

KILDER DANTAS FILGUEIRA

**Valor prognóstico da imunexpressão de fatores pró
e antiapoptóticos no linfoma intestinal felino**

São Paulo

2022

KILDER DANTAS FILGUEIRA

**Valor prognóstico da imunexpressão de fatores pró
e antiapoptóticos no linfoma intestinal felino**

VERSÃO CORRIGIDA

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

Departamento:

Clínica médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Archivaldo Reche-Júnior

São Paulo

2022

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. 4208 FMVZ	Filgueira, Kilder Dantas Valor prognóstico da imunexpressão de fatores pró e antiapoptóticos no linfoma intestinal felino / Kilder Dantas Filgueira. – 2022. 128 f. : il. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2022. Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária. Área de concentração: Clínica Veterinária. Orientador: Prof. Dr. Archivaldo Reche Júnior. 1. Prognose. 2. Imunoistoquímica. 3. Apoptose. 4. Neoplasia entérica. 5. Gato doméstico. I. Título.
-----------------	---



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Valor prognóstico da imunexpressão de fatores pró e antiapoptóticos no linfoma intestinal felino", protocolada sob o CEUA nº 9923250319 (ID 006401), sob a responsabilidade de **Archivaldo Reche Júnior e equipe; KILDER DANTAS FILGUEIRA** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 17/04/2019.

We certify that the proposal "Prognostic value of immunexpression of pro and antiapoptotic factors in feline intestinal lymphoma", utilizing 70 Cats (males and females), protocol number CEUA 9923250319 (ID 006401), under the responsibility of **Archivaldo Reche Júnior and team; KILDER DANTAS FILGUEIRA** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 04/17/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **04/2019** a **12/2021**

Área: **Clínica Médica Veterinária**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Gatos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **6 a 20 anos**

N: **70**

Linhagem: **Variada**

Peso: **2 a 4 kg**

Local do experimento: **Clínica Veterinária Vetmasters**

São Paulo, 16 de maio de 2022

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FILGUEIRA, Kilder Dantas

Título: Valor prognóstico da imunoexpressão de fatores pró e antiapoptóticos no linfoma intestinal felino

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária 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: _____

DEDICATÓRIA

*Á minha gata, **Nina**, representando a espécie felina como um todo. Nina, você realmente faz jus ao que se atribui aos gatos domésticos: seres superiores, divinos, encantadores e que sabem muito bem como “escravizar” os meros humanos que os circundam! (e claro que todos obedecem...). E como já diz um dos mais influentes cantores e compositores da música brasileira, “o Rei Roberto Carlos”: (...) Como é grande o meu amor por você (...)*

AGRADECIMENTOS

Não vou iniciar os agradecimentos com “ clichê”, como sou gratifico a **Deus e minha família multiespécie**. Agradecer a **CADA UM**: já faço diariamente, ao me recolher a noite, em orações.

Ao Professor Dr. **Archivaldo Reche-Júnior**, por aceitar prontamente em ser meu orientador. Obrigado Professor! (como sempre lhe intitulei); peço desculpas por algumas situações que poderiam ser resumidas em uma expressão da língua portuguesa: “água mole em pedra dura tanto bate até que fura”. Se fosse dissertar toda a admiração que tenho por sua pessoa, todas as páginas dessa Tese seriam inteiramente preenchidas. Mas existem normas técnicas, bibliotecárias, então não posso fazer isso. O que importa é o sentimento de respeito que guardarei do senhor (como também sempre lhe chamei). Acho que nunca irei conseguir lhe apelidar de “Valdo”. Será sempre o nosso eterno mestre, professor e orientador.

Ao Professor Dr. **Bruno Cogliati** e toda sua equipe técnica-científica (do Laboratório de Pesquisa Experimental e Comparativa do Fígado do Departamento de Patologia da FMVZ/USP). Professor Bruno, não tenho palavras para expor toda gratidão que tenho pelo senhor. A sua contribuição (e compreensão) para o desenvolvimento do experimento foi fundamental. Sem o seu auxílio, não estaria hoje, aqui e agora, defendendo essa Tese. O senhor foi o melhor coorientador do mundo! Também peço desculpas por vezes ser tão insistente. E também não consigo me referir a sua pessoa apenas como Bruno e sim Professor Bruno, um ser humano iluminado, gentil, generoso, honesto e altamente competente. Uma honra de ter lhe conhecido.

A todas (os) Professoras (es) e funcionárias (os) do **Programa de Pós-graduação em Clínica Veterinária da FMVZ/USP** (e também para algumas pessoas, de competência e cooperativismo ímpar, do corpo docente/técnico dos **Programas de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária e Patologia Experimental e Comparada da FMVZ/USP**). Estendo esse agradecimento a toda equipe do **Hospital Veterinário da FMVZ/USP**: Médicas (os) Veterinárias (os), enfermeiros, residentes, laboratoristas... Enfim a todos que fazem ou já fizeram parte desse grupo durante

minha jornada. Não vou citar nomes, pois seria desagradável esquecer alguém. Gratidão pelos inúmeros conhecimentos adquiridos e a cordialidade diária.

Aos Pós-graduandos que tive a oportunidade em compartilhar a convivência. Em especial a **Aline Elisa Santana, Fábio Parra Sellera e Ronaldo Gomes Gargano**. Vocês foram verdadeiros amigos que conquistei. Muito obrigado pelas conversas, conselhos e parceria em publicações (e espero que assim continuemos!)

Aos membros da banca examinadora, pelo carinho e atenção no momento do convite. Faço votos que a contribuição de cada seja enaltecida para a tese e os artigos científicos que irão surgir da mesma.

A empresa PremieRpet por acreditar nas Universidades e reconhecer a importância de suas pesquisas; sou agradecido pelo incentivo financeiro para a realização do presente estudo.

A empresa L2JM Soluções, representada pela **Dra. Mariana Ramos Queiroz**: excelência em análise estatística.

A toda equipe da **Clínica Veterinária Vetmasters** (São Paulo-SP) pela receptividade agradável durante o período no qual possui o privilégio de acompanhar a rotina clínica do setor de medicina felina. Os ensinamentos que lá obtive serão *ad eternum*.

Aos gestores das diferentes unidades da **Universidade Federal Rural do Semi-Árido** (Mossoró-RN), pela compreensão e incentivo na capacitação do corpo técnico, no qual me enquadro. Retorno para fortalecer a Medicina Veterinária Potiguar, na tríade: ensino, pesquisa e extensão. Com certeza os felinos da região, e seus respectivos tutores, também agradecem.

Não iniciei com “clichê”, mas vou terminar sim com o tal: **agradeço a todos** que contribuíram de forma direta ou indireta para a elaboração desse trabalho e para a minha evolução profissional durante o período da Pós-graduação. É isso. Ponto final!

“O menor dos felinos é uma obra-prima”

(Leonardo da Vinci)

*“Eu não tenho cicatrizes. Eu sou cicatrizes.
Carrego no albergue dos olhos o ódio dos que me odiaram,
a traição dos que me traíram,
o pessimismo dos que não acreditaram em mim.
Mas não há ressentimentos. Não optei por viver ofendido.
A força que me rege é a gratidão”.*

(Pe. Fábio de Melo)

*“Faça tudo o que você pode, com o que você tem,
no tempo que é possível, no lugar onde você está”*

(Froma Walsh)

*“(…) Quando bater a saudade
Olhe aqui pra cima
Sabe lá no céu aquela estrelinha
Que eu muitas vezes mostrei pra você!
Hoje é minha morada,
A minha casinha
Mesmo que de longe tão pequenininha
Ela brilha mais toda vez que te vê (…)”*

(Trecho da canção “Estrelinha”; Compositores: Gabriel Rocha, Leandro Visacre, Luigi Viscare e Lucas Carvalho; Interpretes: Di Paullo & Paulino, com participação especial de Marília Mendonça – *in memoriam*). Esse é meu singelo acalento a todas famílias enlutadas pela partida de seus entes queridos vitimados, de forma direta ou indireta, pela Covid-19.

RESUMO

FILGUEIRA, K. D. **Valor prognóstico da imunexpressão de fatores pró e antiapoptóticos no linfoma intestinal felino.** 2022. 128 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Objetivou-se determinar a imunexpressão da Caspase-3, Bcl-2 e Bax no linfoma intestinal felino e relacionar com o desfecho clínico-terapêutico dos pacientes. Foram utilizados tecidos oriundos de biopsias intestinais de 30 felinos, admitidos na Clínica Veterinária Vetmasters (São Paulo-SP), com diagnóstico histopatológico de linfoma. Os pacientes foram acompanhados até o momento da cura clínica ou óbito. Os animais foram submetidos ao mesmo protocolo quimioterápico (clorambucil e prednisolona). A avaliação imunohistoquímica foi realizada no LiverLab (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo). Foram utilizados os seguintes anticorpos: Caspase-3, Bcl-2 e Bax. A determinação da imunexpressão da Caspase-3, Bcl-2 e Bax foi avaliada de acordo com o percentual de linfócitos neoplásicos positivos. O valor utilizado para considerar o resultado significativo foi de 0.05 ($p < 0.05$). Para determinar se houve diferença na imunomarcagem da Caspase-3, Bcl-2, Bax e razão Bcl-2/Bax, utilizou-se o teste de qui-quadrado (X^2). Para verificar se existiam associações entre as respostas terapêuticas (RC – remissão completa; RP - remissão parcial; AR - ausência de remissão), tempo de sobrevivência e óbito com a imunexpressão da Caspase-3, Bcl-2, Bax e razão Bcl-2/Bax, utilizou-se o teste exato de Fisher. A análise de sobrevivência foi realizada pelo modelo de *Kaplan-Meier*. Houve diferença pelo teste de X^2 ($p < 0.01$) nas probabilidades dos escores de Caspase-3, sendo que a maioria apresentou escore 0. Existiu diferença pelo teste de X^2 ($p < 0.01$) nas probabilidades dos escores de Bcl-2, onde a maior parte apresentou escore 4. Não houve diferença pelo teste de X^2 ($p = 0.22$) para os escores de Bax (0 a 12). Para a razão Bcl-2/Bax, o valor menor que 0.33 representou caso de melhor prognóstico e quando o valor foi igual ou maior a 0.33, considerou-se caso de pior prognóstico. Existiu associação entre o tipo de resposta terapêutica e a imunexpressão de Caspase-3 pelo teste Exato de Fisher ($p = 0.01$). A maioria dos animais, com RC, possuiu associação com o escore 0. Ocorreu associação entre o tipo de resposta terapêutica e a imunexpressão de Bcl-2 pelo teste Exato de Fisher

($p = 0.04$). A maioria dos animais possuíam RC associada ao escore 4. Não existiu associação entre o tipo de resposta terapêutica e a imunexpressão de Bax e na razão Bcl-2/Bax, pelo teste Exato de Fisher ($p = 0.22$ e $p = 0.05$, respectivamente). Ocorreu associação entre o tempo de sobrevivência de até 1 mês e a imunexpressão de Caspase-3 ($p < 0.01$). Não houve associação entre o tempo de sobrevivência e a imunexpressão de Bcl-2 ($p = 0.83$), Bax ($p \geq 0.05$) e razão Bcl-2/Bax ($p = 0.92$). Não existiu associação entre o óbito e as imunexpressões de Caspase-3 ($p = 0.40$), Bcl-2 ($p = 0.76$), Bax ($p = 0.05$) e razão Bcl-2/Bax ($p = 0.40$). Houve imunexpressão da Caspase-3, Bcl-2 e Bax no linfoma intestinal felino, em diferentes escores, e nem todos se relacionaram com o desfecho clínico-terapêutico dos pacientes. Estudos futuros são necessários para melhor compreensão da imunexpressão dos fatores pró e antiapoptóticos no linfoma intestinal felino e sua concreta relação com o prognóstico.

Palavras-chave: Prognose. Imunoistoquímica. Apoptose. Neoplasia entérica. Gato doméstico.

ABSTRACT

FILGUEIRA, K. D. **Prognostic value of the immunoexpression of pro and antiapoptotic factors in feline intestinal lymphoma.** 2022. 128 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

The objective was to determine the immunoexpression of Caspase-3, Bcl-2 and Bax in feline intestinal lymphoma and relate it to the clinical and therapeutic outcome of the patients. Tissues from intestinal biopsies of 30 cats, admitted at Vetmasters Veterinary Clinic (São Paulo-SP), with histopathological diagnosis of lymphoma, were used. The patients were followed until clinical cure or death. The animals were submitted to the same chemotherapy protocol (chlorambucil and prednisolone). Immunohistochemical evaluation was performed at LiverLab (Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo). The following antibodies were used: Caspase-3, Bcl-2 and Bax. The determination of Caspase-3, Bcl-2 and Bax immunoexpression was evaluated according to the percentage of positive neoplastic lymphocytes. The value used to consider the result significant was 0.05 ($p < 0.05$). To determine whether there were differences in the immunolabeling of Caspase-3, Bcl-2, Bax and Bcl-2/Bax ratio, the chi-square (X^2) test was used. To check whether there were associations between therapeutic responses (CR - complete remission; PR - partial remission; AR - no remission), survival time and death with the immunoexpression of Caspase-3, Bcl-2, Bax and Bcl-2/Bax ratio, we used Fisher's exact test. Survival analysis was performed by the *Kaplan-Meier* model. There was a difference by X^2 test ($p < 0.01$) in the probabilities of Caspase-3 scores, where most of them had a score of 0. There was a difference by X^2 test ($p < 0.01$) in the probabilities of Bcl-2 scores, where most of them had a score of 4. There was no difference by X^2 test ($p = 0.22$) for Bax scores (0 to 12). For the Bcl-2/Bax ratio, a value lower than 0.33 represented a case of better prognosis and when the value was equal or higher than 0.33 it was considered a case of worse prognosis. There was an association between the type of therapeutic response and Caspase-3 immunoexpression by Fisher's exact test ($p = 0.01$). Most animals with CR had an association with score 0. There was an association between the type of therapeutic response and Bcl-2 immunoexpression by Fisher's Exact test ($p = 0.04$). The majority of animals had CR associated with score 4. There was no

association between the type of therapeutic response and Bax immunoeexpression and Bcl-2/Bax ratio by Fisher's Exact test ($p= 0.22$ and $p= 0.05$, respectively). There was an association between survival time up to 1 month and Caspase-3 immunoeexpression ($p < 0.01$). There was no association between survival time and immunoeexpression of Bcl-2 ($p= 0.83$), Bax ($p \geq 0.05$) and Bcl-2/Bax ratio ($p= 0.92$). There was no association between death and the immunoeexpressions of Caspase-3 ($p= 0.40$), Bcl-2 ($p= 0.76$), Bax ($p= 0.05$) and Bcl-2/Bax ratio ($p= 0.40$). There was immunoeexpression of Caspase-3, Bcl-2 and Bax in feline intestinal lymphoma at different scores, and not all were related to the clinical-therapeutic outcome of the patients. Future studies are needed to better understand the immunoeexpression of pro-and antiapoptotic factors in feline intestinal lymphoma and their concrete relationship with prognosis.

Keywords: Prognosis. Immunohistochemistry. Apoptosis. Enteric neoplasia. Domestic cat.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotomicrografia evidenciando diferentes escores da imunexpressão de Caspase-3 no linfoma intestinal felino. Legenda: A=escore 0; B e C=escore 1 (setas amarelas); D=escore 2 (setas vermelhas). Objetiva 20x.....82

Figura 2 - Fotomicrografia evidenciando diferentes escores da imunexpressão de Bcl-2 no linfoma intestinal felino. Legenda: A=escore 1 (setas amarelas); B=escore 4; para esse último é notória a positividade na maioria (>75%) das células neoplásicas presentes no campo microscópico. Objetiva 20x.....83

Figura 3 - Fotomicrografia evidenciando diferentes escores da imunexpressão de Bax no linfoma intestinal felino. Legenda: A=escore 2; B=escore 6; C=escore 9; D=escore 12; é notório o aumento na frequência de positividade e intensidade de marcação das células neoplásicas presentes em cada campo microscópico, ao analisar a figura em ordem alfabética. Objetiva 20x.....83

Figura 4 - Estimativa da probabilidade de sobrevivência (método de *Kaplan-Meier*) dos animais com linfoma intestinal felino. Legenda: linha preta contínua: curva da estimativa de sobrevivência; linhas cinza tracejadas: intervalos inferior (abaixo) e superior (acima) de confiança de 95%.....91

Figura 5 - Estimativa da probabilidade de sobrevivência (método de *Kaplan-Meier*) dos animais com linfoma intestinal felino segundo os tipos histológicos.....94

Figura 6 - Estimativa da probabilidade de sobrevivência (método de *Kaplan-Meier*) dos animais com linfoma intestinal felino segundo o tipo de remissão..... 97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Marcadores imunoistoquímicos e suas respectivas condições metodológicas.....	76
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Análise descritiva da distribuição do peso inicial ao tratamento, idade, ECC, escores de imunexpressão (Bcl-2, Bax, Caspase-3 e Razão Bcl-2/Bax) e tempo de sobrevivência dos 30 gatos utilizados no estudo. São Paulo, 2022.....	79
Quadro 2 - Comparação dos tipos histológicos dos linfomas de 30 gatos avaliados no estudo. São Paulo, 2022.....	81
Quadro 3 - Comparação da imunofenotipagem dos linfomas de 30 gatos avaliados no estudo. São Paulo, 2022.....	81
Quadro 4 - Comparação dos escores de Caspase-3 (0 - 4) dos linfomas de 30 gatos avaliados no estudo. São Paulo, 2022.....	81
Quadro 5- Comparação dos escores de Bcl-2 (0 - 4) dos linfomas de 30 gatos avaliados no estudo. São Paulo, 2022.....	82
Quadro 6 - Comparação entre razão Bcl-2/Bax menor que 0.33 e razão igual ou maior que 0.33 dos linfomas de 30 gatos avaliados no estudo. São Paulo, 2022.....	84
Quadro 7 - Relação entre o tipo de resposta terapêutica e os tipos histológicos dos linfomas de 30 gatos avaliados no estudo. São Paulo, 2022.....	85
Quadro 8 - Relação entre o tipo de resposta terapêutica e a imunofenotipagem dos linfomas de 30 gatos avaliados no estudo. São Paulo, 2022.....	85

Quadro 9- Relação entre o tipo de resposta terapêutica e a imunexpressão de Caspase-3 nos linfomas de 30 gatos avaliados no estudo. São Paulo, 2022.....	86
Quadro 10- Relação entre o tipo de resposta terapêutica e a imunexpressão de Bcl-2 nos linfomas de 30 gatos avaliados no estudo. São Paulo, 2022.....	86
Quadro 11 - Relação entre tempo de sobrevida de até 1 mês e os tipos histológicos dos linfomas de 30 gatos avaliados no estudo. São Paulo, 2022.....	87
Quadro 12 - Relação entre tempo de sobrevida de até 1 mês e a imunofenotipagem dos linfomas de 30 gatos avaliados no estudo. São Paulo, 2022.....	88
Quadro 13 - Relação entre tempo de sobrevida de até 1 mês e a imunexpressão de Caspase-3 dos linfomas de 30 gatos avaliados no estudo. São Paulo, 2022.....	88
Quadro 14 - Resumo das estimativas do modelo de <i>Kaplan-Meier</i> de sobrevivência dos 30 animais com linfoma intestinal felino. São Paulo, 2022.....	89
Quadro 15 - Resumo das estimativas do modelo de <i>Kaplan-Meier</i> de sobrevivência dos 23 animais com linfoma linfocítico. São Paulo, 2022.....	92
Quadro 16 - Resumo das estimativas do modelo de <i>Kaplan-Meier</i> de sobrevivência dos 6 animais com linfoma linfoblástico. São Paulo, 2022.....	93
Quadro 17 - Resumo das estimativas do modelo de <i>Kaplan-Meier</i> de sobrevivência dos 22 animais que tiveram remissão completa. São Paulo, 2022.....	94

Quadro 18 - Resumo das estimativas do modelo de *Kaplan-Meier* de sobrevivência dos 4 animais que tiveram remissão parcial. São Paulo, 2022.....95

Quadro 19 - Resumo das estimativas do modelo de *Kaplan-Meier* de sobrevivência dos 4 animais que tiveram ausência de remissão. São Paulo, 2022.....96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FMVZ: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

USP: Universidade São Paulo

FIV: Vírus da imunodeficiência felina

FelV: Vírus da leucemia felina

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

ELISA: Ensaio imunoenzimático

PCR: Reação em cadeia de polimerase

FcaGHV1: *Felis catus gammaherpesvirus 1*

DII: Doença intestinal inflamatória

NK: Natural Killer

COX-2: Cicloxigenase-2

NCIWF: National Cancer Institut Working Formulation

REAL/WHO: Revised European-American Lymphoma/World Health Organization

OMS: Organização Mundial da Saúde

ECC: Escore de condição corporal

PTH-rP: Peptídeo análogo ao paratormônio

MALT: Tecidos linfoides associados à mucosa

PARR: Rearranjos dos receptores antigênicos por PCR

NY: Nova Iorque

EUA: Estados Unidos da América

ADH: Hormônio antidiurético

RC: Resposta completa

RP: Resposta parcial

RN: Remissão nula

AR: Ausência de resposta

pH: Potencial hidrogeniônico

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

TTBS: Tampão de lavagem

IC: Intervalo de confiança

Mín: Mínimo

Med: Mediana

Máx: Máximo

1°Q: Primeiro quartil

3°Q: Terceiro quartil

LISTA DE SÍMBOLOS

et al: Colaboradores

%: Por cento

Kg: Quilogramas

g/dL: Grama por decilitro

≥: Maior ou igual

mg/m²: Miligramas por metro quadrado

VO: Via oral

h: horas

mcg: Microgramas

µm: Micrômetros

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

°C: Graus celsius

®: Marca registrada

TM: *Trade mark*

<: Menor

>: Maior

X²: Qui-quadrado

µ: Média

σ: Desvio-padrão

=: *Igual*

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	24
2.	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1.	CONSIDERAÇÕES INICIAIS	27
2.2.	ETIOLOGIA	28
2.3.	EPIDEMIOLOGIA	34
2.4.	CARACTERIZAÇÃO PATOLÓGICA	35
2.5.	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	37
2.6.	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL E EXAMES COMPLEMENTARES.....	39
2.6.1.	HEMATOLOGIA, BIOQUÍMICA SÉRICA E OUTROS EXAMES DE ROTINA.....	39
2.6.2.	ULTRASSONOGRRAFIA ABDOMINAL	41
2.6.3.	ENDOSCOPIA <i>VERSUS</i> LAPAROTOMIA	43
2.6.4.	CITOLOGIA E HISTOPATOLOGIA.....	45
2.6.5.	IMUNOISTOQUÍMICA	47
2.6.6.	TESTES AVANÇADOS: MOLECULARES E OUTROS	48
2.7.	DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.....	50
2.8.	TRATAMENTO.....	52
2.9.	PROGNÓSTICO.....	56
2.10.	MODELO DE ESTUDOS EM HUMANOS	58
2.11.	APOPTOSE – CONCEITOS GERAIS	58
2.12.	APOPTOSE <i>VERSUS</i> NEOPLASIAS	61
2.13.	FATORES PROGNÓSTICOS E TERMOS CORRELATOS - DEFINIÇÃO	62
2.14.	IMUNOISTOQUÍMICA <i>VERSUS</i> PROGNÓSTICO DE NEOPLASIAS.....	65
2.15.	IMUNOMARCADORES <i>VERSUS</i> PROGNÓSTICO DE NEOPLASIAS.....	66
2.15.1.	BCL-2, BAX E RAZÃO BCL-2/BAX	66
2.15.2.	CASPASE – 3.....	69
3.	JUSTIFICATIVA	71
4.	HIPÓTESE CIENTÍFICA	72
5.	OBJETIVOS	73
5.1.	OBJETIVO GERAL.....	73
5.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	73
5.2.1.	Verificar a diferença entre os tipos histológicos do linfoma intestinal felino	73
5.2.2.	Verificar a diferença na imunofenotipagem do linfoma intestinal felino.	73

5.2.4.	Relacionar o tipo de resposta terapêutica, tempo de sobrevivência e taxa de óbito em decorrência da doença, dos pacientes felinos, com:.....	73
5.2.4.1.	Os resultados da histopatologia no linfoma intestinal.....	73
5.2.4.2.	Os resultados da imunofenotipagem no linfoma intestinal.	73
5.2.4.3.	Os resultados da imunoeexpressão para a Caspase-3, Bcl-2, Bax e razão Bcl-2/Bax, no linfoma intestinal.....	73
6.	MATERIAIS E MÉTODOS	74
6.1.	ANIMAIS.....	74
6.2.	SELEÇÃO DO MATERIAL E DAS INFORMAÇÕES CLÍNICAS DOS PACIENTES.....	74
6.3.	PROTOCOLO QUIMIOTERÁPICO	75
6.4.	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	75
6.5.	REAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA.....	75
6.6.	AVALIAÇÃO SEMIQUANTITATIVA DA IMUNOISTOQUÍMICA.....	77
6.7.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	77
7.	RESULTADOS	79
8.	DISCUSSÃO	98
9.	CONCLUSÕES	108
	REFERÊNCIAS	110
	ANEXOS	127

1. INTRODUÇÃO

O principal representante das neoplasias hematopoiéticas felinas corresponde ao linfoma, onde aproximadamente 32 a 72% destes possuem localização anatômica nos órgãos gastrointestinais, principalmente no que concerne a porção entérica (WILSON, 2008). Esta apresentação é denominada como linfoma intestinal (RECHE-JÚNIOR *et al.*, 2010). Histologicamente, o linfoma intestinal felino é classificado em linfocítico ou de células pequenas, equivalendo à maioria dos casos e geralmente com um baixo grau de malignidade (WILSON, 2008; GIEGER, 2011). Também existe o linfoma linfoblástico ou de células grandes, o qual revela um maior potencial de malignidade (GIEGER, 2011; BARRS e BEATTY, 2012a).

A base de conhecimento relacionada ao tratamento do linfoma felino é menos vasta em relação à espécie canina. Uma grande preocupação dos clínicos veterinários e proprietários é proporcionar melhora clínica ao paciente oncológico sem, no entanto, induzir efeitos colaterais significativos. A maioria dos gatos, principalmente aqueles acometidos pelo linfoma intestinal linfocítico, demonstra uma excelente resposta ao tratamento quimioterápico com o uso de agentes alquilantes e glicocorticoides. A associação do clorambucil com a prednisolona pode proporcionar uma remissão completa em 70 a 96% dos casos (STEIN *et al.*, 2010; BARRS e BEATTY, 2012b).

A carcinogênese compreende um processo complexo de múltiplas etapas. A apoptose é um mecanismo vital e crucial que mantém o equilíbrio entre a sobrevivência e a morte das células para prevenir o câncer (JAN e CHAUDHRY, 2019). As células neoplásicas tendem a evadir os mecanismos da apoptose, permitindo assim uma proliferação excessiva, sobrevivência sob condições hipóxicas e resistência adquirida a agentes terapêuticos (MATSUURA *et al.*, 2016). A apoptose é amplamente descrita como um mecanismo significativo de morte regulada que geralmente ocorre como resultado de dano celular ou estresse externo; é fortemente regida por diferentes grupos de moléculas executoras (JAN e CHAUDHRY, 2019). Assim, a apoptose é reconhecida como um programa de morte celular, com envolvimento de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados (WU *et al.*, 2020). Diversos agentes quimioterápicos atuam por meio da indução desse tipo de morte celular, o que desencadeou a uma intensa investigação dos mecanismos da apoptose e

sua aplicação na terapia oncológica (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; ANAZETTI e MELO 2007).

Os metabólitos celulares podem regular funções de proteínas pró e antiapoptóticas (MATSUURA *et al.*, 2016). As Caspases pertencem à família das cisteínas proteases; sinalizam para a apoptose e desencadeiam vários mecanismos estruturais e bioquímicos que culminam com a morte celular. As Caspases são reconhecidas como iniciadoras e executoras da apoptose (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Em seres humanos, são descritas 14 tipos de Caspases, com destaque para a Caspase-3, que quando ativada é uma das principais efetoras do processo de apoptose (WANG *et al.*, 2014). A Caspase-3 é um importante mediador da apoptose durante a exposição celular a drogas citotóxicas, radioterapia ou imunoterapia (ZHOU *et al.*, 2018). A redução na imunexpressão da Caspase-3 em tecidos neoplásicos, associa-se com o aumento do potencial de malignidade e diminuição da sobrevida do paciente oncológico (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; WANG *et al.*, 2014). Logo, o alto nível de expressão de Caspase-3 em neoplasias malignas pode refletir em um aumento da apoptose e assim suprimir a progressão oncogênica e relacionar-se com uma maior sobrevida (LIU *et al.*, 2017). A imunexpressão da Caspase-3, em tecidos neoplásicos, pode conferir uma previsão prognóstica (WANG *et al.*, 2014).

A família das proteínas Bcl-2 consiste em cerca de 20 genes homólogos com importância na regulação da morte celular programada. Podem ser divididos em classe 1, sendo representados pelos fatores de sobrevivência semelhantes ao Bcl-2 (e assim denominados como reguladores antiapoptóticos), e em classe 2, como a proteína Bax, a qual é considerada como pró-apoptótica (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; KIRKIN; JOOS; ZÖRNIG, 2004).

A imunexpressão da Caspase-3 em neoplasias, é mais reconhecida na espécie humana, embora com reduzidos números de estudos diretamente relacionados ao tema (WANG *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2017). Pesquisas investigando a imunistoquímica para a Caspase-3, mostrou que a mesma é expressa, nos carcinomas de células escamosas esofágico humano, em 5.4 a 79.7% dos casos (WANG *et al.*, 2014). Embora as Caspases sejam encontradas em vários tecidos de animais vertebrados e invertebrados (SAKAMAI e SATOU, 2009; TUMMERS e GREEN, 2022), estudos nas diversas espécies, em especial

aos animais de companhia são praticamente escassos ou ausentes, até o presente momento, ao se realizar o levantamento bibliográfico. Encontrou-se um único estudo, em cães acometidos por osteossarcoma apendicular, no qual avaliou-se o padrão imunoistoquímico e os níveis de expressão de um painel de moléculas envolvidas no ciclo celular e apoptose, como a Caspase-3. Demonstrou-se que a expressão de tal molécula pode ser considerada como um marcador prognóstico positivo no osteossarcoma canino (BONGIOVANNI *et al.*, 2012). Logo, com base nas citações acima torna-se evidente a inexistência de estudos que relacionem a Caspase-3 com o linfoma intestinal felino.

A superexpressão de Bcl-2 é comum em muitos tipos de neoplasias humanas e contribui para aumento da resistência à quimioterapia (KIRKIN; JOOS; ZÖRNIG, 2004). Já foi constatado que seres humanos acometidos por linfoma difuso de células B, e submetidos à poliquimioterapia, a superexpressão da proteína Bcl-2 no tecido neoplásico correlacionou-se com um menor tempo de sobrevivência (PEROJA *et al.*, 2018). Na espécie felina, verificou-se, pela técnica de imunoistoquímica, que mais de 72% dos linfomas expressaram Bcl-2, onde a maioria era com origem nas células T (85%) em detrimento da linhagem em células B (56%) (SWANSON *et al.*, 2012). Em gatos, a presença do Bax já foi identificada em tecido embrionário, ovariano e uterino (LIMAN *et al.*, 2013; SANANMUANG *et al.*, 2013; COCCHIA *et al.*, 2015) e também em medula espinhal (ZHAO *et al.*, 2008), células infectadas pelo calicivírus e vírus da imunodeficiência felina (YAMAZAKI *et al.*, 2004; NATONI *et al.*, 2006) e ainda nas células epidérmicas (MADEWELL *et al.*, 2001).

Uma vez que o conhecimento da expressão da Caspase-3, Bcl-2 e Bax é sinóptico, para as neoplasias hematopoiéticas felinas, torna-se fundamental uma maior investigação sobre as suas imunoexpressões nos linfomas, em especial, aqueles de localização intestinal. A relação entre a imunoexpressão da Caspase-3, Bcl-2 e Bax com a resposta a quimioterapia antineoplásica, o tempo de sobrevivência dos gatos acometidos por essa forma de neoplasia, além do óbito em decorrência da doença, poderá ser útil como um fator prognóstico adicional, contribuindo para a rotina dos clínicos veterinários. Além disso, conforme os resultados obtidos, a imunoexpressão da Caspase-3, Bcl-2 e Bax para o linfoma intestinal felino poderá corresponder a uma ferramenta de extrema utilidade clínica a ser oferecida pelos patologistas veterinários no painel imunoistoquímico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Seguindo uma tendência mundial, os gatos vem liderando na preferência dentre os animais de estimação (FERREIRA, 2017). A verticalização das metrópoles favoreceu em ter o gato doméstico como primeira opção de animal de estimação (BARALON *et al.*, 2012). A proximidade dos gatos com seus tutores gerou a necessidade na evolução dos recursos tecnológicos e difusão de conhecimentos relacionados a saúde e bem-estar animal, com programas de prevenção de algumas doenças e diagnóstico precoce de outras, e assim gerando um reflexo positivo na longevidade dos pacientes (BARALON *et al.*, 2012). Contudo o aumento da expectativa de vida dos gatos, conduziu ao acréscimo da incidência de doenças crônicas, como as de origem neoplásica, fazendo com que as neoplasias tenham se tornado uma das grandes preocupações na medicina felina (FERREIRA, 2017). Dentre as neoplasias mais comuns em gatos, acima de sete anos, destaca-se o linfoma, sendo a apresentação gastrointestinal a forma anatômica observada mais comumente nos últimos anos (PINTO, 2010).

Nos felinos, as neoplasias do trato digestório representam 19.7 a 37.2% dentre todas as neoplasias que ocorrem na espécie. Por sua vez, as neoplasias intestinais dos gatos representam aproximadamente 19.2 a 34.8% de todas as proliferações neoplásicas gastroentéricas da espécie (RISSETTO *et al.*, 2011). O trato gastrointestinal abriga a maior população de células linfóides e imunológicas acessórias do organismo, logo compreende-se que seja um local suscetível à ocorrência de linfoma (MOORE; RODRIGUES-BERTOS; KASS, 2012; WINKEL e LUCAS, 2022). O linfoma intestinal caracteriza-se pela infiltração, nos diversos segmentos entéricos, de linfócitos neoplásicos, com ou sem envolvimento de linfonodos mesentéricos (LINGARD *et al.*, 2009).

