

DOUTORAMENTO

CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

# Linfomas caninos- Portugal x Brasil

O papel do ambiente

Katia Pinello Derneka

# D

2017

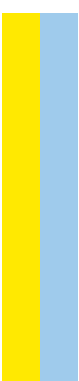


Katia Pinello Derneka. Linfomas caninos- Portugal x Brasil  
O papel di ambiente



Linfomas caninos- Portugal x Brasil  
O papel do ambiente

Katia Cristina Pinello Derneka



**KATIA CRISTINA PINELLO DERNEKA**

**LINFOMAS CANINOS – PORTUGAL X BRASIL  
O PAPEL DO AMBIENTE**

Tese de Candidatura ao grau de Doutor em Ciências Veterinárias submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Doutor **Augusto José Ferreira de Matos**

Categoria – professor auxiliar com agregação

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Coorientador – Doutor **João José Rato Niza Ribeiro**

Categoria – professor auxiliar convidado

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Este Doutorado foi financiado pela **CAPES** - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, **Brasil** no Programa Ciências Sem Fronteiras (CSF 0342-13-0 - Bolsa de Doutorado Pleno no Exterior).



É AUTORIZADA A PUBLICAÇÃO INTEGRAL DESSA TESE PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, A QUAL SE COMPROMETE.

***À minha mãe, ao meu marido e aos meus filhos.***

## **Publicações**

Em obediência ao disposto no n.º 1 do Artigo 34º do Decreto-Lei n.º 74/2006, publicado em Diário da República, 1ª série, nº 60 de 24 de Março de 2006, e republicado pelo Decreto-Lei nº 115/2013, publicado em Diário da República, 1ª série, nº 151 de 07 de Agosto de 2013, que procede à terceira alteração do Decreto-Lei nº 74/2006, de 24 de Março de 2006, a autora declara que é responsável pela conceção e execução do trabalho, bem como na interpretação dos resultados e na redação dos trabalhos, publicados e em publicação, que fazem parte integrante desta tese e/ou que dela advêm.

## **Artigos que fazem parte integrante da Tese**

- I. Pinello, K.C., Santos, M., Leite-Martins, L., Niza-Ribeiro, J., de Matos, A.J. (2017). Immunocytochemical study of canine lymphomas and its correlation with exposure to tobacco smoke. *Veterinary World*, 10, 1307 – 1313.
- II. Pinello, K.C., Niza-Ribeiro, J., Fonseca, L.; de Matos, A.J. Comparative longitudinal and geographical study of human and canine non-Hodgkin lymphoma – A One Health approach. *Veterinary Journal (Submitted)*.

## **Publicações em atas de encontros científicos**

### **Comunicações Oraís**

- III. Pinello, K.C. Santos, M.; Gartner, F.; de Matos, A.J. (2016) Immunocytochemical study of canine non-Hodgkin's lymphoma: diagnosis, classification and proliferative activity. I Jornadas do Programa Doutoral em Ciências Veterinárias – ICBAS – Universidade do Porto.

### **Comunicações - Posters**

- IV. Pinello, K.C., Santos, M., Dias-Pereira, P., Niza-Ribeiro, J., de Matos, A.J. (2017). Histopathological classification and immunophenotyping of canine

lymphomas in Porto – Portugal: a survey. ESVONC CONGRESS LYON, France, 20 a 22 de abril.

- V. Pinello, K.C., Santos, M., Leite-Martins, L., Niza-Ribeiro, J., de Matos, A.J. Immunocytochemical study of canine lymphomas: a practical and reliable tool in classification, proliferation assessment, prognosis and search for risk factors. ESVONC CONGRESS LYON, France, 20 a 22 de abril.
- VI. Pinello, K.C., Martins, L., Gregório, H., Santos, A., Queiroga, F.L., Oliveira, F., Tedardi, M.V., Dagli, M.L., Niza-Ribeiro, J., de Matos, A.J. (2017). Implementation and preliminary results of an Animal Cancer Registry in Portugal (RCA-PT) in partnership with RCA-SP. ESVONC CONGRESS LYON, France, 20 a 22 de abril.
- VII. Pinello, K.C., Fonseca, L., Monteiro, A., Niza-Ribeiro, J., de Matos, A.J. (2017). Geographical distribution of Human and dog lymphomas in “Large area of Porto” – a case study at Porto city. GEOMED Congress 2017, Porto, Portugal. 5 a 7 de setembro.

*“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.” Antoine de Saint-Exupéry*



## **AGRADECIMENTOS**

Acredito que nenhum trabalho fazemos sozinhos. Tudo é fruto da intensa troca de experiências que fazemos ao longo desta jornada. As pessoas que conhecemos, conversamos, que nos apoiam, ensinam, criticam e mesmo aquelas que nos sorriem. Foi da troca de ideias e pensamentos nos mais variados campos – na multidisciplinaridade - que este trabalho se materializou. Para fazer este trabalho, abri e estiquei bem os braços e tentei incluir aspetos que para mim, como médica veterinária, não se podem esquecer - os animais e seus proprietários; o ambiente em que vivemos, Portugal e Brasil, interligando todos numa visão quase holística. Por isso, são muitos os agradecimentos.

### **Ao meu Orientador – Professor Doutor Augusto Matos**

***Agradeço por confiar e ensinar. Agradeço por partilhar conhecimentos, orientar e estar sempre disponível. Agradeço por acreditar e tentar. Por enfrentar todos os obstáculos que apareceram ao longo deste trabalho. Agradeço pela sobriedade e serenidade. Foi uma verdadeira honra conhecê-lo e ser orientada por si.***

### Ao meu Co-orientador – Professor Doutor Niza Ribeiro

*Agradeço por toda a disponibilidade, paciência e amabilidade. Foi uma honra conhecê-lo e ter trabalhado consigo.*

### À Capes – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - BRASIL

*Por acreditar que podemos ser mais do que somos e que é na investigação científica que um país evolui.*

### Ao ICBAS – Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

### À minha tutora no Brasil – Professora Doutora Maria Lúcia Zaidan Dagli

*Graças a si que tudo começou. No Brasil e no Porto. Sabes o quanto admiro-a como pessoa e profissional. De uma gentileza sábia e acolhedora. De pequenos gestos mágicos que fazem nossos sonhos realizarem-se.*

### À Comissão de Acompanhamento

*- Professor Doutor Rui Henrique – IPO. Uma das pessoas mais brilhantes que tive a oportunidade de conhecer. Fonte de sabedoria agregada a gentileza.*

- Doutora Liliana Martins – UPVet. *Querida em todos os sentidos. Obrigada e foi uma honra trabalhar consigo. Tem uma característica que poucas têm: consegue aliar firmeza à gentileza.*

A todas do Departamento de Patologia e Imunologia Veterinária – ICBAS/UP

- Professora Doutora Fátima Gartner

*Foi a primeira pessoa que me abriu as portas. O primeiro incentivo. É uma honra saber que pude contar com vossa preciosa ajuda e ensinamentos.*

- Professora Doutora Patrícia Dias

- Professora Doutora Irina Amorim

- Técnicas Alexandra Rêma e Fátima Carvalho

*A essas duas mulheres incríveis que tanto me ajudaram! Sempre disponíveis, firmes e pacientes.*

- MV Ana Canadas

- MV Aline Alvarenga

Ao Departamento de Microscopia e Serviço de Citologia do ICBAS/UP

- Professor Doutor Eduardo Rocha

- Professora Doutora Marta Santos

- Professor Doutor Ricardo Santos

- Fernanda Malhão e Célia Lopes.

À incrível equipa do Hospital Veterinário da Universidade do Porto - UPVet

- Doutor Jorge Ribeiro, Dra. Joana Santos, Doutor Miguel Faria, Dr. Miguel França, Doutor Pablo Puente, Dra. Luísa Guardão;

- Sr. Carlos Frias e Sra. Maria Vitória Cruz

- Todas as Enfermeiras e técnicas veterinárias

Aos Serviços Administrativos e Académicos do ICBAS

- Ana Paula Pereira

- Madalena Rodrigues

À Doutora Maria José Bento do Registo Oncológico Regional do Norte (RORENO) e Doutora Joana Vasconcelos do Registo Oncológico do Centro (ROR-Centro)

À Professora Doutora Ana Monteiro, coordenadora do Grupo de Investigação em Clima, Saúde e Ambiente e professora da Faculdade de Letras/UP.

Ao incansável geógrafo Luís Fonseca da empresa *Mapis, Mapping Intelligent Solutions*

Ao Departamento de Anatomia Patológica do Instituto Português de Oncologia – IPO-Porto.

Ao querido Mestre Marcelo Tedardi do Registro de Câncer Animal de São Paulo.

À Doutora Katia Cristina Kimura.

Um especial agradecimento a todos os centros veterinários que aceitaram em colaborar neste projeto:

- ❖ CEDIVET – Centro de Diagnósticos Veterinários:  
MV Hugo Lima Carvalho e Doutora Nazaré Pinto da Cunha
- ❖ CHV – Centro Hospitalar Veterinário: Doutor Hugo Gregório
- ❖ Hospital Veterinário de Referência Montenegro:  
MV Dr. Luis Montenegro e MV Filipe Silva
- ❖ Hospital Veterinário do Porto: Dr. Luís Lobo e MV Gonçalo Petrucci
- ❖ SEGALAB: Dra. Abigail Barbosa e MV. Patrícia Ferreira
- ❖ INIAV: Dra. Cristina Ôchoa

A todos os amigos que ajudaram de todas as maneiras possíveis.

*Seria indelicado esquecer de alguém por isso saibam quanto foram importantes nesta caminhada. De perto, bem perto, de longe ou muito longe. Todos de alguma forma incentivaram-me e apoiaram.*

Enfim, à minha família...

À minha mãe Iracy Vieira de Araújo – “O mundo é dos fortes!”

Aos meus filhos, Leandro e Lara –

*“O conhecimento é tudo o que não nos podem tirar”*

Ao meu marido, Alexsandro Derneka – Minha fortaleza.

Aos meus irmãos, Marcos, Sandra e Marcelo – Meus exemplos e amor maior.

Ao meu pai, Roberto Pinello.

Aos meus queridos avós - Sérgio e Aparecida Pinello e Cármen Vieira de Araújo.

À toda a família – pilares da nossa estrutura.

**OBRIGADA**

## ÍNDICE

---

LISTA DE TABELAS .....	15
LISTA DE FIGURAS .....	16
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	17
LISTA DE SÍMBOLOS.....	18
<b>RESUMO</b> .....	19
<b>ABSTRACT</b> .....	21
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	23
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	25
2.1. OS ANIMAIS COMO SENTINELAS AMBIENTAIS .....	25
2.2. RISCOS AMBIENTAIS DE SAÚDE .....	26
2.3. SISTEMA IMUNOLÓGICO .....	30
2.3.1. Diferenciação dos linfócitos.....	31
2.3.1.1. Linfócitos B .....	32
2.3.1.2. Linfócitos T .....	33
2.3.2. Linfonodos .....	35
2.3.2.1. Folículos linfoides .....	36
2.4. NEOPLASIAS LINFOIDES.....	38
2.4.1. O macro ambiente .....	38
2.5. LINFOMAS .....	39
2.5.1. Definição.....	39
2.5.2. Classificação.....	39
2.5.2.1. Localização anatômica .....	40
2.5.2.2. Critérios morfológicos e imunofenotípicos.....	41
2.5.3. Diagnóstico .....	44
2.5.3.1. Exame clínico .....	44
2.5.3.2. Avaliação morfológica .....	45
2.5.3.2.1. Citologia.....	45
2.5.3.2.1. Histopatologia .....	48
2.5.3.3. Imunofenotipagem.....	48
2.5.4. Estadiamento .....	49
2.5.5. Tratamento .....	49

2.5.6.	Prognóstico .....	50
2.5.7.	Aspetos epidemiológicos.....	51
2.5.8.	Fatores de risco .....	51
2.6.	LINFOMAS NÃO-HODGKIN NO MUNDO .....	56
2.7.	PORTO E SÃO PAULO .....	57
2.7.1.	Porto .....	57
2.7.2.	São Paulo .....	57
2.8.	REGISTO DE CANCRO ANIMAL .....	59
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>60</b>
3.1.	OBJETIVOS GERAIS .....	60
3.1.1.	Oncologia comparada .....	60
3.1.2.	Perspectiva “One Health” .....	60
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	60
3.2.1.	Estudo imunocitoquímico de linfomas caninos no Distrito do Porto .....	60
3.2.2.	Estudo imunohistoquímico de linfomas caninos no Distrito do Porto .....	60
3.2.3.	Estudo de fatores de risco de linfomas caninos – Questionário epidemiológico .....	60
3.2.4.	Estudo da implantação de um Registo de Cancro Animal em Portugal .....	60
<b>4.</b>	<b>ESTUDOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>61</b>
4.1.	<b>CAPÍTULO I - ESTUDO IMUNOCITOQUÍMICO DE LINFOMAS CANINOS NO DISTRITO DO PORTO</b> .....	<b>61</b>
4.1.1.	Considerações Gerais .....	61
	Immunocytochemical study of canine lymphomas and its correlation with exposure to tobacco smoke .....	62
4.2.	<b>CAPÍTULO II - ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO DE LINFOMAS CANINOS DO SERVIÇO DE PATOLOGIA VETERINÁRIA DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR – UNIVERSIDADE DO PORTO</b> .....	<b>77</b>
4.2.1.	Objetivos .....	77
4.2.2.	Materiais e Métodos.....	77
4.2.3.	Resultados .....	78
4.2.4.	Discussão .....	80
4.3.	<b>CAPÍTULO III - DESCRIÇÃO DE POTENCIAIS ASSOCIAÇÕES DE FATORES DE RISCO AOS LINFOMAS CANINOS NO DISTRITO DO PORTO.</b> .....	<b>84</b>
4.3.1.	Considerações Gerais e Objetivos .....	84
4.3.2.	Materiais e Métodos.....	84
4.3.3.	Análise estatística .....	85

