KATIA CRISTINA KIMURA

Linfoma canino: papel do meio ambiente

São Paulo
2012

KATIA CRISTINA KIMURA

Linfoma canino: papel do meio ambiente

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento: Departamento de Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:
Prof[a]. Dr[a]. Maria Lúcia ZaidanDagli

Co-orientador :

Prof. Dr. Ricardo Augusto Dias

São Paulo

2012

Nº CLASSIFICAÇÃO

Nº TOMBO
032989

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2596
FMVZ

Kimura, Katia Cristina
Linfoma canino: papel do meio ambiente / Katia Cristina Kimura. -- 2012.
139 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli.

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Augusto Dias.

1. Linfoma. 2. Cães. 3. Humanos. 4. Fatores ambientais. 5. Questionário epidemiológico. 6. Geoprocessamento. I. Título.

PARECER DA COMISSÃO BIOÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Linfoma canino: papel do meio-ambiente", protocolado sob o nº1424/2008, utilizando cães atendidos pelo Serviço de Clínica Veterinária e Necropsia do Hospital Veterinário da FMVZ e prontuários e lâminas de citologia arquivados pelo Laboratório Clínico da referida Faculdade, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

We certify that the Research "Dog's lymphoma: environmental factors", protocol number 1424/2008, under the responsibility Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved "ad referendum" of the meeting.

São Paulo, 08 de setembro de 2008

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP Brasil
05508-270

Fone / Fax: +55 11 3091-7757
+55 11 3091-7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: KIMURA, Katia Cristina

Título: Linfoma canino: papel do meio ambiente.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli, cuja elegante competência me impulsionou a seguir com o coração determinado pelos tortuosos caminhos da vida e da profissão. Agradeço-a como uma filha agradece a mãe, ao olhar para trás e perceber seu apoio constante, sua confiança, sua inteligência e sua disposição direcionados a mim, seja nos momentos de tranquilidade e alegria, seja nos de conturbada turbulência. Minha sempre verdadeira admiração pela mistura de força, generosidade, respeito, equilíbrio e delicada perseverança que sua presença representa.

Ao Prof. Dr. Ricardo Augusto Dias, pela atenção e pela co-orientação para o desenho do estudo, para a estatística e para o geoprocessamento.

Á Marguiti, pela ajuda incessante no laboratório, sempre com otimismo, eficácia e boa vontade, cujas qualidades me inspiram e cuja amizade passei a estimar.

À bolsista de iniciação científica Danielle Zanini, a qual contribuiu muito para a pesquisa do questionário epidemiológico.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, e ao Registro de Câncer da Cidade de São Paulo, à Profa. Dra. Maria do Rosário Latorre, ao doutorando Gabriel Laporta e à doutoranda Fernanda Mitchels, por fornecerem apoio e significativo conhecimento na área epidemiológica e pelo fornecimento de dados fundamentais para a conclusão desta tese.

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo apoio financeiro (Edital 18) e pelas valiosas sugestões ao estudo.

Às Universidades Anhembi Morumbi e UNISA, à Provet e ao Hospital Rebouças pelo fornecimento dos dados de cães portadores de linfoma.

À minha família e aos amados amigos, os quais me acompanham sob todas as circunstâncias nesta jornada.

RESUMO

KIMURA, K. C. **Linfoma canino**: papel do meio ambiente. [Canine lymphoma: role of environment]. 2012. 139f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O linfoma é uma neoplasia maligna do tecido linfóide, sendo reconhecidamente uma doença similar nos cães e no homem. Este trabalho teve como objetivo investigar se os fatores ambientais da cidade de São Paulo poderiam ser associados ao desenvolvimento de linfomas em cães. Para tanto, três estudos foram realizados. Primeiramente procedemos à realização de um estudo retrospectivo abordando o diagnóstico e a imunofenotipagem dos linfomas em cães em São Paulo. Foi feito um levantamento dos casos de linfoma coletados nos arquivos do Serviço de Patologia Animal do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, de 1995 a 2009. Os linfomas caninos foram diagnosticados morfologicamente de acordo com a classificação de Kiel atualizada. Foram coletados dados como raça, gênero e idade. Os casos de linfomas foram submetidos à imunofenotipagem, por meio de imuno-histoquímica, usando-se anticorpos primários anti-CD3 (linfócitos T) e anti-CD79a (linfócitos B). Cães sem raça definida e sem predileção de gênero foram os mais acometidos por linfomas. Em relação ao resultado da imunofenotipagem, 55 (85%) linfomas tiveram origem de células T e 10 (15%) tiveram origem de células B. Um segundo estudo vislumbrou aplicar um questionário epidemiológico a 83 proprietários de cães portadores de linfomas e a 84 controles. A análise multivariada dos resultados demonstrou que cães que viviam em ambientes externos e próximos às ruas ou avenidas movimentadas (mais de 50 veículos por minuto em um raio de 100 metros) apresentaram maior risco de desenvolver linfomas. O terceiro estudo procurou comparar a distribuição de casos de linfomas caninos e humanos na cidade de São Paulo. De 8804 casos de LNH em humanos do Registro de Câncer da cidade de São Paulo, foram selecionados aleatoriamente 629 casos, entre 1996 e 2006. Paralelamente, 579 casos de linfoma não Hodgkin (LNH) em cães, ocorridos no mesmo período, foram obtidos de cinco hospitais veterinários de referência na mesma cidade. Todos os casos foram georreferenciados de acordo com o código de endereçamento postal. A correlação de Spearman mostrou-se altamente significante para a correlação entre a distribuição espacial de linfomas caninos e humanos. Essa sobreposição espacial dos casos de LNH sugere que os cães e os humanos podem compartilhar fatores etiológicos comuns, e que possivelmente os fatores ambientais podem desempenhar um papel na etiologia da LNH em ambas as espécies. Estes resultados sugerem um papel dos poluentes ambientais para o risco de desenvolvimento de linfoma nos cães. Pesquisas futuras devem avaliar os componentes da poluição do ar que podem se relacionar ao desenvolvimento de linfoma.

Palavras-chave: Linfoma. Cães. Humanos. Fatores ambientais. Questionário epidemiológico. Geoprocessamento.

ABSTRACT

KIMURA, K. C. **Canine lymphoma**: role of the environment. [Linfoma canino: papel do meio ambiente]. 2012. 139f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Lymphoma is a malignant neoplasm of lymphoid tissue, recognized as a similar disease in dogs and humans. This study aimed to investigate whether environmental factors of the city of São Paulo could be associated with the development of lymphoma in dogs. For this, three studies were conducted. First we proceed to carry out a retrospective study covering the diagnosis and the immunophenotyping of lymphomas in dogs in Sao Paulo. We conducted a survey of lymphoma cases collected in the archives of the Pathology Service of the Department of Animal Pathology, Faculty of Veterinary Medicine at the University of Sao Paulo, from 1995 to 2009. The canine lymphomas were diagnosed morphologically according to the updated Kiel classification. Data as race, gender and age were collected. Lymphomas underwent immunophenotyping through immunohistochemistry, using primary antibodies anti-CD3 (T lymphocytes) and anti-CD79a (B lymphocytes). Mongrel dogs and with no predilection of gender were the most affected by lymphoma. In relation to the result of immunophenotyping, 55 (85%) lymphomas had T-cell origin and 10 (15%) come from B cells. A second study was an epidemiological questionnaire applied to 83 owners of dogs with lymphoma and to 84 controls. Multivariate analysis results suggested that dogs that live outdoors and close to busy highways or streets (more than 50 vehicles per minute within a radius of 100 meters) had a higher risk of developing lymphomas. The third study sought to compare the distribution of cases of canine lymphoma and human lymphomas in São Paulo. From 8804 cases of human non Hodgkin Lymphoma (NHL) recorded at the Cancer Registry of São Paulo, 629 cases were randomly selected between 1996 and 2006. In addition, 579 cases of NHL in dogs were obtained from five veterinary hospitals veterinary in the same period in Sao Paulo. All cases were geocoded according to the postal code. The Spearman correlation was highly significant between spatial distribution of human and canine lymphoma. The spatial overlap in cases of NHL suggests that dogs and humans may share common etiological factors, and possibly environmental factors may play a role in the etiology of NHL in both species. These results suggest a role of environmental pollutants in the risk of development of lymphoma in dogs. Future research should evaluate the components of air pollution that may be involved in the development of lymphoma.

Keywords: Lymphoma. Dogs. Environmental factors. Epidemiological questionnaire. Geographic Information System.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Classificação Anatômica do linfoma canino proposto pela OMS.....39
Quadro 2- Estadiamento do linfoma canino proposto pela OMS.....42
Quadro 3- Classificação do linfoma canino - REAL-OMS.....45
Quadro 4- Classificação do linfoma canino -Updated Kiel Classification.....46
Quadro 5- Diferentes subtipos de linfoma canino cutâneo T.....47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Análise univariada de todas as variáveis de 83 casos de linfoma em cães e de 84 casos controle, de março a agosto de 2010 69
Tabela 2- Estimativa de fatores de risco das variáveis entre si pela análise univariada de março a agosto de 2010 70
Tabela 3- Modelo de múltiplos fatores de risco associados ao desenvolvimento de linfoma canino, de março a agosto 2010. Análise multivariada 71
Tabela 4- Resultado do modelo espacial autoregressivo da Densidade Kernel dos casos de Linfoma não Hodgkin humano em função dos casos caninos nos distritos do município de São Paulo, SP, Brasil 81
Tabela 5- Correlação de Spearman das variáveis em estudo 81
Tabela 6-Composição da frota no horário de pico da manhã e tarde (valores absolutos) 96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Processo de maturação do linfócito B e T e estrutura da imunoglobulina ... 24
Figura 2-Estágio de maturação da célula B ... 25
Figura 3 -Distribuição de acordo com a raça em cães diagnosticados com linfoma. Serviço da Patologia Veterinária da FMVZ-USP, Brasil, de 1995 a 2009 ... 57
Figura 4 -Classificação histological do linfoma T canino. Serviço da Patologia Veterinária da FMVZ-USP, Brasil, de 1995 a 2009 ... 58
Figura 5 -Classificação histological do linfoma T cutâno canino. Serviço da Patologia Veterinária da FMVZ-USP, Brasil, de 1995 a 2009 ... 59
Figura 6-Classificação histological do linfoma B canino. Serviço da Patologia Veterinária da FMVZ-USP, Brasil, de 1995 a 2009 ... 59
Figura 7- Baço. Linfoma B, subtipo Burkitt. Células de tamanho intermediário com núcleo redondo, cromatina irregular e nucléolo evidente. Padrão‘starry sky’devido a alta concentração de macrófagos reativos. Hematoxilina and Eosina (H&E), aumento 400x. Bar=10µm. 60
Figura 8-Baço, Spleen. Linfoma B, subtipo Burkit marcados com CD79. Imunofenotipagem, aumento 400x. Bar=10µm.
Figura 9-Linfonodo - Linfoma B subtipo mediastinal/anaplásico. Grandes células anaplásicas com abundante citoplasma. H&E, aumento 400x. Bar=5µm
Figura 10-Intestino. Linfoma T subtipo linfocítico de pequenas células. Células de tamanho pequeno com núcleo redondo e ausência de nucléolo positivos para CD3. Imunofenotipagem, aumento 400x. Bar=10µm.
Figura 11- Linfonodo. Linfoma T subtipo linfoblástico. Células de tamanho intermediário com núcleo vesicular, cromatina periférica, nucléolo pequeno evidente. H&E, aumento 400x. Bar=10µm.
Figura 12- Linfonodo. Linfoma T subtipo plasmocitóide. Grandes células com núcleo excêntrico, binucleação occasional, citoplasma acidofílico. H&E, aumento 400x. Bar=10µm. Serviço da Patologia Veterinária da FMVZ-USP, Brasil, de 1995 a 2009
Figura 13- Distribuição espacial do Linfoma não Hodgkin em humanos (à esquerda) e em cães (à direita) nos diferentes distritos da cidade de São Paulo,Brasil. ... 79
Figura14- A, B e C Densidade Kernel de casos de Linfoma não Hodgkin em humanos na cidade de São Paulo, SP, Brasil, em função de escala de 500m, 1km e 2 km, respectivamente. ... 80
Figura 15- Distribuição espacial da distribuição populacional na cidade de São Paulo. ... 83
Figura 16-Distribuição espacial da distribuição de favelas na cidade de São Paulo. 84
Figura 17-Distribuição espacial da distribuição da renda média populacional na cidade de São Paulo. ... 85
Figura 18-Distribuição espacial do nível de alfabetização na cidade de São Paulo. . 86
Figura 19-Distribuição espacial da distribuição de rede de água na cidade de São Paulo. ... 87
Figura 20-Distribuição espacial das redes de esgotos na cidade de São Paulo. ... 88
Figura 21-Localização do Centro Expandido (à esquerda) e localização das estações de monitoramento do ar (à direita) na cidade de São Paulo. ... 91
Figura 22-Distribuição das emissões de monóxido de carbono - CO (em kg/h) na cidade de São Paulo, segundo o volume do tráfego veicular obtido a partir do software EMME/2 (cada quadrado representa uma área de 25 km2). ... 92

Figura 23-Distribuição das emissões de dióxido de nitrogênio - emissões de NOx na cidade de São Paulo, segundo o volume do tráfego veicular obtido a partir do software EMME / 2 (cada quadrado representa uma área de 25 km_2)..... 93
Figura 24-Detalhes da concentração de CO na região central de São Paulo, carregado segundo o volume do tráfego veicular (a espessura dos trames é proporcional ao volume do tráfego). 93
Figura 25-Distribuição das emissões dos Hidrocarbonetos - HC (em kg / h), segundo o volume do tráfego veicular obtidos a partir do software EMME / 2 (cada quadrado representa uma área de 25 km_2)..... 94
Figura 26-Distribuição dos veículos no pico da manhã e tarde (%), 2007..... 97
Figura 27-Volume de Tráfego total (veículos automotores, motocicletas, ônibus e caminhão) no período de 7 às 10hs, no sentido Bairro-Centro, 2007. 99
Figura 28-Volume de Tráfego no período de 17 às 20hs, no sentido Bairro-Centro, 2007. 100
Figura 29-Volume de Tráfego no período de 7 às 10hs, no sentido Centro-Bairro, 2007. 101
Figura 30-Volume de Tráfego no período de 17 às 20hs, no sentido Centro-Bairro, 2007. 102
Figura 31-Mapas do Volume do Tráfego veicular comparação com os mapas da Densidade Kernel entre os casos de linfoma humano (A) e canino (D)..... 103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-D	2,4 ácido fenoxiacético
BALT	tecido linfóide associado aos brônquios
BLV	vírus da leucemia bovina
BCR	receptor da célula B
CALT	tecido linfóide associado ao olho (conjuntiva)
CD	cluster de diferenciação
CEP	código de endereçamento postal
CET	companhia de engenharia de tráfego de são paulo
CETESB	companhia tecnológica e saneamento ambiental
CO	monóxido de carbono
CH_4	metano
DAB	3,3´-diaminobenzidina
DTPD	densidade do tráfego ponderada pela distância
EBV	vírus epstein barr
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FeLV	vírus da leucemia felina
FISH	hibridização in situ
FIV	vírus da imunodeficiência felina
FMVZ	faculdade de medicina veterinária e zootecnia
GALT	tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal
HAP	hidrocarboneto policíclico aromático
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HOVET	hospital veterinário
HC	hidrocarboneto
HPAs	hidrocarbonetos arocmáticos policíclicos
IARC	agência internacional para pesquisa sobre o câncer
IBGE	instituto brasileiro de geografia e estatítica
IL-1	interleucina 1
Ig	imunoglobulina
Kg	kilo
LB	linfócito B
LNH	linfoma não Hodgkin
LT	linfócito T
LTH	linfócito T helper
LSAB	estreptavidina biotina
MALT	tecidos linfóides associados à mucosa
MDR	resistência à múltiplas drogas (MDR)
MHC	complexo de histocompatibilidade principal
NCI	instituto nacional de câncer
NCI-WF	instituto nacional de câncer - working formulation
NK	natural killer
NHL	non-Hodgkin Lymphoma
NH_3	amônio
NOx	óxido de nitrogênio
NO_2	dióxido de nitrogênio
OMS	organização mundial da saúde

PM10	material particulado com tamanho de 10 micra
PM12,5	material particulado com tamanho de 2,5 micra
REAL	revised european american Lymphoma
SALT	tecido linfóide associado à pele
SOx	óxido de enxofre
SO_2	dióxido de enxofre
SRD	sem raça definida
TCDD	2,3,7,8-tetracloro-p-dioxina
TCR	receptor do linfócito T
TdT	gene desoxinucleotidiltransferase terminal
TGF-β	fator de crescimento tumoral beta
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
UNESP	universidade estadual de são paulo
USP	universidade de são paulo
VALT	tecido linfóide associado aos vasos sanguíneos
VOCs	compostos orgânicos voláteis
VPT	departamento da patologia animal
WHO	world human organization

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
<	menor
>	maior
=	igual
ºC	graus Celsius
µm	micra

SUMÁRIO

RESUMO **15**
1 INTRODUÇÃO **21**
2 LINFOMA: REVISÃO DE LITERATURA **23**
2.1 ÓRGÃOS LINFÓIDES 23
2.1.1 Ontogenia do linfócito B 25
2.1.2 Ontogenia do linfócito T 27
2.2.1 Definição 29
2.2.2 Etiologia 30
2.2.3. Incidência 38
2.3 CLASSIFICAÇÃO ANATÔMICA DO LINFOMA: 39
2.3.1 Forma multicêntrica 39
2.3.2 Forma alimentar 40
2.3.3 Forma mediastínica 41
2.3.4 Forma cutânea 41
2.3.5 Forma extranodal 42
2.4 ESTADIAMENTO E SUBESTÁGIO CLÍNICO DO LINFOMA 42
2.5 CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA 43
2.6 IMUNOFENOTIPAGEM DO LINFOMA 47
2.7 DIAGNÓSTICO, TRATAMENTO E PROGNÓSTICO 48
3 OBJETIVO **52**
3.1 OBJETIVO GERAL 52
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 52
4 RESULTADOS e DISCUSSÃO **53**
4.1 CAPÍTULO I **53**
Aspectos Morfológicos e Imunofenotipagem dos cães com linfoma atendidos pelo Serviço De Patologia Animal da Faculdade De Medicina Veterinária e Zootecnia Da Universidade De São Paulo, Brasil **53**
4.1.1 INTRODUÇÃO 54
4.1.2 MATERIAIS E MÉTODOS 55
- Amostras 55
- Imuno-histoquímica 56
- Classificação histopatológica 56

4.1.3 RESULTADOS 57
4.1.4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO 61
4.2 CAPÍTULO II **64**
Relato de uma pesquisa para detectar fatores ambientais relacionados ao desenvolvimento de linfomas caninos. **64**
4.2.1 INTRODUÇÃO 65
4.2.2 MATERIAIS E MÉTODOS 67
- Delineamento da população 67
- Entrevista 67

Análise estatística 68
4.2.3 RESULTADOS 68
4.2.4 DISCUSSÃO 71

4.3 CAPÍTULO III 76
Distribuição Espacial do Linfoma não Hodgkin em Humanos e em Caninos na Cidade de São Paulo: um potencial papel etiológico da poluição ambiental. 76
5. RESULTADO DA ANÁLISE DO TRÁFEGO NA CIDADE DE SÃO PAULO..... 96
6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO GERAL..... 104
7.REFERÊNCIAS 108
APÊNDICE A- Questionário epidemiológico aplicado aos proprietários dos cães durante março 2010 à agosto de 2010. 130
ANEXO 1- Artigo original (inglês) publicado na Brazilian Journal Veterinary Pathology. 132

1 INTRODUÇÃO

Com os avanços da medicina veterinária houve um prolongamento da vida dos animais domésticos, aumentando também a incidência de doenças crônicas, como o câncer (WITHROW, 2007; BREEN; MODIANO, 2008).

O linfoma na espécie canina é mais agressivo, em comparação ao de outras espécies (JUBB, 2008). Ao contrário do linfoma nos seres humanos, o linfoma canino é diagnosticado frequentemente como linfoma de alto grau. Os motivos deste achado são desconhecidos, mas relata-se que os cães apresentam-se geralmente em estádios avançados ao diagnóstico, e isto pode ser devido à morosidade para o proprietário perceber que o seu cão está doente (PONCE et al., 2010).

O linfoma tem uma grande importância, tanto na medicina humana, quanto na medicina veterinária, devido à alta incidência nos últimos anos. Nos humanos há 5 novos casos em mulheres e 4 novos casos em homens a cada 100.000 habitantes no Brasil, para o Linfoma não Hodgkin (INCA, 2012). A incidência anual nos cães é de 24 a 33 casos de linfoma para cada 100.000 cães (PASTOR et al., 2009).

O Linfoma não Hodgkin (LNH) em humanos é similar ao linfoma canino nos seguintes aspectos: morfológico, imunofenotípico, genotípico, clínico e prognóstico (FOURNEL-FLEURY et al., 1997, 2002; VEZZALI et al., 2010; PONCE et al., 2010; THOMAS et al., 2011). As classificações histopatológicas do linfoma nos animais domésticos são adaptações das classificações clássicas em humanos (FOURNEL-FLEURY et al., 2002; VEZZALI et al., 2010). Tal similaridade foi identificada patogeneticamente e citogeneticamente em ambas as espécies. Desse modo, vários tipos de biomarcadores e aberrações cromossômicas que podem ser investigados nas neoplasias humanas também podem ser investigadas nos animais domésticos (KYRTOPOULOS et al.,2006; BREEN ; MODIANO, 2008).

Ambas as espécies compartilham a exposição aos contaminantes ambientais do ar, solo, água, e dividem as condições de vida, podendo o cão ser utilizado como sentinela do risco à saúde humana e como modelo para diversas doenças (BERNY et al.,1995; KNAPP ; WATERS, 1997; BUKOWSKI, 1997, 1998; BACKER et al., 2001).

Fatores ambientais têm sido relacionados ao desenvolvimento de linfoma em humanos e nos cães (GAVAZZA et al., 2001; GOUVEIA et al., 2001; STAGNARO et al., 2004; SKIBOLA, 2007; MARCONATO et al., 2009; MERLO et al., 2010).

A cidade de São Paulo é a maior cidade do Brasil e a quinta maior do mundo em área urbana (IBGE, 2010; HABERMANN et al., 2011). Possui 11.244.369 habitantes (IBGE 2010) e 2.508.401 cães em uma área de 1.523 km_2, sendo a proporção de 1:4 (CANATO, 2010).

A cidade de São Paulo possui uma alta concentração de poluição no ar, causada principalmente por cinco milhões de carros e um milhão de motocicletas, similarmente à outras grandes cidades do mundo (México e New York) (TARIFA, 2000; HABERMANN, 2011). As principais avenidas de São Paulo, como a Marginal Tietê, a Marginal Pinheiros e a Avenida Bandeirantes possuem circulação de 400.000 veículos/dia, 300.000 veículos/dia e 500.000 veículos/dia, respectivamente (TARIFA, 2000). Registros de poluição do ar mostram que a cidade de São Paulo é altamente poluída por materiais de partículas de diversos tamanhos, como $PM_{2,5}$ (material particulado com tamanho de 2,5 µm (micra) e PM_{10} (material particulado com tamanho de 10µm), ambos oriundos principalmente de veículos (LANDMANN, 2004). Uma meta-análise mostrou que, com o desenvolvimento econômico e com a urbanização dos países em desenvolvimento, houve um rápido aumento do número de veículos, a maior fonte responsável pela poluição do ar. Na área central do centro expandido da cidade de São Paulo é possível encontrar a maior concentração de poluentes (CO, NO_2 e PM_{10}), consequência do intenso tráfego (TOLEDO et al., 2010). A poluição do ar pode estar associada ao câncer nos cães e nos seres humanos, já comprovado por estudos experimentais e epidemiológicos (FIGHERA, 2000; GAVAZZA et al., 2001; GOUVEIA et al., 2001; STAGNARO et al., 2004; SKIBOLA, 2007; MARCONATO et al., 2009; PASTOR, et al., 2009; MERLO et al., 2010).

Estudos com camundongos expostos à poluição atmosférica urbana mostraram maior formação de tumores de pulmão induzidos por uretana, composto encontrado na atmosfera poluída (REYMAO et al., 1997; CURY et al., 2000; PEREIRA et al., 2011).

2 LINFOMA: REVISÃO DE LITERATURA

O linfoma não Hodgkin (LNH) constitui um grupo heterogêneo de neoplasias malignas dos tecidos linfóides, com diferentes subtipos histológicos e apresentações clínicas, e representam a quinta forma mais comum de câncer em seres humanos (HALLACK et al. 2005) e terceiro tumor mais comum em cães (GREENLEE, 1990). A etiologia da doença permanece desconhecida e vários fatores são citados como possíveis hipóteses (STAGNARO et al., 2001; JUBB, 2008; NORTH ; BANKS, 2009).

2.1 ÓRGÃOS LINFÓIDES

O sistema linfóide constitui-se de uma população de linfócitos B, T e natural killer (NK). Estes linfócitos são responsáveis pela resposta imunológica inespecífica (NK) e pela resposta imunológica específica humoral e celular (linfócitos B e T, respectivamente). Estas células estão presentes nos órgãos linfóides primários (medula óssea e timo) e nos órgãos linfóides secundários (linfonodos, baço, tecidos linfóides associados à mucosa - MALT) (ABBAS, 2008).

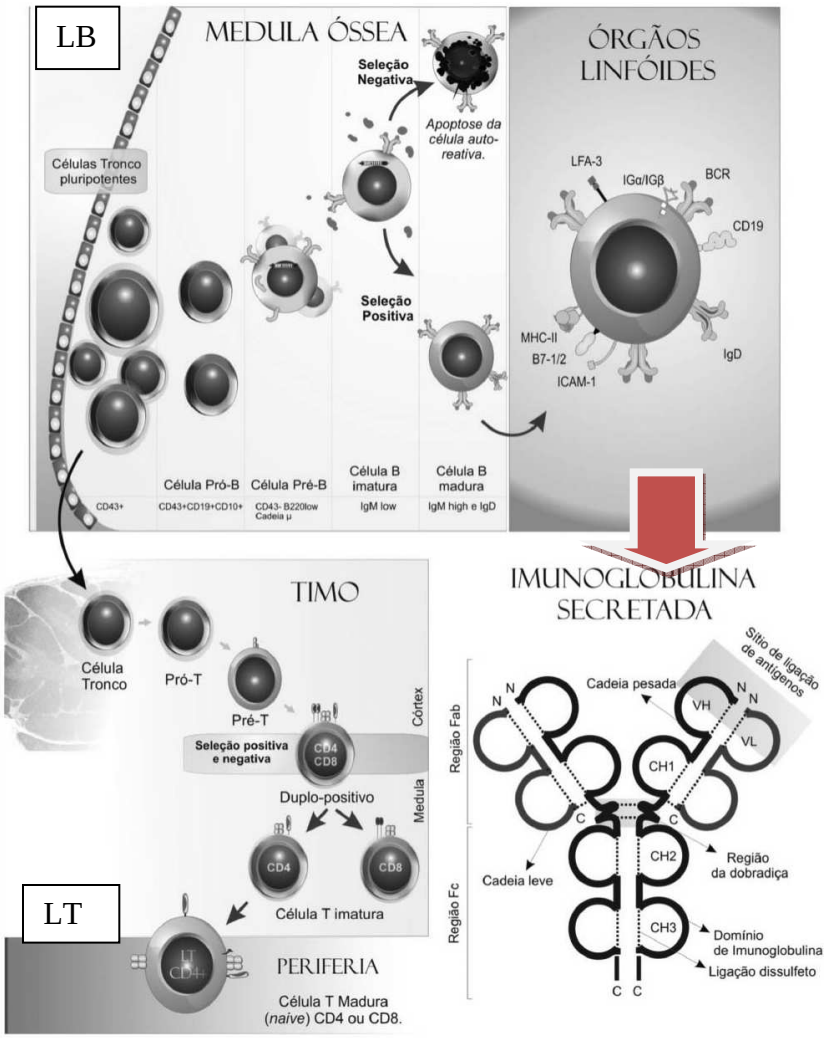
O MALT é composto pelo GALT (tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal), pelo BALT (tecido linfóide associado aos brônquios), pelo NALT (tecido linfóide associado à narina), pelo SALT (tecido linfóide associado à pele), pelo VALT (tecido linfóide associado aos vasos sanguíneos) e pelo CALT (tecido linfóide associado à conjuntiva ocular), além de órgãos acessórios do trato digestório (tonsilas linguais, faringeanas, glândula parótida), dentre outros (ABBAS, 2008).

Nos órgãos linfóides primários ocorrem a produção e a maturação dos linfócitos T e B (hematopoiese) e nos órgãos linfóides secundários ocorre a ativação dessas células (GOLDSBY et al., 2003).

Os linfócitos B são responsáveis pela resposta imunitária humoral (pela produção de anticorpos). Os linfócitos B são oriundos das células pluripotentes da medula óssea (ABBAS et al., 2008).

As células pluripotentes são produzidas no saco vitelino, migram para o espaço de Disse no fígado e vão para o endósteo na medula óssea. Inicia-se, então, a hematopoiese, com um progenitor linfóide produzindo os linfócitos T e B. Os linfócitos B são produzidos e maturados na medula óssea, e vão para os órgãos linfoides secundários, sendo capazes de produzir os anticorpos (imunoglobulinas), ao contrário dos linfócitos T, que também são oriundos da medula óssea, mas precisam migrar para o timo para amadurecerem (ABBAS et al., 2008) - ilustrado na figura 1 abaixo. O Linfoma não Hodgkin possui diferentes tipos e subtipos histológicos, oriundos de cada fase da ontogenia dos linfócitos B e T (SMEDBY, 2006).

Figura 1-Processo de maturação do linfócito B e T e estrutura da imunoglobulina

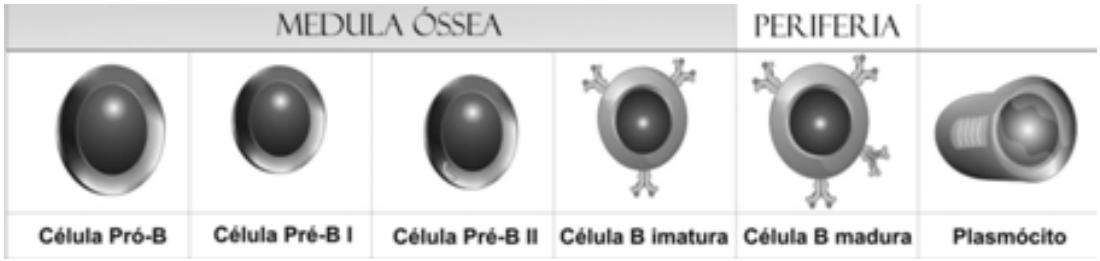


Fonte: Junior et al. **Rev. Bras.Reumatol**., v. 50, n. 5, p. :552-580, 2010

2.1.1 Ontogenia do linfócito B

A maturação do linfócito B é dividida em duas fases: fase independente de antígeno, em que ocorre a maturação do linfócito B na medula óssea (órgão linfóide primário), e a fase dependente de antígeno no órgão linfóide secundário, em que ocorre a diferenciação do linfócito B em plasmócitos (produz imunoglobulinas) e células B de memória - figura 2:

Figura 2-Estágio de maturação da célula B



Fonte: Junior et al. **Rev. Bras.Reumatol**., v. 50, n. 5, p. :552-580, 2010

As células pró B e pré B são chamadas de linfoblastos B precursores. A maturação dos linfócitos B inicia-se pelos linfócitos pró B, os quais expressam clusters de diferenciação (CD19, CD22 - proteínas membrânicas), porém ainda não possuem imunoglobulinas (WEISENBURGER et al., 1990). As células pró B se diferenciam em células pré B pela ação do gene c-kit e da IL-7, expressando uma molécula de cadeia μ (IgM) e um único precursor da cadeia leve (kappa, k, ou lambda, λ) (WEISENBURGER et al., 1990). Durante o processo de maturação, as células que não expressam receptor de célula B (BCR) são eliminadas por apoptose (seleção negativa). Os linfócitos B imaturos que expressam BCR começam a se diferenciar (seleção positiva) (ABBAS et al., 2008). Quando atingem a maturação, os linfócitos B podem ser ativados, podem se proliferar e se transformar em plasmócitos (JUNIOR et al., 2010). Com a expressão do gene desoxinucleotidiltransferase terminal (TdT), e dos genes ativadores da recombinação (RAG 1 e RAG 2), a partir das células pré B, inicia-se a recombinação gênica, definida pela porção variável (Fab) das cadeias leve e pesada (ABBAS et al., 2008).

A recombinação ou rearranjo gênico permite produzir uma extraordinária diversidade de anticorpos a partir de uma quantidade relativamente pequena de capacidade codificadora no DNA. A imunoglobulina é formada por duas cadeias pesadas e duas cadeias leves unidas por pontes de dissulfeto (MAGRATH, 1990).

O locus responsável pela codificação na porção variável (Fab) das cadeias leves e pesadas de anticorpos possui diversos segmentos gênicos, agrupados em regiões denominadas V (variável) e J (junção) na cadeia leve e V, D (diversidade) e J na cadeia pesada. Na cadeia leve, ocorre a recombinação de uma única cadeia κ (kappa) ou λ (lambda) (MAGRATH, 1990; JUNIOR et al., 2010).

Na cadeia pesada, os seguimentos D e J se unem com o segmento V, produzindo um único domínio variável na imunoglobulina, que confere especificidade de reconhecimento do anticorpo. Se constituir no domínio único μ, produzirá IgM; se constituir no domínio є, produzirá IgE; se constituir no domínio δ produzirá IgD; e se constituir no domínio γ produzirá IgG (MAGRATH, 1990; JUNIOR et al., 2010). As células B imaturas expressam a imunoglobulina IgM (JUNIOR et al., 2010).

As células consideradas maduras co-expressam duas cadeias peptídicas, denominadas IgA (CD79a) e IgB (CD79b), e produzem as imunoglobulinas IgM e IgD. Estas células B migram para os órgãos linfóides secundários e são capazes de se ligar ao antígeno (GRAY et al., 2006). Diferentemente do linfócito T, o linfócito B se liga ao antígeno pelo BCR por meio da imunoglobulina IgM e IgD, ocorrendo um processamento interno desse antígeno, sem a necessidade da presença da célula apresentadora de antígeno e da exteriorização do MHC II. Quando o MHC II é ativado, dentro do linfócito B, ele migra à superfície celular, libera as citocinas e estimula a divisão e a diferenciação da célula B em plasmócitos, os quais produzirão os anticorpos (imunoglobulinas) (GRAY et al., 2006; LIU, 2006).

Na camada cortical do linfonodo, os linfócitos B vão para os folículos linfáticos. Como o estímulo antigênico, os folículos linfáticos proliferam-se e tornam-se os folículos secundários, compostos pelo centro germinativo, pela zona de manto e pela zona marginal. Os linfócitos ‘’virgens’’ compõem a zona de manto e a zona marginal, na qual se acumulam os linfócitos B de memória. Nos centros germinativos estão presentes os linfócitos B, que se transformam em centroblastos (grandes células não clivadas) pelo estímulo antigênico (GRAY et al., 2006; ABBAS et al., 2008).

Os centroblastos dão origem aos centrócitos (pequenas células clivadas), pela hipermutação somática, ou seja, são criadas mutações pontuais que originam diferentes aminoácidos na seqüência final da imunoglobulina. Os centrócitos ocupam o pólo externo do centro germinativo. (GRAY et al., 2006; ABBAS et al., 2008)

Na zona paracortical estão os linfócitos T e na região medular estão os plasmoblastos e os plasmócitos, compondo os cordões e os seios medulares. No baço, os linfócitos B ocupam a polpa branca e os linfócitos T compõe a região periarteriolar. Na polpa vermelha ocorre a destruição das hemácias. Os linfócitos T ou B estimulados imunologicamente levam a uma resposta imune e podem atingir o Tecido Linfóide Associado à Mucosa (MALT) e outros linfócitos T podem se fixar na derme como linfócito T cutâneo (GRAY et al., 2006; ABBAS et al., 2008).

2.1.2 Ontogenia do linfócito T

O linfócito T é reponsável pela resposta imunitária celular e pelo auxílio ao sistema imunitário. Eles se dividem em linfócitos T auxiliares ou helpers (CD4), linfócitos T citotóxicos (CD8) (ABBAS et al., 2008) e, mais recentemente na ontogenia humana, detectaram-se os linfócitos T γδ e LT 17 (JUNIOR et al., 2010).

Os linfócitos T auxiliares ou helpers (CD4) estimulam a proliferação dos linfócitos T citotóxicos e supressores contra o antígeno, além de estimularem a proliferação do linfócito B e sua diferenciação em plasmócitos. Dividem-se em LTH1 (secretor de INF-γ e IL-2) e LTH2 (secretor de IL-4,IL-10 e IL-13) (JUNIOR et al., 2010).

Os linfócitos citotóxicos (CD8) reconhecem o MHC I e agem diretamente contra os antígenos, por meio da liberação da perforina, que causa a formação de um poro na membrana e a ruptura osmótica da célula, ou pela liberação de mediadores (granzima) que levam a apoptose. Geralmente estão envolvidos com processos antivirais ou antitumorais. A função dos linfócitos supressores é inativar os linfócitos citotóxicos e auxiliares, juntamente com as citocinas TGFβ, a IL-4 e a IL-10 (GRAY et al., 2006; LIU, 2006).

Outras subpopulações, como os linfócitos LTH17 (secretor de IL-17, IL-21 e IL-22), NKT e LTγδ (atua nas mucosas e pele), representam populações muito heterogêneas quanto à capacidade funcional e atuam, ora como efetoras, ora como reguladoras (ABBAS et al., 2008; JUNIOR et al., 2010).

Os precursores do linfócito T (CD8-, CD4- e TCR-) são produzidos na medula óssea e vão em direção ao timo (timócitos-pró T) para amadurecerem e se tornarem ativos em outros órgãos linfóides secundários. Para que os linfócitos reconheçam uma grande variedade de antígenos, ocorre a recombinação somática das cadeias polipeptídicas αβ e γδ do receptor do linfócito T(TCR), em que β e δ são codificadas pelos segmentos génicos V(D)JC, enquanto que a α e γ são codificadas pelos segmentos V,J e C. Em cerca de 95% dos linfócitos circulantes, o TCR é composto por αβ (JUNIOR et al., 2010).

Os timócitos ou linfócitos imaturos expressam TCR e ligam-se ao MHC I ou II, e podem ser duplo-positivos (CD4+,CD8+). No decorrer do amadurecimento, após a recombinação gênica e a ativação das RAGS 1 e 2, os linfócitos podem expressar apenas um cluster de diferenciação: CD4 (linfócito T auxiliar) ou CD8 (linfócito T citotóxico) (ABBAS et al., 2008). Os linfócitos são submetidos à seleção positiva e negativa no córtex do timo. Os timócitos que não se ligarem a classe MHC I (CD8) e II (CD4), entram em apoptose (95%) (ABBAS et al., 2008).

Os timócitos αβ que sofreram a seleção positiva e expressam apenas CD4 ou CD8 entram em contato com as células dendríticas e macrófagos (células apresentadoras de antígenos), na medula tímica, prontos para deixarem o timo e exercerem as suas funções nos órgãos linfóides secundários. Aqueles que têm pouca afinidade com esses complexos morrem por apoptose (seleção negativa) (JUNIOR et al., 2010). Desse modo, no processo de maturação é necessário que o linfócito T reconheça os antígenos próprios pelo MHC I e II. As células apresentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans e células B) fagocitam os antígenos pela via exógena (ABBAS et al., 2008).

Os antígenos são processados endogenicamente, transformados em peptídeos ou epitopos, e vão para o interior de uma célula apresentadora de antígeno, onde são unidas ao MHC de classe II e expostas pela superfície da célula para serem reconhecidas pelo TCR ou pelo linfócito T (CD4), completando o ciclo de maturação do linfócito T(GRAY et al., 2006).

2.2 DEFINIÇÃO, ETIOLOGIA E INCIDÊNCIA

2.2.1 Definição

O linfoma é a neoplasia maligna dos linfócitos proveniente de órgãos linfóides primários (timo e medula óssea) e orgãos linfóides secundários (linfonodos, baço, fígado), podendo ocorrer em qualquer tecido. Ele representa 83% dos casos de neoplasias malignas hematopoiéticas sofridas pelo cão (VAIL; YOUNG, 2007; DALECK, 2009). Ao acometer a medula óssea ou o sangue periférico denomina-se leucemia (FELDMAN et al., 2000). Acomete várias espécies, como os seres humanos, os cães, os felinos, os bovídeos, os eqüinos e outras espécies, principalmente animais de meia idade e idosos, sem predileção de gênero (FOURNEL-FLEURY et al., 2002; ETTINGER, 2003).

Nos cães, o linfoma tem aparecimento espontâneo e sua etiologia é considerada multifatorial (FISHER ; FISHER, 2004; JUBB et al, 2008). O linfoma em cães ocorre nas formas: multicêntrica, alimentar, cutânea, mediastínica e extranodal (olhos, rins, sistema nervoso central - SNC - e cavidade nasal) (JUBB et al, 2008).

Existem dois tipos de linfoma nos cães: o tipo Hodgkin e o não Hodgkin. O linfoma do tipo não Hodgkin na espécie canina é semelhante ao linfoma não Hodgkin na espécie humana (CARTWRIGHT; WATKINS, 2004). Estas doenças são caracterizadas pela proliferação descontrolada dos linfócitos em várias fases de diferenciação e podem exibir qualquer um dos variados fenótipos histopatológicos e imunoistoquímicos, além de comportamentos clínicos que vão desde indolentes a agressivos (FISHER ; FISHER, 2004; FOURNEL-FLEURY et al., 2002).