Aproximadamente 90% das proliferações hematopoiéticas felinas são classificadas como linfomas, onde 32 a 72% destes possuem localização nos órgãos do trato gastrointestinal, prevalentemente no intestino (WILSON, 2008). Assim esta forma anatômica é denominada como linfoma intestinal ou alimentar (RECHE-JÚNIOR *et al.*, 2010). No trato gastrointestinal, acomete principalmente o duodeno (83%), jejuno (100%), íleo (93%) e linfonodos mesentéricos (59 a 71%) (GIEGER,

2011). Na espécie felina, o linfoma representa 47% de todos os tumores intestinais (RISSETTO *et al.*, 2011).

A classificação do linfoma felino é feita com base na forma anatômica (nodal, extranodal, gastrointestinal e mediastinal), grau histológico (baixo, intermediário e alto), características histológicas (tendo como base o tamanho celular: pequenos ou grandes linfócitos) e imunofenotípicas (origem celular B ou T) (MOORE; RODRIGUES-BERTOS; KASS, 2012; PAULIN *et al.*, 2018; WINKEL e LUCAS, 2022). As apresentações anatômicas menos frequentes do linfoma felino correspondem à multicêntrica e extranodal (BARRS e BEATTY, 2012a). O linfoma é a neoplasia maligna mais frequente em gatos domésticos e a localização intestinal, em seus vários graus e tipos, é na atualidade, a forma anatômica mais usual de linfoma nesses animais (MARDELL *et al.*, 2020).

2.2. ETIOLOGIA

A etiologia do linfoma intestinal não está totalmente elucidada e vários fatores de risco são citados, tais como dietéticos, ambientais e genéticos, além das infecções retrovirais e inflamações intestinais crônicas; esses fatores podem apresentar-se isoladamente ou associados (MOORE; RODRIGUES-BERTOS; KASS, 2012).

A infecção pelos retrovírus (vírus da imunodeficiência felina - FIV e vírus da leucemia felina - FeLV) pode ser considerada como fator predisponente ao linfoma (CALAZANS; DALECK; DE NARDI, 2016). Aproximadamente 25% dos gatos infectados pelo FeLV desenvolvem linfoma, sendo a incidência dessa neoplasia 5 a 6 vezes maior em felinos também infectados pelo FIV em relação aos não acometidos (LOUWERENS *et al.*, 2005). Presume-se que tal retrovírus tenha um papel direto na gênese do linfoma, ou indireto, pela desregulação de respostas imunes, enfraquecimento da vigilância celular e sinergismo com outros vírus oncogênicos, como o FeLV (CALAZANS; DALECK; DE NARDI, 2016; LEITE-FILHO *et al.*, 2020). Em contradição, Reche-Júnior *et al.* (2010) demonstraram que dentre os gatos portadores de linfoma intestinal, nenhum estava infectado pelo FeLV e apenas 18.8% dos animais encontravam-se infectados pelo FIV. Um estudo brasileiro indicou que as retrovirose ainda desempenham um papel importante no desenvolvimento de linfoma em felinos no País (LEITE-FILHO *et al.*, 2020). O FeLV é o mais linfomagênico dos retrovírus e considerado como um carcinógeno biológico (PINTO, 2010; AMORIM DA COSTA; SOUZA; DAMICO, 2017). Os gatos infectados pelo FeLV possuem um risco

60 vezes maior ao desenvolvimento do linfoma do que os gatos não infectados (AMORIM DA COSTA; SOUZA; DAMICO, 2017).

Em um estudo nacional, verificou-se a frequência de retrovírus na população de gatos portadores de linfoma, onde 52% eram FeLV positivos, 21.6% FIV positivos e 10.4% dos gatos positivos para ambos retrovírus (LEITE-FILHO *et al.*, 2020). O FIV, e especialmente o FeLV, têm sido associados ao linfoma, principalmente antes da época em que a vacinação para o FeLV era inacessível (LEITE-FILHO *et al.*, 2020). Postula-se que o linfoma intestinal, assim como o renal, são subcategorias de linfoma abdominal que geralmente não estão associados aos retrovírus (LOUWERENS *et al.*, 2005).

Entretanto, até a década de 1980, o grau de associação do FeLV com o desenvolvimento de linfomas foi de aproximadamente 70% (CRISTO *et al.*, 2018). Porém, esta associação diminuiu em muitos países (como Estados Unidos da América, Canadá, Alemanha) devido a adoção de medidas preventivas (vacinação) e práticas de controle populacional (castração), além da conscientização da população para as boas práticas de manejo, como testagem para as retrovirose, segregação dos animais infectados (em colônias/abrigos/gatis), resguardo para os saudáveis, dentre outras medidas (LEITE-FILHO *et al.*, 2020). Tal fato, proporcionou, nos países de primeiro mundo, a redução da taxa de infecção pela retrovirose, variando de 8,82 a 14.5%, nas décadas contemporâneas (CRISTO *et al.*, 2018).

Todavia, o Brasil posiciona-se na contramão dos países mais desenvolvidos, uma vez que na atualidade há uma alta taxa de imunopositividade dos linfomas felinos para o antígeno FeLV (em torno de 57%, especialmente em filhotes e adultos jovens). Esse índice elevado também é verificado em outros países em desenvolvimento, como Malásia e Costa Rica (RISSETO *et al.*, 2011; LEITE-FILHO *et al.*, 2020). Tal situação provavelmente está associada a baixa adesão dos tutores a determinadas medidas, como a profilaxia (testagem, vacinação), programas de quarentena, esterilização cirúrgica e manejo da população dos gatos infectados, em associação a difusão de lares com múltiplos gatos e a permissão de livre acesso ao ambiente externo pelos animais (LEITE-FILHO *et al.*, 2020).

É reconhecido que os linfomas intestinais sejam atualmente a forma mais comum do tumor reconhecida em gatos, mas com baixa associação com o FeLV, pois a suscetibilidade à infecção pode diminuir à medida que a idade aumenta (o linfoma intestinal ocorre principalmente em na faixa etária de 10 a 13 anos) (CRISTO *et al.*,

2018). Todavia, animais senis (acima de 10 anos de idade), podem ser positivos para o FeLV, partindo do pressuposto que o linfoma se desenvolve como consequência de uma infecção regressiva após a interação do DNA viral com oncogenes celulares (RISSETO *et al.*, 2011). O envolvimento do FeLV com o linfoma intestinal não está claramente evidente pois felinos com linfoma intestinal podem apresentar-se negativos para o vírus em ensaio imunoenzimático (ELISA) mas com resultado positivo na reação em cadeia de polimerase (PCR) para a pesquisa do DNA proviral; a inserção do DNA proviral ao código genético da célula do hospedeiro pode desencadear mutagênese e assim correlacionar-se com o desenvolvimento do linfoma (WEISS; KLOPFLEISCH; GRUBER, 2010). Em outras palavras, apesar de alguns felinos conseguirem debelar a infecção pelo FeLV, não estão isentos da transformação maligna nas células linfoides (PINTO, 2010). Logo, pode existir uma expressiva parcela (60 a 80%) de gatos com linfoma intestinal e portadores do FeLV (fase regressiva) uma vez que apresentam resultados negativos nos testes que buscam o antígeno viral mas positivo na PCR para o DNA proviral (WEISS; KLOPFLEISCH; GRUBER, 2010). A infecção pelo FeLV pode, portanto, representar uma das principais causas de linfomas entéricos nos felinos, mesmo após a introdução de vacinação contra o FeLV (WEISS; KLOPFLEISCH; GRUBER, 2010).

Nas regiões geográficas em que a testagem e vacinação contra o FeLV (dentre outras medidas profiláticas) foram alcançáveis para a maior parte da população felina, houve uma diminuição no número de gatos jovens que vieram ao óbito em decorrência do linfoma induzido por FeLV. Por consequência, mais gatos negativos para FeLV estavam vivendo mais tempo para finalmente desenvolver o linfoma intestinal de ocorrência natural (RISSETO *et al.*, 2011).

Embora esteja bem estabelecido que infecções virais persistentes podem causar linfoma em gatos, a relação do FeLV com o linfoma intestinal em felinos ainda permanece controversa, com discordância (entre 0 a 38%) nos testes que buscam a presença do antígeno e positividade para sequências virais em tecidos analisados pela PCR. Porém, é concebível que a infecção latente pelo FeLV conduza ao linfoma intestinal felino (SIMPSON, 2017).

Os herpesvírus são uma das principais causas de cânceres que surgem em pacientes humanos imunodeficientes (BEATTY, 2014). Em cães, há o desenvolvimento espontâneo de malignidades linfoides que compartilham características com algumas doenças associadas ao gama-herpesvirus, como linfoma

de grandes células B. Relata-se que os gama-herpesvírus em animais não primatas podem apresentar potencial oncogênico, mas a relação com o linfoma intestinal em gatos permanece desconhecido (BEATTY, 2014). O *Felis catus gammaherpesvirus 1* (FcaGHV1) foi pesquisado em gatos com linfoma, uma vez que vírus da mesma família são reconhecidamente implicados na ocorrência de câncer em seres humanos, como o vírus Epstein-Barr. O envolvimento do FcaGHV1 não ficou comprovado na ocorrência dos linfomas, mas sua presença correlaciona-se com a diminuição de sobrevida (BEATTY *et al.*, 2014).

A doença crônica do intestino delgado é uma entidade clínica frequente em gatos de meia-idade a mais velhos. As duas etiologias mais comuns correspondem ao linfoma e a enterite crônica, sendo a doença intestinal inflamatória (DII) a principal representante da causa de origem inflamatória. Na doença crônica do intestino delgado dos felinos, reconhece-se que 55% dos casos são decorrente da DII e o restante (45%) corresponde ao linfoma intestinal (NORSWORTHY *et al.*, 2015).

Estima-se que 33% dos gatos doença crônica do intestino delgado possuem DII e linfoma de modo concomitante (NORSWORTHY *et al.*, 2015). A relação da DII crônica com o desenvolvimento em linfoma intestinal está bem documentada para humanos, mas em gatos permanece anedótico (KISELOW *et al.*, 2008; NORSWORTHY *et al.*, 2015). Contudo, muitos casos de linfoma intestinal felino ocorrem frequentemente em locais de inflamação linfocítica crônica; logo, correlações com o histórico de DII e delineamento detalhado dos locais primários para linfoma intestinal devem ser considerados (LOUWERENS *et al.*, 2005).

Além da DII, hipersensibilidades alimentares crônicas também têm sido postuladas como precursoras do linfoma intestinal. Os alimentos para gatos mudaram, nas últimas décadas, em resposta a outras enfermidades, como por exemplo, as doenças do trato urinário (MARSILIO *et al.*, 2019b). Aproximadamente 71% dos gatos com diarreia crônica melhoram quando há introdução de dietas com alto teor de proteína animal (LOUWERENS *et al.*, 2005; KISELOW *et al.*, 2008). Uma dieta inadequada, com alta quantidade de carboidratos, tem sido sugerido como causa de enteropatia inflamatória, mas isso não foi avaliado criticamente e é não está claro se existe uma ligação entre dieta e linfoma alimentar (NORSWORTHY *et al.*, 2015).

O microbioma intestinal desempenha um papel substancial na modulação do sistema imunológico do hospedeiro dentro e além do trato gastrointestinal (MARSILIO *et al.*, 2019b). A microbioma gastrointestinal desempenha um papel vital nas doenças

que afetam o intestino (GARRAWAY *et al.*, 2018). A microbioma contribui com a homeostase intestinal e, portanto, o desequilíbrio está associado ao progresso de doenças (LYU *et al.*, 2020). Estudos em pessoas e cães com enteropatia crônica encontraram alterações na composição do microbioma intestinal que podem prejudicar o estado de saúde do hospedeiro. Essas alterações são comumente chamadas de como disbiose (MARSILIO *et al.*, 2019b).

Os gatos acometidos com enteropatia crônica (DII e/ou linfoma intestinal) apresentam padrões de disbiose semelhantes aos descritos em pessoas com DII (MARSILIO *et al.*, 2019b; LYU *et al.*, 2020). Microrganismos obrigatoriamente anaeróbicos, como representantes do filo Firmicutes (famílias *Ruminococcaceae* e *Turicibacteraceae*), Actinobacteria (gênero *Bifidobacterium*) e Bacteroidetes (espécie *Bacteroides plebeius*) foram depletados em gatos com enteropatia crônica, enquanto os anaeróbios facultativos da família *Enterobacteriaceae* e *Streptococcaceae* foram abundantes (MARSILIO *et al.*, 2019b). Em gatos com linfoma intestinal de pequenas células, há um aumento da população de *Fusobacterium spp* (GARRAWAY *et al.*, 2018). Estudos recentes demonstraram alterações no microbioma intestinal devido a modificações dietéticas em gatos, onde a maioria observou a disbiose em dieta a base de peixe (LYU *et al.*, 2020).

Ao tentar estabelecer a relação de algumas bactérias com o desenvolvimento de neoplasias intestinais, em condições de disbiose, verificou-se que a *Escherichia coli* produz toxinas bacterianas específicas (genotoxinas) que acarretam em lesão no DNA celular; bactérias do gênero *Fusobacterium* interferem na imunovigilância local ao inativar as células *Natural Killer (NK)*; o *Propionobacterium acnes* ao induzir a ativação da cicloxigenase-2 (COX-2) favorece ao aumento da proliferação celular, inibição da apoptose, aumento da angiogênese e da inflamação local; dietas ricas em gorduras em associação a um microbioma enriquecido em espécies de *Clostridium* modificadoras de ácidos biliares, também podem resultar em progressão neoplásica (GOODMAN e GARDNER, 2018).

Mudanças no microbioma entérico acarreta em anormalidades na arquitetura da mucosa (principalmente atrofia e fusão das vilosidades intestinais), na regulação positiva de citocinas pró-inflamatórias e acentuam a gravidade clínica da neoplasia (SIMPSON *et al.*, 2017). Especula-se a associação com bactérias invasoras da mucosa, colonizadoras da superfície serosa, além de infiltração vascular. No entanto ainda não está claro se bactérias podem desencadear o linfoma intestinal ou são

oportunistas na colonização da mucosa intestinal danificada pelo desenvolvimento da neoplasia (PAULIN *et al.*, 2018).

A exposição ambiental a fumaça do tabaco foi associada a um aumento de 2.4 a 3.2 vezes do risco de desenvolvimento de linfomas em gatos com exposição crônica há mais de 5 anos (BERTONE; SNYDER; MOORE, 2002). Devido a autolimpeza (*grooming*) frequente e extensa, típica da espécie felina, a exposição também ocorre pela ingestão de partículas de fumaça do tabaco, que se depositam na pele e na pelagem (SMITH *et al.*, 2020). Assim, pode existir uma associação entre a ingestão da nicotina (biomarcador da fumaça do tabaco) concentrada nos pelos com o desenvolvimento do linfoma intestinal em gatos; no entanto, mais estudos são necessários (SMITH *et al.*, 2020). Contudo, desde a introdução e aumento da popularidade dos cigarros eletrônicos (*vape, e-cigarette*), a exposição à nicotina pode já não ser bem representada, mediante aos múltiplos carcinógenos expelidos na fumaça do cigarro tradicional (MARDELL, 2020). O surgimento de linfoma alimentar de baixo grau nos Estados Unidos da América, Grã-Bretanha e Austrália ecoa com o aparecimento do hipertireoidismo felino e levanta a possibilidade de uma etiologia ambiental subjacente (SIMPSON, 2017).

Alterações genéticas também podem estar envolvidas, como em animais da raça Siamês, podendo-se estender para padrões raciais correlatos (Sagrado da Birmânia, Himalaio) ou até os mestiços, mas Sem Raça Definida, como os clássicos gatos melânicos e de cauda curta, curvada e em forma de “L”, ou ainda para aqueles com aparência fenotípica similar ao genuíno Siamês. Contudo, diferentemente da espécie canina (na qual o componente genético para o desenvolvimento do linfoma é bem correlacionado com determinadas raças), o mesmo não ocorre de modo robusto para os felinos (SIMPSON *et al.*, 2017). Assim, é aventado que a predisposição racial não seja preponderante devido a uma grande variedade de raças acometidas na rotina clínica e de animais provenientes de diversos cruzamentos, sem definição racial (PINTO, 2010). Modificações na expressão de oncogene supressor, mudanças epigenéticas, transdução de sinal e alterações no percurso da morte celular são observadas comumente em linfomas humanos e provavelmente também estão envolvidas na gênese da neoplasia em gatos (VAIL e PINKERTON, 2020).

2.3. EPIDEMIOLOGIA

O intestino é classificado como um sítio tumoral primário para a maioria dos linfomas abdominais (LOUWERENS *et al.*, 2005). O termo “linfoma alimentar” é mais generalista pois pode envolver não apenas os intestinos mas também a cavidade oral (particularmente em mucosa gengival e tonsilas), glândulas salivares, esôfago, estômago, linfonodos adjacentes, fígado, pâncreas e por ventura outros órgãos correlatos com trato digestório (PINTO, 2010; ETTINGER e LITTLE, 2020). Embora o termo “linfoma intestinal” seja mais específico, o termo “linfoma alimentar” ainda é usado pois os gatos acometidos, em sua maioria, apresentaram evidência de infiltração difusa de linfócitos neoplásicos em mais de uma região anatômica do trato gastrointestinal (FREICHE; FAUCHER; GERMAN, 2016; MARSILIO *et al.*, 2019b).

Em contraste com os cães, em que tumores colorretais são mais comuns, a neoplasia intestinal felina é relatada usualmente no intestino delgado (MOORE e OGILVIE, 2001), com frequência variando de 61 a 97%, dentre todos os tumores intestinais da espécie (COUTO, 2010; RISSETTO *et al.*, 2011; VAIL e PINKERTON, 2020). Na realidade, o intestino delgado é 4 vezes mais provável de ser afetado do que o intestino grosso, no que diz respeito ao linfoma entérico felino (ETTINGER e LITTLE, 2020). A incidência do linfoma intestinal felino aumentou nos últimos 10 anos e é atualmente a neoplasia mais frequente do trato digestório dos gatos, com uma frequência entre 60 a 75%. Os locais mais comuns para o surgimento do linfoma são: jejuno (86 a 100%), íleo e junção ileocecólica (93%) e duodeno (83%) (PAULIN *et al.*, 2018).

Em geral, não há predisposição por gênero para o linfoma intestinal felino (POHLMAN *et al.*, 2009; RISSETTO *et al.*, 2011; VAIL e PINKERTON, 2020). Geralmente ocorre em gatos idosos com 12 a 13 anos de idade (COUTO, 2010). Os gatos siameses e de raças orientais parecem apresentar um maior risco para o desenvolvimento do linfoma (CALAZANS; DALECK; DE NARDI, 2016; RISSETTO *et al.*, 2011). O Siamês é a raça mais comumente acometida, com risco aumentado (em 3.7 vezes) após os 7 anos de idade. Os gatos domésticos de pelo curto também parecem ter uma maior propensão (50%) para a enfermidade, embora representem a maior parte da população felina na maioria dos estudos (POHLMAN *et al.*, 2009; RISSETTO *et al.*, 2011; LEITE-FILHO *et al.*, 2020). Por vezes, é difícil associar a predisposição de determinadas raças em razão da grande quantidade de animais

mestiços, ampla falta de registro, pesquisas isoladas e com baixa casuística (MOORE; RODRIGUES-BERTOS; KASS, 2012; WINKEL e LUCAS, 2022).

Os animais inteiros (principalmente os machos) parecem ter um risco reduzido em comparação com os castrados, mas isso pode ser explicado pela diferença de idade entre esses pacientes, pois os mais velhos provavelmente já estão castrados, enquanto os jovens são mais propensos a estarem ainda inteiros (RISSETO *et al.*, 2011). Em gatos jovens, com menos de 7 anos de idade, o risco de linfoma intestinal parece ser menor. A partir dos 7 anos de idade, há um aumento gradual da incidência de tal neoplasia (LEITE-FILHO *et al.*, 2020).

2.4. CARACTERIZAÇÃO PATOLÓGICA

Histologicamente, o linfoma intestinal na espécie felina, é dividido classicamente em: linfoma de baixo grau (linfoma linfocítico, linfoma bem diferenciado ou linfoma de pequenas células) e linfoma de alto grau (linfoma linfoblástico, linfoma pouco diferenciado, linfoma imunoblástico ou linfoma de grandes células) (AL-GHAZLAT; REZENDE; FERRERI, 2013). Existe ainda a apresentação de grau intermediário. Menos frequentemente, observa-se o linfoma de grandes células granulares (RECHE-JÚNIOR *et al.*, 2010). O linfoma de pequenas células é facilmente reconhecido devido à sua morfologia celular; é lentamente progressivo e caracteriza-se pela infiltração de linfócitos pequenos, bem diferenciados, apesar de neoplásicos e malignos (ETTINGER e LITTLE, 2020). O linfoma de pequenas células é 3 vezes mais comum em relação ao linfoma linfoblástico (AL-GHAZLAT; REZENDE; FERRERI, 2013).

O linfoma linfocítico geralmente possui um baixo grau de malignidade (WILSON, 2008; GIEGER, 2011; MOORE; RODRIGUES-BERTOS; KASS, 2012; ETTINGER e LITTLE, 2020). Já o linfoma linfoblástico revela um maior potencial de malignidade (GIEGER, 2011; BARRS e BEATTY, 2012a). O linfoma do tipo linfocítico, caracteriza-se por infiltração difusa de pequenos linfócitos neoplásicos nas vilosidades intestinais, confinado ao epitélio e à lâmina própria, com extensão mínima para a submucosa (MOORE; RODRIGUES-BERTOS; KASS, 2012), diferentemente da forma linfoblástica, que geralmente é transmural, onde o infiltrado de grandes linfócitos neoplásicos se estende acentuadamente nas túnicas submucosa e muscular (LOUWERENS *et al.*, 2005; MOORE; RODRIGUES-BERTOS; KASS, 2012). Em lesões transmurais avançadas há coalescência do infiltrado linfocitário, obliterando a túnica muscular e progressão para a camada serosa e mesentério adjacente. Essas

alterações histológicas podem explicar a apresentação clínica de formação de massa, obstrução intestinal e até perfuração com peritonite (MOORE; RODRIGUES-BERTOS; KASS, 2012).

Estudos mostram divergências em relação às frequências de linfomas de alto ou baixo grau. Alguns descrevem a presença majoritária (90%) dos graus intermediário ou alto, diferentemente de outros que demonstraram maior frequência (75 a 80%) para linfoma de baixo grau. A variabilidade observada na prevalência dos graus histológicos pode ser devido a diferenças na distribuição geográfica, método de coleta da biopsia e sistema de classificação usado pelo patologistas (FREICHE; FAUCHER; GERMAN, 2016; MARSILIO *et al.*, 2019a).

A utilização de marcadores imunoistoquímicos também pode ser usada para a classificação desta neoplasia hematopoiética felina. Cita-se que dentre os linfomas do trato gastrointestinal dos felinos, há uma predominância dos linfomas de células T, podendo alcançar um percentual aproximado de 72% (LEITE-FILHO *et al.*, 2020). Este tipo demonstra uma enorme variabilidade morfológica ao longo do trato gastrointestinal (VEZZALI, *et al.*, 2009). Os linfomas primários, do intestino delgado, de célula T são muito mais comuns em gatos do que o linfoma intestinal de pequenas células B. Cerca de 52% dos linfomas do intestino delgado são de linhagem de células T, 38% da linhagem de células B, e 8% não marcados para células B ou T (fenótipo de células *NK*). Para os tumores que infiltraram múltiplos sítios intestinais, a porcentagem de linfomas de células T aumenta para 60% (KIUPEL *et al.*, 2011). Os linfomas de células B frequentemente (47%) ocorrem simultaneamente, em vários locais, principalmente na metade posterior do jejuno e íleo. Já aqueles de células T são quase exclusivamente localizados no jejuno (MOORE; RODRIGUES-BERTOS; KASS, 2012). Linfomas associados ao FeLV tendem a ser da linhagem de células T, enquanto os linfomas associados ao FIV são mais prováveis de serem da linhagem de células B (LOUWERENS *et al.*, 2005).

O linfoma linfocítico geralmente envolve células T enquanto o linfoblástico e o de grau intermediário pode envolver células B ou T (RECHE-JÚNIOR *et al.*, 2010; SIMPSON, 2017; MARDEEL, 2020). O linfoma linfocítico apresenta imunofenótipo para origem em células T em 89% dos casos e apenas 8% para origem em células B (KISELOW *et al.*, 2008; MARSILIO *et al.*, 2019a). Até o presente momento não se tem dados suficientes para associar o fenótipo da neoplasia com o respectivo significado clínico (KISELOW *et al.*, 2008; MARDEEL, 2020).

Os sistemas de classificações histológicas mais utilizados para o linfoma intestinal felino são propostos pelo *National Cancer Institut Working Formulation (NCIWF)* e pelo *Revised European-American Lymphoma/World Health Organization (REAL/WHO)* (BARRIGA, 2013). O *NCIWF* classifica o linfoma conforme a sua progressão, em três graus histológicos: baixo, intermediário ou alto (BARRS e BEATTY, 2012a). O sistema *REAL/WHO* utiliza tanto os aspectos morfológicos quanto imunoistoquímicos, classificando o linfoma em subtipos ou doenças específicas (BARRIGA, 2013). O uso da classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) forneça informações mais detalhadas sobre a doença e cientificamente valiosas (WOLFESBERGER *et al.*, 2017).

2.5. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A sintomatologia mais comum é a perda de peso devido à má assimilação (63 a 100%), seguida de vômito/diarreia (70 a 88%), hiporexia (75%), anorexia (42 a 66%), constipação (10%), flatulência (5%) e icterícia (7%) (FREICHE; FAUCHER; GERMAN, 2016). Alterações a palpação abdominal é comum (3/4 dos pacientes), principalmente por espessamento intestinal (35%) e massa abdominal (23%), sendo esse último achado devido principalmente a linfonodomegalia mesentérica (29%) (LINGARD *et al.*, 2009). A neoplasia pode ser localizada ou difusa, infiltrando as camadas intestinais, causando ou não obstrução luminal. A apresentação pode manifestar-se exclusivamente por comprometimento intestinal ou pela combinação com linfonodos mesentéricos (MOORE; RODRIGUES-BERTOS; KASS, 2012; WINKEL e LUCAS, 2022). A sintomatologia pode ser pouco específica, onde a anorexia e perda de peso podem ser as únicas manifestações clínicas relatadas e a história geralmente é prolongada (KISELOW *et al.*, 2008; AMORIM DA COSTA; SOUZA; DAMICO, 2017; ETTINGER e LITTLE, 2020; WINKEL e LUCAS, 2022).

A duração das manifestações clínicas antes da confirmação diagnóstica, em geral, tem duração de no mínimo 4 semanas, mas pode cursar ao longo de vários meses, com uma mediana de 6 meses (ETTINGER e LITTLE, 2020). Em 65% dos casos, há relato de cronicidade (LINGARD *et al.*, 2009). A média de peso inicial, no momento do diagnóstico, é de 4.4 Kg (KISELOW *et al.*, 2008). Pode-se também ter a ideia de cronicidade quando os vômitos ocorrem 3 vezes ao mês por pelo menos 3 meses consecutivos, diarreia persistente acima de 3 semanas de duração e perda de

peso, com redução de 0.5 Kg ou mais nos últimos 6 meses. (NORSWORTHY *et al.*, 2015).

Os gatos geralmente têm um escore de condição corporal (ECC) abaixo do ideal (26%), letargia (47%), desidratação (70%), hipertermia (21%) e uma aparência geral mal cuidada (18%) (SILVA *et al.*, 2018); relata-se ainda poliúria e polidipsia, quando há doença renal crônica concomitante, e alotriofagia (MOORE e OGILVIE, 2001). A letargia, perda de peso, inapetência, diarreia e vômito, podem ser potencializados pela deficiência de cobalamina (TORESSON *et al.*, 2017). Por vezes, o vômito crônico é considerado normal pelos donos dos gatos e, às vezes, pelos próprios médicos veterinários (consideram como um hábito comum de tentativa de eliminar bolas de pelo) (FREICHE; FAUCHER; GERMAN, 2016; ETTINGER e LITTLE, 2020). Deve-se alertar para a anorexia conjuntamente com a caquexia, pois podem acarretar a “síndrome anorexia-caquexia associada ao câncer”, a qual corresponde a uma síndrome paraneoplásica de alta prevalência (até 80%) na oncologia humana e, na medicina veterinária, 27% dos pacientes felinos oncológicos são acometidos (MANGIERI, 2016). Relata-se ainda o aparecimento de doenças cutâneas autoimunes (como o pênfigo foliáceo) associado ao linfoma intestinal, também por mecanismos paraneoplásicos (RECHE-JÚNIOR *et al.*, 2012).

O linfoma linfocítico é uma doença lenta e progressiva (KISELOW *et al.*, 2008). A duração média da sintomatologia antes de diagnóstico é de 6 meses (LINGARD *et al.*, 2009). O linfoma de pequenas células e DII podem coexistir, ou seja, com ocorrência concomitante (AL-GHAZLAT; REZENDE; FERRERI, 2013). No linfoma linfoblástico, as manifestações clínicas são de caráter agudo, com evolução variando de dias a semanas (LINGARD *et al.*, 2009). Dor abdominal aguda, peritonite séptica e choque podem estar presentes se tiver ocorrido perfuração intestinal secundária a neoformação (AMORIM DA COSTA; SOUZA; DAMICO, 2017; SIMPSOM, 2017). Embora o linfoma de alto grau, consagradamente, manifeste-se com a apresentação de uma neoformação intra-abdominal palpável, não é regra pois o linfoma de baixo grau pode ser associado também com neoformação abdominal (LINGARD *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, o diagnóstico do linfoma intestinal, parece estar aumentando na população felina. Isso pode muito bem ser reflexo da melhora no atendimento veterinário e capacidade de diagnóstico hábil. O aumento de casos de linfoma intestinal pode refletir em um estadiamento diagnóstico definitivo mais precoce, com

exclusão prematura do principal diagnóstico diferencial, a DII (RISSETO *et al.*, 2011; CRISTO *et al.*, 2018; LEITE-FILHO *et al.*, 2020). Conhecer a raça, idade, tipo e distribuição anatômica para os casos de tumores intestinais felinos poderia ajudar os veterinários a fazer mais decisões informadas ao recomendar testes diagnósticos e considerar diagnósticos diferenciais em pacientes com manifestações clínicas gastrointestinais inespecíficos (MARDELL, 2020).

2.6. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL E EXAMES COMPLEMENTARES

2.6.1. HEMATOLOGIA, BIOQUÍMICA SÉRICA E OUTROS EXAMES DE ROTINA

A anemia e neutrofilia são os achados hematológicos mais frequentes. A anemia pode ter relação com alterações do metabolismo do ferro, distúrbios hemolíticos, infiltrado medular por linfócitos neoplásicos, hiperesplenismo e estresse oxidativo eritrocitário; pode também ser decorrente de hemorragias entéricas secundárias a neoplasia ou presença de doenças concomitantes (PINTO, 2010; FREICHE; FAUCHER; GERMAN, 2016; SILVA *et al.*, 2018; ETTINGER e LITTLE, 2020). Cerca de 76% dos casos apresentam anemia (FREICHE; FAUCHER; GERMAN, 2016). A leucocitose pode ser por neutrofilia (secundária a inflamação ou estresse), linfocitose, linfopenia e ainda, eosinofilia paraneoplásica (BARRS *et al.*, 2002).

Na avaliação bioquímica, a principal anormalidade equivale ao aumento moderado da enzima alaninaaminotransferase (14% dos casos), podendo ser justificada por disseminação neoplásica para o parênquima hepático ou doenças concomitantes, como colangite neutrofílica e hipertireoidismo (ETTINGER e LITTLE, 2020). Outras enfermidades que podem cursar em conjunto ao linfoma intestinal, como a doença renal crônica e a DII, potencializam não só as manifestações clínicas como também as alterações laboratoriais (FREICHE; FAUCHER; GERMAN, 2016). A hipoalbuminemia foi relatada em 50 a 75% dos gatos e acredita-se que ocorra principalmente devido a perda da integridade da mucosa e/ou como resposta inflamatória de fase aguda (FREICHE; FAUCHER; GERMAN, 2016; WINKEL e LUCAS, 2022). A hipoalbuminemia está mais frequentemente associada aos linfomas de células B ou de grandes células (WINKEL e LUCAS, 2022). Quando houver

hiperglobulinemia acima de 9 g/dL, é importante verificar a taxa de aumento por meio de proteinograma plasmático eletroforético, onde geralmente há gamopatia monoclonal, em região beta ou gama do traçado eletroforético (MANGIERI, 2016; LUCAS; RODRIGUES; JARK, 2022).

Níveis séricos de cobalamina (vitamina B12) e folato (vitamina B9) também devem ser avaliados (FREICHE; FAUCHER; GERMAN, 2016; SILVA *et al.*, 2018; ETTINGER e LITTLE, 2020). Observa-se baixa concentração de cobalamina (78%), por má absorção e espoliação intestinal; alta concentração sérica de folato (37%), por disbiose no intestino delgado ou diminuição no uso de folato devido a deficiência simultânea de cobalamina (KISELOW *et al.*, 2008). Também podem ocorrer hipercalcemia e hipovitaminose D (AMORIM DA COSTA; SOUZA; DAMICO, 2017). Em gatos, embora o tipo predominante de hipercalcemia seja a de origem não neoplásica, a hipercalcemia paraneoplásica (“hipercalcemia maligna”) pode ser relatada, sendo resultado da produção pelas células neoplásicas do peptídeo análogo ao paratormônio (PTH-rP). De modo similar ao paratormônio genuíno, o PTH-rP estimula os osteoclastos a promover a reabsorção do cálcio ósseo e aumentar a reabsorção renal de cálcio (DAMICO e SILVA, 2017; LUCAS; RODRIGUES; JARK, 2022). A hipovitaminose D pode ser justificada pela diminuição da ingestão oral, redução na absorção intestinal e aumento da perda pelo trato gastrointestinal; também pode correlacionar-se com a espoliação da albumina, pela via entérica, uma vez que a proteína de transporte dos metabólitos da vitamina D é estruturalmente semelhante à albumina (LALOR *et al.*, 2014). Em gatos com linfoma intestinal e com baixas concentrações séricas da vitamina D, também propõem-se haver uma hipovitaminose K (LALOR *et al.*, 2014).