4.3.4.	Resultados .....	86
4.3.5.	Discussão .....	90
4.3.6.	Conclusão .....	94
<b>4.4. CAPÍTULO IV</b>	<b>- DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DO LINFOMA NÃO-HODGKIN HUMANO E CANINO NO GRANDE PORTO.....</b>	<b>95</b>
4.4.1.	Considerações Gerais .....	95
	Comparative longitudinal and geographical study of human and canine non-Hodgkin lymphoma – A One Health perspective .....	95
<b>4.5. CAPÍTULO V</b>	<b>- COMPARAÇÃO INTERNACIONAL - PORTO E SÃO PAULO.....</b>	<b>114</b>
4.5.1.	Considerações Gerais e Objetivos .....	114
4.5.2.	Materiais e Métodos.....	114
4.5.2.1.	Qualidade do Ar .....	114
4.5.2.1.1.	Porto .....	114
4.5.2.1.2.	São Paulo .....	116
4.5.2.2.	Principais poluentes atmosféricos .....	117
4.5.2.3.	Radão.....	118
4.5.2.4.	Distribuição geográfica dos linfomas .....	118
4.5.3.	Resultados .....	118
4.5.3.1.	Poluição atmosférica .....	118
4.5.3.2.	Radão.....	123
4.5.3.3.	Distribuição geográfica dos linfomas .....	124
4.5.4.	Discussão .....	127
<b>4.6. CAPÍTULO VI</b>	<b>- ESTUDO DA IMPLEMENTAÇÃO DE UM REGISTO DE CANCRO ANIMAL EM PORTUGAL – PTRCA.....</b>	<b>130</b>
4.6.1.	Considerações Gerais .....	130
4.6.2.	Materiais, Métodos e Resultados.....	130
1.	Aquisição do endereço eletrónico para o acesso ao sistema .....	130
2.	Adaptações.....	131
3.	Validação Interna .....	131
4.	Validação Externa.....	132
5.	Inserção de Dados e Resultados .....	132
6.	Análise SWOT .....	139
4.6.3.	Discussão .....	139
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS E PERSPETIVAS FUTURAS .....</b>	<b>141</b>

<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>143</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>154</b>
- QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO .....	154
- POSTERS APRESENTADOS NO CONGRESSO DA ESVONC – 2017 .....	154
- POSTER APRESENTADO NO CONGRESSOS GEOMED - 2017 .....	154

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 2.1</b> – Classificação de Kiel adaptada utilizada na classificação citológica de linfomas caninos <sup>[11; 76]</sup> . .....	42
<b>Tabela 2.2</b> – Classificação de neoplasias linfoides adotada pela OMS e aplicada em animais (Fonte: Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals, 2015) <sup>[46]</sup> .....	43
<b>Tabela 2.3</b> – Roteiro para avaliação citológica dos linfomas caninos.....	47
<b>Tabela 4.2.1.</b> – Características dos linfomas caninos do Serviço de Patologia Veterinária – ICBAS/UP, de 2005 a 2016, pertencentes ao Distrito do Porto. ....	79
<b>Tabela 4.2.2</b> – Classificação histológica dos linfomas caninos do Serviço de Patologia Veterinária – ICBAS-UP, de 2005 a 2016, pertencentes ao Distrito do Porto. ....	80
<b>Tabela 4.3.1</b> - Descrição do questionário epidemiológico: fatores de risco para o linfoma canino no Distrito do Porto.....	86
<b>Tabela 4.3.2</b> – Estrutura e distribuição das questões em domínios e subdomínios. ....	87
<b>Tabela 4.3.3</b> – Análise descritiva das variáveis idade e peso.....	88
<b>Tabela 4.3.4</b> – Análise descritiva das variáveis sexo e situação reprodutiva. ....	88
<b>Tabela 4.3.5</b> – Distribuição das principais raças.....	88
<b>Tabela 4.3.6</b> – Análise univariada das variáveis do domínio referente as características individuais dos cães.....	89
<b>Tabela 4.3.7</b> - Análise univariada das variáveis do domínio referente as exposições. ....	89
<b>Tabela 4.3.8</b> – Resultados do teste ANOVA para as médias de poluição externa, interna e exposição ao fumo de tabaco entre os grupos linfoma e controlo.....	90
<b>Tabela 4.5.1</b> – Estações da rede de medição da qualidade do ar no Grande Porto.....	115
<b>Tabela 4.5.2</b> - Alteração dos limites máximos permitidos por lei dos poluentes monitorizados na cidade de São Paulo e valores preconizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) <sup>[17; 41]</sup> .....	117
<b>Tabela 4.5.3</b> – Classificação do Município de São Paulo relativamente aos poluentes atmosféricos (fonte: CETESB 2017).....	122
<b>Tabela 4.6.1</b> - Análise descritiva dos casos inseridos no PTRCA em 2016.....	133
<b>Tabela 4.6.2</b> - Raças registadas no PTRCA em 2016. ....	134
<b>Tabela 4.6.3</b> - Localizações topográficas registadas no PTRCA - 2016. ....	135
<b>Tabela 4.6.4</b> - Tipos histológicos registados no PTRCA - 2016.....	136
<b>Tabela 4.6.5</b> - Distritos e Concelhos de origem registados no PTRCA - 2016. ....	137



## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 2. 1</b> - Diagrama esquemático de diferenciação dos linfócitos B. ....	33
<b>Figura 2.2</b> – Diagrama esquemático da diferenciação dos linfócitos T. ....	35
<b>Figura 2.3</b> - Diagrama anatómico de diferenciação de linfócitos nos linfonodos e foliculos linfoides com os respetivos fenótipos (fonte: Quick Reference Handbook for Surgical Pathologists, 2011 <sup>[51]</sup> ).....	37
<b>Figura 2.4</b> – <b>Linfoma não-Hodgkin no mundo</b> . Distribuição geográfica mundial da incidência padronizada pela idade (ASR) do linfoma não-Hodgkin (fonte: GLOBOCAN 2012, IARC).....	56
<b>Figura 4.2.1</b> – Esquema dos linfomas B foliculares baseado na arquitetura normal de um folículo linfoide. (fonte: Jubb, Kennedy, and Palmer’s pathology of domestic animals, 2015 <sup>[12]</sup> ).....	82
<b>Figura 4.5.1</b> – Localização das estações de medição de NO <sub>2</sub> (esquerda) e PM <sub>10</sub> (direita) da rede de monitorização da qualidade do ar no Grande Porto. ....	116
<b>Figura 4.5.2</b> – Médias anuais para o poluente PM <sub>10</sub> nas estações de monitorização da qualidade do ar do Grande Porto. Base: dados fornecidos pela CCDRN.....	119
<b>Figura 4.5.3</b> – Médias anuais para o poluente NO <sub>2</sub> nas estações de monitorização da qualidade do ar do Grande Porto no período de 2000 a 2013. Base: dados fornecidos pela CCDRN.....	120
<b>Figura 4.5.4</b> - Localização das estações que apresentaram valores de PM <sub>10</sub> (esquerda) e NO <sub>2</sub> (direita) acima de 40 µg/m <sup>3</sup> no período de 2000 a 2013. Base: dados fornecidos pela CCDRN. ....	121
<b>Figura 4.5.5</b> - Número de dias por ano de ultrapassagem dos limites máximos de <b>Ozono</b> nas estações da Rede de Medição da Qualidade do ar da Região Norte – CCDRN. Fonte: Evolução da qualidade do ar na Região Norte CCDRN 2010 <sup>[189]</sup> .....	122
<b>Figura 4.5. 6</b> - Número de ultrapassagens, em horas totais, registadas na cidade de São Paulo no período de 1995 a 2009 para os principais poluentes (Fonte: Séries estatísticas do IBGE). ....	123
<b>Figura 4.5.7</b> – Concentração interior média de radão nos concelhos do Grande Porto. Fonte: Veloso et al, 2012 <sup>[1]</sup> .....	124
<b>Figura 4.5.8</b> - Densidade de Kernel da distribuição geográfica dos casos de linfoma não - Hodgkin humanos diagnosticados entre 2005 a 2010 no Grande Porto. ....	125
<b>Figura 4.5. 9</b> – Densidade de Kernel da distribuição geográfica dos casos de linfomas caninos diagnosticados entre 2005 a 2016 no Grande Porto.....	126
<b>Figura 4.5.10</b> - Distribuição espacial dos casos de LNH em humanos (esquerda) e em cães (direita) na cidade de São Paulo no período de 1996 a 2006. Fonte: Tese de Doutoramento de Katia Cristina Kimura, 2012, Universidade de São Paulo <sup>[173]</sup> .....	127
<b>Figura 4.6.1</b> - Mapas de localização geográfica dos casos registados no PTRCA – 2016.....	138
<b>Figura 4.6.2</b> - Diagrama de análise SWOT do Registo de Cancro Animal de Portugal.....	139

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4D	ácido diclorofenoxiacético	LZM	linfoma de zona marginal
ASR	incidência padronizada pela idade	mAbs	anticorpos monoclonais
BCR	recetor de célula B	MALT	tecido linfoide associado a mucosas
CAMV	Centro de atendimento médico-veterinário	máx	máximo
CCDR	Comissões de Coordenação e Desenvolvimento Regional	MHC	complexos principais de histocompatibilidade
CD	cluster of differentiation	min	mínimo
CEDIVET	Centro de Diagnóstico Veterinário	n	quantidade amostral
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental	NAP-ONCOVET	Núcleo de Pesquisa em Oncologia Veterinária
CHERG	Climate, Health and Environment Research Group	NK	<i>natural killer</i>
CHOP	protocolo quimioterápico	Nox	óxidos de azoto
CHV	Centro Hospitalar Veterinário	NUT	Nomenclatura de unidade territorial
CO	monóxido de carbono	O <sub>3</sub>	ozono
COV	compostos orgânicos voláteis	OR	<i>Odds Ratio</i>
CTCL	linfoma cutâneo de células T	PAF	punção por agulha fina
DLBCL	Linfoma de grandes células B difuso	PAX5	<i>Paired box protein</i>
EATL	enteropatia associado ao linfoma	PM	Matéria particulada
EN12	Estrada da Circunvalação	PTRCA	Registo de Cancro Animal de Portugal
ESVONC	European Society of Veterinary Oncology	RCA-SP	Registo de Cancro Animal de São Paulo
HAP	hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	REAL	<i>Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms</i>
HG	Alto grau ( <i>high grade</i> )	RMQA	Rede de monitorização da qualidade do ar
HHV-8	herpesvírus humano 8	ROR-Centro	Registo Oncológico Regional do Centro
HTLV-1	vírus T-linfotrópico humano	RORENO	Registo Oncológico Regional do Norte
HVP	Hospital Veterinário do Porto	SEER	<i>Surveillance Epidemiology and End Results</i>
HVRM	Hospital Veterinário de Referência Montenegro	SO <sub>2</sub>	dióxido de enxofre
IACR	Associação Internacional de Registos de Cancro	SOE	sem outra especificação
IARC	<i>International Agency of Research on Cancer</i>	sup	superior

IBD	doença inflamatória crónica intestinal	SWOT	forças, fraquezas, oportunidades e ameaças
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística	TCR	recetor de célula T
IC	intervalo de confiança	TDT	desoxinucleotidiltransferase terminal
IC23	Via de Cintura Interna	TKIs	inibidores da tirosina cinase
ICC	Imunocitoquímica	UPVet	Hospital Veterinário da Universidade do Porto
inf	inferior	VEB	vírus Epstein-Barr
IPO	Instituto Português de Oncologia	VIH	vírus da imunodeficiência humana
LG	Baixo grau ( <i>low grade</i> )	WC	<i>workshop cluster</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

---

$\mu\text{g}/\text{m}^3$  – micrograma por metro cúbico

$\mu\text{m}$  - micrómetro

$\text{Bq m}^{-3}$  – Bequerel por metro cúbico

## RESUMO

---

O linfoma é uma neoplasia maligna com alta incidência tanto na medicina humana quanto na veterinária. Sendo o cão um animal doméstico que vive cada vez mais próximo aos seus proprietários, estudar os efeitos que o ambiente pode ter sobre a sua saúde é estudar também os mesmos efeitos sobre os seres humanos e o ambiente em si. Este trabalho teve como objetivos principais caracterizar os linfomas não-Hodgkin humanos e caninos no Grande Porto, identificar as principais fontes de potencial risco ambiental e a sua associação com a distribuição geográfica de casos animais e humanos de linfoma não-Hodgkin, comparando estes dados com os anteriormente obtidos na região de São Paulo, Brasil. A caracterização individual e ambiental dos casos de linfoma canino foi estudada através de inquérito exaustivo aos seus proprietários/tutores. A análise estatística dos resultados demonstrou que o risco de desenvolvimento de linfoma pode estar associado a características do próprio animal como a idade, peso, porte e raça, assim como a fatores ambientais e de hábitos de vida como a alimentação e a exposição ao fumo do tabaco.