A existência do linfoma do tipo Hodgkin em cães é rara e causa polêmica sobre a sua real existência (MACMAHON, 1933; MAEDA et al., 1993), porém nos seres humanos ela existe, apesar de haver uma frequência menor, em comparação com o tipo não Hodgkin (CARTWRIGHT; WATKINS, 2004). O linfoma não Hodgkin acomete principalmente cães adultos, com a idade média de 6 a 7 anos. Não há predisposição de gênero (TESKE et al., 1994; CARLTON; MACGAVIN, 1998; DOBSON et al., 2001; ARESPACOCHAGA et al., 2007; PASTOR et al., 2009).

2.2.2 Etiologia

Muitos estudos associam diferentes fatores de riscos ao desenvolvimento do linfoma, incluindo a hereditariedade (LURIE et al., 2008), fatores genéticos (TOMAS et al.,2011) e a exposição aos fatores ambientais. Porém as causas relacionadas ao linfoma ainda são desconhecidas e multifatoriais (GAVAZZA et al., 2001; LEEUWEN et al., 2009; PONCE et al., 2010). Na oncologia, 80 a 90% dos cânceres são relacionados aos fatores ambientais, incluindo o modo de vida (BELPOMME, 2004). A maioria dos trabalhos identifica a presença dos fatores ambientais (tais como os pesticidas, os poluentes e os produtos químicos) como fator de risco para o desenvolvimento do linfoma nos cães (HAYES et al., 1991, 1995).

Hereditariedade

Os cães da raça Boxer têm um risco maior de desenvolver o linfoma (COHEN et al., 1959; HOWARD et al., 1965; DORN et al., 1967; COHEN et al., 1974).

Em um estudo com 1440 cães da raça Golden Retriver, 50% desenvolveram câncer, principalmente o hemangiossarcoma (risco de 1:5), seguido pelo linfoma (risco de 1:8) (GOLDEN RETRIVIER FOUNDATION, 1998).

As raças de cães com o risco relativo maior de desenvolver o linfoma segundo a literatura são: Pastor Alemão, Rotweiller, Boxer, Poodle, Golden Retrivier, Labrador, Cocker Spaniel, Scotish Terrier, São Bernardo, Bull Mastiff, Basset Hound (MACEWEN et al., 1987; DOBSON et al., 2001;FAN; KITCHELL, 2002).

- **Fatores genéticos**

Em uma célula normal, quando há lesão de seu genoma, o mecanismo de defesa é disparado e o ciclo celular é interrompido, para que a célula tente reparar o erro. Caso este reparo falhe, a célula pode entrar em apoptose ou caminhar para a transformação maligna. Os mecanismos da transformação maligna de uma célula normal envolvem uma série de eventos genéticos (proto-oncogenes, genes supressores e controladores da apoptose, alterações epigenéticas) e também moleculares, que fazem com que a célula perca a resposta aos mecanismos regulatórios, tornando-as independentes. Isso leva a um acúmulo de 5 a 6 mutações no seu genoma, que propiciam o desenvolvimento de câncer (ARGYLE & KHANNA, 2007). A translocação cromossômica em 90% dos casos relaciona-se à presença dos fatores ambientais, os quais podem contribuir para a ativação de oncogenes (N-ras) ou para a inativação de genes de supressão tumoral (p53) e levar a oncogênese do tecido linfóide (VELDHOEN et al.,1998 ; KLUMB, 2001; THOMAS et al., 2003;SUEIRO, 2004).

A transformação maligna dos linfócitos também pode ocorrer pela alteração da expressão do receptor das imunoglobulinas (BCR) ou do receptor das células T (TCR), levando a uma proliferação descontrolada. Durante a ontogênese do linfócito, a recombinação gênica pode levar a uma variedade de clones de células B, envolvendo a quebra e a ligação do DNA dentro do loci, podendo haver ligações aberrantes, que propiciam o desenvolvimento do linfoma (KLUMB, 2001).

Uma análise cromossômica mostrou que houve aberrações cromossômicas evolutivamente conservadas, tanto nos cães, como nos seres humanos. As aberrações foram detectadas com o ganho nos cromossomos 13 e 31 nos cães diagnosticados com linfoma e nos cromossomos 8 e 21 em pessoas diagnosticadas com linfoma (THOMAS et al., 2011). Outro artigo mostrou a perda do cromossomo 14 em 25 casos de cães com linfoma (THOMAS et al., 2003). Cães com linfoma e com trissomia no cromossomo 13 possuem uma sobrevida maior e um tempo de remissão maior em 25% dos cães estudados (HAHN et al, 1994). Os fatores genéticos são muito bem definidos na oncogênese humana, ao contrário da oncogênese canina, necessitando de estudos que possam relacionar ambas espécies (THOMAS et al., 2003, 2011).

- **Fatores ambientais (agentes infecciosos)**

Em algumas espécies, os agentes virais podem aumentar o risco para o desenvolvimento do linfoma, como nos gatos (vírus da imunodeficiência felina), nos bovinos (vírus da leucemia bovina), em aves (leucose aviária) e nos humanos (pacientes com o vírus da imunodeficiência humana -HIV, epstein Barr, herpesvírus 8, vírus da leucemia/linfoma de celulas T humano do tipo 1 ou Hepatite C). Nos cães essa relação ainda não foi comprovada (KAWASHIMA et al., 1994; DALMASO et al., 2006; GRULICH et al., 2007; JUBB, 2008).

Apesar de existir evidência da presença de partículas virais em cultura celular de tecido linfóide de cães com linfoma (GHERNATI et al.,1999), e da detecção da exposição de cães com linfoma ao Epstein barr vírus, não há evidências da presença do vírus na oncogênese do linfoma (MILMAN et al., 2010).

Agentes bacterianos como Helicobacter pylori, Chlamydophila psittaci e Borrelia burgdorferi podem induzir ao câncer pela indução de uma inflamação crônica e pelos metabólitos bacterianos carcinogênicos, sendo bem definida essa relação nos linfomas de seres humanos (PARSONNET, 1994). Apesar de os cães serem um potencial zoonótico para essas doenças, ainda não há indícios que mostrem esses agentes como fator de risco para o desenvolvimento do linfoma canino (BRUNKER ; HOOVER, 2007; SPRAGUE et al., 2008 ; DUQUENOY ; LE LUYER, 2009 ;BRYAN et al., 2011).

- **Fatores ambientais (herbicida)**

O pesticida 2,4 ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) é o mais citado, e utilizado extensivamente na agricultura, em ambientes residenciais e em locais públicos para controle de crescimento de ervas daninhas. Conhecido como 2,4D, foi utilizado por muito tempo na agricultura, em pastagens, em gramados, nas plantações de arroz, de milho, de soja, de cana de açúcar, de trigo, dentre outras (REYNOLDS et al., 1994).

Exposição aos pesticidas tem sido sugerida como uma possível explicação para o aumento da incidência de neoplasias hematopoiéticas (REYNOLDS et al., 1994).

Estudos evidenciaram um aumento do risco adquirido de linfoma canino e humano devido à utilização deste herbicida (FOURNEL-FLEURY et al., 2002). O risco de o cão desenvolver o linfoma é duplicado após quatro ou mais aplicações anuais do herbicida no local próximo ao cão (HAYES, 1991), corroborando com outros resultados (REYNOLDS et al., 1994). Neste estudo, houve a presença do pesticida na urina de cães que residiam em locais com histórico do uso do 2.4D, em relação ao grupo controle. Esta associação também foi encontrada nos fazendeiros de Kansas, na qual houve um risco seis vezes maior em fazendeiros que utilizavam frequentemente o herbicida (HOAR et al., 1986). O risco de desenvolver linfoma foi evidenciado em fazendeiros que utilizavam o herbicida (BLAIR, 1990).

Contrariamente a esta teoria, um estudo caso-controle mostrou que não existe a associação entre o linfoma canino e o uso de 2,4-D (KANEENE; MILLER, 1999). Uma revisão da epidemiologia e da toxicologia do 2.4 D mostrou ausência de efeitos carcinogênicos em camundongos, após a administração por via oral de ração contendo 2,4D (GARABRANT; PHILBERT, 2002). Também não houve evidência de que o 2,4D, em qualquer de suas formas, ativa ou não, possa alterar o sistema imunológico dos animais em qualquer dose (GARABRANT; PHILBERT, 2002).

Estudo epidemiológico em humanos diagnosticados com linfoma não Hodgkin, com idade entre 20 e 74 anos, constatou que a exposição residencial ao herbicida não aumentou o risco de Linfoma não Hodgkin, pois a frequência e a intensidade de utilização foram baixas, em comparação com aqueles expostos ocupacionalmente (HARTGE et al., 2005).

A associação ou não do agrotóxico ácido 2,4 fenoxiacético (2,4D) com o desenvolvimento do linfoma é um fator que gera controvérsias, tanto em cães, como em humanos.

- **Fatores ambientais (tabagismo)**

Muitos resultados mostram a associação do cigarro com as neoplasias nasal, facial e nasofaríngea em humanos e nos cães. Estudos epidemiológicos em seres humanos sugerem que o tabagismo é um possível fator de risco ao Linfoma não Hodgkin, especialmente do subtipo folicular (PEACH; BARNETT, 2001; STAGNARO et al., 2001, 2004; SCHÖLLKOPF et al., 2005).

Estudos epidemiológicos sugerem que a concentração de cotinina (metabólito principal da nicotina) na urina de cães é significativo e linearmente associada ao tabagismo pelos proprietários do animal de estimação no domicílio (ROZA; VIEGAS, 2007). Embora a presença de metabólitos de nicotina na urina de cães confirme a exposição ao ao tabaco ambiental, não há evidência de risco aumentado de linfoma em cães de estimação que vivem em agregados familiares fumantes (ROZA; VIEGAS, 2007), apesar do fato ter sido demonstrado em gatos (BERTONE et al., 2006).

- **Fatores ambientais (poluição)**

A exposição à poluição é responsável por internações hospitalares e diminui a qualidade de vida, sendo um fator de risco para uma série de neoplasias (GAVAZZA et al., 2011; MACIEJEWSKI et al., 2008; MARCONATO et al., 2009; RAMIS et al., 2009; VIEL et al., 2011).

A incidência do Linfoma não Hodgkin tem aumentado em todos os países industrializados. Estudos com seres humanos mostram que a prevalência do Linfoma não Hodgkin depende fortemente da região geográfica e da relação causal com os fatores de riscos. A poluição pode estar envolvida com o desenvolvimento do linfoma. (FISHER; FISHER, 2004). Deleglize, 2010, mostrou que o aumento do número de casos de linfoma em humanos coincidiu com o surgimento de novos poluentes.

A poluição atmosférica é composta por gases e aerossóis presentes no ar e pode se tornar nociva. Os poluentes gasosos podem ter origem primária, como a produção dos gases de CO (monóxido de carbono), SOx (óxidos de enxofre),NOx (óxidos de nitrogênio), amônio (NH_3), metano (CH_4), carbonos orgânicos voláteis (VOC) (CETESB, 2008). Existem também os poluentes secundários, tais como o ozônio e hidrocarboneto policíclico aromático (HAP), produzidos por meio de reações químicas e fotoquímicas, a partir de poluentes primários e componentes do ar. (CETESB, 2008).

Além dos gases, os poluentes atmosféricos também são compostos por aerossóis, definidos como partículas sólidas ou líquidas, que formam os materiais particulados oriundos de fontes antropogênicas, sendo também produzidos diretamente da fonte (origem primária) ou formados pela interação de compostos pré existentes, a partir de gases como o dióxido de enxofre, óxido de nitrogênio e compostos orgânicos voláteis (origem secundária). O material particulado compõe-se de uma complexa mistura de componentes: a) Partículas totais em suspensão (diâmetro menor do que 50 µm); b)Partículas inaláveis (diâmetro de 10µm e contém as partículas inaláveis finas de diâmetro de 2,5µm); c) Fumaça (material particulado suspenso na atmosfera-fuligem); d) produtos formados a partir da combustão incompleta de combustíveis (Dióxido de enxofre, Monóxido de Carbono, Óxido de nitrogênio e dióxido de nitrogênio) e alguns compostos orgânicos como o benzeno e principalmente o HAP que entram no organismo por via inalação do ar (oriundo da emissão veicular à diesel e à gasolina, fumo de tabaco, incinerador de lixo, queima de carvão), por ingestão de alimentos (produtos defumados ou processados a alta temperatura), pela ingestão de água contaminada ou pela absorção desse componentes na pele (CASTANHO, 1999). Os compostos orgânicos são poluentes de grande persistência ambiental, e muitos deles são capazes de reagir com o DNA, após transformações metabólicas (bioativação pelas enzimas do citocromo p450), tornando-se carcinogénicos e potenciais mutagénicos. O HAP foi identificado pela detecção de 1-hidroxipireno na urina de pessoas expostas ao tráfego urbano e ingestão de alimentos (COCCO et al., 2007; IARC,2010).

Segundo a CETESB, 40% do material particulado, 50% de SO_2, 50% do material particulado e 95% de NOx emitidos na cidade de São Paulo são secundários e oriundos da emissão direto dos veículos, sendo responsável pela emissão de 50% do aerossol secundário. Outras substâncias cancerígenas, altamente reativas e bioacumuláveis, como metais (chumbo, cobre, cromo, arsênio, entre outros), podem estar presentes nos materiais particulados.

Se esses materiais particulados tiverem um diâmetro menor do que 10 µm, eles podem atingir a via respiratória superior (nasal, cavidade oral, nasofaringe, orofaringe, laringofaringe, laringe e traquéia) e são considerados menos perigosos por se sedimentarem rapidamente (reduzindo a exposição pela inalação). Somente o material particulado com o diâmetro menor do que 2,5µm ($PM_{2,5}$) atingirá a via respiratória inferior (porção inferior da traquéia, brônquios, bronquíolos e alvéolos) (CASTANHO, 1999).

Esses materiais particulados de menor fração, contendo substâncias tóxicas, podem passar para a luz alveolar ou ser adsorvidos e transferidos para o meio interno por difusão, desencadeando uma resposta inflamatória ou levando a substância tóxica para o meio interno (desenvolvendo-se resposta inflamatória sistêmica). Se forem fagocitados por macrófagos alveolares, podem ser levados para o sistema linfático, atingindo os linfonodos e outros órgãos, tais como fígado, coração, rins e cérebro.

Os poluentes também podem entrar no organismo e ser dispersos pelo sistema circulatório (gases e partículas solúveis), ou então, as partículas menos solúveis podem se depositar e ser levadas pelo sistema mucociliar, em direção à faringe, sendo deglutidas ou expelidas. Outra via de entrada é por absorção cutânea pela ressuspensão de partículas, principalmente a de menor diâmetro (menores do que 2,5µm). Esses processos podem induzir a um processo inflamatório, e levar a uma diminuição da atividade e da celularidade do sistema imunológico. As células inflamatórias ativadas geralmente induzem uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS), podendo gerar doenças respiratórias e cardiovasculares (SCHRAUFSTATTER et al., 1986; COCHRANE, 1991; DAVID et al., 1994; LEWTAS, 2007; ROESSNER et al., 2008).

Se os mecanismos de defesa contra as substâncias ingeridas, absorvidas ou inaladas não forem eficientes, a célula pode entrar em apoptose ou sofrer um acúmulo de mutações que podem levar a uma transformação maligna, devido à genotoxicidade (alterações citogenéticas, mutações ou produção de adutos de DNA) e à carcinogenicidade (SCHRAUFSTATTER et al., 1986; COCHRANE, 1991; DAVID et al., 1994; LEWTAS, 2007; ROESSNER et al., 2008). Indivíduos expostos à poluição ocasionada pelo tráfego de veículos em área urbana apresentaram taxas maiores de lesões cromossômicas (ANWAR, 1994).

Um estudo avaliou a composição e a concentração de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) no interior de um túnel da cidade de Lisboa. Verificou-se que a concentração de PAHs foi maior na fração mais fina do aerossol, ou seja, $PM_{0,5}$, em comparação ao $PM_{0,5-1}$ (19 vezes), e na fração $PM_{2,5-1}$ (100 vezes). Todas as frações continham cerca de 74% do benzo[a]pireno (BaP), demonstrando uma abundância constante nos índices de carcinogenidade (BOSTROM et al., 2002 ; TAVARES, 2009).

Os incineradores emitem para a atmosfera muitos compostos: 2,3,7,8-tetracloro-p-dioxina (TCDD), metais pesados (cádmio, arsênico, cromo, cobalto, manganês, dióxido de nitrogênio, por exemplo) e outros produtos químicos, tais como o monóxido de carbono ou hidrocarbonetos poliaromáticos. Embora parcialmente contestada, os TCDD, incluindo dioxinas, foram reconhecidos pela Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer como carcinogênico (IARC, 1997; CONSONNI et al., 2008).

Um questionário epidemiológico realizado em Nápoles e nas cidades próximas, onde existem o descarte ilegal do lixo em aterros e as incinerações não autorizadas, mostrou que os cães que vivem na área de risco estavam 2,9 vezes mais propensos a desenvolver o linfoma (MARCONATO et al., 2009).

Do mesmo modo, foi demonstrado que pessoas que viviam em zonas de alta exposição a um incinerador de lixo sólido com alta emissão de dioxina, na cidade de Besançon (França), tinham um risco de 2,3 vezes maior para desenvolver o linfoma não Hodgkin, em comparação com as pessoas que viviam em zonas de baixa exposição (FLORET et al., 2007).

Pastor et al. (2009) mostrou uma forte correlação entre a presença de linfoma não Hodgkin em cães (702 casos) e as áreas de incineração de resíduos, as áreas poluídas e as áreas com a presença de resíduo radioativo. Concluiu-se que os incineradores de resíduos, os locais poluídos, e os resíduos radioativos podem ser considerados indicadores de risco de LNH, mas seria necessário haver mais estudos para considerá-los fatores de risco (PASTOR et al., 2009).

Ramis et al. (2009), demonstraram que a proximidade das indústrias de papel aos centros populacionais (<2 km) poderia estar associada a um risco aumentado de mortalidade por linfoma não Hodgkin em humanos.

Existe relação entre o linfoma em humanos e a moradia próximo às rodovias com tráfego pesado (PAZ et al., 2009). Também foi demonstrada uma associação da mortalidade de motoristas de ônibus por neoplasias, incluindo o linfoma, e a exposição à poluição na cidade de Genoa (MERLO et al., 2010).

Gavazza et al. (2001), realizaram estudo caso-controle para determinar se a exposição indoor aos poluentes ambientais poderia estar ligada ao aumento de risco de desenvolvimento de linfomas em cães. Os resultados demonstraram que morar em áreas industriais e usar substâncias químicas, como solventes ou tintas, poderiam estar positivo e independentemente associados ao desenvolvimento de linfomas nos cães. Os autores também concluíram que a análise dos linfomas nos cães pode ser um parâmetro interessante para a detecção de riscos potenciais aos seres humanos.

2.2.3. Incidência

A incidência anual de cães acometidos pelo linfoma é de aproximadamente 24 a 33 casos de linfoma para cada 100.000 cães, sendo o linfoma responsável por uma faixa de 8,5 a 9% de todas as neoplasias caninas (PASTOR et al., 2009).

Os casos de linfoma em seres humanos têm aumentado progressivamente em vários países, acometendo tanto os adultos, como as crianças (KATANODA; YAKO-SUKETOMO, 2008; MULLER et al., 2005; FISHER; FISHER, 2004; CROCETTI et al., 2004; REMONTET et al., 2003; IZARZUGAZA et al., 2006).

A incidência do Linfoma não Hodgkin predomina nos países industrializados. Segundo o Instituto Nacional do Câncer, a incidência de câncer no Brasil no ano de 2012 é de 257.870 novos casos em homens e de 260.640 novos casos em mulheres, sendo que 7 mulheres a cada 100.000 desenvolverão o LNH e 8 homens a cada 100.000 desenvolverão o LNH na cidade de São Paulo (INCA, 2012).

2.3 CLASSIFICAÇÃO ANATÔMICA DO LINFOMA:

A classificação anatômica do linfoma canino divide-se nas formas: multicêntrica, alimentar, cutânea, mediastínica e extranodal (olhos, rins, sistema nervoso cerebral – SNC - e cavidade nasal), de acordo com a recomendação da Organização Mundial da Saúde (OMS), descrito por Macdonald (2007), observada no quadro 1.

Quadro 1 - Classificação Anatômica do linfoma canino proposto pela OMS.

TIPO ANATÔMICO
Multicêntrico (Linfonodos periféricos com ou sem envolvimento do fígado, baço e/ou medula).
Alimentar (Trato gastrointestinal e/ou linfonodos mesentéricos - GALT)
Mediastínico (Timo e/ou linfonodos mediastinais)
Cutâneo (Epiderme e derme)
Extra Nodal (Ocular, renal, SNC, óssea, articular, e outros locais)

2.3.1 Forma multicêntrica

A forma multicêntrica envolve todos os linfonodos (superficiais e profundos), e pode envolver outros órgãos (baço, fígado, rins, trato gastrointestinal, pulmões, coração e medula óssea) (HAWKINS et al., 1992; DEYKIN; SMITH, 1997).

Essa forma representa a maior parte dos casos de cães com linfoma (aproximadamente 84% dos casos) e geralmente é assintomática (RALLIS et al., 1992; FAN; KITCHEL, 2002; MORENO;BRACARENSE, 2005).

A caracterização dos sinais clínicos depende da localização do linfoma (WILCOCK; YAGER, 1989; HARVEY, 1996; MACLACHLAN; CULLEN, 1998; FIGHERA, 2000; GREENE, 2006). O envolvimento do fígado ou do baço pelo linfoma pode apresentar sinais clínicos, como anorexia, palidez de mucosas, ascite, hepatomegalia com infiltração hepática (63% dos casos), hiperbilirrubinemia indireta (icterícia), elevação leve a moderada da atividade sérica da alanina aminotransferase (47 a 70% dos casos), icterícia e esplenomegalia.

Dentre os diagnósticos diferenciais devem ser incluídos o mieloma múltiplo, a leucemia linfóide, a erliquiose, a histoplasmose, a blastomicose, a brucelose e o lúpus eritematoso sistêmico (GREENE, 2006).

2.3.2 Forma alimentar

A forma alimentar aparece com menos frequência nos cães, aproximadamente 5 a 10% dos casos. Pode envolver o trato gastrointestinal e/ou linfonodos mesentéricos (GALT), principalmente em cães, ao contrário dos gatos. Ocorre nas formas nodular ou difusa. A região mais acometida é a porção ileocólica, com conseqüente obstrução ou estreitamento do lúmen (JONES et al., 2000).

O linfoma intestinal é a segunda neoplasia mais comum entre os tumores de intestino nos cães. Os sinais clínicos mais comuns são diarréia e esteatorréia, quando acomete o intestino delgado, e melena, quando ocorre no intestino grosso, podendo causar a síndrome de má absorção (FIGHERA, 2000; JONES et al., 2000;FAN; KUTCHELL, 2002).

Cães da raça Basenji com enterite linfocitário-plasmocitária podem ter predisposição para o linfoma. (MACEWEN; YOUNG, 1996; FIGHERA, 2000). O linfoma gástrico é raro nos cães, ao contrário dos felinos (TWEDT; MAGNE, 1992).

2.3.3 Forma mediastínica

A forma mediastínica ou tímica acomete o timo e/ou linfonodos mediastinais e pode causar dispnéia, taquipnéia, regurgitação, tosse, anorexia, letargia, cianose, hemotórax, quilotórax, edema simétrico em cabeça, pescoço, membros torácicos, efusão pleural, compressão dos lobos pulmonares ou síndrome da veia cava causal. A forma mediastínica pode ocorrer nos cães em 5% dos casos. Em 40% dos cães acometidos ocorre hipercalcemia. A forma mediastinal em cães é mais comum com o imunofenótipo da célula T. O diagnóstico diferencial compõe-se por: timoma, carcinoma pulmonar e adenocarcinoma ectópico da tireóide (FIGHERA, 2000; MACEWEN; KUTCHELL, 2002).

2.3.4 Forma cutânea

Na região cutânea, o linfoma pode ser localizado ou generalizado, correspondendo a menos de 5% dos casos de linfoma. O linfoma cutâneo possui múltiplos nódulos, geralmente alopécicos e, por vezes, ulcerados, acometendo principalmente a cabeça, o tronco e as extremidades. Os linfomas cutâneos são classificados em: 1) epiteliotrópico, com subtipos reticulose de Paget, micose fungóide e síndrome de Sézary; 2) não epiteliotrópico (FOSTER et al., 1997). A forma não epiteliotrópica pode ser constituída por células B (CD79), mas é constituída predominantemente por células T (CD3). A forma epiteliotrópica é a mais comum, constituída por células T (CD8), semelhantemente aos seres humanos (MACEWEN; YOUNG, 1996). Esta forma caracteriza se por uma erupção eritematosa pruriginosa e descamativa, formando placas firmes, e pode afetar a mucosa oral (VALLI, 2010). A forma Reticulose de Paget é rara nos cães, sendo considerada uma dermatite de interface, caracterizada por uma infiltração moderada de linfócitos neoplásicos entre a membrana basal e a derme papilar. A forma micose fungóide tem uma infiltração epiteliotrópica de linfócitos neoplásicos, microabcessos de Pautrier, edema e vesículas intraepiteliais (WITHROW; MACEWEN, 2001).

A síndrome de Sézary é uma variante da micose fungóide e é relatada em cães e em gatos. É considerada a mais agressiva e envolve a corrente sanguínea (VALLI, 2010). Pode invadir a mucosa oral, os linfonodos, o fígado, o baço e a medula óssea. A média de sobrevida é de poucos meses a 2 anos (MACEWEN; YOUNG, 1996). A forma não epiteliotrópica é menos frequente nos cães e gatos, formando múltiplos nódulos compostos por linfócitos T ou B. Esta forma geralmente está presente no tronco, cabeça e extremidade (WITHROW; MACEWEN, 2001).

2.3.5 Forma extranodal

A forma extranodal pode envolver regiões extranodais, tais como os olhos, os rins, a pele, a cavidade nasal, a bexiga, o sistema nervoso e a porção intravascular (SNYDER et al., 2006; KESSLER et al., 2008; DATERS et al., 2010).

2.4 ESTADIAMENTO E SUBESTÁGIO CLÍNICO DO LINFOMA

O Quadro 2 abaixo mostra o estadiamento clínico proposto pela Organização Mundial da Saúde (OMS), descrito por Owen (1980) e atualizado por North e Banks (2009):

Quadro 2 - Estadiamento do linfoma canino proposto pela OMS

ESTÁGIO CLÍNICO	
I	Envolvimento de apenas um linfonodo
II	Envolvimento de vários linfonodos regionais
III	Linfoadenomegalia generalizada
IV	Envolvimento do fígado e/ou do baço, com ou sem estágio I-III
V	Envolvimento da medula óssea, com ou sem estágio I-IV
Subestágios	a Sem sinais ou sintomas sistêmicos
	b Com sinais ou sintomas sistêmicos

2.5 CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

As primeiras classificações das neoplasias linfóides em humanos começaram a partir do ano de 1800. Em 1832, Thomas Hodgkin descreveu uma doença com linfadenopatia generalizada, dando o nome de linfoma de Hodgkin (HODGKIN, 1832).

Em 1845, Rudolf Virchow descreveu a leucemia que tinha origem na medula óssea e, em 1863, ele descreveu o linfossarcoma como um tumor linfóide distinto da leucemia por ter origem linfóide (VALLI et al., 2007).

Após tantas modificações, surgiu a classificação de Henry Rappaport, de acordo com o padrão arquitetural nodular ou folicular, e com correlação ao respectivo prognóstico. Porém devido à inserção do subgrupo histiocitário e pela baixa frequência dos linfomas foliculares, esta classificação foi logo substituída (RAPPAPORT et al., 1956). Em 1966, Lukes e Butler descreveram uma nova categoria, o linfoma não Hodgkin (LUKES et al., 1966).

A primeira classificação baseada nos princípios imunológicos foi desenvolvida por Karl Lennert de Kiel, nomeada como classificação de Kiel, em 1974, revisada em 1988 e 1992. A classificação de Kiel também reconhecia os tumores linfóides malignos oriundos de diferentes estágios de maturação no centro germinativo: as células pequenas (centrócitos) e as células grandes (centroblastos) (VALLI et al., 2007).

A classificação de Lukes e Collins foi similar à classificação de Kiel, baseada na determinação da célula B e T. Porém ela não considerava o padrão arquitetural (LUKES; COLLINS, 1974). Em 1982, o Instituto Nacional de Câncer utilizou como padrão a Working Formulation (NCI-WF), uma classificação do linfoma humano nos Estados Unidos, a qual identificava os subtipos de linfoma de acordo com a sua histomorfologia, porém apresentava algumas deficiências na classificação de algumas entidades (imunoblastos, linfoma MALT, marginal e de manto).

Este modelo foi logo substituído (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 1982). Em 1994, o sistema Revised European American Lymphoma (REAL) criou uma listagem de entidades e foi revisado posteriormente pela World human organization (WHO) (HARRIS et al.,1994,1997; JAFFE et al.,1997).

O REAL-WHO categorizou como critério básico de classificação a morfologia, suficiente para classificar alguns tipos de linfomas (linfoma folicular), nos quais o genótipo e o imunofenótipo não eram considerados essenciais.

As classificações do linfoma canino têm sido aprimoradas nas últimas décadas, de acordo com as atualizações das classificações do linfoma humano. O linfoma humano é similar ao linfoma canino, tanto na sua morfologia, como na biologia e na resposta à terapia. Por este motivo, adaptou-se a classificação histopatológica do linfoma humano para o linfoma canino (TESKE et al., 1994; VALLI et al., 2002). Existem, entretanto, algumas particularidades que diferenciam o linfoma entre as duas espécies. O linfoma canino de baixo grau e do tipo folicular são diagnosticados com pouca frequência, ao contrário do linfoma humano (TESKE, 1994; DOBSON et al., 2001).

Alguns subtipos são classificações exclusivas dos cães, tais como o linfoma de alto grau com diferenciação plasmocitóide e o linfoma com macronucléolo (FOURNEL-FLEURY et al., 1997).

As classificações mais utilizadas para os linfomas caninos são a classificação update Kiel (FOURNEL-FLEURY et al., 2002), oriunda da Europa, e a classificação REAL-OMS, oriunda da América (VALLI et al., 2010). A classificação atualizada de Kiel baseia-se na morfologia celular (centroblástico, centrocítico e imunoblástico) e na imunofenotipagem (célula T ou B), sendo de grande valia prognóstica, por determinar o tempo de recidiva nos animais em tratamento e a estimativa do tempo de sobrevida (FOURNEL-FLEURY et al., 1997; FOURNEL-FLEURY et al., 2002).

A Working Formulation classifica a neoplasia de acordo com o padrão tecidual (difuso ou folicular) e com o tipo celular (pequena e clivada; grande; e imunoblástica), mas não representa grande valia prognóstica, quanto ao padrão tecidual, pois o tipo folicular é pouco frequente nos cães (TESKE et al., 1994).

A nova classificação, denominada classificação da REAL-OMS, adotada em 2002, classificou o linfoma canino de acordo com a imunofenotipagem ao diagnóstico e acrescentou outros tumores mielóides (VALLI et al., 2002; VALLI, 2007; VEZZALI et al., 2010), apresentados no quadro 3.

Quadro 3-Classificação do linfoma canino - REAL-OMS

Classificação do Linfoma (REAL-OMS)	Tipo de Linfoma
	Linfoma B
Precursor Maduro	Linfoma linfoblástico B/ Leucemia linfoblástica aguda
	Linfoma linfocítico de pequenas células B/ Leucemia linfocítica crônica B
	Linfoma linfocítico de células intermediárias B
	Linfoma linfoplasmocítico
Folicular	Linfoma de célula de manto
	Linfoma folicular tipo I
	Linfoma folicular tipo II
	Linfoma folicular tipo III
	Linfoma de zona marginal
	Linfoma de zona marginal esplênica
	Linfoma do tecido linfóide associado à mucosa
Neoplasias plasmocíticos	Neoplasia plasmacítico indolente
	Neoplasia plasmacítico anaplásica
	Mieloma
Linfoma B de grandes celulas	Linfoma imunoblástico de grandes células
	Linfoma de célula B rico em célula T
	Linfoma de célula B tímico
Linfoma Burkitt	x
	Linfoma T
Precursor	Linfoma linfoblástico T/ Leucemia linfoblástica aguda
Maduro	Linfoma linfocítico de célula pequena/ leucemia linfocítica crônica T
	Leucemia linfocítica crônica de célula NK
Cutâneo	Linfoma cutâneo epiteliotrópico
	Linfoma cutâneo não epiteliotrópico
Linfoma periférico ou extranodal	x
Linfoma angiotrópico	Linfoma angiocêntrico
	Linfoma angioinvasivo
Linfoma intestinal de célula T	X
Linfoma de células grandes anaplásicas	x

Fonte: Vezalli et al. *Vet.Comp.Oncol.*, 8(1) :38-49, 2010

Outra classificação recente é a updated Kiel adaptada, em que houve a inclusão dos linfomas de célula B, de célula T e de célula nula (marcação negativa para o linfoma B e T). Essa classificação foi utilizada neste estudo devido à alta frequência do linfoma T canino no Brasil (semelhantemente à França) (PONCE et al., 2010), visto a seguir no quadros 4 e 5:

Quadro 4-Classificação do linfoma canino -Updated Kiel Classification

Grau	Classificação do Linfoma ((Updated Kiel)
	Linfoma B
Baixo grau	Linfoma de célula pequena B
	Linfocítico
	Prolinfocítico
	Linfoplasmacitário
	Zona Marginal
	Centroblástico-centrocítico
Alto grau	Centroblástico monomórfico (subtipo follicular ou difuso)
	Centroblástico polimórfico
	Immunoblástico
	Anaplásico/mediastinal
	Burkit
	Plasmocitóide
	Pequenas células não específicas
	Linfoma T
Baixo grau	Prolinfocítico
	Célula pequena pleomórfica
	Célula pequena clara (zona T)
Alto grau	Pleomórfico misto
	Pleomórfico de célula grande
	Immunoblástico
	Plasmacitóide
	Célula grande granular agressiva
	Inclassificáveis
	Linfoma cutâneo T, baixo grau
	Linfoma cutâneo B, baixo grau
	Linfomas sem marcação

Fonte: Ponce et al.*Veterinary Pathology*.47(3):414-33, 2010

Quadro 5-Diferentes subtipos de linfoma canino cutâneo T

	Linfoma cutâneo T (Updated Kiel)
Baixo grau	Célula pequena cerebriforme (micosis fungóides)
	Monocitóide
	Célula grande linfócitica granular
Alto grau	Pequena cerebriforme
	Célula grande em transformação imunoblástica
	Blástica

Fonte: Ponce et al.*Veterinary Pathology*.47(3):414-33, 2010

2.6 IMUNOFENOTIPAGEM DO LINFOMA

A imunofenotipagem é uma ferramenta importante para o prognóstico do linfoma e fornece dados quanto ao tempo de recidiva do tumor e da sobrevivência do indivíduo com a doença. O linfoma com imunofenótipo T tem pior prognóstico e sobrevida menor, além de períodos de remissão mais curtos. Entretanto ele responde rápido à quimioterapia e pode ser potencialmente curável (em humanos), ao contrário do linfoma de células B. Os de célula B nos cães e nos seres humanos geralmente apresentam progressão lenta, longa sobrevida, porém frequentemente são incuráveis (GREENLEE et al., 1990; JAFFE et al., 2001; FOURNELL-FLEURY et al., 2002; PONCE et al., 2010). No cão, o linfoma com imunofenótipo B (LB) pode ser marcado pelos anticorpos contra o cluster de diferenciação: CD21, CD79. O PAX-5 e o linfoma de célula como o imunofenótipo T (LT) podem ser marcados pelos anticorpos contra o cluster de diferenciação: CD3, CD4, CD8, CD49 (FOURNELL-FLEURY et al., 2002). O linfoma também pode ser imunofenotipado em LT ou LB pela citometria de fluxo (COMAZZI; GELAIN, 2011) e pela reação em cadeia de polimerase (GENTILINI et al., 2009).

Algumas raças, como Cocker Spaniel e Pinschers, são mais predispostas ao desenvolvimento de linfoma de célula B. Já a raça Boxer tem predisposição ao linfoma T e os Golden Retriviers ao linfoma B e ao linfoma T (WITHROW; MACEWEN´S, 2007).

Entretanto a imunofenotipagem é pouco utilizada na rotina, devido ao alto custo, mas tem ganhado espaço por sua importância (FISHER et al., 1995; MILNER et al., 1996; FOURNEL FLEURY et al.,1997).

2.7 DIAGNÓSTICO, TRATAMENTO E PROGNÓSTICO

O diagnóstico do linfoma é efetuado de acordo com a anamnese, achados físicos (palpação dos linfonodos, palpação abdominal, palpação retal, inspeção das mucosas, mensuração da temperatura), exames complementares (hemograma completo, perfil bioquímico sérico, radiografia, ultrassonografia, tomografia computadorizada, mielograma, ressonância magnética). O diagnóstico definitivo é feito pelo exame histopatológico. Nos animais é freqüente o uso da citologia para diagnosticar o linfoma (WHITROW;MACEWEN, 2001, 2001;ETTINGER, 2003; FELDMAN et al., 2004 ;COUTO, 2009).

Os animais podem apresentar sinais clínicos inespecíficos, como anorexia, poliúria/polidpsia, letargia, dispnéia, diarréia, emese, hemorragias, hepatomegalia, esplenomegalia, perda de peso e alterações neurológicas (GAVAZZA et al., 2009; NORTH ; BANKS, 2009). Deve-se levar em conta também a síndrome paraneoplásica. O sintoma paraneoplásico frequentemente encontrado no linfoma T é a hipercalcemia. Nessa síndrome, semelhantemente ao que ocorre com a ação do paratormônio, há a liberação de fatores de reabsorção óssea e do fator ativador de osteoclastos e pode haver fratura óssea espontânea. Além disso, são liberados fatores humorais, como a interleucina 1 (IL-1), o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), o fator transformador de crescimento tumoral beta (TGF-β) e os análogos de vitaminas D (MEULTEN, 2002; FOURNEL-FLEURY et al., 2002). A liberação de paraproteínas (secretor de imunoglobulina) pode alterar a função plaquetária (trombocitopenia em 30% a 50% dos casos) e causar epistaxe, diátese hemorrágica e síndrome da hiperviscosidade (WHITROW;MACEWEN, 2001;MACEWEN;YOUNG, 2001).

Também podem ser observados na síndrome paraneoplásica os quadros de neutrofilia (25 a 40% dos cães com linfoma), de linfocitose (20% dos cães com linfoma), de hipoproteinemia em cães com linfoma alimentar e de gamopatia monoclonal (em 6% dos casos). Pode ocorrer também o aumento do nitrogênio e da creatinina sérica (quando houver a infiltração do tumor) e o aumento da bilirrubina e das enzimas hepáticas (quando houver a infiltração hepática) (WHITROW; MACEWEN, 2007).

Em um levantamento de 54 cães diagnosticados com linfoma no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), na região de Botucatu, as alterações hematológicas mais frequentes foram a anemia, a leucocitose, a neutrofilia, a hipercalcemia e a hiperglobulinemia (CARDOSO et al., 2004).

Na radiografia torácica desses cães, 60 a 75% dos cães com linfoma multicêntrico apresentaram alterações, como a linfoadenomegalia torácica esternal e traqueobronquial e a linfoadenomegalia crânio-mediastinal (20%). É possível observar um aumento dos linfonodos ilíacos e mesentéricos, do baço ou do fígado em 50% dos casos usando-se a radiografia abdominal (WHITROW;MACEWEN, 2007).

O tratamento cirúrgico é utilizado com uma maior frequência nos casos de linfoma com o estágio I ou de linfoma extranodal solitário. Outro tratamento disponível é o transplante autólogo da medula óssea (NORTH; BANKS, 2009). Os animais sem tratamento geralmente morrem dentro de 4 a 6 semanas (WHITROW;MACEWEN, 2007). A radioterapia também pode ser utilizada quando o linfoma for de estágio I ou II, sendo associada ao transplante de medula óssea ou ao transplante de célula tronco. Também é utilizada após a remissão do linfoma induzida pela quimioterapia, porém ainda é preciso mais estudo sobre o real ganho terapêutico (WHITROW;MACEWEN, 2007).

Como o linfoma canino é mais agressivo do que no ser humano, o tratamento de eleição é a quimioterapia. Os linfomas de baixo grau não apresentam uma remissão completa e são considerados indolentes. Ao contrário, os linfomas de alto grau são considerados agressivos, porém respondem melhor ao tratamento quimioterápico e podem ter uma remissão completa (FOURNEL-FLEURY et al., 1997).

Geralmente observa-se uma remissão completa em 60 a 80% dos cães com linfoma tratados com a quimioterapia. O tempo médio de sobrevida é em torno de 6 a 12 meses e somente 10% sobrevivem por dois anos ou mais, em contraposição ao tempo médio de sobrevida de apenas 26 dias de um cão que não responde ao tratamento (PONCE et al.,2004; ETTINGER; FELDMAN, 2004; VAIL; YOUNG, 2007; YOUNG;RICKINSON, 2007; ARESPACOCHAGA et al., 2007).