Biomarcadores séricos tem sido usado em alguns casos de linfoma intestinal de baixo grau em felinos. Esses correspondem a albumina (biomarcador de perda proteica entérica, com decréscimo em 49% dos casos), cobalamina (biomarcador de absorção, com decréscimo em 50 a 80% dos casos), folato (biomarcador de disbiose, com acréscimo em 37% dos casos e de absorção, com decréscimo em 31% dos casos), lactato desidrogenase (biomarcador de necrose celular, com acréscimo em 47% dos casos) (PAULIN *et al.*, 2018).

A proteinúria pode ser detectada em uma frequência de 27% (LINGARD *et al.*, 2009), onde tal achado pode ser caracterizado por “proteinúria de Bence-Jones”, quando alguns animais tem gamopatia monoclonal (LUCAS; RODRIGUES; JARK,

2022). A citologia da medula óssea é recomendada nos pacientes com anemia, leucopenia ou atipia celular na corrente sanguínea. Torna-se ainda importante implementar testes para as retrovíroses felinas (LINGARD *et al.*, 2009; MARSILIO *et al.*, 2019b). No que se refere a triagem para os retrovírus, com uso da técnica ELISA, a taxa de infecção é baixa, sendo apenas de 20% para o FIV e negatividade para o FeLV na maioria (ou até na totalidade) dos animais. O método de análise pode limitar a real relação entre o linfoma intestinal e o FeLV e então estabelecer, talvez de forma equivocada, que não há associação entre tal neoplasia com a infecção retroviral (LINGARD *et al.*, 2009; NORSWORTHY *et al.*, 2015; FREICHE; FAUCHER; GERMAN, 2016).

Outros exames são necessários para excluir diagnósticos diferenciais, como a dosagem hormonal de T4 total (tiroxina) para o hipertireoidismo, exame coproparasitológico para exclusão de agentes infecciosos, como *Giardia* spp, *Criptosporidium* spp, *Isospora* spp, *Clostridium* spp, *Campilobacter* spp, *Tritrichomonas foetus* (atualmente também denominado como *T. suis*) e *T. blagburni*; ainda é importante eliminar a possibilidade de intolerância alimentar (KRICK *et al.*, 2008; LINGARD *et al.*, 2009; FREICHE; FAUCHER; GERMAN, 2016).

2.6.2. ULTRASSONOGRAFIA ABDOMINAL

Alguns animais portadores de linfoma intestinal não demonstram alterações radiográficas abdominais; por essa razão, a ultrassonografia deve ser preferida ao exame radiológico (AMORIM DA COSTA; SOUZA; DAMICO, 2017). No geral, 60 a 90% dos gatos com linfoma intestinal possuem anormalidades ultrassonográficas (ETTINGER e LITTLE, 2020) e especificamente gatos com linfoma linfocítico, apresentam alteração em mais de 90% dos casos (NOGUEIRA e MELO, 2020). Contudo, os achados podem ser normais, particularmente no linfoma de pequenas células (RICHTER, 2003). Assim a ausência de alterações ao ultrassom não exclui a possibilidade de ocorrência do linfoma intestinal (FREICHE; FAUCHER; GERMAN, 2016; PAULIN *et al.*, 2018).

Usualmente, nos casos de linfoma linfocítico, o achado mais comum, em 81% das situações, é o espessamento de alças intestinais (NOGUEIRA e MELO, 2020). Além do espessamento mural difuso (50 a 70%) ou mural focal do intestino delgado e perda de estratificação normal (31%), há frequentemente linfonodomegalia mesentérica (70 a 80%) (LINGARD *et al.*, 2009; NORSWORTHY *et al.*, 2015;

FREICHE; FAUCHER; GERMAN, 2016; ETTINGER e LITTLE, 2020). Massas abdominais são observadas (20 a 30%), seja devido a linfonodomegalia mesentérica ou neoplasia intestinal focal (SILVA *et al.*, 2018).

Apesar de lesões inflamatórias e neoplásicas (de pequenos linfócitos) apresentarem similaridade, o conhecimento dos recursos oferecidos pelos equipamentos pode auxiliar no direcionamento de cada doença (KRICK *et al.*, 2008). Com significância estatística, gatos diagnosticados com linfoma de pequenos linfócitos apresentaram média no valor da espessura da parede do duodeno/jejuno de 0,564 cm, enquanto em pacientes com DII o valor médio equivale a 0,462 cm (SILVA *et al.*, 2018). Os achados de linfonodomegalia e espessamento da camada muscular ocorre em 50% dos casos de linfoma linfocítico e em apenas 4% dos casos de DII, sendo esse um parâmetro adicional que pode indicar na diferenciação entre os dois processos (GUTTIN *et al.*, 2019). Entre 50 a 80% dos casos de linfoma intestinal de pequenas células, o espessamento da camada muscular no intestino delgado é o dobro da espessura da camada muscular de um gato hígido. Outro achado bastante característico é a proporção entre a largura da camada muscular e submucosa, indicando possível anormalidade neoplásica quando $\geq 0,5$ (ZWINGENBERGER *et al.*, 2010). O espessamento da lâmina própria e da camada muscular ocorre em 98% dos casos de linfomas oriundos de células T (ZWINGENBERGER *et al.*, 2010). Todavia nenhum dos parâmetros acima citados devem ser considerados como patognomônicos para o linfoma intestinal (ZWINGENBERGER *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2018; GUTTIN *et al.*, 2019).

Quando há o somatório dos achados de espessamento intestinal transmural, perda da estratificação normal da parede, hipomotilidade intestinal com neoformação, além do comprometimento de linfonodos mesentéricos, fígado e baço, deve-se alertar para a presença do linfoma de grandes linfócitos ou linfoblástico (GIEGER, 2011). Um estudo revelou que 100% das imagens ultrassonográficas de formação na parede do intestino correlacionaram-se, com o auxílio de exames citológicos ou histopatológicos, com o diagnóstico de linfoma linfoblástico (RECHE-JÚNIOR *et al.*, 2010).

Apesar da utilidade na evidenciação de alterações do trato gastrointestinal, localização de neoformações e avaliação de linfonodos abdominais, a ultrassonografia ainda não oferece informações patognomônicas para a diferenciação diagnóstica entre linfoma intestinal e DII (FERREIRA, 2017). O diagnóstico definitivo de linfoma

intestinal nunca pode ser realizado com base em imagens ultrassonográficas anormais, onde no mínimo, a análise histológica é necessária para um diagnóstico final (PAULIN *et al.*, 2018). Entretanto, gatos mais velhos com evidência ultrassonográfica de espessamento da túnica muscular intestinal são 18 vezes mais propensos a terem linfoma em detrimento da DII (ZWINGENBERGER *et al.*, 2010; GIEGER, 2011). Na suspeição de neoplasias intestinais, o exame ultrassonográfico demonstra uma sensibilidade entre 50 a 80% e especificidade de 57 a 100% (FREICHE; FAUCHER; GERMAN, 2016). Assim, tal exame de imagem pode servir de biomarcador e preditor para doenças infiltrativas transmuralis, como o linfoma intestinal (ZWINGENBERGER *et al.*, 2010).

A ultrassonografia ainda é útil na orientação precisa para aspiração guiada por agulha fina ou obtenção de biópsias (destinadas para o exame citológico e histopatológico, respectivamente); também pode ser usada para avaliar a resposta à terapia de forma não invasiva. Todavia a capacidade em explorar os recursos oferecidos pelo exame ultrassonográfico depende da experiência do operador e da tecnologia do aparelho (RICHTER, 2003).

2.6.3. ENDOSCOPIA *VERSUS* LAPAROTOMIA

Em relação a coleta de material para biopsia (destinada ao exame histopatológico), o debate continua em relação à endoscopia *versus* laparotomia (AL-GHAZLAT; REZENDE; FERRERI, 2013). Muitos proprietários optam pela endoscopia por motivos relacionados à menor invasibilidade e ao estado crítico de alguns pacientes (ETTINGER e LITTLE, 2020). Apesar da endoscopia ser um procedimento menos invasivo, as amostras obtidas podem não alcançar todas as túnicas do intestino (FREICHE; FAUCHER; GERMAN, 2016). Já a laparotomia, apesar de mais invasiva, permite obter fragmentos intestinais em sua espessura total (transmural, ou seja, todas as camadas intestinais presentes na amostra), colher material de linfonodos mesentéricos alterados, proporciona maior inspeção da cavidade abdominal, em busca de alterações macroscópicas em outros órgãos, sujeitos a biopsia (FREICHE; FAUCHER; GERMAN, 2016). A duração média da hospitalização após a celiotomia é breve (até 2 dias) e, quando ocorrem complicações, são leves e transitórias (AL-GHAZLAT; REZENDE; FERRERI, 2013). Logo a coleta de material via laparotomia é o método de eleição e recomendado por vários autores (AL-

GHAZLAT; REZENDE; FERRERI, 2013; FREICHE; FAUCHER; GERMAN, 2016; ETTINGER e LITTLE, 2020).

Biópsia endoscópica além da porção anterior do jejuno, normalmente não é possível devido às limitações do equipamento. A endoscopia pode não demonstrar sucesso devido à dificuldade na localização das alterações intestinais mais distais (BOTTERO *et al.*, 2019). Contudo, a biópsia por endoscopia associada ao exame de ultrassonográfico prévio vem obtendo destaque e pode ser uma boa opção para a obtenção adequada de amostras teciduais (RYCHLIK e KACZMAR, 2020). A ultrassonografia pode facilitar a seleção da local a ser biopsiado; além disso, pode prever a ocorrência de lesões histológicas de acordo com a camada intestinal alterada (ZWINGENBERGER *et al.*, 2010).

Gatos com alterações na imagem do ultrassom, normalmente são susceptíveis de exibirem lesões histológicas (WASHABAU *et al.*, 2010). Alterações ultrassonográficas na mucosa intestinal são altamente preditivos para anormalidades histológicas, diferentemente da submucosa e muscular (ou seja, alterações de imagem nessas duas últimas não são preditivas de infiltração microscópica histológica) (RYCHLIK e KACZMAR, 2020). Logo sugere-se que a biópsia de espessura total (via celiotomia) pode não ser essencial em todos os casos e assim a endoscopia, ao obter biópsia da mucosa, ser preferida pois além de conferir uma amostra confiável para o exame histopatológico, minimiza os riscos para o paciente já que é um método mais rápido, conferindo menor estresse e invasibilidade para os gatos, que usualmente estão com morbidade considerável (ECC abaixo do ideal, hipoalbuminêmicos, anoréxicos); biópsias endoscópicas não requerem hospitalização e não é observada convalescência dos pacientes (WASHABAU *et al.*, 2010; RYCHLIK e KACZMAR, 2020).

A endoscopia ainda permite ao operador ver alterações em mucosa que não podem ser visualizadas pela abordagem cirúrgica e também a coleta de múltiplas biópsias, uma vez que o linfoma pode ser multifocal no intestino (WASHABAU *et al.*, 2010). Contudo, deve-se ter acesso aos exames de imunoistoquímica e clonalidade para poder obter informações precisas de espécimes de biópsia endoscópica. Sem a disponibilidade desses testes, a diferenciação histológica entre linfoma e DII pode ser desafiadora mediante a amostra restrita a mucosa e sem as camadas mais profundas (SABBATTINI *et al.*, 2016). Embora a análise de clonalidade aumente consistentemente a possibilidade de diagnóstico de linfoma de pequenas células em biópsias

endoscópicas, caso a suspeita histológica de linfoma alimentar não seja confirmada pela clonalidade, nunca deve ser descartada, pois pode representar uma forma inicial de linfoma e progredir posteriormente para a neoplasia em sua plenitude (SABATTINI *et al.*, 2016).

Os locais mais comuns do linfoma intestinal em gatos são jejuno e íleo. Como o endoscópio alcança até a porção anterior do jejuno, amostras oriundas do jejuno além do segmento anterior e do íleo, devem ser obtidas por laparotomia ou laparoscopia para um diagnóstico preciso (GUTTIN *et al.*, 2019). Relata-se uma eficiência de apenas 36% para a duodenoscopia (MOORE e OGILVIE, 2001). A laparotomia permite a coleta adequada de material do intestino em vários pontos (BOTTERO *et al.*, 2019) enquanto a laparoscopia pode ser uma alternativa minimamente invasiva à laparotomia e obtendo espécimes de biópsia diagnóstica (EVANS *et al.*, 2006; GUTTIN *et al.*, 2019). Recomenda-se que toda DII crônica, resistente ao tratamento, seja investigada por biopsia intestinal em todas as suas camadas, o que não só pode ser obtida por endoscopia (MOORE E OGILVIE, 2001; AMORIM DA COSTA; SOUZA; DAMICO, 2017). A técnica de biópsia intestinal por videolaparoscopia, além de fornecer espécimes de biópsia diagnóstica também diminui a dor pós-operatória em comparação com a técnica de cirurgia aberta (via laparotomia) mas sem diferença em relação a duração da cirurgia, complicações ou tempo de internação (McCLARAN *et al.*, 2017).

Vale destacar que o vômito crônico pode ser aceito como normal por alguns proprietários; tal situação retarda o encaminhamento do felino até a assistência médica e quando é proposta a confirmação da causa, os tutores podem ser relutantes em conceder permissão para a realização das técnicas disponíveis para definir a etiologia específica e o diagnóstico definitivo (NORSWORTHY *et al.*, 2015). A decisão de recomendar a técnica de biópsia intestinal é multifacetada, com base no nível de invasividade, fatores individuais do paciente, qualidade diagnóstica e expectativa dos tutores (WASHABAU *et al.*, 2010).

2.6.4. CITOLOGIA E HISTOPATOLOGIA

A citologia raramente é útil para distinguir o linfoma de baixo grau de DII (LINGARD *et al.*, 2009). Ao contrário do linfoma de alto grau, a citologia pode ser inconclusiva ou falso-negativa pois pode concluir em um processo hiperplásico ou reativo (FREICHE; FAUCHER; GERMAN, 2016; ETTINGER e LITTLE, 2020). Nos

casos de linfoma linfocítico, pelas características dos linfócitos pequenos, o diagnóstico microscópico pode ser mais difícil. No caso de punção aspirativa dos linfonodos mesentéricos, a citologia exibe um valor de 50% de falsos negativos. Para os linfomas de grandes células, há maior probabilidade de acertos ao exame citológico (BARRS e BEATTY, 2012a). Em um pouco acima da metade dos gatos com linfoma linfocítico, a análise citológica dos linfonodos mesentéricos aumentados sugere hiperplasia linfoide benigna (amostras obtidas por punção aspirativa com agulha fina, guiada por ultrassom); logo, para os casos de linfoma de baixo grau com envolvimento de linfonodo mesentérico, a citologia do gânglio linfático pode ter resultado falso negativo (FREICHE; FAUCHER; GERMAN, 2016). Deve-se salientar que o exame citológico restringe na determinação da morfologia e tamanho dos linfócitos, não avaliando os critérios demonstrados pela histopatologia (GRANDI e BARRA, 2019). A negatividade para linfoma no exame citológico não exclui a possibilidade do diagnóstico. Na verdade, há alto grau de discordância entre o exame citopatológico e resultados da análise histopatológica (SIMPSON, 2017).

Para confirmar o diagnóstico de linfoma intestinal (especialmente os de baixo grau), a histopatologia é normalmente necessária. Assim, a avaliação da arquitetura histológica é necessária para distinguir entre hiperplasia e neoplasia, o que corrobora com a necessidade de amostra representativa para histopatologia (LINGARD *et al.*, 2009; NORSWORTHY *et al.*, 2015). Deve-se atentar que os tecidos linfoides associados à mucosa (MALT) são compostos principalmente por linfócitos T, e tanto na DII quanto no linfoma de pequenas células, a população de células T se expande para além do MALT (AL-GHAZLAT; REZENDE; FERRERI, 2013). No entanto, ao contrário do processo inflamatório, as células neoplásicas frequentemente se infiltram além da mucosa, destruindo a arquitetura normal do tecido (LINGARD *et al.*, 2009). Portanto, biopsias intestinais, nos casos de linfoma de pequenas células, em que as células não se restringem a mucosa e amostras teciduais são obtidas por via endoscópica (na qual por vezes limita-se a obtenção apenas da camada mucosa), tornam-se desafiadoras para interpretação do patologista (AL-GHAZLAT; REZENDE; FERRERI, 2013).

Embora a obtenção de biopsia intestinal via endoscópica possa permitir o diagnóstico histológico de linfoma, a endoscopia pode obter amostras friáveis e sem as lesões de submucosa e serosa e assim direcionar, erroneamente, para o diagnóstico de enterite linfoplasmocítica (uma vez que pode não conceder a aquisição

de fragmentos intestinais por completo, contendo todas as túnicas) (SIMPSOM, 2017). Há o risco da histopatologia, realizada a partir de biópsia obtida por endoscopia, não diferenciar a DII do linfoma intestinal pois a amostra é superficial e de tamanho reduzido (AMORIM DA COSTA; SOUZA; DAMICO, 2017). Assim, alguns patologistas não estão dispostos a diagnosticar linfoma a partir de biópsias endoscópicas (SIMPSOM, 2017). Os patologistas têm subestimado as lesões na mucosa e depositam maior confiança do diagnóstico quando há invasão transmural de linfócitos neoplásicos, pois são facilmente diagnosticados por exames morfológicos (MARSILIO *et al.*, 2019a). Entretanto, esse conceito pode ser um tanto equivocado pois o linfoma se manifesta na mucosa intestinal muito antes da progressão transmural (SIMPSOM, 2017). Além disso, na atualidade a endoscopia digestiva tem se tornado uma realidade na medicina veterinária, obtendo-se rotineiramente espécimes de biópsia endoscópica, que consistem basicamente em mucosa (por completo) e tecido submucoso escasso (MOORE; RODRIGUES-BERTOS; KASS, 2012).

Existe uma considerável variação observacional entre patologistas no diagnóstico de populações de células da mucosa intestinal (WILLARD *et al.*, 2002). Deve-se considerar se as alterações histopatológicas podem prever com precisão se um paciente não tem doença crônica intestinal clinicamente evidente (MOORE; RODRIGUES-BERTOS; KASS, 2012). A biópsia intestinal é normalmente realizada quando o intestino é considerado uma possível causa da doença para o animal; no entanto, a sintomatologia do paciente pode ser decorrente de enfermidades em muitos órgãos, além do intestino (LINGARD *et al.*, 2009). Assim, é possível que um número substancial de biópsias intestinais submetidas a histopatologia não são responsáveis pelas manifestações clínicas do paciente; logo, deve-se ter cautela ao correlacionar manifestações clínicas com descrições histopatológicas de amostras de biópsia intestinal (WILLARD *et al.*, 2002).

2.6.5. IMUNOISTOQUÍMICA

A imunoistoquímica pode ser aplicada como ferramenta auxiliar para o diagnóstico exato de neoplasmas indiferenciados (WERNER *et al.*, 2005a; RAMOS-VARA *et al.*, 2008). A identificação de receptores celulares e moléculas relacionadas à progressão tumoral permite caracterizar o imunofenótipo das células neoplásicas (MOHAMMED *et al.*, 2011), constituindo fatores prognósticos e preditivos importantes (WERNER *et al.*, 2005a; RAMOS-VARA *et al.*, 2008).

Os linfomas de pequenas células são geralmente oriundos de células T (90%) sendo o restante de células B (CHAVKIN, 2018). A análise imunofenotípica é importante pois pode contribuir para a diferenciação entre DII e linfoma linfocítico, uma vez que esse último é caracterizado por uma população monoclonal de linfócitos T (MOORE; RODRIGUES-BERTOS; KASS, 2012; MARSILIO *et al.*, 2019a). No entanto, deve-se notar que a expansão das populações de células T no MALT intestinal pode ocorrer tanto na inflamação intestinal quanto na doença neoplásica (AL-GHAZLAT; REZENDE; FERRERI, 2013).

Assim, em alguns casos, as análises histopatológicas e imunofenotípica não são suficientes para definir o diagnóstico de linfoma, sendo indicado o teste de clonalidade por meio da PCR para a detecção da expansão clonal de linfócitos T, já que uma população mista de células linfoides favorece o diagnóstico de DII (MOORE; RODRIGUES-BERTOS; KASS, 2012; MARSILIO *et al.*, 2019a). Logo, a determinação da clonalidade de populações de células T, no infiltrado de linfócitos no intestino, por técnicas moleculares mostra-se promissora como adjuvante a histopatologia e a imunoistoquímica para a exclusão de inflamação e diagnóstico correto e definitivo de linfoma de baixo grau (AL-GHAZLAT; REZENDE; FERRERI, 2013;). Logo, se o diagnóstico histopatológico for inconclusivo, a imunofenotipagem associado a testes moleculares, são recomendados pois aumentam a sensibilidade diagnóstica em 80% (AL-GHAZLAT; REZENDE; FERRERI, 2013; FREICHE; FAUCHER; GERMAN, 2016).

2.6.6. TESTES AVANÇADOS: MOLECULARES E OUTROS

A diferenciação entre uma população residente de linfócitos maduros inflamatórios ou neoplásicos (ou seja, o grande dilema: DII *versus* linfoma de pequenas células), não podem ser alcançados apenas por citologia (LINGARD *et al.*, 2009). Mesmo com biópsias de espessura total, a histopatologia pode ser inconclusiva; esses casos justificam a aplicação de ferramentas complementares como o teste de clonalidade do receptor de células T baseado em PCR para a distinção e diagnóstico definitivo da causa da doença crônica do intestino delgado dos felinos (GRESS *et al.*, 2016). Para uma maior precisão no diagnóstico de linfoma intestinal em gatos, uma combinação de citologia, histologia, imunoistoquímica, citometria de fluxo e teste de clonalidade são mandatórios (GRESS *et al.*, 2016).

O ensaio molecular por rearranjos dos receptores antigênicos por PCR (PARR) vem sendo empregado para detectar populações de linfócitos expandidos clonalmente

em gatos (BURNETT *et al.*, 2003). Em uma expansão de linfócitos neoplásicos, os genes do receptor de antígeno serão homogêneos em sequência e comprimento (MOORE *et al.*, 2005). A expansão é monoclonal para linfócitos neoplásicos, diferentemente de uma população inflamatória, como a DII, na qual a expansão é policlonal (BURNETT *et al.*, 2003). Outro uso para o ensaio PARR é no monitoramento da doença residual mínima após a quimioterapia (WERNER *et al.*, 2005b).

Sugerem-se diretrizes para situações em que o teste PARR é uma ferramenta de diagnóstico útil, como detecção de doença linfoproliferativa (uma vez que analisa mutações específicas no genoma de células neoplásicas linfoides), quando o resultado da citologia e histologia é ambíguo, determina a relação clonal das células linfoides malignas, pesquisa retrospectiva de expansão de linfócitos pré-neoplásicos e detecção de doença residual mínima (MOORE *et al.*, 2005). A detecção da população clonal de células em lesões linfoproliferativas é um importante critério para o diagnóstico de neoplasia (FREICHE; FAUCHER; GERMAN, 2016). A técnica PARR corresponde a um exame que auxilia no diagnóstico definitivo de linfoma quando outras provas não foram eficientes para tal finalidade (AL-GHAZLAT; REZENDE; FERRERI, 2013). A avaliação sistemática das técnicas de histopatologia, imunohistoquímica e PARR, em conjunto, diminuiu a probabilidade de erros de diagnóstico (AL-GHAZLAT; REZENDE; FERRERI, 2013).

A citometria de fluxo é um processo que analisa as características físicas e químicas de células isoladas; é um tipo de imunofenotipagem que detecta a expressão da superfície celular e antígenos intracelulares, juntamente com seu nível de expressão (BEZZERA *et al.*, 2011). Auxilia a identificar a população de células, com marcadores específicos de linfócitos T e de linfócitos B (NOGUEIRA e MELO, 2020). O estudo imunofenotípico nos processos linfoproliferativos é útil na distinção entre alterações reacionais benignas e malignas, por meio da identificação de monoclonalidade (WERNER *et al.*, 2005b). O uso da citometria de fluxo associada à cito-histopatologia e o estudo imunohistoquímico permite diagnosticar e diferenciar os processos reacionais dos neoplásicos, além de subclassificar as doenças linfoproliferativas (BEZZERA *et al.*, 2011). A citometria de fluxo é especialmente útil na distinção entre os vários tipos de linfoma/leucemia em pacientes com linfocitose (MOORE *et al.*, 2005; BEZZERA *et al.*, 2011).

Embora o ensaio PARR seja preferível quando há necessidade de confirmar se existe uma população neoplásica (ARESU *et al.*, 2014), não é útil para

imunofenotipagem (se estão disponíveis o acesso as técnicas de citometria de fluxo, imunoistoquímica ou imunocitoquímica), estadiamento do linfoma ou triagem para animais saudáveis (BURNETT *et al.*, 2003). Em cães, com linfoma difuso de grandes células B, as técnicas imunológicas (citometria de fluxo) e moleculares (PARR), quando usadas em combinação, são as mais promissoras para monitorar a doença residual mínima. Contudo, estudos adicionais são necessários para determinar o valor prognóstico desses métodos e sua capacidade de segregar animais em categorias de risco (ARESU *et al.*, 2014). No Brasil ainda há certa dificuldade no uso de tais métodos na rotina clínica, pois tais ensaios estão disponíveis em apenas poucos centros no País (NOGUEIRA e MELO, 2020). No *Cornell University Veterinary Specialists* (único hospital privado de referência afiliado ao *Cornell University College of Veterinary Medicine* - Ithaca, NY, EUA) realiza-se PARR se a histopatologia não for diagnóstica para linfoma linfocítico. Essa prática aumentou significativamente o número de diagnósticos positivos para o linfoma de pequenas células, no referido hospital (CHAVKIN, 2018).

A espectrometria de massa guiada por histologia corresponde a uma potencial ferramenta diagnóstica adicional para a diferenciação entre enteropatia linfocítico-plasmocítica (principal apresentação histológica da DII) e linfoma intestinal de pequenas células, em gatos (MARSILIO *et al.*, 2020). Corresponde a um novo método de classificação de perfil molecular que surgiu ao longo da última década (SEELEY e CAPRIOLI, 2011). Equivale a uma técnica confiável e pode ter vantagens sobre os testes atualmente considerados como *goldstandard* na distinção das enfermidades intestinais felinas (MARSILIO *et al.*, 2020). Logo, a especificidade da PARR passou a ser questionada, devendo ser associada a outros exames, como a histopatologia e imunoistoquímica, para permanecer no *status* de “padrão-ouro” de diagnóstico (PAULIN *et al.*, 2018). Ao comparar os resultados da espectrometria de massa com a análise PARR, a primeira mostrou parâmetros superiores. Enquanto a PARR exibiu sensibilidade de 85.7%, especificidade de 33.3% e acurácia de 61.5%, a espectrometria de massa demonstrou sensibilidade de 86.7%, especificidade de 91.7% e acurácia de 88.9% (MARSILIO *et al.*, 2020).

2.7. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Para o linfoma intestinal (em particular o tipo histológico linfocítico), o principal diagnóstico diferencial corresponde a DII (RISSETO *et al.*, 2011). Para os linfomas

formadores de massa palpável (tipo histológico linfoblástico) deve-se alertar principalmente para a diferenciação com pólipos, papiloma, adenocarcinoma, mastocitoma, carcinoma de células escamosas, hemangiossarcoma, leiomiossarcoma, fibrossarcoma, dentre outras neoplasias intestinais (CRISTO *et al.*, 2018; LEITE-FILHO *et al.*, 2020). O adenocarcinoma corresponde a neoplasia intestinal não linfoide mais comum dos gatos (PAULIN *et al.*, 2018; MARDELL, 2020).

Algumas enfermidades não neoplásicas devem ser investigadas, na diferenciação com o linfoma intestinal, como os corpos estranhos, úlceras gastroentéricas, gastrites, hipertireoidismo e peritonite infecciosa felina (COUTO, 2010; CALAZANS; DALECK; DE NARDI, 2016; VAIL e PINKERTON, 2020). Inclui-se ainda a fibroplasia esclerosante eosinofílica gastrointestinal, uma entidade clínica emergente e relacionada com intolerância alimentar, disbiose intestinal, ingestão de ectoparasitas, presença de endoparasitas, ingestão excessiva de pelos contendo alérgenos ambientais ou material vegetal (LINTON *et al.*, 2015). Considera-se que os felinos que apresentem caquexia, alterações hematológicas, hipercalcemia e manifestações cutâneas de causa desconhecida devem ter a síndrome paraneoplásica, devido ao linfoma intestinal, como diagnóstico diferencial (DAMICO e SILVA, 2017).

Atualmente, tem-se descrito, em gatos idosos, o termo “enteropatia crônica felina”; essa é definida como a presença de manifestações clínicas de doença gastrointestinal por mais de 3 semanas na ausência de doenças intestinais infecciosas e causas extraintestinais. A enteropatia crônica felina é representada principalmente pelo linfoma de pequenas células e enterite com infiltrado linfocítico-plasmocitário, a qual corresponde ao principal tipo histológico da DII (REZENDE; FERRERI, 2013; MARSILIO *et al.*, 2020). A DII e o linfoma de pequenas células possuem similaridade na anamnese, sintomatologia e no exame ultrassonográfico, muitas vezes com resultados inespecíficos e que se sobrepõem (KIUPEL *et al.*, 2011) A diferenciação entre DII e linfoma linfocítico é muitas vezes difícil, especialmente quando apenas algumas espécimes de biópsia endoscópica estão disponíveis para avaliação histopatológica (AL-GHAZLAT; REZENDE; FERRERI, 2013). Na histopatologia, os infiltrados inflamatórios associados à enterite crônica são morfologicamente semelhantes aos infiltrados neoplásicos (NORSWORTHY *et al.*, 2015). No entanto, um diagnóstico correto é imperativo para o tratamento adequado e prognóstico (POHLMAN *et al.*, 2009).

Um algoritmo de diagnóstico foi desenvolvido para diferenciar com mais precisão o linfoma intestinal da DII, tendo como primeiro passo a avaliação histológica, seguida de imunofenotipagem e depois PCR para determinar a clonalidade dos linfócitos infiltrantes, de células T ou B (MARSILIO *et al.*, 2019a). A adição da imunoistoquímica, citometria de fluxo e o ensaio da PARR à histopatologia tradicional, resulta em maior acurácia na diferenciação entre células linfoides neoplásicas e processo inflamatório, podendo assim minimizar a probabilidade de erros de diagnóstico (PAULIN *et al.*, 2018; ETTINGER e LITTLE, 2020; MARDELL, 2020). Um número significativo de linfomas de células T são incorretamente diagnosticados como DII usando histomorfologia isolada ou apenas em conjunto com a imunoistoquímica (MARSILIO *et al.*, 2019a).

2.8. TRATAMENTO

A base de conhecimento relacionada ao tratamento do linfoma intestinal felino é menos vasta em relação à espécie canina. Tal fato é justificado, principalmente, devido à maior variação no tipo histológico e localizações anatômicas observadas nos linfomas dos gatos domésticos (VAIL e PINKERTON, 2020). Uma grande preocupação dos clínicos veterinários e proprietários é proporcionar melhora clínica ao paciente felino oncológico sem, no entanto, induzir efeitos colaterais significativos (GIEGER, 2011). A principal modalidade terapêutica para o linfoma é a quimioterapia antineoplásica (MOORE e OGILVIE, 2001; WINKEL e LUCAS, 2022). Os fármacos antineoplásicos direcionados ao tratamento do linfoma felino, geralmente induzem apoptose das células tumorais (KANO *et al.*, 2008). A escolha do protocolo de tratamento depende do tipo celular envolvido, mas também deve-se considerar a condição clínica do paciente, uma vez que o gato geralmente é idoso e tende a apresentar comorbidades (MOORE; RODRIGUES-BERTOS; KASS, 2012). Desta forma, a escolha dos medicamentos quimioterápicos deve ser cautelosa, além de se avaliar particularidades individuais (RECHE-JÚNIOR *et al.*, 2010). A resposta inicial à quimioterapia é um adequado fator prognóstico (CALAZANS; DALECK; DE NARDI, 2016). Em geral, os gatos com linfoma linfocítico têm melhores respostas terapêuticas e maiores tempos de sobrevida, quando comparado aqueles com linfoma linfoblástico (GIEGER, 2011; POPE *et al.*, 2015).

A maioria dos gatos, principalmente aqueles que padecem do linfoma linfocítico, demonstra uma excelente resposta ao tratamento quimioterápico com o uso

de agentes alquilantes e glicocorticoides. A associação do clorambucil com a prednisolona pode proporcionar uma resolução completa em 70 a 96% dos casos e conferir um tempo médio de remissão entre 26 a 29 meses (STEIN *et al.*, 2010; BARRS e BEATTY, 2012b). O protocolo preconizado para o linfoma de baixo grau (ou de pequenas células) inclui a utilização de prednisolona (40mg/m², VO, a cada 24h, durante 7 dias e após: 40 mg/m², VO, a cada 48h) e clorambucil (2 mg/gato, VO, a cada 72h, após a quarta semana do início do tratamento com o glicocorticoide (FONDOCARO *et al.*, 1999; RECHE-JÚNIOR *et al.*, 2010; STEIN *et al.*, 2010). Esse protocolo pode ser descontinuado, no mínimo, em 1 ano se a resposta clínica completa foi atingida (POPE *et al.*, 2015). Devido á possibilidade de mielossupressão com a terapia antineoplásica, deve ser realizada monitoração hematológica dos pacientes, de acordo com o protocolo utilizado e com a evolução clínica do animal (MOORE *et al.*, 2005; WINKEL e LUCAS, 2022). Contudo, em geral, as reações adversas, secundárias a toxicidade quimioterápica, são pouco frequentes (33.9%), embora possam ocorrer distúrbios gastrointestinais leves e autolimitantes (KANO *et al.*, 2008). Chama-se a atenção para a possibilidade do clorambucil induzir mielossupressão (neutropenia moderada e trombocitopenia grave) e hepatotoxicidade (embora reversível após descontinuar o clorambucil) (STEIN *et al.*, 2010; RISSETO *et al.*, 2011; VAIL e PINKERTON, 2020). O referido agente alquilante pode ainda ocasionar a “Síndrome de Fanconi”, caracterizada pela disfunção do túbulo proximal e consequente excreção de glicose, aminoácidos e eletrólitos (AMORIM DA COSTA; SOUZA; DAMICO, 2017).