O aprofundamento da caracterização dos linfomas na espécie foi obtido através da completa análise de amostras obtidas no processo de diagnóstico, tanto citológicas (animais diagnosticados durante os trabalhos desta tese) como histológicas (amostras arquivadas do Serviço de Patologia Veterinária do ICBAS recebidas entre 2005 e 2016). Para além do tipo histológico, grau e índice proliferativo, procedeu-se também à caracterização imunofenotípica de amostras citológicas. Os linfomas de células B representaram a maior parte dos casos (65% dos diagnósticos citológicos e 57% dos casos histopatológicos), verificando-se ainda que 40% das amostras citológicas apresentaram um alto índice de proliferação celular (IPC), nem sempre coincidente com o seu grau histológico. Por comparação individualizada com os resultados do correspondente inquérito epidemiológico, observou-se também que este IPC estava relacionado com a coabitação com seres humanos fumadores ou não. A distribuição etária e racial dos animais afetados foi coincidente com os resultados de estudos anteriores.

Na perspetiva “*One Health*”, procedeu-se a um estudo longitudinal comparativo entre linfomas não-Hodgkin humanos e caninos na área do Grande Porto. Foram incluídos 1242 casos de LNH humanos diagnosticados entre 2005 e 2010 e 504 casos de linfoma canino diagnosticados entre 2005 e 2016, caracterizados através de análise epidemiológica descritiva e seu mapeamento, calculando-se os riscos padronizados (ASR) de incidência. Os resultados evidenciaram um maior risco do género/sexo

masculino em ambas as espécies assim como uma correlação das correspondentes distribuições geográficas. Os valores mais altos de ASR foram encontrados nos grandes centros urbanos (Porto, Matosinhos e Maia) em ambas as espécies. O estudo comparativo internacional entre linfomas humanos e caninos do Grande Porto e do município de São Paulo evidenciou similitudes de prevalência global entre as duas regiões, com uma proporção de linfomas de tipo T, em ambas, superior à relatada na bibliografia internacional. A identificação dos principais poluentes ambientais resultou, no entanto, na evidenciação de fenómenos distintos. Enquanto São Paulo apresenta uma elevação crónica dos valores atmosféricos de ozono, no Grande Porto as suspeitas recaem no efeito potenciador das elevadas concentrações de radão sobre os poluentes atmosféricos e resultantes do fumo do tabaco.

Durante os trabalhos desta tese foi ainda realizado o estudo de implementação de um registo de cancro animal, através da adaptação de sistema já implementado em São Paulo. Após as fases de adaptação, validação interna e externa, e utilização rotineira em dois centros de atendimento veterinário, concluiu-se que o registo representa uma potencial mais-valia como ferramenta epidemiológica. Foi também possível perceber as dificuldades da sua implementação no terreno, sobretudo ligadas à colheita de informação e a alguma complexidade do sistema.

## ABSTRACT

---

Lymphoma is a malignant neoplasm with high incidence both in human and veterinary medicine. As the dog is a domestic animal that lives closer and closer to its owners, studying the effects that the environment can have on their health is also studying the same effects on humans and the environment itself. The main objectives of this study were to characterize human and canine non-Hodgkin's lymphomas in Greater Porto, to identify the main sources of potential environmental risks and their association with the geographical distribution of animal and human cases of non-Hodgkin's lymphoma; comparing these data with those previously obtained in the region of São Paulo, Brazil. The individual and environmental characterization of canine lymphoma cases was studied through an exhaustive survey of their owners. Statistical analysis of the results showed that the risk of developing lymphoma may be associated with the animal's characteristics such as age, weight, size and race, as well as environmental and lifestyle factors such as feeding and tobacco smoking.

The detailed characterization of lymphomas in the species was obtained through a complete analysis of samples obtained in the diagnostic process, both cytological (animals diagnosed during the thesis) and histological (archived samples from the Veterinary Pathology Service of ICBAS, between 2005 and 2016). In addition to the histological type, grade and proliferative index, we also carried out the immunophenotypic characterization of cytological samples. B-cell lymphomas accounted for the majority of cases (65% of cytological diagnoses and 57% of histopathological cases). It was also observed that 40% of cytological samples presented a high cell proliferation index (CPI), not always coincident with its histological grade. By individual analysis of the corresponding epidemiological survey, it was also observed that this CPI was related to cohabitation with smokers or not. The age and breed distribution of the affected animals coincided with the results of previous studies.

On the "One Health" perspective, a comparative longitudinal study was carried out between human and canine non-Hodgkin lymphomas in the Greater Porto area. We included 1242 cases of human NHL diagnosed between 2005 and 2010 and 504 cases of canine lymphoma diagnosed between 2005 and 2016, characterized by descriptive epidemiological analysis, mapping and age standardized risks (ASR) of incidence. The results showed a greater risk for men and male dogs as well as a correlation of the corresponding geographical distributions. The highest values of ASR were found in large urban centers (Porto, Matosinhos and Maia) in both species. The international comparative study between human and canine lymphomas of Greater Porto and the city

of São Paulo showed similarities of global prevalence between the two regions, with a proportion of T-lymphomas higher than that reported in the international bibliography in both regions. The identification of the main environmental pollutants resulted, however, in the disclosure of different phenomena. While São Paulo presents chronic high values of the atmospheric ozone, in the Greater Porto area the suspicions rests on the potentiating effects of high concentrations of radon in the atmospheric pollutants and tobacco smoke.

During this thesis we also carried out the study of the implementation of an animal cancer registry, through the adaptation of the system already implemented in São Paulo. After the stages of adaptation, internal and external validation, and routine use in two veterinary centers, it was concluded that the registry represents a potential added value as an epidemiological tool. It was also possible to perceive the difficulties of its implementation in the field, mainly related to the collection of information and some complexity of the system.

## 1. INTRODUÇÃO

---

A Oncologia Comparada é uma área multidisciplinar em expansão nos últimos anos a qual estuda o risco de cancro e o seu desenvolvimento em diferentes espécies, com o objetivo maior de ampliar o conhecimento desta doença<sup>[2]</sup>.

Os cancros caninos são considerados fisiopatologicamente e clinicamente equivalentes aos cancros humanos, ocorrendo de forma espontânea <sup>[2]</sup>. Para além disso, o facto de a esperança de vida canina ser mais curta tem por consequência um menor período de latência entre a exposição a agentes de risco e o desenvolvimento da neoplasia, permitindo inferir que o estudo do cancro nos cães abrevia a avaliação de novas técnicas de diagnóstico, tratamento e prevenção e os cães podem ser utilizados como alertas para perigos ambientais sobre a saúde humana <sup>[2-4]</sup>. A coabitação próxima entre cães e seres humanos coloca os primeiros numa posição privilegiada e mais aproximada à realidade humana quando comparados com os tradicionais modelos murinos, podendo fornecer uma poderosa fonte de informação para o estudo do cancro <sup>[2]</sup>.

Cada vez mais há uma consciencialização sobre a oportunidade e a necessidade crítica de abordar problemas de saúde e alcançar objetivos numa perspetiva holística, considerando a interface entre a saúde do ecossistema, a saúde animal e a saúde humana, que caracteriza a essência do conceito *One Health* em que esses três campos são interdependentes e interligados <sup>[5]</sup>.

O estudo do linfoma tem uma grande importância tanto na medicina humana quanto na veterinária devido ao aumento preocupante da sua incidência nas últimas décadas. A incidência padronizada mundial do linfoma não-Hodgkin em seres humanos é de 9,8 (casos/100.000 habitantes), 11,9 para homens e 8,0 para mulheres <sup>[6]</sup>, representando a sétima neoplasia mais insidiosa nos países desenvolvidos. Nos cães, a incidência estimada de 21,7 casos/100.000 cães, estando apenas atrás das neoplasias mamárias <sup>[7]</sup> e representando 90% das neoplasias hematopoiéticas na espécie. Assim como os humanos, os linfomas caninos são mais frequentes nos animais mais velhos, com maior predomínio de machos <sup>[8]</sup>. Os linfomas são também similares entre as duas espécies nos aspetos de morfologia celular, de imunofenótipo, da genética e características clínicas <sup>[2; 9-11]</sup>. Por esse facto, as classificações utilizadas na medicina veterinária são adaptações da humana, com predomínio, em ambas as espécies, de linfomas de células B e do subtipo de grandes células difusas (DLBCL) <sup>[2; 9; 10; 12; 13]</sup>.



Os riscos ambientais de saúde são todos os contaminantes, naturais ou não, presentes no ar, água, solo ou comida, que podem causar danos, agudos ou crônicos, na saúde dos seres humanos [3; 4; 14]. Após as intensas modificações advindas da revolução industrial e intensa urbanização, os poluentes antropogênicos, como a poluição advinda da combustão de combustíveis fósseis, das indústrias e tabaco, são de longe os que mais danos causam à saúde humana, animal e ambiental [3; 15; 16]. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a poluição do ar é o maior perigo ambiental à saúde humana [17].

A comparação entre espécies pode fornecer várias informações a respeito de possíveis fatores de risco ambientais. Também a comparação entre espécies e regiões distintas, inseridas nos estudos ambientais, podem revelar evidências e levantar hipóteses que contribuam para o melhor entendimento das causas de morbos como os linfomas.

São Paulo é uma megalópole com altas concentrações de poluição atmosférica, causadas principalmente pela frota de veículos automóveis, superior a 6 milhões [18]. A cidade do Porto está inserida na afluência de nove concelhos denominada Grande Porto, com uma população de pouco mais de um milhão de habitantes [19]. Enquanto numa das principais vias do Porto há um tráfego estimado de 160 mil veículos/dia [20], em São Paulo este número superava os 500 mil veículos/dia [18]. Surpreendentemente, as incidências padronizadas de linfoma não-Hodgkin no município de São Paulo (homens – 10,2 e mulheres 9,06/100.000 habitantes) não são particularmente distintas das do Distrito do Porto (homens – 13 e mulheres 10/100 000 habitantes) [21; 22]. Além disso, um estudo realizado em linfomas caninos no município de São Paulo identificou uma incidência superior de linfomas de células T<sup>[23]</sup>, divergente da maioria dos estudos noutros países [24].

Na obra “Zoobiquidade: o que os animais podem nos ensinar sobre saúde e a ciência de cura” (2012) [25], as autoras observam: *“Num mundo onde nenhuma criatura está verdadeiramente isolada e as doenças se espalham tão rapidamente como os jatos podem voar, somos todos os canários e todo o planeta é a nossa mina de carvão. Qualquer espécie pode ser uma sentinela de perigo - mas apenas se a mais ampla gama de profissionais de saúde estiver a prestar atenção.”*

Este trabalho teve por objetivo prestar atenção particular aos linfomas caninos e humanos, e à sua relação com o ambiente em dois países de diferentes continentes, unidos no conceito *One Health*.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

---

### 2.1. Os animais como sentinelas ambientais

Há aproximadamente 15 mil anos, a relação do homem com os cães era muito diferente, sendo estes selecionados primariamente pela sua função<sup>[2]</sup>. Os cães ajudaram os humanos a sobreviver, usando a sua velocidade para ajudar a caçar e a sua força e audácia para os proteger<sup>[2]</sup>. Embora os cães e gatos sejam animais de companhia há vários séculos, foi apenas recentemente que assumiram uma importância relevante como membros da sociedade humana<sup>[26]</sup>.

O conceito de que os animais podem ser sentinelas de perigos ambientais para a saúde pública não é novo <sup>[3]</sup>. A imagem do canário na entrada de minas de carvão para detetar altos níveis de monóxido de carbono, descritas no século passado (1914) <sup>[27]</sup>, ainda continua a ser uma forte representação de como os animais são importantes neste campo <sup>[3]</sup>. Animais em variados habitats podem ser utilizados para monitorizar os perigos ambientais <sup>[3; 14]</sup>. Em 2006, um fenómeno chamado de “aves a despenhar-se do céu” foi o alerta para um caso de envenenamento ambiental na Austrália <sup>[28]</sup>. A doença neurológica conhecida como “a febre do gato dançarino” foi um alerta quando as pessoas começaram a apresentar sintomas similares e descobriram uma contaminação das águas por mercúrio com origem em fábricas locais <sup>[29]</sup>. Os mamíferos marinhos, que constituem o topo da cadeia alimentar dos oceanos e portanto acumulam as toxinas presentes no ecossistema, foram e são considerados sentinelas do estado de poluição dos vastos oceanos<sup>[3]</sup>. Os efeitos da exposição a xenobióticos (compostos químicos estranhos a um organismo ou sistema biológico e que são por ele absorvidos<sup>[30]</sup>), poluição ambiental, metais pesados, compostos organoclorados, mercúrio, pesticidas e outros contaminantes foram amplamente documentados nestes animais<sup>[3]</sup>.