Existem vários protocolos de quimioterapia. O tratamento com a doxorrubicina é feito com 5 aplicações, com três semanas de intervalo entre elas. O tempo médio de sobrevivência usando-se a doxorrubicina é de 8 a 10 meses. As terapias individuais, como com a predinisona, podem levar ao desenvolvimento de resistência às múltiplas drogas (MDR). Além disso, o cão em monoterapia pode ter menos remissão e menor sobrevivência, caso se decida mais tarde associar um protocolo combinado. A utilização apenas da prednisona leva a um tempo médio de sobrevivência de 60 dias (VAIL ; YOUNG, 2007; YOUNG;RICKINSON, 2007; WHITROW;MACEWEN, 2007).

O anticorpo monoclonal Rituximabe, obtido pela engenharia genética, age pela depleção seletiva dos pré-linfócitos e dos linfócitos B maduros por até 6 meses, voltando a normalidade em 9 a 12 meses. A posologia é de 375 mg/m^2, administrada por via intravenosa, uma vez por semana, durante quatro semanas ou uma vez a cada três semanas,quanto utilizada em combinação com outros agentes anti-neoplásicos (COIFFIER et al., 2002)

Os diversos protocolos quimioterápicos surgem em parte por causa da resistência aos agentes antineoplásicos. A poliquimioterapia é a mais efetiva para o combate do linfoma (HOSKINS, 2001).

O tratamento quimioterápico COP (COTTER; GOLDSTEIN, 1993) é um dos exemplos da poliquimioterapia e envolve uma combinação de vincristina (4 aplicações intravenosas semanais, com intervalo de 3 semanas), a prednisona (via oral, por 6 meses) e a ciclofosfamida (via oral, por 4 dias, a cada 3 semanas). A remissão ocorre em 60 a 90% dos casos, após 3 a 6 meses, e o tempo de sobrevivência varia de 6 a 12 meses (VAIL; YOUNG, 2007; YOUNG;RICKINSON, 2007).

O esquema CHOP (associação de ciclofosfamida, doxirrubicina, vincristina e prednisona) foi o primeiro protocolo quimioterápico e ainda é a primeira opção terapêutica em linfomas agressivos. Geralmente induz a uma completa remissão em 60 a 90% dos cães e tem uma média de sobrevida de 6 a 12 meses e somente 20 a 25% dos cães sobrevivem mais do que 2 anos (WHITROW;MACEWEN, 2007).

Atualmente, a associação do protocolo CHOP com o Rituximabe (CHOP-R) tem demonstrado mais eficiência, em relação ao protocolo CHOP (COIFFIER et al., 2002).

O protocolo Madison-Wisconsin, o mais utilizado atualmente, constitui-se de vincristina, doxorrubicina, ciclofosfamida, prednisona e L-asparaginase. As aplicações intravenosas são semanais, durante 9 semanas, e, depois, a cada 2 semanas, até a 25º semana. Usa-se junto a prednisona via oral ou/e a ciclofosfamida. Este protocolo geralmente fornece uma remissão de 80 a 90% e uma maior média de tempo de sobrevida, de 12 meses. A remissão média varia de 10 a 14 meses, com 25% de sobrevida de 2 anos (HOSOYA et al., 2010).

Alguns dos efeitos adversos da quimioterapia são a mielotoxicidade, que é frequente e grave, e a neutropenia. Porém em menos de 2 semanas a medula óssea começa a se recuperar (LANORE; DELPRAT, 2004).

A resistência às drogas geralmente está relacionada com o gene MDR-1, que controla a expressão do MDR e a expressão de P-glicoproteína. Ambos atuam como uma bomba, ejetando a droga para fora e impedindo sua ação no local do tumor (WHITROW;MACEWEN, 2007).

O prognóstico depende do estágio da doença (estadiamento e histopatológico), do uso de corticóide, da presença ou não das síndromes paraneoplásicas. São considerados também influenciadores do prognóstico as condições do próprio paciente e a condição financeira do proprietário. Os fatores mais relevantes a um prognóstico desfavorável são: subestágio b, células do tipo T, pré tratamento prolongado com corticóides, linfoadenopatia craniomediastinal e localização anatômica (medula óssea, cutânea, alimentar; acometimento hepatoesplênico) (WITHROW; VAIL, 2007; GAVAZZA et al., 2009).

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

O linfoma é uma neoplasia maligna de tecido linfóide, altamente prevalente em cães e no homem. O linfoma pode ser causado causado por múltiplos fatores, tais como a predisposição genética e os fatores ambientais. A etiologia do linfoma canino é ainda desconhecida. A maioria dos estudos identifica os fatores ambientais como um risco para o desenvolvimento de linfoma em cães, mas os resultados ainda são controversos (HAYES et al., 1991, 1995; GAVAZZA et al., 2001; PASTOR et al., 2009; MARCONATO et al., 2009).

O objetivo deste trabalho é realizar avaliações epidemiológica, morfológica e fenotípica, abordando a população canina com linfoma e a sua associação com os fatores ambientais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Realizar de um estudo retrospectivo, abordando o diagnóstico e a imunofenotipagem dos linfomas em cães;

-Avaliar a possível associação entre os fatores de riscos ambientais e o desenvolvimento do linfoma, por meio de um questionário epidemiológico;

-Avaliar a localização geográfica dos casos de Linfoma não Hodgkin canino e do humano e sua possível associação.

4 RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1 CAPÍTULO I

Artigo Publicado no Brazilian Journal of Veterinary Pathology

Aspectos Morfológicos e Imunofenotipagem dos cães com linfoma atendidos pelo Serviço De Patologia Animal da Faculdade De Medicina Veterinária e Zootecnia Da Universidade De São Paulo, Brasil

Kátia C. Kimura[1], Danielle A. Zanini[1], Adriana T. Nishiya[3],
Ricardo A. Dias [2], Maria L. Z. Dagli[1]

[1]Departamento da Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), São Paulo, Brazil
[2]Departamento da Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, FMVZ-USP, São Paulo, Brazil
[3]Departamento de Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais, Anhembi Morumbi, São Paulo, Brazil

Submetido no dia 17 de agosto de 2011, Aceito no dia 17 de outubro de 2011

4.1.1 INTRODUÇÃO

O linfoma é um tumor maligno do tecido hematopoiético, causado pela expansão clonal maligna das células linfóides. O linfoma é considerado a neoplasia hematopoética mais comum em cães, encontrado em 83% das neoplasias hematopoiéticas (DALEK et al., 2009; DE MOURA et al., 2003; VAIL; YOUNG, 2007).

A etiologia do linfoma canino é pouco caracterizada. De acordo com a literatura atual, a incidência de linfoma não Hodgkin em cães é de 33 casos por 100 mil cães por ano (FOURNEL-FLEURY et al., 1997;VEZZALI et al., 2010).

A idade média do paciente canino acometido pelo linfoma é em torno de 6,7 anos e não há predileção por gênero em cães com linfoma (TESKE et al., 1994; CARLTON; MCFAVIN, 1998; DOBSON et al., 2001)..

As raças mais predispostas ao linfoma são: Boxer, Scottish terrier, Basset hound, Airedale terrier, Chow Chow, Pastor Alemão, Poodle, São Bernardo, Beagle, Golden Retriever e Buldogue (RALLIS et al., 1992; TESKE et al., 1994; VONDERHAAR; MORRISON, 1998).

As formas anatômicas do linfoma canino são classificadas em quatro grupos: multicêntrico, alimentar, mediastinal e extranodal (renal, SNC, e cutânea) (WHO, 2001).

A classificação histopatológica do linfoma canino é ainda controversa. As classificações histológicas mais utilizadas para o linfoma canino são a classificação de Kiel atualizada (PONCE et al., 2010) e o Linfoma Europeu-Americano Revisado (REAL), adaptada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2002 (FOURNEL-FLEURY et al., 2002; VEZZALI et al., 2010). A classificação de Kiel atualizada é baseada no tipo celular (centroblástico, imunoblástico e centrocítico) e no imunofenótipo (células T ou B). É uma classificação importante, devido ao seu potente valor prognóstico para determinar o tempo da reincidência nos animais sob tratamento e para estimar o tempo de sobrevida (FOURNEL-FLEURY et al., 1997, 2002; PONCE et al., 2004, 2010).

A classificação Working Formulation é baseada no padrão tecidual (difuso ou folicular) e no tipo celular (pequeno clivado, grandes e imunoblástico), mas não inclui a imunofenotipagem, e não se correlaciona com o prognóstico (SUZANO, 2004). A nova classificação, chamada REAL-classificação da OMS, acrescentou a imunofenotipagem ao diagnóstico de linfoma canino (VEZALLI et al., 2010).

A imunofenotipagem pode ser usada como uma ferramenta de prognóstico, já que o linfoma T está correlacionado com a alta frequência de reincidência e com uma menor sobrevida após o tratamento, em comparação com o linfoma de célula B (VAN PELT; CONNOR, 1968; VAIL et al., 1968, 1996; TESKE et al., 1994; FORUNEL-FLEURY et al., 1997; RUSLANDER et al., 1997; DOBSON et al., 2001; PONCE et al., 2004).

O objetivo deste estudo é classificar e imunofenotipar os linfomas caninos diagnosticados pelo Serviço de Patologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Brasil.

4.1.2 MATERIAIS E MÉTODOS

- Amostras

Foram coletados 65 blocos de parafina de linfomas caninos, fixados em formaldeído, durante o período de 1995 a 2009, pelo Serviço de Patologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Brasil. Os linfomas caninos foram diagnosticados morfologicamente, de acordo com a classificação de Kiel atualizada. Foram coletados dados como a raça, o gênero e a idade.

- Imuno-histoquímica

Para a realização da imuno-histoquímica, os cortes dos materiais diagnosticados com linfoma foram colocados em lâminas silanizadas e desparafinadas. Após o bloqueio da peroxidase endógena com H_2O_2 à 10% no microondas por 15 minutos, as lâminas foram incubadas com anticorpos primários anti-CD79a (clone M7051 Dako), diluídos em 1:50, e anti-CD3 (coelho policlonal, Dako), diluído em 1:100, durante à noite, à uma temperatura de 4C (geladeira). Foram utilizados os anticorpos secundários, a estreptavidina biotina (LSAB) e a revelação com a 3,3´-diaminobenzidina (DAB). Os controles negativos foram obtidos através da execução dos mesmos passos da reação imuno-histoquímica, omitindo o anticorpo primário.

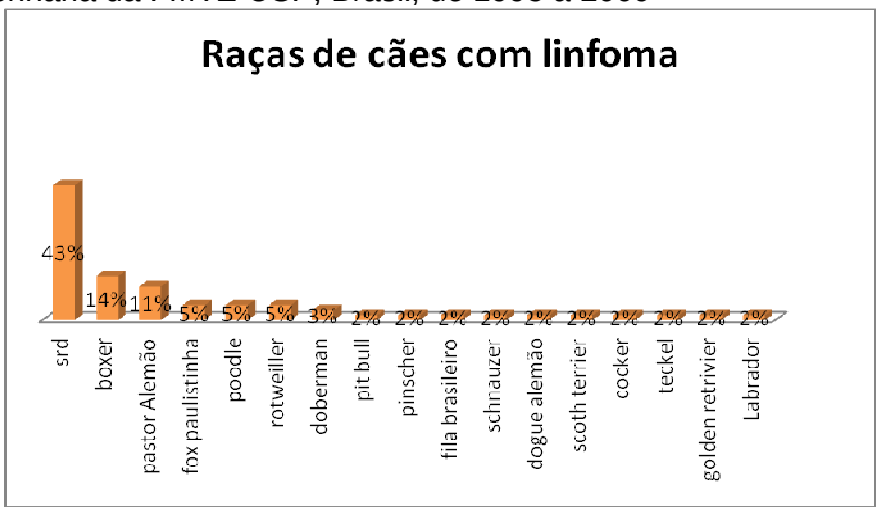
- Classificação histopatológica

Os tipos histológicos foram diagnosticados pelo tamanho das células, pela morfologia dos núcleos e pelo índice de mitose, de acordo com a classificação de Kiel (MOULTON; HARVEY, 1990; FOURNEL-FLEURY et al.,1997; FAN; KITCHELL, 2002; PONCE et al., 2004). O tamanho da célula foi definido como pequeno, (tamanho do núcleo menor que uma hemácia), médio (tamanho do núcleo igual a hemácia) e grande (tamanho do núcleo maior do que duas hemácias). O índice mitótico foi contabilizado em 10 campos, com um aumento de 400x por amostra. Desse modo, o linfoma foi classificado com 2 índices mitóticos: baixo e o alto. Foi considerada como índice mitótico baixo a amostra que apresentava 0-2 mitoses em dez campos, no aumento de 400x, e foi considerad como índice mitótico alto, a que tinha ≥ 6 mitoses em dez campos, no aumento de 400x (FOURNEL-FLEURY et al.,1997, 2002; PONCE et al., 2004, 2010).

4.1.3 RESULTADOS

Neste estudo retrospectivo foi possível identificar a prevalência da raça dos cães: sem raça definida (43%; n=28), seguida pela raça Boxer (14%, n=9), Pastor Alemão (11%, n=7), Fox Paulistinha (3%, n=5), Poodle (3%, n=5), Rottweiler (3%, n=5), Doberman (3%, n=2), Pit bull (2%, n=1), Pinscher (2%, n=1), Fila brasileiro (2%, n=1), Schnauzer (2%, n=1), Dogue Alemão (2%, n =1), Scotch terrier (2%, n=1), Cocker Spaniel (2%, n=1), Teckel (2%, n=1), Golden Retriever (2%, n=1) e Labrador (2%, n=1) observados na figura 3.

Figura 3 - Distribuição do linfoma em cães, de acordo com a raça. Serviço da Patologia Veterinária da FMVZ-USP, Brasil, de 1995 a 2009



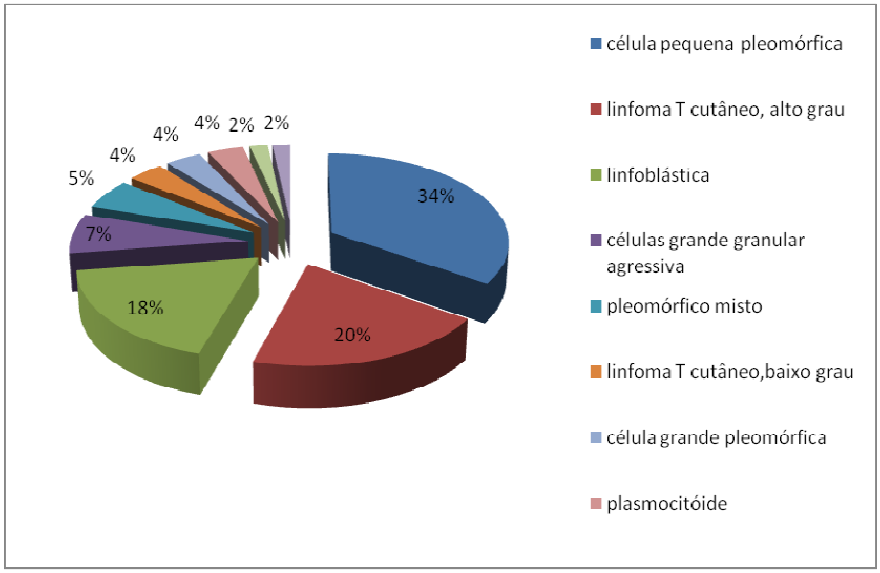
Dos 65 linfomas caninos, 30 casos eram de fêmeas e 35 eram de machos. A distribuição do linfoma canino foi maior na faixa etária de 5-9 anos (45% total de casos), seguida pela faixa etária de 10-13 anos (34%), sendo que 17% tinham idade abaixo de 4 anos e 5% tinham idade acima de 14 anos. A idade média foi de 8,7 anos, com um intervalo de 5 meses a 15 anos.

A distribuição anatômica mostrou que 37% (n=24) dos casos eram multicêntricos, 23% (n=15) dos casos eram extranodais, 20% (n=13) dos casos eram cutâneos, 18% (n=12) estavam no trato digestório e 2% dos casos (n=1) eram mediastinais. Em relação ao resultado da imunofenotipagem, 55 (85%) tiveram origem de células T e 10 (15%) tiveram origem de células B e nenhum tinha dupla marcação positiva ou negativa de células B e células T.

Dos diferentes subtipos morfológicos do linfoma canino, foram diagnosticados 6 subtipos de linfoma B e 11 subtipos do linfoma T. A respeito do índice mitótico, 51% (n=33) dos linfomas T tiveram um alto índice mitótico e 34% (n=22) tiveram um baixo índice mitótico. No linfoma B, 9% (n=6) tiveram um alto índice mitótico e 6% (n= 4) tiveram um baixo índice mitótico.

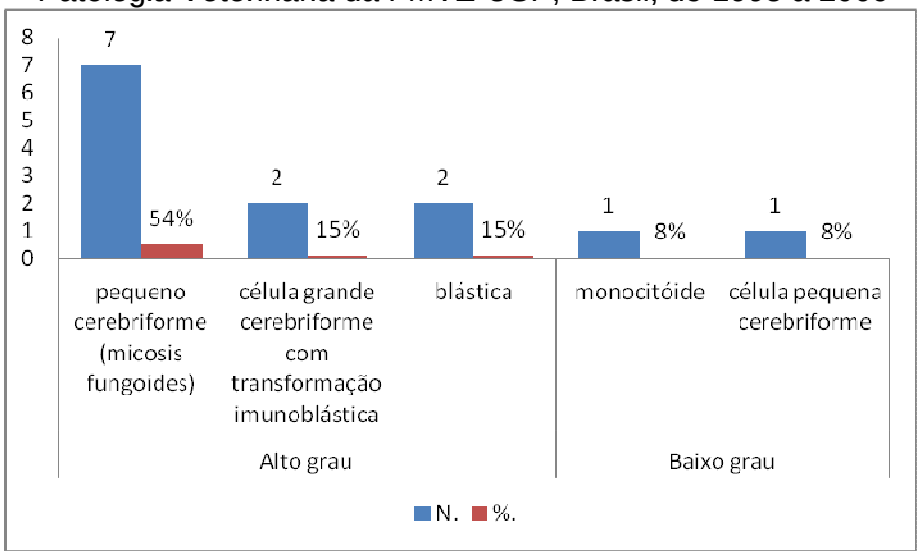
Os linfomas T foram classificados como: 19 (34%) como sendo de célula pequena pleomórfica, 11 (20%) de linfoma T cutâneo de alto grau, 10 (18%) de linfoblástico, 4 (7%) de célula grande granular agressiva, 3 (5%) de pleomórfico mista, 2 (4%) de linfoma T cutâneo de baixo grau, 2 (4%) de células pleomórficas grandes, 2 (4%) de plasmocitóide, 1 (2%) de imunoblástico e 1 (2%) de prolinfocítico, como mostrado na **figura 4**.

Figura 4 - Classificação histológica do linfoma T canino. Serviço da Patologia Veterinária da FMVZ-USP, Brasil, de 1995 a 2009



Os subtipos histológicos do linfoma T cutâneo foram classificados da seguinte forma: 7 (54%) sendo pequeno cerebriforme (micose fungóide), 2 (15%) cerebriforme de grandes células em transformação imunoblástica, 2 (15%) blásticas, 1 (8%) monocitóide e 1 (8%) cerebriforme de células pequenas, como observado na **figura 5.**

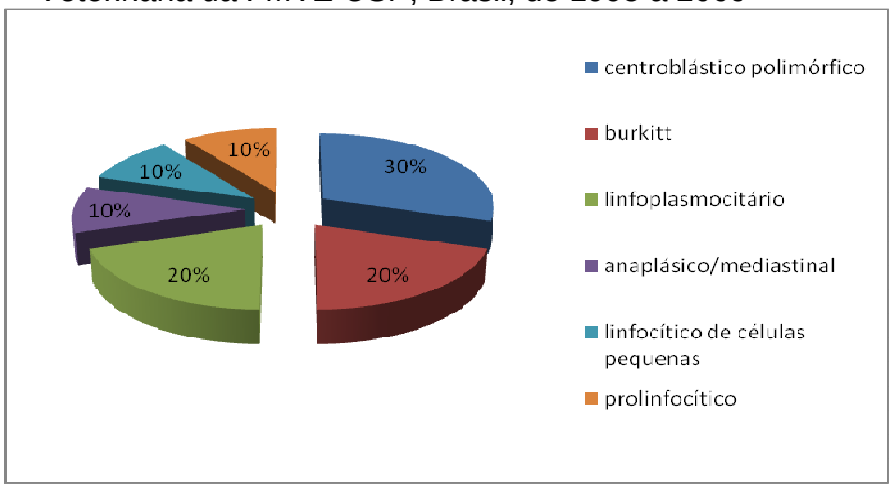
Figura 5 - Classificação histológica do linfoma T cutâno canino. Serviço da Patologia Veterinária da FMVZ-USP, Brasil, de 1995 a 2009



.

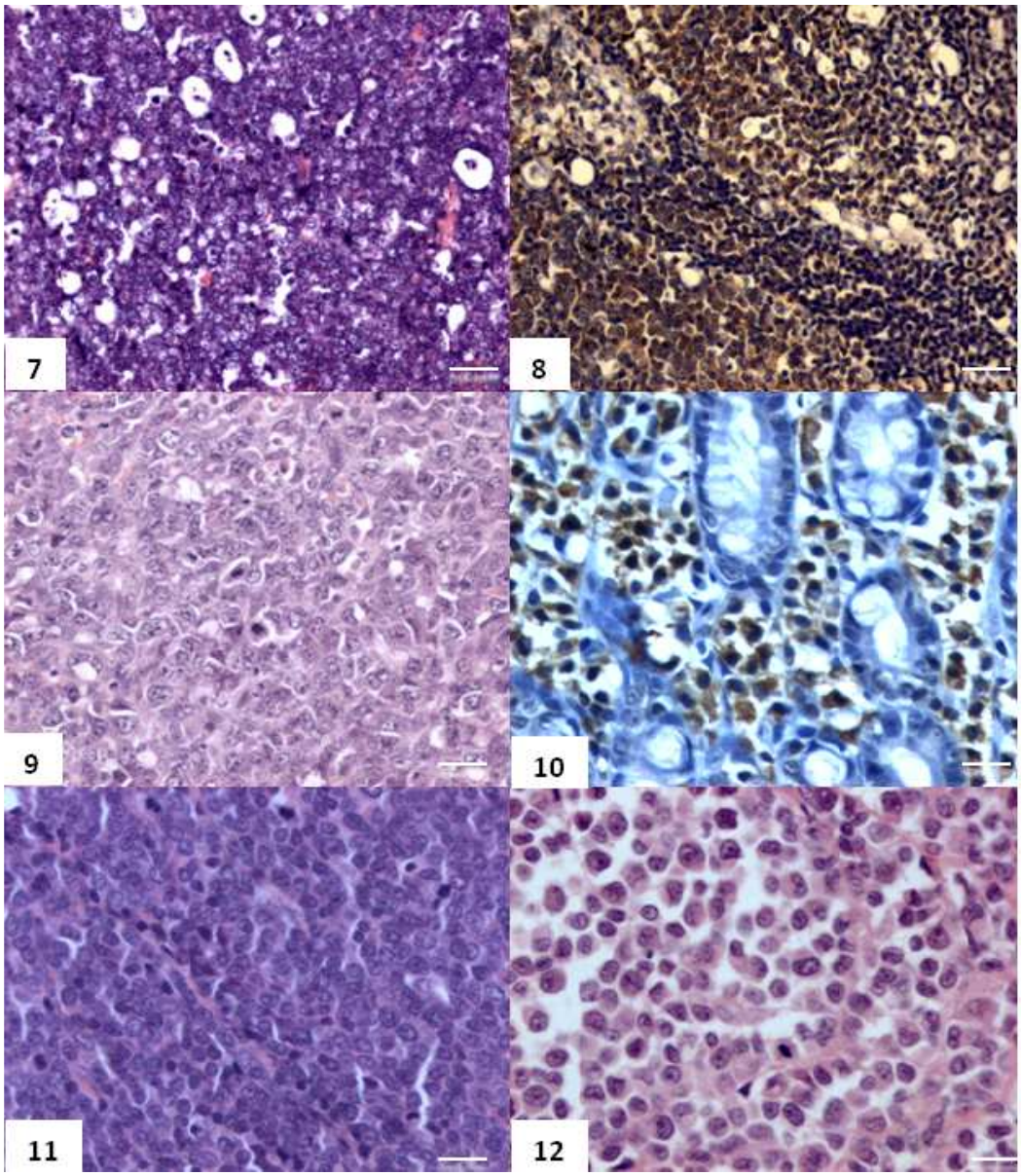
Os 10 linfomas B foram classificados como: 3 (30%) sendo centroblástico polimórfico, 2 (20%) Burkitt, 2 (20%) linfoplasmocitário, 1 (10%) anaplásico/mediastinal, 1 (10%) linfocítico de célula pequena e 1 (10%) prolinfocítico, como representado na **figura 6.**

Figura 6 - Classificação histológica do linfoma B canino. Serviço da Patologia Veterinária da FMVZ-USP, Brasil, de 1995 a 2009



A fotomicrografia de alguns subtipos de linfoma T e B está representada nas **figuras 7, 8, 9, 10, 11e 12.**

Figura 7- Baço. Linfoma B, subtipo Burkitt. Células de tamanho intermediário com núcleo redondo, cromatina irregular e nucléolo evidente. Padrão'starry sky', devido à alta concentração de macrófagos reativos. Hematoxilina & Eosina (H&E), aumento 400x. Bar=10µm. **Figura 8**- Baço. Linfoma B, subtipo Burkit marcado com CD79. Imunofenotipagem, aumento 400x. Bar=10µm. **Figura 9**- Linfonodo - Linfoma B subtipo mediastinal/anaplásico. Grandes células anaplásicas com abundante citoplasma. H&E, aumento 400x. Bar=5µm. **Figura 10**- Intestino. Linfoma T subtipo linfocítico de pequenas células. Células de tamanho pequeno com núcleo redondo e ausência de nucléolo positivos para CD3. Imunofenotipagem, aumento 400x. Bar=10µm. **Figura 11**-. Linfonodo. Linfoma T subtipo linfoblástico. Células de tamanho intermediário com núcleo vesicular, cromatina periférica, nucléolo pequeno evidente. H&E, aumento 400x. Bar=10µm. **Figura 12**- Linfonodo. Linfoma T subtipo plasmocitóide. Grandes células com núcleo excêntrico, binucleação occasional, citoplasma acidofílico. H&E, aumento 400x. Bar=10µm. Serviço da Patologia Veterinária da FMVZ-USP, Brasil, de 1995 a 2009



4.1.4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Neste estudo, 65 linfomas caninos foram classificados histologicamente e imunofenotipados, oriundos do Serviço de Patologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (Brasil), durante os anos de 1995 a 2009. O Serviço de Patologia Animal é responsável pelo diagnóstico de biópsias e necropsias derivados do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, bem como de clínicas e hospitais veterinários privados e de outras instituições públicas ou privadas.

A maioria dos estudos descreve que cães sem raça definida (SRD) são os mais predispostos a apresentarem linfoma, seguidos pelo Pastor Alemão. Entretanto, o Pastor Alemão foi a terceira raça mais predisposta neste estudo (CARLTON; MACGAVIN, 1998; MORENO; BRACARENSE, 2007; VEZZALI et al., 2010). Os cães sem raça definida foram os mais afetados pelo linfoma, seguidos pela raça Boxer, similarmente a outros estudos (TESKE et al., 1994; SUZANO, 2004). A maioria dos cães com linfomas T detectados pela imunofenotipagem era da raça Boxer.

A idade média dos cães foi de 8,7 anos (5 meses a 15 anos). O linfoma canino acomete uma maior faixa etária, entre 5 e 9 anos. Alguns trabalhos mostram uma idade média variando entre 5,9 e 8 anos, similarmente ao resultado desse trabalho (VAN PELT; CONNOR, 1968; MADEWELL, 1985; TESKE et al., 1994; LURIE et al., 2008; PONCE et al., 2010). A faixa etária dos cães acometidos pelo linfoma diverge de um estudo ao outro. Alguns mostram que o linfoma canino é prevalente entre 6 e 10 anos, com a idade média de 6,58 (SUEIRO et al., 2004). Outros identificaram 54,4% dos linfomas com idade acima de 6 anos e idade média de 7,2 anos, similarmente a outros resultados, que mostraram 80% dos que tinham linfoma tinham entre 5 e 11 anos, com idade média de 5,9; outro identificou 80% dos casos variando entre 4 e 13 anos e outro obteve uma faixa etária entre 1 e 16 anos, com idade média de 7,9 anos (SEQUEIRA, 1992; SUZANO, 2004; MORENO; BRACARENSE, 2007; VEZALLI et al., 2010).

Neste estudo, os cães machos foram mais acometidos pelo linfoma do que as fêmeas. Porém não houve predileção de gênero estatisticamente significante. A literatura apresenta alguns trabalhos mostrando a predominância dos machos acometidos pelo linfoma (SEQUEIRA;FRANCO,1992; DALEK et al., 2009).

Apesar da divergência dos dados epidemiológicos, acredita-se que o gênero não seja um fator de risco ao desenvolvimento do linfoma nos cães (MOULTON; HARVEY, 1990; JACOBS et al., 2002; MORENO; BRACARENSE, 2007).

O linfoma multicêntrico foi o mais diagnosticado nesta pesquisa, seguido pelo extranodal. Estes resultados são similares a outros encontrados na literatura (FAN; KITCHELL, 2002; LURIE et al., 2004; SUEIRO et al., 2004; SUZANO, 2004; MORENO; BRACARENSE, 2007; PONCE et al., 2010; VEZALLI et al., 2010).

O papel da imunofenotipagem dos linfomas é diferenciar o linfoma de outras proliferações não neoplásicas, além de avaliar o prognóstico do paciente. O linfoma T está associado a um prognóstico ruim, ao contrário do linfoma B, que na maioria das vezes está associado a um bom prognóstico, previamente reportado na medicina veterinária e humana (WHO, 2001; PONCE et al., 2004; ASTER, 2004; MORENO; BRACARENSE, 2007). Os achados mostram que o linfoma T foi o mais comumente diagnosticado (85% dos casos), similarmente a outros resultados (LURIE et al., 2004; PONCE et al., 2004; MODIANO et al., 2007).

Outros estudos, em diferentes países, encontraram um predomínio do linfoma B (60-80%) em cães, similarmente aos resultados em seres humanos, que mostram o linfoma B em 80 a 85%, com exceção da Ásia (ASTER, 2004; WILKERSON et al., 2005; MODIANO et al., 2007; LURIE et al., 2008; PONCE et al., 2004, 2010; WILLIAN et al., 2010). Na literatura, 22% dos linfomas caninos são classificados como mistos (dupla marcação de célula T e B) e menos de 5% não são imunorreativos, similarmente aos estudos humanos (FOURNEL-FLEURY et al., 2002; VAIL; YOUNG, 2007).

O mais freqüente subtipo do linfoma T encontrado neste estudo foi o de célula pequena pleomórfica, seguido pelo linfoma T cutâneo de alto grau e pelo linfoblástico. A alta prevalência do linfoma T cutâneo foi relatada por alguns estudos (FOURNEL-FLEURY, 1997, 2002; SUZANO, 2004). Em contraste com outro trabalho, detectou-se um maior número de linfoma cutâneo T de baixo grau (9%), em relação ao de alto grau (3%) (MOULTON; HARVEY, 1990).

Em relação ao linfoma T, neste estudo foram obtidos 4% de linfoma cutâneo de baixo grau e 20% de linfoma cutâneo de alto grau. Dentro dos subtipos do linfoma T cutâneo foram observados: 7 (54%) de pequeno cerebriforme, 2 (15%) de célula grande cerebriforme com transformação imunoblástica, 2 (15%) de blástico, 1 (8%) monocitóide e 1 (8%) de pequena célula cerebriforme. Outra pesquisa encontrou um predomínio do linfoma pequeno, misto e de grande célula pleomórfica (FOURNEL-FLEURY et al., 1997). Outros artigos descreveram um predomínio do linfoma pleomórfico misto (6%), seguido pelo plasmocitóide (3%), pelo de células grandes pleomórficas, pelo imunoblástico e pelo de célula grande granular agressivo (MOULTON; HARVEY, 1990).

O mais frequente subtipo de linfoma B foi o centroblástico polimórfico, seguido pelo Burkitt e pelo linfoplasmocitário, de acordo com a classificação de Kiel update (FOURNEL-FLEURY et al., 2002; FAN; KITCHELL, 2002; SUZANO, 2004; SUEIRO et al., 2004). Outros estudos descrevem um predomínio do centroblástico polimórfico (38%), seguido por outros subtipos, como de zona marginal (11%), imunoblástico (8%), Burkitt (2%), 1% de linfoplasmocitário, 1% de plasmocitóide e outros com uma porcentagem menor que 1% (pequeno linfocítico, prolinfocítico, centrocítico-centroblástico, anaplásico/medianstianl e pequena células não específica) (MOULTON; HARVEY, 1990).

Os dados epidemiológicos dos linfomas caninos são controversos na literatura. Existe uma variação de raças predispostas, diferentes fenótipos, diferentes tipos e subtipos, comportamento biológico variável e diferente resposta ao tratamento. Varia também de acordo com a região ou país, fazendo com que o linfoma canino seja um desafio epidemiológico, clínico e patológico, cuja etiologia ainda é desconhecida.Este estudo mostrou que cães sem raça definida foram mais acometidos pelo linfoma, seguido pela raça Pastor Alemão. A idade média foi de 8,7 anos. Não houve predileção de gênero. O linfoma T foi predominante na raça Boxer. O tipo multicêntrico foi o mais comumente encontrado. Os subtipos mais comuns foram o de célula pequena pleomórfica no linfoma T e centroblástica no linfoma B. Esses dados representam uma importante ferramenta epidemiológica para o avanço de melhores métodos de pesquisa, prevenção e tratamento do linfoma canino. Os possíveis e inúmeros fatores que possam contribuir para o desenvolvimento do linfoma canino ainda são desconhecidos e requerem futuras pesquisas nesta área.

4.2 CAPÍTULO II

Manuscrito submetido a Preventive Veterinary Medicine

Relato de uma pesquisa para detectar fatores ambientais relacionados ao desenvolvimento de linfomas caninos.

Danielle A. Zanini[1], Katia C. Kimura[1],Adriana T. Nishiya[3],
Ricardo A. Dias [2], Maria L. Z. Dagli[1]

[1]Departamento da Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), São Paulo, Brazil
[2]Departamento da Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, FMVZ-USP, São Paulo, Brazil
[3]Departamento de Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais, Anhembi Morumbi, São Paulo, Brazil

4.2.1 INTRODUÇÃO

A incidência de câncer em animais de estimação vem crescendo ano a ano. O aumento dessa incidência tem sido atribuído à expectativa de vida desses animais e à proximidade com os seres humanos. Por se exporem às mesmas condições ambientais que os humanos, os cães podem desenvolver doenças semelhantes, podendo ser utilizados como sentinelas para o estudo da epidemiologia e da etiologia do câncer em seres humanos (BACKER et al., 2001;GAVAZZA et al., 2001;WITHROW et al., 2007 ; BREEN et al., 2008).

O uso de cães para se avaliar o risco de desenvolvimento de câncer em seres humanos tem uma série de vantagens. O Linfoma não Hodgkin (LNH), o osteossarcoma, o melanoma, o carcinoma de próstata, o carcinoma do pulmão, o carcinoma mamário e os sarcomas dos tecidos moles se comportam de forma análoga entre os cães e os humanos, por exemplo. Além disso, a grande população canina proporciona um número suficiente de animais a pesquisa (BACKER et al., 2001; KHANNA et al., 2006).

Linfoma não Hodgkin (LNH) compreende um grupo heterogêneo de doenças malignas do tecido linfóide que têm diferentes subtipos histológicos e características clínicas. É a quinta forma mais comum de câncer em seres humanos e o terceiro em cães. A etiologia da doença permanece desconhecida e uma variedade de fatores causais tem sido proposta (FOURNEL-FLEURY et al., 1997; FISHER; FISHER, 2004).

Fatores ambientais têm sido investigados e são suspeitos de participação no desenvolvimento de linfoma em humanos e em cães, especialmente o herbicida ácido 2,4 diclorofenoxiacético (GARABRANT; PHILBERT, 2002), a fumaça do tabaco (STAGNARO et al., 2004; ROZA; VIEGAS, 2007), o tipo de dieta (CROSS; LIM, 2006; SKIBOLA, 2007), a contaminação dos alimentos (ROHRMANN et al., 2011) e a poluição ambiental em geral (GAVAZZA et al., 2001; HORDERN, 2005; MARCONATO et al., 2009; GOUVEIA;PRADO, 2010; MERLO et al., 2010).

A cidade de São Paulo é considerada altamente produtora de poluição ambiental, oriunda principalmente da circulação de cinco milhões de carros e de um milhão de motocicletas. Essa cidade é a maior da América do Sul e a quarta maior do mundo. A população do estado de São Paulo é de 18,6 milhões (IBGE,2010). Existem 11.244.369 habitantes na cidade de São Paulo (IBGE,2010) e 2.508.401 cães, sendo a relação cão/habitante de 1:4(CANATO,2010).

Os poluentes do ar são compostos por material particulado em suspensão (PM, que pode assumir a forma de poeira, fumaça e névoa), poluentes gasosos (como o dióxido de enxofre - SO_2 e o dióxido de nitrogênio - NO_2), dentre outros. Veículos motores, principais fontes de poluentes nas megacidades, podem emitir material particulado (PM), óxido nítrico - NO_2 (referidos em conjunto como NOx), monóxido de carbono (CO) e compostos orgânicos (CETESB, 2004).

O ar poluído causar hospitalização por problemas respiratórios, diminuição do sistema imunitário e dano celular, além do aumento do risco de desenvolvimento de vários tipos de neoplasias (CURY et al.,2000; PASTOR et al,2009; PAZ et al.,2009; MERLO et al, 2010; PEREIRA et al.,2011; ABBA et al, 2011; CHAKRABORTY,2011; KLIUCININKAS et al, 2011;LIOY et al, 2011).

Este trabalho tem como objetivo realizar um estudo caso-controle em cães com linfoma e em cães saudáveis (controle), por meio de um questionário epidemiológico aplicado aos proprietários de cães, e avaliar a associação entre as variáveis independentes (fatores ambientais) e o risco de desenvolver o linfoma em cães.

4.2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

- **Delineamento da população**

Para avaliar a relação entre os fatores de risco em cães e o desenvolvimento de linfoma, coletaram-se os dados de 83 casos de linfoma e de 84 controles, de março a agosto de 2010. Foram escolhidas 5 representantes que participaram desta pesquisa (clínicas, clínica oncológica, centro de diagnóstico): Hospital Veterinário e Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), localizado na região Sul; Hospital Veterinário da Universidade Anhembi Morumbi, localizado na região Leste; Hospital Veterinário Rebouças, localizado na região Oeste; Hospital Veterinário da Universidade de Santo Amaro e a PROVET (diagnóstico em oncologia veterinária), localizadas na região Sul.

Os casos de linfoma foram diagnosticados pelo método histológico e citológico. Para compor o grupo controle foram selecionados cães diagnosticados com problemas traumáticos (principalmente fraturas), problemas dentários, ou que vieram ao hospital para realizar um exame de rotina, sem o diagnóstico de câncer, residentes nas mesmas áreas geográficas que os cães com linfoma, e admitidos às mesmas redes de hospitais. Os critérios de exclusão foram: cães com diagnóstico de doenças infecciosas, cães com diagnóstico de outros tipos de câncer e cães diagnosticados com mais de um tipo de câncer.

- **Entrevista**

Os proprietários, cujos cães possuiam ou não linfoma, foram entrevistados pessoalmente ou por telefone. Foi utilizado um questionário com duas páginas contendo dados epidemiológicos do animal (gênero, raça, idade), estilo de vida do cão (tipo de alimento, tipo de água, exposição às substâncias diferentes, proximidade de ondas magnéticas) e dados sobre o proprietário (mora em casa ou em apartamento, endereço, cep, fumante ou não, tipo de cigarro, dentre outros). Os dados foram coletados e aplicados apenas pela bolsista de iniciação científica deste estudo (Danielle Zanini). O questionário foi aplicado durante o período de março a agosto de 2010, como mostrado no Apêndice A.

Análise estatística

A associação de linfoma com possíveis fatores de risco foi acessada pelo teste do qui-quadrado (análise univariada). Variáveis que apresentaram um valor $p \leq 0,20$ foram submetidas à análise de regressão logística (análise multivariada). $P < 0,005$ foi considerado significativo. Todas as análises foram realizadas com o software SPSS versão 9.0 (SPSS Inc., Chicago IL).

4.2.3 RESULTADOS

Foram entrevistados proprietários de 83 cães com linfoma e de 84 controles, com média de idade de 9,5 anos para os casos de linfoma (2-17 anos) e de 8,5 anos para os controles (2-15 anos). Não houve diferença estatisticamente significante entre os gêneros.

Dentre os cães com linfoma, 61% (n= 51) eram de raça e 39% eram sem raça definida (n= 32) e, dentre o grupo controle, 64% (n= 54) eram cães de raça e 36% eram cães sem raça definida (n= 35). As raças mais comuns do grupo controle foram: Poodle (18%, n= 15), Cocker (10%, n= 8), Yorkshire (6%, n= 5), Teckel (5%, n = 4), Rotweiller, Labrador, Dalmata, Chihuahua, Boxer e Sheepdog - 2,5% cada (n= 2), Staffordshire Terrier, Schnauzer, Pinscher, pastor Alemão, Lhasa Apso, Dogo Argentino, Boston Terrier, Border Collie e Basset hound - 1% cada (n = 1).