O uso de glicocorticoides e clorambucil para o tratamento do linfoma de pequenas células, demonstra-se promissor não apenas para a localização gastrointestinal da enfermidade como também para os casos situados em outros sítios anatômicos (POPE *et al.*, 2015). Porém, um grande problema está na corticoideterapia precoce, sem diagnóstico definitivo (VAIL e PINKERTON, 2020). O uso do corticoide, indicado para a DII, pode prejudicar a resposta ao tratamento quimioterápico do linfoma (KANO *et al.*, 2008). O uso prévio e prolongado de corticosteroides pode induzir a uma resistência a múltiplas medicações quimioterápicas, afetando negativamente ao tratamento (POPE *et al.*, 2015; AMORIM DA COSTA; SOUZA; DAMICO, 2017).

Já nos linfomas de grandes células e de células intermediárias, diversos protocolos podem ser utilizados, incluindo o COP (ciclofosfamida, vincristina e

prednisolona), CVTx (ciclofosfamida, vincristina, prednisolona, L-asparaginase, doxorrubicina e metotrexato), protocolo da Universidade de Wisconsin-Madison (vincristina, L-asparaginase, prednisolona, ciclofosfamida, doxorrubicina, metotrexato e clorambucil) e o CCNU (lomustina, 40-60 mg/m², VO, a cada 3 a 6 semanas) (AMORIM DA COSTA; SOUZA; DAMICO, 2017). Outra opção de tratamento para os linfomas de grandes células ou de células intermediárias, corresponde a radioterapia da cavidade abdominal associada a quimioterapia oral com lomustina e prednisolona. O tratamento foi aparentemente bem tolerado na maioria dos gatos e com resultados semelhantes a protocolos de poliquimioterapia injetável. Portanto, é plausível que um melhor controle possa ser alcançado por meio de otimização e intensificação do protocolo de quimiorradioterapia combinatória (GIEGER; SEILER; NOLAM, 2021). Uma particularidade em relação ao uso da vincristina e ciclofosfamida, equivale a potencialização da liberação do hormônio antidiurético (ADH), o que pode ocasionar a “síndrome da secreção inapropriada do ADH” (DAMICO e SILVA, 2017).

Excisão cirúrgica de massas intestinais tem sido historicamente reservado para casos de obstrução ou perfuração intestinal (com peritonite subsequente) (MORRICE; POLTON; BECK, 2019). Geralmente, a prática cirúrgica é restrita para os casos de linfoma intestinal de células intermediárias ou de grandes células, os quais são mais implicados com a apresentação nodular ou tumoral da doença (TIDD *et al.*, 2019). Todavia, podem ocorrer múltiplas aderências ao ponto de tornar-se a técnica cirúrgica inviável (MOORE e OGILVIE, 2001). Quando a cirurgia for realizada, a quimioterapia deve ser adiada para proporcionar uma cicatrização adequada, e assim, evita a deiscência de sutura no local da anastomose intestinal, principalmente se o paciente estiver com hipoalbuminemia (PAULIN *et al.*, 2018).

Tem-se despontado um novo protocolo quimioterápico para gatos com linfoma (porém para as formas anatômicas mediastinais e multicêntricas), constituído por lomustina, vincristina, prednisolona e doxorrubicina (denominado como “LOPH”); embora a maioria (90%) dos animais submetidos a esse tratamento estivessem em viremia persistente para o FeLV, obteve-se uma resposta completa em 81% dos pacientes, sendo bem tolerado e proporcionando uma sobrevida global de 214 dias (HORTA *et al.*, 2021). Os próprios autores sugerem a necessidade de estudos futuros para avaliar a eficácia do protocolo de acordo a localização anatômica e tipos histológicos.

A resposta individual dos gatos ao tratamento e a duração da remissão dependem de alguns fatores, mas os gatos com linfoma de pequenas células T apresentam maior tempo de sobrevivência e melhor resposta ao tratamento, se comparados aos pacientes com linfoma de grandes células, seja de células B ou T (MOORE *et al.*, 2005; WINKEL e LUCAS, 2022). Associado ao tratamento antineoplásico, é preciso considerar o controle de comorbidades e outras alterações que podem impactar na resposta ao tratamento, como vômito, náusea, diarreia, anorexia, perda de peso, hipocobalaminemia e hipoproteïnemia (MOORE *et al.*, 2005; WINKEL e LUCAS, 2022). Assim, o tratamento de suporte é de extrema importância; a sintomatologia de vômito, náusea, diarreia, anorexia e perda de peso, associada à redução sérica de cobalamina e albumina é agravada com o tratamento quimioterápico (MOORE e OGILVIE, 2001; VAIL e PINKERTON, 2020). Deve-se considerar a transição para uma dieta de alta digestibilidade, com proteína de elevado valor biológico (MOORE *et al.*, 2005). Poder ser necessário o suporte nutricional enteral (por meio de sondas esofágicas, gástricas ou jejunais) ou por via parenteral; na prática, em grande parte dos casos, o suporte nutricional é mandatório para a obtenção de um tratamento satisfatório para o linfoma intestinal (MOORE e OGILVIE, 2001). O uso de antieméticos, antinauseantes e orexígenos (maropitant, mirtazapina, ondansetrona, ciproheptadina) é imprescindível (CALAZANS; DALECK; DE NARDI, 2016). Em geral, quando a neoplasia reduz de tamanho, os animais voltam a se alimentar normalmente (VAIL e PINKERTON, 2020). Recentemente, descreveu-se o uso em gatos, do capromorelin (um agonista seletivo do receptor de grelina) para estímulo do apetite e aumento do peso corporal; a posologia sugerida é de 6mg/kg, a cada 24h mas necessita de confirmação; nenhum evento adverso grave foi observado até o momento (PAULIN *et al.*, 2018).

Torna-se essencial o monitoramento do nível sérico de cobalamina e suplementar conforme a necessidade (ETTINGER e LITTLE, 2020). Gatos com hipocobalaminemia se beneficiam da adição parenteral de cobalamina (250 mcg, via intramuscular, a cada 7 dias, durante 6 semanas); mas os efeitos parecem ter uma duração relativamente curta (decréscimo após 4 a 10 semanas após a última administração); logo, o acompanhamento dos níveis séricos de cobalamina é indicado para determinar se a manutenção deve ser continuada (KEMPF *et al.*, 2017). A suplementação oral (0,25 mcg, a cada 24h, durante 27 a 94 dias) é uma alternativa promissora à administração parenteral. Porém, estudos comparativos e prospectivos

em gatos tratados com cobalamina parenteral *versus* oral são necessários antes que a suplementação oral possa ser recomendada para uso rotineiro (TORESSON *et al.*, 2017).

2.9. PROGNÓSTICO

O sistema de estadiamento da OMS para neoplasias hematopoiéticas humanas foi adaptado para o linfoma intestinal felino, mas apresenta um baixo valor em prever a resposta terapêutica, diferentemente do que se verifica com o estadiamento na espécie canina (MOORE; RODRIGUES-BERTOS; KASS, 2012; WINKEL e LUCAS, 2022). Os fatores prognósticos reconhecidos como negativos incluem a presença de infecção retroviral (especialmente pelo FeLV), hipoalbuminemia (concentração sérica de albumina inferior a 2 g/dL), perda de peso ao diagnóstico (com ganho inferior a 9% no primeiro mês de tratamento) e hipocobalaminemia (potencializa a anorexia, vômito, diarreia e perda de peso) (WINKEL e LUCAS, 2022). O prognóstico também oscila de acordo com classificação histopatológica, estágio de evolução da doença, presença de síndromes paraneoplásicas e resistência aos fármacos antineoplásicos (CALAZANS; DALECK; DE NARDI, 2016; VAIL e PINKERTON, 2020).

O tipo celular também impacta no prognóstico (MOORE; RODRIGUES-BERTOS; KASS, 2012). O linfoma de pequenas células T está associado a maior taxa de resposta terapêutica e maior tempo de sobrevida, quando comparado aos linfomas de alto grau, especialmente aos linfomas de grandes linfócitos granulares que são considerados os de pior prognóstico (WINKEL e LUCAS, 2022). Além disso, a resposta inicial à quimioterapia também representa um importante fator prognóstico; os gatos com boa resposta terapêutica, nos quais as doses dos antineoplásicos podem ser mantidas e que alcançam remissão completa, tem maior tempo de sobrevida (MOORE e OGILVIE, 2001; MOORE; RODRIGUES-BERTOS; KASS, 2012; WINKEL e LUCAS, 2022). Realmente, alcançar remissão completa é fator prognóstico para maior sobrevida, mas infelizmente, a resposta não pode ser prevista antes do início do protocolo terapêutico; para avaliar os efeitos da resposta ao protocolo, deve-se esperar três a quatro sessões quimioterápicas (NOGUEIRA e MELO, 2020). Concentrações elevadas das proteínas de fase aguda (amilóide sérica A e a alfa1-glicoproteína ácida), no momento do diagnóstico, podem ser potenciais indicadores de remissão da doença durante o monitoramento (WINKEL, 2012).

Gatos com linfoma intestinal de baixo grau apresentam uma melhor resposta terapêuticas quando tratado com prednisolona e pulsoterapia de clorambucil em comparação com os animais com linfoma alimentar de alto grau e submetidos a protocolo com múltiplos quimioterápicos (LINGARD *et al.*, 2009). Assim, o linfoma linfocítico, por muitas vezes tem boa resposta à terapia com agentes quimioterápicos orais (com remissão completa em 75 a 80% dos casos), conferindo um maior tempo de sobrevida, geralmente de 1 a 2 anos ou mais (VAIL e PINKERTON, 2020). Nos gatos com diagnóstico confirmado de linfoma de baixo grau e tratados com prednisolona e clorambucil, verificou-se que 56% possuíram resposta completa (com duração média de 897 dias); 39% com resposta parcial (com duração média de 428 dias); e apenas 5% com ausência de resposta; A mediana geral do tempo de sobrevivência foi de 704 dias (PAULIN *et al.*, 2018). Chama-se a atenção para a apresentação clínica de letargia, que despontou como um fator que parece prever se o gato atingiu a remissão ou não. Em 92% de gatos não letárgicos alcançou-se uma remissão completa. O tempo mediano de sobrevida foi de 19 meses (LINGARD *et al.*, 2009; FREICHE; FAUCHER; GERMAN, 2016), em detrimento aqueles que não atingiram uma remissão completa (LINGARD *et al.*, 2009; FREICHE; FAUCHER; GERMAN, 2016). Quando há recidiva após uma remissão durável (mais de 6 meses), as chances de alcançar uma segunda remissão são favoráveis (MOORE e OGILVIE, 2001).

A outra forma histológica (linfoma linfoblástico, alto grau ou de grandes células) por revelar-se com um curso rápido e grave, conduzindo a uma curta sobrevida (LOUWERENS *et al.*, 2005). Para o linfoma intestinal de células intermediárias ou de grandes células, a resposta à poliquimioterapia é menos previsível, com taxas de resposta gerais variando de 30 a 75%. A durabilidade da resposta também tende a ser menos favorável, com tempos médios de sobrevivência entre 3 a 6 meses (TIDD *et al.*, 2019). Mesmo que submetido a terapia com múltiplos agentes quimioterápicos, apenas 11% dos casos atingem uma resposta terapêutica completa (MOORE e OGILVIE, 2001). O linfoma linfoblástico tende a ser muito mais agressivo e, mesmo em regime de poliquimioterapia, tem um prognóstico ruim (SIMPSON, 2017). Porém, a quimioterapia combinada com ressecção cirúrgica de massa intestinal primária em gatos com linfoma de grandes células pode resultar em uma melhora no prognóstico (KRICK *et al.*, 2008). Além disso, o protocolo combinado de quimiorradioterapia pode conceder um tempo médio de sobrevida global de 101 dias e tempo médio de

sobrevida livre de progressão da doença de 77 dias (GIEGER; SEILER; NOLAM, 2021).

O linfoma de células T da mucosa relaciona-se com uma sobrevida mediana de 29 meses em detrimento ao linfoma de células B, que carrega uma sobrevida mediana de apenas 3.5 meses. Contudo, quando há infiltração transmural de células T, a sobrevida mediana é de apenas 1.5 meses (MOORE; RODRIGUES-BERTOS; KASS, 2012). Em resumo, os pacientes com linfoma intestinal de células T sobreviveram significativamente por mais tempo (1.7 anos) em comparação aos que possuíam linfoma de grandes células B (4.5 meses) (WOLFESBERGER *et al.*, 2017). Gatos diagnosticados com DII tiveram sobrevida média significativamente maior (748 dias) do que os gatos com linfoma intestinal de células T (316 a 620 dias) ou de células B (66.8 a 135 dias) (KIUPEL *et al.*, 2011).

2.10. MODELO DE ESTUDOS EM HUMANOS

O linfoma intestinal de baixo grau felino, compartilha semelhanças com algumas enfermidades similares em humanos, como a doença linfoproliferativa de células T (MARDELL, 2020). Dentro do conceito de “saúde única”, o gato doméstico é considerado um bom modelo de pesquisa para biomedicina comparativa (PAULIN *et al.*, 2018). De fato, as neoplasias felinas de ocorrência natural são oportunas para avanços comparativos e translacionais que podem trazer benefício mútuo, tanto para o ser humano quanto para a oncologia veterinária (POHLMAN *et al.*, 2009). Ao explorar os mecanismos patogénéticos envolvidos no linfoma intestinal de baixo grau dos gatos, torna-se possível uma melhor compreensão da doença em seres humanos, identificação de marcadores diagnósticos e prognósticos e desenvolvimentos de regimes terapêuticos eficazes (PAULIN *et al.*, 2018). Além disso pode conferir informações importantes sobre as interações patógeno-hospedeiro que ocorrem no trato gastrointestinal e processos fundamentais envolvidos na fisiologia e imunologia (PAULIN *et al.*, 2018).

2.11. APOPTOSE – CONCEITOS GERAIS

Os termos *apoptose* e *morte celular programada* tem sido usados como sinônimos e referem-se a uma morte individual de uma célula em uma variedade de processos (WU *et al.*, 2020). O início de processo de morte induzida pela própria célula, referido

por alguns como “suicídio celular”, é comum em ambas (TOGNON; NUNES; CASTRO, 2013). Embora haja muita sobreposição nos mecanismos celulares, o termo *morte celular programada* deveria ser reservado para a morte celular fisiológica que ocorre no desenvolvimento dos animais (embriogênese e crescimento normal) (MYERS e McGAVIN, 2009). Para aquelas circunstâncias na quais a morte celular é patológica, os termos *apoptose ou necrose apoptótica*, são mais apropriadamente usados (CHOTA; GEORGE; ABRAHAMSE, 2021). A necroapoptose é muito comum em trauma tóxico, dano físico, infecções e em diversas formas de degeneração (MYERS e McGAVIN, 2009). A morte celular por necrose ligada a inflamação crônicas pode aumentar a possibilidade de proliferação neoplásica (MEICHNER *et al.*, 2016). Cita-se ainda um terceiro tipo de morte celular, a *autofagia*, definida como “morte por autodegradação”, sendo mais comuns em células de animais invertebrados (WU *et al.*, 2020).

Os mecanismos da apoptose relacionam-se com uma diversidade de estímulos que resultam em uma sequência de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Na oncologia, a apoptose é um mecanismo inato de defesa antineoplásica (ANAZETTI e MELO, 2007). Diversos agentes quimioterápicos agem por meio da indução desse tipo de morte celular, o que induziu a uma intensa investigação dos mecanismos moleculares de apoptose e sua aplicação no tratamento do câncer (MYERS e McGAVIN, 2009).

A sequência de eventos relacionados a apoptose, envolve a iniciação por uma sinalização celular específica, uma fase de execução (comum pelos genes da “família Caspase”) e remoção de células mortas (CHOTA; GEORGE; ABRAHAMSE, 2021). Assim, o processo de apoptose pode ser dividido em uma fase de iniciação e uma fase de execução (WU *et al.*, 2020). O desencadeamento da apoptose ocorre principalmente por sinais de duas vias distintas, mas convergentes: a via extrínseca e a intrínseca (FERRER; BERTHENET; ICHIM, 2021).

A via extrínseca ocorre pela interação dos receptores de morte na superfície de uma diversidade de células (MEICHNER *et al.*, 2016). A via intrínseca responde a sinais de estresse, com aumento da permeabilidade mitocondrial e liberação de moléculas pró-apoptóticas para o interior do citoplasma (MYERS e McGAVIN, 2009; SILVA, 2014). A Bcl-2 é uma proteína antiapoptótica, que reside normalmente nas membranas das mitocôndrias e no citoplasma (CHOTA; GEORGE; ABRAHAMSE, 2021). Quando as células são privadas dos sinais de sobrevivência ou sujeitas a

estresse, a Bcl-2 sai da membrana mitocondrial e sendo substituída por membros pró-apoptóticos desta família, como o Bax (TOGNON; NUNES; CASTRO, 2013).

A família das proteínas Bcl-2 consiste em cerca de 20 genes homólogos com importância na regulação da morte celular programada (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Podem ser divididos em classe 1, sendo representado pelos fatores de sobrevivência semelhantes ao Bcl-2 (e assim denominados como reguladores antiapoptóticos), e em classe 2, como a proteína Bax, a qual é considerada indutora da apoptose (KIRKIN; JOOS; ZÖRNIG, 2004).

A fase de execução é a etapa final da apoptose e mediada por uma cascata proteolítica, para a qual os vários mecanismos de desencadeamento convergem (WU *et al.*, 2020). As proteases que mediam a fase de execução pertencem à “família Caspase”, a qual pode ser dividida funcionalmente em dois grupos: iniciadoras e executoras; as Caspases iniciadoras são: Caspase-8 e Caspase-9 (FERRER; BERTHENET; ICHIM, 2021). A Caspase-3 e a Caspase-6 atuam como executoras. As Caspases executoras agem em muitos componentes celulares (CHOTA; GEORGE; ABRAHAMSE, 2021). Elas clivam as proteínas citoesqueléticas e da matriz nuclear, e dessa forma rompem o citoesqueleto elevam ao desarranjo nuclear (TOGNON; NUNES; CASTRO, 2013). As enzimas mais importantes, envolvidas na apoptose, são as Caspases, que hidrolisam as proteínas estruturais e funcionais conduzindo à morte celular (SILVA, 2014).

Em resumo, a regulação do apoptose depende da expressão de várias proteínas antiapoptóticas, (como a Bcl-2); as proteínas antiapoptóticas previnem a apoptose através de inibição ou inativação de proteínas pró-apoptóticas (como a Bax) cuja função é promover a apoptose (FERRER; BERTHENET; ICHIM, 2021). Assim, os fatores considerados de maior importância no processo de apoptose celular incluem as proteínas Bcl-2, Bax e Caspases, agindo na regulação, ativação ou inativação dos mecanismos pró-apoptóticos e antiapoptóticos (CHOTA; GEORGE; ABRAHAMSE, 2021). Por fim, deve-se atentar que defeitos nas vias indutoras de apoptose podem levar para a multiplicação de células neoplásicas (MEICHNER *et al.*, 2016). A resistência a apoptose estimula a multiplicação celular aberrante que incita à carcinogênese (WU *et al.*, 2020).

2.12. APOPTOSE VERSUS NEOPLASIAS

A morte celular programada desempenha um papel crucial em muitos processos biológicos, incluindo a estruturação do tecido durante embriogênese, desenvolvimento do sistema imunológico e destruição de células danificadas (JAN e CHAUDHRY, 2019).

Entre as diferentes formas de morte celular programada, a apoptose é a mais comum e mais bem estudada, contando com a ativação de proteases para induzir a clivagem de centenas de substratos e morte celular rápida (MEINCHER *et al.*, 2016). Apoptose é necessária para remover as células invadidas por patógenos, mas também é essencial para eliminar células malignas e células imunes autoagressivas (FERRER; BERTHENET; ICHIM, 2021).

A evasão da apoptose está envolvida na fisiopatologia de numerosas entidades nosológicas, como doenças degenerativas, autoimunes e neoplasias (TOGNON; NUNES; CASTRO, 2013; FERRER; BERTHENET; ICHIM, 2021). A apoptose é um mecanismo vital e crucial que mantém o equilíbrio entre sobrevivência e morte celular para prevenir o câncer (JAN e CHAUDHRY, 2019). No câncer, a apoptose é um mecanismo supressor tumoral, especialmente em tecidos com alta capacidade de proliferação, como os tecidos linfoides e hematopoiéticos (MEICHNER *et al.*, 2016; FERRER; BERTHENET; ICHIM, 2021). A perda do controle da apoptose permite que as células cancerosas sobrevivam por mais tempo, adquirindo êxitos adicionais para a oncogênese, como a multiplicação descontrolada e capacidade metastática (JAN e CHAUDHRY, 2019; FERRER; BERTHENET; ICHIM, 2021). A desregulação da apoptose desempenha um papel importante na progressão do tumor e na resistência ao tratamento citotóxico (MEICHNER *et al.*, 2016). A inibição de fatores pró-apoptóticos direcionados a células cancerígenas (com o Bax e as Caspases proteolíticas) é um recurso crítico para a oncogênese (WU *et al.*, 2020). Da mesma forma, a elevação de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, por exemplo) promove restrições de atividades pró-apoptóticas em células tumorais, bem como o desenvolvimento de resistência das células neoplásicas ao sistema imune (CHOTA; GEORGE; ABRAHAMSE, 2021).

Nas neoplasias mieloproliferativas humanas, sabe-se que a desregulação da expressão dos genes pró e antiapoptóticos promove a resistência das células à apoptose, culminando com o acúmulo das células mieloides e estabelecendo a neoplasia (TOGNON; NUNES; CASTRO, 2013). Em humanos, a alterações nas

expressões das moléculas Bcl-2 e Bax, foram associadas ao prognóstico e à resposta à terapia para leucemia linfocítica crônica, linfoma não Hodgkin e leucemia mieloide aguda (TOGNON; NUNES; CASTRO, 2013). Além dessas neoplasias, a superexpressão do Bcl-2 também foi observada em mieloma, melanoma e em vários carcinomas (hepatocelular, pulmonar, mamário e prostático) (TOGNON; NUNES; CASTRO, 2013). Altos níveis de expressão de Bcl-2 foram demonstrados em gatos com linfoma de células T quando comparado ao imunofenótipo de células B (MEICHNER *et al.*, 2016; JAN e CHAUDHRY, 2019). A resistência à apoptose em células neoplásicas é decorrente de alterações na expressão de moléculas que participam da regulação das duas principais vias do processo: a intrínseca e a extrínseca (WU *et al.*, 2020). A superexpressão de moléculas antiapoptóticas, como o Bcl-2, e subexpressão de membros pró-apoptóticos (Bax, Caspase-3) geralmente estão associados com a quimiorresistência na terapia antineoplásica (JAN e CHAUDHRY, 2019).

Na oncologia humana, vislumbra-se a possibilidade da utilização das moléculas envolvidas na apoptose como marcadores de prognóstico e diagnóstico (TOGNON; NUNES; CASTRO, 2013). No linfoma multicêntrico canino, a razão Bcl-2/Bax pode ser um marcador prognóstico útil, uma vez que altas proporções de Bcl-2/Bax relacionam-se com um tempo de sobrevida livre de progressão da doença mais curto em relação aos cães que possuem baixos índices da razão (MEICHNER *et al.*, 2016). O entendimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na disfunção do processo de apoptose faz-se necessário para que se desenvolvam terapias alvos específicas contra o câncer (TOGNON; NUNES; CASTRO, 2013; JAN e CHAUDHRY, 2019). Agentes terapêuticos devem ser desenvolvidos para suprimir os fatores antiapoptóticos e regular positivamente as moléculas pró-apoptóticas (JAN e CHAUDHRY, 2019).

2.13. FATORES PROGNÓSTICOS E TERMOS CORRELATOS - DEFINIÇÃO

Entendem-se como fatores prognósticos, aqueles que predizem o risco de recidiva ou de óbito, devido à neoplasia, independentemente do tratamento empregado (AZAMBUJA, 2007). Fator prognóstico é um marcador, à época do diagnóstico ou do tratamento cirúrgico, que possa ser associado ao tempo livre de

doença ou sobrevida global na ausência de terapia (BHARGAVA *et al.*, 2008; STOCKMANS *et al.*, 2008).

Fatores prognósticos são características associadas com o desfecho em pacientes com a doença em questão (BONITA; BEAGLEHOLE; KJELLSTRÖM, 2010). Um marcador prognóstico é útil quando é capaz de, no momento do diagnóstico (ou cirurgia) da neoplasia, fornecer informações a respeito da sua evolução clínica (ZUCCARI *et al.*, 2008). O conhecimento dos prováveis prognósticos é essencial para determinar o melhor tratamento (BONITA; BEAGLEHOLE; KJELLSTRÖM, 2010). A aplicação criteriosa de fatores prognósticos estabelecidos e validados é essencial para se aumentar a utilização de terapia sistêmica e, conseqüentemente, diminuir a mortalidade (PAYNE *et al.*, 2008).

Segundo Abreu e Koifman (2002), fatores prognósticos são parâmetros possíveis de serem mensurados no momento do primeiro diagnóstico e que podem ser utilizados para a classificação dos pacientes oncológicos em pelo menos três categorias. A primeira é caracterizada pelos pacientes cujo prognóstico é tão bom que dispensa a necessidade de tratamentos adjuvantes à cirurgia. A segunda é representada pelos indivíduos que apresentam maiores riscos de disseminação ou progressão tumoral, podendo ser beneficiados por um tratamento adjuvante convencional ou mais agressivo. O terceiro grupo inclui pacientes que podem receber uma terapia de alvo molecular específica, direcionada ao imunofenótipo neoplásico (THAMM e ARGYLE, 2020). O marcador prognóstico deve estar relacionado a determinadas características biológicas envolvidas na transformação celular neoplásica, no crescimento tumoral ou no processo da cascata metastática (ZUCCARI *et al.*, 2008).

Os estudos ideais de fatores prognósticos são prospectivos, com planejamento detalhado dos objetivos. Os pacientes devem ter diagnóstico recente, serem seguidos por tempo suficiente e serem submetidos apenas ao tratamento padrão. No entanto, devido ao custo elevado e o longo tempo necessário a observação, os estudos prospectivos são raros em oncologia. Na maioria das vezes os estudos são retrospectivos baseados em dados armazenados, que tem a vantagem de serem baratos e possuírem tempo longo de observação, mas a desvantagem de que as informações clínicas podem ser incompletas (HALABI e OWZAR, 2010).

O fator de prognóstico é bastante utilizado para estimar sobrevida em pacientes com neoplasias. Atualmente, com o desenvolvimento de biomarcadores, o fator de

prognóstico vem ganhando nova dimensão. Os desfechos frente a um fator de prognóstico são: determinação de sobrevida, letalidade, mortalidade por doença específica, remissão, recorrência (GOMES, 2015).

A resposta ao tratamento é categorizada como: completa (RC), ou seja, 100% de resolução do quadro clínico, durante 30 dias ou mais e parcial (RP), ou seja, mais de 50% e menos de 100% da resolução das manifestações clínicas, durante 30 dias ou mais. A remissão nula (RN) ou ausência de resposta (AR) é estabelecida quando há menos de 50% de melhora do quadro clínico, no período inferior a 30 dias (AMORIM DA COSTA; SOUZA; DAMICO, 2017; PAULIN *et al.*, 2018). Para gatos com resposta ao tratamento, a duração da remissão é definida como o intervalo entre a data do diagnóstico histopatológico e progressão ou recorrência das manifestações clínicas (PAULIN *et al.*, 2018). Os animais devem ser sempre acompanhados com métodos de mensuração clínica do tumor, com auxílio de exames complementares, como a ultrassonografia abdominal (AMORIM DA COSTA; SOUZA; DAMICO, 2017).

Tempo de sobrevida é definido como o tempo entre ao diagnóstico histopatológico até o óbito em decorrência do linfoma (PAULIN *et al.*, 2018). O início da observação do indivíduo não considera o que aconteceu no passado. Embora o evento final geralmente corresponde ao óbito, também pode ser associado à variação de um parâmetro biológico, ou seja, pode ser por outros desfechos do tipo tempo-até-evento, como por exemplo: tempo até engravidar após tratamento de fertilidade, tempo até desmame do ventilador mecânico (BUSTAMENTE-TEIXEIRA; FAERSTEIN; LATORRE, 2002; FERREIRA e PATINO, 2016). A análise de sobrevida utiliza probabilidade condicional; ou seja, a probabilidade de sobreviver até um momento, dado que o sujeito estava vivo no início de um intervalo de tempo especificado. O método de *Kaplan-Meier* é utilizado para estimar a probabilidade de sobrevida em vários intervalos de tempo e para ilustrar graficamente a sobrevida ao longo do tempo (FERREIRA e PATINO, 2016). O teste de *log-rank* é um teste não paramétrico utilizado na comparação de curvas de sobrevida entre dois ou mais grupos (FERREIRA e PATINO, 2016). O conhecimento do óbito decorrente de uma doença é essencial pois contribui para a mudança do padrão de mortalidade e o impacto nos diferentes grupos da população (BRASIL, 2008). Apesar do avanço nas ações e serviços de saúde, na própria medicina humana nacional ainda há evidentes problemas na qualidade das informações da mortalidade (BRASIL, 2008).

O conceito errôneo de que mortalidade e sobrevida são intercambiáveis vem do uso leigo dos termos. Porém, em bioestatística, sobrevida é um conceito derivado de um procedimento analítico específico, enquanto mortalidade é uma variável de desfecho dicotômica geralmente comparada entre dois ou mais grupos em um momento específico (por exemplo, em 5 anos). Sobrevida, por sua vez, constitui uma variável que relaciona tempo e evento, ou seja, mensura o tempo entre o início da observação até a ocorrência de um evento (BUSTAMENTE-TEIXEIRA; FAERSTEIN; LATORRE, 2002).

2.14. IMUNOISTOQUÍMICA *VERSUS* PROGNÓSTICO DE NEOPLASIAS

A identificação imunoistoquímica de receptores celulares e moléculas relacionadas à progressão tumoral permite caracterizar o imunofenótipo das células neoplásicas, constituindo fatores prognósticos importantes (HORTA *et al.*, 2012). O estudo da expressão de marcadores prognósticos na oncologia, através da metodologia de imunoistoquímica, têm se revelado importante ferramenta de trabalho na rotina diagnóstica e de pesquisa (ZUCCARI *et al.*, 2008).

As possibilidades para utilização da técnica imunoistoquímica em oncologia veterinária são ilimitadas. A avaliação da proliferação celular, angiogênese, expressão de COX-2 e outros marcadores celulares representam fatores prognósticos para inúmeros processos neoplásicos (SALLES *et al.*, 2009). Infelizmente, na Medicina Veterinária, a análise imunoistoquímica ainda não é rotina e até mesmo o exame anatomopatológico tem sido, por vezes, negligenciado (HORTA *et al.*, 2012). A definição de um prognóstico preciso e a escolha de um tratamento mais adequado só podem ser inferidos a partir da obtenção de um diagnóstico detalhado, sendo necessário, em alguns casos, explorar o imunofenótipo neoplásico (CASSALI *et al.*, 2020).

O tipo celular impacta no prognóstico, já que o linfoma com imunofenótipo para células T (linfocítico), está associado a maior taxa de resposta terapêutica e maior tempo de sobrevida, quando comparado ao linfoma de grandes células B (linfoblástico) que possui um pior prognóstico (RECHE-JÚNIOR *et al.*, 2010; WINKEL e LUCAS, 2022). A menor expressão de linfócitos T CD8 relacionou-se a remissão completa e maior tempo de sobrevida de felinos portadores de linfoma intestinal (WINKEL, 2016). Contudo, existem autores que apoiam a ideia em que o imunofenótipo não tem valor

como fator prognóstico (PATTERSON-KANE; KUGLER; FRANCIS, 2004; NOGUEIRA e MELO, 2020).

2.15. IMUNOMARCADORES *VERSUS* PROGNÓSTICO DE NEOPLASIAS

2.15.1. BCL-2, BAX E RAZÃO BCL-2/BAX

O conhecimento da imunoexpressão tecidual de certos fatores envolvidos com a apoptose em células neoplásicas é fundamental pois proporciona um maior entendimento da biologia tumoral, o pode predizer o desfecho clínico e terapêutico do paciente portador de doença neoplásica (KUMARAGURUPARAN *et al.*, 2006). Os fatores que coordenam a via intrínseca apoptótica podem ser divididos em 2 grupos, cada um com funções antagônicas: os antiapoptóticos, representados por proteínas, tais como Bcl-2, e as proteínas pró-apoptóticas, como a Bax (BARRA *et al.*, 2018). Sabe-se que o aumento da expressão da molécula antiapoptótica Bcl-2, ou expressão diminuída do agente pró-apoptótico Bax, confere resistência das células tumorais à apoptose em muitos tipos de neoplasias malignas (WANG *et al.*, 2019).

A superexpressão da proteína reguladora dos mecanismos antiapoptóticos, a Bcl-2, é comumente relatada em vários tipos de neoplasias humanas (como as de origem em próstata, cólon/reto, pulmão, estômago, rim, neuroblastomas, linfomas e leucemias agudas e crônicas) (KIRKIN; JOOS; ZÖRNIG, 2004). Em mulheres, o câncer de ovário exibiu imunoexpressões positivas de Bcl-2, que foram aumentadas nos estágios mais avançados da doença (LIANG e ZHAO, 2018); além disso, quando ocorria metástase linfática ou recorrência pós-operatória, as taxas de expressão positiva de Bcl-2 aproximaram-se de 100%. Logo, determinou-se que as superexpressões positivas dessa proteína confere um prognóstico ruim no câncer ovariano humano (LIANG e ZHAO, 2018). Ao avaliar o papel da oncoproteína Bcl-2 em neoplasias orais (carcinoma de células escamosas) e também em alterações displásicas bucais humanas, constatou-se que a imunoexpressão da Bcl-2 foi um indicador de mau prognóstico tanto para as lesões cancerígenas quanto para as pré-cancerígenas (ARYA; SINGH; DANIEL, 2016). A expressão dessa proteína em células tumorais, depende de vários fatores, sendo um deles a malignidade tumoral. Na espécie felina, o nível de expressão de Bcl-2 foi maior em linhagens celulares derivadas de linfoma T, com imunorreatividade mediana de 66.8% nos casos de linfomas de células T e de 22.8% para os linfomas de células B (KANO *et al.*, 2008).