Através da partilha dos mesmos ambientes, os cães são potencialmente expostos a vários dos agentes ambientais de risco humano<sup>[3]</sup>. Considerando as similitudes entre as doenças humanas e animais, incluindo muitos dos seus fatores etiológicos, é facilmente inferível que estes animais podem ser encarados como indicadores sensíveis de perigos ambientais, fornecendo um sistema de alerta precoce que permita intervenções de saúde pública com ganho de eficácia e maior aproximação à realidade, quando comparados com estudos laboratoriais de experimentação animal<sup>[3]</sup>. As vantagens da utilização de animais domésticos como sentinelas ou modelos comparativos das doenças humanas deve-se em parte à ausência relativa a

exposições concorrentes, viés ou confundidores presentes em humanos<sup>[3]</sup>. Como exemplo, a influência do tabaco, do álcool ou de exposições ocupacionais pode mascarar ou mimetizar o efeito nocivo da exposição a outros contaminantes ambientais<sup>[3]</sup>. Sendo a precisão da avaliação da exposição um dos grandes desafios da epidemiologia ambiental, poderá argumentar-se que a mobilidade restrita, a baixa frequência de migrações e viagens e a esperança de vida curta dos animais são mais-valias adicionais para a eficiência e credibilidade do modelo<sup>[3]</sup>.

Muitos dos estudos baseados no uso de sentinelas para identificação de perigos ambientais utilizaram câncros nos animais domésticos, especialmente cães, que partilhavam o mesmo ambiente dos humanos<sup>[3]</sup>. Na Alemanha de 1932, Gustav Freiherr von Pohl criou o conceito “casas de cancro”, associando o habitat ao desenvolvimento do cancro também nos animais<sup>[31]</sup>. Outro exemplo clássico é o estudo do mesotelioma e a sua associação com exposição a amianto<sup>[32]</sup>. Em 1939 um estudo evidenciou uma associação interessante entre a poluição em Londres e carcinoma da amígdala em cães errantes<sup>[33]</sup>. Outros agentes de risco como a exposição ao tabaco<sup>[34]</sup> e pesticidas<sup>[35]</sup>, entre outros, têm revelado que os cães podem ser considerados bons sentinelas de risco de exposição ambiental<sup>[3; 36; 37]</sup>.

## **2.2. Riscos ambientais de saúde**

Os perigos ambientais à saúde são todos os contaminantes, naturais ou não, presentes no ar, água, solo ou comida, que podem causar danos, agudos ou crónicos, à saúde dos seres humanos<sup>[3; 4; 14]</sup>.

Os perigos naturais, também chamados geobiológicos, são oriundos de fenómenos da Natureza, como por exemplo emissões de vulcões, incêndios e emissões de minerais vindos do solo, como o radão<sup>[15]</sup>.

Os perigos antropogénicos são os compostos químicos produzidos em consequência da atividade humana. Devido às rápidas alterações decorrentes da industrialização, a quantidade de novos compostos químicos produzidos alteraram o ambiente sem precedentes, com a progressiva contaminação ambiental e exposição de todas as espécies animais e vegetais<sup>[15]</sup>.

Os principais poluentes ambientais são produtos da combustão de combustíveis fósseis. Em quase todos os países do mundo há uma crescente preocupação com a monitorização da qualidade ambiental e mensuração dos principais componentes prejudiciais à saúde humana, animal e ambiental. São eles: NO<sub>x</sub> (óxidos de azoto), O<sub>3</sub> (ozono), SO<sub>2</sub> (dióxido de enxofre), CO (monóxido de carbono), benzeno, chumbo,

crómio, arsénio, cádmio, níquel, benzopirenos, matérias particuladas (PM 10 e 2,5) e, cada vez mais, nanopartículas<sup>[15]</sup>.

Segundo a Organização Mundial de Saúde – “a poluição do ar, tanto do ambiente (externa) quanto a interna – é o maior perigo ambiental para a saúde, sendo responsável por aproximadamente um em cada nove mortes anualmente. A poluição do ar (externa) sozinha mata cerca de três milhões de pessoas em cada ano.(...) A poluição do ar continua a aumentar em escalas preocupantes, afetando a economia e a qualidade de vida das pessoas” <sup>[38]</sup>.

A Agência Internacional para a Pesquisa em Cancro (IARC) classificou a poluição externa como sendo carcinogénica (grupo 1 - evidências suficientes) em humanos <sup>[39]</sup>. Estudos epidemiológicos mostram consistentemente que a exposição à poluição atmosférica, em especial por partículas, está associada ao aumento do risco de cancro, proporcional ao nível de exposição <sup>[39]</sup>.

Os poluentes que suscitam maior preocupação do ponto de vista da saúde são o ozono, os materiais particulados (MP), os óxidos de azoto e de enxofre e os compostos orgânicos voláteis (COVs) <sup>[38]</sup>. A seguir são descritas as características destes poluentes, os valores máximos recomendados pela Organização Mundial de Saúde e os respetivos limites oficiais em Portugal <sup>[40]</sup> e no Brasil <sup>[17; 41]</sup>.

Poluente	Valor Limite ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )		
	OMS	Portugal	Brasil
<b>Ozono</b>	100	120	140

Período considerado: média de 8 horas

O ozono, dentro da categoria de oxidantes fotoquímicos, é um poluente não diretamente emitido de uma fonte primária, isto é, é formado através de uma complexa série de reações químicas na atmosfera geridas pela transferência de oxigénio do dióxido de azoto ( $\text{NO}_2$ ) quando absorve a radiação solar, fornecendo um oxigénio reativo para a molécula  $\text{O}_2$ , resultando em  $\text{O}_3$  <sup>[17]</sup>. Os precursores que fornecem substratos para essa reação química são os óxidos de azoto, os compostos voláteis orgânicos (COV), e o metano <sup>[17; 42]</sup>.

A concentração ambiental do ozono é dependente de vários fatores como a intensidade luminosa, convecção atmosférica, espessura da camada de inversão termal, concentração de óxidos de nitrogénio e COVs. O ozono, uma vez formado, espalha-se com o vento sendo as altas concentrações urbanas deslocadas para regiões de maior altitude <sup>[17; 43]</sup>.

A absorção do ozono é praticamente exclusiva por inalação, através do trato respiratório superior e vias aéreas intratorácicas, muito superior em pessoas durante

atividade física intensa <sup>[17]</sup>. A sua absorção é maior em crianças e mulheres <sup>[17]</sup>. Os efeitos da inalação de ozono advêm de reações inflamatórias difusas que não se restringem ao aparelho respiratório, mas alteram os mecanismos imunológicos por diversos mecanismos como a diminuição da limpeza muco ciliar, diminuição da atividade macrofágica e efeitos nos linfócitos circulantes, conduzindo, em casos crónicos, a alterações estruturais importantes <sup>[17]</sup>.

Poluente	Valor Limite ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )		
	OMS	Portugal	Brasil
Matéria particulada - <b>PM<sub>10</sub></b>	20	40	40
<b>PM<sub>2,5</sub></b>	10	20	20
Período considerado: média anual			

As partículas, ou matérias particuladas (designadas internacionalmente como PM – *particulated matter*) representam uma mistura complexa e heterogénea de componentes com diferenças físicas e químicas, divididas de acordo com o diâmetro aerodinâmico em partículas com menos de 10  $\mu\text{m}$  (PM<sub>10</sub>) e com menos de 2,5  $\mu\text{m}$  (PM<sub>2,5</sub>). As PM<sub>10</sub> incluem partículas suficientemente pequenas para penetrar nos brônquios enquanto as PM<sub>2,5</sub> têm uma alta probabilidade de deposição nos alvéolos pulmonares <sup>[17]</sup>.

São diversas as fontes de partículas, tanto relacionadas as atividades humanas como originárias de fontes naturais, sendo a primeira forma responsável por mais de dois terços da sua produção <sup>[17]</sup>. As principais origens incluem a combustão de combustíveis fósseis, de biomassa (madeira residencial, incêndios florestais) e emissões de amónia dos processos agrícolas <sup>[17]</sup>. A combustão da madeira é responsável pela emissão de mais de 200 compostos distintos provenientes dos polímeros e resinas presentes <sup>[17]</sup>. Os principais efeitos das partículas na saúde resultam da produção de radicais livres pela resposta inflamatória à presença das partículas e da genotoxicidade, direta ou indireta, por eles causada <sup>[17]</sup>. A inalação de partículas pode aumentar a produção de imunoglobulinas antigénio-específicas e alterar a função imunológica <sup>[17]</sup>.

Poluente	Valor Limite ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )		
	OMS	Portugal	Brasil
<b>Dióxido de Azoto (NO<sub>2</sub>)</b>	40	40	60
Período considerado: média anual			

O dióxido de azoto é um gás castanho avermelhado com odor pungente, potente oxidante que, ao reagir com a água, produz ácido e óxido nítricos <sup>[17]</sup>. Tem um papel

crítico na formação de ozono na troposfera visto que é o único iniciador da formação deste composto, seja em atmosferas poluídas ou não <sup>[17]</sup> e, através de reações com o dióxido de enxofre, é fonte de nitratos e sulfatos, medidos como matérias particuladas <sup>[17]</sup>. Por ser considerado precursor chave de uma série de poluentes secundários que afetam a saúde, foi utilizado nalguns estudos como marcador da poluição atmosférica <sup>[17]</sup>.

As suas principais fontes são os processos de combustão em centrais termoelétricas, centrais de aquecimento, veículos automóveis e navios, havendo uma relação notória entre os seus níveis e o consumo de combustíveis <sup>[17]</sup>.

As fontes de poluição interna incluem fumo de tabaco e emissões de aparelhos a gás e fogões a óleo, podendo atingir níveis muito superiores aos recomendados por longos períodos de tempo <sup>[17]</sup>.

Após a inalação, mais de 70% do dióxido de azoto é absorvido pelo aparelho respiratório, fenómeno aumentado pela prática de atividade física. Em cães, praticamente 50% da quantidade inalada é removida pela nasofaringe, com a restante podendo permanecer dentro do pulmão por longos períodos e mesmo ser absorvida e encontrada no sangue e na urina <sup>[17]</sup>.

Os efeitos da exposição a este poluente são principalmente no metabolismo, estrutura e função pulmonar assim como perturbação do sistema imunológico <sup>[17]</sup>.

Poluente	Valor Limite ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )		
	OMS	Portugal	Brasil
<b>Dióxido de Enxofre (SO<sub>2</sub>)</b>	20	60	60
Período considerado: 24 horas			

O dióxido de enxofre é um gás incolor e muito solúvel em água, na qual forma o ácido sulfúrico. As fontes naturais, como as emissões vulcânicas, são insignificantes perto das emissões antropogénicas, como a utilização de combustíveis fósseis que contêm enxofre para o aquecimento residencial, em centrais termoelétricas e por veículos automóveis <sup>[17]</sup>. A concentração interna costuma ser menor do que a externa na sequência da sua absorção pelas paredes, mobília e vestuário. No entanto, a exposição ocupacional a este poluente pode ultrapassar largamente as concentrações máximas recomendadas <sup>[17]</sup>.

Sendo apenas por inalação, a absorção de SO<sub>2</sub> pelas mucosas respiratórias ocorre rapidamente em virtude da sua alta solubilidade em água, aumentando com o exercício físico <sup>[17]</sup>.

Tanto na Europa como na América do Norte, as concentrações de SO<sub>2</sub> nas áreas urbanas diminuíram consideravelmente como resultado do controlo de emissões e

alterações na utilização de combustíveis [17]. Entretanto, em cidades onde ainda se utiliza o carvão como fonte de aquecimento doméstico ou para preparação de alimentos, ou onde as fontes industriais não são controladas, os valores podem chegar a decuplicar [17].

Um traço comum da poluição ambiental pelos compostos descritos é a perturbação do sistema imunológico, transversal a todas as espécies animais [15]. O sistema imunológico, pela sua complexidade e mecanismos intrínsecos de atuação, tem uma dificuldade especial na adaptação a mudanças ambientais [15; 44]. Quando a homeostase do sistema imunológico é perturbada iniciam-se processos de estresse oxidativo, com produção de radicais livres (espécies reativas de oxigénio e nitrogénio) que podem conduzir à sua desregulação e possível transformação neoplásica [15].