As raças mais comum dos cães diagnosticados com linfoma foram: Cocker (7%, n= 6), Rotweiller (6%, n= 5), Boxer, Bull Terrier, Teckel e Poodle - 5% cada (n = 4), Labrador (4%, n= 3), Bernese Mountain Dog, Collie, Pit Bull, Setter Irlandes e Weimaraner (2,6% cada, n= 2), Basset hound, Beagle, Doberman, Dogue de Bordeaux, Golden Retrivier, Husky Siberiano, Pinscher, Schnauzer, Shar Pei, Fox terrier e Yorkshire - 1% cada (n= 1).

Tabela 1- Análise univariada de todas as variáveis de 83 casos de cães com linfoma e de 84 casos controle, de março a agosto de 2010

Variáveis	**Valor de p**
Peso	<0,001
Uso de wi fi perto do cão	<0,001
Casa ou apartamento	0,01
Uso de incenso, velas, perfumes, óleos perfumados	0,01
Cães que vivem dentro ou fora da casa	0,02
Uso de antiparasita	0,02
Cães que vivem com o mesmo proprietário no mesmo endereço	0,03
Exposição à fumaça de churrasco, à fogueira	0,03
Cães que tem contato com inseticida	0,04
Cães que vivem próximo à rua ou avenida movimentada	0,05
Cães que vivem no quintal com cimento ou outro material de cobertura	0,05
Idade	0,14
Gênero	0,14
Castrado ou não	0,14
Cães que tem contato com herbicida	0,14
Uso de shampoo com inseticida durante o banho.	0,20
Alguém em contato com o cão trabalha com indústria, pintura, construção de carroçeria, agrícolas e outros	0,21
Telefone sem fio na sala onde o cão dorme	0,23
Cães com linfoma na vizinhança	0,23
Cães que vivem em 2/3 do tempo por dia no jardim, ou na garagem, ou em área industrial e outros	0,25
Cães que têm contato com fungicidas, que são armazenados ou pulverizados sobre as plantas no jardim ou em casa	0,32
Cães que ingerem (↓ 3x/semana) frutas ou legumes	0,54
Cães de raça ou sem raça	0,70
Tipo de comida (ração, comida ou mista)	0,70
Água mineral ou da torneira	0,71
Quanto tempo os cães têm contato com pessoas que fumam	0,78
Cães que têm acesso aos materiais de construção contendo tintas, solventes, formaldeído, amianto ou outros produtos	0,81
Utilização de uma solução para limpar a casa em contato com o cão	0,82
Número de maços de cigarro por dia	0,87
Uso de amitraz, lindane e outros produtos na casa	0,89
Número de pessoas que fumam perto de cão	0,94
Tipo de tabaco (charuto, cigarro ou cachimbo)	0,95
Cães que vivem no mesmo ambiente de pessoas que fumam	0,97
Cães que vivem a maior parte de sua vida na área rural ou urbana	1,00

Todas as variáveis independentes com p≤0,20 foram incluídas na análise multivariada, representadas pela Tabela 1. O resultado das variáveis analisadas foi: o peso (p<0,001); o uso de wi-fi perto do cão (p<0,001); se o cão mora na casa ou no apartamento (p = 0,01); o uso de incenso, de velas, de perfumes, de óleos perfumados (p= 0,01); os cães que vivem dentro ou fora da casa (p= 0,02); o uso de antiparasitários (p= 0,02); os cães que vivem com o proprietário no mesmo endereço (p= 0,03); a exposição a incêndio ou a churrasco (p= 0,03); os cães que têm contato com inseticidas em casa (p= 0,04); os cães que vivem em torno de 100 metros de uma rua movimentada (mais de 50 veículos por hora) (p = 0,05); os cães que vivem no quintal com cimento ou com outro material de cobertura (p= 0,05); a idade (p= 0,14); o gênero (p= 0,14); se são castrados ou não (p= 0,14); os cães que têm contato com herbicidas em casa (p= 0,14) e o uso de shampoo com inseticida no banho (p = 0,2) .

Do resultado da análise univariada, as variáveis que foram estatisticamente significantes (p≤0,05) foram analisadas em conjunto na análise multivariada, representada na Tabela 2.

Tabela 2- Estimativa de fatores de risco das variáveis entre si pela análise univariada de março a agosto de 2010

Fator de risco	**Valor de p**
Peso x casa ou apartamento	0,001
Cães que vivem a até 100 metros de ruas movimentadas ou avenidas (mais de 50 veículos por minuto) x Cães que vivem dentro de casa, dentro e fora, no quintal ou em outro lugar	0,06
Cães que vivem próximo à rua movimentada ou avenida x casa ou apartamento	0,43
Exposição à fumaça de churrasco ou à fogueira x cães que vivem dentro de casa ou fora de casa.	0,46
Uso de inseticida x Cães que vivem dentro e fora de casa	0,63

No entanto, a regressão multivariada mostrou que somente os cães que viviam na área externa da casa e a cerca de 100 metros das ruas movimentadas ou de avenidas (mais de 50 veículos por minuto) foram significativamente associados ao aumento da probabilidade de desenvolver o linfoma (odds ratio 3,1; 95 %, intervalo de confiança 1,4-6,9; p= 0,001) (Tabela 5). Também foi observado que os cães de médio e de grande porte, pesando mais de 10 kg (68%), tiveram maior risco para o desenvolvimento de linfoma (odds ratio 3,8; 95%, intervalo de confiança 1,8-8,0; p <0,001).

Tabela 3- Modelo de múltiplos fatores de risco associados ao desenvolvimento de linfoma canino, de março a agosto 2010. Análise multivariada

Fator de risco	**OR**	**CI**
Cães que vivem a até 100 metros de ruas movimentadas ou avenidas (mais de 50 veículos por minuto)	3,1	1,4 – 6,9
Cães acima de 10kg	3,8	1,8 – 8,0

4.2.4 DISCUSSÃO

Os resultados do estudo mostraram que os cães de meia-idade e os idosos com linfoma (idade média de 8,5 anos) foram os mais afetados pelo linfoma, como já indicou a maioria dos estudos (FOURNEL-FLEURY et al., 1997; NORTHS;BANKS, 2009; WITHROW, 2007). Nenhuma predisposição de gênero para o desenvolvimento de linfoma foi observada, similarmente ao observado em outros estudos (NORHS;BANKS,2009; WITHROW, 2007).

A predisposição racial para o desenvolvimento de linfoma em cães indicou em alguns estudos uma alta frequência da raça Boxer, do Bull Mastiff, do Basset Hound, do São Bernardo e do Bulldogue (LURIE et al, 2008; NORHS; BANKS, 2009; WITHROW, 2007), diferindo do resultado analisado por este questionário epidemiológico, em que as raças mais afetadas foram: Cocker (7%, n = 6), Rotweiller (6%, n = 5), Boxer, Bull Terrier, Teckel e Poodle - 5% cada (n = 4) e Labrador (4%, n = 3). A frequência das raças é bastante variável, conforme a região ou país, influenciada pela diversidade racial.

Neste estudo, verificou-se que os cães com peso acima de 10 kg tiveram maior risco de desenvolver linfoma. Em um artigo os cães de grande porte foram os mais frequentemente diagnosticados pelo linfoma (MORENO; BRACARENSE, 2004). No entanto, esta variável não foi considerada como um fator de risco, e sim um fator de confusão, já que a maioria dos cães com linfoma e dos cães saudáveis coletados neste estudos possuia grande porte.

Neste estudo, observamos que a forma multicêntrica de linfoma e os estágios 3 e 4 compunham a maior proporção dos afetados, similar ao encontrado na maioria dos estudos (FOURNEL-FLEURY et al, 1997; MORENO; BRACARENSE, 2004; WITHROW, 2007).

A exposição aos campos magnéticos (MF) é considerada um fator cancerígeno e eleva o risco para o desenvolvimento de leucemia e de linfoma em crianças (HUG et al, 2004; HARDELL et al, 2009; ELLIOT et al., 2010) e nos cães que passam 25% do tempo ao ar livre (REIF et al.,2005). Neste estudo, foi observada uma relação entre a exposição ao Wi-Fi e o desenvolvimento da doença na análise univariada, mas não existe uma associação na análise multivariada. Não há relatos de tal relação na literatura em cães. Este pode ser considerado um fator sócio-econômico, pois a maioria das pessoas possui wi-fi em casa, sendo considerado um fator de confusão. Não houve também qualquer associação entre o contato com um telefone sem fio e o risco de desenvolver linfoma nas análises univariada e multivariada.

Há associação entre o tabagismo e o câncer nasal e nasofaríngeo em humanos e em cães (ROZA;VIEGAS, 2007;STAGNARO et al., 2004). A maioria dos cães gasta muito tempo ao ar livre. Isso significa que esses animais são mais freqüentemente expostos aos contaminantes ambientais. Cães e gatos podem ser expostos aos componentes cancerígenos do tabaco por meio da inalação, da absorção cutânea e da ingestão oral, pela lambida dos pêlos (DENSON, 2003). Há uma forte indicação de que os cães que vivem no mesmo lugar que os donos podem ser fumantes passivos do tabaco (ROZA; VIEGAS, 2007), porém não há associação entre o tabagismo passivo e o LNH em cães. Ao contrário deles, há uma associação entre o tabagismo e o desenvolvimento de linfoma em gatos, quando são fumantes passivos. Nos gatos considerados fumantes passivos por 5 anos ou mais, o risco aumentou para 3,2 (95%; CI: 1,5-6,9) em comparação com aqueles sem exposição (DENSON, 2003).

Um dos fatores de risco relacionados ao linfoma em cães é a poluição atmosférica. Os poluentes mais ameaçadores e prevalentes na cidade de São Paulo são o material particulado com tamanho de 2,5 micrômetros de diâmetro ($PM_{2,5}$) e o com 10 micrômetros de diâmetro (PM_{10}) (CETESB, 2004). De acordo com um estudo realizado pelo órgão ambiental estadual, a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo de Saneamento Ambiental (CETESB, 2004), embora as concntrações de poluentes atmosféricos primários tenham diminuído ao longo dos últimos 20 anos, a agência ainda registra diariamente concentrações elevadas de dióxido de nitrogênio, de monóxido de carbono, de material particulado em suspensão e de ozônio. Nos últimos cinco anos, o ozônio tem se tornado o poluente mais problemático.

Pesquisadores brasileiros descobriram uma ligação direta entre as doenças respiratórias e a poluição (CETESB, 2004) e também há diversos estudos experimentais e epidemiológicos que associam a poluição com o risco elevado de desenvolver o linfoma (PASTOR et al, 2009; PAZ et al, 2009; MERLO et al, 2010). Um estudo da Universidade de São Paulo sobre as doenças respiratórias em crianças e a poluição do ar exterior mostrou que as admissões hospitalares de crianças por doenças respiratórias tiveram um aumento significativo, associado com poluentes como o ozônio (5-8%), o NO_2 (9%) e o PM10 (9%), em 2000. Consistentemente, o número de internações por pneumonia foi maior do que para todas as outras doenças respiratórias registradas. Além disso, as crianças menores de 1 ano apresentaram taxas mais elevadas do que as crianças mais velhas O estudo concluiu que, dada a concentração atual de poluição do ar em São Paulo e a grande população potencialmente exposta, a atenção deve ser direcionada para minimizar tais efeitos. São Paulo recente incluiu medidas políticas para reduzir a poluição, o que gerou queda acentuada da morbidade e da mortalidade (BRAGA et al, 1999).

A concentração de poluição do ar pode estar associada ao câncer em geral. Isso foi comprovado por estudos experimentais e epidemiológicos. Reymao (1997) mostrou que ratos expostos à poluição atmosférica urbana tiveram maior formação de tumores de pulmão, induzidos por uretana; e a concentração urbana de poluição do ar modificou a progressão de tumores de pulmão induzida em camundongos (CURY et al, 2000; PEREIRA et al, 2011).

Muitos estudos epidemiológicos em humanos têm demonstrado a associação entre as partículas no ar e o desenvolvimento do câncer em Tampa (CHAKRABORTY, 2011), na Dinamarca (RAASCHOU-NIELSEN et al., 2011), na Índia (ABBA et al, 2011), dentre outros. As concentrações de poluição do ar podem estar associadas ao risco de desenvolvimento do Linfoma não Hodgkin. A exposição ao benzeno tem um grande potencial para produzir alterações cromossômicas e outras alterações genéticas importantes na indução de LNH (O´CONNOR et al, 1999). As fontes móveis são os maiores contribuidores locais para a concentração de benzeno ambiental (LIOY et al, 2011). Poluentes como poeira de rua e escape gasoso podem atuar não apenas como uma fonte de material particulado (PM), mas também como fonte de partículas ligadas aos Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HPAs) e aos compostos orgânicos voláteis (VOCs) (KLIUCININKAS et al, 2011).

Um estudo coorte realizado em motoristas de ônibus e em trabalhadores de manutenção de ônibus mostrou uma associação positiva entre a exposição aos poluentes do ar urbano e a mortalidade por causas específicas, como o câncer. O linfoma não Hodgkin e o câncer de pulmão podem estar associados a longo prazo à exposição da poluição atmosférica urbana em Genova (MERLO et al, 2010). Outro estudo mostrou uma associação estatisticamente significante entre a morbidade do LNH e o fato de morar em estradas de tráfego pesado ($p<0,01$) (PAZ et al, 2009). Em um estudo com 600 casos de cães com Linfoma não Hodgkin na França, concluiu-se que os incineradores de resíduos, os locais poluídos, e os resíduos radioativos podem ser considerados indicadores de risco de LNH, mas seria necessário haver mais estudos para considerá-los fatores de risco (PASTOR et al, 2009).

Em conclusão, o questionário epidemiológico mostrou que os cães que eram frequentemente mantidos ao ar livre e que viviam cerca de 100 metros de ruas ou de avenidas movimentadas (mais de 50 veículos por minuto) foram significativamente associados ao risco de desenvolver o linfoma não Hodgkin (odds ratio 3,1; 95% intervalo de confiança 1,4-6,9; $p = 0,001$). Os resultados sugerem que a poluição ambiental pode estar associada ao risco de desenvolvimento de linfoma em cães pertencentes à cidade de São Paulo.

AGRADECIMENTOS

Danielle Almeida Zanini foi o destinatário de uma bolsa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Proc. n º 2010/00418-7). Os autores agradecem o Hospital Veterinário Rebouças, o Hospital Veterinário da Universidade Anhembi Morumbi, o Hospital Veterinário da Universidade de Santo Amaro e do Departamento de Oncologia Clínica do Provet, os quais permitiram o acesso aos dados utilizados nesta investigação.

4.3 CAPÍTULO III

Manuscrito Submetido a Nature Medicine

Distribuição Espacial do Linfoma Não Hodgkin em Humanos e em Caninos na Cidade de São Paulo: um potencial papel etiológico da poluição ambiental.

Katia Cristina Kimura, Gabriel Zorelo Laporta, Fernanda Alessandra S. Michels, Danielle Almeida Zanini, Adriana Tomoko Nishiya, Rodrigo Ubukata, Renata Afonso Sobral, Rafael Magdanelo Leandro, Claudia Prado de Brito, Marcia La Rocca Trombetti, Ana Carolina Lagoa, Lucas Campos de Sá Rodrigues, Thaís Rodrigues Macedo, Allan Monnereau, Annie J Sasco, Maria do Rosário Dias de Oliveira Latorre, Ricardo Augusto Dias, Maria Lúcia Zaidan Dagli

Linfomas não Hodgkin (LNH) são neoplasias heterogêneas decorrentes da transformação maligna das células linfóides normais em vários estágios de diferenciação (MOULTON;HARVEY, 1990; FISHER;FISHER, 2004). A incidência de LNH está crescendo globalmente, com aproximadamente 356,431 novos casos e 191,599 mortes no mundo todo (FERLAY et al,2010). Estima-se a ocorrência de 5.190 novos casos de linfoma não Hodgkin em homens e de 4.450 casos em mulheres para o Brasil em 2012 (SILVA, 2012).

Os linfomas são caracterizados pela proliferação descontrolada dos linfócitos, que podem exibir uma variedade de tipos histopatológicos e imunofenotípicos, além de comportamentos clínicos que vão desde o indolente ao agressivo (MOULTON;HARVEY, 1990; FISHER;FISHER, 2004; SMEDBY,2006). Alguns deles têm um prognóstico sombrio (MOULTON;HARVEY, 1990).

Foram coletados 8.044 casos de linfoma não Hodgkin em humanos diagnosticados entre 1996 e 2006 no Registro de Câncer em São Paulo. Destes, 2582 casos tinham código de endereçamento postal (CEP) completo. Para executar a análise espacial foi selecionada uma amostra aleatória de 25% dos casos que continham o CEP completo, resultando em 629 casos de LNH prevalentes em seres humanos. Obteve-se um total de 321 mulheres (51%) e de 309 homens (49%), com a faixa etária variando entre 1 a 75 anos e a idade média de 42 anos.

A localização anatômica mais prevalente da doença foi nos linfonodos (55%) e o estágio mais freqüente foi a fase I (67%).

Os 579 casos prevalentes de cães com LNH foram diagnosticados em cinco hospitais de referência veterinária na mesma cidade. Foram obtidos 255 machos (47%) e 285 fêmeas (53%), variando entre 1 e 14 anos, com idade média de 8 anos. A raça mais afetada foi a Sem Raça Definida (26%, n = 142), seguida por Boxer (9%, n = 48) e Rottweiler (8%, n = 43). O estágio IV predominou (44%), seguido pelo estágio III (14%), pelo estágio V (3%), e pelos estágios I e II (1%).

A etiologia da LNH continua pouco esclarecida. No entanto, os potenciais fatores de risco têm sido relacionados ao aumento da incidência da doença em seres humanos (FISHER;FISHER,2004; SMEDBY,2006), tais como os agentes virais (OKSENHENDLER et al., 2002; YOUNG;RICKINSON, 2004; BONNET et al., 2006; GIORDANO et al., 2007; HJALGRIM;ENGELS, 2008; EPELDEGUI et al., 2010; ADAM et al., 2011), a exposição aos pesticidas (HOHENADEL et al., 2011; BRAUNER et al., 2012; TAKASHIMA-UEBELHOER et al., 2012), a exposição aos solventes orgânicos e ao benzeno (O'CONNOR et al.,1999; MAO et al., 2000; ALEXANDER et al., 2007; GOLDSTEIN,2009; KANE;NEWTON 2010), a exposição aos campos magnéticos (MYERS et al 1990; VERKASALO et al.,1993) e o diabetes tipo II (ZAHM et al.,1995; CHAO; PAGE,2008; KHAN et al., 2008).

Nos cães, assim como em humanos, os fatores ambientais (BUKOWSKI;WARTENBERG,1997; GAVAZZA et al,2001; MACIEJEWSKI et al, 2008; PASTOR et al, 2009), a predisposição racial (LURIE et al, 2008; MOULTON;HARVEY, 1990; WITHROW;VAIL, 2007) e o envelhecimento (MOULTON;HARVEY, 1990; WITHROW;VAIL, 2007) têm sido implicados como causas da LNH.

Embora os fatores ambientais sejam reconhecidos como intervenientes importante na patogênese do LNH, a magnitude de seus efeitos ainda não é totalmente compreendida. Para explorar o papel potencial dos fatores ambientais no LNH, compararam-se as distribuições espaciais dos casos de LNH em humanos e nos cães na cidade de São Paulo. A distribuição espacial dos casos selecionados foram mapeados com base no código postal do paciente humano ou do cão que viveu com o seu dono por mais de 5 anos na mesma localização, sendo analisados pelo software ArcGIS 9.2 (Environmental Systems Research Institute, Inc., Redlands, Califórnia). As distribuições espaciais (**figura 13**) e a densidades de Kernel (**figura 14**) dos casos de LNH em humano e em caninos em São Paulo mostraram regiões com alta frequência de casos em ambas espécies.

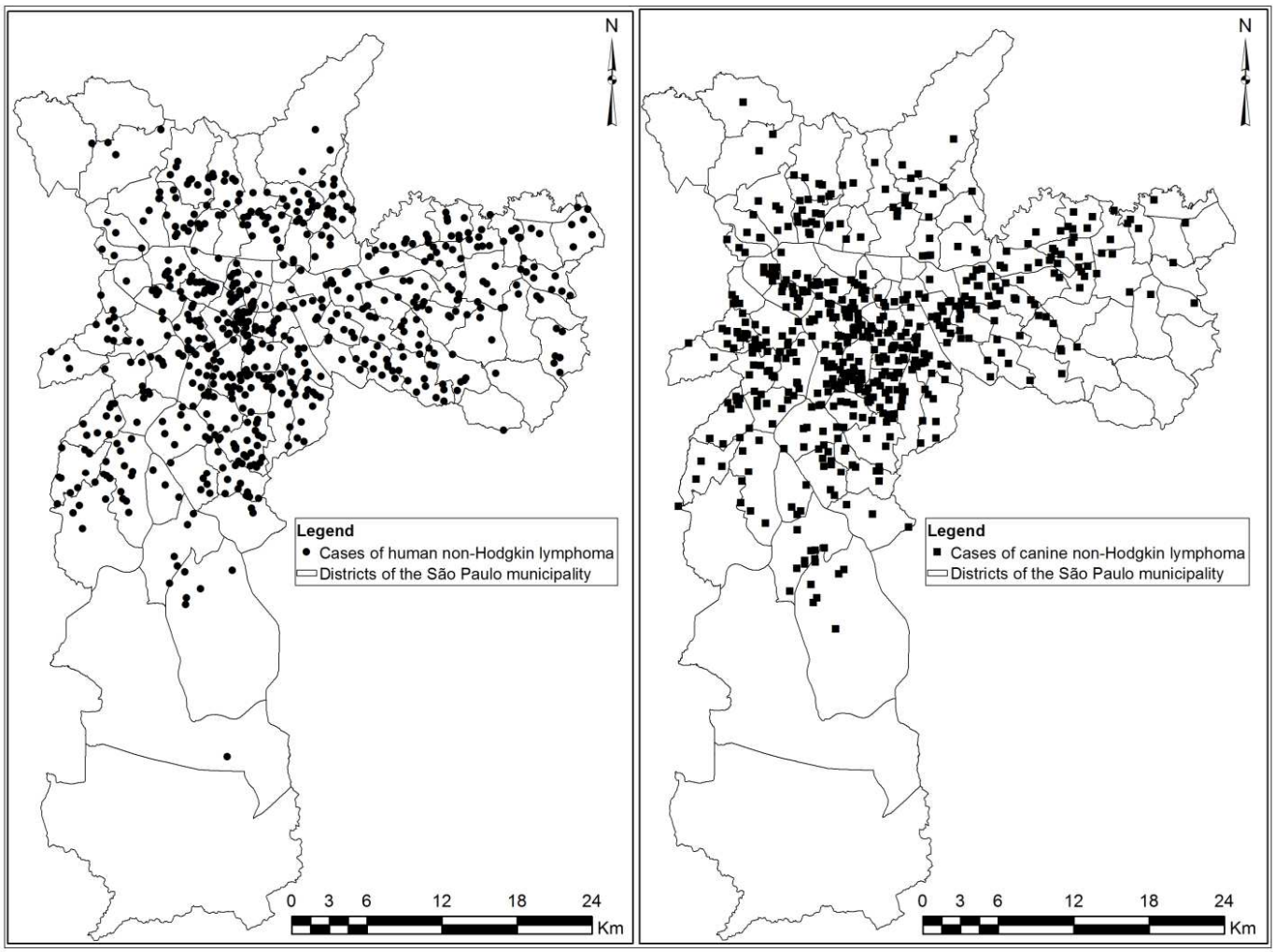


Figura 13- Distribuição espacial do Linfoma não Hodgkin em humanos (à esquerda) e em cães (à direita) nos diferentes distritos da cidade de São Paulo, Brasil

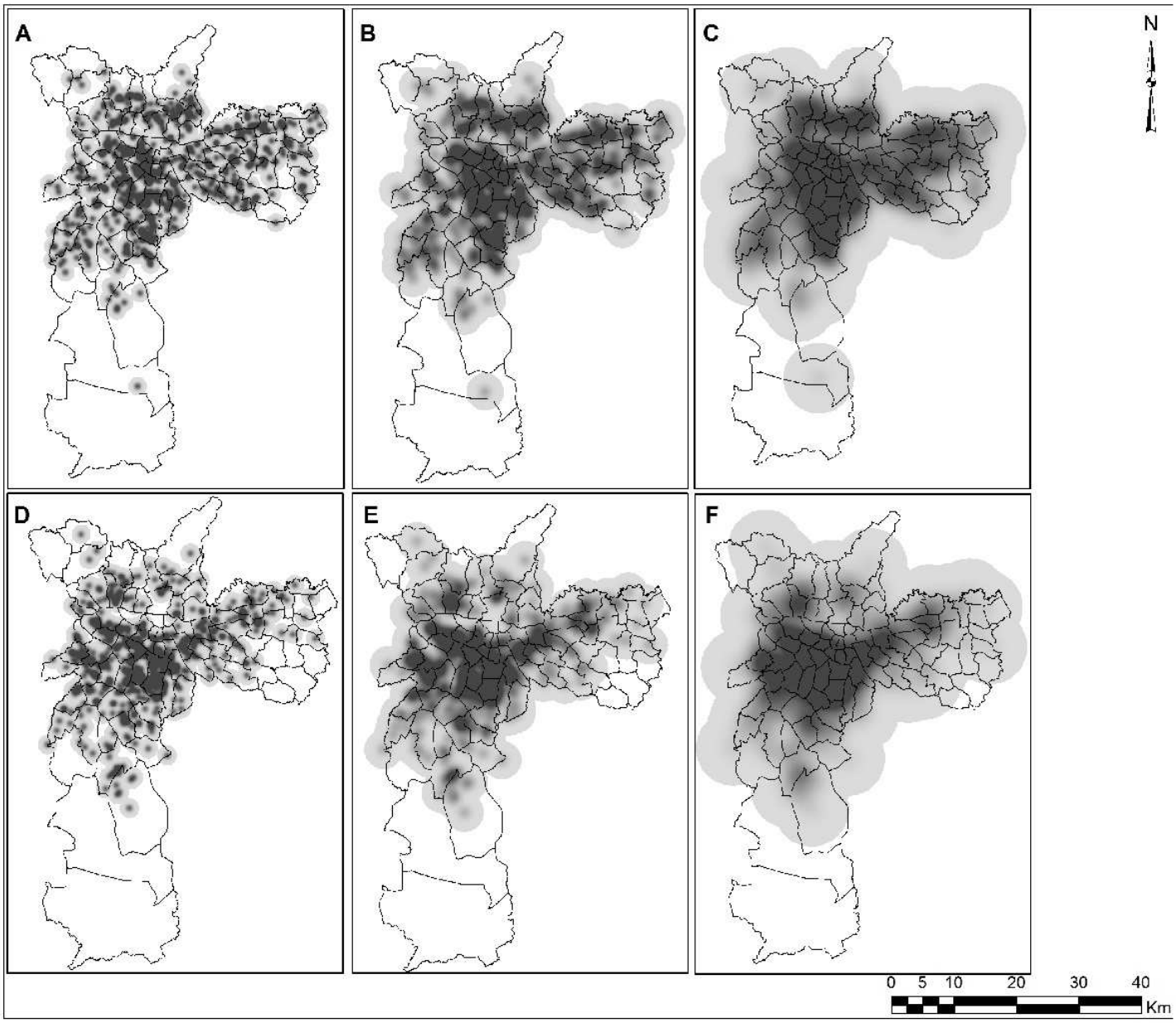


Figura 14 - A, B e C Densidade Kernel dos casos de Linfoma não Hodgkin em humanos na cidade de São Paulo, SP, Brasil, em função de escala de 500m, 1km e 2 km, respectivamente

Figura 14 - D, E e F Densidade Kernel dos casos em Linfoma não Hodgkin nos cães na cidade de São Paulo, SP, Brasil, em função de escala de 500m, 1km e 2km, respectivamente

A Densidade Kernel é uma função não-paramétrica para estimar a função probabilística da densidade de uma variável aleatória e é usado para calcular uma área preenchida por pontos ou polígonos, utilizando-se uma função Kernel para analisar o mapa. A análise estatística demostrou uma correlação positiva entre os agregados (clusteres) dos casos de LNH em humanos e nos cães (modelo de erro auto-regressivo, Tabela 4 e matriz de correlação de Spearman, Tabela 5, em três escalas, ou seja, 500m, 1 km e 2 km).

Tabela 4- Resultado do modelo espacial autoregressivo da Densidade Kernel dos casos de Linfoma não Hodgkin humano em função dos casos caninos nos distritos do município de São Paulo, SP, Brasil

Models	Coefficient β_1	Z-test	AIC[a]
Human ~ Canine 500 m	0.30	4.51 ($P < 0.001$)	28.13
Human ~ Canine 1 Km	0.32	5.19 ($P < 0.001$)	-0.15
Human ~ Canine 2 Km	0.40	7.31 ($P < 0.001$)	-45.74

[a]Akaike Information Criteria related to the linear model fit and parsimony.

Tabela 5- Correlação de Spearman das variáveis em estudo

Variables (Interpolation)	Canine 500 m	Canine 1 Km	Canine 2 Km
Human 500 m	0.55 ($P < 0.001$)	-	-
Human 1 Km	-	0.61 ($P < 0.001$)	-
Human 2 Km	-	-	0.67 ($P < 0.001$)

A região Central do São Paulo, onde havia a maioria dos casos de LNH em humanos e em caninos, possui uma densidade de população relativamente baixa para ambas as espécies e uma alta concentração de tráfego veicular (LANDMANN, 2004). A sobreposição espacial dos casos de LNH sugere que os cães e os humanos podem compartilhar fatores etiológicos comuns, e que possivelmente os fatores ambientais podem desempenhar um papel na etiologia do LNH em ambas as espécies.

Muitos agentes virais foram relacionados ao LNH em humanos, tais como o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (ASCOLI et al,2001; GERARD et al,2002; BREEN et al,2005; BONNET et al,2006; EPELDEGUI et al,2010), o vírus Epstein-Barr (EBV) (ADAM et al, 2011;GRUHNE, 2009), KANNA et al, 1995), o herpes vírus humano 8 (Kaposi-sarcoma-associated herpesvírus) (OKSENHENDLER et al.,2002), o vírus humano T-linfotrópico 1 (ZIMMERMAN et al., 2010) e o vírus da hepatite C (GIORDANO et al., 2007;SCHOLLKOPF et al., 2008; SPINELLI et al, 2008). O EBV infecta as células epiteliais, os linfócitos B e, possivelmente, algumas células T (MILMAN et al.2011).

Existe evidência de que o EBV é cancerígeno em seres humanos. O EBV está associado às células T em pacientes imunocomprometidos, no linfoma de Burkitt (principalmente nas zonas de alta endemicidade), no linfoma de células B, no linfoma de células T/ células NK (tipo nasal) e no linfoma de Hodgkin (IARC, 2012).

Os anticorpos específicos para EBV timidina-quinase foram detectados nos casos dos linfomas caninos. Estes anticorpos foram detectados em 38,4% dos soros caninos no Reino Unido, em 64% dos soros caninos nos EUA (MILMAN et al.2011) e em 88,9% dos soros dos cães em Taiwan (CHIOU et al.,2005). No entanto, a infecção persistente nas tonsilas palatinas dos cães é rara, ao contrário dos humanos, e não há relatos da detecção do EBV em células mononucleares no sangue periférico canino (MILMAN et al.2011).

Mais estudos epidemiológicos são necessários para se elucidar o papel potencial do EBV no LNH canino. As densidades espaciais dos casos de linfoma humano e canino foram maiores nas áreas centrais, onde, contrariamente, há uma menor densidade populacional (**figura 15**) para ambas as espécies, em comparação com aqueles que residem nas regiões periféricas – favelas - (**figura 16**) na cidade de São Paulo. Além disso, os moradores destas áreas possuem uma maior renda per capita (**figura 17**), altas taxas de alfabetização (**figura 18**) e melhores condições de vida, tais como acesso ao tratamento de água (**figura 19**) e de esgoto (**figura 20**).

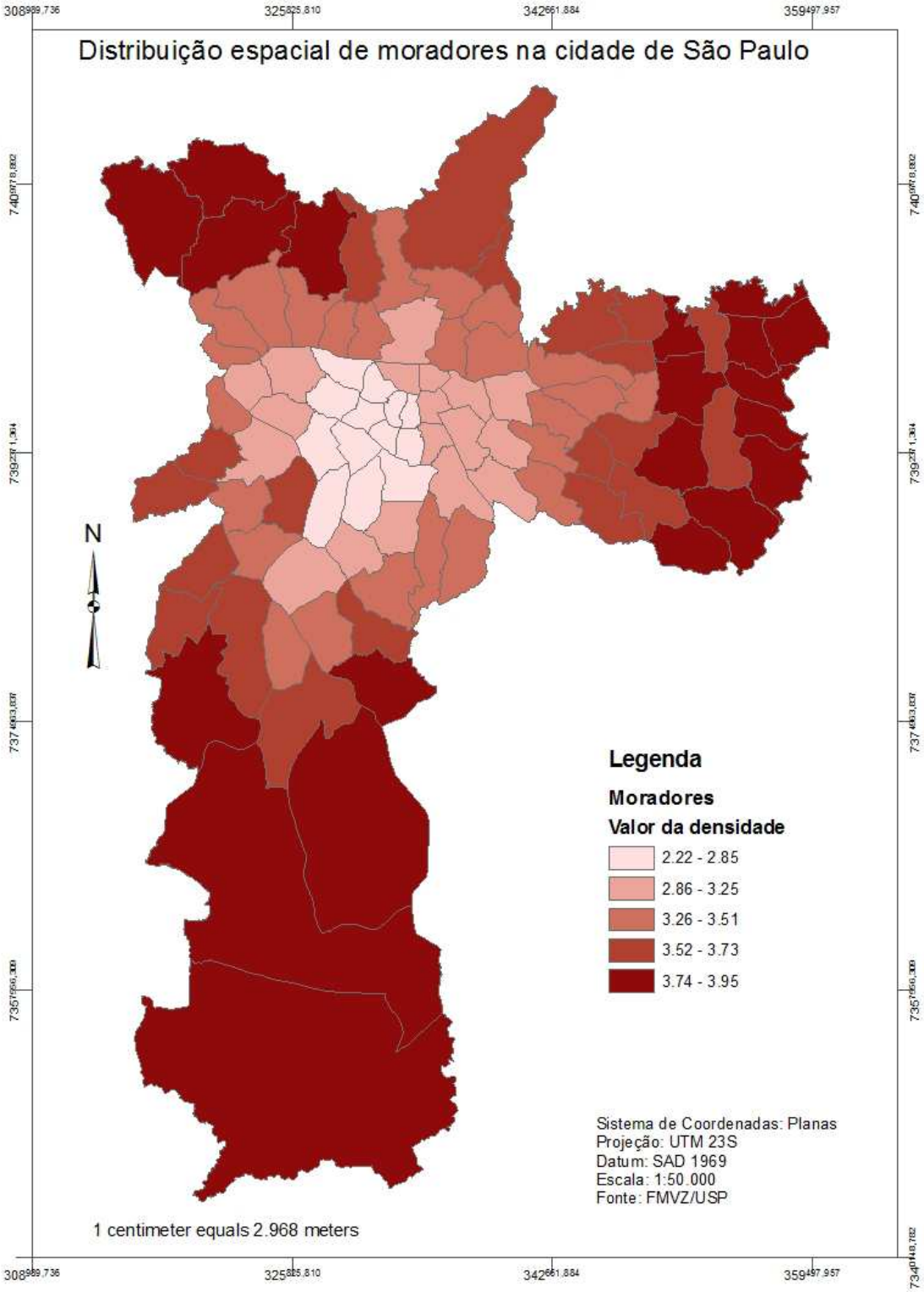


Figura 15- Distribuição espacial da distribuição populacional na cidade de São Paulo

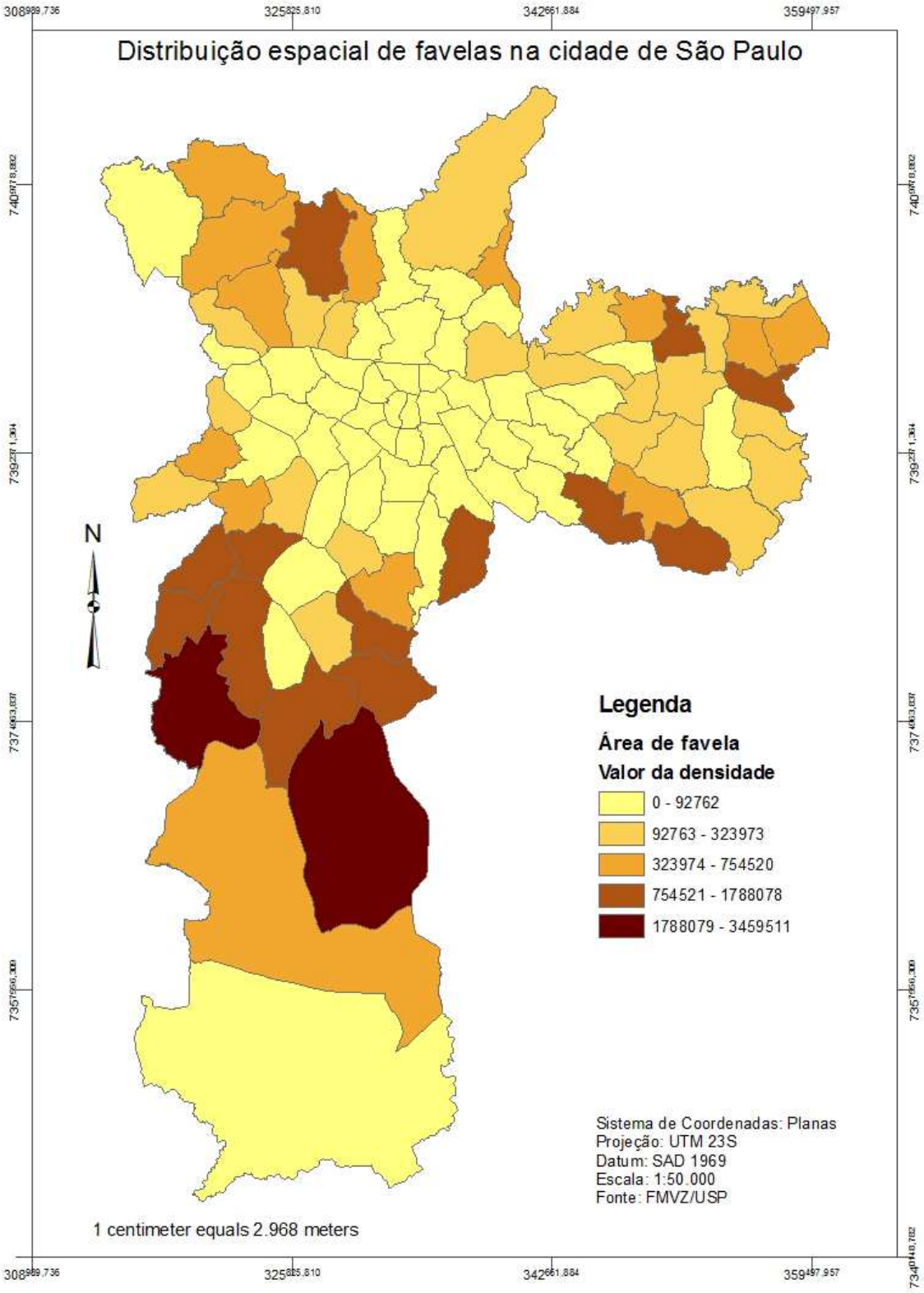


Figura 16-Distribuição espacial da distribuição de favelas na cidade de São Paulo