No tumor venéreo transmissível canino, a superexpressão de Bcl-2, demonstrada por ensaios imunistoquímicos, promove a progressão e sobrevivência tumoral, diferentemente das linhagens menos agressivas, as quais tendem a possuir uma alta taxa de apoptose, o que pode levar a um melhor prognóstico (FLÓREZ *et al.*, 2016). Em cães, há constantes pesquisas no mastocitoma (cutâneo e subcutâneo) que buscam imunomarcadores de proliferação e diferenciação celular, no sentido de fornecer informações adicionais sobre o comportamento biológico e prognóstico clínico. Nos últimos anos, vem se estudando a imunoexpressão de proteínas apoptóticas (Bax, Bcl-2) e seus possíveis valores prognósticos (De NARDI *et al.*, 2022). No mastocitoma cutâneo canino, a imunoexpressão celular de Bcl-2 acarretou em um impacto negativo na sobrevida dos pacientes, aumentando o risco de morte devido à doença em 5.8 vezes (BARRA *et al.*, 2018).

O Bcl-2 é um fator crítico de sobrevivência de linfócitos. A expressão de Bcl-2 bloqueia parte da ativação da via intrínseca da apoptose (ao inibir o fator próapoptótico Bax) e também limita a etapa final da apoptose, a fase de execução, ao impedir a ação da Caspase-3 (AZIMI *et al.*, 2011). Na espécie felina, a partir de biopsias intestinais, detectou-se um maior grau de imunomarcção positiva para Bcl-2 no linfoma intestinal (90%), em detrimento a DII (60%). Houve uma diferença estatisticamente significativa, mas o grau de imunomarcção positiva do Bcl-2 para ambas enfermidades crônicas intestinais foi considerado alto (SWANSON *et al.*, 2012). Assim a elevada marcação para Bcl-2 pode revelar-se mais importante para condutas terapêuticas, em vez de confirmação de diagnóstico. Os glicocorticoides são um dos principais fármacos utilizados no tratamento do linfoma intestinal e da DII, em gatos domésticos. Para regular negativamente a expressão de Bcl-2 (ou interferir na sua atividade), doses mais baixas ou durações mais curtas de tratamento esteroideal podem ser necessárias para o manejo terapêutico de ambas as doenças (SWANSON *et al.*, 2012). Ensaios clínicos de inibidores alvo e específicos para a molécula de Bcl-2 estão sendo conduzido na oncologia humana e felina, o que irá refletir positivamente no prognóstico dos pacientes (AZMI *et al.*, 2011).

Em neoplasias humanas do sistema nervoso central, como os gliomas, observou-se uma imunoexpressão diminuída do Bax, com a progressão da doença e em estágio tardio (KUMARAGURUPARAN *et al.*, 2006). Assim, propõem-se que os níveis de proteína Bax podem ser usados como um biomarcador de prognóstico confiável para pacientes acometidos por gliomas de alto grau (WANG *et al.*, 2019).

Devido à sua ação pró-apoptótica, a proteína Bax quando em baixos níveis teciduais, associa-se a um pior resultado clínico-terapêutico, não só para os gliomas avançados, mas também em muitos tipos de cânceres em seres humanos (WANG *et al.*, 2019). Nos casos de linfoma e leucemia linfoblástica humana, a superexpressão do Bax foi associada a um maior tempo de sobrevivência (MEICHNER *et al.*, 2016). Em felinos domésticos, a imunoposição para o Bax, em tecido linfoide (normal ou neoplásico), oriundo de linfocentros periféricos, órgãos do sistema gastrointestinal ou de outras regiões não se encontra descrita na literatura atual pesquisada. Nesta espécie, a presença do Bax já foi identificada em tecidos embrionário (SANANMUANG *et al.*, 2013), ovariano (COCCHIA *et al.*, 2015), uterino (LIMAN *et al.*, 2013), neurológico (ZHAO *et al.*, 2008), cutâneo (MADEWELL *et al.*, 2001) e também em células infectadas pelo FIV e pelo calicivírus felino (YAMAZAKI *et al.*, 2004; NATONI *et al.*, 2006).

Em tumores mamários na espécie canina, a expressão de Bcl-2 foi aumentada, enquanto a expressão de Bax foi significativamente reduzida. A razão Bcl-2/Bax mostrou-se 2 vezes maior ao se comparar com os valores oriundos dos tecidos adjacentes normais (KUMARAGURUPARAN *et al.*, 2006). A desregulação da apoptose devido a um desequilíbrio na razão Bcl-2/Bax contribui para a patogênese do câncer de mama. Esses achados podem ser favoráveis para a evasão da apoptose no tecido mamário neoplásico de cadelas, o que impacta em um prognóstico ruim para as pacientes. Sabe-se que a evasão da apoptose é uma das características marcantes do câncer (KUMARAGURUPARAN *et al.*, 2006). Tal evento aumenta a probabilidade de mutações genéticas necessárias para a carcinogênese, com prolongando da sobrevivência das células neoplásicas, promove o escape da imunovigilância, aumenta o potencial para metástases e favorece geração de quimiorresistência. Curiosamente, as neoplasias mamárias de mulheres apresentam padrão semelhante as cadelas, no que diz respeito as alterações em proteínas associadas à apoptose; assim, o modelo canino é considerado ideal para estudos em medicina comparativa, no âmbito de mecanismos moleculares da carcinogênese, podendo substituir o modelo murino tradicional (KUMARAGURUPARAN *et al.*, 2006).

A apoptose serve como uma barreira natural para o desenvolvimento do câncer, especialmente em tecidos com alta proliferação intrínseca capacidade e renovação celular, como o tecido hematopoiético e linfoide (GRESS *et al.*, 2016). A proporção de proteínas pró e antiapoptóticas é determinante na sensibilidade a

estímulos apoptóticos, como por exemplo a proporção de Bcl-2 para Bax (AZMI *et al.*, 2011). No linfoma folicular humano, a razão Bcl-2/Bax elevada, foi associada a uma sobrevida mais curta e óbito precoce. Contudo, a super imunexpressão de Bax nos linfomas difusos de grandes células B e nos linfomas de células T periféricas foi associada a maior sobrevida nos pacientes humanos (PEROJA *et al.*, 2018). Em cães com linfoma multicêntrico, quando a proporção Bcl-2/Bax foi superior à mediana, observou-se uma curta sobrevida livre de progressão da doença (MEICHNER *et al.*, 2016). A razão Bcl-2/Bax foi maior em cães com linfoma de células T em comparação com linfoma de células B, contribuindo assim para a determinação de um prognóstico menos favorável para o linfoma do tipo T, com provável maior resistência ao tratamento citotóxico, recidiva precoce e quadro clínico mais agressivo. A razão Bcl-2/Bax pode ser um marcador prognóstico útil para cães com linfoma multicêntrico, proporcionando informações prognósticas importantes, além do imunofenótipo isoladamente. (MEICHNER *et al.*, 2016).

2.15.2. CASPASE – 3

Na oncologia humana, biomarcadores preditivos são importantes para o avanço das terapias direcionadas. Isso permite uma triagem mais eficaz de pacientes para determinar intervenções clínicas benéficas (LIU *et al.*, 2017). É reconhecido que a Caspase-3 é um mediador da morte celular programada, sendo altamente expresso em células apoptóticas (BONGIOVANI *et al.*, 2012). A expressão e ativação das Caspases representam um passo importante no apoptose (SAKAMAI e SATOU, 2009).

Em homens com câncer de próstata, investigou-se o valor prognóstico da Caspase-3; ao correlacionar com os parâmetros dos pacientes, observou-se uma forte expressão de Caspase-3 no grupo de câncer de próstata classificado como bom prognóstico em comparação ao grupo de mau prognóstico (ACAR *et al.*, 2021); assim, uma diminuição na expressão de Caspase-3 foi identificada em pacientes com prognóstico ruim para a neoplasia prostática; um percentual de 93.75% dos homens classificados com bom prognóstico para o câncer prostático, apresentaram níveis mais elevados de Caspase-3 (ACAR *et al.*, 2021). Logo, tem-se a Caspase-3 como potencial marcador prognóstico para pacientes humanos com câncer de próstata (TUMMERS e GREEN, 2022).

Para outras neoplasias humanas, o mesmo raciocínio já foi demonstrado, onde a baixa atividade da Caspase-3 esteve associada a um maior risco de recorrência local no câncer colorretal (ZHOU *et al.*, 2018). Baixos níveis de expressão de Caspase-3 associaram-se a mau prognóstico em câncer de bexiga (WANG *et al.*, 2014). Em pacientes com câncer colorretal altos níveis de Caspase-3 foram associadas a bom prognóstico (ZHOU *et al.*, 2018). Para o carcinoma de células escamosas, em cavidade oral de pessoas, a maior expressão de Caspase-3 foi associada com melhor sobrevida em pacientes mesmo em estágios avançados da doença, com grandes dimensões tumorais e invasão de linfonodos satélites (LIU *et al.*, 2017).

Na medicina veterinária, tem-se conhecimento de um único trabalho que avaliou, dentre várias moléculas como ferramentas prognósticas, a Caspase-3. Todavia o estudo foi na espécie canina e direcionado para neoplasias ósseas (essencialmente o osteossarcoma). Em todos os graus analisados da neoplasia (I, II e III), houve uma diminuição progressiva da Caspase-3. Esse achado reforça a importância da avaliação da Caspase-3 em tecidos neoplásicos de mamíferos domésticos (BONGIOVANI *et al.*, 2012). Todavia, até o presente momento, é desconhecido a associação de tal moléculas como fator de prognóstico para outras neoplasias de cães e tão pouco para a espécie felina.

3. JUSTIFICATIVA

Uma vez que o conhecimento da expressão de Caspase-3, Bcl-2 e Bax é escasso ou até ausente, para as neoplasias hematopoiéticas felinas, torna-se fundamental uma maior investigação sobre as suas imunoexpressões nos linfomas, em especial, aqueles de localização intestinal, já que correspondem ao tipo mais frequente na espécie felina.

4. HIPÓTESE CIENTÍFICA

Os gatos acometidos pelo linfoma intestinal e com menor imunexpressão de Caspase-3 ativada e razões Bcl-2/Bax mais elevadas nos linfócitos neoplásicos, apresentam prognóstico desfavorável .

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GERAL

Determinar a imunexpressão da Caspase-3, Bcl-2 e Bax no linfoma intestinal felino e relacionar com o desfecho clínico-terapêutico dos pacientes.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

5.2.1. Verificar a diferença entre os tipos histológicos do linfoma intestinal felino.

5.2.2. Verificar a diferença na imunofenotipagem do linfoma intestinal felino.

5.2.3. Verificar a imunexpressão dos marcadores Caspase-3, Bcl-2 e Bax no linfoma intestinal felino.

5.2.4. Relacionar o tipo de resposta terapêutica, tempo de sobrevida e taxa de óbito em decorrência da doença, dos pacientes felinos, com:

5.2.4.1. Os resultados da histopatologia no linfoma intestinal.

5.2.4.2. Os resultados da imunofenotipagem no linfoma intestinal.

5.2.4.3. Os resultados da imunexpressão para a Caspase-3, Bcl-2, Bax e razão Bcl-2/Bax, no linfoma intestinal.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho constituiu-se em um estudo clínico retrospectivo, conduzido de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), registrado sob o número 9923250319. A coleta das amostras foi concedida após a assinatura da “Carta de autorização” (Anexo A) por parte do responsável técnico do ambiente hospitalar que proveu o material biológico e informações clínicas para a pesquisa.

6.1. ANIMAIS

Foram utilizados tecidos oriundos de biopsias intestinais (via laparotomia), de 30 pacientes felinos, admitidos na Clínica Veterinária Vetmasters (localizada atualmente na Avenida Pacaembu, 1166, São Paulo-SP), entre o período de março de 2007 a dezembro de 2018, sob a supervisão do Prof. Dr. Archivaldo Reche-Júnior. Foram incluídos no experimento animais com diagnóstico histopatológico de linfoma intestinal.

6.2. SELEÇÃO DO MATERIAL E DAS INFORMAÇÕES CLÍNICAS DOS PACIENTES

Os tecidos avaliados estavam previamente parafinizados, uma vez que possuíam origem de gatos atendidos no estabelecimento veterinário supracitado. O material de cada animal foi novamente submetido à avaliação histopatológica e análise imunoistoquímica, conforme as técnicas abaixo descritas. Todos os animais, na época da obtenção do diagnóstico histopatológico de linfoma intestinal, foram submetidos à quimioterapia antineoplásica. Os pacientes foram acompanhados periodicamente até o momento da cura clínica ou óbito. Todos os dados relacionados com a resposta terapêutica, tempo de sobrevivência e óbito em decorrência da doença foram descritos em prontuários clínicos individuais. Vale ressaltar que se recomendou, para todos os felinos, a triagem laboratorial para retrovíruses (SNAP® FIV/FelV Combo Test, IDEXX Laboratories – Westbrook/Maine/United States of America).

6.3. PROTOCOLO QUIMIOTERÁPICO

Todos os animais foram submetidos ao mesmo protocolo quimioterápico, padronizando-se o uso nosocomial da prednisolona (40 mg/m², VO, a cada 24h, durante 7 dias e após: 40 mg/m², VO, a cada 48h) em associação ao clorambucil (2 mg/gato, VO, a cada 72h, após a quarta semana do início do tratamento com o glicocorticoide). Tal protocolo foi baseado nas citações de Fondocaró *et al.* (1999) e Stein *et al.* (2010), com modificações. Para cada paciente, realizou-se hemograma a cada 15 dias, no sentido de monitorar o risco de mielotoxicidade induzida pelo clorambucil. Os proprietários foram devidamente orientados em relação as normas de biossegurança para a manipulação quimioterápica. A duração do tratamento foi mantida até a obtenção do tipo da resposta terapêutica (RC, RP ou AR).

6.4. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

A avaliação histopatológica realizou-se nas dependências do Laboratório de Patologia Morfológica e Molecular do Departamento de Patologia da FMVZ-USP. Cortes histológicos de 5 µm, corados pela técnica de Hematoxilina- Eosina, foram utilizados para a classificação histopatológica dos linfomas intestinais dos felinos, de acordo com os critérios estabelecidos pela OMS.

6.5. REAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA

A avaliação imunoistoquímica realizou-se nas dependências do Laboratório de Patologia Morfológica e Molecular do Departamento de Patologia da FMVZ-USP.

Cortes histológicos com 5 µm de espessura, obtidos em lâminas silanizadas (Starfrost®), foram desparafinizados, hidratados e submetidos ao desmascaramento antigênico em panela de pressão (durante 10 minutos) com tampão citrato (pH 6.0) ou EDTA (pH 9.0). Posteriormente, as lâminas foram submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena em solução de H₂O₂ (10 volumes) por 30 minutos, a 37°C, protegidas da luz. Após lavagens em água corrente, água destilada e em tampão de lavagem (TTBS), foi realizado o bloqueio de proteínas em solução de leite desnatado 5% (Molico Desnatado®, Nestlé), durante 30 minutos à 37°C; em seguida as lâminas foram novamente lavadas em TTBS (3 lavagens, por 3 vezes) e submetidas ao bloqueio em Protein Block (Novocastra, Leica Biosystems™), durante 10 minutos em estufa a 25°C. Após lavagens em TTBS (por 3 vezes), as lâminas foram incubadas,

em câmara úmida escura pelo período de 16h à 4°C, com os seguintes anticorpos primários: Caspase-3 ativada (Cell Signaling™, 1:200, tampão citrato por 20 minutos), Bcl-2 (Novocastra, Leica Biosystems™, 1:200, tampão citrato por 20 minutos) e Bax (Cell Signaling™, 1:200, tampão EDTA por 10 minutos) (Tabela 1). Após incubação, as lâminas foram lavadas em TTBS (por 3 vezes) e incubadas com o reagente pós-primário (Novocastra, Leica Biosystems™), por 30 minutos em temperatura de 20 a 25°C. Após lavagem em TTBS (por 3 vezes), o polímero Novolink Max Polymer Detection System (Novocastra, Leica Biosystems™) foi aplicado por 30 minutos em temperatura de 20 a 25°C. Em seguida, as lâminas foram lavadas em TTBS (por 3 vezes) e reveladas pelo cromógeno tetracloreto de 3-3' diaminobenzidina (DAB, Novocastra, Leica Biosystems™) por 5 minutos e em temperatura ambiente. Após lavagens em água corrente e destilada, as lâminas foram contra coradas com Hematoxilina de Harris (Merck®), lavadas em água corrente e destilada e realizados 2 banhos rápidos em água amoniacal (0.5%). Por fim, as lâminas foram submetidas à bateria de desidratação e diafanização. Para montagem, utilizou-se lamínulas e a resina *Permount* (ThermoFischer™). Todas as reações foram acompanhadas de tecidos para o controle positivo de cada anticorpo. O controle negativo foi realizado pela omissão do anticorpo primário da reação e substituição pelo diluente.

Tabela 1- Marcadores imunoistoquímicos e suas respectivas condições metodológicas.

Marcador	Marca	Clone	Tampão e condições de desmascaramento	Diluição do anticorpo
Caspase-3	Cell Singnalin g™	Asp 175	Panela de pressão por 10 minutos, em tampão citrato (pH 6.0)	1:200
Bcl-2	Novocastra Leica™	Bcl-2/100/D5	Panela de pressão por 10 minutos, em tampão citrato (pH 6.0)	1:200
Bax	Cell Singnaling™	B-9	Panela de pressão por 10 minutos, em tampão EDTA (pH 9.0)	1:200

Fonte: FILGUEIRA (2022).

6.6. AVALIAÇÃO SEMIQUANTITATIVA DA IMUNOISTOQUÍMICA

Para a determinação da imunexpressão dos marcadores Caspase-3 ativada, Bcl-2 e Bax nos linfomas intestinais, considerou-se o percentual de linfócitos neoplásicos positivos. Foi adotada a seguinte classificação semiquantitativa: grau 0 (< 5% de células positivas), grau 1 (de 5 a 25% de células positivas), grau 2 (de 26 a 50% de células positivas), grau 3 (de 51 a 75% de células positivas) e grau 4 (> 75% de células positivas), seguindo a metodologia de Liu *et al.* (2017). Adicionalmente, a intensidade de marcação dos linfócitos neoplásicos também foi considerada para avaliação de Bax, utilizando a escala grau 0 (sem marcação), grau 1 (marcação discreta), grau 2 (marcação moderada) e grau 3 (marcação forte), tomando como base o estudo de Wang *et al.* (2014). Ao final, o escore de imunexpressão de Bax foi calculado pela multiplicação dos graus de percentual de células marcadas e intensidade de marcação, obtendo valores definitivos entre 0 e 12 (adaptado de LIMAN *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2017).

6.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R CORE TEAM (2020) com os pacotes data.table (DOWLE e SRINIVASAN, 2021), tidyverse (WICKHAM *et al.*, 2019), skimr (WARING *et al.*, 2021) e survival (THERNEAU, 2020). O valor utilizado para considerar o resultado significativo foi de 0.05 ($\alpha = 5\%$ ou valor de $p < 0.05$).

Para determinar se houve diferença nas frequências de imunofenotipagem (células B ou T), tipos histológicos (linfomas linfocítico, linfoblástico e linfoma de células intermediárias), imunexpressão de Caspase-3 (escore 0 - 4), Bcl-2 (escore 0 - 4), Bax (escore 0 - 12) e a razão Bcl-2/Bax, utilizou-se o teste de qui-quadrado (X^2).

Para verificar se existiam associações entre as respostas terapêuticas (RC – remissão completa; RP - remissão parcial; AR - ausência de remissão), tempo de sobrevida e óbito em decorrência da doença com os tipos histológicos, imunofenotipagem, imunexpressão de Caspase-3, Bcl-2, Bax, e a razão Bcl-2/Bax utilizou-se o teste exato de Fisher.

A análise de sobrevivência foi realizada pelo modelo de *Kaplan-Meier* para estimar a probabilidade de sobrevivência dos animais. Calculou-se a função de sobrevivência dos animais acometidos com linfoma intestinal felino, isto é, verificou-

se quanto tempo se passa até que ocorra o óbito do animal no período do estudo. E para entender se a sobrevivência entre dois ou mais grupos foi diferente usou-se o teste de *Log-Rank* que comparou se as distribuições de sobrevivência das amostras diferiram. Assumiu-se que a censura foi não informativa, ou seja, que por motivos que não envolvem o linfoma intestinal felino, o animal não chegou a óbito neste estudo.

7. RESULTADOS

Trinta gatos com diagnóstico de linfoma intestinal e tratados com clorambucil e prednisolona foram avaliados retrospectivamente. A seguir são exibidas as descrições da população do estudo. As características que qualificaram a população foram apresentadas em número absoluto e frequência relativa.

No que se referiu ao padrão racial, observou-se que 26 (86.7%) dos animais não possuíam definição racial e uma menor parcela (4/13.3%) eram felinos com raça definida, sendo 3 (10%) Siameses e apenas 1 (3.3%) Himalaio. Em relação ao sexo, ocorreu igualdade, ou seja, 15 (50%) machos e 15 (50%) fêmeas. Para a sorologia empregada para detectar infecções pelos retrovírus, constatou-se que a maioria (22/73.4%) dos animais eram negativos tanto para o FIV quanto para o FeLV; a positividade foi baixa, equivalendo a 1 (3.3%) para o FIV, 1 (3.3%) para o FeLV e 1 (3.3%) para ambos retrovírus; em 5 (16.7%) dos felinos não foi possível realizar a sorologia. Detectou-se que 26 (86.7%) dos felinos não possuíam histórico de tratamento anterior, em detrimento a 4 (13.3%) pacientes, que carregavam terapia prévia ao diagnóstico definitivo de linfoma. Quando submetidos a quimioterapia específica para a neoplasia intestinal, 22 (73.4%) apresentaram RC, seguidos de 4 (13.3%) com RP, sendo esse último valor (absoluto e percentual) igual para os animais com AR (ou seja, 4/13.3%). O óbito em decorrência da doença foi detectado em 19 (63.3%) dos pacientes felinos oncológicos e 11 (36.7%) não vieram a óbito devido ao linfoma intestinal; destes, 9 (82%) estavam vivos ao final do tratamento e 2 (18%) ainda estavam em tratamento até o fim do seguimento.

O quadro 1 mostra a descrição das características mensuráveis (variáveis quantitativas) com a distribuição dos dados em média (μ), desvio padrão (σ), mínimo (*Mín.*), primeiro quartil (*1ºQ*), mediana (*Med*), terceiro quartil (*3ºQ*) e máximo (*Máx.*)

Quadro 1 - Análise descritiva da distribuição do peso inicial ao tratamento, idade, ECC, escores de imunexpressão (Bcl-2, Bax, Caspase-3 e Razão Bcl-2/Bax) e tempo de sobrevida dos 30 gatos utilizados no estudo. São Paulo, 2022.

Variável	μ	σ	Mín.	1ºQ	Med	3ºQ	Max.
Peso inicial (Kg)	4.21	1.42	2.15	2.9	4.12	5.15	7.6

Idade (anos)	11.6	2.33	7	10	12	13	15
ECC	3.17	1.12	1	2	3	4	5
Escore Caspase-3 (0 - 4)	0.367	0.556	0	0	0	1	2
Escore Bcl-2 (0 - 4)	3.53	1.07	1	4	4	4	4
Escore Bax (0 - 12)	4.5	2.75	1	2.25	4	6	12
Razão Bcl-2/Bax	1.13	0.821	0.11	0.542	1	1.33	4
Tempo de sobrevivência (meses)	21.0	16.5	0.10	7	21.5	28.8	60

Fonte: FILGUEIRA (2022).

Em até 75% das observações os animais exibiam um peso de até 5.15 Kg e um ECC pontuado até 4, no momento do início da quimioterapia antineoplásica. A idade mínima dos animais com linfoma intestinal foi de 7 anos; em até 25% da amostragem os animais possuíam até 10 anos. A imunexpressão do Bcl-2 nos linfócitos neoplásicos intestinais revelou o escore mais elevado (grau 4), em 25 até 100% da amostragem; já em relação ao Bax, houve bastante oscilação, apresentando um valor mediano de escore 4, considerando o grau de imunomarcagem mínimo de 1 e máximo de 12. Em até 75% dos casos, o valor da razão Bcl-2/Bax foi de 1.3. A Caspase-3 apresentou um baixo grau de imunexpressão, onde em até $\frac{3}{4}$ dos casos, a intensidade foi ínfima, detectando-se escore 1, dentro de uma escala de 0 a 4. Embora existisse pelo menos um animal que possuiu tempo de sobrevivência máximo de 60 meses, o valor mediano para essa variável foi de 21.5 meses (Quadro 1).

O quadro 2 demonstra que houve diferença pelo teste de X^2 ($p < 0.01$) nas probabilidades dos tipos histológicos, sendo que a maioria foi de linfoma linfocítico, seguido do linfoma linfoblástico.

Quadro 2 - Comparação dos tipos histológicos dos linfomas de 30 gatos avaliados no estudo. São Paulo, 2022.

Linfoma Linfoblástico	Linfoma Linfocítico	Linfoma de células intermediárias	Valor de p
6 (20.0%)	23 (76.7%)	1 (3.3%)	< 0.01

Fonte: FILGUEIRA (2022).

O quadro 3 demonstra que houve diferença pelo teste de X^2 ($p < 0.01$) nas probabilidades do imunofenótipo dos linfomas, sendo que a maioria foi de célula T.

Quadro 3 - Comparação da imunofenotipagem dos linfomas de 30 gatos avaliados no estudo. São Paulo, 2022.

Linfoma de células B	Linfoma de células T	Valor de p
6 (20.0%)	24 (80.0%)	< 0.01

Fonte: FILGUEIRA (2022).

O quadro 4 demonstra que houve diferença pelo teste de X^2 ($p < 0.01$) nas probabilidades dos escores de Caspase-3, sendo que a maior parte dos linfomas apresentou escore 0 para imunoexpressão de Caspase-3.

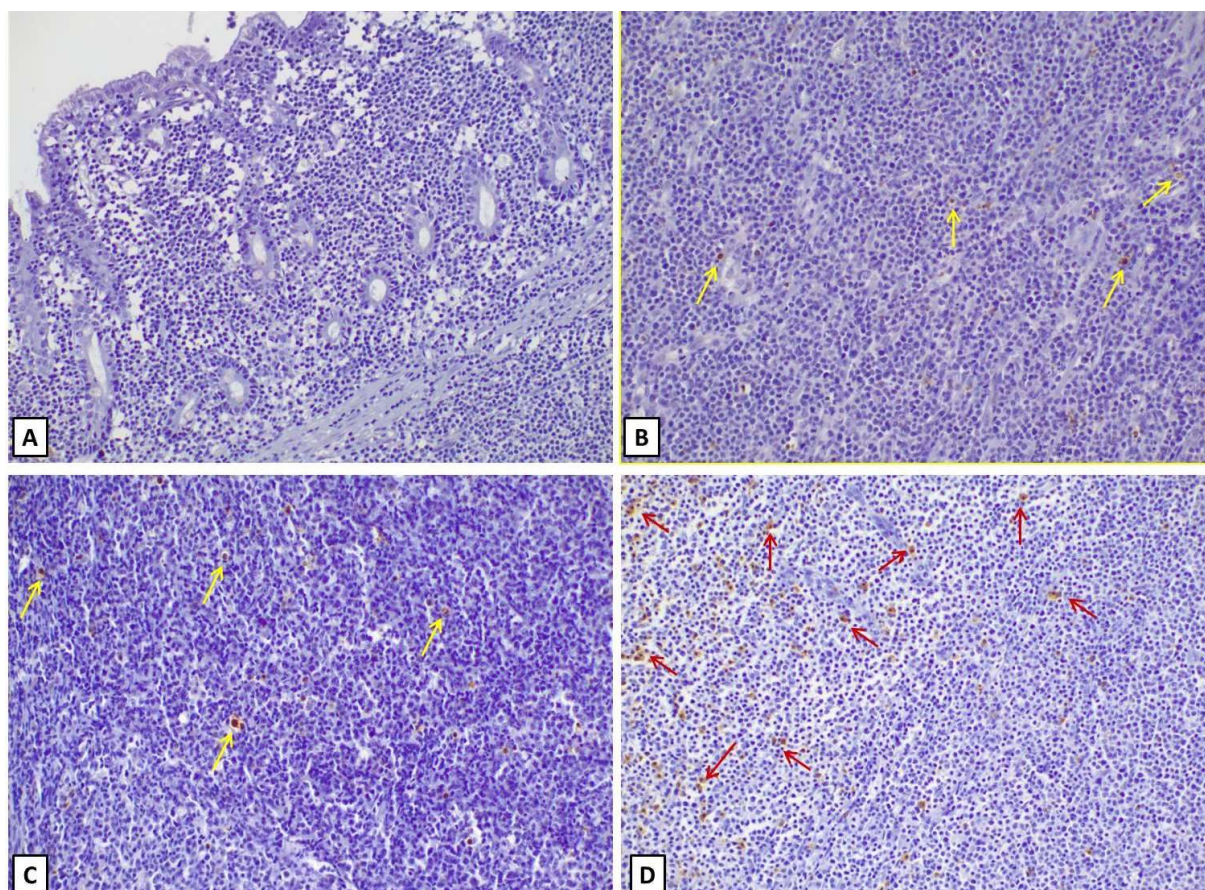
Quadro 4 - Comparação dos escores de Caspase-3 (0 - 4) dos linfomas de 30 gatos avaliados no estudo. São Paulo, 2022.

Escore 0	Escore 1	Escore 2	Valor de p
20 (66.7%)	9 (30.0%)	1 (3.3%)	< 0.01

Fonte: FILGUEIRA (2022).

A figura 1 apresenta a imunexpressão de Caspase-3 no linfoma intestinal felino.

Figura 1 - Fotomicrografia evidenciando diferentes escores da imunexpressão de Caspase-3 no linfoma intestinal felino. Legenda: A=escore 0; B e C=escore 1 (setas amarelas); D=escore 2 (setas vermelhas). Objetiva 20x.



Fonte: FILGUEIRA (2022).

O quadro 5 demonstra que houve diferença pelo teste de X^2 ($p < 0.01$) nas probabilidades dos escores de Bcl-2, sendo que a maior parte dos linfomas apresentou escore 4 para imunexpressão de Bcl-2.

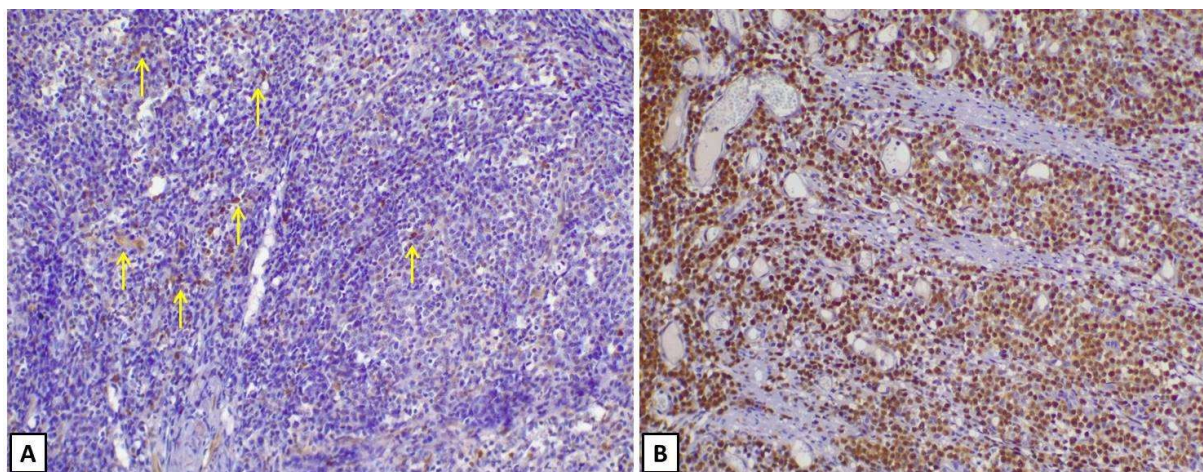
Quadro 5- Comparação dos escores de Bcl-2 (0 - 4) dos linfomas de 30 gatos avaliados no estudo. São Paulo, 2022.

Escore 1	Escore 2	Escore 4	Valor de p
4 (13.3%)	1 (3.3%)	25 (83.3%)	< 0.01

Fonte: FILGUEIRA (2022).

A figura 2 apresenta a imunoposição de Bcl-2 no linfoma intestinal felino.

Figura 2 - Fotomicrografia evidenciando diferentes escores da imunoposição de Bcl-2 no linfoma intestinal felino. Legenda: A=escore 1 (setas amarelas); B=escore 4; para esse último é notória a positividade na maioria (>75%) das células neoplásicas presentes no campo microscópico. Objetiva 20x.