### **2.3. Sistema Imunológico**

O sistema imunológico é responsável, em síntese, pela proteção do organismo sendo um complexo sistema de mecanismos de defesa interligados que em conjunto eliminam ou controlam os potenciais invasores nefastos [45]. O sistema funciona como uma rede interativa altamente complexa que, quando ativado, desencadeia diversas alterações em múltiplas vias interligadas entre si, com várias respostas e a participação de variados tipos celulares, moléculas e órgãos distintos [45].

O sistema hematopoiético é o responsável pela produção das células do sistema imunológico e é genericamente dividido em dois tipos de tecidos fundamentais: mieloide e linfoide [46]. Os tecidos mieloides incluem a medula óssea e as células sanguíneas dela derivadas (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) [46]. O tecido linfoide é dividido em dois compartimentos principais: tecidos linfoides primários ou centrais e secundários ou periféricos [47]. Os tecidos linfoides primários são a medula óssea e o timo. Contêm células linfoides precursoras e sustentam o processo inicial de diferenciação independente do antigénio, desde células imaturas até estádios mais maduros que permitem realizar funções em resposta aos estímulos antigénicos [47]. Os órgãos linfoides secundários são os linfonodos, baço, e tecido linfoide associado a mucosas (MALT), onde os linfócitos maduros encontram os antigénios e desenvolvem diferentes tipos de respostas imunológicas [47].

Nos microambientes altamente organizados do tecido linfoide, conjugam-se diferentes populações celulares, estruturas vasculares e componentes estromais para facilitar as interações entre os linfócitos e antigénios, gerando a resposta imunológica [47]. São locais altamente organizados onde os estádios de diferenciação e maturação linfoide ocorrem, caracterizando-se por:

- uma anatomia definida e particular – são encontrados em locais específicos do corpo;
- uma arquitetura única e complexa – cada tecido linfoide está especificamente organizado para que as reações celulares e de diferenciação ocorram em locais específicos dentro destes tecidos organizados;
- uma morfologia celular específica – as células, quando contactam com os antígenos, alteram o seu tamanho, forma e perfil de expressão de recetores de superfície;
- uma grande plasticidade de expressão genética - as células linfoides alteram a sua expressão genética e as proteínas que produzem no processo de formação e ativação <sup>[47]</sup>.

Os componentes celulares deste sistema incluem células fagocitárias (neutrófilos, monócitos ou macrófagos), linfócitos [células T, células B e células “natural-killer” (NK)], e células apresentadoras de antígeno (histiócitos e células dendríticas), capazes de desencadear dois tipos distintos de resposta <sup>[47]</sup>. A resposta inata é a primeira linha de defesa, mediada por células (fagócitos, células dendríticas, células NK e algumas células T, incluindo células T gama-delta) que reconhecem um vasto, embora pouco específico, número de antígenos e não geram memória imunológica <sup>[47]</sup>. A resposta adaptativa dirige-se especificamente contra antígenos que são apresentados por complexos principais de histocompatibilidade (MHC) aos linfócitos B, que podem reconhecer um espectro virtualmente universal de antígenos, gerando células com memória imunológica <sup>[47]</sup>.

Morfologicamente semelhantes entre si embora com funções muito diferentes, os linfócitos são diferenciados através da caracterização das suas moléculas de superfície celular (glicoproteínas), que caracterizam cada fenótipo celular <sup>[45]</sup>. Estas moléculas foram classificadas através de um sistema denominado “*cluster of differentiation*” (CD), identificadas individualmente através de números sequenciais, porém arbitrários (CD1 a CD371), que não definem a sua função molecular <sup>[45]</sup>. A identificação de células com expressão de CD específicas permite identificar subpopulações celulares e acompanhar o seu desenvolvimento e diferenciação <sup>[45]</sup>.

### **2.3.1. Diferenciação dos linfócitos**

Os linfócitos atravessam duas principais fases de diferenciação, uma independente e outra dependente de antígenos externos (figuras 2.1 a 2.3). A diferenciação independente de antígeno, que ocorre nos órgãos linfoides primários, resulta na



produção de linfócitos maduros e prontos para responder a antígenos, chamados linfócitos B e T virgens ou *naïves*. Estas células expressam moléculas de superfície que são recetores de antígenos - recetor de célula B (BCR) e de célula T (TCR) - e, quando expostas aos respetivos ligandos, transformam-se em células blásticas grandes e proliferativas (imunoblastos ou centroblastos). Os estádios iniciais de diferenciação, tanto antígeno dependente como independente, resultam em células com capacidade proliferativa, enquanto as células efetoras totalmente diferenciadas não se dividem até que sejam estimuladas por um antígeno, dando então origem a uma grande população de células de memória (plasmócitos)<sup>[47]</sup>.

A alteração imunofenotípica dos linfócitos ao longo do processo de maturação permite identificá-los em todas as fases do seu ciclo de vida. A grande homologia entre os recetores humanos e caninos permite que o mesmo sistema classificativo seja usado nas duas espécies, com exceção dos raros recetores não homólogos que são classificados como WC (*workshop cluster*)<sup>[45]</sup>.

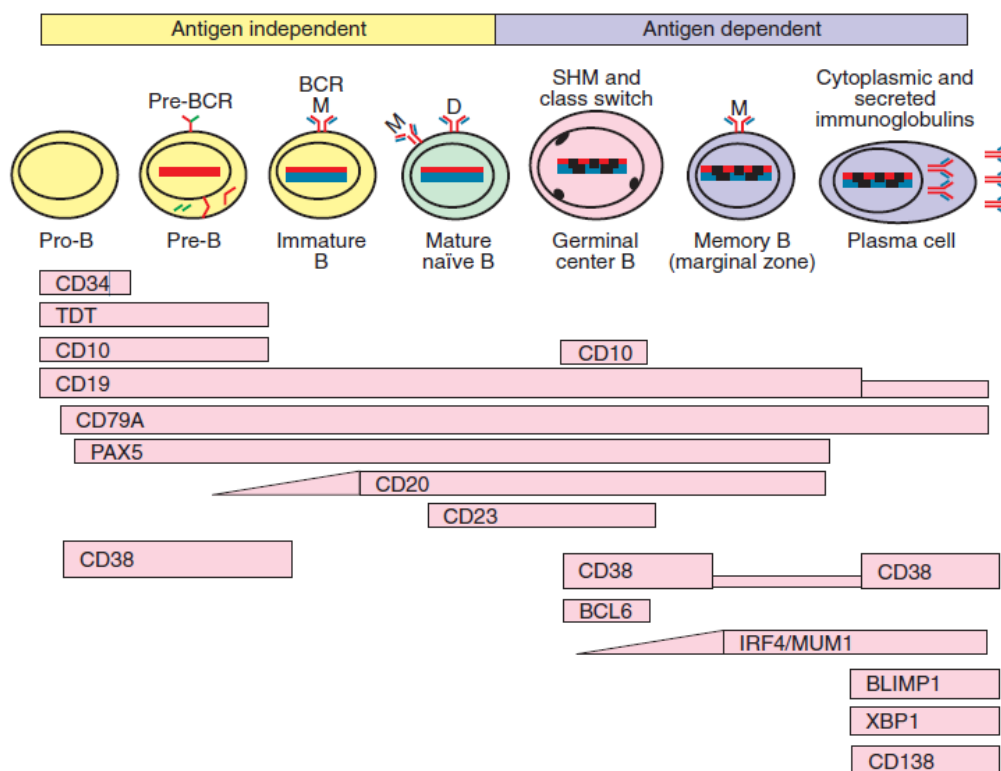
#### **2.3.1.1. Linfócitos B**

A maturação dos linfócitos B (figura 2.1) inicia-se a partir dos seus precursores primitivos (prolinfócitos B) que expressam as moléculas CD34, CD10, CD19. O CD19 é um marcador primitivo de diferenciação de linfócitos B que se mantém durante todo o processo de diferenciação, com atenuação nos plasmócitos, fase em que a célula inicia a expressão do gene desoxinucleotidiltransferase terminal (TdT), um dos responsáveis pela recombinação genética necessária para a produção de imunoglobulinas. O estágio seguinte de desenvolvimento é representado pela célula pré-B, caracterizada pelo rearranjo genético da cadeia pesada, que passa a expressar CD45, CD79 e PAX5<sup>[47; 48]</sup>. Os prolinfócitos e as células pré-B recebem a designação de linfoblastos B precursores<sup>[47]</sup>.

No estágio seguinte de maturação, cada célula B em desenvolvimento rearranja os genes e produz as cadeias leves, formando os linfócitos B imaturos (*naïve*) que passam a expressar CD20<sup>[47]</sup>. São pequenos linfócitos que podem ser encontrados no sangue periférico, folículos linfoides primários e zona do manto dos linfonodos<sup>[47; 48]</sup>.

Após a aquisição de competência funcional, isto é, produção de imunoglobulinas, as células são denominadas células B maduras, encontradas no sangue e órgãos linfoides periféricos e capazes de reconhecer os antígenos com alta afinidade e de sofrer, em consequência, uma transformação blástica formando os imunoblastos, células B imaturas de núcleo grande com cromatina frouxa e nucléolo central proeminente. Os imunoblastos proliferam e diferenciam-se em células secretoras de

anticorpos (plasmócitos) e células de memória [47; 48]. A diferenciação dos plasmócitos é caracterizada pela expressão de CD138 acompanhada por subexpressão de PAX5 [47].



**Figura 2. 1** - Diagrama esquemático de diferenciação dos linfócitos B.

Durante a sua maturação, os linfócitos B passam por estádios caracterizados por um padrão específico de expressão de proteínas membranares que servem como marcadores fenotípicos (barras em rosa) desses estádios de desenvolvimento. (fonte: Jaffe et al. Hematopathology 2011[47]).

### 2.3.1.2. Linfócitos T

As células precursoras dos linfócitos T migram da medula óssea para o timo onde ocorre a sua maturação e seleção. O processo de maturação dos linfócitos T resulta na expressão do receptor de célula T (TCR- *T cell receptor*) funcional e das moléculas CD4 e CD8 [47]. Apenas as células maduras deixam o timo e entram na circulação [49].

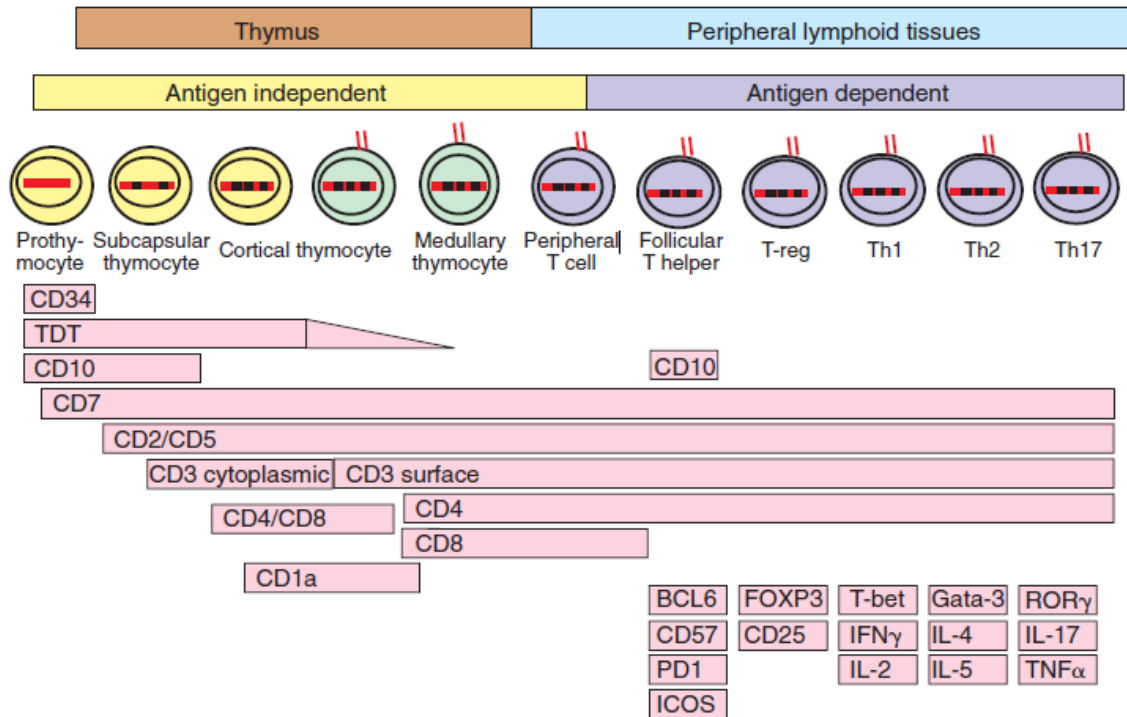
Os timócitos corticais são linfoblastos que contêm a enzima intranuclear Tdt e expressam CD34, CD45RA, CD13 e CD33, mas ainda não expressam CD3, CD4 ou CD8, sendo por isso denominados como células “triplo negativas”. No timo, as células adquirem sequencialmente CD1a, CD2, CD5, CD3 (citoplasmático) e primeiro o CD4 auxiliar e depois o CD8 supressor, tornando-se em células “duplo positivas”. Ainda no timo, o rearranjo genético do TCR é iniciado com as cadeias gama e delta, seguido pelas

cadeias beta e alfa e que são então expressas na superfície celular <sup>[47]</sup>. O TCR é expresso na membrana em associação com um complexo denominado CD3, composto por cinco diferentes imunoglobulinas <sup>[49]</sup>.