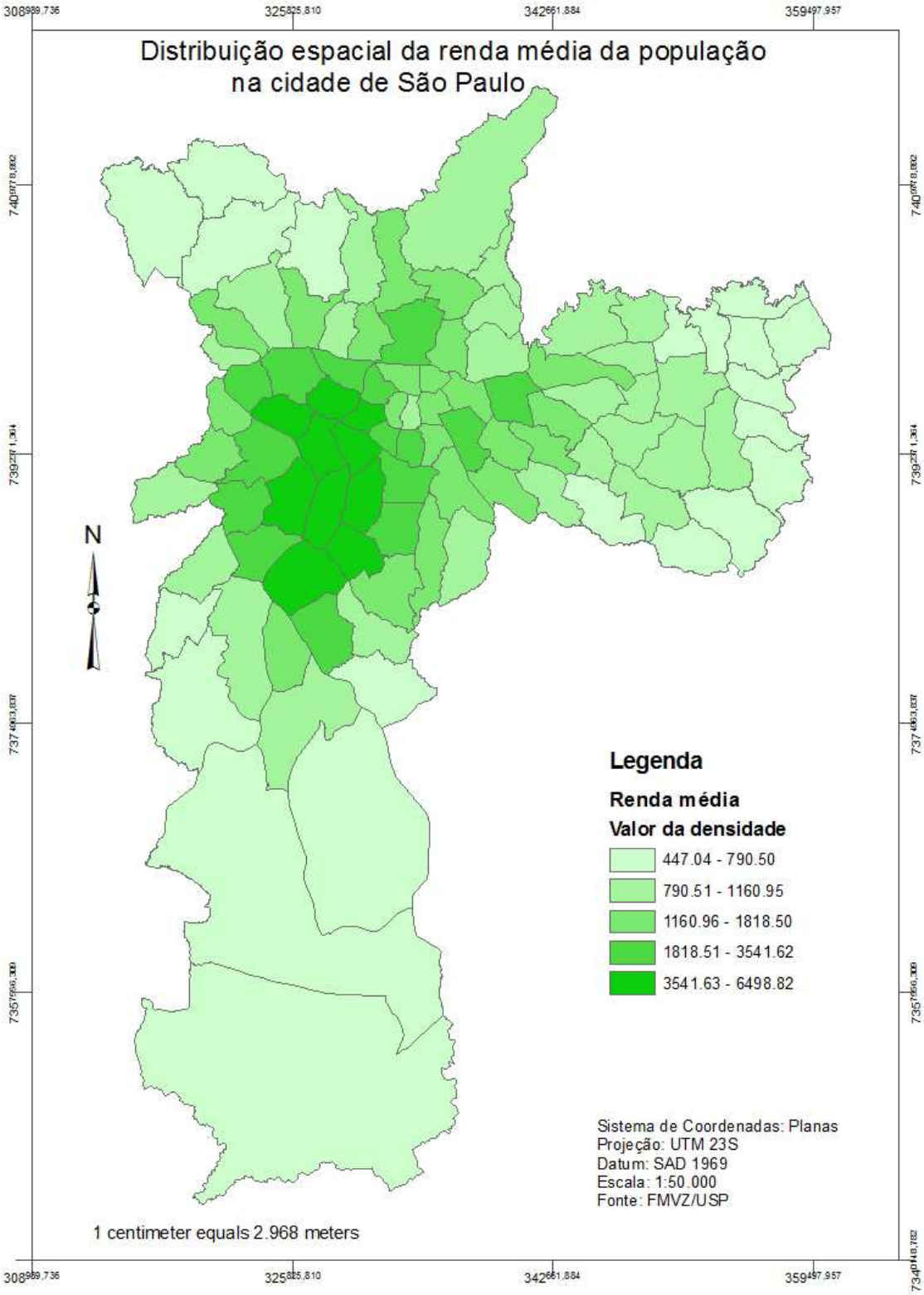


Figura 17-Distribuição espacial da distribuição da renda média populacional na cidade de São Paulo

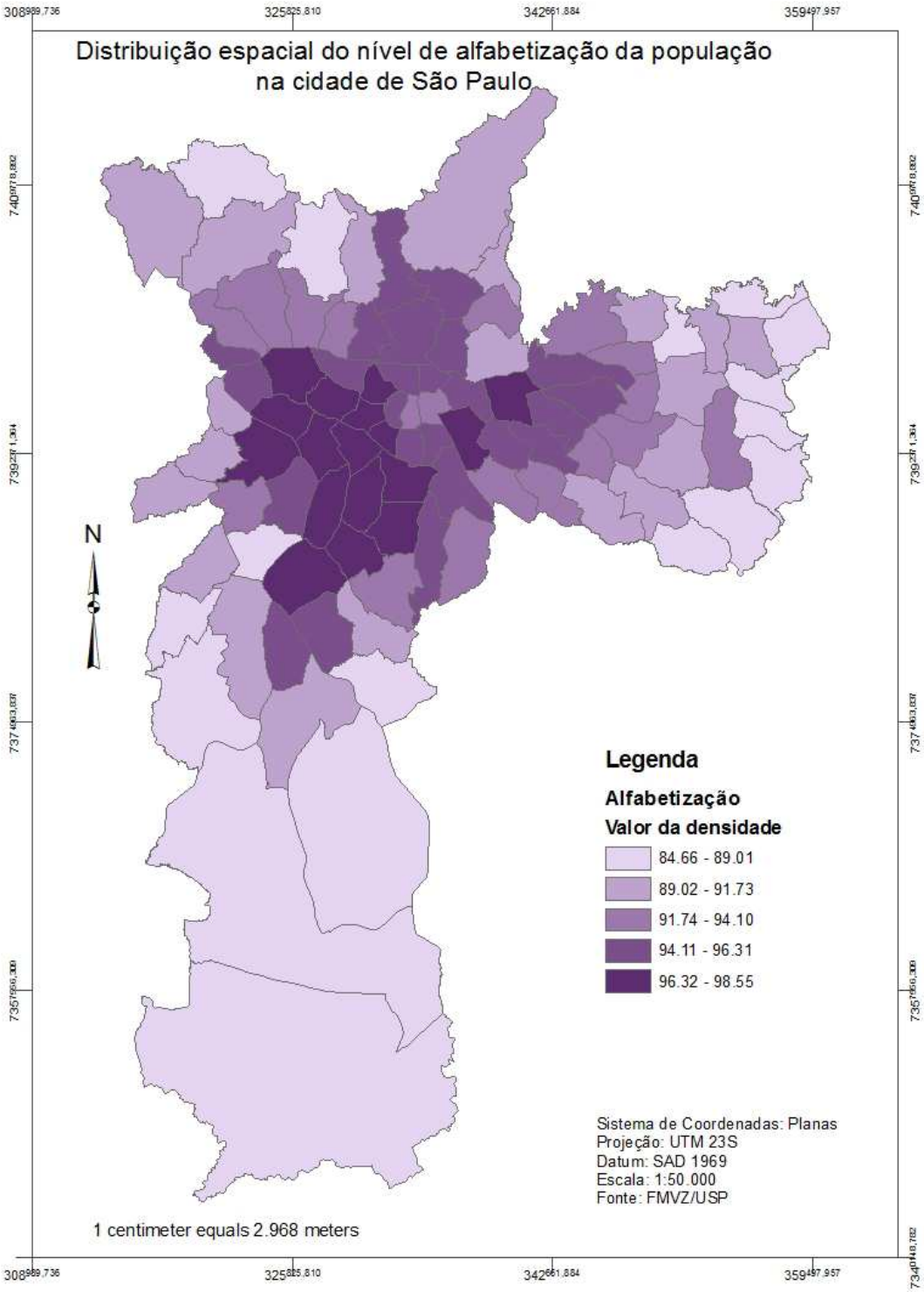


Figura 18-Distribuição espacial do nível de alfabetização na cidade de São Paulo

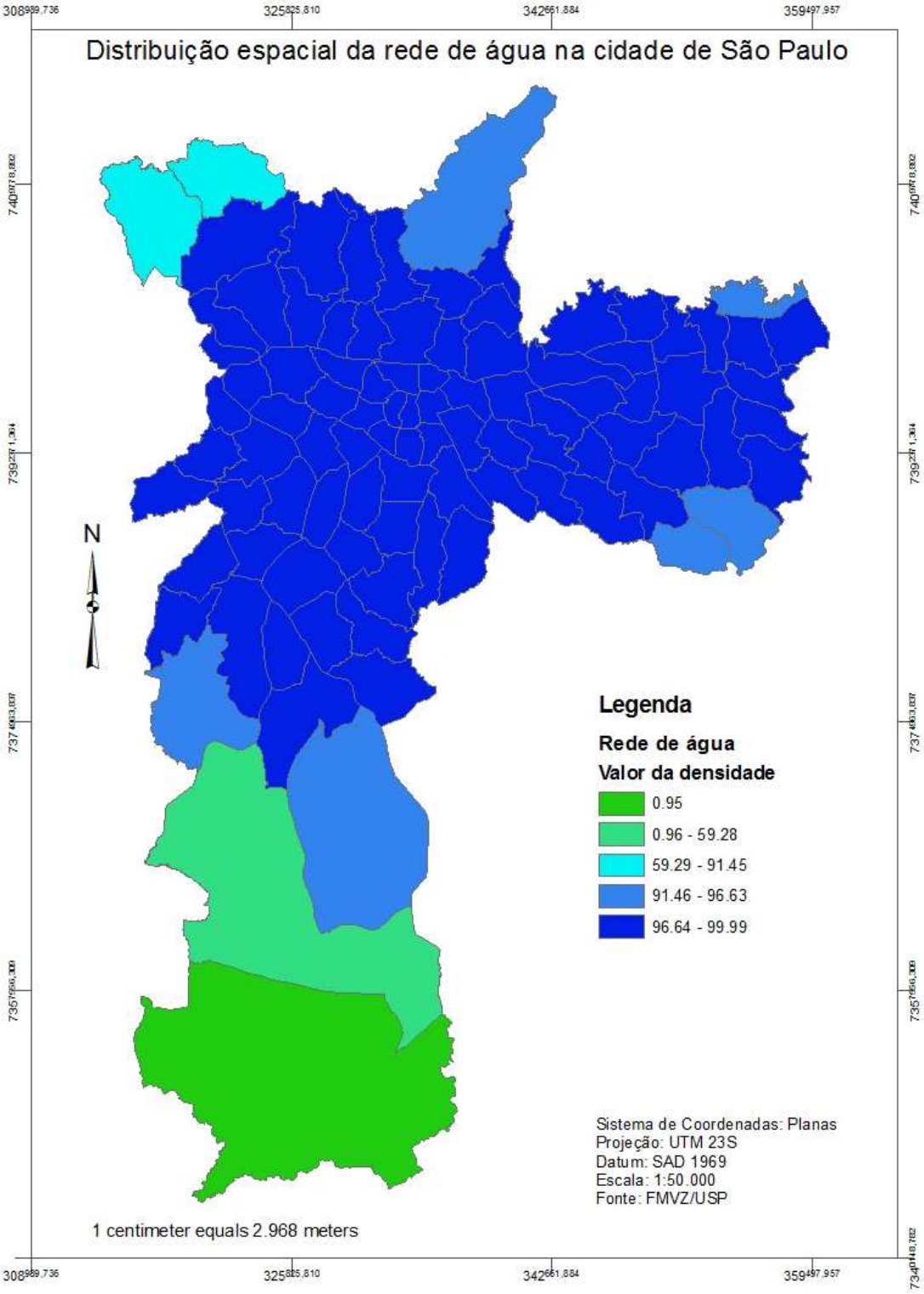


Figura 19-Distribuição espacial da distribuição de rede de água na cidade de São Paulo

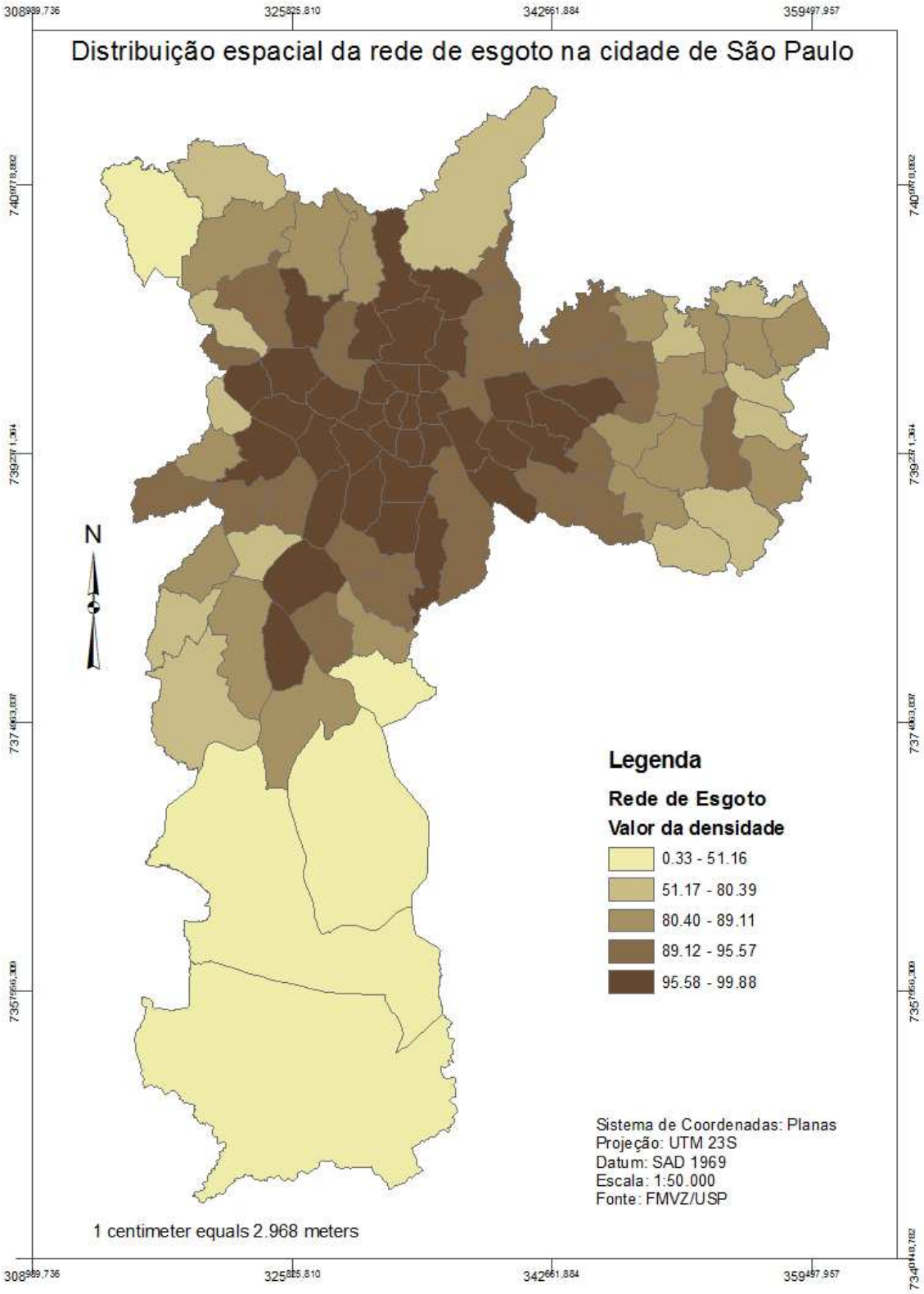


Figura 20-Distribuição espacial das redes de esgotos na cidade de São Paulo

Em adição a estas observações, os dados sugerem que uma causa infecciosa seria uma explicação menos provável para o desenvolvimento de LNH em seres humanos ou nos cães, já que, apesar de a propagação viral ser facilitada nas áreas periféricas, onde há uma maior densidade populacional e piores condições de vida, a incidência de LNH em ambas as espécies foi menor nesses locais.

Outras hipóteses relacionadas às causas da LNH deves ser consideradas, incluindo o possível efeito carcinogênico da exposição às radiações eletromagnéticas. Não houve associação entre o desenvolvimento de LNH em camundongos geneticamente modificados (AKR/J, geneticamente predispostos a desenvolver linfoma) e a exposição à radiação 24 h por dia, 7 dias por semana, 0,4 W/ kg da taxa de absorção específica (SOMMER et al,2007). No entanto, a maioria dos estudos anteriores revela uma associação entre a onda eletromagnética e o risco de se desenvolver leucemia infantil ou câncer cerebral e, menos freqüentemente, linfoma não Hodgkin (MERZENICH et al.,1986; VERKASALO et al.,1993; MYERS et al.,1990). As crianças são tão frágeis e sensíveis como um cão. Um artigo mostrou que a exposição residencial aos campos magnéticos aumentou o risco de desenvolvimento de linfoma em cães que passavam mais de 25% do dia ao ar livre (REIF et al.,2005). A avenida Paulista é um dos pontos mais altos em São Paulo e está localizada dentro de uma área central com a maior concentração de radioatividade no Brasil (ANTONIO et al.,1986). Sabe-se que 29 estações de TV estão localizadas nesta avenida. Mesmo assim, os valores de radiação para esta área são inferiores aos recomendados como seguros pela OMS, que variam de 55 MHz a 220 MHz (ANTONIO et al.,1986; ANATEL,2011). São necessários mais estudos coortes para se verificar o real risco à população de exposição a esta radiação.

A cidade de São Paulo é a sexta maior (1523 km2) em área, e a quinta mais populosa do mundo, com 11.244.369 pessoas, 600.000 veículos e 17000 km de estradas (NARDOCCI et al.2011).

Uma meta-análise mostrou que o rápido desenvolvimento econômico e a urbanização dos países em desenvolvimento causam o aumento do número de veículos, que são responsáveis pela maior parte da poluição do ar (TOLEDO, 2010; HABERMANN et al,2011).

Dados sobre a qualidade do ar mostraram que a cidade de São Paulo tem altas concentrações de poluição ambiental com partículas e poluentes voláteis, como os materiais particulados de 2,5 micrômetros ($PM_{2,5}$) e de 10 micrômetros (PM_{10}), o monóxido de carbono (CO), o dióxido de nitrogênio (NO_2), os compostos orgânicos voláteis (VOCs), e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), principalmente na região Central de São Paulo, onde a concentração do tráfego veicular é mais intensa (HAN;NAEHER,2006).

O número de carros na cidade aumenta em 200.000 a cada ano e atingirá cerca de 9.000.000 veículos em 2015, uma relação de 2,3 habitantes por carro (HAN;NAEHER,2006).

Em São Paulo, 86% do transporte de passageiros são feitos por meio do carro ou do ônibus e apenas 14% são feitos por meio do metrô e dos trens, ao contrário das cidades de Nova York e de Tóquio, que possuem 72% e 61% do transporte de passageiros pelo metrô, respectivamente (STMSP,1999).

Os carros representam na cidade de São Paulo uma fonte estimada de 97,5% de CO e de 96% de NO_2 da poluição atmosférica, equivalentes a cerca de $1,5 \times 10^6$ toneladas de CO e a $3,5 \times 10^5$ toneladas de NO_2 emitidos para a atmosfera a cada ano (HAN;NAEHER,2006; TOLEDO, 2010). A região Central do Centro Expandido teve o maior tráfego e as mais altas concentrações de poluentes (CO, NO_2 e de partículas de 10 micrômetros, PM_{10}), de veículos pesados (ônibus e caminhões), de veículos leves (automóveis) e de motocicletas, em um total de 153 vias mensuradas pela CET (Companhia de Engenharia de Tráfego de São Paulo). O Centro Expandido é uma área do centro histórico de São Paulo delimitada pelos distritos das regiões Norte, Leste, Central, Sul e Oeste. Essa delimitação possui uma rede de avenidas, que abrangiam uma área de 10% da cidade e concentravam cerca de 55% dos veículos diariamente, durante os dias úteis, entre 1997 a 2007 (PAIVA, 2008).

Nas principais avenidas das áreas centrais da cidade circulam mais de 1.900.000 veículos por dia e há prédios altos, que formam microclimas únicos, conhecidos como cânions urbanos. A verticalização da cidade por prédios formam áreas de pouca ventilação e com ar altamente poluído (TARIFA; ARMANI, 2000).

A correlação entre o modelo de concentração de poluentes (Caline-4 modelo de dispersão) e o número de veículos foi alta para poluentes como o CO (0,96) e o PM_{10} (0,94), mensurados pelas estações de medição do ar na região de Pinheiros, Cerqueira César, Centro, Ibirapuera, Congonhas, entre 2000-2005, representada na figura 21. As concentrações de NO_2 foram excluídas, devido ao baixo número de observações (TOLEDO, 2010).

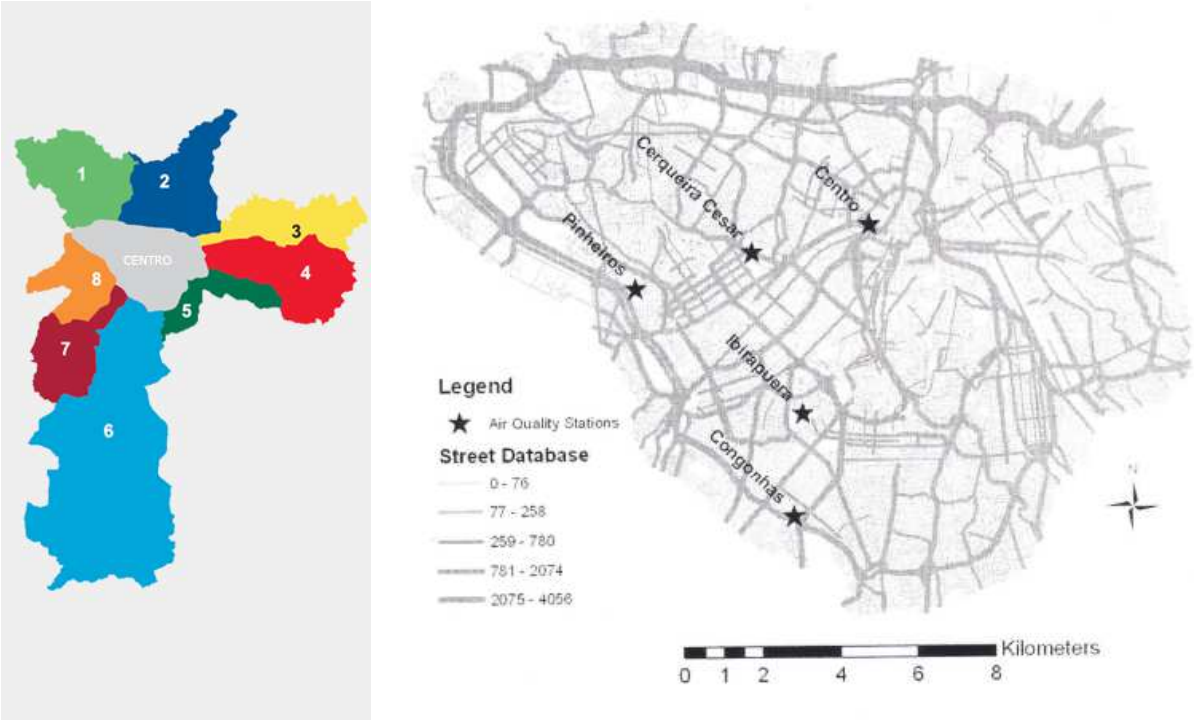


Figura 21-Localização do Centro Expandido (à esquerda) e localização das estações de monitoramento do ar (à direita) na cidade de São Paulo
Fonte: Toledo, G.I.F.M. Avaliação da exposição da população à poluição relacionada ao tráfego no município de São Paulo. 2010. 111f. Tese (Doutorado na Saúde Pública) -Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Em um estudo, foram analisados dados de emissões calculadas em termos de unidade de massa, por unidade de tempo, por unidade de área. A região metropolitana deste estudo foi dividida em uma grade composta por quadrados de 25 km² ou 9 km² para medir a emissão de cada um dos poluentes (CO, NO_2, hidrocarbonetos e-HC). O estudo revelou que a região do Centro expandido, principalmente a região Central, teve um elevado número de veículos e uma elevada concentração de poluição, em comparação com outras regiões da cidade de São Paulo. Devido à ocupação urbana desordenada e ao sistema viário radial, nesta região se concentra a maior poluição atmosférica de São Paulo - **figuras 22,23,24 e 25** (LANDMANN, 2004).

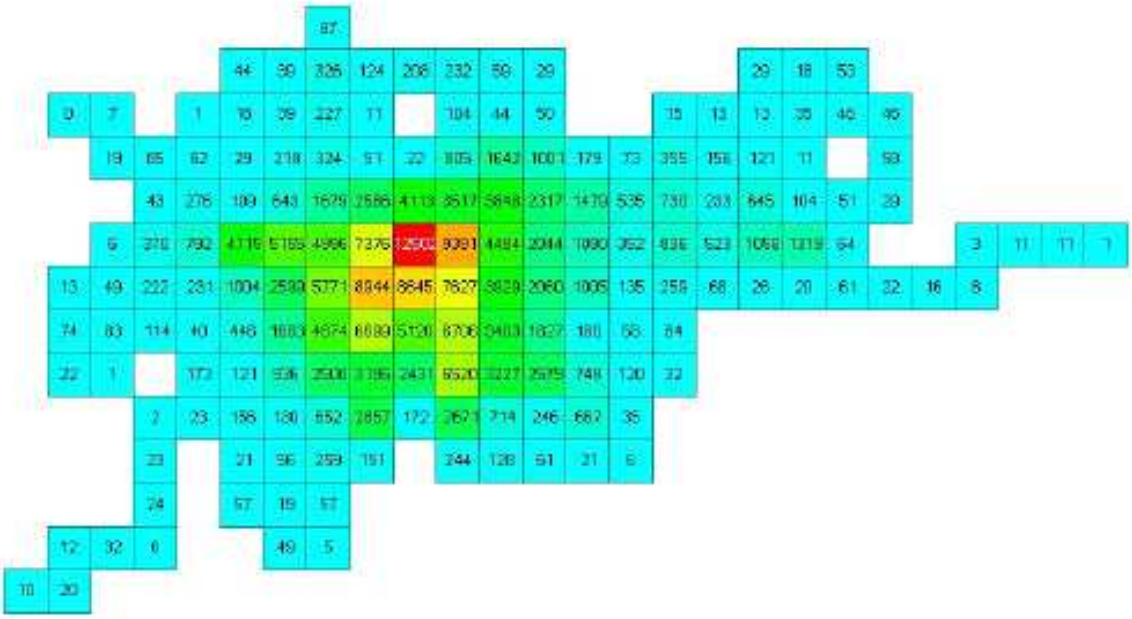


Figura 22-Distribuição das emissões de monóxido de carbono - CO (em kg / h) na cidade de São Paulo, segundo o volume do tráfego veicular obtido a partir do software EMME/ 2 (cada quadrado representa uma área de 25 km2)
Fonte : Landmann, 2004. Avaliable in:http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd25/camili.pdf

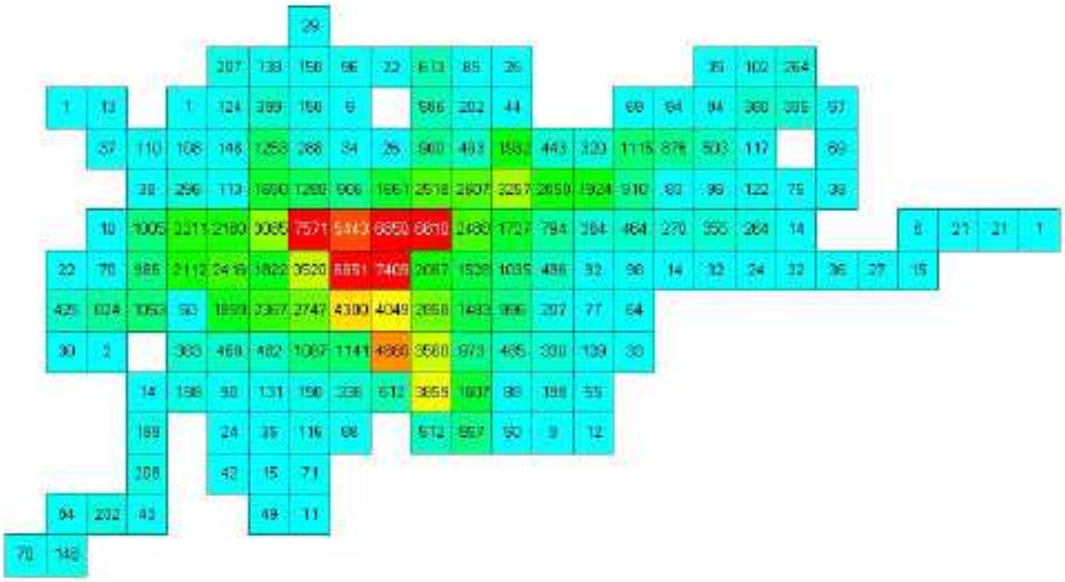


Figura 23-Distribuição das emissões de dióxido de nitrogênio - emissões de NOx na cidade de São Paulo, segundo o volume do tráfego veicular obtido a partir do software EMME / 2 (cada quadrado representa uma área de 25 km_2)
Fonte : Landmann, 2004. Avaliable in:http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd25/camili.pdf

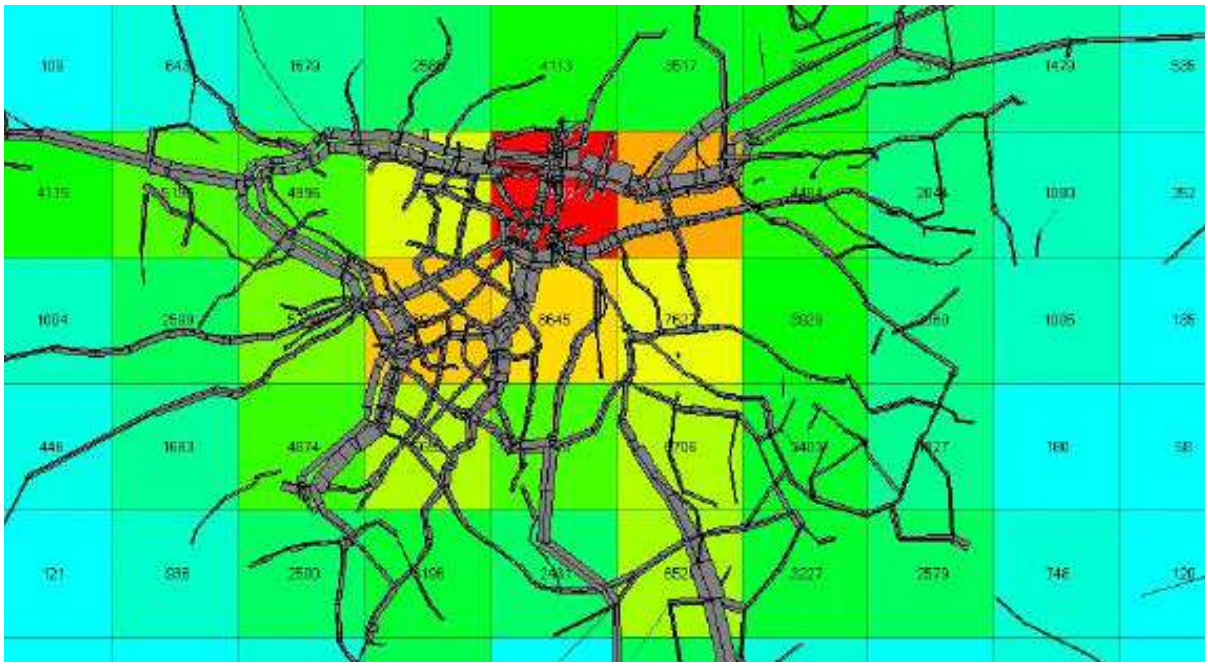


Figura 24-Detalhes da concentração de CO na região central de São Paulo, carregado segundo o volume do tráfego veicular (a espessura dos trames é proporcional ao volume do tráfego)
Fonte : Landmann, 2004. Avaliable in:http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd25/camili.pdf

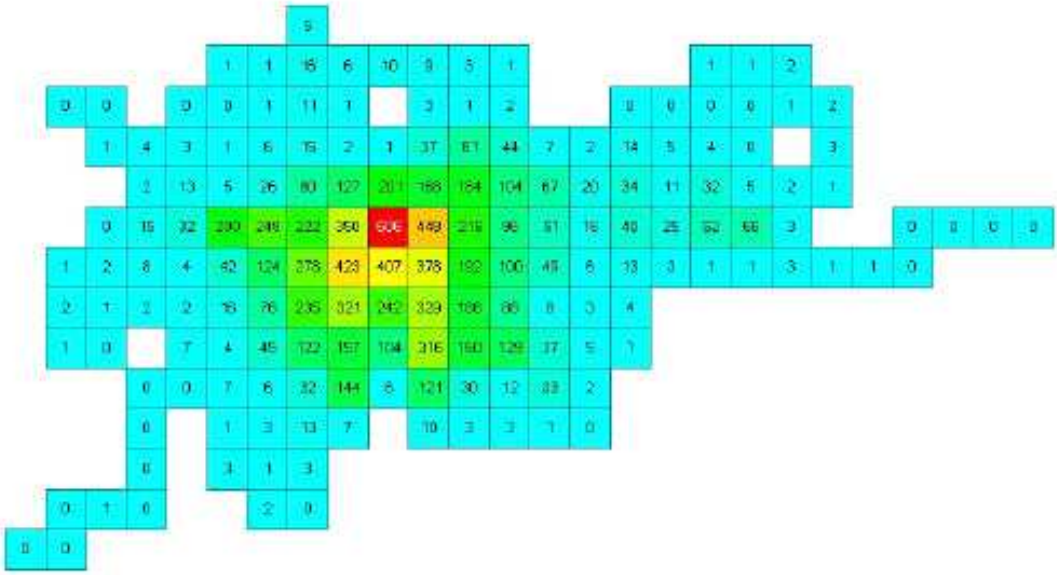


Figura 25-Distribuição das emissões dos Hidrocarbonetos - HC (em kg / h), segundo o volume do tráfego veicular obtidos a partir do software EMME / 2 (cada quadrado representa uma área de 25 km2)
Fonte : Landmann, 2004. Avaliable in:http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd25/camili.pdf

O linfoma não Hodgkin tem sido associado à poluição urbana do ar. Motoristas de ônibus e trabalhadores de manutenção de ônibus expostos à poluição atmosférica urbana apresentaram um aumento da mortalidade por LNH (MERLO et al.,2010), e moradores de residências perto de estradas com intenso tráfego veicular foram associados à morbidade por LNH (MERLO et al.,2010). Estudos em cães concluíram que os incineradores de resíduos, os locais poluídos, e os resíduos radioativos podem ser considerados indicadores de risco para LNH (PASTOR et al.,2009). A cidade de São Paulo possui um número estimado de 2,509,000 cães, com uma relação cão/habitante de 1:4 (CANATTO et al.,2010). Os cães (Canis lupus familiaris) são considerados excelentes modelos de doenças humanas por várias razões, incluindo a fácil acessibilidade e o proeminente status em diversas culturas. Os cães desenvolvem doenças espontâneas como os seres humanos e compartilham o ambiente com seus proprietários (BACKER et al.,2001).

A coincidência espacial dos casos de LNH nos caninos e nos humanos aponta para fatores de risco comuns a ambas as espécies e sugere uma investigação mais aprofundada da relação entre os fatores ambientais e os padrões epidemiológicos do linfoma. Este resultado preliminar sugere que o papel dos poluentes ambientais no risco de desenvolvimento de LNH em humanos e nos cães deve ser abordado nas áreas urbanas, como São Paulo. Pesquisas futuras devem avaliar outros componentes da poluição do ar que podem estar envolvidos no desenvolvimento do linfoma.

AGRADECIMENTOS

Autores filiados: Departamento de Patologia Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Brasil (Katia Cristina Kimura, Maria Lúcia Zaidan Dagli); Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Brasil (Ricardo Augusto Dias); Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, Brasil (Gabriel Zorelo Laporta, Fernanda Alessandra S. Michels, Maria do Rosário Dias de Oliveira Latorre); Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Anhembi-Morumbi, São Paulo, Brasil (Danielle Almeida Zanini, Adriana Tomoko Nishiya); Departamento de Oncologia, Provet. Medicina Veterinária Diagnóstica, São Paulo, Brasil (Rodrigo Ubukata, Renata Afonso Sobral); Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Santo Amaro, São Paulo, Brasil (Rafael Magdanelo Leandro, Claudia Prado de Brito); Departamento de Oncologia, Hospital Rebouças, São Paulo, Brasil (Marcia La Rocca Trombetti, Ana Carolina Lagoa); Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Brasil (Lucas Campos de Sá Rodrigues, Thaís Rodrigues Macedo); Epidemiology for Cancer Prevention INSERM-Bordeaux, France (Allan Monnereau, Annie J Sasco).This work was support by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Proc. No. Proc. 2006/58355-5 and 08/54612-9).

5. RESULTADO DA ANÁLISE DO TRÁFEGO NA CIDADE DE SÃO PAULO

O fluxo de veículos é um importante indicador de poluição atmosférica, uma vez que as fontes móveis são as principais emissoras desses poluentes nas áreas urbanas. Como o único dado fornecido pela CET foi o Desempenho do Sistema Viário-2007, optou-se por se desenvolver uma planilha com os dados que pudessem ser geocodificados e aplicados ao mapa dos linfomas humanos e caninos da cidade de São Paulo, de acordo com o volume do tráfego registrado neste período.

A composição da frota de algumas avenidas principais da cidade de São Paulo, entre 2006 e 2007, pela CET, mostrou que houve a passagem de 335.686 veículos no pico da manhã, no sentido Bairro-Centro e de 312.633 veículos no pico da tarde, no sentido Centro Bairro, representado na Tabela 8 abaixo:

Tabela 6-Composição da frota no horário de pico da manhã e tarde (valores absolutos)

Pico da Manhã (B - C)		Pico da Tarde (C - B)	
07h00-08h00	Automóvel = 86.315	17h00-18h00	Automóvel = 82.947
	Ônibus Fretados = 2.126		Caminhões = 5.536
08h00-09h00	Motocicletas = 15.941		Motocicletas = 17.273
	Ônibus Urbano = 7.524		Ônibus Urbanos = 5.622
09h00-10h00	Caminhões = 6.908	18h00-19h00	Ônibus Fretados = 1.966

Fonte: Companhia de Engenharia do Tráfego, 2007

Essa frota veicular é composta por veículos automotores, motocicletas, ônibus e caminhão como mostra a **figura 26**:

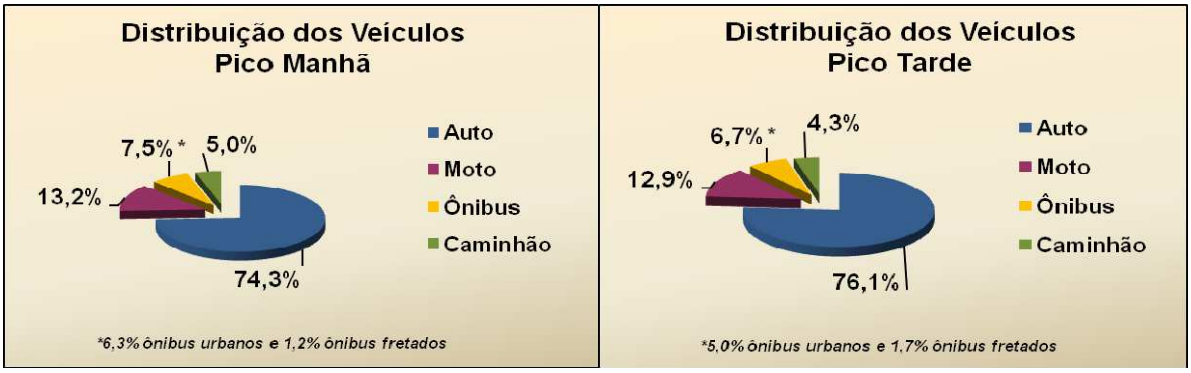


Figura 26-Distribuição dos veículos no pico da manhã e tarde (%), 2007.
Fonte: Companhia de Engenharia do Tráfego, 2007

A listagem do endereçamento das rotas de análise do volume do tráfego das 30 rotas analisadas pela CET ,em relação ao Desempenho do Volume de Tráfego, a seguir:

1 av 23 de maio,2105
2 av nove de julho,1000
3 av alcantara machado,2300
4 av prestes maia,850
5 av dos bandeirantes,3125
6 av eusebio matoso,2500
7 av dr arnaldo,450
8 av washington luis,3100
9 av salim farah maluf,8500
10 av cidade jardim,790
11 av do estado,9741
12 av luis inacio anhana melo,2300
13 av brasil,20
14 av cruzeiro do sul,1000
15 av santo amaro,2100
16 av conde de frontin,2580
17 av do estado,5100
18 r cadeal arcoverde,1200
19 av senador queiros,499
20 av brigadeiro faria lima,4900
21 av liberdade,500
22 av prof francisco morato,300
23 r vergueiro,2200
24 av brigadeiro luis antonio,2300
25 av francisco matarazzo,1100

26 av rudge, 400
27 av joao dias,1100
28 av rangel pestana,1150
29 av guarapiranga,1100
30 av pedroso de moraes,6300

Cada rota foi geocodificada e ilustrada em um mapa, caracterizado pela distribuição espacial do volume de tráfego no período de 7h00 às 10h00 (**Figura 27**) e de 17h00 às 20h00 (**Figura 28**), no período de 7h00 às 10h00, no sentido Bairro-Centro (**Figura 29**) e de 17h00 às 20h00, no sentido Centro-Bairro (**Figura 30**). Os dados foram ilustrados no mapa, através de pontos que variavam em tamanho e em número, de acordo com as rotas de maior intensidade de tráfego. Depois os dados foram comparados ilustrativamente aos mapas da Densidade Kernel dos casos de linfoma humano e canino (**Figura 31**).