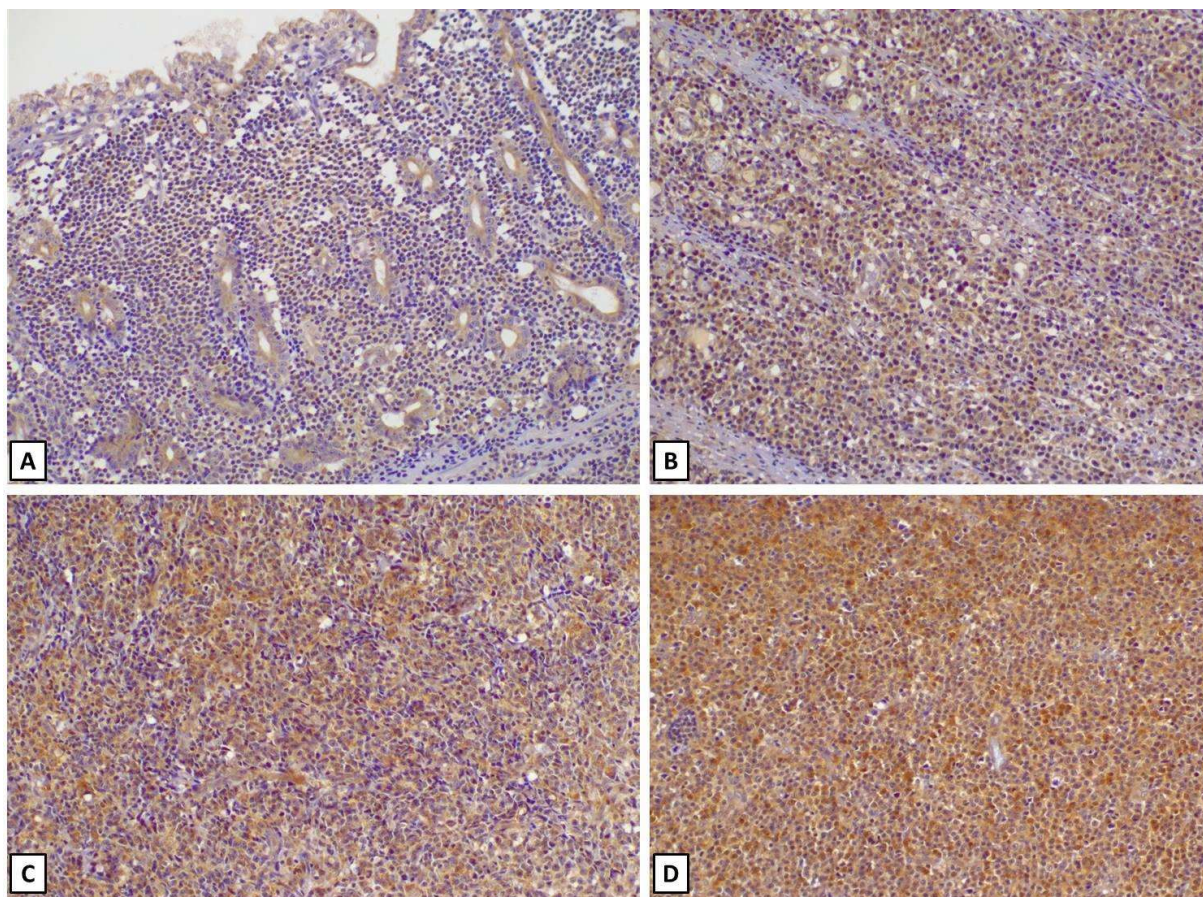


Fonte: FILGUEIRA (2022).

Não houve diferença pelo teste de X^2 ($p= 0.22$) nas probabilidades dos escores de Bax (entre 0 a 12). Porém ao averiguar descritivamente, quase metade (14/46.6%) da população estudada foi enquadrada com um baixo escore (entre 1 a 3); apenas em 1 (3.3%) caso houve categorização para o escore máximo de 12. Não existiram expressões relacionadas aos escores 0, 5, 7, 8, 10 e 11.

A figura 3 apresenta a expressão de Bax no linfoma intestinal felino.

Figura 3 - Fotomicrografia evidenciando diferentes escores da imunoposição de Bax no linfoma intestinal felino. Legenda: A=escore 2; B=escore 6; C=escore 9; D=escore 12; é notório o aumento na frequência de positividade e intensidade de marcação das células neoplásicas presentes em cada campo microscópico, ao analisar a figura em ordem alfabética. Objetiva 20x.



Fonte: FILGUEIRA (2022).

Ao verificar os possíveis valores para a razão Bcl-2/Bax, percebe-se oscilação entre 0 e 4, sendo que valores menores que 0.33 representaram metade das possibilidades de razão e de 0.33 ou acima, representaram a outra metade. Por esse motivo utilizou-se como ponto de corte 0.33; assim, quando a razão foi de valor menor que 0.33 representou caso de melhor prognóstico e quando a razão foi de valor igual ou maior a 0.33, considerou-se caso de pior prognóstico. O quadro 6 demonstra que houve diferença pelo teste de X^2 ($p < 0.01$) nas probabilidades dos valores de razão menores que 0.33 e valores de razão igual ou maiores que 0.33. A maior parte dos linfomas deste estudo possuíram alta razão Bcl-2/Bax.

Quadro 6 - Comparação entre razão Bcl-2/Bax menor que 0.33 e razão igual ou maior que 0.33 dos linfomas de 30 gatos avaliados no estudo. São Paulo, 2022.

Razão ≥ 0.33	Razão < 0.33	Valor de p
-------------------	----------------	------------

26 (86.7%)	4 (13.3%)	< 0.01
------------	-----------	--------

Fonte: FILGUEIRA (2022).

O quadro 7 demonstra que existiu associação entre o tipo de resposta terapêutica e o tipo histopatológico dos linfomas pelo teste Exato de Fisher ($p < 0.01$). Isto é, o tipo de resposta terapêutica foi dependente do tipo histológico; as amostras deste estudo demonstraram que os linfomas linfocíticos geralmente resultaram em uma RC, enquanto os linfomas linfoblásticos tiveram RC ou AR e o linfoma de células intermediárias só apresentou AR.

Quadro 7 - Relação entre o tipo de resposta terapêutica e os tipos histológicos dos linfomas de 30 gatos avaliados no estudo. São Paulo, 2022.

	Linfoma Linfoblástico	Linfoma Linfocítico	Linfoma de células intermediárias
AR	3 (10.0%)	0 (0.0%)	1 (3.3%)
RC	3 (10.0%)	19 (63.3%)	0 (0.0%)
RP	0 (0.0%)	4 (13.3%)	0 (0.0%)

Fonte: FILGUEIRA (2022).

O quadro 8 demonstra que existiu associação entre o tipo de resposta terapêutica e a imunofenotipagem dos linfomas pelo teste Exato de Fisher ($p = 0.04$). Isto é, o tipo de resposta terapêutica foi dependente da imunofenotipagem; as amostras deste estudo demonstraram que linfomas de células T geralmente resultaram em uma RC, enquanto linfomas de células B tiveram RC ou AR.

Quadro 8- Relação entre o tipo de resposta terapêutica e a imunofenotipagem dos linfomas de 30 gatos avaliados no estudo. São Paulo, 2022.

	Linfoma de células B	Linfoma de células T
AR	3 (10.0%)	1 (3.3%)

RC	3 (10.0%)	19 (63.3%)
RP	0 (0.0%)	4 (13.3%)

Fonte: FILGUEIRA (2022).

O quadro 9 demonstra que existiu associação entre o tipo de resposta terapêutica e a imunexpressão de Caspase-3 pelo teste Exato de Fisher ($p = 0.01$). Isto é, o tipo de resposta terapêutica foi dependente da imunexpressão de Caspase-3. A maioria dos animais, com RC, possuiu associação com o escore 0; já o escore 1 também teve maior proporção de casos de RC; para o escore 2, verificou-se apenas AR.

Quadro 9- Relação entre o tipo de resposta terapêutica e a imunexpressão de Caspase-3 nos linfomas de 30 gatos avaliados no estudo. São Paulo, 2022.

	Escore 0	Escore 1	Escore 2
AR	0 (0.0%)	3 (10.0%)	1 (3.3%)
RC	17 (56.7%)	5 (16.7%)	0 (0.0%)
RP	3 (10.0%)	1 (3.3%)	0 (0.0%)

Fonte: FILGUEIRA (2022).

O quadro 10 demonstra que existiu associação entre o tipo de resposta terapêutica e a imunexpressão de Bcl-2 pelo teste Exato de Fisher ($p = 0.04$). Isto é, o tipo de resposta terapêutica foi associado a imunexpressão de Bcl-2. A maioria dos animais possuíram RC associada ao escore 4. Escores mais baixos, como o 1 e 2, representavam 17% (5/30 amostras) do total deste estudo. O escore 1 revelou valores iguais para RC e AR. Quanto ao escore 2, só se observou RP.

Quadro 10- Relação entre o tipo de resposta terapêutica e a imunexpressão de Bcl-2 nos linfomas de 30 gatos avaliados no estudo. São Paulo, 2022.

	Escore 1	Escore 2	Escore 4
--	-----------------	-----------------	-----------------

AR	2 (6.7%)	0 (0.0%)	2 (6.7%)
RC	2 (6.7%)	0 (0.0%)	20 (66.7%)
RP	0 (0.0%)	1 (3.3%)	3 (10.0%)

Fonte: FILGUEIRA (2022).

Não existiu associação entre o tipo de resposta terapêutica e a imunopressão de Bax assim como na razão Bcl-2/Bax, pelo teste Exato de Fisher ($p= 0.22$ e $p= 0.05$, respectivamente). Isto é, o tipo de resposta terapêutica não foi associado a imunopressão de Bax nem com a razão Bcl-2/Bax.

Para a relação entre o tempo de sobrevida e tipos histológicos, imunofenotipagem, imunopressão de Caspase-3, Bcl-2, Bax e razão Bcl-2/Bax, realizou-se análise de 0.10 meses até 60 meses de sobrevida e separando-se nas seguintes categorias: até 1 mês de sobrevida; de 2 a 6 meses de sobrevida; de 7 a 12 meses de sobrevida; de 13 a 24 meses de sobrevida; e maior que 24 meses de sobrevida. Os tempos de sobrevida em categorias apenas foram apresentados se tiveram significância, isto é, se o teste Exato de Fisher resultou em valor menor que 0.05.

Genericamente, não se observou associação entre o tempo de sobrevida geral e os tipos histológicos ($p= 0.65$), ou seja, o tempo de sobrevida geral não foi dependente dos tipos histológicos; porém, ocorreu associação entre o tempo de sobrevida de até 1 mês e os tipos histológicos ($p < 0.01$); logo, o tempo de sobrevida de até 1 mês foi dependente dos tipos histológicos, sendo que sobrevida de até 1 mês esteve associada em sua maioria aos linfomas linfoblásticos e tempo de sobrevida maior que 1 mês de vida associou-se aos linfomas linfocíticos (Quadro 11).

Quadro 11 - Relação entre tempo de sobrevida de até 1 mês e os tipos histológicos dos linfomas de 30 gatos avaliados no estudo. São Paulo, 2022.

	Linfoma Linfoblástico	Linfoma linfocítico	Linfoma de células intermediárias
--	----------------------------------	--------------------------------	--

Mais de 1 mês de Sobrevida	3 (10.0%)	23 (76.7%)	0 (0.0%)
Até 1 mês de Sobrevida	3 (10.0%)	0 (0.0%)	1 (3.3%)

Fonte: FILGUEIRA (2022).

Em princípio, não se estabeleceu associação entre o tempo de sobrevida geral e a imunofenotipagem ($p= 0.77$), ou seja, o tempo de sobrevida geral não foi dependente da imunofenotipagem; porém, houve associação entre o tempo de sobrevida de até 1 mês e a imunofenotipagem ($p= 0.02$); logo, o tempo de sobrevida de até 1 mês foi dependente da imunofenotipagem, sendo que sobrevida de até 1 mês foi associada aos linfomas de células B e tempo de sobrevida maior que 1 mês de vida esteve associado a linfomas de células T (Quadro 12).

Quadro 12 - Relação entre tempo de sobrevida de até 1 mês e a imunofenotipagem dos linfomas de 30 gatos avaliados no estudo. São Paulo, 2022.

	Célula B	Célula T
Mais de 1 mês de sobrevida	3 (10.0%)	23 (76.7%)
Até 1 mês de sobrevida	3 (10.0%)	1 (3.3%)

Fonte: FILGUEIRA (2022).

Não se detectou associação entre o tempo de sobrevida geral e a imunoeexpressão de Caspase-3 ($p= 0.96$), ou seja, o tempo de sobrevida geral não foi dependente da imunoeexpressão de Caspase-3; porém ocorreu associação entre o tempo de sobrevida de até 1 mês e a imunoeexpressão de Caspase-3 ($p < 0.01$); logo, o tempo de sobrevida de até 1 mês foi dependente da imunoeexpressão de Caspase-3; todos os escores foram baixos; os escores 0 e 1 ocorreram em animais que tiveram mais de 1 mês de sobrevida (Quadro 13).

Quadro 13 - Relação entre tempo de sobrevida de até 1 mês e a imunoeexpressão de Caspase-3 dos linfomas de 30 gatos avaliados no estudo. São Paulo, 2022.

	Escore 0	Escore 1	Escore 2
Mais de 1 mês de sobrevida	20 (66.7%)	6 (20.0%)	0 (0.0%)
Até 1 mês de sobrevida	0 (0.0%)	3 (10.0%)	1 (3.3%)

Fonte: FILGUEIRA (2022).

Não houve associação entre o tempo de sobrevida geral e a imunopressão de Bcl-2 ($p= 0.83$) e a razão Bcl-2/Bax ($p= 0.92$). Também não existiu associação quando ao tempo de sobrevida que foi separado em categorias (para ambas variáveis, em todos os testes: valor de $p \geq 0.05$); logo, o tempo de sobrevida não foi dependente da imunopressão de Bcl-2 e da razão Bcl-2/Bax. Em relação ao Bax, não ocorreu associação quando ao tempo de sobrevida que foi separado em categorias (em todos os testes: valor de $p \geq 0.05$). Logo, o tempo de sobrevida também não foi dependente da imunopressão de Bax.

Não existiu associação entre o óbito em decorrência da doença e os tipos histológicos ($p= 1$), imunofenotipagem ($p= 1$) e nas imunopressões de Caspase-3 ($p= 0.40$), Bcl-2 ($p= 0.76$) e Bax ($p= 0.05$) e também para a razão Bcl-2/Bax ($p= 0.40$). Logo, o óbito em decorrência da doença não foi dependente para essas variáveis.

O quadro 14 corresponde a um resumo do modelo de *Kaplan-Meier* com os tempos de sobrevivência de cada animal (Tempo), quantos animais estavam em risco naquele período (Risco), quantos óbitos ocorreram no período (Óbito), probabilidade de sobrevivência além daquele período de tempo (Sobrevivência), erro padrão associado àquela probabilidade de sobrevivência (Erro padrão) e o intervalo de confiança de 95% inferior (IC 95% inferior) e superior (IC 95% superior) da probabilidade de sobrevivência.

Quadro 14 - Resumo das estimativas do modelo de *Kaplan-Meier* de sobrevivência dos 30 animais com linfoma intestinal felino. São Paulo, 2022.

Tempo	Risco	Óbito	Sobrevivência	Erro Padrão	IC 95% Inferior	IC 95% Superior

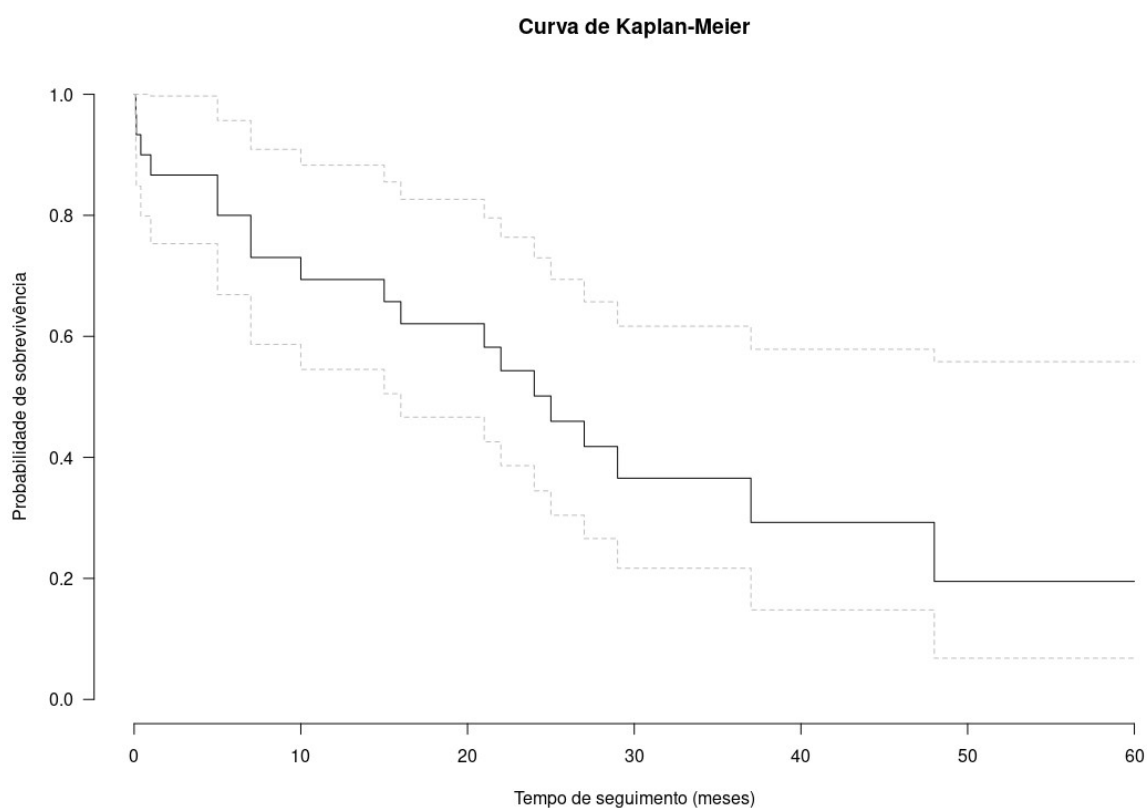
0.10	30	1	0.967	0.0328	0.9045	1.000
0.13	29	1	0.933	0.0455	0.8482	1.000
0.40	28	1	0.900	0.0548	0.7988	1.000
1.00	27	1	0.867	0.0621	0.7532	0.997
5.00	26	2	0.800	0.0730	0.6689	0.957
7.00	23	2	0.730	0.0816	0.5868	0.909
10.00	20	1	0.694	0.0853	0.5454	0.883
15.00	19	1	0.657	0.0883	0.5053	0.855
16.00	18	1	0.621	0.0906	0.4664	0.826
21.00	16	1	0.582	0.0929	0.4257	0.796
22.00	15	1	0.543	0.0944	0.3864	0.764
24.00	13	1	0.501	0.0960	0.3446	0.730
25.00	12	1	0.460	0.0967	0.3044	0.694
27.00	11	1	0.418	0.0965	0.2658	0.657
29.00	8	1	0.366	0.0975	0.2168	0.617
37.00	5	1	0.293	0.1018	0.1479	0.579
48.00	3	1	0.195	0.1046	0.0681	0.558

Fonte: FILGUEIRA (2022).

Dos 30 animais analisados, 19 (63.3% da população) vieram a óbito devido ao linfoma intestinal em até 48 meses. Observou-se incremento no número de óbitos em até 48 meses, sendo que ao final apenas 2 (6.7%) animais ainda estavam vivos ao final do estudo (Quadro 14).

A figura 4 apresenta a estimativa da probabilidade de sobrevivência dos animais com linfoma intestinal felino; observou-se que 2 animais permaneceram vivos além de 48 meses e verificou-se que aproximadamente metade dos felinos que não perderam acompanhamento (12) acometidos pelo linfoma intestinal sobreviveram em até 25 meses (Quadro 14).

Figura 4 - Estimativa da probabilidade de sobrevivência (método de *Kaplan-Meier*) dos animais com linfoma intestinal felino. Legenda: linha preta contínua: curva da estimativa de sobrevivência; linhas cinza tracejadas: intervalos inferior (abaixo) e superior (acima) de confiança de 95%.



Fonte: FILGUEIRA (2022).

Foram analisadas comparações entre grupos de sobrevivência em relação ao sexo, presença de comorbidades¹, imunofenotipagem, tipo histológico e tipo de resposta terapêutica. Não houve diferença quanto a sobrevivência em relação ao sexo ($p= 0.50$), presença de comorbidades ($p= 0.20$) e imunofenotipagem ($p= 0.10$).

¹Retrovíroses, doença renal crônica, hipertireoidismo, cardiomiopatia de fenótipo hipertrófico; alguns animais possuíam mais de uma comorbidade.

Os quadros 15 e 16 corresponderam ao resumo do modelo de *Kaplan-Meier* no grupo de animais com linfoma linfocítico e linfoblástico, respectivamente, com os tempos de sobrevivência de cada animal (Tempo), quantos animais estavam em risco naquele período (Risco), quantos óbitos ocorreram no período (Óbito), probabilidade de sobrevivência além daquele período de tempo (Sobrevivência), o erro padrão associado àquela probabilidade de sobrevivência (Erro padrão) e o intervalo de confiança de 95% inferior (IC 95% inferior) e superior (IC 95% superior) da probabilidade de sobrevivência.

Quadro 15 - Resumo das estimativas do modelo de *Kaplan-Meier* de sobrevivência dos 23 animais com linfoma linfocítico. São Paulo, 2022.

Tempo	Risco	Óbito	Sobrevivência	Erro Padrão	IC 95% Inferior	IC 95% Superior
5	23	1	0.957	0.0425	0.8767	1.000
7	21	2	0.865	0.0723	0.7346	1.000
10	18	1	0.817	0.0828	0.6702	0.997
15	17	1	0.769	0.0908	0.6104	0.970
16	16	1	0.721	0.0970	0.5540	0.939
21	15	1	0.673	0.1018	0.5005	0.905
22	14	1	0.625	0.1053	0.4493	0.869
24	12	1	0.573	0.1086	0.3951	0.831
25	11	1	0.521	0.1105	0.3436	0.789
27	10	1	0.469	0.1111	0.2946	0.746
29	7	1	0.402	0.1136	0.2309	0.699
37	5	1	0.321	0.1159	0.1586	0.652
48	3	1	0.214	0.1167	0.0737	0.623

Fonte: FILGUEIRA (2022).

Dos 23 animais acometidos pelo linfoma linfocítico, 21 (91.3%) vieram a óbito devido neoplasia em até 48 meses; o risco de óbito foi menor nos primeiros meses

de observação, com aumento ao decorrer do tempo; ao final apenas uma pequena parcela 2 (8.7%) ainda estava viva no estudo (Quadro 15).

Quadro 16 - Resumo das estimativas do modelo de *Kaplan-Meier* de sobrevivência dos 6 animais com linfoma linfoblástico. São Paulo, 2022.

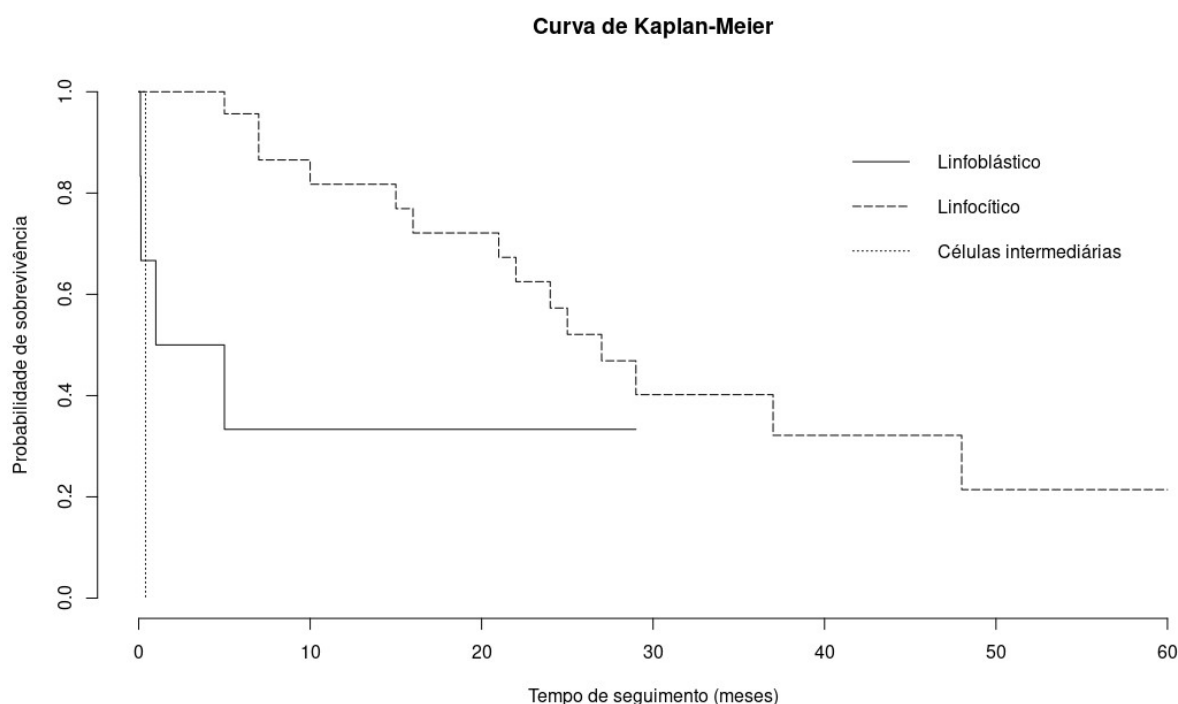
Tempo	Risco	Óbito	Sobrevivência	Erro Padrão	IC 95% Inferior	IC 95% Superior
0.10	6	1	0.833	0.152	0.583	1
0.13	5	1	0.667	0.192	0.379	1
1.00	4	1	0.500	0.204	0.225	1
5.00	3	1	0.333	0.192	0.108	1

Fonte: FILGUEIRA (2022).

Dos 6 animais acometidos pelo linfoma linfoblástico, 4 (67%) vieram a óbito devido a neoplasia em até 5 meses; o risco de óbito foi menor nos primeiros meses de observação, com aumento ao decorrer do tempo; ao final menos da metade (2/33%) ainda estava viva no estudo (Quadro 16).

A figura 5 apresenta a estimativa da probabilidade de sobrevivência *versus* o tipo histológico; quando comparadas apresentaram diferença ($p < 0.01$), sendo que do total de animais acometidos pelo linfoma linfocítico, observou-se uma baixa probabilidade (21.4%) de permanecerem vivos além de 48 meses; constatou-se que aproximadamente metade dos felinos (11) sobreviveram até 25 meses (Quadro 15). Em relação ao linfoma linfoblástico, menos de 50% dos felinos acometidos (2) permaneceram vivos além de 5 meses (Quadro 16). Para o único caso de linfoma de células intermediárias, o paciente veio a óbito em 0.4 meses.

Figura 5 - Estimativa da probabilidade de sobrevivência (método de *Kaplan-Meier*) dos animais com linfoma intestinal felino segundo os tipos histológicos.



Fonte: FILGUEIRA (2022).

Os quadros 17, 18 e 19 correspondem a um resumo do modelo de *Kaplan-Meier* no grupo de animais que tiveram RC, RP e AR, respectivamente, com os tempos de sobrevivência de cada animal (Tempo), quantos animais estavam em risco naquele período (Risco), quantos óbitos ocorreram no período (Óbito), probabilidade de sobrevivência além daquele período de tempo (Sobrevivência), o erro padrão associado àquela probabilidade de sobrevivência (Erro padrão) e o intervalo de confiança de 95% inferior (IC 95% inferior) e superior (IC 95% superior) da probabilidade de sobrevivência.

Quadro 17 - Resumo das estimativas do modelo de *Kaplan-Meier* de sobrevivência dos 22 animais que tiveram remissão completa. São Paulo, 2022.

Tempo	Risco	Óbito	Sobrevivência	Erro Padrão	IC 95% Inferior	IC 95% superior
5	22	1	0.955	0.0444	0.871	1.000
15	19	1	0.904	0.0645	0.786	1.000

16	18	1	0.854	0.0781	0.714	1.000
21	16	1	0.801	0.0896	0.643	0.997
22	15	1	0.747	0.0983	0.578	0.967
24	13	1	0.690	0.1062	0.510	0.933
25	12	1	0.632	0.1118	0.447	0.894
27	11	1	0.575	0.1155	0.388	0.852
29	8	1	0.503	0.1214	0.313	0.807
37	5	1	0.402	0.1324	0.211	0.767
48	3	1	0.268	0.1406	0.096	0.750

Fonte: FILGUEIRA (2022).

Dos 22 animais acometidos pelo linfoma intestinal e com RC para a terapia antineoplásica, 11 (50%) vieram a óbito devido a neoplasia em até 27 meses; o risco de óbito foi menor nos primeiros meses de observação, com aumento ao decorrer do tempo; ao final 2 (9%) dos animais ainda estavam presentes no estudo (Quadro 17).

Quadro 18 - Resumo das estimativas do modelo de *Kaplan-Meier* de sobrevivência dos 4 animais que tiveram remissão parcial. São Paulo, 2022.

Tempo	Risco	Óbito	Sobrevivência	Erro Padrão	IC 95% Inferior	IC 95% Superior
5	4	1	0.75	0.217	0.4259	1
7	3	2	0.25	0.217	0.0458	1
10	1	1	0.00	-	-	-

Fonte: FILGUEIRA (2022).

Dos 4 animais acometidos por linfoma intestinal e com RP para a terapia antineoplásica, todos (100%) vieram a óbito devido a neoplasia em até 10 meses; conseqüentemente, ao final nenhum animal estava presente no estudo (Quadro 18).

Quadro 19 - Resumo das estimativas do modelo de *Kaplan-Meier* de sobrevivência dos 4 animais que tiveram ausência de remissão. São Paulo, 2022.

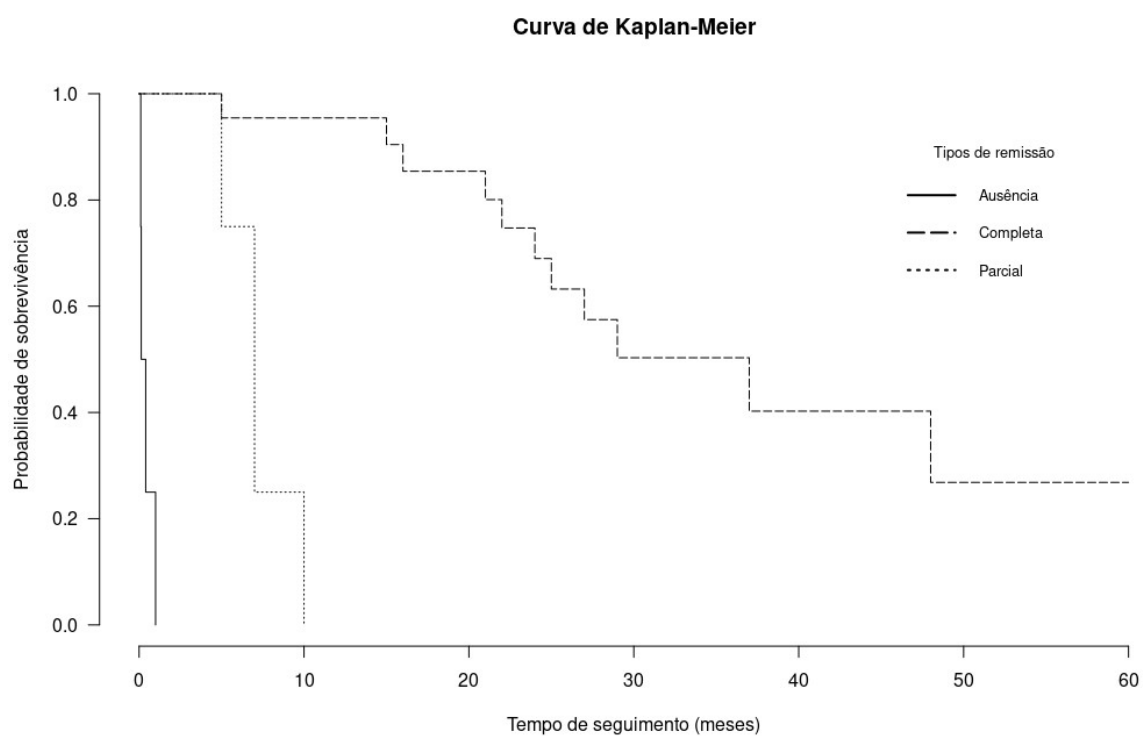
Tempo	Risco	Óbito	Sobrevivência	Erro Padrão	IC 95% Inferior	IC 95% Superior
0.10	4	1	0.75	0.217	0.4259	1
0.13	3	1	0.50	0.250	0.1877	1
0.40	2	1	0.25	0.217	0.0458	1
1.00	1	1	0.00	-	-	-

Fonte: FILGUEIRA (2022).

Dos 4 animais acometidos por linfoma intestinal e com AR para a terapia antineoplásica, todos (100%) vieram a óbito devido neoplasia em até 1 mês; conseqüentemente, ao final nenhum animal deste grupo estava presente no estudo (Quadro 19).

A figura 6 apresenta a estimativa da probabilidade de sobrevivência *versus* o tipo de resposta terapêutica; quando comparadas apresentaram diferença ($p < 0.01$), sendo que do total de animais que apresentaram RC, observou-se uma baixa probabilidade (26.8%) de permanecerem vivos ao final do seguimento e constatou-se que aproximadamente metade dos felinos (11) sobreviveram até 27 meses (Quadro 17). Em relação a RP, nenhum animal estava vivo além de 10 meses (Quadro 18). Para a AR, nenhum animal estava vivo além de 1 mês (Quadro 19).

Figura 6 - Estimativa da probabilidade de sobrevivência (método de *Kaplan-Meier*) dos animais com linfoma intestinal felino segundo o tipo de remissão.



Fonte: FILGUEIRA (2022).

8. DISCUSSÃO

Conforme alguns pesquisadores, os gatos acometidos por linfoma intestinal não possuem definição racial em sua maioria (50 a 90%), dentro das populações estudadas. Os animais com padrão racial definido aparecem com menor frequência, (10 a 31%), onde os siameses foram os mais representativos (RECHE-JÚNIOR *et al.*, 2010; MARSILIO *et al.*, 2019a; LEITE-FILHO *et al.*, 2020). Os dados obtidos no presente estudo foram similares aos dos autores supracitados. A hegemonia de animais sem definição racial possivelmente tiveram influência não por alguma predisposição mas por apresentarem maior popularidade dentre os felinos estudados. Os felinos machos parecem ser mais acometidos, pois geralmente exibem um percentual mais elevado (60%) em detrimento das fêmeas (40%) (RECHE-JÚNIOR *et al.*, 2010; LEITE-FILHO *et al.*, 2020). Na pesquisa em discussão, não se verificou diferença estatística entre os sexos; embora a literatura cite um discreto percentual adicional de machos em relação as fêmeas, os resultados são similares aos encontrados na presente pesquisa, o que pode pôr em discussão se realmente ocorre predisposição sexual.

Os gatos com linfoma intestinal podem ser negativos para antígenos do FeLV mas positivos em ensaios de imunistoquímica e PCR (AMORIM DA COSTA; SOUZA; DAMICO, 2017). Ao se comparar as metodologias, a positividade para o FeLV é de 0.0% na triagem sorológica mas esse valor pode aumentar ao ponto de envolver mais da metade dos animais, ao se usar técnicas de diagnósticas mais avançadas como a imunistoquímica e PCR (RECHE-JÚNIOR *et al.*, 2010; LEITE-FILHO *et al.*, 2020). Já em relação a pesquisa pelo FIV, a divergência entre os métodos de diagnóstico foi menor, variando de 19 a 22% (para a sorologia e imunistoquímica, respectivamente) (CRISTO *et al.*, 2018; MARSILIO *et al.*, 2019a). Ao se verificar a infecção concomitante por ambos retrovírus, a maioria dos felinos acometidos pelo linfoma intestinal foram negativos, por meio de técnicas sorológicas (BARRIGA, 2013); ao se analisar a mesma condição porém com o advento da imunistoquímica, o valor obtido foi de 10.4% (LEITE-FILHO *et al.*, 2020). No presente trabalho, o fato de a maioria dos animais terem apresentado negatividade para ambas retrovirose poderia ser explicado pelo uso de métodos de diagnóstico de triagem, pois houve impossibilidade de implementar técnicas mais avançadas; caso tivesse existido a possibilidade de diagnóstico por métodos moleculares, os

resultados poderiam ser mais expressivos; ou seja, dentre a população estudada pode ter ocorrido a presença de animais falso-negativos.