Após uma seleção positiva (de células que não apresentem um reatividade contra si próprias) e uma seleção negativa (sem especificidade), as células remanescentes começam a expressar altos níveis de CD3 membranar, adquirem CD27 e CD69, perdem CD1a, expressam BCL2 e deixam de ser duplamente positivas (CD4+/CD8), tornando-se células T maduras (naive) <sup>[47; 49]</sup>. Finalizado o processo de maturação no timo, originam-se então duas populações de linfócitos T: CD4<sup>+</sup>, descritos como auxiliares, e CD8<sup>+</sup>, denominados citotóxicos. Essas células atingem a corrente sanguínea e circulam nos órgãos linfoides secundários, linfonodos e baço, até encontrarem os seus antígenos específicos e serem ativadas. É necessária uma interação complexa de moléculas de superfície dos linfócitos T com as moléculas de superfície das células apresentadoras de antígenos para a ativação dos primeiros em resposta ao antígeno. Nos linfócitos T, as moléculas CD4 e CD8 ligam-se às MHC classe II ou classe I, respetivamente, originando uma cadeia de ligações com produção de moléculas estimuladoras, como interferão gama e interleucinas, capazes de promover estímulos mútuos de ativação <sup>[47]</sup>.

Os linfócitos T maduros transformam-se em imunoblastos, grandes células com nucléolo proeminente e citoplasma basofílico que são indistinguíveis dos imunoblastos B. Os imunoblastos T são TDT e CD1 negativos, expressam fortemente CD3 e continuam a expressar CD4 ou CD8 <sup>[47]</sup>.

Os linfócitos T auxiliares (Th- *helpers*) são responsáveis por estimular a proliferação dos linfócitos T citotóxicos (CD8) contra o antígeno, além de estimularem a proliferação dos linfócitos B e sua diferenciação em plasmócitos. As células Th são subdivididas pelo padrão de citocinas que produzem, podendo um precursor Th0 tornar-se numa célula Th1 (IL-2, interferão gama), Th2 (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) ou Th17 (IL-23). Os linfócitos citotóxicos estão envolvidos principalmente nas respostas antivirais e possuem atividade antitumoral <sup>[49]</sup>.



**Figura 2.2 – Diagrama esquemático da diferenciação dos linfócitos T.**

Os precursores primitivos de células T expressam CD34, TDT e CD10. O CD7 é o primeiro marcador específico de células T expresso, seguido por CD2/CD5 e CD3 citoplasmático (fonte: Jaffe et al. Hematopathology 2011<sup>[47]</sup>).

### 2.3.2. Linfonodos

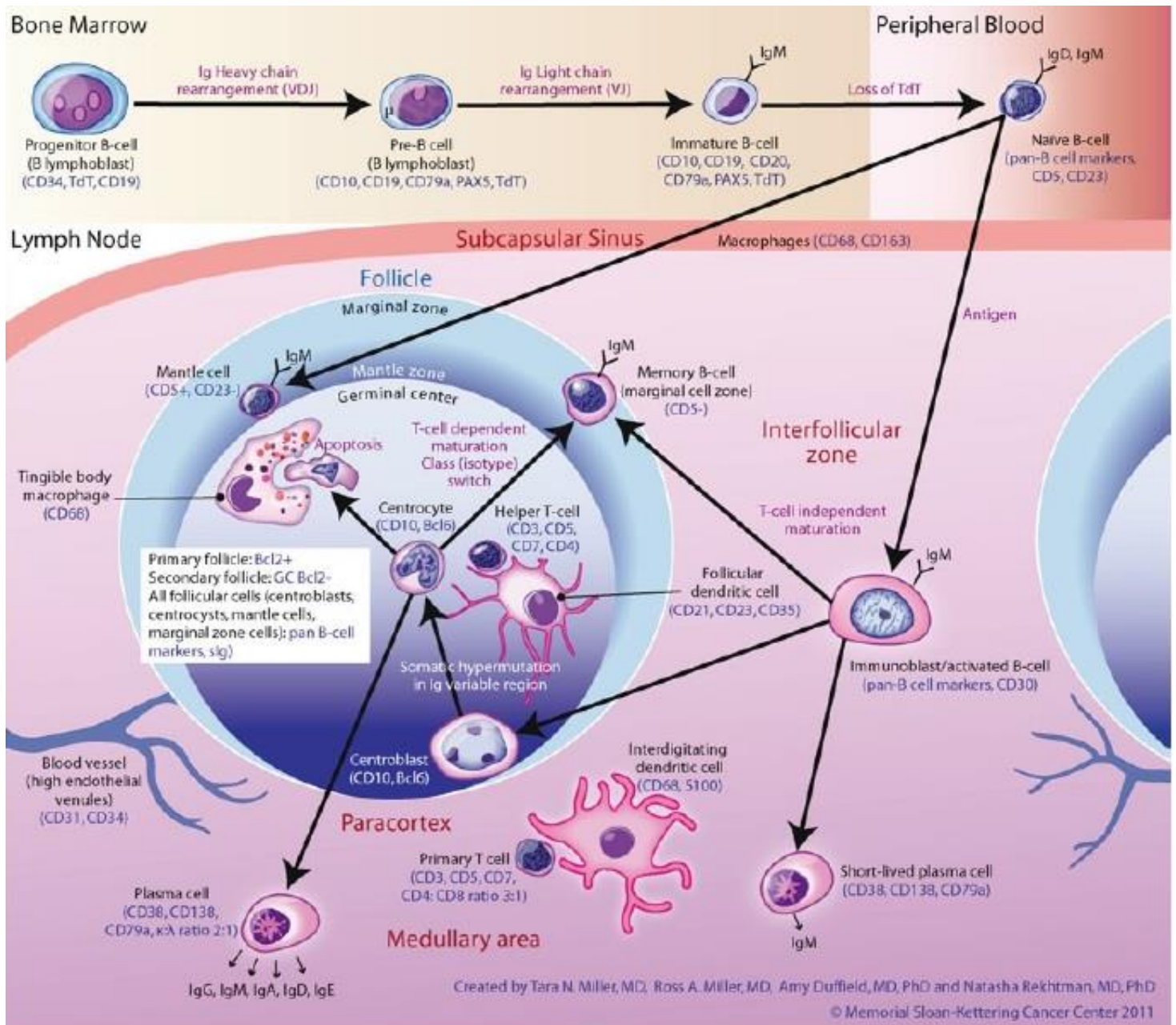
Os linfonodos, tecido linfóide secundário ou periférico, são estruturas linfóides estrategicamente espalhadas pelo corpo para maximizar a captura de antígenos presentes na linfa. São protegidos por uma fina cápsula com trabéculas internas que sustentam a arquitetura tecidual e contêm histiócitos (macrófagos), responsáveis pela captura e processamento dos antígenos e sua apresentação aos linfócitos. Os compartimentos celulares estão divididos em três regiões: 1. Área medular - área interna dos linfonodos que contém células B e T, plasmócitos, macrófagos e células dendríticas; 2. Para córtex - zona de células T e células apresentadoras de antígenos; 3. Córtex ou área cortical - zona de células B onde estão inseridos os folículos linfóides (zona folicular) e uma pequena rede de células dendríticas <sup>[47]</sup>.

### 2.3.2.1. Folículos linfóides

Os folículos linfóides primários, não ativados e sem centro germinativo, são constituídos por células B em repouso, recirculantes e de memória <sup>[48]</sup> que são linfócitos pequenos, com núcleos redondos e citoplasma escasso <sup>[50]</sup>. A estimulação antigénica destas células gera a sua expansão de forma altamente organizada e formação dos folículos linfóides secundários (figura 2.3), compostos por um halo mais escuro (zona do manto), uma camada mais fina externa (zona marginal), um centro germinativo e uma densa rede de células dendríticas <sup>[47]</sup>. Nos centros germinativos ocorre a proliferação celular pela estimulação antigénica, a hipermutação somática e a seleção positiva e negativa das populações de linfócitos <sup>[45]</sup>. A formação do centro germinativo desloca as células originais do folículo primário para a periferia, que passam então a constituir a zona do manto <sup>[47]</sup>. O centro germinativo é polarizado e subdivide-se numa porção escura, formada principalmente por centroblastos e uma porção clara, constituída sobretudo por centrócitos <sup>[50]</sup>.

Ao entrar na zona escura do centro germinativo (figura 2.3), as células blásticas B ativadas transformam-se em centroblastos cujas características morfológicas os permitem distinguir: núcleo grande, cromatina frouxa e nucléolos pequenos e múltiplos, geralmente três, próximos da membrana nuclear <sup>[50]</sup>. Os centroblastos continuam a multiplicar-se e sofrem pequenas mutações originando células que produzem anticorpos levemente diferentes, um processo denominado hipermutação somática. Na zona clara do centro germinativo, os centroblastos que produzem anticorpos com maior afinidade são selecionados e transformam-se em centrócitos que têm núcleos com cromatina mais condensada, indentações e nucléolos indistintos. Nesta zona clara também há uma maior concentração de células T e de macrófagos de corpos tingíveis, que fagocitam restos celulares, e de centroblastos não selecionados que sofreram apoptose, responsáveis pelo aspeto característico de “céu estrelado”<sup>[50]</sup>.

No final deste processo, a maioria das células de alta afinidade ao antígeno sofrerão ou maturação como células de memória, que passam à linfa e retornam à circulação sanguínea, ou transformam-se em imunoblastos e em seguida em células efetoras – plasmócitos <sup>[50]</sup>.



**Figura 2.3** - Diagrama anatómico de diferenciação de linfócitos nos linfonodos e foliculos linfoides com os respectivos fenótipos (fonte: Quick Reference Handbook for Surgical Pathologists, 2011 [51]).

Este conhecimento elemental do sistema imunológico fornece algumas das bases para um entendimento das neoplasias linfoides [52].

## **2.4. Neoplasias linfoides**

A maioria das neoplasias linfoides é monoclonal, ou seja, resultante de uma célula que sofreu alterações genéticas, perdendo o controlo do ciclo celular ou da apoptose e levando à produção de clones. Em consequência, a maioria das células neoplásicas são semelhantes às células normais homólogas, podendo ser identificadas através dos recetores característicos de cada fase de maturação e diferenciação. No entanto, as alterações genéticas são suscetíveis de desencadear o desenvolvimento de outros processos neoplásicos, dando origem ao aparecimento de células que não correspondem a estádios conhecidos de desenvolvimento normal e exibindo fenótipos aberrantes. Na maioria dos casos, os clones malignos não estão restritos a um estágio de diferenciação podendo apresentar células em diferentes fases de maturação [52].

### **2.4.1. O macro ambiente**

As neoplasias linfoides, como a grande maioria das neoplasias, são resultado de diversas interações do ambiente com fatores genéticos. Entretanto, sendo uma neoplasia do sistema responsável pela proteção do indivíduo contra microrganismos patogénicos invasores e potencialmente fatais, como bactérias, vírus, fármacos, químicos ambientais e radiações, as células do sistema imune são constantemente ativadas, o que causa uma hiperplasia para cumprir o seu papel de proteção [52].

São quatro as vias patogénicas através das quais os agentes ambientais podem induzir esta hiperplasia de populações celulares específicas, aumentando desta forma o risco de desenvolvimento de uma anormalidade genética relevante – um pré-requisito absoluto para a neoplasia [52]:

- Estimulação crónica de recetor antigénico;
- Alterações no balanço ou na regulação dos subtipos de linfócitos ou em resultado de um dano nas ações de células reguladoras, e.g. apoptose;
- Dano direto ao ADN celular;
- Ação direta sobre uma via molecular relevante;

Os tecidos linfoides são particularmente suscetíveis aos fatores descritos porquanto os seus fenómenos fisiológicos de recombinação para formação dos recetores de antígenos os predispõem a erros (e.g. troca de classes de imunoglobulinas ou mecanismos hipermutacionais somáticos) potencialmente desencadeantes do processo neoplásico [52].

## **2.5. Linfomas**

A primeira descrição de um processo mórbido, que mais tarde viria a receber o seu nome, dos gânglios linfáticos e do baço foi publicada em 1832 por Thomas Hodgkin no *Journal of the Medical and Chirurgical Society* de Londres. Hodgkin afirmava que, embora afetasse órgãos linfoides, se tratava de um processo não infeccioso. Três décadas depois, Samuel Wilkins descreveu a mesma doença e, percebendo que já havia sido relatada por Hodgkin, decidiu batizá-la doença (ou linfoma) de Hodgkin. O seu estudo subsequente permitiu perceber que na maioria dos casos não se observavam as típicas células descritas por Hodgkin - células de Reed-Sternberg – pelo que foram designados linfomas não-Hodgkin [52].