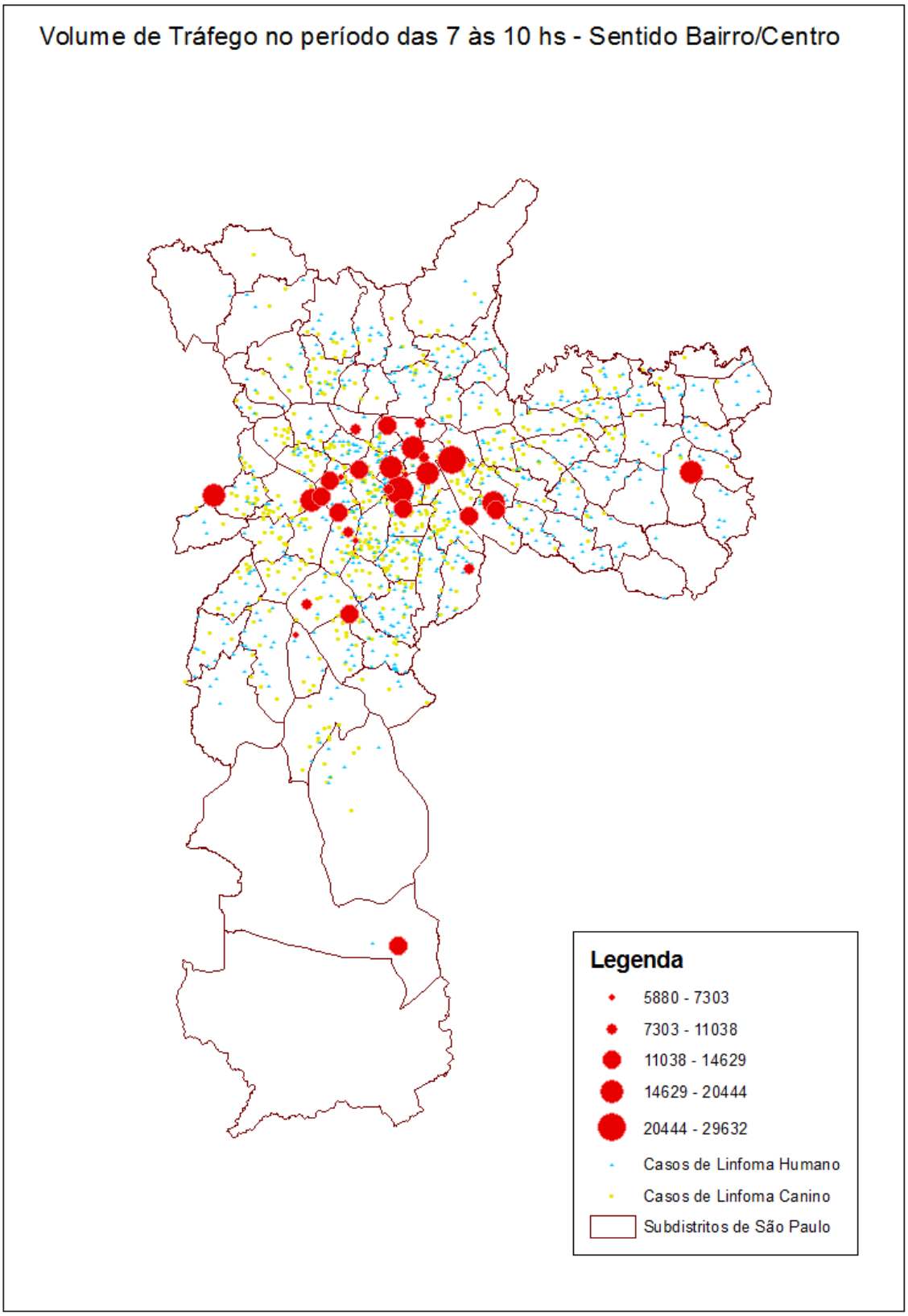


Figura 27-Volume de Tráfego total (veículos automotores, motocicletas, ônibus e caminhão) no período de 7 às 10hs, no sentido Bairro-Centro, 2007

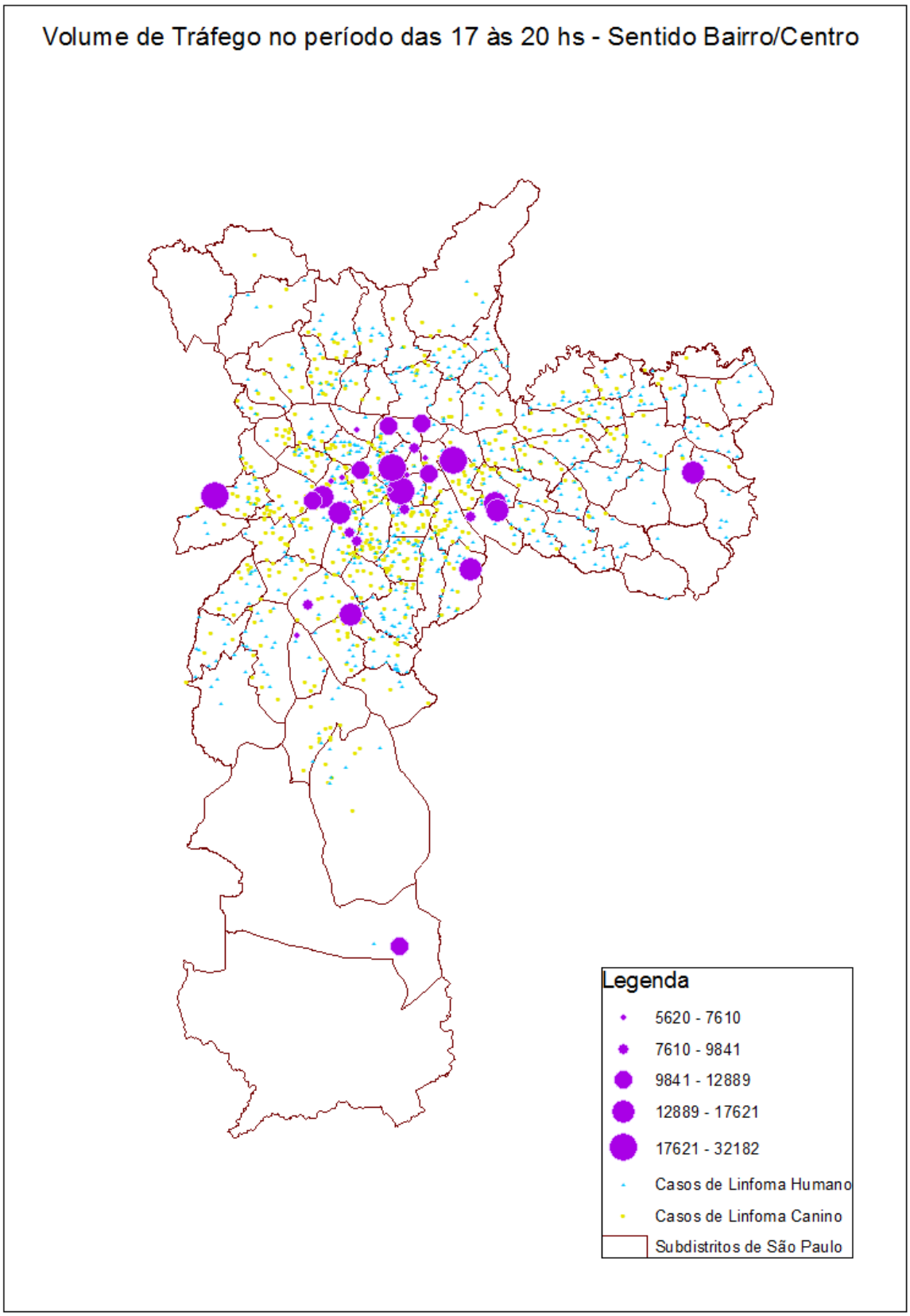


Figura 28-Volume de Tráfego no período de 17 às 20hs, no sentido Bairro-Centro, 2007

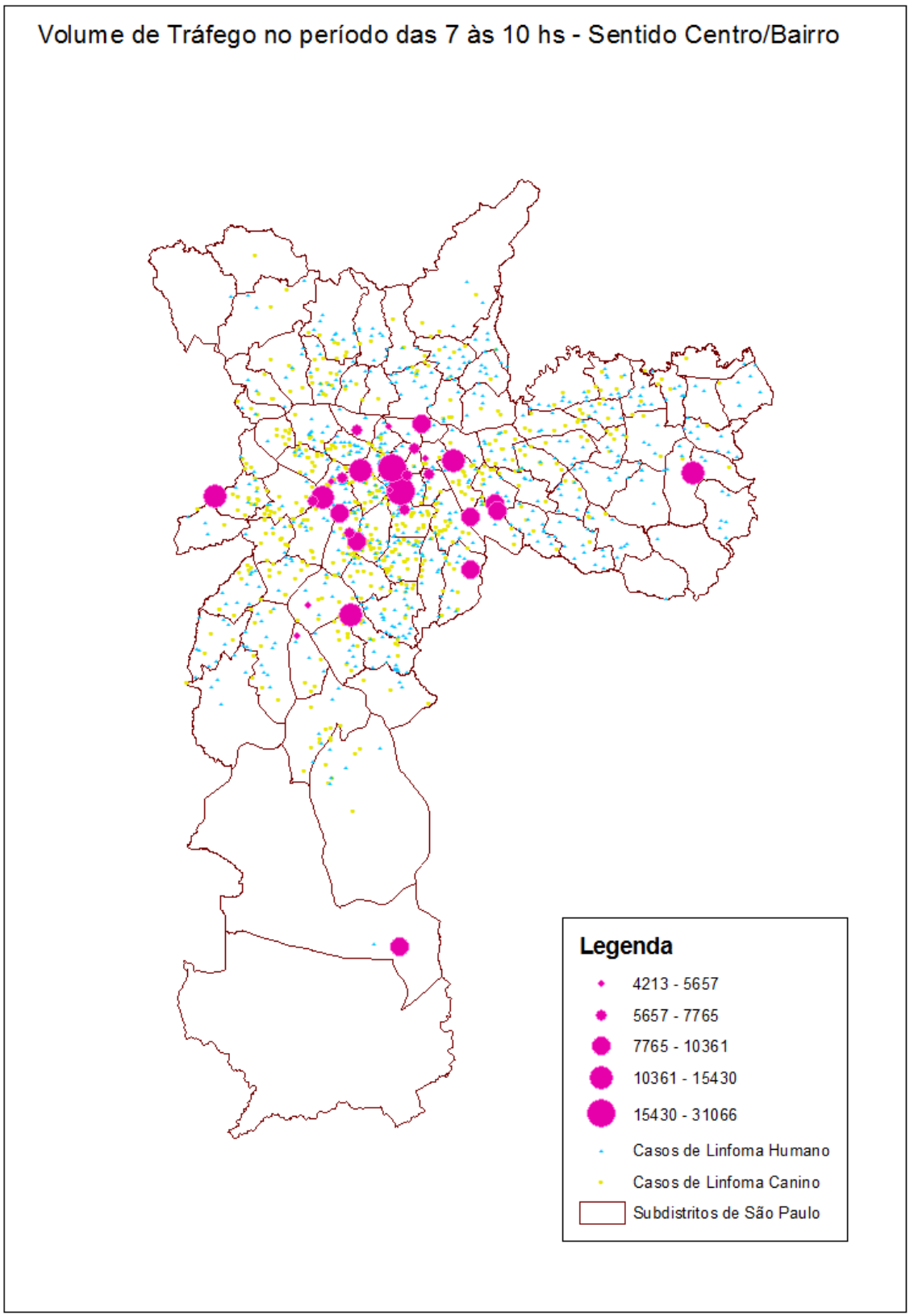


Figura 29-Volume de Tráfego no período de 7 às 10hs, no sentido Centro-Bairro, 2007

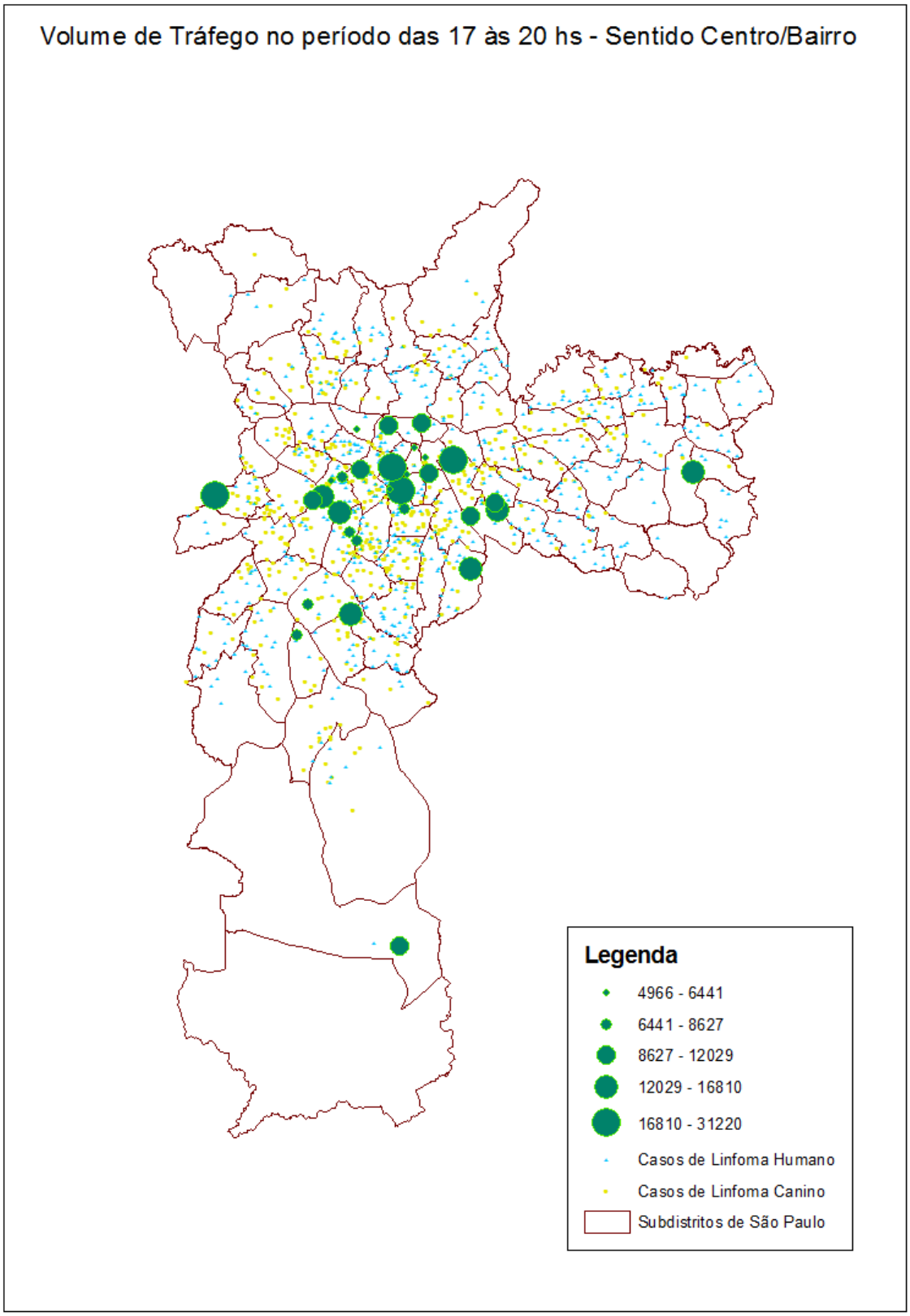


Figura 30-Volume de Tráfego no período de 17 às 20hs, no sentido Centro-Bairro, 2007

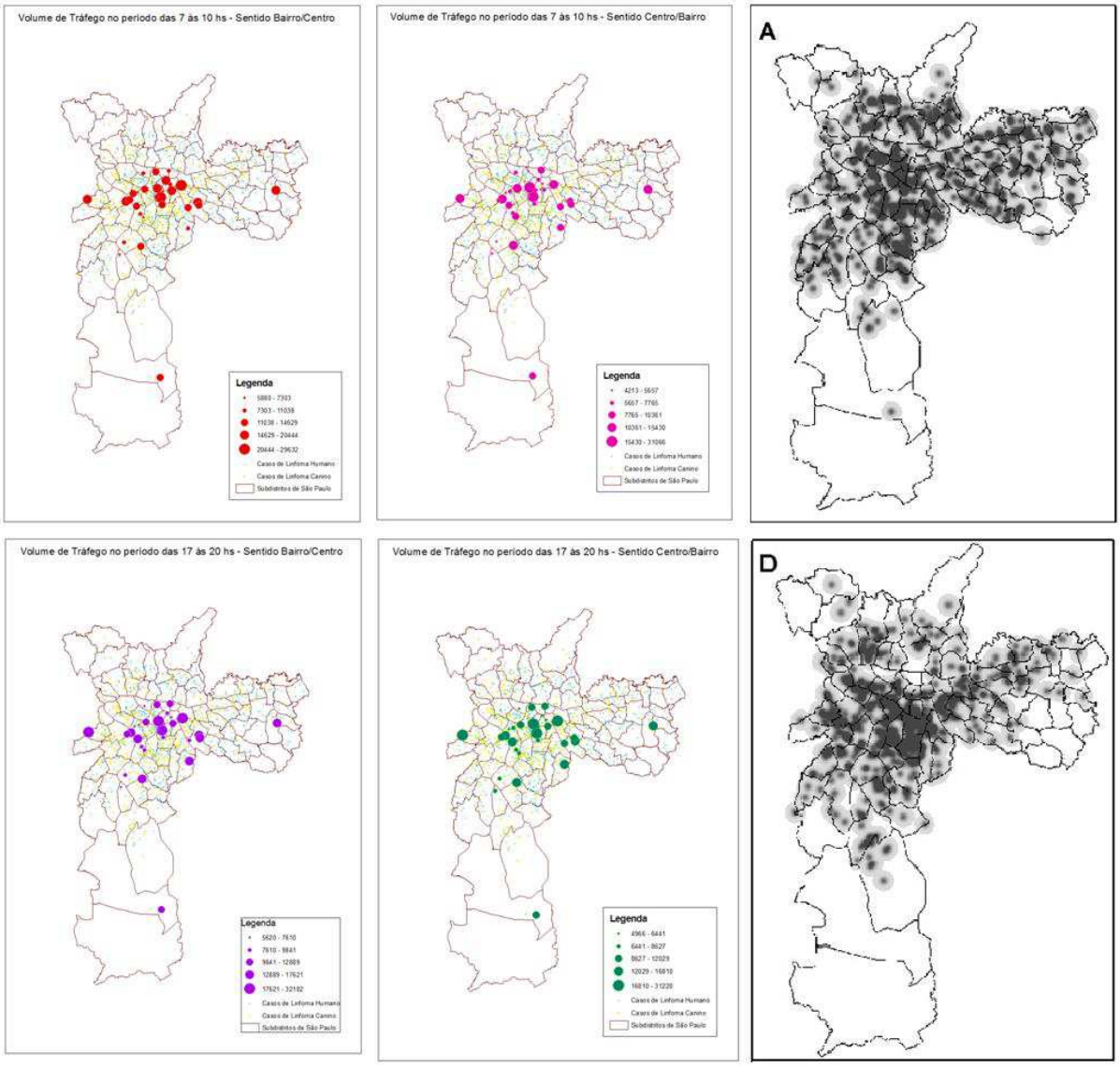


Figura 31-Mapas do Volume do Tráfego veicular; comparação com os mapas da Densidade Kernel entre os casos de linfoma humano (A) e canino (D)

6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO GERAL

O desenvolvimento industrial e urbano tem originado em todo o mundo um aumento crescente da emissão de poluentes atmosféricos (DEGLISE, 2010). Muitos estudos epidemiológicos têm mostrado a associação entre a exposição aos poluentes atmosféricos e os efeitos adversos à saúde (Pan American Health Organization, 2005).

Um questionário epidemiológico realizado em Nápoles e nas cidades próximas, onde existem o descarte ilegal do lixo em aterros e as incinerações não autorizadas, mostrou que os cães que vivem na área de risco eram 2,9 vezes mais propensos a desenvolver o linfoma (MARCONATO et al,2009). Do mesmo modo, foi demonstrado que pessoas que viviam em zonas de alta exposição ao incinerador de lixo sólido com alta emissão de dioxina, tinham um risco de 2,3 vezes maior para desenvolver o linfoma não Hodgkin, em comparação com as pessoas que viviam em zonas de baixa exposição na cidade de Besançon (França) (FLORET et al,2007). Ramis et al. (2009), demonstraram que a proximidade das indústrias de papel aos centros populacionais (<2 km) poderia estar associada a um risco aumentado de mortalidade por linfoma não Hodgkin em humanos. Houve um alto risco de desenvolver linfoma em cães (702 casos) em áreas de incineração de resíduos, em áreas poluídas e em áreas com a presença de resíduo radioativo (PASTOR et al, 2009).

A cidade de São Paulo foi escolhida como sede para a realização deste estudo devido à alta concentração de poluição do ar, sendo considerada uma das cidades mais poluídas do mundo, junto com Tóquio, México e New York (TOLEDO, 2000). As grandes metrópoles brasileiras, incluindo São Paulo, Rio de janeiro e Belo Horizonte, somam 45% da frota nacional de veículos (Pan American Health Organization, 2005).

Uma meta-análise mostrou que com o desenvolvimento econômico e com a urbanização dos países em desenvolvimento, houve um rápido aumento do número de veículos, considerados a maior fonte móvel responsável pela poluição do ar (HABERMANN, 2011).

Na área central do centro expandido da cidade de São Paulo é possível encontrar a maior concentração de poluentes da cidade (CO, NO_2 e PM10), devido ao intenso tráfego. Esta região está localizada ao redor do centro histórico e é delimitada pelo mini-anel viário, composto pelas marginais Tietê e Pinheiros e pelas avenidas Salim Farah Maluf, Afonso d'Escragnolle Taunay, Bandeirantes, Juntas Provisórias, Presidente Tancredo Neves, Luís Inácio de Anhaia Melo e pelo Complexo Viário Maria Maluf. Esta região é caracterizada também por uma alta concentração de edifícios, os quais criam diversos microclimas, chamados cânions urbanos. A verticalização urbana resultou em cânions mal ventilados, com o ar altamente poluído preso (TOLEDO, 2000). Neste estudo, a área Central do Centro Expandido da cidade de São Paulo, a mais poluída da cidade, mostrou a maior concentração de casos de Linfoma não Hodgkin em cães e em humanos.

Apesar da queda da emissão dos poluentes pelos veículos em São Paulo, devido à fiscalização, as fontes móveis ainda representam uma das principais emissoras de poluentes da cidade, devido ao seu crescimento exponencial. O crescimento da frota veicular é maior a cada ano e gera congestionamento e aumento da queima de combustível (CETESB, 2008; HABERMANN et al, 2011). A avaliação da poluição atmosférica pelas redes de monitoramento da qualidade do ar (automática e manual), feita pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo-CETESB, é distribuída em somente alguns pontos da Cidade de São Paulo a não abrange a heterogeneidade espacial causada pela dispersão dos poluentes emitidos pelas fontes móveis (CETESB, 2008). Em virtude dessa deficiência, muitos artigos avaliaram indiretamente esses poluentes por meio do volume do tráfego de veículos (HABERMANN, 2011).

Um estudo comparando a densidade de veículos, as vias e o tráfego com a concentração de poluentes verificou que existe uma correlação positiva (estatisticamente significante) com poluentes como o CO (r :0,70), benzeno (r= :0,69), 1,3 butadieno (r = 0,57) e NO_2 (r :0,30) (REYNOLDS et al, 2002). Abrangendo essa hipótese, uma meta análise verificou que as concentrações de poluentes perto de vias são bem correlacionadas com o volume do tráfego (HABERMANN et al.2011).

Em relação ao tráfego, os mapas do Volume de Densidade do Tráfego, fornecidos pela Companhia de Engenharia do Tráfego (CET), mostraram que o pico de tráfego no período entre 07:00 e 10:00h foi muito semelhante nos sentidos Bairro-Centro e Centro-Bairro. O mesmo aconteceu no horário entre 17:00 e 20:00h, sugerindo que essas vias são rotas principais e são responsáveis por uma parte ilustrativa do desenho do tráfego e, indiretamente, pela poluição geral na cidade de São Paulo. As rotas secundárias não são englobadas pela análise do tráfego da CET. As rotas de maior intensidade de tráfego tendem a seguir o contorno do desenho ilustrativo da Densidade Kernel, mostrando maior intensidade na região Central, do mesmo modo que os casos de linfoma canino e humano representado na Figura 31.

Segundo o resultado do questionário epidemiológico realizado neste estudo, houve uma forte tendência de que a permanência de cães outdoor (que vivem no ambiente externo da casa) a cerca de 100 metros das ruas movimentadas ou de avenidas (mais de 50 veículos por minuto) foi significativamente associada com o aumento de desenvolver o linfoma, fortalecendo a idéia de que os fatores de risco ambientais podem estar implicados no desenvolvimento do linfoma. Segundo os mapas espaciais das Densidades Kernel, os aglomerados de casos de linfomas caninos e humanos sobrepuseram-se, havendo uma coincidência maior na região Central da cidade de São Paulo, onde há maior poluição atmosférica. Os linfomas foram positivamente associados com os padrões sócio-econômicos médio e alto, representados por índices, como a alfabetização da população, renda, distribuição da rede de água e esgoto, dentre outros. Desse modo, os cães e as pessoas com linfoma foram caracterizados como aqueles que têm em alguns aspectos uma melhor condição de vida, mas que tem baixa qualidade de vida em outros aspectos, por viverem em uma região de maior desenvolvimento urbano e, consequentemente, maior tráfego e poluição veicular. Os linfomas foram negativamente associados com a distribuição das favelas, o que poderia ser explicado pelo subdiagnóstico de linfoma em cães, devido à falta de recursos financeiros do dono para levar o cão ao veterinário. Por outro lado, os seres humanos que vivem nas favelas teoricamente procuram o atendimento médico, em caso de doença grave, como o linfoma.

Este estudo sugere que há fortes indícios de que existem fatores de risco de desenvolver o linfoma comuns aos cães e aos humanos. Tanto o questionário epidemiológico, quanto os mapas cartográficos e as características da região Central da cidade de São Paulo (tráfego e intensa urbanização, como a presença de indústrias, de automóveis, de comércios, de caminhões, de motocicletas, de prédios e de ônibus) relacionam os fatores de risco comuns de desenvolvimento de linfoma nos cães e nos humanos e a contribuição da poluição atmosférica para essa doença. Isso reforça a necessidade de novas investigações e de aprofundamento da suposta relação causal entre os poluentes atmosféricos e o desenvolvimento do linfoma em ambas as espécies, além da necessidade de avaliação de outros poluentes (da água, do solo, da alimentação). O conjunto desses dados ajudará a esclarecer a relação entre a poluição ambiental e o desenvolvimento de linfomas em humanos e nos cães.

7.REFERÊNCIAS

ABBA, E.J.; UNNIKRISHNAN, S.; KUMAR, R.; YEOLE, B.; CHOWDHURY, Z."Fine aerosol and PAH carcinogenicity estimation in outdoor environment of Mumbai City, India". **Int.ernal Journal Environmental Health Research.** 22, 134-49, 2011.

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**, 8 ed, Editora Saunders, 2008.

ADAM, P.; BONZHEIM, I.; FEND, F.; QUINTANILLA-MARTÍNEZ, L. Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphomas of the elderly. **Advances in Anatomic Pathology**. v.18, p.349-55, 2011.

ALEXANDER, D.D.; MINK, P.J.; ADAMI, H.O.; CHANG, E.T.; COLE, P.; MANDEL, J.S.; TRICHOPOULOS, D. The non Hodgkin lymphomas: a review of the epidemiologic literature. **Internal Journal Cancer**. v.120, p.1–39, 2007.

ANATEL (**Agência Nacional de Telecomunicações**). Available in: http://sistemas.anatel.gov.br/sigwebmaprni/index.zul (2011).

ANTONIO, A.; LAMPARELLI, C.C.; HERNANDEZ, J.G.; COSCELI J. **Estudo do potencial poluidor de emissões de energia: radiações não ionizantes na faixa VHF.** Fonte: São Paulo; CETESB; 134 p. Ilus.(1986).

ANWAR, W.A. Monitoring of human populations a risk by different cytogenetic end points. **Environmental Health Perspectives**,v.102, p.131-134, 1994.

ARESPACOCHAGA, A.G.; SCHWENDENWEIN, I.; WEISSENBÖCK, H. Restrospective study of 82 cases of canine lymphoma in Austria based on the working formulation and imunophenotyping. **Journal of Comparative Pathology**. v.136, p.186-192, 2007.

ARGYLE, D.J. ; KHANNA, C. **Tumor Biology and Metastasis.** In Vail, D.M.&Withrow, S.J. (eds). Withrow and MacEwen´s small animal clinical oncology. (4thed.). (pp.31-50). Missouri:Saunders Elsevier.

ASCOLI, V.; SIGNORETTI, S.; ONETTI-MUDA, A.; PESCARMONA, E.; DELLA-ROCCA, C.; NARDI, F.; MASTROIANNI, CM.;GASTALDI, R.;PISTILLI, A.;GAIDANO, G.;CARBONE, A.; LO-COCO, F. Primary effusion lymphoma in HIV-infected patients with multicentric Castleman's disease. **Journal of Pathology**, v.193, p.200–209, 2001.

ASTER, J.C. **Diseases of white blood cells, lymph nodes, spleen and thymus.** In: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 7th edn., KUMAR V., ABBAS AK., FAUSTO N., eds., Philadelphia, Elsevier Saunders, 2004.

BACKER, L.C.; GRINDEM, C.B.; CORBETT, W.T.; CULLIN, L.; HUNTER, L. Pet dogs as sentinels for environmental contamination.**The Science of The Total Environment.** v.274, n.1-3, p.161-169, 2001.

BERNY, P.J.; CÔTÉ, L.M.; BUCK, W.B. Can household pets be used as reliable monitors of lead exposure to humans? **Science of the Total Environment**. v.172, n.2-3, p.163-73,1995.

BELPOMME, D. **Ces Maladies créées par l´homme**. Albin Michel, Français: 2004.p.384.

BLAIR, A. Herbicides and non Hodgkin's lymphoma: New evidence from a study of Saskatchewan farmers. **Journal of the National Cancer Instute** v.82:544-545, 1990.

BONNET, F.; BALESTRE, E.; THIEBAUT, R.; MORLAT, P.; PELLEGRIN,J.L.; NEAU, D.; DABIS, F.Factors associated with the occurrence of AIDS-related non Hodgkin lymphoma in the era of highly active antiretroviral therapy: Aquitaine Cohort, France. **Clinical Infectious Disease.** v.42, p.411-417, 2006.

BOSTRÖM, C.E. ; GERDE, P. ; HANBERG, A. ; JERNSTRÖM, B. ; JOHANSSON, C. ; KYRKLUND, T. ; RANNUG, A. ; TÖRNQVIST, M. ; VICTORIN, K. ; WESTERHOLM, R. Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. **Environmental Health Perspectives**. v.3, p.451-88, 2002.

BRAGA, A.L.F.; CONCEIÇÃO, G.M.S.; PEREIRA, L.A.A.; KISHI, H.S.; PEREIRA, J.C.R.; ANDRADE, M.F; GONÇALVES, F.L.T.; SALDIVA,P.H.N.; LATORRE,M.D.O. "Air pollution and pediatric respiratory hospital admissions in São Paulo, Brazil". **Journal Environmental Medicine.** v.1, p.95-102, 1999.

BRÄUNER, E.V.; SØRENSEN, M.; GAUDREAU, E.; LEBLANC, A.; ERIKSEN, K.T.; TJØNNELAND, A.; OVERVAD, K.; RAASCHOU-NIELSEN, O. A prospective study of organochlorines in adipose tissue and risk of non Hodgkin lymphoma. **Environmental Health Perspect.** v.120, n 1, p.105-11, 2012.

BREEN, M.; MODIANO, J. F. Evolutionarily conserved cytogenetic changes in hematological malignancies of dogs and humans - man and his best friend share more than companionship. **Chromosome Research**. v.16, p.145-154, 2008.

BRUNKER, J.D., HOOBER, J.P. B-cell lymphoma in a dog with ehrlichiosis (Ehrlichia canis) and systemic histoplasmosis (Histoplasma capsulatum). **Cancer Veterinary Journal**. v.48, n.3, p.292-295, 2007.

BRYAN, H.M.; DARIMONT, C.T.; PAQUET, P.C.; ELLIS, J.A.; GOJI, N.; GOUIX,M.; SMITS, J.E.Exposure to infectious agents in dogs in remote coastal British Columbia: Possible sentinels of diseases in wildlife and humans. **Cancer Journal Veterinary Researh**. v.75, n.1, p.11-7,2011.

BUKOWSKI, J.A.; WARTENBERG, D. An alternative approach for investigating the carcinogenicity of indoor air pollution: pets as sentinels of environmental cancer risk. **Environmental Health Perspectives**. v.105, n.12, p.1312-9,1997.

CANATTO, B.D. **Caracterização das populações de cães e gatos domiciliados no município de Sao Paulo**. 2010. 92f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CARDOSO, M.J.L.; MACHADO, L.H.A.; MOUTINHO, F.Q.; PADOVANI, C.R. Linfoma Canino- Achados clínicos-patológicos. **Archives of Veterinary Science.** v.9, n. 2, p.25-29, 2004.

CARLTON WW., MCGAVIN MD*.* **Patologia Veterinária Especial de Thomson**. 2.ed. Porto Alegre: Artemed, 1998.

CARTWRIGHT,R.A.; WATKINS,G. Epidemiology of Hodgkin's disease: a review. **Hematological Oncology.** v.22, n.1, p.11-26, 2004.

CASTANHO, A.D.A.A. **Determinação Quantitativa de Fontes de Material Particulado na Atmosfera da Cidade de São Paulo**. 1999. 131f.Dissertação (Mestrado no Instituto de Física) de Mestrado, Instituto de Física, Universidade de São Paulo, 1999.

CETESB, Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Relatório da Qualidade do Ar no Estado de São Paulo**, 2001. Avaliable in: http://marsp.cptec.inpe.br/gestar/RelatorioAr2001.pdf.

[CETESB] Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Relatório de qualidade do ar no estado de São Paulo,** 2004. Avaliable in: http://marsp.cptec.inpe.br/gestar/RelatorioAr2004.pdf.

CETESB, Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Relatório da Qualidade do Ar no Estado de São Paulo,** 2008. Avaliable in: HTTP://www.cetesb.sp.gov.br/Ar/publicações.asp.

CHAKRABORTY, J. "Cancer risk from exposure to hazardous air pollutants: spatial and social inequities in Tampa Bay, Florida". **Internal Journal Environmental Health Research.** 2011.

CHAO, C.; PAGE, J.H. Type 2 diabetes mellitus and risk of non Hodgkin lymphoma: a systematic review and meta-analysis. **American Journal Epidemiology**. *v.*168, p.471-80, 2008.

CHIOU,S.H.; CHOW, K.C.; YANG, C.H.; CHIANG, S.F.; LIN, CH.Discovery of Epstein-Barr virus (EBV)-encoded RNA signal and EBV nuclear antigen leader protein DNA sequence in pet dogs. **Journal General Virology**. v.86, n.4, p.899–905,2005.

COCHRANE, C.G. Cellular injury by oxidants. **American Journal Medicine**, v.91, p.23S-30S, 1991.

COHEN, D.; REIF, I.S.; BRODEY, R.S.Epidemiological analysis of the most prevalent sites and types of canine neoplasia observed in a veterinary hospital. **Cancer Research**.v.34,p.2859-2868, 1974.

COCCO, P.; MOORE, P.S.; ENNAS, M.G.; TOCCO, M.G.; IBBA, A.; MATTUZZI, S.; MELONI, M.; MONNE, M.; PIRAS, G.; COLLU, S.; SATTA, G.; ZUCCA, M.; SCARPA, A.; FLORE, C. Effect of urban traffic, individual habits, and genetic polymorphisms on background urinary 1-hydroxypyrene excretion. **Annals of Epidemiology.** v.17, p.1-8, 2007.

COIFFIER, B.; LEPAGE, E.; BRIERE, J.; HERBRECHT, R.; TILLY, H.; BOUABDALLAH, R.; MOREL, P.; VANDEN NESTE, E.; SALLES, G.; GAULARD, P.; REYES, F.; LEDERLIN, P.; GISSELBRECHT, C. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. **The New England Journal of Medicine**.v.346, n.4, p.235-42, 2002.

COMAZZI, S. ; GELAIN, M.E. Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma. **Veterinary Journal**. v.188,n.2,p.149-55,2011.

CONSONNI, D.; PESATORI, A.C.; ZOCCHETTI, C. ; SINDACO, R.; DÓRO, L.C.; RUBAGOTTI, M.; BERTAZZI, P.A. Mortality in a population exposed to dioxin after the Seveso, Italy, accident in 1976: 25 years of follow-up. **American Journal Epidemiology.** v.167, pp. 847-858, 2008.

COOTER, S.M. ; GOLDESTEIN, M.A. Treatment of lymphoma and leukemia with cyclophosphamide, vincristine and prednisone. I. Treatment of the dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**.v.19,p.159-165,1983.

COUTO, C.G. **Oncology.** In R.W. Nelson & C.G. Couto. Small Animal Internal Medicine. 4th ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2009.p.1143-1195.

CROCETTI, E.; CAPOCACCIA, R.; CASELLA, C.; GUZZINATI, S.; FERRETTI, S.; ROSSO, S.; SACCHETTINI, C.; SPITALE, A.; STRACCI, F.; TUMINO, R. **European Journal of Cancer Prevention**. v.13, n.1, p.287-295, 2004.

CROSS, A.J.; LIM, U. "The role of dietary factors in the epidemiology of non Hodgkin's lymphoma." **Leukemia & Lymphoma**. 2006; 47(12): 2477-2487.

CULLEN, C.L.; CASWELL, J.L.; GRAHN, B.H. Intravascular lymphoma presenting as bilateral panophthalmitis and retinal detachment in a dog. **Journal American Animal Hospital Association**. v.36, n.4, p.337-42, 2000.

CURY, P.M.; LICHTENFELS, A.J.; REYMÃO, M.S.; CONCEIÇÃO, G.M.; CAPELOZZI, V.L.; SALDIVA, P.H. "Urban level of air pollution modifies the progression of urethane-induced lung tumours in mice". **Pathology Research Practice.** v.196, n.9, p.627-33, 2000.

DALEK,C.R.; CALAZANS, S.G.; NARDI, A.B. **Linfomas.** In: Dalek,C.R.; Nardi, A.B.; Rodaski, S. Oncologia em cães e gatos. São Paulo: Roca, 2009.

DAL MASO, L.; FRANCESCHI, S. Hepatitis C Virus and Risk of Lymphoma and Other Lymphoid Neoplasms: A Meta-analysis of Epidemiologic Studies. **Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention.** v.15, n.11, p.2078-85, 2006.

DATERS,A.T.;MAULDIN,G.E.;MAULDIN,G.N.;BRODSKY,E.M.;POST,G.S.Evaluation of a multidrug chemotherapy protocol with mitoxantrone based maintenance (CHOP-MA) for the treatment of canine lymphoma. **Veterinary and Comparative Oncology**. v.8, n.1, p.11-22, 2010.

DAVID, T.W., LEAH, A.C., HONGFEI, L., BERNARD, F., CHENG, M.L., KENNETH, B.A. Environ Interactions of Oxygen Radicals with Airvvay Epithelium. **Health Perspect** , v.1, p.85-90, 1994.

DELEGLISE,N.**Les lymphomes malins canins: données épidémiologiques à partir d'une étude rétrospective de 427 cas entre 2007 et 2008**. 2010.152f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)- École nationale vétérinaire, Universite Claude Bernard Lyon, 2010.

DEYKIN, A.R., SMITH, J.S. Orbital neoplasia in a dog. **Australian Veterinary Journal**. v.9, p.638-640, 1997.

DEMOURA, V.M.B.D.; SEQUEIRA, J.L.; AMORIN, R.L.; BANDARRA, E.P. Aspectos Epidemiológicos dos Linfomas Caninos – Na região de Botucatu-SP. **Nosso Clínico**, v.31, p.32-40, 2003.

DENSON K. "Re: Environmental tobacco smoke and risk of malignant lymphoma in pet cats." **American Journal Epidemiology**. v.158, n.12, p. 1227-1228, 2003.

DOBSON,J.M.;BLACKWOOD,L.B.;MCINNES,E.F.;BOSTOCK,D.E.;NICHOLLS,P.; HOATHER,T.M.;TOM,B.D. Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma. **Journal of Small Animal Practice.** v.42, p.377-84, 2001.

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

DUQUENOY, A.; LE LUYER, B. Gastritis caused by Helicobacter heilmannii probably transmitted from dog to child. **Archive de Pédiatrie.** v.16, n.5, p.426-9, 2009.

EITAN, O.; YUVAL, BARCHANA, M.; DUBNOV, J.; LINN, S.; CARMEL, Y.; BRODAY, D.M. "Spatial analysis of air pollution and cancer incidence rates in Haifa Bay, Israel." **Science Total Environmental.** v.408, n.20, p.4429-4439, 2010.

ELLIOTT, P.; TOLEDANO, B.M.; BENNETT, J.; BEALE, L.; HOOGH, K.; BRIGGS, D.J.. "Mobile phone base stations and early childhood cancers: case-control study." **British Medical Journal.**. p.340: 3077, 2010.

EPELDEGUI, M.; VENDRAME, E.; MARTÍNEZ-MAZA, O. HIV-associated immune dysfunction and viral infection: role in the pathogenesis of AIDS-related lymphoma. **Immunology Research**. v.48, p.72-83, 2010.

ETTINGER, S.N. **Principles of treatment for canine lymphoma.** Clinical Techniques in Small Animal Practice, v.18, n.3, p.92.97, 2003.

FAN,T.M.; KITCHELL,B.E. An update on diagnosing and treating canine lymphosarcoma. **Veterinary Medicine**. v.97, p.58-65, 2002.

FERLAY, J.; SHIN, H.R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN, D.M.GLOBOCAN 2008, **Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No.10** [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: http://globocan.iarc.fr (Accessed February 22, 2012).

FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p.1058.

FIGHERA, R.A. **Leucemia em medicina veterinária**. Santa Maria : O autor, 47p. cap.6: Linfoma: p.32-38,2000.

FISHER, D.J.; NAYDAN, D.; WERNER, L.; MOORE, P.F. Immunophenotyping Lymphomas in Dogs: A Comparison of Results From Fine Needle Aspirate and Needle Biopsy Samples. **Veterinary Clinical Pathology**. v.24, p118-123, 1995.

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

FOSTER, A.P.; EVANS, E.; KERLIN, R.L.; VAIL,D.M. Cutaneous T cell lymphoma with Sezary Syndrome in a dog. **Veterinary Clinical Pathology,** v.26, p.188-92, 1997.

FOURNEL-FLEURY, C.; MAGNOL, J.P.; BRICAIRE, P.; MARCHAL, T.; CHABANNE, L.; DELVERDIER, A.; BRYON, P.A.; FELMAN, P. Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non Hodgkin's lymphomas. **Journal of Comparative Pathology.** v.117, n.1,p.35-59,1997.