A tênue distinção entre DII e linfoma intestinal, associada a relutância dos tutores em autorizar a biopsia intestinal para tentar obter um diagnóstico definitivo, resulta por vezes na prescrição de corticosteroides pelo médico veterinário (KANO *et al.*, 2008). Essa situação já foi constatada com uma frequência de 38% no Hospital Veterinário da Universidade da Pensilvânia (Filadélfia, EUA) (POPE *et al.*, 2015). Contudo, o uso prévio e prolongado de corticosteroides, antes da definição de um diagnóstico conclusivo, pode induzir a resistência a múltiplos quimioterápicos, afetando negativamente o tratamento (POPE *et al.*, 2015; AMORIM DA COSTA; SOUZA; DAMICO, 2017). Na pesquisa em foco, a prática de terapia empírica ou presuntiva, previamente ao diagnóstico definitivo, foi bem menos frequente, o que pode inferir a uma maior conscientização por parte do médico veterinário paulistano e adesão dos tutores as recomendações impostas pelo profissional.

Em gatos com diagnóstico confirmado de linfoma intestinal e tratados com prednisolona e clorambucil, verificou-se que 56 a 75% possuíam RC, 16 a 39% com RP e 5 a 9% com AR (RECHE-JÚNIOR *et al.*, 2010; PAULIN *et al.*, 2018). Principalmente em relação a RC e RP, detectou-se semelhança com a literatura, o que demonstra a credibilidade dos autores mencionados pois foi possível a replicação das suas metodologias e obtenção de dados similares. Verificou-se na literatura que de 25 a 28% dos gatos, vieram a óbito relacionado ao linfoma intestinal e 37% estavam vivos até o momento final da análise (STEIN *et al.*, 2010). A maior taxa de óbito na tese em julgamento, poderia ter como argumento a resposta positiva a hipótese científica, ou seja, prognóstico ruim para a maioria dos animais com valores mais elevados para fatores antiapoptóticos e reduzidos para os fatores próapoptóticos.

O peso inicial, anteriormente ao tratamento quimioterápico oscilou, de acordo com alguns autores, de 3.6 a 5Kg (RECHE-JÚNIOR *et al.*, 2010; MARSILIO *et al.*, 2019a). Em relação ao ECC, existem autores citando que geralmente os gatos tinham um ECC abaixo do ideal (SILVA *et al.*, 2018) enquanto outros demonstraram que os animais possuíam um ECC ideal (4-5) ou até chegando a valores de 9, onde o animal é considerado como obeso (MARSILIO *et al.*, 2019a), sempre com base no consagrado estudo de Laflamme (1997). No experimento em discussão, a maior parte dos gatos se enquadraram no limite máximo de peso ao comparar com as

informações literárias e com ECC ideal. Esses achados foram considerados como favoráveis ao prognóstico dos animais, pois é reconhecido que a perda de peso progressiva e ECC abaixo do ideal, previamente a quimioterapia antineoplásica, consistem em fatores prognósticos ruins (WINKEL e LUCAS, 2022); contudo deve-se ressaltar que, na presente pesquisa, outras variáveis influenciaram no prognóstico dos pacientes, de modo desfavorável.

A idade para a detecção do linfoma intestinal variou de 9.5 a 12 anos, com um risco aumentado a partir dos 7 anos (COUTO, 2010; RECHE-JÚNIOR *et al.*, 2010; RISSETO *et al.*, 2011; MARSILIO *et al.*, 2019a). A idade mínima observada nos gatos avaliados conduziu a categorizá-los já como adultos maduros, seguindo o consenso mais atual que estabelece as etapas da vida dos felinos (QUIMBY *et al.*, 2021); ao acatar o referido documento em até 75% da amostra existiam gatos enquadrados como seniores, com idade de 13 anos. Assim, considerando a variável idade, os pacientes estudados já estavam sob risco para o desenvolvimento do linfoma intestinal.

Em carcinomas esofágicos humanos, estudos imunoistoquímicos mostraram que a Caspase-3 foi expressa em 55.4 a 79.7% dos casos (WANG *et al.*, 2014). Na espécie felina, estudos imunoistoquímicos aplicados ao linfoma gastrintestinal, mostraram a expressão de Bcl-2 em 90% dos casos (SWANSON *et al.*, 2012). Detectou-se que, em média, 64% das neoplasias mamárias das fêmeas caninas revelaram positividade para Bax (KUMARAGURUPARAN *et al.*, 2006). No estudo apresentado, a alta imunoexpressão para os escores do fator antiapoptótico Bcl-2 e a baixa imunoexpressão para os escores do fator próapoptótico Caspase-3, foram consideradas como umas das variáveis que influenciaram no prognóstico dos pacientes, de modo desfavorável. Já foi constatado que em neoplasias mamárias caninas, a razão Bcl-2/Bax mostrou-se aumentada em até de 2 vezes ao ponto de corte (KUMARAGURUPARAN *et al.*, 2006). Uma das respostas obtidas para a hipótese do estudo em discussão, ou seja, elevadas razões Bcl-2/Bax para a maioria dos animais, foi de encontro com a citação acima mencionada.

Conforme as pesquisas de Reche-Júnior *et al.* (2010) e Barriga (2013), dentre os resultados condizentes com linfoma alimentar felino, o predomínio foi do linfoma linfocítico (45 a 50%) seguido do tipo histológico linfoblástico (15 a 34.4%) e 7.5 a 16% classificados como linfoma de células intermediárias. A sobrevida de gatos acometidos por linfoma intestinal do tipo linfocítico (baixo grau ou de pequenas

células) e tratados com a associação do clorambucil e prednisolona oscilou de 15 a 21 meses (KISELOW *et al.*, 2008; LINGARD *et al.*, 2009). Tais resultados foram similares aos encontrados na presente pesquisa uma vez que o tipo histológico predominante foi o de baixo grau, o que pode conceder ao animal um maior tempo de sobrevida, diferentemente de outras formas mais agressivas do linfoma intestinal felino. Em estudos nacionais e internacionais, 70 a 80% dos linfomas gastrintestinais felinos, eram do imunofenótipo T, sendo a minoria (12.5 a 30%) do tipo B (MOORE; RODRIGUES-BERTOS; KASS, 2012; BARRIGA, 2013; LEITE-FILHO *et al.*, 2020). O linfoma linfocítico geralmente envolve células T (KISELOW *et al.*, 2008; RECHE-JÚNIOR *et al.*, 2010; SIMPSON, 2017; MARSILIO *et al.*, 2019a; MARDEEL, 2020). Na tese em questionamento, o tipo histológico preponderante foi o linfocítico (baixo grau), assim como o imunofenótipo T, concordando com os estudos de outros autores; essas informações aliadas com a menção literária, por vários grupos de estudos, da relação do imunofenótipo T com o tipo histológico linfocítico, foram consideradas como uma das variáveis com implicação prognóstica favorável.

Em tecidos de neoplasias esofágicas humanas, quando era atribuído um baixo escore para a Caspase-3 (ou seja, expressão reduzida de Caspase-3), havia associação com o aumento no potencial de malignidade e diminuição da sobrevida (WANG *et al.*, 2014). Como a maior parte dos linfomas avaliados apresentou escore 0 para imunexpressão de Caspase-3, tal fato possivelmente justificou os casos de pior desfecho clínico-terapêutico. A expressão e ativação da Caspase-3 representa um passo importante na morte celular por via apoptótica. O aumento da expressão de Caspase-3 foi positivamente correlacionado com bom prognóstico em pacientes oncológicos. Em contraste, uma diminuição na expressão de Caspase-3 foi identificada em pacientes com prognóstico ruim. Em humanos, a Caspase-3 são potenciais marcadores prognósticos para homens afetados por câncer prostático (ACAR *et al.*, 2021).

Em seres humanos portadores de linfoma de grandes células B, o oncogene antiapoptótico Bcl-2 confere um impacto prognóstico negativo quando superexpresso (DAMLAJ *et al.*, 2019). Embora o imunofenótipo B tenha sido pouco frequente no estudo em discussão, a superexpressão de Bcl-2, e seus altos escores de marcação imunoistoquímica, foi o suficiente para justificar a gravidade de alguns casos.

Em neoplasias do sistema nervoso central, de seres humanos, a expressão diminuída de Bax correlacionou-se com mau prognóstico (WANG *et al.*, 2019). Em neoplasias mamárias da mulher e da cadela, a baixa expressão para Bax, facilitou a evasão da apoptose nas células neoplásicas e contribuiu para o desenvolvimento do fenótipo maligno (KUMARAGURUPARAN *et al.*, 2006). Logo, os escores atribuídos a proteína Bax no tecido neoplásico, podem ser usados como um marcador prognóstico (WANG *et al.*, 2019). Embora seja um fator imunistoquímico de prognóstico útil, não foi possível realizar inferências, com validade estatística, da expressão deste agente próapoptótico para o linfoma intestinal felino devido ao baixo número de animais (30) avaliados.

Em cães, acometidos por linfoma multicêntrico, quando havia uma maior razão Bcl-2/Bax no tecido neoplásico, a sobrevida livre de progressão tumoral era mais curta em comparação aos pacientes que possuíram uma razão numérica menor. O valor da razão Bcl-2/Bax pode corresponder a uma importante informação prognóstica para cães com neoplasia linfoide (MEINCHER *et al.*, 2016). De forma inédita, o presente trabalho concedeu para a oncologia felina, e em particular para o linfoma intestinal, valores padronizados para a razão Bcl-2/Bax e suas relações com o prognóstico.

Em gatos com diagnóstico confirmado de linfoma intestinal, do tipo linfocítico ou de baixo grau, e tratados com prednisolona e clorambucil, verificou-se que 56 a 66% possuíram RC, 39% com RP e apenas 5 a 10% com AR (RICHTER, 2003; PAULIN *et al.*, 2018). Para o tipos histológicos linfoblástico (alto grau) e de células intermediárias prevalece uma resposta terapêutica ruim, com maior percentual de RP e AR e baixo índice de RC (RICHTER, 2003; TIDD *et al.*, 2019; GIEGER; SEILER; NOLAM, 2021). Essa relação do tipo histológico com a resposta terapêutica, foi reproduzida similarmente no experimento em discussão; realmente aqueles linfomas de baixo grau, em sua maioria, exibiam uma RC, já que a malignidade não era tão intensa, diferentemente dos outros tipos de maior agressividade biológica, como o linfoblástico e o de células intermediárias, nos quais a AR foi um achado comum. Essa relação traz à tona variáveis adicionais a serem empregadas no linfoma intestinal felino.

A resposta dos gatos ao tratamento é individual e depende de alguns fatores, mas aqueles com linfoma linfocítico de imunofenótipo T apresentaram melhor resposta ao tratamento, diferentemente dos pacientes com imunofenotipagem para

células B, seja para o linfoma linfoblástico ou linfoma de células intermediárias (MOORE *et al.*, 2005; WINKEL e LUCAS, 2022). A citação desses autores é condizente com os achados da pesquisa em foco. A maioria dos linfomas de células T revelaram RC ou RP (e uma menor proporção de AR), diferentemente do imunofenótipo B; isso confirma a influência do imunofenótipo com o prognóstico e assim reforça a importância da solicitação da análise imunoistoquímica além da histopatologia clássica para os casos de linfoma intestinal em gatos.

Diferentemente da medicina veterinária, na oncologia humana tem-se o conhecimento, para vários tipos de cânceres, da imunoexpressão da Caspase-3 com a resposta às estratégias terapêuticas. Em pacientes com câncer de próstata, câncer colorretal, câncer de bexiga e carcinoma de células escamosas oral, uma forte expressão de Caspase-3 relacionou-se com respostas terapêuticas satisfatórias em detrimento dos casos em que a tal molécula próapoptótica era subexpressa (WANG *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2018; ACAR *et al.*, 2021). Na presente pesquisa, baixos escores para a imunoexpressão da Caspase-3 relacionou-se com melhor prognóstico (maior índice de RC), sendo teoricamente esperado que baixos escores da Caspase-3 estivessem relacionados com um maior percentual de RP ou AR ou altos escores da Caspase-3 estivessem relacionados com um maior percentual de RC, em virtude do seu papel próapoptótico; a justificativa para a não obtenção desses resultados poderia ser pelo fato do número amostral ter sido um tanto reduzido e/ou necessidade de maior tempo de observação e delineamento prospectivo do estudo. Infelizmente os achados obtidos não elucidaram claramente o papel da Caspase-3 frente a resposta terapêutica dos pacientes felinos portadores de linfoma intestinal.

Na quimioterapia oncológica, de cães e seres humanos, encontrou-se mais notoriamente a relação da superexpressão de Bcl-2 com tipo de resposta terapêutica (em geral era de RP a AR) (KANO *et al.*, 2008; FLÓREZ *et al.*, 2016; DAMLAJ *et al.*, 2019; De NARDI *et al.*, 2022). No experimento em evidência, altos escores para a imunoexpressão do Bcl-2 relacionou-se com maior índice de RC, sendo teoricamente esperado que altos escores do Bcl-2 tivessem relação com um maior percentual de RP ou AR, em virtude do seu papel antiapoptótico; a justificativa para a não obtenção desse resultado poderia ser explicado similarmente ao que ocorreu com os achados da Caspase-3 frente o tipo de resposta terapêutica. No presente estudo, o fato do tipo de resposta terapêutica não ter sido associado a

imunoexpressão e valores dos escore de Bax e razão Bcl-2/Bax, provavelmente justificou-se pelo número de amostras ser pequeno (apenas 30 animais), diferentemente de outras pesquisas, no âmbito da medicina interna canina quanto na medicina humana (WANG *et al.*, 2014; MEINCHER *et al.*, 2016; KUMARAGURUPARAN *et al.*, 2006). Com base na literatura revisada, os resultados da relação da resposta a quimioterapia antineoplásica com a imunoexpressão de Bcl-2, Bax e razão Bcl-2/Bax, até então não eram reconhecidos na oncologia felina, seja para neoplasias hematopoiéticas ou não, o que confere uma caráter inédito para os achados do trabalho em questão, apesar das divergências em alguns resultados.

A inexistência da associação entre o tempo de sobrevida geral e os tipos histológicos, assim como da imunofenotipagem e da imunomarcação da Caspase-3, justificou-se pelo fato de as amostras desse estudo terem demonstrado que a proporção dos tempos de sobrevida geral foram homogêneos em relação ao tipo histológico, imunofenótipo e expressão para Caspase-3. Contudo, as amostras desse estudo demonstraram que a proporção do tempo de sobrevida de até 1 mês foi heterogêneo em relação ao tipo histológico e imunistoquímico assim como para a Caspase-3, explicando o motivo de o tempo de sobrevida de até um 1 mês ter sido dependente dos tipos histológicos, imunistoquímicos e expressão da Caspase-3. Para o linfoma linfocítico, a mediana geral do tempo de sobrevivência foi de 24 a 48 meses (VAIL e PINKERTON, 2020) enquanto para o linfoma linfoblástico, os tempos médios de sobrevivência foi de 3 a 6 meses (TIDD *et al.*, 2019). O linfoma de células T relaciona-se com uma sobrevida mediana de 29 meses em detrimento ao linfoma de células B que carrega uma sobrevida mediana de apenas 3.5 meses (MOORE; RODRIGUES-BERTOS; KASS, 2012). Em seres humanos, com carcinoma esofágico, a sobrevida foi de 23 meses quando ocorria a expressão de Caspase-3 (WANG *et al.*, 2014). Em cães acometidos por osteossarcoma, não foram encontradas relações entre a expressão da Caspase-3 ativa com parâmetros clínico-patológicos (BONGIOVANNI *et al.*, 2012).

A ausência da associação entre o tempo de sobrevida com imunomarcação para Bcl-2 e Bax, além da razão Bcl-2/Bax, justificou-se pelo fato de as amostras desse estudo terem demonstrado que a proporção dos tempos de sobrevida geral foram homogêneos em relação a expressão Bcl-2, Bax, além da razão Bcl-2/Bax. No presente experimento, a impossibilidade de encontrar associação do óbito dos gatos em decorrência do linfoma intestinal, justificou-se devido ao baixo número de

amostras testadas; além disso, as amostras deste estudo demonstraram que a proporção do óbito em decorrência da doença foi homogênea em relação a: tipo histológico, imunofenotipagem, imunexpressão de: Caspase-3, Bcl-2, Bax e razão de Bcl-2/Bax. Em termos estatísticos, o resultado do teste (valor de p calculado) pode não ser tão preciso quando o número de amostras é pequena (o que houve em todas as comparações). Logo, ocorreu divergência em relação as pesquisas em seres humanos, cães e até mesmo na espécie felina (KUMARAGURUPARAN *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2014; MEINCHER *et al.*, 2016; DAMLAJ *et al.*, 2019; ACAR *et al.*, 2021). Em vários estudos, correlatos ao tema em discussão, constataram que não existiu a forte influência do número amostral sobre as variáveis dentro das populações analisadas (RICHTER, 2003; PAULIN *et al.*, 2018; TIDD *et al.*, 2019; GIEGER; SEILER; NOLAM, 2021). Assim, na pesquisa em pauta, para melhor compreensão, o baixo número amostral diminuiu o poder estatístico do teste, isto é, diminuiu a chance de detectar um efeito, quando o mesmo realmente existiu; em outras palavras, diminuiu a capacidade de diferenciar um efeito real de um efeito aleatório do estudo.

Entende-se como fatores prognósticos, aqueles que indicam o risco de recidiva ou de óbito; são marcadores associados ao tempo livre de doença ou sobrevida global (AZAMBUJA, 2007; BHARGAVA *et al.*, 2008; STOCKMANS *et al.*, 2008). No linfoma intestinal felino, o prognóstico oscila de acordo com classificação histopatológica, estadiamento clínico tumoral, perda de peso, infecções retrovirais, presença de comorbidades (VAIL e PINKERTON, 2020; WINKEL e LUCAS, 2022). Dentre as comorbidades mais comuns dos gatos adultos maduros a seniores destacam-se a doença renal crônica, DII, hipertireoidismo, cardiomiopatia hipertrófica, neoplasias de outras origens celulares, doença articular degenerativa e síndrome da disfunção cognitiva (SALA, 2014; QUIMBY *et al.*, 2021). O imunofenótipo também possui relação com o prognóstico; os pacientes com linfoma intestinal de pequenas células T sobrevivem por mais tempo em comparação aos linfomas de grandes células B (WOLFESBERGER *et al.*, 2017); no linfoma de células T é observada uma sobrevida mediana de 29 meses em detrimento ao linfoma de células B que carrega uma sobrevida de apenas 3.5 meses (KIUPEL *et al.*, 2011). Entretanto, não houve diferença quanto a sobrevivência ou óbito em relação a presença de comorbidades e imunofenotipagem, nos felinos do presente estudo. Tal fato pode ter sido justificado por uma limitação do teste de *Log-Rank*, onde as

aproximações assintóticas das distribuições do teste podem ser imprecisas quando os tamanhos das amostras são pequenos e/ou desequilibrados ou quando as distribuições de censura subjacentes diferem entre os grupos (WANG; LAGAKOS; GRAY, 2010). Assim, o poder do teste se torna fraco e conseqüentemente o resultado (valor de p calculado) pode não ser tão preciso. Contudo a análise de sobrevivência pelo modelo de *Kaplan-Meier* permitiu estimar a probabilidade de sobrevivência dos animais acometidos pelo linfoma intestinal, com base em outras variáveis, como o tipo histológico do linfoma intestinal e o tipo de resposta terapêutica (ou tipo de remissão) mediante a terapia antineoplásica.

Gatos com linfoma intestinal, essencialmente quando classificado de baixo grau, apresentam RC completa acima de $\frac{3}{4}$ dos casos, associado a um maior tempo de sobrevida, geralmente até 48 meses ou mais (VAIL e PINKERTON, 2020). No entanto, no presente estudo, considerando o mesmo tipo histológico e o intervalo de tempo supracitado, quase a totalidade dos animais vieram ao óbito em virtude da doença. Em decorrência da malignidade mais tênue do linfoma linfocítico e da sua relação estatística com um percentual de RC em mais da metade da população estudada, era previsto um maior tempo de sobrevida. Possivelmente o número amostral foi um fator limitante para alcançar o resultado até então esperado, restringindo-se na obtenção de um tempo de sobrevida mais curto em mais da metade do número amostral. Para as outras formas histológicas (linfoma linfoblástico e linfoma de células intermediárias), o curso da doença é rápido e mais grave, conduzindo a uma curta sobrevida (LOUWERENS *et al.*, 2005). Esta citação condiz com o resultado visto no estudo em discussão, uma vez que mais da metade dos gatos portadores de linfoma intestinal com maior grau de malignidade, vieram a óbito em um período inferior a um semestre. A resposta à poliquimioterapia para os tipos histológicos mais malignos é menos previsível, com taxas de resposta em menos de 50% da população. A durabilidade da resposta também tende a ser menos favorável, com tempos de sobrevivência entre 3 a 6 meses (TIDD *et al.*, 2019). Esses padrões histológicos com respectivos potenciais de malignidades poderiam explicar os casos de RP e AR frente a probabilidade de sobrevivência e de óbito. Conforme o tipo de resposta terapêutica, fosse linfoma linfocítico, linfoblástico ou de células intermediárias, era esperado uma oscilação no tempo de sobrevida, sendo maior para RC e menor para RP ou AR. Realmente tal fato ocorreu no presente estudo, mas com resultados inferiores aos esperados, com base nos dados literários

revisados. Novamente, o número amostral do experimento pode ter sido um fator limitante na aspiração dos resultados teoricamente previstos.

Como limitações do presente estudo, teve-se o baixo número amostral, o que pode ter impedido validar estatisticamente alguns resultados; se uma população maior tivesse sido analisada, provavelmente seriam obtidos resultados significativos para algumas variáveis. Todavia, embora com a restrição amostral, pode-se detectar algumas respostas relevantes e com comprovação estatística, emergindo informações inéditas referentes a imunoexpressão de marcadores pró ou antiapoptóticos no linfoma intestinal felino e sua contribuição prognóstica para os pacientes. Baixos níveis para o escore do imunomarcador próapoptótico Caspase – 3 e uma alta razão Bcl-2/Bax (conforme o ponto de corte estabelecido) foram verificados em mais da metade dos animais, onde esses achados podem ser relacionados com um prognóstico ruim para os felinos avaliados.

9. CONCLUSÕES

- Houve imunexpressão da Caspase-3, Bcl-2 e Bax no linfoma intestinal felino, em diferentes escores, e nem todos se relacionaram com o desfecho clínico-terapêutico dos pacientes.
- O tipo histológico linfocítico foi o mais prevalente dentre os casos de linfoma intestinal felino.
- O imunofenótipo para células T foi o mais prevalente dentre os casos de linfoma intestinal felino.
- Baixos escores (0 e 1) foram os mais expressos para Caspase-3; Escore alto (4) foi o mais expresso para Bcl-2; não houve diferença entre as expressões dos escores de Bax (0 a 12).
- O tipo de resposta terapêutica foi dependente do tipo histológico; os linfomas linfocíticos geralmente resultaram em uma RC, enquanto os linfomas linfoblásticos tiveram RC ou AR e o linfoma de células intermediárias só apresentou AR.
- O tipo de resposta terapêutica foi dependente da imunofenotipagem; os linfomas de células T geralmente resultaram em uma RC, enquanto linfomas de células B tiveram RC ou AR.
- O tipo de resposta terapêutica foi dependente da imunexpressão de Caspase-3. A maioria dos animais, com RC, possuiu associação com o escore 0.
- O tipo de resposta terapêutica foi associado a imunexpressão de Bcl-2. A maioria dos animais possuíram RC associada ao escore 4.
- O tipo de resposta terapêutica não foi associado a imunexpressão de Bax nem com a razão Bcl-2/Bax.

- O tempo de sobrevida geral não foi dependente dos tipos histológicos; porém, ocorreu associação entre o tempo de sobrevida de até 1 mês e os tipos histológicos.
- O tempo de sobrevida geral não foi dependente da imunofenotipagem; porém, houve associação entre o tempo de sobrevida de até 1 mês e a imunofenotipagem.
- O tempo de sobrevida geral não foi dependente da imunoexpressão de Caspase-3; porém ocorreu associação entre o tempo de sobrevida de até 1 mês e a imunoexpressão de Caspase-3.
- O tempo de sobrevida geral não foi dependente da imunoexpressão de Bcl-2 e Bax e da razão Bcl-2/Bax.
- Não existiu associação entre o óbito em decorrência da doença e os tipos histológicos, imunofenotipagem e nas imunoexpressões de Caspase-3, Bcl-2 e Bax e também para a razão Bcl-2/Bax.
- Estudos futuros tornam-se necessários, sejam retrospectivos mas como maior número amostral, ou preferencialmente prospectivos, para a melhor compreensão da imunoexpressão dos fatores pró e antiapoptóticos no linfoma intestinal felino e sua concreta relação com o prognóstico dos animais acometidos pela enfermidade neoplásica. O presente estudo foi um marco inicial para alcançar tal propósito.

REFERÊNCIAS

ABREU, A.; KOIFMAN, S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n.1, p. 113-131, 2002.

ACAR, V.; FERNANDEZ, F. L. C.; BUSCARIOLO, F. F.; NOVAIS, A. A.; PEREIRA, R. A. M.; ZUCCARI, D. A. P. C. Immunohistochemical evaluation of PARP and Caspase-3 as prognostic markers in prostate carcinomas. **Clinical Medicine & Research**, v. 19, n. 3, p.183-191, 2021.

AL-GHAZLAT, S.; REZENDE, C. E.; FERRERI, J. Feline small cell lymphoma versus inflammatory bowel disease: diagnostic challenges. **Compendium: continuing education for veterinarians**, v. 35, n. 6, p. 1-5, 2013.

AMORIM DA COSTA, F. V.; SOUZA, H. J.; DAMICO, C. B. Linfoma e desordens mieloproliferativas em felinos. In: AMORIM DA COSTA, F. V.; SOUZA, H. J.; CUNHA, S. C. S.; CORGOZINHO, K. B. (Org.). **Oncologia felina**. Rio de Janeiro: LF Livros, 2017. Cap. 15, parte 2, p. 315-356.

ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, v. 1, n. 1, p. 37-58, 2007.

ARESU, L.; ARICÒ, A.; FERRARESSO, S.; MARTINI, V.; COMAZZI, S.; RIONDATO, F.; GIANTIN, M.; DACASTO, M.; GUADAGNIN, E.; FRAYSSINET, P.; ROQUET, N.; DRIGO, M.; MARCONATO, L. Minimal residual disease detection by flow cytometry and PARR in lymph node, peripheral blood and bone marrow, following treatment of dogs with diffuse large B-cell lymphoma. **The Veterinary Journal**, v. 200, n. 2, p. 318-324, 2014.

ARYA, V.; SINGH, S.; DANIEL, M. J. Clinicopathological correlation of Bcl-2 oncoprotein expression in oral precancer and cancer. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 6, n. 1, p. 18-23, 2016.

AZAMBUJA, E. **Marcadores prognósticos e preditivos e sua importância na individualização do tratamento de pacientes com câncer de mama**. 2007. 304 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS.

AZMI, A. S.; WANG, Z.; PHILIP, P. A.; MOHAMMAD, R. M.; SARKAR, F. H. Emerging Bcl-2 inhibitors for the treatment of cancer. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 16, n. 1, p. 59-70, 2011.

BARALON, P.; BLÄTTNER, A.; LITTLE, G.; MERCADER, P. **Como desenvolver seu negócio para gatos**. Aimargues: Royal Canin, 2012. 51 p.

BARRA, C. N.; MACEDO, B. M.; CADROBBI, K. G.; PULZ, L. H.; HUETE, G. C.; KLEEB, S. R.; XAVIER, J. G.; CATÃO-DIAS, J. L.; NISHIYA, A. T.; FUKUMASU, H.; STREFEZZI, R. F. Apoptotic intrinsic pathway proteins predict survival in canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 16, n. 1, p. 38-44, 2018.

BARRIGA, V. M. **Avaliação citológica, histológica e imunoistoquímica do linfoma alimentar em felinos domésticos**. 2013. 87 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP.

BARRS, V.; BEATTY, J. Feline alimentary lymphoma: classification, risk factors, clinical signs and non-invasive diagnostics. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 14, n. 3, p. 182–190, 2012a.

BARRS, V.; BEATTY, J. Feline alimentary lymphoma: further diagnostics, therapy and prognosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 14, n. 3, p. 191–201, 2012b.

BARRS, V.; BEATTY, J.; MCCANDLISH, I. A.; KIPAR, A. Hypereosinophilic paraneoplastic syndrome in a cat with intestinal T cell lymphosarcoma. **Journal of Small Animal Practice**, v. 43, n. 9, p. 401-404, 2002.

BEATTY, J. Viral causes of feline lymphoma: retroviruses and beyond. **The Veterinary Journal**, v. 210, n. 2, p. 174–18, 2014.

BERTONE, E. R.; SNYDER, L. A.; MOORE, A. S. Environmental tobacco smoke and risk of malignant lymphoma in pet cats. **American Journal of Epidemiology**, v. 156, n. 3, p. 268-273, 2002.

BEZERRA, A. M. P. S.; PASQUALIN, D. S.; GUERRA, J. C. C.; COLOMBINI, M. P.; VELLOSO, E. D. R. P.; SILVEIRA, P. A. A.; MANGUEIRA, C. L. P.; KANAYAMA, R. H.; NOZAWA, S. T.; CORREIA, R.; APELLE, A. C.; PEREIRA, W. O.; GARCIA, R. G.; BACAL, N. S. Correlação entre citometria de fluxo e anatomia patológica: experiência de dez anos na investigação de doenças linfoproliferativas. **Einstein**, v. 9, n. 22, p. 151-159, 2011.

BHARGAVA, R.; BERIWAL, S.; MCMANUS, K.; DABBS, D. J. CK5 is more sensitive than CK5/6 in identifying the “basal-like” phenotype of breast carcinoma. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 130, n. 5, p. 724-730, 2008.

BONITA, R.; BEAGLEHOLE, R.; KJELLSTRÖM, T. **Epidemiologia básica**. 2. ed. São Paulo: Santos, 2010. 213 p.

BONGIOVANNI, L.; MAZZOCCHETTI, F.; MALATESTA, D.; ROMANUCCI, M.; CICCARELLI, A.; BURACCO, P.; DE MARIA, R.; PALMIERI, C.; MARTANO, M.; MORELLO, E.; MANISCALCO, L.; SALDA, L.D. Immunohistochemical investigation of cell cycle and apoptosis regulators (Survivin, β -Catenin, P53, Caspase 3) in canine appendicular osteosarcoma. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 78, p. 1-11, 2012.

BOTTERO, E.; MUSSI, E.; PIERAMATI, C.; De LORENZI, D.; SILVESTRI, S.; LEPRI, E. Comparison of 2 differently sized endoscopic biopsy forceps in the evaluation of intestinal disease in cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 33, n. 2, p. 523-530, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual para a investigação do óbito com causa mal definida**. Brasília, DF, 2008.

BURNETT, R.C.; VERNAU, W.; MODIANO, J. F.; OLVER, C. S.; MOORE, P. F.; AVERY, A. C. Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes. **Veterinary Pathology**, v.40, n.1, p. 32-41, 2003.

BUSTAMENTE-TEIXEIRA, M. T.; FAERSTEIN, E.; LATORRE, M. R. Survival analysis techniques. **Reports in Public Health**, v. 18, n. 3, p. 579-594, 2002.

CALAZANS, S. G.; DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B. Linfomas. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B. (Org.). **Oncologia em cães e gatos**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2016. Cap. 49, p. 633-648.

CASSALI, G. D.; JARK, P. C.; GAMBA, G.; DAMASCENO, K. A.; ESTRELA-LIMA, A.; DE NARDI, A. B.; FERREIRA, E.; HORTA, R. S.; FIRMO, B. F.; SUEIRO, F. A. R.; RODRIGUES, L. C. S.; NAKAGAKI, K. Y. R. Consensus regarding the diagnosis, prognosis and treatment of canine and feline mammary tumors – 2019. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.13, n. 3, p. 555-574, 2020.

CHAVKIN, J. **CUVS Clinical Brief**: feline small cell lymphoma. Stamford: CUVS, 2018. p. 1-2, v. 1.

CHOTA, A.; GEORGE, B. P.; ABRAHAMSE, H. Interactions of multidomain pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins in cancer cell death. **Oncotarget**, v. 12, n. 16, p. 1615-1626, 2021.

COCCHIA, N.; CORTEGGIO, A.; ALTAMURA, G.; TAFURI, S.; REA, S.; ROSAPANE, I.; SICA, A.; LANDOLFI, F.; CIANI, F. The effects of superoxide dismutase addition to the transport medium on cumulus–oocyte complex apoptosis and IVF outcome in cats (*Felis catus*). **Reproductive Biology**, v. 15, n. 1, p. 56-64, 2015.

COUTO, C. G. Linfoma no cão e no gato. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. (Org.). **Medicina interna de pequenos animais**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. Cap. 80, parte 11, p. 1176-1188.

CRISTO, T. G.; BIEZUS, G.; NORONHA, L. F.; PEREIRA, L. H. H. S.; WITHOEFT, J. A.; FURLAN, L. V.; COSTA, L. S.; TRAVERSO, S. D.; CASAGRANDE, R. A. Feline lymphoma and a high correlation with feline leukaemia virus infection in Brazil. **Journal of Comparative Pathology**, v. 166, p. 20-28, 2018.

DAMICO, C. B.; SILVA, C. A. Síndromes paraneoplásicas. In: AMORIM DA COSTA, F. V.; SOUZA, H. J.; CUNHA, S. C. S.; CORGOZINHO, K. B. (Org.). **Oncologia felina**. Rio de Janeiro: LF Livros, 2017. Cap. 6, parte 1, p. 123-138.