### **2.5.1. Definição**

Os linfomas são neoplasias dos linfócitos que podem surgir em linfonodos ou em localizações extra-nodais [46]. São considerados tumores monoclonais de células B, T ou NK, podendo desenvolver-se em qualquer dos seus estádios de diferenciação [53]. Algumas neoplasias podem apresentar mais de um estágio de diferenciação e, dentro de um mesmo processo, os clones malignos podem alterar os seus próprios estádios de diferenciação celular [52].

As neoplasias linfoides malignas diferem em muitos aspetos de outras neoplasias porque se originam num sistema amplamente disperso e complexo, com todos os seus precursores e linhagens, do qual fazem parte linfócitos livres que possuem normalmente a capacidade e obrigatoriedade de migrar a todos os tecidos do corpo. Por isso, os conceitos de invasão e metastização estão implícitos, conferindo a essas neoplasias um comportamento maligno, devendo a designação “linfoma” ser entendida como “linfossarcoma” [52].

Nos seres humanos, os linfomas são classificados classicamente como linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin. Embora tenham sido diagnosticados alguns linfomas de Hodgkin em gatos, a vasta maioria nos animais domésticos é muito similar aos linfomas não-Hodgkin, por isso podem ser simplesmente referidos como linfomas [46].

### **2.5.2. Classificação**

A classificação dos linfomas caninos é feita de acordo com a sua localização anatómica, critérios histológicos/citológicos e características imunofenotípicas [8].



### 2.5.2.1. Localização anatômica

Os locais anatômicos de desenvolvimento dos linfomas caninos são:

1. Multicêntricos (MC) – Caracterizados por uma linfadenomegalia superficial, podem ainda envolver outros órgãos como fígado, baço, sangue e medula óssea<sup>[8]</sup>. O número de órgãos afetados define e caracteriza o estadiamento clínico. Esta é a forma anatômica mais frequente em cães, correspondendo a 80% dos casos diagnosticados.
2. Alimentares ou gastrointestinais – Caracterizando-se por uma infiltração solitária, difusa ou multifocal do trato gastrointestinal, com ou sem linfadenopatia mesentérica, são a segunda forma mais frequente na espécie (5 a 7% de todos os linfomas)<sup>[8]</sup>.
3. Cutâneos – Solitários ou mais generalizados, podem ser designados como epiteliotrópicos (micose fungóide) com origem, na maior parte dos casos, em células T (CD8<sup>+</sup>)<sup>[54]</sup> e invadindo a epiderme, ou não epiteliotrópicos quando envolvem a derme e tecido subcutâneo<sup>[8]</sup>. Os linfomas cutâneos podem metastizar para linfonodos, baço, fígado e medula óssea<sup>[8]</sup>.
4. Tímicos/Mediastinais – Caracterizados pelo aumento dos linfonodos craniomediastinais, timo ou ambos, ocorrem em aproximadamente 5% dos casos e geralmente têm origem em células T. Em 10% a 40% dos casos dão origem a uma síndrome paraneoplásica de hipercalcemia <sup>[8]</sup>.
5. Esplênicos – Incomuns, são por vezes classificados como linfomas de zona marginal e têm frequentemente um curso indolente<sup>[55; 56]</sup>.
6. Hepáticos – Relativamente raros, envolvem apenas o fígado com ausência de linfadenopatia periférica<sup>[57]</sup>.
  - 6.1. Linfoma hepato-esplênico – relativamente incomum, caracteriza-se pela infiltração do fígado, baço e medula óssea por células T  $\gamma\delta$  (gama-delta) (CD11<sup>+</sup>), ausência de linfadenopatia generalizada, extrema agressividade biológica e fraca resposta a terapia <sup>[8; 58]</sup>.

- 6.2. Linfoma hepatocitotrópico – Distinto do anterior por envolver células CD11<sup>+</sup> e apresentar um padrão de envolvimento hepático em que os linfócitos não estão confinados aos sinusóides hepáticos, mas invadem os cordões hepáticos [57].
7. Linfoma extranodal – Pode ocorrer em qualquer localização fora do sistema linfático, incluindo olho<sup>[59]</sup>, sistema nervoso central (SNC)<sup>[60]</sup>, pulmão<sup>[61]</sup>, ossos<sup>[62]</sup>, próstata<sup>[63]</sup>, rim<sup>[64]</sup>, bexiga<sup>[65]</sup>, coração<sup>[66]</sup>, cavidade nasal<sup>[67]</sup> e vasos sanguíneos<sup>[8; 68]</sup>.
8. Linfoma intravascular – Proliferação linfocitária dentro do lúmen e parede dos vasos sanguíneos na ausência de uma massa primária extravascular ou leucemia. Na maioria dos casos envolvem o sistema nervoso central e o olho<sup>[8]</sup>.

#### **2.5.2.2. Critérios morfológicos e imunofenotípicos**

A classificação histológica dos linfomas em animais domésticos tem seguido muitos dos critérios aplicados em linfomas não-Hodgkin humanos<sup>[69]</sup>. Em ambas as espécies, o desenvolvimento das técnicas de imunofenotipagem permitiu rever e melhorar uma classificação até então tipicamente baseada em critérios morfológicos<sup>[69]</sup>. O sistema Rappaport de 1966<sup>[70]</sup> foi um dos primeiros sistemas de classificação aplicados a linfomas caninos<sup>[69]</sup>. Em meados da década de 1970 foram publicadas as classificações de Lukes-Collins<sup>[71]</sup> na América do Norte e de Kiel na Europa, baseadas em conceitos imunológicos<sup>[69]</sup>. Em 1982 o *National Cancer Institute*, numa tentativa de unificação entre os diversos sistemas de classificação dos linfomas não-Hodgkin humanos, publicou o que chamou a “Working Formulation”, uma ferramenta mais orientada para a clínica, focando-se em particular no seu valor prognóstico<sup>[69; 72]</sup>. No entanto, estas características não permitiam uma classificação histopatológica nem a sua utilização em cães, visto a sobrevida ter sido estudada em humanos<sup>[12]</sup>. Após falhar na classificação de 12% dos LNH humanos, a classificação original de Kiel foi revista em 1989 tornando-se aplicável a linfomas caninos onde adquiriu valor prognóstico<sup>[11; 73-77]</sup>. Muitos estudos continuam a utilizar este sistema, principalmente em estudos citológicos<sup>[12; 75; 78-81]</sup>. Nesta classificação, os linfomas não-Hodgkin são definidos essencialmente de acordo com as suas células, caracterizadas pela morfologia e imunofenótipo, e classificados como de baixo e alto grau de malignidade<sup>[77]</sup>.

Com os avanços da imunologia e da histoquímica foi necessária uma nova adaptação dos sistemas de classificação e assim, em 1994, o *International Lymphoma Study Group* (ILSG) propôs o sistema REAL – *Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms*<sup>[82]</sup>, que inclui como critérios de diagnóstico todas

as informações relevantes: morfologia celular e linhagem, assim como topografia e biologia de cada neoplasia, definindo cada uma como entidade específica<sup>[82]</sup>. O sistema de classificação de tumores linfoides e hematopoiéticos da OMS, baseado nos princípios da REAL<sup>[53]</sup>, foi uma tentativa de definir neoplasias que podem ser reconhecidas por patologistas com as técnicas disponíveis e distinguir diferentes entidades clínicas<sup>[53]</sup>. Mesmo a OMS concorda que não existe uma classificação “*gold standard*” para as neoplasias do sistema hematopoiético<sup>[53]</sup>. Os estudos de imunofenotipagem são rotineiros no diagnóstico da vasta maioria das malignidades hematológicas humanas, tanto para determinar a linhagem do processo quanto para diferenciar processos benignos de malignos<sup>[53]</sup>. A inclusão do imunofenótipo não só permite o reconhecimento da neoplasia mas também identifica recetores, genes ou vias que podem ser alvos terapêuticos<sup>[53]</sup>. A classificação atual da OMS para linfomas caninos inclui a morfologia celular, o fenótipo, a localização, a arquitetura tecidual e o seu curso clínico – linfomas agressivos ou indolentes <sup>[12; 55; 83-85]</sup>.

**Tabela 2.1** – Classificação de Kiel adaptada utilizada na classificação citológica de linfomas caninos<sup>[11; 76]</sup>.

<b>Linfócitos B</b>	Baixo grau	De pequenas células	Linfocítico
			Linfoplasmocitóide
			Prolinfocítico
			Centrocítico
		Centroblástico/Centrocítico	
		De células médias macronucleadas	
	Alto grau	Centroblástico	Monomórfico
			Polimórfico
		Imunoblástico	
		De pequenas células	Tipo Burkitt
		Plasmocitóide	
	Linfoblástico		
<b>Linfócitos T</b>	Baixo grau	De pequenas células	De células claras
			Prolinfocítico
			Pleomórfico
		Micose fungóide	
	Alto grau	Pleomórfico misto (pequenas e grandes células)	
		Pleomórfico de grandes células	
		Imunoblástico	
Plasmocitóide			
	Linfoblástico (linfoma de células T precursoras)		

**Tabela 2.2** – Classificação de neoplasias linfoides adotada pela OMS e aplicada em animais (Fonte: Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals, 2015)<sup>[46]</sup>.

<b>Imunofenótipo</b>			
<b>Linfócitos B</b>	<b>Precursor</b>	Linfoblástico (leucemia linfoblástica aguda)	
	<b>Maduro</b>	Linfocítico de células pequenas (leucemia linfocítica crônica)	
		Linfocítico de células intermédias	
		Linfoplasmocítico	
		Difuso de células grandes	SOE
			Centroblástico
			Imunoblástico
			Rico em T
		Anaplásico	
		Granulomatose linfomatóide	
		Folicular	Folicular grau 1
			Folicular grau 2
			Folicular grau 3
		Da zona marginal	Nodal
			Esplénica
			MALT
		Do manto	
Tipo Burkit			
Plasmocítico	Plasmocitoma extramedular		
	Mieloma múltiplo		
<b>Linfócitos T e NK</b>	<b>Precursor</b>	Linfoblástico	
	<b>Maduro</b>	Nodal	Da zona T
			Periférico, SOE
			Anaplásico grande
			Angioimunoblástico
		Associado a enteropatia (EATL)	Grandes células – EATL tipo 1
			Pequenas células – EATL tipo 2
		Extranodal	Hepatosplénico
			Hepatocitotrópico
			Periférico, SOE
			Cutâneo (CTCL)
		- Micose fungóide	
		- Reticulose pagetóide	
		- Síndrome de Sézary	
		Não epiteliotrópico	
		Periférico, SOE	
		Subcutâneo “paniculite-like”	
Anaplásico grande			
Leucemia linfocítica de células grandes granulares	Aguda		
	Crônica		

SOE: sem outra especificação

### 2.5.3. Diagnóstico

#### 2.5.3.1. Exame clínico

Todos os animais cuja lista de diagnósticos diferenciais inclua linfoma devem ser sujeitos a um exame clínico exaustivo e cuidadoso para, além de substanciar o diagnóstico, poder avaliar a extensão da doença e definir o estágio clínico<sup>[8]</sup>.

1. Anamnese – De extrema importância para poder extrair informações relevantes sobre os sinais clínicos, localização, duração e extensão da doença. Deve incluir perguntas para avaliar anorexia, letargia, perda de peso (aguda ou gradual), vômitos, diarreia, dispneia, tosse, início da linfadenomegalia se for o caso, identificação de nódulos cutâneos, paralisias, síncope, poliúria e polidipsia<sup>[12]</sup>
2. Exame físico – Centrado na presença e extensão da linfadenomegalia<sup>[8]</sup>, inclui a palpação abdominal para revelar a presença e o grau de organomegalia do fígado e baço, espessamento intestinal ou envolvimento de linfonodos mesentéricos<sup>[8]</sup>. A auscultação torácica pode sugerir a presença de massas mediastinais e/ou derrame pleural; o exame oftalmológico permite avaliar se há envolvimento ocular através de espessamento da íris, uveíte, hifema, sinequias e glaucoma, potencialmente presentes em 37% dos linfomas multicêntricos<sup>[8]</sup>.
3. Exames laboratoriais – Embora de resultados muito variáveis, podem auxiliar na avaliação do local e extensão da doença. Os essenciais incluem:
  - Hemograma com contagem diferencial de células sanguíneas para identificar possível anemia, trombocitopenia, neutrofilia, linfopenia/linfocitose e presença de células neoplásicas circulantes, contribuindo para o estadiamento mais correto da doença<sup>[86]</sup>.
  - Perfil bioquímico que inclua:
    - Bilirrubina e enzimas hepáticas – podem denunciar envolvimento hepático<sup>[8]</sup> ou indicar uma hepatopatia<sup>[68]</sup>.
    - Cálcio sérico – A hipercalcemia é uma síndrome neoplásica frequente nos linfomas T<sup>[12]</sup> e resulta da produção de paratormona (PTH) pelos linfoblastos T CD4<sup>+</sup><sup>[68]</sup>.
    - Níveis séricos de ácido úrico, potássio e fósforo - úteis para identificar cães em risco de desenvolver a síndrome de lise tumoral, que pode ser desencadeada pela quimioterapia<sup>[86; 87]</sup>.
  - Urinálise – para avaliar a função renal, pode evidenciar proteinúria que por vezes está associada à forma multicêntrica<sup>[68]</sup>.