FOURNEL-FLEURY, C.; PONCE, F.; FELMAN, P.; BLAVIER, A.; BONNEFONT, C.; CHABANNE, L.; MARCHAL, T.; CADORE, J.L.; GOY-THOLLOT, I.; LEDIEU, D.; GHERNATI, I.; MAGNOL, J.P. Canine T-cell Lymphomas: A Morphological, Immunological, and Clinical Study of 46 New Cases. **Veterinary Pathology,** v.39, p.92-109, 2002.

FLORET, N.; LUCOT, E.; BADOT, .PM.; MAUNY, F.; VIEL, J.F. A municipal solid waste incinerator as the single dominant point source of PCDD/Fs in an area of increased non Hodgkin's lymphoma incidence. **Chemosphere**. v.68, n.8, p.1419-26, 2007.

GARABRANT, D.H. ; PHILBERT, M.A. Review of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) epidemiology and toxicology**. Critical Reviews in Toxicology.** v.32, n.4, p.233-57, 2002.

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

GENTILINI,F.;CALZOLARI,C.;TURBA,M.E.;BETTINI,G.;FAMIGLIBERGAMINI,P.GeneScanning analysis of Ig/TCR gene rearrangements to detect clonality in canine lymphomas. **Veterinary Immunology Immunopathology.** v.127, n.1-2, p.47-56, 2009.

GERARD, L.; GALICIER, L.; MAILLARD, A.; BOULANGER, E.; QUINT, L.; MATHERON, S.; CARDON, B.; MEIGNIN, V.; OKSENHENDLER, E. Systemic non Hodgkin lymphoma in HIV-infected patients with effective suppression of HIV replication: persistent occurrence but improved survival. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome**, v.30, p.478–484, 2002.

GIORDANO, T.P.; HENDERSON, L.; LANDGREN, O.; CHIAO, E.Y.; KRAMER, J.R.; EL-SERAG, H.; ENGELS, E.A. Risk of non Hodgkin lymphoma and lymphoproliferative precursor diseases in US veterans with hepatitis C virus. **The Journal of the Americal Medical Association. v.**297, p.2010–7, 2007.

GOLDSTEIN, B.D. Benzene as a cause of lymphoproliferative disorders. **Chemico-Biological Interactions.** v.184, n.1-2, p.147-50, 2010.

GHERNATI,I.; AUGER,C.; CHABANNE,L.; CORBIN,A.; BONNEFONT,C.; MAGNOL,J.P. ;FOURNEL,C.;RIVOIRE,A.;MONIER,J.C.;RIGAL,D.Characterization of a canine long-term T cell line (DLC 01) established from a dog with Sézary syndrome and producing retroviral particles. **Leukemia.** v.13, n.8, p.1281-90, 1999.

GLICKMAN, L.; RAGHAVAN, M.; KNAPP, D.W.; BONNEY, P.L.;DAWSON, M.H. "Herbicide exposure and the risk of transitional cell carcinoma of the urinary bladder in Scottish Terriers." **The Journal of the Americal Medical Association.** v.224, n.8, p.1290-1297, 2004.

GOLDEN RETRIVIER FOUNDATION: **National Health Survey, 1998-1999,** Available in : http://www.goldenretrieverfoundation.org/insidepagesdata/healthsurvey/GRCA%20Health%20Survey.pdf

GOLDSBY, R.A.T.J.; KINDT, B.A. OSBORNE,; KUBY,J. **Immunology.** 5th ed. W. H. Freeman and Co., New York, NY. 2003.

GOUVEIA, N.; PRADO, R. Spatial analysis of the health risks associated with solid waste incineration: a preliminary analysis. **Revista Brasileira de Epidemiologia.** v.13, n.1, p.3-10, 2010.

GRAY,D.;GRAY,M.; BARR, T. Innate responses of B cells. **European Journal Immunology.** v.37,n.12,p.3304-10, 2007.

GREENE,CE. **Infectious Diseases of the Dog and Cat,** Elsevier Saunders, 3ed, 2006.

GREENLEE, P.G.; FILIPPA, D.A.; QUIMBY, F.W.; PATNAIK, A.K.; CALVANO S.E.; MATUS, R.E.; KIMMEL, M.; HURVITZ, AI.; LIEBERMAN, P.H.P.G. Lymphoma in dogs: a morphologic, immunologic, and clinical study. **Cancer.** v.66, 480-490, 1990.

GRUHNE, B.; SOMPALLAE, R.; MARESCOTTI, D.;.KAMRANVAR, S.A.;GASTALDELLO, S.; MASUCCI, M.G. The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 promotes genomic instability via induction of reactive oxygen species.**Proceeding of the Natioanl Academy of Sciences,** v.106, p.2313–2318, 2009.

HABERMANN, M.; MADEIROS, A.P.P.; GOUVEIA, N. Motor vehicle traffic as an air pollution exposure assessment method in big cities. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. v.14, 120-130, 2011.

HALLACK-NETO, A.E.; PEREIRA, J.; DORLHIAC-LLACER, P. ; BEITLER, B.; CHAMONE, D.A.F. Aplicação do índice prognóstico internacional em pacientes com linfoma difuso de grandes células B em uma instituição brasileira. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.25, p.27-30, 2005.

HAHN, K.A.; RICHARDSON, R.C.; HAHN, E.A.; CHRISMAN, C.L. Diagnostic and prognostic importance of chromosomal aberrations identified in 61 dogs with lymphosarcoma. **Veterinary Pathology.** v.31, p. 528-40, 1994.

HAN, X. & NAEHER, L.P. A review of traffic-related air pollution exposure assessment studies in the developing world. **Environmental Internal.** v.32, p.106-120, 2006.

HARDELL, L.; CARLBERG, M.; HANSSON, M.K. "Epidemiological evidence for an association between use of wireless phones and tumor diseases." **Pathophysiology***.* v.16, n.2-3, p.113-122, 2009.

HARRIS, N.L.; JAFFE, E.S.; STEIN, H.; BANKS, P.M.; CHAN, J.K.; CLEARY, M.L.; DELSOL,G.; DE WOLF-PEETERS, C.; FALINI, B.; GATTER, K.C. A revised European-American classification of lymphoid neoplasm: a proposal from the international lymphoma study group. **Blood**. v.84, p.1361-92, 1994.

HARRIS,N.L.;JAFFE,E.S.;DIEBOLD,J.;FLANDRIN,G.;HERMELINK,H.K.M.;VARDIMAN,J.;LISTER,T.A. ;BLOOMFIELD,C.D.The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Arlie House, Virginia, November 1997. **Histopathology**. v.36, p.69-87, 2000.

HARTGE, P.; COLT, J.S.; SEVERSON, R.K.; CERHAN, J.R.; COZEN, W.; CAMANN, D.; ZAHM, S.H.; DAVIS, S. Residential Herbicide Use and Risk of Non Hodgkin Lymphoma.**Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention.** v.14, n.4, p.934-7, 2005.

HARVEY,C.E. **Moléstia da faringe e tonsilas**. In: BOJRAB,M.J. Mecanismos da moléstia na cirurgia dos pequenos animais. 2.ed. São Paulo : Manole, 1996. 1445 p. cap.62. p.432-434.

HAYES,H.M.; TARONE, R.E.; CANTOR, K.P.; JESSEN, C.R.; MCCURNIN, D.M.; RICHARDSON, R.C. Case-Control Study canine Malignant Lymphoma: Positive Association with Dog Owner's use of 2,4Dichlorophenoxyacetic Acid Herbicides. **Journal National Cancer Institute,** v.83: 1226-1231, 1991.

HAWKINS,E.C.,ETTINGER,S.J.,SUTER, P.F.**Moléstias do trato respiratório inferior (pulmão) e edema pulmonar.** In: ETTINGER, S.J. Tratado de medicina interna veterinária. 3ed. São Paulo : Manole, 1992. 2557p. cap.69. p.855-908.

HJALGRIM, H.; ENGELS, E.A. Infectious aetiology of Hodgkin and non Hodgkin lymphomas: a review of the epidemiological evidence. **Journal Internal Medicine**. v.264, p.537-48, 2008.

HOAR, S.K.; BLAIR, A.; HOLMES, F.F. Agricultural herbicide use and risk of lymphoma and soft tissue sarcoma. **The Journal of the American Association.** v.256:1141-1147, 1986.

HODGKIN,T. On some morbid apperarances of the absorbent glands and spleen. **Medical Chirurgical Transactions**. v.17, p.69-97, 1832.

HOHENADEL, K; HARRIS, S.A.; MCLAUGHLIN, J.R.; SPINELLI, J.J.; PAHWA,P.; DOSMAN, J.A.; DEMERS, P.A.; BLAIR, A. Exposure to multiple pesticides and risk of non Hodgkin lymphoma in men from six Canadian provinces. **Internal Journal Environmental Research Public Health**. v.8, p.2320-3, 2011.

HORDERN B**. "Can pollution cause cancer?".** 2005; InTouch 4(4): 19-22, 34-15.

HOSOYA, K.; KISSEBERTH, W.C.; LORD, L.K.; ALVAREZ, F.J.; LARA-GARCIA, A.; KOSAREK, C.E.; LONDON,C.A.; COUTO, C.G. Comparison of COAP and UW-19 protocols for dogs with multicentric lymphoma**. Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.21, n.6, p.1355-1363, 2007.

HOSKINS, J. Confirmation needed for lymphoma. **Biological & Agricultural DVM**, v.32, p.16-20, 2001.

HOWARD,E.B.; NIELSEN, S.E. Neoplasias of the boxer dog. **American Journal Veterinary Research**. v.26, p.1121-1131,1965.

HUG, K.; GRIZE, L.; SEIDLER, A.; KAATSCH, P.; SCHUZ, J. "Parental occupational exposure to extremely low frequency magnetic fields and childhood cancer: a German case-control study." **American Journal Epidemiology**. v.171, n.1, p.27-35, 2004.

IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 100B (2012) **A Review of Human Carcinogens: Biological Agents.** 475 pages. Avaliable in: http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100B/mono100B-6.pdf

IARC. **Polychlorinated dibenzo-para-dioxins and polychlorinated dibenzofurans.** v.69, pp. 33-344,1997.

IARC, **Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures,** v.92, 2010. Avaliable in: http://monographs.iarc.fr /ENG/Monographs/vol92/index.php.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatítica. **Censo Demográfico 2010** - Resultados do universo. Avaliable in: http://www.ibge.gov.br. (2010).

INCA. **Instituto Nacional do Câncer.** Rio de Janeiro (Brasil). c1996-2011 e 2012. Avaliable in: http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/ site/home/ linfoma_nao_hodgkin (2011) ; http://www1.inca.gov.br/ estimativa/2012/ index.asp? ID=5 (2012).

IZARZUGASA, M.I.; STELIAROVA-FOUCHER, E.; CARMEN, M. Non Hodgkin's lymphoma incidence and survival in European children and adolescents (1978–1997): Report from the Automated Childhood Cancer Information System project.**European Journal of Cancer**. v.42 , n.13 , p.2050 - 2063, 2006.

JACOBS,R.M.; MESSICK, J.B.; VALLI, V.E**. Tumors of the Hemolymphatic system.** In: Meulten DJ. Tumors in domestic animals. 4ed. Iowa: State Press, 2002, p.119-198.

JAFFE, E.S.;HARRIS,N.L.;STEIN,H.;VARDIMAN,J. **Pathology and Genetics Of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. 1ed. Lyon:IARC, 2001, 352p.

JONES, C.T.; HUNT, D.H.; KING, N.W. **Patologia veterinária**. São Paulo: Manole, 2000.

JUBB, K.V.F; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. **Pathology of Domestic Animals.** 4.ed. San Diego, California: Elsevier, 2008.

JUNIOR, D.M.; ARAÚJO, J.A.P; CATELAN, T.T.T.;SOUZA, A.W.S.; CRUVINEL, W.M.; ANDRADE, L.E.C.; SILVA, N.P. Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v.50, n.5, p.552-80, 2010.

JUNQUEIRA,L.C., CARNEIRO,J. **Histologia Básica**. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KANE EV, NEWTON R.Occupational exposure to gasoline and the risk of non Hodgkin lymphoma: a review and meta-analysis of the literature. **Cancer Epidemiology.** v.34, n.5, p.516-22, 2010.

KANEENE, J.B.; MILLER, R.Re-analysis of 2,4-D use and the occurrence of canine malignant lymphoma.**Veterinary Human Toxicology**. v.41, n.3, p.164-70, 1999.

KARIPIDIS, K.K.; BENKE, G.; SIM, M.R.; KAUPPINEN, T.; KRICKER, A.; HUGHES, A.M.; GRULICH, A.E.; VAJDIC, C.M.; KALDOR, J.;ARMSTRONG, B.; FRITSCHI, L. Occupational exposure to ionizing and non-ionizing radiation and risk of non Hodgkin lymphoma. **Internal Archives of Occupational and Environmental.** v.80, p.663-70, 2007.

KAWASHIMA, K. ; HAYASHI,K. ; OHNOSHI, T. ; TERAMOTO, N. ; KIMURA, I. Epstein-Barr virus-associated post-transplant non Hodgkin's lymphoma: establishment and characterization of a new cell line. **Journal Cancer Research**, v.11, p.1080-6, 1994.

KATANODA,K.; YAKO-SUKETOMO,H.Comparison of time trends in Hodgkin and non Hodgkin lymphoma incidence (1973-97) in East Asia, Europe and USA, from cancer incidence in five continents. **Japanese Journal Clinical Oncology**. v.38, n.5, p.391-393, 2008.

KESSLER, M.; KANDEL-TSCHIEDERER, B.; PFLEGHAAR, S.; TASSANI-PRELL, M. Primary malignant lymphoma of the urinary bladder in a dog: longtermremission following treatment with radiation and chemotherapy. **Schweizer Archivfur Tierheilkunde**, v.150, n.11, p. 565-569, 2008.

KLUMB, C.E. Biologia e Patogênese dos Linfomas não Hodgkin de origem B na infância: uma revisão. **Revista Brasileira de Cancerologia.** v.47, n.3, p.291-01, 2001.

KHANNA, C.; LINDBLAD-TOH, K.; VAIL, D.; LONDON, C.; BERGMAN, P.; BARBER, L.; BREEN, M.; KITCHELL, B.; MCNEILL, E.; MODIANO, J.F.; NIEMI,S.; COMSTOCK, K.E.; OSTRANDER, E.; WESTMORELAND, S.; WITHROW, S. "The dog as a cancer model." **Nature Biotechnology.** v. 24, n.9, p.1065-1066, 2010.

KHAN, A.E.; GALLO, V.; LINSEISEN, J.; KAAKS, R.; ROHRMANN, S.; RAASCHOU-NIELSEN, O.; TJØNNELAND, A.; JOHNSEN, H.E.; OVERVAD, K.; BERGMANN, M.M.; BOEING, H.V.; BENETOU V.; PSALTOPOULOU, T.; TRICHOPOULOU, A.; MASALA, G.; MATTIELLO, A.; GRIONI, S.; TUMINO, R.; VERMEULEN, R.C.; PEETERS, P.H.; BUENO-DE-MESQUITA HB.; ROS, M.M.; LUND, E.; ARDANAZ, E.; CHIRLAQUE, MD.; JAKSZYN, P.; LARRAÑAGA, N.; LOSADA A.; BECKER N.; NIETERS A.; MARTÍNEZ-GARCÍA C.; AGREN, A.; HALLMANS, G.; BERGLUND, G.; MANJER, J.; ALLEN, NE.; KEY, T.J.; BINGHAM, S.; KHAW, K.T.; SLIMANI, N.; FERRARI, P, BOFFETTA, P.; NORAT, T.; VINEIS, P.; RIBOLI, E; EPIC, GROUP. Diabetes and the risk of non Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. **Haematologica.** v.93, p.842-50, 2008.

KLIUCININKAS, L.; MARTUZEVICIUS, D.; KRUGLY, E.; PRASAUSKAS, T.; KAUNELIENE, V.; MOLNAR, P.; STRANDBERG, B. Indoor and outdoor concentrations of fine particles, particle-bound PAHs and volatile organic compounds in Kaunas, Lithuania. **Journal of Environmental Monitoring.** v.13, n.1, p.182-91. 2011.

KNAPP, D.W.; WATERS, D.J.Naturally occurring cancer in pet dogs: important models for developing improved cancer therapy for humans. **Molecular Medicine Today**. v.3, n.1, p.8-11, 1997.

KYRTOPOULOS, S.A. Biomarkers in environmental carcinogenesis research: Striving for a new momentum. **Toxicology Letters**, v.3-15, 162p, 2006.

LANDMANN, M. C. (2004) **Estimativa das Emissões de Poluentes dos Automóveis da RMSP Considerando as Rotas de Tráfego.** Programa de Ciência Ambiental – Universidade de São Paulo. Avaliable in: http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd25/camilli.pdf

LANORE, D. & DELPRAT, C. **Quimioterapia Anticancerígena**. São Paulo: Roca, 2004. cap.4. p.53 -78.

LEEUWEN, M.T. ; GRULICH, A.E. ; WEBSTER, A.C. ; MCCREDIE, M.R. ; STEWART,J.H. ; MCDONALD, S.P. ; AMIN, J. ; KALDOR, J.M. ; CHAPMAN,J.R. ; VAJDIC, C.M. Immunosuppression and other risk factors for early and late non Hodgkin lymphoma after kidney transplantation. **Blood.** v.114, n.3, p.630-7, 2009.

LEWTAS, J. Air combustion emissions: characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects. **Mutagenese Research,** v. 636, p. 95-133,2007.

LIOY, P.J.; FAN, Z.; ZHANG, J.; GEORGOPOULOS, P.; WANG, S.W.; OHMAN-STRICKLAND, P.; WU, X.; ZHU, X.; HARRINGTON, J.; TANG, X.; MENG, Q.; JUNG, K.H.; KWON, J.; HERNANDEZ, M.; BONNANO, L.; HELD, J.; NEAL, J.; HEI Health Review Committee. Personal and Ambient exposures to air toxics in Camden, New Jersey. **Research Report Health Effects Institute.** v.160, n.3-127, p.129-51, 2011.

LIU,Y.J. A unified theory of central tolerance in the thymus. **Trends Immunology.** v.27, p.215-21, 2006.

LUKES, R.; BUTLER, J.; HICKS, E. NATURAL history of Hodgkin's disease as related to its pathological picture. **Cancer**.v.19, p.317-344, 1966.

LUKES, R.J.;COLLINS,R.D. Immunological characterisation of human malignant lymphomas. **Cancer.** v.14, p.1488-1503, 1974.

LURIE, D.M.; LUCROY, M.D.; GRIFFEY,S.M.; SIMONSON, E.; MADWELL, B.R. T-cell derived malignant lymphoma in the boxer breed. **Veterinary Comparative Oncology,** v. 2, p.171–175, 2004.

LURIE, D.M.; MILNER, R.J.; SUTER, S.E.; VERNAU, W. Immunophenotypic and cytomorphologic subclassification of T-cell lymphoma in the boxer breed. **Veterinary Immunology Immunopathology.** v.15, p.102-10, 2008.

MACDONALD, D.A. ; CONNORS, J.M. New strategies for the treatment of early stages of Hodgkin's lymphoma.**Hematology Oncology Clinical North American.** v.21, n.5, p.871-80, 2007.

MacEWEN, E.G.; YOUNG, K.M. **Canine lymphoma and lymphoid leukemia.** In:WITHROW, S. J.; MacEWEN E. G. Small Animal Clinical Oncology. 2.ed, 2007.Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1996. p451-478.

MACIEJEWSKI, R,; GLICKMAN, N.; MOORE, G.; ZHENG, C.; TYNER, B.; CLEVELAND, W.; EBERT, D.; GLICKMAN, L.Companion animals as sentinels for community exposure to industrial chemicals: the Fairburn, GA, propyl mercaptan case study. **Public Health Reports.** v.123, p.333-42, 2008.

MACLACHLAN,N.J.;CULLEN, J.M. **Fígado, sistema biliar e pâncreas exócrino.** In: CARLTON, W.W. Patologia veterinária especial de Thomson. 2.ed. Porto Alegre:Artmed, 1998. cap.2. p.95-131.

MACMAHON,H.E. A Case of Hodgkin's Disease in a Dog. **American Journal Pathology**. v.10, n.2, p.309–312, 1934.

MADEWELL,B.R.Canine lymphoma.Veterinary Clinics of North America: **Small An.Practice**.v.15, p.709-723, 1985.

MAEDA, H., OZAKI, K., HONOGA, S., et al. Hodgkin’s-like lymphoma in a dog. **Zentralbl Veterinarmed.** v.40, p.200-204, 1993.

MAGRATH,I.**Lymphocyte ontogeny: a conceptual basis for understanding neoplasia of the immune system**. In: I. T. Magrath (ed.). The Non Hodgkin's Lytnphomas. Baltimore. MD: Williams & Wilkins. 1990. pp. 29-48.

MAO, Y.; HU, J.; UGNAT, AM.; WHITE, K. Non Hodgkin's lymphoma and occupational exposure to chemicals in Canada. **Annals of Oncology**. *v.11, p. 69-73,* 2000.

MARCONATO,L.;LEO, C.;GIRELLI,R.;SALVI,S.; ABRAMO,F.; BETTINI,G.; COMAZZI,S.; NARDI,P.;ALBANESE,F.; ZINI,E."Association between waste management and cancer in companion animals." **Journal Veterinary Internal Medicine.** v.23,n.3, p.564-569, 2009.

MERLO,D.F.;STAGI,E.;FONTANA,V.;CONSONNI,D.;GOZZA,C.;GARRONE,E.;BER TAZZI,P.A.;PESATORI,A.C."A historical mortality study among bus drivers and bus maintenance workers exposed to urban air pollutants in the city of Genoa, Italy."**Occupacional Environmental Medicine.** v.67, n.9, p.611-619, 2010.

MERZENICH, H.; SCHMIEDEL, S.; BENNARCK, S.; BRUGGEMEYER, H.; PHILLIPP, J.; BLETTNER, M.; SCHUZ,J. Childhood leukemia in relation to radio frequency electromagnetic fields in the vicinity of television and radio broadcast transmitters. **American Journal Epidemiology.** *v.*168, p.1169-78, 2008.

MEUTEN, D. **Tumors in Domestic Animals.** 4ed. United States of Amercia.Iowa State Press, 2002, p.128-143.

MILMAN, G., SMITH, K.C., ERLES, K. Serological detection of Epstein-Barr virus infection in dogs and cats. **Veterinary Microbiology***.* v.15-20, 2011.

MILNER, R. J.; PEARSON, J.; NESBIT, J. W.; CLOSE, P. Immunophenotypic classification of canine malignant lymphoma on formalin-fixed paraffin wax-embedded tissue by means of CD3 and CD79a cell markers. Onderstepoort **Journal of Veterinary Research**, v.63, p.309-313, 1996.

MODIANO, J.F.; BREEN, M.; VALLI, V.E.; WOJCIESZYN, J.W.; CUTTER, G.R. Predictive value of p16 or Rb inactivation in a model of naturally occurring canine non Hodgkin's lymphoma. **Leukemia.** v.21, p.184-187, 2007.

MORENO, K.; BRACARENSE, A.P.F.R.L. Estudo retrospectivo de linfoma canino no período de 1990 - 2004 na região norte do Paraná. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science.** v.44, p.46-52, 2007.

MOULTON, J.E.; HARVEY, J.W. **Tumors of the lymphoid and hematopoietic tissues**.In: Moulton JE. Tumors in Domestic Animals. London: University of California Press, 1990.

MYERS, A., CLAYDEN, A.D., CARTWRIGHT, R.A.; CARTWRIGHT, S.C. (1990) Childhood cancer and overhead powerlines: A case–control study. **Brazilian Journal Cancer,** v.62, p.1008–1014, 1990.

MULLER,A.M.S;IHORST,G.;MERTELSMANN,R.;ENGELHARDT,M.Epidemiology of non Hodgkin's lymphoma (NHL): trends, geographic distribution, and etiology. **Annals of Hematology**. v.84, n.1, p.1-12, 2005.

NACIONAL CANCER INSTITUTE. Sponsored study of classification of non Hodgkin's lymphomas: summary and description of a Working Formulation for a clinical usage. **Cancer**, v.48, p.2112-2135, 1982.

NARDOCCI, A.C. ; CARDOSO, M.R.A. ; FREITAS, C.. ; RIBEIRO, H. ; OLIVEIRA, M.A. ; ALMEIDA, S.L. Exposure Assessment of Traffic-related Air pollution in Sao Paulo, Brazil. **Epidemiology,** v.22, n.1, p.92, 2011.

NOGAI, H.B.; DÖRKEN, B.; LENZ, G."Pathogenesis of non Hodgkin's lymphoma." **Journal of Clinical Oncology***.* v. 29, n.14, p.1803-1811, 2011

NORTH,S.; BANKS, T. **Introduction to small animal oncology**. Londres: Saunders Elsevier, 2009, p.225-229.

O´CONNOR SR, FARMER PB, LAUDER I. Benzene and non Hodgkin´s lymphoma. **Journal Pathology.** v.189, n.4, p.448-5, 1999.

OKSENHENDLER, E.; BOULANGER, E.;GALICIER,L.;MING-QING,D.; DUPNI, N.; DISS, T.C.~HAMOUNDI, R; DANIEL, M.T.; AGBALIKA, F.; BOSHOFF, C.; CLAUVEL, J.P.; ISAACSON, P.G.; MEIGNIN, V. High incidence of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus-related non Hodgkin lymphoma in patient with HIV infection and multicentric Castleman disease. **Blood.** v.99, p.2331- 6, 2002.

OWEN, L. **TNM Classification of tumors in domestic animals.** Geneva: World Health Organization. p. 46-47. 1980.

PAIVA,C. **Qual o número de veículos que circula na cidade de São Paulo.** 7p. Avaliable in: http://www.sinaldetransito.com.br/artigos_area.php?tipo=Planejamento.

PARSONNET, J. ; HANSEN, S. ;RODRIQUEZ,L. ; GELB, A.B.; WARNKE,R.A.; JELLUM,E.;ORENTREICH,N.;VOGELMAN,J.H. ;FRIEDMAN,G.D.Helicobacter pylori infection and gastric lymphoma. **New England Journal of Medicine**. V.330, n.18, 1267-1271, 1994.

PASTOR,M.; CHALVET-MONFRAY,K.; MARCHAL, T.; KECK, G.; MAGNOL, J.P.; FOURNEL-FLEURY,C; PONCE,F. Genetic and Environmental Risk Indicators in Canine Non Hodgkin's Lymphomas: Breed Associations and Geographic Distribution of 608 Cases Diagnosed throughout France over 1 Year. **Journal Veterinary Internal Medicine.** v.23, p.301-10, 2009.

PAZ,S.;LINN,S.;PORTNOV,B.A.;LAZIMI, A.;FUTERMAN,B. ; BARCHANA M. Non Hodgkin Lymphoma (NHL) linkage with residence near heavy roads--a case study from Haifa Bay, Israel. **Health Place**. v.15, n.2, p.636-41, 2009.

PEACH, H.G.; BARNETT,N.E. Critical review of epidemiological studies of the association between smoking and non Hodgkin's lymphoma.**Hematology Oncology.** v.19, n.2, p.67-80, 2001.

PEREIRA, F.A. ; LEMOS, M. ; MAUAD,T. ; ASSUNÇÃO, J.V. ; SALDIVA, P.H. "Urban, traffic- related particles and lung tumors in urethane treated mice". **Clinics**. v.66, n.6, p.1051-4, 2011.

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

PONCE,F.;MARCHAL,T.;MAGNOL,J.P.;TURINELLI,V.;LEDIEU,D.;BONNEFONT,C.; PASTOR,M. ;DELIGNETTE,M.L. ;FOURNEL-FLEURY,C.A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. **Veterinary Pathology.** v.47, p.414-33, 2010.

RAASCHOU-NIELSEN, O.;ANDERSEN, Z.J.;HVIDBERG, M.;JENSEN, S.S.; KETZEL.M.;SØRENSEN.M.;HANSEN,J.;LOFT,S.;OVERVAD,K. ;TJØNNELAND, A. "Air pollution from traffic and cancer incidence: a Danish cohort study". **Environmental Health.** v.19, p.10-67, 2011.

RALLIS, T.; KOUTINAS, A.; LEKKAS, S.; PAPADIAMANTIS, C. Lymphoma (malignant lymphoma, lymphosarcoma) in the dog. **Journal Small Animal Practice**. v.33, p.590-596, 1992.

RAPPAPORT,H.;WINTER,W.J.;HICKS,E.C. Follicular lymphoma.**Cancer**; v.9, p.792-821,1956.

RAMIS,R.;VIDAL,E.; GARCÍA-PÉREZ,J.; LOPEZ,V.; ARAGONÉS,N.; PÉREZ-GÓMEZ,B.; POLLÁN,M.; LÓPEZ-ABENTE,G. Study of non Hodgkin's lymphoma mortality associated with industrial pollution in Spain, using Poisson models. ***BMC Public Health*.** v.9, n.26, p.1471-2458, 2009.

REIF, J.S.; LOWER, K.S.; OGILVIE, G.K. "Residential exposure to magnetic fields and risk of canine lymphoma." **American Journal Epidemiology.** v.141, n.4, p.352-359, 2005.

REMONTET,J.;ESTEVE,AM.;BOUVIER,P.;GROSCLAUDE,G.Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000. **Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique**, v.51, n.1,p.3-30, 2003.

REYMÃO,M.S. ;CURY,P.M. ;LICHTENFELS,A.J. ;LEMOS,M. ;BATTLEHNER, C.N.; CONCEIÇÃO, G.M. ; CAPELOZZI, V.L.;MONTES, G.S.; JUNIOR, M.F. ; MARTINS, M.A. ; BÖHM, G.M. ; SALDIVA, P.H. "Urban air pollution enhances the formation of urethane-induced lung tumors in mice". **Environmental Research.** v.74, n.2, p.150,1997.

REYNOLDS, P.M.; REIF, J.S. ; RAMSDELL, H.S. ; TESSARI, J.D. Canine Exposure to Herbicide treated Lawns and Urinary Excretion of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid. Cancer Epidemiology, **Biomarkers & Prevention.** v.3p.233-237, 1994.

ROESSNER, A.; KUESTER, D.; MALFERTHEINER, P.; SCHNEIDER-STOCK. Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. **Pathology-Research and Pratices**. v.204, p.511-524, 2008.

ROHRMANN, S.; LINSEISEN, L.; JAKOBSEN, M.U.; OVERVAD, K.; RAASCHOU-NIELSEN, O.; TJONNELAND, A.; BOUTRON-RUAULT, M.C.; KAAKS, R.; BECKER, N.; BERGMANN, M.; BOEING, H.; KHAW K.T.; WAREHAM, N.J.; KEY, T.J.; TRAVIS, R.; BENETOU, V.; NASKA, A.; TRICHOPOULOU, A.; PALA, V.; TUMINO, R.; MASALA, G.; MATTIELLO, A.; BRUSTAD, M.; LUND, E.; SKEIE, G.; BUENO-DE-MESQUITA, H.B.; PEETERS, P.H.; VERMEULEN, R.C.; JAKSZYN, P.; DORRONSORO, M.; BARRICARTE, A.; TORMO, M.J.; MOLINA, E.; ARGÜELLES, M.; MELIN, B.; ERICSON, U.; MANJER, J.; RINALDI, S.; SLIMANI, N.; BOFFETTA, P.; VERGNAUD, A.C.; KHAN, A.; NORAT, T.; VINEIS, P. "Consumption of meat and dairy and lymphoma risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition." **Internal Journal Cancer.** v.128, n.3, p.623-634, 2011.

ROZA, M.R.; VIEGAS, C.A. "The dog as a passive smoker: effects of exposure to environmental cigarette smoke on domestic dogs". **Nicotine Tobacco Research.** v.9, n.11, p.1171-6, 2007.

RUSLANDER,D.A.;GEBHARD, D.H.;TOMPKINS,M.B.;GRINDEM,C.B.; PAGE RL. Immunophenotypic characterization of canine lymphoproliferative disorders. **In Vivo**. v.11, p.169-172,1997.

RUTLEY, M.; MACDONALD, V. Managing the canine lymphosarcoma patient in general practice. **Cancer Veterinary Journal.** 2007; 48, n.9, p.977-979, 2007.

SAID, J.; CESARMAN,E (2008). **Primary effusion lymphoma**. In:World Health Organization Classification of Tumours– Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoieticand and Lymphoid Tissues. Swerdlow S, Campo E, Harris NL et al., editors. Lyon: IARC Press.

SEQUEIRA,J.L.; FRANCO, M. Características dos linfomas caninos. **Journal Anatomopathology**. v.7, p.6-8, 1992.

SCHÖLLKOPF, C.; SMEDBY, K.E.; HJALGRIM H.; ROSTGAARD, K.; GADEBERG, O.; ROOS, G.; PORWIT-MACDONALD, A.; GLIMELIUS, B.; ADAMI, H.O.; MELBYE, M. Cigarette smoking and risk of non Hodgkin's lymphoma--a population-based case-control study. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention**.v.14, n.7, p.1791-6, 2005.

SCHRAUFSTATTER, I.U., HINSHAW, D.B., HYSLOP, P.A., SPRAGG, R.G., COCHRANE, C.G. Oxidant injury of cells: DNA strand-breaks activate polyadenosine diphosphate-ribose polymerase and lead to depletion of nicotinamide adenine dinucleotide. **Journal of Clinical Investigation**, v.77, p.1312-1318, 1986.

SHOFER,F.S.;WINKLE,T.J.V.;MASSICOTTE,C.Canine Intracranial Primary Neoplasia: 173 Cases (1986–2003). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.20, n.3, p.669-675, 2006.

SKIBOLA,C.F. "Obesity, diet and risk of non Hodgkin lymphoma." **Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention.** v.16, n.3, p.392-395, 2007.

SILVA, J.A.G. Estimativa 2012**. Incidência de Câncer no Brasil. Ministério da Saúde**. Instituto Nacional do Câncer. Available in: http://www1.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf (2012).

SMEDBY, K.R. Epidemiology and etiology of non Hodgkin lymphoma – a review. ***Acta Oncologica*.** v.45, p.258-271, 2006.

SNYDER, J.M.; SHOFER, F.S.; WINKLE, T.J.V.; MASSICOTTE, C. Canine Intracranial Primary Neoplasia: 173 Cases (1986–2003). **Journal of Veterinary Internal Medicine,** v.20, n.3, p.669-675, 2006.

SOMMER, A.M.; BITZ, A.K.; STRECKERT, J.; HANSEN, V.W.; LERCHL, A. Lymphoma development in mice chronically exposed to UMTS-modulated radiofrequency electromagnetic fields. ***Radiation Research*.** v.168, p.72-80, 2007.

SPINELLI, J.J.; LAI, A.S.; KRAJDEN, M.; *ANDONOV, A.; GASCOYNE, R.D.; CONNORS, J.M.; BROOKS-WILSON, A.R.; GALLAGHER, R.P.* Hepatitis C virus and risk of non Hodgkin lymphoma in British Columbia, Canada. **Internal Journal Cancer,** v.122, p.630–633, 2008.

STAGNARO, E.; RAMAZZOTTI, V.; CROSIGNANI, P.;FONTANA, A.; MASALA, G.;MILIGI, L.; NANNI, O.; NERI, M.; RODELLA, S.;COSTANTINI, A.S.; TUMINO, R.;VIGANÒ, C.; VINDIGNI, C.; VINEIS, P.Smoking and hematolymphopoietic malignancies.**Cancer Causes Control.** v.12(4):325-34,2001.

STAGNARO, E.; TUMINO, R.; PARODI, S.; CROSIGNANI, P.; FONTANA, A.; MASALA, G.; MILIGI, L.; NANNI O, RAMAZZOTTI, V, RODELLA, S, SENOIRI CONSTANTINI, A.; VIGANO, C.; VINDIGNI, C.; VINEIS, P.Non Hodgkin's lymphoma and type of tobacco smoke.Cancer **Epidemiology Biomarkers Prevention.** v.13, n.3, 431-7,2004.

STMSP, (1999). **A região Metropolitana de São Paulo**. Avaliable in:HTTP://www.stmsp.com.br/rmsp.html

SUEIRO,F.A.;ALESSI,A.C.;VASSALLO,J.Canine lymphomas: a morphological and immunohistochemical study of 55 cases, with observations on p53 immunoexpression**. Journal Comparative Pathology.** v.131, p.207–213, 2004.

SUZANO,S.M.C. **Classificação Citológica e Imunocitoquímica dos Linfomas Caninos.** 110 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

SUEIRO, F.A.R**. Linfomas caninos: estudo morfológico e imunoistoquímico de 55 casos e correlação com da imunoexpressão da proteína p53.** Dissertação de doutorado, 2004. Tese (Doutorado na Saúde Pública)-Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, São Paulo, 2004.

TAKASHIMA-UEBELHOER, B.B.; BARBER, L.G.; ZAGARINS, S.E.; PROCTER-GRAY, E.; GOLLENBERG, A.L.; MOORE, A.S.; BERTONE-JOHNSON, E.R. Household chemical exposures and the risk of canine malignant lymphoma, a model for human non Hodgkin's lymphoma. **Environmental Research,** v.112, p.171-6, 2012.

TARIFA, J.R.;ARMANI, G. **Unidades climáticas urbanas da cidade de São Paulo**. In: São Paulo. Prefeitura do Município de São Paulo. Atlas ambiental do município de São Paulo – Fase I: “Diagnósticos e bases para a definição de políticas públicas para as áreas verdes no município de São Paulo”. São Paulo: PMSP. 86p, 2000.

TAVARES, J.A.M.M.**Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos no ar ambiente de um túnel rodoviário.** 2009. 83f. Dissertação (Mestrado na Engenharia do Ambiente)- Departamento de Ambiente e Ordenamento, Universidade de Aveiro, 2009.

TESKE, E.; VAN-HEERDE,P.; RUTTEMAN,G.R.; KURZAMAN, D.I.; MOORE, P.F.; MACEWEN, G. Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs. **Journal American Veterinary Medicine Association**. v.205, p.1722-1728, 1994.

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

THOMAS, R.; SMITH, K.C.; GOULD, R.; GOWER, S.M.; BINNS, M.M.; BREEN,M. Molecular cytogenetic analysis of a novel high-grade canine Tlymphoblastic lymphoma demonstrating co-expression of CD3 and CD79a cell markers. **Chromossome Research**, v.9, p.649-657, 2001.

THOMAS, R.; SMITH, K.C.; OSTRANDER, E.A.; GALIBERT, F.; BREEN, M. Chromosome aberrations in canine multicentric lymphomas detected with comparative genomic hybridisation and a panel of single locus probes. **British Journal Cancer.** v. 89, p.1530-1537, 2003.

THOMAS,R.; SEISER, E.L.; MOTSINGER-REIF, A.; BORST, L.; VALLI, V.E.; KELLEY, K.; SUTER, S.E.; ARGYLE, D.; BURGESS, K.; BELL, J.; LINDBLAD-TOH, K.; MODIANO, J.F.; BREEN, M.Refining tumor-associated aneuploidy through 'genomic recoding' of recurrent DNA copy number aberrations in 150 canine non Hodgkin lymphomas. **Leukemia Lymphoma.** v.52, n.7, p.1321-35, 2011.

TOLEDO, G.I.F.M. **Traffic-related exposure assessment at São Paulo city**. 2010. 111f. Tese (Doutorado na Saúde Pública)-Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

TWEDT, D.C.; MAGNE, M.L. **Moléstias do estômago**. In:ETTINGER SJ. Tratado de medicina interna veterinária. 3ed.São Paulo: Manole, 1992. 2557p. cap85. p1353-1386.

VAIL, D.M.; KISSEBERTH, W.C.; OBRADOVIC.H, J.E.; MOORE, F.M.; LONDON, C.A.; MACEWENEG.; RITTER, M.A. Assessment of potential doubling time (Tpot), argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR), and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as predictors of therapy response in canine non Hodgkin's lymphoma. **Experimental Hematology**, v.24, p.807-815, 1996.

VAIL, D.M.; YOUNG, K.M. **Hematopoietic tumors**. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. Small Animal Clinical Oncology. 4.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2007.

VALLI, V.E.; JACOBS, R.M.; PARODI, A.L.; VERNAU, W.; MOORE, P.F. Histological Classification of Hematopoietic Tumors Of Domestic Animals: Hematopoectic Tumors of Domestic Animals (WHO International Classification of Tumors of Domestic Animals). Armed Forces Institute of Pathology, **American Registry of Pathology**, Washington, DC, 2002.

VALLI, VE. **Veterinary Comparative Hematopathology**.1. ed. Ames, Iowa: Blackwell Pub, 2007, 558p.

VALLI, V.E.; MYINT, M.S.; BARTHEL, A.; BIENZLE, D.; CASWELL, J.; COLBATZKY, F.; DURHAM, A.; EHRHART, E.J.; JOHNSON, Y.; JONES, C.; KIUPEL, M.; LABELLE, P.; LESTER, S.; MILLER, M.; MOORE,P.; MOROFF, S.; ROCCABIANCA, P.; RAMOS-VARA, J.; ROSS, A.; SCASE, T.; TVEDTEN, H.; VERNAU, W.Classification of Canine Malignant Lymphomas According to the World Health Organization Criteria. **Veterinary Pathology**, v.48, n.1, p. 198-211, 2011.

VAN PELT,R.W.; CONNOR, G.H. Clinicopathological survey of malignant lymphoma in the dog. **Journal American Veterinary Medicine Association,** v. 152, p.976-989, 1968.