DAMLAJ, M.; YASSIN, R.; AL-SHIEBAN, S.; PASHA, T.; ALZHRANI, M.; ALHEJAZI, A.; ALASKAR, A. Bcl-2 overexpression overcomes cell of origin stratification in diffuse large B-cell lymphoma. **Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy**, v. 12, n. 3, p. 174-177, 2019.

DE NARDI, A. B.; SANTOS HORTA, R.; FONSECA-ALVES, C. E.; DE PAIVA, F. N.; LINHARES, L. C. M.; FIRMO, B. F.; RUIZ SUEIRO, F. A.; DE OLIVEIRA, K. D.; LOURENÇO, S. V.; DE FRANCISCO STREFEZZI, R.; BRUNNER, C. H. M.; RANGEL, M. M. M.; JARK, P. C.; CASTRO, J. L. C.; UBUKATA, R.; BATSchinski, K.; SOBRAL, R. A.; DA CRUZ, N. O.; NISHIYA, A. T.; FERNANDES, S. C.; DOS SANTOS CUNHA, S. C.; GERARDI, D.; CHALLOUB, G. S. G.; BIONDI, L. R.; LAUFER-AMORIM, R.; PAES, P. R. O.; LAVALLE, G. E.; HUPPES, R. R.; GRANDI, F.; VASCONCELLOS, C. H. C.; DOS ANJOS, D. S.; LUZO, A. C. M.; MATERA, J. M.; VOZDOVA, M.; ZAIDAN DAGLI, M. L. Diagnosis, prognosis and treatment of canine cutaneous and subcutaneous mast cell tumors. **Cells**, v. 11, n. 618, p. 1-37, 2022.

DOWLE, M.; SRINIVASAN, A. Data.table: Extension of data.frame. R package version 1.14.0. 2021. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=data.table>; Acesso em: 27 mar. 2022.

ETTINGER, S.; LITTLE, S. Cat low-grade lymphoma versus IBD: clearing the confusion. In: WESTERN VETERINARY CONFERENCE. 2020, Las Vegas. **Proceedings....** Las Vegas, NV, USA, 2020. SA269 p.

EVANS, S. E.; BONCZYNSKI, J. J.; BROUSSARD, J. D.; HAN, E.; BAER, K. E. Comparison of endoscopic and full-thickness biopsy specimens for diagnosis of inflammatory bowel disease and alimentary tract lymphoma in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 229, n. 9, p. 1447-1450, 2006.

FERREIRA, J. C.; PATINO, C. M. O que é análise de sobrevivência e quando devo utilizá-la? **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 42, n. 1, p. 77, 2016.

FERREIRA, M. **Contribuição do exame ultrassonográfico para o diagnóstico das neoplasias gastrintestinais em felinos**. 2017. 105 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP.

FERRER, C. C.; BERTHENET, K.; ICHIM, G. Apoptosis – fueling the oncogenic fire. **The FEBS Journal**, v. 288, n. 15, p. 4445–4463, 2021.

FLÓREZ, M. M.; FÊO, H. B.; SILVA, G. N.; YAMATOJI, R. S.; AGUIAR, A. J. ARAÚJO-JÚNIOR, J. P.; ROCHA, N. S. Cell cycle kinetics, apoptosis rates and gene expressions of *MDR-1*, *TP53*, *BCL-2* and *BAX* in transmissible venereal tumour cells and their association with therapy response. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 15, n. 3, p. 793–807, 2016.

FONDOCARO, J. V.; RICHTER, K. P.; CARPENTER, J. L.; HART, J. R.; HILL, S. L.; FETTMAN, M.J. Feline gastrointestinal lymphoma: 67 cases (1988-1996). **European Journal of Comparative Gastroenterology**, v. 4, n. 2, p. 5-11, 1999.

FREICHE, V.; FAUCHER, M. R.; GERMAN, A. J. Can clinical signs, clinicopathological findings and abdominal ultrasonography predict the site of histopathological abnormalities of the alimentary tract in cats? **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 18, n. 2, p. 118–128, 2016.

GARRAWAY, K.; JOHANNES, C. M.; BRYAN, A.; PEAUROI, J.; ROSS, G.; ZHANG, M.; WANG, C.; ALLENSPACH, K.; JERGENS, A. E. Relationship of the mucosal microbiota to gastrointestinal inflammation and small cell intestinal

lymphoma in cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 32, n. 5, p. 1692–1702, 2018.

GIEGER, T. Alimentary lymphoma in cats and dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 41, n. 2, p. 419–432, 2011.

GIEGER, T. L.; SEILER, G. S.; NOLAM, M. W. Treatment of feline gastrointestinal intermediate or large-cell lymphoma with lomustine chemotherapy and 8 Gy abdominal cavity radiation therapy. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 23, n. 6, p. 469–476, 2021.

GOODMAN, B.; GARDNER, H. The microbiome and cancer. **Journal of Pathology**, v. 244, n. 3, p. 667–676, 2018.

GOMES, E. C. S. **Conceitos e ferramentas da epidemiologia**. Recife: Universitária da UFPE, 2015. 83 p.

GRANDI, F.; BARRA, C. N. **Citopatologia dos linfomas em cães e gatos**. São Paulo: VetSchool São Paulo, 2019. 157 p.

GRESS, V.; WOLFESBERGER, B.; FUCHS-BAUMGARTINGER, A.; NEDOROST, N.; SAALMÜLLER, A.; SCHWENDENWEIN, I.; RÜTGEN, B. C.; HAMMER, S. E. Characterization of the T-cell receptor gamma chain gene rearrangements as an adjunct tool in the diagnosis of T-cell lymphomas in the gastrointestinal tract of cats. **Research in Veterinary Science**, v. 107, p. 261-266, 2016.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 57, n. 3, p. 335-343, 2007.

GUTTIN, T.; WALSH, A.; DURHAM, A. C.; REETZ, J. A.; BROWN, D. C.; RONDEAU, M. P. Ability of ultrasonography to predict the presence and location of histologic lesions in the small intestine of cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 33, n. 3, p. 1278-1285, 2019.

HALABI, S.; OWZAR, K. The importance of identifying and validating prognostic factors in oncology. **Seminars in Oncology**, v. 37, n. 2, p. 9-18, 2010.

HORTA, R. S.; COSTA, M. P.; LAVALLE, G. E.; ARAÚJO, R. B.; CASSALI, G. D. Fatores prognósticos e preditivos dos tumores caninos definidos com auxílio da imuno-histoquímica. **Ciência Rural**, v.42, n.6, p.1033-1039, 2012.

HORTA, R. S.; SOUZA, L. M.; SENA, B. V.; ALMEIDA, I. O.; JARETTA, T. A.; PIMENTA, M. M.; RECHE-JÚNIOR, A. LOPH: a novel chemotherapeutic protocol for feline high-grade multicentric or mediastinal lymphoma, developed in an área endemic for feline leukemia virus. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 23, n. 2, p. 86–97, 2021.

JAN, R.; CHAUDHRY, G. S. Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 9, n. 2, p. 205-218, 2019.

KANO, R.; SATO, E.; OKAMURA, T.; WATANABE, S.; HASEGAWA, A. Expression of Bcl-2 in feline lymphoma cell lines. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 37, n. 1, p. 57–60, 2008.

KEMPF, J.; HERSBERGER, M.; MELLIGER, R. H.; REUSCH, C. E.; KOOK, P. H. Effects of 6 weeks of parenteral cobalamin supplementation on clinical and biochemical variables in cats with gastrointestinal disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 31, n. 6, p. 1664-1672, 2017.

KIRKIN, V.; JOOS, S.; ZÖRNIG, M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1644, n. 2-3, p. 229-249, 2004.

KISELOW, M. A.; RASSNICK, K. M.; MCDONOUGH, S. P.; GOLDSTEIN, R. E.; SIMPSON, K. W.; WEINKLE, T. K.; ERB, H. N. Outcome of cats with low-grade lymphocytic lymphoma: 41 cases (1995–2005). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 232, n. 3, p. 405-410, 2008.

KIUPEL, M.; SMEDLEY, R. C.; PFENT, C.; XIE, Y.; XUE, Y.; WISE, A. G.; DEVAUL, J. M.; MAES, R. K. Diagnostic algorithm to differentiate lymphoma from inflammation in feline small intestinal biopsy samples. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 212-222, 2011.

KRICK, E. L.; LITTLE, L.; PATEL, R.; SHOFER, F. S.; SORENMO, K.; CLIFFORD, C. A.; BAEZ, J. L. Description of clinical and pathological findings, treatment and outcome of feline large granular lymphocyte lymphoma (1996–2004). **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 6, n. 2, p. 102–110, 2008.

KUMARAGURUPARAN, R.; KARUNAGARAN, D.; BALACHANDRAN, C.; MANOHAR, B. M.; NAGINI, S. Of humans and canines: a comparative

evaluation of heat shock and apoptosis-associated proteins in mammary tumors. **Clinica Chimica Acta**, v. 365, n. 1-2, p. 168–176, 2006.

LAFLAMME, D. P. Development and validation of a body condition score system for cats: a clinical tool. **Feline Practice**, v.25, n. 5-6, p. 13-18, 1997.

LALOR, S.; SCHWARTZ, A. M.; TITMARSH, H.; REED, N.; TASKER, S.; BOLAND, L.; BERRY, J.; GUNN-MOORE, D.; MELLANBY, M. J. Cats with inflammatory bowel disease and intestinal small cell lymphoma have low serum concentrations of 25-HydroxyvitaminD. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, n. 2, p. 351-355, 2014.

LEITE-FILHO, R. V.; PANZIERA, W.; BANDINELLI, M. B.; HENKER, L. C.; MONTEIRO, K. C.; CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D.; SONNE, L.; PAVARINI, S. P. Epidemiological, pathological and immunohistochemical aspects of 125 cases of feline lymphoma in Southern Brazil. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 18, n. 2, p. 224-230, 2020.

LIANG, M.; ZHAO, J. Protein expressions of AIB1, p53 and Bcl-2 in epithelial ovarian cancer and their correlations with the clinical pathological features and prognosis. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 16, p. 5134-5138, 2018.

LIMAN, N.; ALAN, E.; BAYRAM, G. K.; GÜRBULAK, K. Expression of survivin, bcl-2 and bax proteins in the domestic cat (*Felis catus*) endometrium during the oestrus cycle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n.1, p. 33-45, 2013.

LINGARD, A. E.; BRISCOE, K.; BEATTY, J. A.; MOORE, A. S.; CROWLEY, A. M.; KROCKENBERGER, M.; CHURCHER, R. K.; CANFIELD, P. J.; BARRS, V. R. Low-grade alimentary lymphoma: clinicopathological findings and response to treatment in 17 cases. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, n. 8, p. 692-700, 2009.

LINTON, M.; NIMMO, J. S.; NORRIS, J. M.; CHURCHER, R.; HAYNES, S.; ZOLTOWSKA, A.; HUGHES, S.; LESSELS, N. S.; WRIGHT, M.; MALIK, R. Feline gastrointestinal eosinophilic sclerosing fibroplasia: 13 cases and review of an emerging clinical entity. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 17, n. 5, p. 392–404, 2015.

LIU, P. F.; HU, Y. C.; KANG, B. H.; TSENG, Y. K.; WU, P. C.; LIANG, C. C.; HOU, Y. Y.; FU, T. Y.; LIOU, H. H.; HSIEH, I. C.; GER, L. P.; SHU, C. W. Expression levels of cleaved caspase-3 and caspase-3 in tumorigenesis and prognosis of oral tongue squamous cell carcinoma. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, p. 1-14, 2017.

LOUWERENS, M.; LONDON, C. A.; PEDERSEN, N. C.; LYONS, L. A. Feline lymphoma in the post-feline leukemia virus era. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, n. 3, p. 329-335, 2005.

LUCAS, S. R. R.; RODRIGUES, L. C. S.; JARK, P. C. Síndromes paraneoplásicas associadas às neoplasias hematopoiéticas. In: JARK, P. C.; RODRIGUES, L. C. S. (Org.). **Neoplasias hematopoiéticas em cães e gatos**. São Paulo: MedVet, 2022. Cap. 9, seção III, p. 289-311.

LYU, Y.; SU, C.; VERBRUGGHE, A.; DE WIELE, T. V.; MARTINEZ-CAJA, A. M.; HESTA, M. Past, present, and future of gastrointestinal microbiota research in cats. **Frontiers in Microbiology**, v.11, n. 1661, p. 1-15, 2020.

MADEWELL, B. R.; GANDOUR-EDWARDS, R.; EDWARDS, B. F.; MATTHEWS, K. R.; GRIFFEY, S. M. Bax/bcl-2: cellular modulator of apoptosis in feline skin and basal cell tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 124, n. 2-3, p. 115-121, 2001.

MARDELL, E. Is there a link between tobacco smoke exposure and the development of alimentary lymphoma in cats? **Veterinary Record**, v. 4, n. 11, p. 411-413, 2020.

MANGIERI, J. G. Síndromes paraneoplásicas em cães e gatos. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B. (Org.). **Oncologia em cães e gatos**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2016. Cap. 25, p. 325-338.

MARSILIO, S.; ACKERMANN, M. A.; LIDBURY, J. A.; SUCHODOLSKI, J. S.; STEINER, J. M. Results of histopathology, immunohistochemistry, and molecular clonality testing of small intestinal biopsy specimens from clinically healthy client-owned cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 33, n. 2, p. 551–558, 2019a.

MARSILIO, S.; NEWMAN, S. J.; ESTEP, J. C.; GIARETTA, P. R.; LIDBURY, J. A.; WARRY, E.; FLORY, A.; MORLEY, P. S.; SMOOT, K.; SEELEY, E. H.; POWELL, M. J.; SUCHODOLSKI, J. S.; STEINER, J. M. Differentiation of lymphocytic-plasmacytic enteropathy and small cell lymphoma in cats using histology-guided mass spectrometry. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 34, n. 2, p. 669-677, 2020.

MARSILIO, S.; PILLA, R.; SARAWICHITR, B.; CHOW, B.; HILL, S. L.; ACKERMANN, M. R. Characterization of the fecal microbiome in cats with

inflammatory bowel disease or alimentary small cell lymphoma. **Scientific Reports**, v. 9. n. 19208, p. 1-11, 2019b.

MATSUURA, K.; CANFIELD, K.; FENG, W.; KUROKAWA, M. Metabolic regulation of apoptosis in cancer **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 327, p. 43-87, 2016.

McCLARAN, J. K.; SKERRETT, S. C.; CURRAO, R. L.; PAVIA, P. R.; TARVIN, K. M. Comparison of laparoscopic-assisted technique and open laparotomy for gastrointestinal biopsy in cats. **Veterinary Surgery**, v. 46, n. 6, p. 821–828, 2017.

MEICHNER, K.; FOGLE, J. E.; ENGLISH, L.; SUTER, S. E. Expression of apoptosis-regulating proteins Bcl-2 and Bax in lymph node aspirates from dogs with lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, n. 3, p. 819–826, 2016.

MOHAMMED, R. A. A.; MARTIN, S. G.; MAHMMOD, A. M.; MACMILLAM, R. D.; GREEN, A. R.; PAISH, E. C.; ELLIS, I. O. Objective assessment of lymphatic and blood vascular invasion in lymph node-negative breast carcinoma: findings from a large case series with longterm follow-up. **Journal of Pathology**, v. 223, p. 358-365, 2011.

MOORE, A. S.; OGILVIE, G. K. Managment of specific diseases – lymphoma. In: OGILVIE, G. K.; MOORE, A. S. (Org.). **Feline oncology** – a comprehensive guide to compassionate care. Trenton: Veterinary Learning Systems, 2001. Chap. 36, section VI, p. 191-219.

MOORE, P. F.; RODRIGUES-BERTOS, A.; KASS, P. H. Feline gastrointestinal lymphoma: mucosa architecture, immunophenotype and molecular clonality. **Veterinary Pathology**, v. 49, n. 4, p. 658-668, 2012.

MOORE, P. F.; WOO, J. C.; VERNAU, W.; KOSTEN, S.; GRAHAM, P. S. Characterization of feline T cell receptor gamma (TCRG) variable region genes for the molecular diagnosis of feline intestinal T cell lymphoma. **Veterinary Immunology & Immunopathology**, v. 106, n. 3-4, p. 167-178, 2005.

MORRICE, M.; POLTON, G.; BECK, S. Evaluation of the histopathological extent of neoplastic infiltration in intestinal tumours in cats. **Veterinary Medicine and Science**, v. 5, n. 3, p. 307–316, 2019.

MYERS, R. K.; McGAVIN, M. D. Respostas celulares e teciduais à lesão. In: McGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. (Org.). **Bases da patologia em veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. Cap. 1, seção I, p. 3-62.

NATONI, A.; KASS, G. E. N.; CARTER, M. J.; ROBERTS, L. O. The mitochondrial pathway of apoptosis is triggered during feline calicivirus infection. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 2, p. 357–361, 2006.

NOGUEIRA, M. M.; MELO, M. M. Linfoma alimentar linfocítico felino: uma revisão de literatura. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 14, n. 3, p. 1-14, 2020.

NORSWORTHY, G. D.; ESTEP, J. C.; HOLLINGER, C.; STEINER, J. M.; LAVALLEE, J. O.; GASSLER, L. N.; RESTINE, L. M.; KIUPEL, M. Prevalence and underlying causes of histologic abnormalities in cats suspected to have chronic small bowel disease: 300 cases (2008–2013). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 247, n. 6, p. 629-635, 2015.

PATTERSON-KANE, J. C.; B. KUGLER, P. B.; FRANCIS, K. The Possibilitie prognostic significance of immunophenotype in feline alimentary lymphoma: a pilot study. **Journal of Comparative Pathology**, v. 130, n. 2-3, p. 220-222, 2004.

PAULIN, M. V.; COURONNÉ, L.; BEGUIN, J.; PODER, S. L.; DELVERDIER, M.; SEMIN, M.O.; BRUNEAU, J.; BENSUSSAN, N. C.; MALAMUT, G.; CELLIER, C.; BENCHEKROUN, G.; TIRET, L.; GERMAN, A. J.; HERMINE, O.; FREICHE, V. Feline low-grade alimentary lymphoma: an emerging entity and a potential animal model for human disease. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 306, p. 1-19, 2018.

PAYNE, S. J. L.; BOWEN, R. L.; JONES, J. L.; WELLS, C. A. Predictive markers in breast cancer – the present. **Histopathology**, v. 52, n. 1, p. 82-90, 2008.

PEROJA, P.; PEDERSEN, M.; MANTERE, T.; NORGAARD, P.; PELTONEN, J.; MARIA-HAAPASAARI, K.; BÖHM, J.; JANTUNEN, E.; TURPEENNIEMI-HUJANEN, T.; RAPAKKO, K.; KARIHTALA, P.; SOINI, Y.; VASALA, K.; KUITTINEN, O. Mutation of *TP53*, translocation analysis and immunohistochemical expression of MYC, BCL-2 and BCL-6 in patients with DLBCL treated with R-CHOP. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2018.

PINTO, C. F. **Avaliação do estado oxidante/antioxidante e da defesa eritrocitária antioxidante em felinos com linfoma**. 2010. 103 f. Dissertação

(Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP.

POHLMAN, L. M.; HIGGINBOTHAM, M. L.; WELLES, E. G.; JOHNSON, C. M. Immunophenotypic and histologic classification of 50 cases of feline gastrointestinal lymphoma. **Veterinary Pathology**, v. 46, n. 2 p. 259-268, 2009.

POPE, K. V.; TUN, A. E.; MCNEILL, C. J.; BROWN, D. C.; KRICK, E. L. Outcome and toxicity assessment of feline small cell lymphoma: 56 cases (2000–2010). **Veterinary Medicine and Science**, v. 1, n. 2, p. 51–62, 2015.

QUIMBY, J.; GOWLAND, S.; CARNEY, H. C.; DePORTER, T.; PLUMMER, P.; WESTROPP, J. 2021 AAHA/AAFP feline life stage guidelines. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 23, n. 3, p. 211-233, 2021.

RAMOS-VARA, J. A.; KIUPEL, M.; BASZLER, T.; BLIVEN, L.; BRODERSEN, B.; CHELACK, B.; CZUB, S.; DEL PIERO, F.; DIAL, S.; EHRHART, E. J.; GRAHAM, T.; MANNING, L.; PAULSEN, D.; VALLI, V. E.; WEST, K. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, n. 4, p. 393-413, 2008.

R CORE TEAM R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2020. Disponível em: <https://www.Rproject.org/>; Acesso em: 27 mar. 2022.

RECHE-JÚNIOR, A.; CHALITA, M. C. C.; WANG, L.; GERALDO-JÚNIOR, C. A.; SANTOS, C. F.; FREITAS, M. F. Uso da L-asparaginase (elspar®), prednisona (meticorten®) e clorambucil (leukeran®) no tratamento de gatos com linfoma alimentar: 32 casos (2004-2009). **A Hora Veterinária**, v. 29, n. 173, p. 9-16, 2010.

RECHE-JÚNIOR, A.; WANG, L.; GERALDO-JÚNIOR, C. A.; SALVAGNI, S.; LARSSON, C. E. Paraneoplastic pemphigus foliaceus in a cat. **Veterinary Dermatology**, v. 23, n. S1, p. 72, 2012.

RICHTER, K. P. Feline gastrointestinal lymphoma. **The Veterinary Clinics – Small Animal Practice**, v. 33, n. 5, p. 1083-1098, 2003.

RISSETTO, K.; VILLAMIL, J. A.; SELTING, K. A.; TYLER, J.; HENRY, C. J. Recent trends in feline intestinal neoplasia: an epidemiologic study of 1.129 cases in the veterinary medical database from 1964 to 2004. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 47, n. 1, p. 28-36, 2011

RYCHLIK, A.; KACZMAR, E. Endoscopic biopsies and histopathological findings in diagnosing chronic gastrointestinal disorders in dogs and cats. **Veterinary Medicine International**, v. 2020, p. 1-8, 2020.

SABATTINI, S.; BOTTERO, E.; TURBA, M, E.; VICCHI, F.; BO, S.; BETTINI, G. Differentiating feline inflammatory bowel disease from alimentary lymphoma in duodenal endoscopic biopsies. **Journal of Small Animal Practice**, v. 57, n. 8, p. 396–401, 2016.

SAKAMAKI, K.; SATOU, Y. Caspases: evolutionary aspects of their functions in vertebrates. **Journal of Fish Biology**, v. 74, n. 4, p. 727–753, 2009.

SALA, S C. **Geriatría canina e felina**. São Paulo: MedVet, 2014. 296 p.

SALLES, M. A.; CÚRCIO, V. S.; PEREZ, A. A.; GOMES, D. S.; GOBBI, H. Contribuição da imuno-histoquímica na avaliação de fatores prognósticos e preditivos do câncer de mama e no diagnóstico de lesões mamárias. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 3, p. 213-222, 2009.

SANANMUANG, T.; PHUTIKANIT, N.; NGUYEN, C.; MANEE-IN, S; TECHAKUMPHU, M.; THARASANIT, T. *In vitro* culture of feline embryos increases stress-induced heat shock protein 70 and apoptotic related genes. **Journal of Reproduction and Development**, v. 59, n. 2, p. 180-188, 2013.

SEELEY, E. H.; CAPRIOLI, R. M. MALDI imaging mass spectrometry of human tissue: method challenges and clinical perspectives. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 3, p.136-143, 2011.

SILVA, A. P. S. **Importância da apoptose nas neoplasias hematopoiéticas**. 2014. 85 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa- Distrito de Lisboa.

SILVA, C. A.; CUNHA, S. C. S.; SOUZA, H. J. M.; JESUS, A. C.; FERREIRA, A. M. R. Clinical, ultrasonographic and histopathological findings of gastrointestinal disorders in cats. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 46, n. 1591, p. 1-6, 2018.

SIMPSON, K. Feline ibd and lymphoma: pitfalls and progress in diagnosis and management. In: PACIFIC VETERINARY CONFERENCE. 2017, Long Beach. **Proceedings....** Long Beach, CA, USA, 2017.

SMITH, V.; KNOTTENBEL, T. C.; WATSON, D.; MELLOR, D. J.; MARTINEZ, A. G.; PHILP, H.; KEEGAN, S.; MARRINGTON, M.; GIANNASI, C.; CAVE, T.;

MCBREARTY, A. R. Hair nicotine concentration of cats with gastrointestinal lymphoma and unaffected control cases. **Veterinary Record**, v. 186, n. 13, p. 1-8, 2020.

STEIN, T. J.; PELLIN, M.; HOWARD, S.; CHUN, R. Treatment of feline gastrointestinal small-cell lymphoma with chlorambucil and glucocorticoids. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 46, n. 6, p. 413-417, 2010.

STOCKMANS, G.; DERAEDT, K.; WILDIERS, H.; MERMAN, P.; PARIDAENS, R. Triple-negative breast cancer. **Current Opinion in Oncology**, v. 20, n. 3, p. 614-620, 2008.

SWANSON, C. M.; SMEDLEY, R. C.; SAAVEDRA, P. V.; KIUPEL, M.; KITCHELL, B. E. Expression of the Bcl-2 apoptotic marker in cats diagnosed with inflammatory bowel disease and gastrointestinal lymphoma. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 14, n. 10, p. 741-745, 2012.

THAMM, D. H.; ARGYLE, D. J. Novel and emerging therapeutic agents In: VAIL, D. M.; THAMM, D. H.; LIPTAK, J. M. (Org.). **Withrow & MacEwen's - Small animal clinical oncology**. 6th ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2020. Chap. 15, section D, p. 268-272.

THERNEAU, T. A Package for Survival Analysis: in R. R package version 3.1-12, 2020. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=survival>; Acesso em: 27 mar. 2022.

TIDD, K. S.; DURHAM, A. C.; BROWN, D. C.; VELOVOLU, S.; NAGEL, J.; KRICK, E. L. Outcomes in 40 cats with discrete intermediate- or large-cell gastrointestinal lymphoma masses treated with surgical mass resection (2005-2015). **Veterinary Surgery**, v. 48, n. 7, p. 1218-1228, 2019.

TOGNON, R.; NUNES, N. S.; CASTRO, F. A. Apoptosis deregulation in myeloproliferative neoplasms. **Einstein**, v. 11, n. 4, p. 540-544, 2013.

TORESSON, L.; STEINER, J. M.; OLMEDAL, G.; LARSEN, M.; SUCHODOLSKI, J. S.; SPILLMANN, T. Oral cobalamin supplementation in cats with hypocobalaminaemia: a retrospective study. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 19, n. 12, p. 1302-1306, 2017.

TUMMERS, B.; GREEN, D.R. The evolution of regulated cell death pathways in animals and their evasion by pathogens. **Physiological Reviews**, v. 102, n. 1, p. 411–454, 2022.

VAIL, D. M.; PINKERTON, M. Feline lymphoma and leukemia. In: VAIL, D. M.; THAMM, D. H.; LIPTAK, J. M. (Org.). **Withrow & MacEwen's - Small animal clinical oncology**. 6th ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2020. Chap. 33, section B, p. 715-730.

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 and Comparative Oncology**, v. 8, n. 1, p. 38–49, 2009.

WANG, P. G.; LI, Y. T.; PAN, Y.; GAO, Z. Z.; GUAN, X. W.; JIA, L.; LIU, F. T. Lower expression of Bax predicts poor clinical outcome in patients with glioma after curative resection and radiotherapy/chemotherapy. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 141, n. 1, p. 71–81, 2019.

WANG, R.; LAGAKOS, S. W.; GRAY, R, J. Testing and interval estimation for two-sample survival comparisons with small sample sizes and unequal censoring. **Biostatistics**, v. 11, n. 4, p. 676-692, 2010.

WANG, X. S.; LUO, K. J.; BELLA, A. E.; BU, S. S.; WEN, J.; ZHANG, S. S.; HU, Y. Caspase-3 expression in metastatic lymph nodes of esophageal squamous cell carcinoma is prognostic of survival. **World Journal of Gastroenterology**, v. 10, n. 15, p. 4414-4420, 2014.

WARING, E.; QUINN, M.; MCNAMARA, A.; LA RUBIA, E. A.; ZHU, H.; ELLIS, S. Skimr: Compact and Flexible Summaries of Data. R package version 2.1.3. 2021. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=skimr>; Acesso em: 27 mar. 2022.

WASHABAU, R. J.; DAY, M. J.; WILLARD, M. D.; HALL, E. J.; JERGENS, A. E.; MANSELL, J.; MINAMI, T.; BILZER, T. W. Endoscopic, biopsy, and histopathologic guidelines for the evaluation of gastrointestinal inflammation in companion animals. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, n. 1, p. 10-26, 2010.

WEISS, A. T, A.; KLOPFLEISCH, R.; GRUBER, A. D. Prevalence of feline leukaemia provirus DNA in feline lymphomas. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, n. 12, p. 929–936, 2010.

WERNER, B.; CAMPOS, A. C.; NADJI, M.; TORRES, L. F. B. Uso prático da imuno-histoquímica em patologia cirúrgica. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 4, n. 5, p. 353-364, 2005a.

WERNER, J. A.; WOO, J. C.; VERNAU, W.; GRAHAM, P. S.; GRAHN, R. A.; LYONS, L. A.; MOORE, P. F. Characterization of feline immunoglobulin heavy chain variable region genes for the molecular diagnosis of B-cell neoplasia. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 5, p. 596-607, 2005b.

WICKHAM, H.; AVERICK, A.; BRYAN, J.; CHANG, W.; MCGOWAN, L.; FRANÇOIS, R.; GROLEMUND, G.; HAYES, A.; HENRY, L.; HESTER, J.; KUHN, M.; PEDERSEN, T.; MILLER, E.; BACHE, S.; MÜLLER, K.; OOMS, J.; ROBINSON, D.; SEIDEL, D.; SPINU, V.; TAKAHASHI, K.; VAUGHAN, D.; WILKE, C.; WOO, K.; YUTANI, H. Welcome to the tidyverse. *Journal of Open Source Software*, 4(43), 1686, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.21105/joss.01686>; Acesso em: 27 mar. 2022.

WILLARD, M.D.; JERGENS, A. E.; DUNCAN, R. B.; LEIB, M. S.; MCCRACKEN, M. D.; DENOVO, R. C.; HELMAN, R. G.; SLATER, M. G.; HARBISON, J. L. Interobserver variation among histopathologic evaluations of intestinal tissues from dogs and cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 220, n. 8, p. 1177-1182, 2002.

WILSON, H. M. Feline alimentary lymphoma: demystifying the enigma. **Topics in Companion Animal Medicine**, v.23, n. 4, p. 177-184, 2008.

WINKEL, V. M. **Estudo das concentrações séricas de amiloide A, α 1-glicoproteína ácida e proteína C reativa em felinos com linfoma durante a quimioterapia**. 2012. 98 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP.

WINKEL, V. M. **Estudo das expressões de marcadores imunohistoquímicos do sistema imune em felinos com linfoma gastrointestinal**. 2016. 135 f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP.

WINKEL, V. M.; LUCAS, S. R. R. Linfoma gastrointestinal em gatos. In: JARK, P. C.; RODRIGUES, L. C. S. (Org.). **Neoplasias hematopoiéticas em cães e gatos**. São Paulo: MedVet, 2022. Cap. 21, seção VI, p. 517-541.

WOLFESBERGER, B.; SKOR, O.; HAMMER, S. E.; FLICKINGER, L.; KLEITER, M.; RÜTGEN, B. C.; SCHWENDENWEIN, I.; TICHY, A.; HITTMAIR, K. M.;

DEGASPERI, B.; FUCHS-BAUMGARTINGER, A. Does categorisation of lymphoma subtypes according to the World Health Organization classification predict clinical outcome in cats? **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 19, n. 8, p. 897–906, 2017.

WU, J.; YE, J.; KONG, W.; ZHANG, S.; ZHENG, Y. Programmed cell death pathways in hearing loss: A review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Proliferation**, v. 53, n. 11, p. 1-14, 2020.

YAMAZAKI, J.; HASEBE, N.; NAGAFUCHI, S.; BABA, K.; TSUJIMOTO, G.; KANO, R.; HASEGAWA, A. Expression of apoptosis-related gene mRNAs in feline T-cells infected with feline immunodeficiency virus (FIV). **Veterinary Microbiology**, v. 101, n. 1, p. 1-8, 2004.

ZHAO, W.; ZHAO, Q.; LIU, J.; XU, X. Y.; SUN, W. W.; ZHOU, X.; LIU, S.; WANG, T. H. Electro-acupuncture reduces neuronal apoptosis linked to Bax and Bcl-2 expression in the spinal cords of cats subjected to partial dorsal root ganglionectomy. **Neurochemical Research**, v. 33, n. 11, p. 2214-2221, 2008.

ZHOU, M.; LIU, X.; LI, Z.; HUANG, Q.; LI, F.; LI, C. Y. Caspase-3 regulates the migration, invasion, and metastasis of colon cancer cells. **International Journal of Cancer**, v. 143, n. 4, p. 921–930, 2018.

ZUCCARI, D. A.P.C.; BERTON, C. R.; TERZIAN, A. C. B.; RUIZ, C. M. Fatores prognósticos e preditivos nas neoplasias mamárias—importância dos marcadores imuno-histoquímicos nas espécies humana e canina – estudo comparativo. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 4, p. 189-198, 2008.

ZWINGENBERGER, A. L.; MARKS, S. L.; BAKER, T. W.; MOORE, P. F. Ultrasonographic evaluation of the muscularis propria in cats with diffuse small intestinal lymphoma or inflammatory bowel disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, n. 2, p. 289-292, 2010.

ANEXOS

ANEXO A – Carta de autorização



São Paulo, 19 de março de 2019

AUTORIZAÇÃO

Eu, Archivaldo Reche Junior, RG 8957334, CPF 10117845809, autorizo, meu orientado Kilder Dantas Filgueira, a utilizar quaisquer dados dos prontuários e blocos parafinados contendo material de biópsia intestinal dos gatos com diagnóstico de linfoma intestinal em acompanhamento na clínica Vetmasters/ SP, CNPJ 67.930.446/0001-96, onde exerço cargo de diretor científico e técnico. Esses dados serão utilizados no projeto de pesquisa: "Valor prognóstico e preditivo da imunexpressão de fatores pró e antiapoptóticos no linfoma alimentar felino".

Atenciosamente,

Archivaldo Reche Junior
Clínica Veterinária Vetmasters