VERKASALO, P.K.; PUKKALA, E.; HONGISTO, M.Y.; VALJUS, J.E.; JÄRVINEN, P.J.;KEIKKILÄ, K.V.;KOSKENVUO, M. Risk of cancer in Finnish children living close to power lines. **British Medical Journal.** v.307, p.895–899, 1993.

VELDHOEN, N.; STEWART, J.; BROWN, R.; MILNER, J. Mutations of the p53 gene in canine lymphoma and evidence for germ line p53 mutations in the dog. **Oncogene.**v.16, p249-55, 1998.

VERKASALO, P.K.; PUKKALA, E.;HONGISTO, M.Y.; VALJUS, J.E.;JÄRVINEN, P.JV KEIKKILÄ, K.V.;KOSKENVUO, M. Risk of cancer in Finnish children living close to power lines. **British Medical Journal,** *v.* 307, p.895–899, 1993.

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**. Veterinary Comparative Oncology**, v.8, n.1, p;38-49, 2010.

VIEL,J.F.;FLORET,N.;DECONINCK,E.;FOCANT,J.F.;DEPAUW,E.; CAHN,J.Y. Increased risk of non Hodgkin lymphoma and serum organochlorine concentrations among neighbors of a municipal solid waste incinerator. **Environmental International**. v.37, n.2, p.449-53, 2011.

VONDERHAAR, M.A.; MORRISON, W.B. **Lymphosarcoma.** In: Morrison, WB. Cancer in dogs and cats. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1998.

WEISENBURGER, D.D.; HARRINGTON, D.S.; ARMITAGE, J.O. **B-cell neoplasia: a conceptual understanding based on the normal humoral immune response.** In: P. P. Rosen and R. E. Fechner (cds.). Pathology Annual. Part I, Vol. 25. pp. 99-115. Norwalk, CT: Appleton and Lange, 1990.

WILCOCK, B.P., YAGER, J.A. The behavior of epidermotropic lymphoma in 25 dogs**.** **Cancer Veterinary Journal**, v.30, p.754-759, 1989.

WILKERSON, M.J.; DOLCE, K.; KOOPMAN, T.; SHUMAN, W.; CHUN, R.; GARRETT, L.; BARBER, L.; AVERY, A. Lineage differentiation of canine lymphoma/ leukemias and abberant expression of CD molecules. **Veterinary Immunology Immunopathology.** v.106, p.179-196, 2005.

WILLMANN M., ILAUER LM., ARESPACOCHAGA AG., REIFINGER M., MOSBERGER I., THALHAMMER JG. Pax5 immunostaining in paraffin-embedded sections of caninenon Hodgkin lymphoma: A novel canine pan pre-B- and B-cell marker. **Veterinary Comparative Oncololy.** v. 8, p.38-49, 2010.

WITHROW,S.J.;MACEWEN,E.G. **Small Animal Clinical Oncology,** 3rdedn. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company, 2001: p.558–84.

WITHROW, S.J.; VAIL,D.M. "**Small animal clinical oncology**". 4 ed. St. Louis : Saunders; 2007.

WITHROW, S.J. **Why worry about cancer in pets?** In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. Small animal clinical oncology. 4. ed. St. Louis: Saunders, 2007. p.15-16.

WOOD, G.S.; SALVEKAR, A.; SCHAFFER, J.; CROOKS, C.F.; HENGHOLD, W.; FIVENSON, D.P.; KIM, Y.H.; SMOLLER, B.R. Evidence against a role for human T-cell lymphotrophic virus type I (HTLV-I) in the pathogenesis of American cutaneous T-cell lymphoma. **Journal of Investigative Dermatology.** v.107, p.301–307, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: **International Classification Of Diseases For Oncology**.2.ed. Geneva, 2001.

URETA-VIDAL, A.; ANGELIN-DUCLOS, C.; TORTEVOYE, P.; MURPHY, E.;LEPÈRE, J.F.; BUIGUES, R.P.; JOLLY, N.;JOUBERT, M.; CARLES, G.; POULIQUEN, JF.; DE THÉ, G.; MOREAU, J.P.; GESSAIN, A.(1999). Mother-to-child transmission of human T-cell-leukemia/lymphoma virus type I: implication of high antiviral antibody titer and high proviral load in carrier mothers. **Internal Journal Cancer,** v.82, p.832–836, 1999.

VERKASALO, P.K.; PUKKALA, E.;HONGISTO, M.Y.; VALJUS, J.E.;JÄRVINEN, P.JV KEIKKILÄ, K.V.;KOSKENVUO, M. Risk of cancer in Finnish children living close to power lines. **British Medical Journal,** *v.* 307, p.895–899, 1993.

YOUNG, L.S.; RICKINSON, A.B. Epstein–Barr virus: 40 years on. **Naure Reviews Cancer**, v. 4, n.10, p.757-768, 2004.

ZAHM, S.H.; BLAIR, A.; CANTOR, K.P.; FRAUMENI, J.F.JR. Non-insulin dependent diabetes mellitus and non Hodgkin's lymphoma. Other American studies fail to confirm an association. **British Medical Journal.** v.310, p.1009-10, 1995.

ZIMMERMAN, B., NIEWIESK, S. ; LAIRMORE, M.D. Mouse Models of Human T Lymphotropic Virus Type-1–Associated Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. **Veterinary Pathology**. V.47, p 677-689, 2010.

APÊNDICE A- Questionário epidemiológico aplicado aos proprietários dos cães durante março 2010 à agosto de 2010.

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP)

TABAGISMO PASSIVO E LINFOMA EM CÃES. EXISTE ASSOCIAÇÃO?

Bolsista de Iniciação Científica: Danielle Almeida Zanini

Orientador: Prof[a]. Dr[a]. Maria Lúcia Z. Dagli
Laboratório de Oncologia Experimental, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
Colaborador: Katia Cristina Kimura
Prof. Dr. Ricardo Augusto Dias

Nome da clínica veterinária ou hospital:_____

Número do prontuário/Ficha clínica: _____

1. Nome do proprietário /Telefone

2. Nome do cão/ Idade

3. Raça

4. Endereço ( ) casa ( ) apartamento

5. CEP e nome do BAIRRO

_____-_____ \ _____

6. Seu cão teve ou tem linfoma?
☐ sim ☐ não

7. O cão toma água de
☐ torneira ☐mineral

8. Sexo do animal
☐fêmea ☐fêmea castrada
☐macho ☐macho castrado

9. Peso
☐ ↓10 kg ☐↑10kg

10. Há quanto tempo o animal vive com o mesmo dono no mesmo endereço?
☐2-4 years ☐5- 10 years ☐11-17 years

11. Em qual local o cão passa 2/3 do seu tempo por dia?
☐ Dentro do jardim
☐ Dentro da garagem da casa
☐ Em uma firma
☐ Em uma área industrial
☐ Outro: _____

12. O cão vive próximo a uma avenida ou rua bem movimentada (mais do que 50 veículos por minuto ao redor de 100 metros)? ☐ sim ☐ não

13. O cão:
☐ vive dentro de casa
☐ vive fora de casa.

14. O quintal tem ☐cimento ☐outro material

15. O cão vive maior parte de sua vida
☐ Em zona urbana ☐Em zona rural

16. Costuma fazer churrasco ou queimar madeira (fogueira) no lugar onde o cão circula? ☐ não ☐sim

17. O cão pode ter acesso aos materiais de construção que contém tinta, solvente, formol, amianto ou outro produto?
☐ não ☐sim

18. O cão tem contato com herbicida (armazenado no jardim) ? ☐ não ☐sim

19. O cão tem contato com fungicidas (para eliminar fungos, doenças das plantas devido ao fungo) que são armazenados ou pulverizados sobre as plantas no jardim ou casa? ☐ não ☐sim

20. O cão tem contato com inseticidas em casa, nos armários, no chão, plantas ou outro local? ☐ não ☐sim

21. Existe wireless (wi-fi) no quarto onde o cão dorme? □ não □sim

22. Existe algum telefone sem fio no quarto onde o cão dorme?□não □sim

23. O cão tem contato com produtos domésticos usados ou produtos biológicos para a manutenção da casa? □ não □sim

24. Você usa incenso, velas, fragâncias, óleos perfumados onde o cão circula? □ não □sim

25. O cão fica no mesmo ambiente de pessoas que fumam
□cigarro □charuto □cachimbo

26. O cão tem contato com pessoas que fumam (dentro de casa ou em outros lugares fechados ou dentro do carro)?
□ não □sim

•Quantidade de maços por dia:
□ ↓1 □1 □2 □3 □4 □5 □6 □7 □8

Há quanto tempo fuma ou fumava no mesmo local do cão? ___anos ___meses

27.Quantas pessoas fumam na residência?
□1 □2 □3 □4 □5 □6 □7 □8

28. Conhece algum cão com linfoma no bairro? □ não □sim

29.Você usa shampoo □ não □sim

30.Você trata o seu cão com algum tipo de anti-parasita externo?
□ não □sim

31. Você usa no ambiente soluções de:
□não □ amitraz □ lindane □outros:

32.Qual é o tipo de alimentação do seu cão?
□caseira □comercial □misto

33. O cão come (↓3x/semana) frutas ou vegetais? □ não □sim □ não sei

34. Alguém em contato com o cão trabalha com:
□ indústria (Qual?_____)
□ pintura □funilaria
□ construção □agricultura
□ marcenaria □outros:

Se não souber pergunte ao veterinário:
•Localização do LINFOMA:
□ Multicêntrico □Alimentar
□ Mediastínico □Cutâneo
□ Extra Nodal (renal, neurológica, ocular, óssea, articular, etc.).

• **ESTADIAMENTO DO LINFOMA:**
□ I Envolvimento de apenas um linfonodo.
□ II Envolvimento de vários linfonodos superficiais, com ou sem envolvimento de tonsilas.
□ III Linfoadenomegalia generalizada (todos os linfonodos acometidos).
□ IV Envolvimento de fígado e/ou baço, com ou sem linfoadenomegalia generalizada.
□ V Envolvimento de sangue, medula óssea e/ou outros órgãos (olho, pele, etc).

ANEXO 1- Artigo original (inglês) publicado na Brazilian Journal Veterinary Pathology.

BJVP
Brazilian Journal of Veterinary Pathology

Original Full Paper

Morphology and Immunophenotypes of Canine Lymphomas: a Survey from the Service of Animal Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, Brazil

Kátia C. Kimura[1], Danielle A. Zanini[1], Adriana T. Nishiya[3],
Ricardo A. Dias [2], Maria L. Z. Dagli[1]

Abstract

Lymphoma is a malignant clonal expansion of lymphoid cells, and is reported to be one of the most common hematopoietic neoplasms in dogs. The purpose of this study was to perform a survey of lymphomas diagnosed at the Service of Animal Pathology of the School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, Brazil, from 1995 to 2009, and determine their morphological subtypes and immunophenotypes. Breed, age and gender were recorded. The canine lymphomas were classified according to the updated Kiel classification, and all the cases were submitted to immunostaining for CD3 and CD79a antibodies to reveal their T or B origin, respectively. In addition, mitotic figures were counted in all samples, in 10 microscopic fields. Mixed breed dogs were the most affected breed (43%), followed by Boxer (14%), German Shepherd (11%), Brazilian terrier (3%), Poodle (3%) and Rottweiler (3%). Other breeds were represented at a rate below 1%. Among the 65 cases of lymphomas, 30 cases were found in females and 35 in males. The mean age was 8.7 years with a range of 5 months to 15 years. The most frequent localization was multicentric lymphadenopathy (37%), followed by extranodal (23%), cutaneous (20%), alimentary tract (18%) and mediastinal site (2%). From 65 canine lymphomas, 55 (85%) had T-cell origin and 10 (15%) had B-cell origin. Among mitotic index, 51% (n=33) of T-cell origin had high mitotic index, 34% (n=22) had a low mitotic index; 9% (n=6) of B-cell origin had high mitotic index and 6% (n=4) had low mitotic index. The most common subtypes were pleomorphic small cell and centroblastic polymorphic type for T-cell lymphoma and B-cell lymphoma, respectively. The 55 T-cell lymphomas were subtyped as: 19 (34%) of pleomorphic small cell, 11 (20%) of cutaneous T cell, high grade, 10 (18%) of lymphoblastic, 4 (7%) of aggressive large granular cell, 3 (5%) of pleomorphic mixed, 2 (4%) of cutaneous T cell, low grade, 2 (4%) of pleomorphic large cell, 2 (4%) of plasmacytoid, 1 (2%) of immunoblastic and 1 (2%) of prolymphocytic. The 10 B-cell lymphomas were subtyped as: 3 (30%) of centroblastic polymorphic, 2 (20%) of Burkitt, 2 (20%) of lymphoplasmacytic, 1 (10%) of anaplastic/mediastinal, 1 (10%) of small lymphocytic and 1 (10%) of prolymphocytic. Our results are in accordance with other studies which state that T-cell lymphomas are the most common in dogs. The possible factors that contribute to the development of lymphomas in dogs remain unknown.

Key Words: canine, lymphoma, immunophenotyping, updated Kiel, histological types

Brazilian Journal of Veterinary Pathology. www.bjvp.org.br . All rights reserved 2007.

Introduction

Lymphoma is a malignancy of hematopoietic tissue caused by the malignant clonal expansion of lymphoid cells. Lymphoma is reported to be the most common hematopoietic neoplasm in dogs and represents 83% of the hematopoietic cancers (3,4,30). Etiology of the canine lymphoma remains poorly characterized (10).

According to current literature, the incidence of non-Hodgkin lymphoma in dogs is 33 cases per 100,000 dogs per year (7, 31) and the mean age is 6.7 years (2, 5, 25). No gender preference has been reported. The following breeds seem predisposed to lymphoma: Boxer, Scottish terrier, Basset hound, Airedale terrier, Chow Chow, German Shepherd, Poodle, Saint Bernard, Beagle, Golden Retriever and Bulldog (20, 26, 32).

Anatomic forms of canine lymphoma are categorized in four groups: multicentric, alimentary, mediastinal, and extranodal (renal, CNS, and cutaneous) (35).

The histopathological classification of canine lymphoma is still controversial. The most used histopathological classifications for canine lymphoma are the updated Kiel classification and the Revised European-American Lymphoma (REAL) adopted in 2002 by the World Health Organization (WHO) classification (8, 31). The updated Kiel classification is based on cell type (centroblastic, immunoblastic and centrocytic) and immunophenotype (T cell or B). It is an important classification due to its potential prognostic value to determine the time of relapse in animals under treatment and to estimate the survival time (6, 7, 8, 17, 18, 19). The Working Formulation classification is based on standard tissue (diffuse or follicular) and cell type (small cleaved, large, and immunoblastic), but does not include immunophenotyping, and it does not correlate with the prognostic (24). The new classification called REAL-WHO classification added immunophenotyping in the diagnosis of canine lymphoma (31).

Immunophenotyping may be used as a prognostic tool because T-cell canine lymphoma is at significantly higher risk of relapse and early death following therapy than B-cell lymphoma (5, 7, 18, 21, 26, 28, 29).

The purpose of this study is to classify and to immunophenotype canine lymphomas retrieved from the Service of Animal Pathology of the Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), Brazil.

Material and Methods

Samples

Formalin-fixed paraffin wax-embedded tissue samples were collected from 65 canine lymphomas in the period from 1995 to 2009 from the Service of Animal Pathology of FMVZ-USP, São Paulo, Brazil. They were classified morphologically according to the updated Kiel classification scheme (18). Breed, gender and age were recorded. This project was approved by the Ethics Committee of School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo.

Immunohistochemistry

For immunohistochemistry, the sections were placed on silanized slides and dewaxed. After endogenous peroxidase block in with 10% H_2O_2 in a microwave for 15 minutes, the slides were incubated with primary antibodies to anti-CD79a (clone M7051 Dako) diluted in 1:50 and anti-CD3 (rabbit polyclonal, Dako) antibody diluted in 1:100, overnight, at 4ºC. Labeled streptavidin biotin (**LSAB**) reagents and reacted with 3-diaminobenzidine (DAB) were used. Negative controls were obtained by performing the same steps of the immunohistochemical reaction, omitting the primary antibody in the sections.

Histological criteria

Histological types were diagnosed by the size of cells, nuclei morphology and by the mitotic rates according to updated Kiel classification (18). The cell size was defined as small (nucleus smaller than red blood cells), medium (nucleus equal to red blood cells) and large (nucleus larger than two red blood cells). The mitotic rate was counted in histological specimens by scanning 10 fields at 400x. A low mitotic index was defined as 0-2 mitosis/ten fields, and high grade as ≥6/ ten fields (7, 8, 18, 19) .

Results

The results of the breed distribution by retrospective study identified the prevalence of Mixed breed (43%; n=28), followed by Boxer (14%; n=9), German Shepherd (11%; n=7), Brazilian terrier (3%; n=5), Poodle (3%; n=5), Rottweiler (3%; n=5), Doberman (3%; n=2), Pit bull (2%, n=1), Pinscher (2%, n=1), Fila brasileiro (2%, n=1), Schnauzer (2%, n=1), Great Dane (2%, n=1), Scotch terrier (2%, n=1), Cocker Spaniel (2%, n=1), Teckel (2%, n=1),Golden Retriever (2%, n=1) and Labrador (2%, n=1) shown in Fig. 1. From 65 canine lymphomas, 30 cases were found in females and 35 were found in males.

The incidence of canine lymphoma was higher between 5 to 9 years (45% of total cases), followed by ages between 10 to 13 years (34%); 17% had an age below 4 years and 5% had an age up to 14 years. The mean age was 8.7 years with a range of 5 months to 15 years.

The anatomical distribution showed that 37% (n=24) cases were multicentric lymphadenopathy, 23% (n=15) cases were extranodal, 20% (n=13) cases were cutaneous, 18% (n=12) were in the alimentary tract and 2% (n=1) case were mediastinal.

From 65 canine lymphomas, 55 (85%) had T-cell origin and 10 (15%) had B-cell origin and none had

B-cell and T-cell origin. T-cell lymphoma was the most prevalent. Different morphological subtypes of canine NHL, 6 subtypes of the B-cell and11 subtypes of the T-cell were studied. Among mitotic index, 51% (n=33) of T-cell origin had high mitotic index and 34% (n=22) had a low mitotic index and 9% (n=6) of B-cell origin had high mitotic index and 6% (n=4) had low mitotic index.

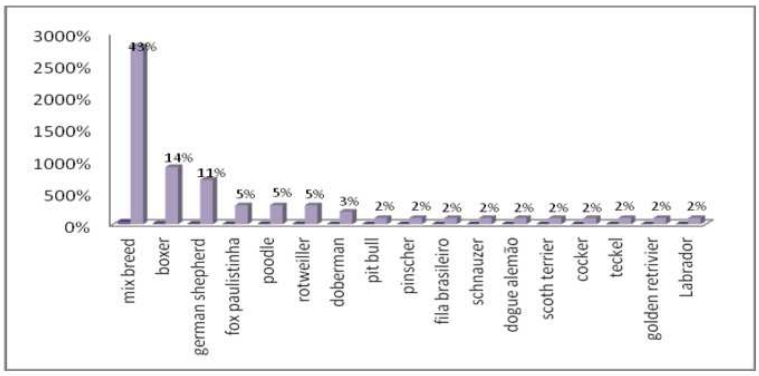


Figure 1 - Distribution according to breed in canine lymphoma. Service of Animal Pathology of the FMVZ-USP, Brazil, from 1995 to 2009.

(34%) of pleomorphic small cell, 11 (20%) of cutaneous T-cell, high grade, 10 (18%) of lymphoblastic, 4 (7%) of aggressive large granular cell, 3 (5%) of pleomorphic mixed, 2 (4%) of cutaneous T-(4%) of plasmacytoid, 1 (2%) of immunoblastic and 1 (2%) of prolymphocytic, as shown in Fig. 2.

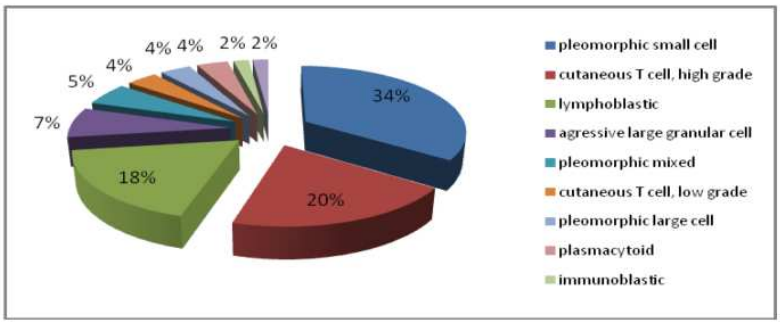


Figure 2 - Histological classification of T-cell lymphoma canine lymphoma. Service of Animal Pathology of the FMVZ-USP, Brazil, from 1995 to 2009.

Among the histological subtypes of cutaneous T-cell lymphoma, the following values were obtained: 7 (54%) of cerebriform small (mycosis fungoides), 2 (15%) of cerebriform large cell in transformation immunoblastic, 2 (15%) of blastic, 1 (8%) of monocytoid and 1 (8%) of cerebriform small cell, as observed in Fig. 3.

The 10 B-cell lymphomas were subtyped as: 3 (30%) of centroblastic polymorphic, 2 (20%) of Burkitt, 2 (20%) of lymphoplasmacytic, 1 (10%) of anaplastic/mediastinal, 1 (10%) of small lymphocytic and 1 (10%) of prolymphocytic, as represented in Fig. 4.

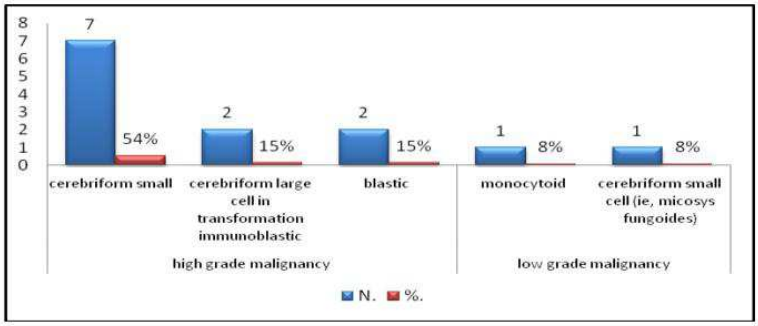


Figure 3 - Histological classification of cutaneous T-cell lymphoma in canine lymphoma. Service of Animal Pathology of the FMVZ-USP, Brazil, from 1995 to 2009.

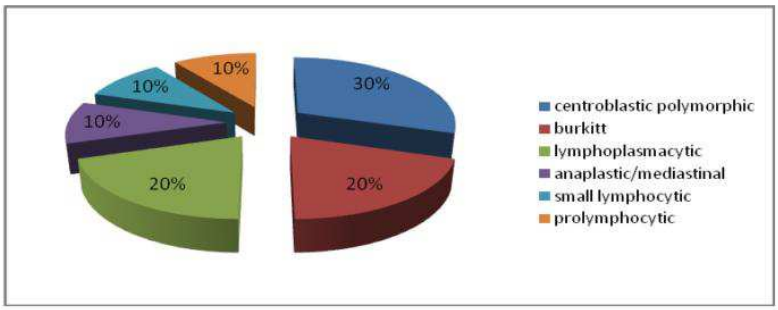


Figure 4 - Histological classification of B-cell canine lymphoma. Service of Animal Pathology of the FMVZ-USP, Brazil, from 1995 to 2009.

Discussion

This study diagnosed morphological subtypes and immunophenotypes of 65 canine lymphomas retrieved from the Service of Animal Pathology of the FMVZ-USP from 1995 to 2009. The Service of Animal Pathology is responsible for biopsy and necropsy specimens diagnosis derived from the Veterinary Hospital of FMVZ-USP, as well as private veterinary clinics or other public or private institutions. In a previous study, it was determined that the Veterinary Hospital of the FMVZ-USP receives cases of dogs bearing tumors from all regions of the city of São Paulo (data not shown). Therefore, we believe that such types of studies are important to characterize the epidemiology of these neoplasms in the city of São Paulo.

The majority of findings described Mixed breed as the more prevalent in canine lymphoma followed by German Shepherd. However, the German Shepherd was third in our findings (2,16,31). Mixed breed was the most affected breed, followed by Boxer, similar to other authors (24,25). The most T-cell lymphomas detected by immunophenotype were in the Boxer breed. The mean age of the dogs with lymphoma was 8.7 years (5 months to 15 years). The canine lymphoma is higher between 5 to 9 years. Worldwide, predominance among dogs aged between 6 to 10 years with 6.58 of mean age (23). Other studies identified that 54.4% had an age up to 6 years and 7.2 mean age (24); similar to other results that showed 80% of cases had an age between 5 to 11 years and mean age of 5.9 (16); 80% had an age between 4 to 13 years (22) and other results identified the mean age of 7.9 and an age between 1 to 16 years (31).

Male dog was the most affected gender in this study (53%) in comparison with females (46%). However, the gender predilection of tumors was not significantly different. Other authors found a predominance of lymphoma in male dogs, although that was not significantly different, similar to our study (3, 22). Other authors showed a predominance of lymphoma in female dogs, contradicting the result of some articles (22, 25). Although there is a controversy related to gender, it is believed that gender is not a risk factor for the development of lymphoma in dogs (10, 16, 17).

Multicentric lymphoma was the most common in this study followed by extranodal. This result is similar to the majority of studies found in the literature (6, 12, 16, 19, 20, 23, 24, 31).

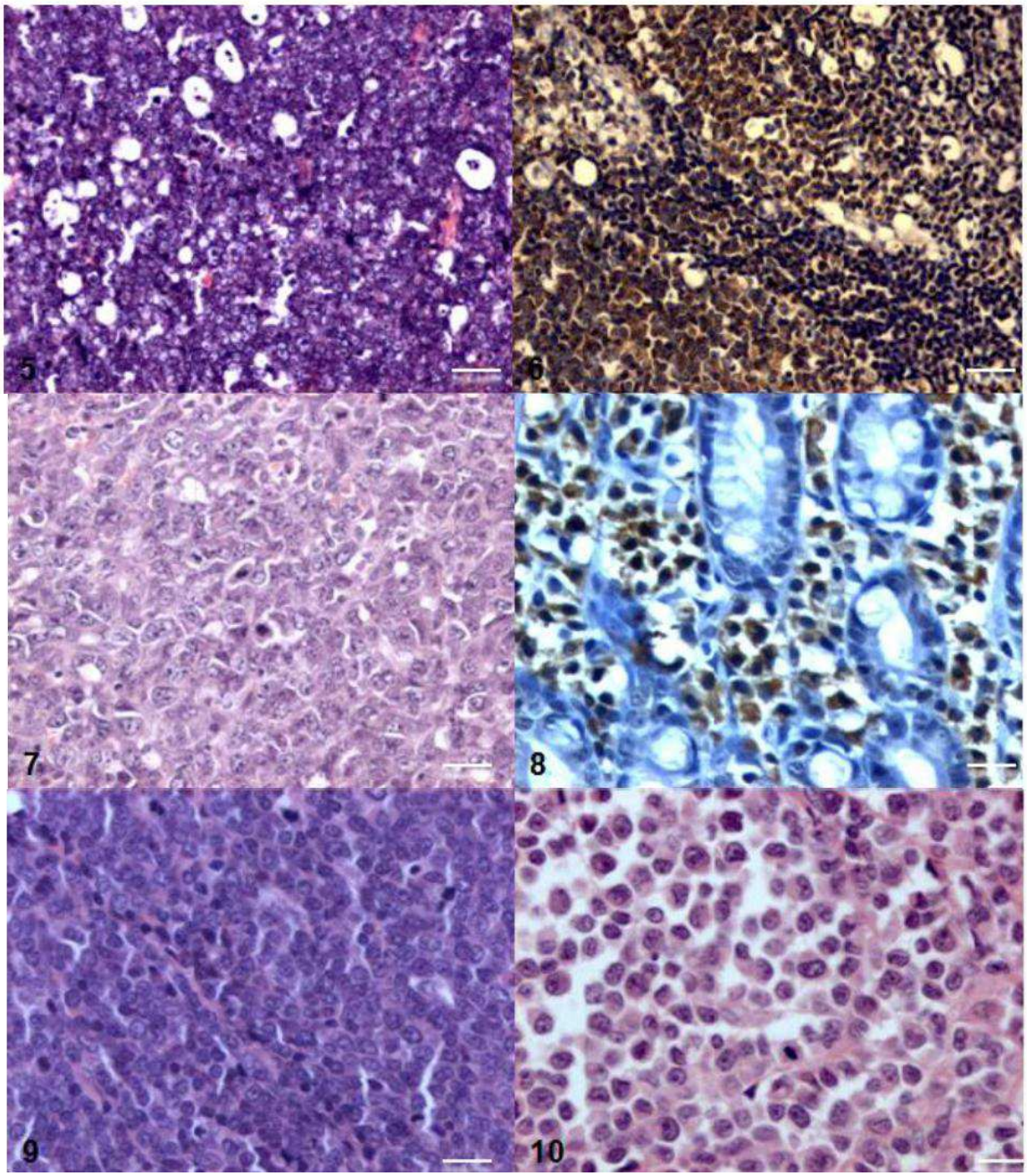


Figure 5. Spleen. Burkitt-subtype B-cell lymphoma. Medium-sized cells characterized with round nuclei, irregular chromatin and several nucleoli. 'Starry-sky' appearance due to a high number of tingible body macrophages. Hematoxylin and Eosin (H&E). Bar=100µm. Figure 6. Spleen. Burkitt- subtype B-cell lymphoma. Neoplastic B-cell lymphoma is densely CD79 positive. Immunolabeling with anti-CD79, hematoxylin counterstain. Bar=100µm. Figure 7. Lymph node. Anaplastic/mediastinal - subtype B-cell lymphoma. Large-sized cells are markedly anaplastic with abundant cytoplasm. H&E. Bar=50µm. Figure 8. Intestine. Small lymphocytic- subtype T-cell lymphoma. Small-sized T cells with round nuclei and absent nucleoli are CD3 positive. hematoxylin counterstain. Bar=50µm. Figure 9. Lymph node. Lymphoblastic- subtype T-cell lymphoma. Medium-sized cells with vesicular nuclei, peripheralized chromatin and visible small nucleoli. H&E. Bar=50µm. Figure 10. Lymph node. Plasmacytoid T-cell subtype. Large-size cell with eccentric nuclei, occasional binucleation, acidophilic cytoplasm. H&E. Bar=50µm. Service of Animal Pathology of the FMVZ-USP, Brazil, from 1995 to 2009.

Brazilian Journal of Veterinary Pathology. www.bjvp.org.br . All rights reserved 2007.

The role of immunophenotyping lymphomas is to differentiate lymphoma from other non-neoplastic proliferations of lymph nodes and evaluate the prognosis of the patient. The T-cell phenotype was associated with a worse prognosis, unlike the B-cell phenotype that can be associated with good, intermediate and poor prognosis, as previously reported in veterinary and human medicine(1, 16, 18, 35).This study showed T-cell lymphoma was the most common (85% of cases) like some other studies (13, 15, 18). Other researchers from different countries found the predominance of B-cell lymphoma (60-80%) similar to human results that showed the predominance of B-cell lymphoma (80–85%) with the exception of Asia(1, 13, 15, 18, 19, 33, 34). Canine lymphoma are classified as mixed (22%) (double stained for T cell and B cell) and less than 5% are not immune reactive, similar to human studies (8,30) .The predominance of Boxers with T-cell lymphoma was also found in previous studies, similar to our result (7, 14, 17).The epidemiology of canine lymphoma is still controversial in the literature. There is variation in terms of breed predisposition, different phenotypes, different types and subtypes with different biological behavior and response to treatment, varying according to region or country making canine lymphoma, an epidemiological, clinical and pathological challenge whose etiology is still unknown.

The most frequent subtype of T-cell lymphoma in this study was pleomorphic small cell, followed by cutaneous T-cell, high grade and lymphoblastic. The high prevalence of cutaneous T-cell lymphoma was reported in some studies (7, 8, 24). One study found 23.9% of pleomorphic mixed, small, and large-cell lymphomas, 23.9% of lymphoblastic lymphoma and 13.0% of pleomorphic large cells (7). Other articles described 6% of pleomorphic mixed, 3% of plasmacytoid, 2% of pleomorphic large cell, 2% of immunoblastic and 1% of aggressive large granular (17).

Among the cutaneous T-cell lymphoma, in our study the following results were obtained: 4% of cutaneous low grade T-cell, and 20% of cutaneous high grade T-cell. Among the subtypes we observed: 7 (54%) of cerebriform small, 2 (15%) of cerebriform large cell in transformation immunoblastic, 2 (15%) of blastic, 1 (8%) of monocytoid and 1 (8%) of cerebriform small cell. This is in contrast with another study that found more cutaneous T-cell, low grade (9%) than high grade (3%) (17).

The most frequent subtype of B-cell lymphoma in this study was centroblastic polymorphic, followed by Burkitt, lymphoplasmacytic, according to the updated Kiel classification reported by some authors (6, 8, 23, 24).

Other studies described the predominance of centroblastic polymorphic (38%), followed by other subtypes as 11% of marginal zone and 8% of immunoblastic, 2% of Burkitt, 1% of lymphoplasmacytic, 1% of plasmacytoid, and others below 1% (small lymphocytic, prolymphocytic, centroblastic-centrocytic, anaplastic/mediastinal and small cell not otherwise specified) (17).

In summary, our study has shown that, in general, the Mixed breed was the most affected breed, followed by German Shepherd, and the mean age was 8.7 years. There was no gender preference. T-cell lymphoma predominated in the Boxer breed. Multicentric type was the most common lymphoma. T-cell lymphoma was the most prevalent in dogs in the present study. The most common subtypes were pleomorphic small cell type and centroblastic type for T-cell lymphoma and B-cell lymphoma, respectively. These data are an important epidemiological tool for advancing the best methods in research, prevention and treatment of lymphoma in dogs. Possible factors contributing to the development of lymphoma in dogs remain unknown and require further research.

Acknowledgements

Katia Cristina Kimura is the recipient of a PhD fellowship from FAPESP (Proc. No. 08/54612-9). The study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

References

1. ASTER JC. Diseases of white blood cells, lymph nodes, spleen and thymus. In: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 7th edn., KUMAR V., ABBAS AK., FAUSTO N., eds., Philadelphia, Elsevier Saunders, 2004.
2. CARLTON WW., MCGAVIN MD. Patologia Veterinária Especial de Thomson. 2.ed. Porto Alegre: Artemed, 1998.
3. DALEK CR., CALAZANS SG., NARDI AB. Linfomas. In: DALEK CR, NARDI AB, RODASKI S. Oncologia em cães e gatos. São Paulo: Roca, 2009.
4. DE MOURA VMBD., SEQUEIRA JL., AMORIN RL., BANDARRA EP. Aspectos Epidemiológicos dos Linfomas Caninos – Na região de Botucatu-SP. Nosso Clínico., 2003, 31, 32-40.
5. DOBSON JM., BLACKWOOD LB., MCINNES EF., BOSTOCK DE., NICHOLLS P., HOATHER TM., TOM BD. Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma. J. Small An.Practice., 2001, 42, 377-84.
6. FAN TM., KITCHELL BE. An update on diagnosing and treating canine lymphosarcoma. Vet.Med., 2002, 58-65.
7. FOURNEL-FLEURY C., MAGNOL JP., BRICAIRE P., MARCHAL T., CHABANNE L., DELVERDIER A., BRYON PA., FELMAN P. Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with

human non-Hodgkin's lymphomas. J.Comp.Pathol., 1997, 117, 35-59.

8. FOURNEL-FLEURY C., PONCE F., FELMAN P., BLAVIER A., BONNEFONT C., CHABANNE L., MARCHAL T., CADORE JL., GOY-THOLLOT I., LEDIEU D., GHERNATI I., MAGNOL JP. Canine T-cell Lymphomas: A Morphological, Immunological, and Clinical Study of 46 New Cases. Vet.Pathol., 2002, 39, 92-109.
9. GREENLEE PG., FILIPPA DA., QUIMBY FW., PATNAIK AK., CALVANO SE., MATUS RE., KIMMEL M., HURVITZ AI., LIEBERMAN PHPG. Lymphoma in dogs: a morphologic, immunologic, and clinical study. Cancer., 1990, 66, 480-490.
10. JACOBS RM., MESSICK JB., VALLI VE. Tumors of the Hemolymphatic system. In: Meulten DJ. Tumors in domestic animals. 4ed. Iowa: State Press, 2002.
11. JUBB KVF., KENNEDY PC., PALMER N. Pathology of Domestic Animals. 4.ed. San Diego, California: Elsevier, 2008.
12. LURIE DM., LUCROY MD., GRIFFEY SM., SIMONSON E., MADWELL BR. T-cell derived malignant lymphoma in the boxer breed. Vet. Comp.Oncol., 2004, 2, 171–175.
13. LURIE DM., MILNER RJ., SUTER SE., VERNAU W. Immunophenotypic and cytomorphologic subclassification of T-cell lymphoma in the boxer breed. Vet. Immunol. Immunopathol., 2008, 15, 102-10.
14. MADEWELL BR. Canine lymphoma.Veterinary Clinics of North America: Small An. Practice., 1985, 15, 709-723.
15. MODIANO JF., BREEN M., VALLI VE., WOJCIESZYN JW., CUTTER GR. Predictive value of p16 or Rb inactivation in a model of naturally occurring canine non-Hodgkin's lymphoma. Leukemia, 2007, 21, 184-187.
16. MORENO K., BRACARENSE APFRL. Estudo retrospectivo de linfoma canino no período de 1990 - 2004 na região norte do Paraná. B. J. Vet. Res. An. Sci., 2007, 44, 46-52.
17. MOULTON JE., HARVEY JW. Tumors of the lymphoid and hematopoietic tissues In:Moulton JE. Tumors in Domestic Animals. London: University of California Press, 1990.
18. PONCE F., MAGNOL JP., LEDIEU D., MARCHAL T., TURINELLI V., CHALVET-MONFRAY K., FOURNEL-FLEURY C. Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. Vet. J., 2004, 167, 158-166.
19. PONCE F., MARCHAL T., MAGNOL JP., TURINELLI V., LEDIEU D., BONNEFONT C., PASTOR M., DELIGNETTE ML., FOURNEL-FLEURY C. A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. Vet. Pathol., 2010, 47, 414-33.
20. RALLIS T., KOUTINAS A., LEKKAS S., PAPADIAMANTIS C. Lymphoma (malignant lymphoma, lymphosarcoma) in the dog. J. Small An. Practice., 1992, 33, 590-596.
21. RUSLANDER DA., GEBHARD DH., TOMPKINS MB., GRINDEM CB., PAGE RL. Immunophenotypic characterization of canine lymphoproliferative disorders. In Vivo., 1997, 11, 169-172.
22. SEQUEIRA JL., FRANCO M. Características dos linfomas caninos. J. Anatomopathol., 1992, 7, 6-8.
23. SUEIRO FA., ALESSI AC., VASSALLO J. Canine lymphomas: a morphological and immunohistochemical study of 55 cases, with observations on p53 immunoexpression. J. Comp. Pathol., 2004, 131, 207–213.
24. SUZANO SMC. Classificação Citológica e Imunocitoquímica dos Linfomas Caninos. 110 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.
25. TESKE E., VAN HEERDE P., RUTTEMAN GR., KURZAMAN DI., MOORE PF., MACEWEN G. Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc., 1994, 205, 1722-1728.
26. TESKE E., WISMAN P., MOORE PF., VAN HEERDE P. Histologic classification and immunophenotyping of canine non-Hodgkin's lymphomas: unexpected high frequency of T cell lymphomas with B cell morphology. Exp. Hematol., 1994, 22, 1179-1187.
27. THOMAS R., SMITH KC., GOULD R., GOWER SM., BINNS MM., BREEN M. Molecular cytogenetic analysis of a novel high-grade canine Tlymphoblastic lymphoma demonstrating co-expression of CD3 and CD79a cell markers. Chrom.Res., 2001, 9, 649-657.
28. VAN PELT RW., CONNOR GH. Clinicopathological survey of malignant lymphoma in the dog. J. Am. Vet. Med. Assoc., 1968, 152, 976-989.
29. VAIL DM., KISSEBERTH WC., OBRADOVICH JE., MOORE FM., LONDON CA., MACEWENEG., RITTER MA. Assessment of potential doubling time (Tpot), argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR), and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as predictors of therapy response in canine non-Hodgkin's lymphoma. Exp. Hematol., 1996; 24:807–815.

30. VAIL DM., YOUNG KM. Hematopoietic tumors. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. Small Animal Clinical Oncology. 4.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2007.

31. VEZZALI E., PARODI AL., MARCATO PS., BETTINI G. Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-Hodgkin lymphoma according to the WHO. Vet. Comp. Oncol., 2010, 8, 38-49.

32. VONDERHAAR MA., MORRISON WB. Lymphosarcoma. In: Morrison, WB. Cancer in dogs and cats. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1998.

33. WILKERSON MJ., DOLCE K., KOOPMAN T., SHUMAN W., CHUN R., GARRETT L., BARBER L., AVERY A. Lineage differentiation of canine lymphoma/ leukemias and abberant expression of CD molecules. Vet. Imm. Immunopathol., 2005, 106, 179-196.

34. WILLMANN M., ILAUER LM., ARESPACOCHAGA AG., REIFINGER M., MOSBERGER I., THALHAMMER JG. Pax5 immunostaining in paraffin-embedded sections of canine non-Hodgkin lymphoma: A novel canine pan pre-B- and B-cell marker. Vet. Comp. Oncol., 2010, 8, 38-49.

35. WORLD HEALTH ORGANIZATION: International Classification of Diseases for Oncology. 2.ed. Geneva, 2001.