- Biópsia aspirativa de medula óssea – Embora controversa, é necessária para um correto estadiamento, visto que em alguns casos a infiltração da medula óssea não está correlacionada com a infiltração sanguínea<sup>[68; 86]</sup>.
4. Exames imagiológicos – A radiologia torácica é importante para identificar massas mediastinais, linfadenopatias torácicas, efusão pleural e infiltrados pulmonares<sup>[68; 86]</sup>. Embora não seja recomendada para o diagnóstico ou exclusão de linfomas gastrointestinais, a ecografia tornou-se uma ferramenta indispensável para a avaliação do estágio da doença, principalmente em órgãos abdominais. <sup>[68]</sup>. Técnicas mais sofisticadas como a tomografia computadorizada, conjugada ou não com a emissão de positrões (PET-CT), são os procedimentos mais utilizados em medicina humana, <sup>[68]</sup>. Na medicina veterinária, um estudo mostrou a utilidade do uso da fluorotimidina marcada com isótopos para detecção de recorrência de linfomas caninos mesmo antes da sua detecção clínica<sup>[88]</sup>.

### **2.5.3.2. Avaliação morfológica**

A avaliação morfológica das células que constituem o tumor é essencial para o diagnóstico de linfoma<sup>[8]</sup>. Pode ser realizada através de citologia aspirativa ou de análise histopatológica de biópsias incisionais ou de linfonodos cirurgicamente removidos. Na seleção dos locais ou órgãos de colheita de amostras deve, sempre que possível, evitar-se linfonodos de áreas reativas (e.g. linfonodos mandibulares), dando preferência aos linfonodos pré-escapulares e poplíteos, por serem de mais fácil acesso e não estarem tão sujeitos a estimulação antigénica<sup>[8]</sup>

#### **2.5.3.2.1. Citologia**

Contrariamente ao que ocorre na medicina humana, a citologia é o método mais frequentemente utilizado para o diagnóstico dos linfomas caninos<sup>[89],[90]</sup>, principalmente por restrições financeiras a exames mais avançados. A análise citológica é um método fácil de executar, barato, seguro, adequado e com elevada concordância com os resultados histopatológicos<sup>[89]</sup>. Atualmente muitos autores recomendam a citologia como um método suficiente para o diagnóstico de linfoma canino, especialmente se conjugada com imunocitoquímica e/ou citometria de fluxo <sup>[91-93]</sup>. A colheita é realizada através da técnica de punção por agulha fina (PAF), com ou sem aspiração<sup>[94; 95]</sup>. Dado que o tecido linfoide se caracteriza por uma baixa adesão celular, permite obter um grande número de células com morfologia preservada que, quando seguida de um processamento

adequado, permite obter o diagnóstico correto na maior parte dos casos, incluindo os principais subtipos de linfoma<sup>[11; 79; 91]</sup>. A citologia ganglionar permite: 1. Estabelecer um diagnóstico final, incluindo o subtipo; 2. Escolher o linfonodo mais representativo no caso de uma subsequente biópsia excisional; 3. Monitorizar o curso da doença e detetar recidivas; 4. Detetar alvos potenciais para uma terapia molecular individualizada<sup>[96]</sup>.

A avaliação das amostras obtidas deve incluir vários parâmetros, descritos na tabela 2.3<sup>[97]</sup>, para posterior classificação adaptada de Kiel<sup>[74; 79; 80; 98]</sup>.

**Tabela 2. 3 – Roteiro para avaliação citológica dos linfomas caninos.**

Característica	Descrição	Observações
Densidade celular	Avaliação de toda a amostra em baixa ampliação	Baixa Média Alta
Homogeneidade celular	Avaliação do grau de homogeneidade morfológica	Baixa Média Alta
Índice mitótico	Contagem do número de mitoses por campo de grande ampliação (40X)	Baixo: 0-1 figura/5 campos Médio: 2-3 figuras/5 campos Alto: >3 figuras/5 campos
Identificação de corpos linfoglândulares	Identificação de formações arredondadas de cor azul claro em localização intercelular (detritos de linfócitos)	Presença sugestiva de neoplasia linfoide.
Fragilidade celular	Identificação de núcleos nus	
Células macrofágica		Indicadoras de elevado índice apoptótico
Atipia celular	Identificação de células binucleadas ou multinucleadas	
Tamanho celular	Pequenas (1-1,5 X eritrócito) Médias (2-2,5 X eritrócito) Grandes ( $\geq$ 3 X eritrócito)	
Forma do núcleo e localização no citoplasma	Redondo Redondo irregular Indentado Uma indentação ( <i>clefted</i> ) Central ou excêntrico	Circular sem Indentações Algumas indentações Muitas indentações profundas
Número, tamanho, distinção e localização de nucléolos	Único ou múltiplos Grandes ou pequenos Indistintos  Proeminentes Centrais ou marginais	Não visíveis ou fracamente perceptíveis Facilmente visíveis
Citoplasma (quantidade e cor)	Escasso  Moderado Abundante Claro Moderado Escuro	Pequeno aro ao redor do núcleo  2X o tamanho do núcleo Basofilia leve Basofilia moderada Basofilia intensa
Grau de malignidade	Baixo grau  Alto grau	Baixo índice mitótico com células pequenas  Moderado a alto índice mitótico e células médias e grandes



### 2.5.3.2.1. Histopatologia

As biópsias incisionais ou excisionais devem ser fixadas em formol a 10% para avaliação histológica da arquitetura tecidual e para processamento através de técnicas de imunohistoquímica<sup>[12]</sup>. A avaliação histológica é idealmente realizada em cortes de 2 a 4 µm corados com Hematoxilina e Eosina (HE) ou Giemsa para uma melhor visualização de características nucleares<sup>[12]</sup>. A fragilidade particular dos tecidos linfoides obriga a especial cuidado com as técnicas de preservação, em especial no que respeita à compressão tecidual, atraso na fixação ou desidratação por insuficiente quantidade de solução fixadora, que podem produzir artefactos e impossibilitar o diagnóstico correto<sup>[12]</sup>. É essencial identificar as áreas com boa preservação da morfologia celular, porquanto a boa análise se baseia na arquitetura tecidual, tamanho celular e índice mitótico<sup>[12]</sup>. Depois de diferenciar um padrão difuso de um folicular, é necessário avaliar o tamanho celular predominante, através da comparação dos seus núcleos com o tamanho dos eritrócitos, e o índice mitótico que é determinado pela média de figuras mitóticas em 10 campos de alta resolução (40x), selecionando-se as áreas de maior atividade mitótica<sup>[12]</sup>.

### 2.5.3.3. Imunofenotipagem

A imunofenotipagem é fundamental para o diagnóstico correto dos linfomas visto que os linfócitos podem ser morfologicamente semelhantes mas fenotipicamente heterogéneos<sup>[12]</sup>, como explicado anteriormente. Pode ser realizada em amostras citológicas ou histológicas e baseia-se no uso de anticorpos para identificar proteínas e moléculas em células e tecidos<sup>[99]</sup>.

Existem basicamente dois métodos para revelar a presença do antigénio: o método direto, em que o indicador (*label*) se liga diretamente ao anticorpo primário o qual se ligou ao antigénio; e o indireto, onde a marcação é feita por um anticorpo secundário<sup>[99]</sup>. É ainda possível o recurso a sistemas de amplificação, praticamente universais nos dias de hoje, que anexam um polímero ao anticorpo secundário, aumentando o número de reações cromogénicas, o que permite aumentar a intensidade do sinal (coloração)<sup>[98]</sup>.

Na grande maioria dos estudos em animais domésticos utiliza-se a combinação de dois anticorpos: anti-CD3 para detetar células T e anti-PAX5<sup>[100]</sup>, anti-CD20 ou anti-CD79a para localizar células B<sup>[12]</sup>. Outras moléculas utilizadas como adjuvantes no diagnóstico dos linfomas caninos podem incluir: anti-CD45 (antigénio comum de linfócitos), anti-CD18 (para diagnóstico diferencial com tumores histiocíticos), anti-CD34

(blastos), anti-BCL-2 (células do manto), MIB1 (proliferação celular), granzima B (células T), anti-CD10 (precursor linfoide), anti-BCL-6 (células do centro germinativo), anti-MUM-1 (plasmócitos), anti-CD-4 (células T auxiliares), anti-CD-8 (células T citotóxicas)<sup>[51]</sup>.

#### **2.5.4. Estadiamento**

Clinicamente os linfomas são categorizados em cinco estádios definidos pela OMS<sup>[101]</sup>. Os dois primeiros estádios referem-se aos casos em que o linfoma está limitado a um único linfonodo ou ao tecido linfoide de um órgão singular (estádio I), ou a múltiplos linfonodos de uma região (estádio II). Classificam-se em estágio III os pacientes com envolvimento ganglionar generalizado e em estágio IV quando é demonstrado envolvimento de fígado e/ou baço. O estágio V engloba todos os animais com manifestações sanguíneas e/ou envolvimento da medula óssea<sup>[8; 68]</sup>. Cada estágio é por sua vez sub-classificado conforme o paciente apresente ou não sinais clínicos, utilizando-se o sufixo *a* para indicar ausência e *b* para indicar a presença de sinais clínicos como febre, perda de peso, prostração, e hipercalcemia<sup>[68]</sup>.

#### **2.5.5. Tratamento**

A abordagem terapêutica aos pacientes com linfoma é determinada pelo estágio e sub-estádio da doença, a presença ou ausência de síndromes paraneoplásicas, o estado fisiológico geral do animal, a capacidade financeira e temporal dos proprietários, além da sua disponibilidade em lidar com possíveis efeitos secundários do tratamento<sup>[8]</sup>. Como a maioria dos linfomas caninos é diagnosticada em fases avançadas, a maior parte dos cães sem tratamento morre em 4 a 6 semanas<sup>[8]</sup>. Com algumas exceções, os linfomas são considerados doenças sistêmicas, requerendo quimioterapia sistêmica, geralmente com combinações de fármacos<sup>[8]</sup>.

Apesar de nos últimos 20 anos terem sido propostos vários protocolos de tratamento do linfoma canino, com metodologias várias e resultados frequentemente difíceis de comparar devido à diversidade metodológica, os tratamentos quimioterápicos mais utilizados na prática clínica oncológica baseiam-se no uso de quatro moléculas: ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona (CHOP)<sup>[7; 8; 74; 75; 102-104]</sup>. Estes protocolos convencionais permitem obter remissão na maior parte dos casos, com taxas que se aproximam dos 90%. Contrariamente ao tratamento do linfoma humano, os objetivos principais da quimioterapia de linfomas caninos são induzir uma remissão o mais completa e duradoura possível e reinduzir remissão quando o linfoma recidiva ou se torna resistente aos fármacos utilizados nas primeiras remissões, desta forma

prolongando a sobrevida do animal com uma razoável qualidade de vida durante o tratamento<sup>[7]</sup>. Embora estes princípios sejam válidos para todos os tipos histológicos, os linfomas indolentes costumam ter uma resposta incompleta ao protocolo CHOP, embora este proporcione uma maior sobrevida, frequentemente requerendo protocolos contínuos de manutenção <sup>[84; 85; 105]</sup>.

### ➤ **Além da quimioterapia**

Têm sido estudadas outras terapias, aliadas ou não a quimioterapia<sup>[7]</sup>. Com as possíveis exceções dos linfomas solitários, solitários extranodais e primários esplênicos<sup>[8; 56; 106]</sup>, a cirurgia não está indicada. Obviamente que a possibilidade de tratamento cirúrgico implica a demonstração de que o paciente se encontra em estágio I.

Alguns estudos sugerem que a radioterapia pode ser utilizada para o tratamento dos linfomas, em particular nos casos de envolvimento ganglionar em estágio I ou lesões extra-nodais solitárias. Alguns autores propõem ainda protocolos de irradiação total (*half-body RT*) subsequentes a remissão por quimioterapia, com o objetivo de consolidação ou manutenção <sup>[107; 108]</sup>.

Nas últimas décadas têm surgido propostas de tratamento imunoterápico, na sequência dos resultados obtidos no tratamento de linfomas não-Hodgkin humanos. Estas terapias desenvolveram-se em torno de duas estratégias: imunoterapia de alvo molecular e vacinas anti-tumorais<sup>[68; 91; 109-111]</sup>. A terapia de alvo molecular, que inclui anticorpos monoclonais (mAbs) e inibidores da tirosina cinase (TKIs), utiliza agentes que bloqueiam mecanismos específicos envolvidos na transformação maligna e progressão tumoral, sendo por isso mais seletivos e eficazes<sup>[109]</sup>. Os anticorpos monoclonais caninos para CD20 e CD52 receberam recentemente licença (total e condicional, respetivamente) para o tratamento de linfomas caninos B e T, respectivamente<sup>[7; 109-111]</sup>.

Outra área crescente é o das vacinas autólogas, que têm demonstrado prolongar o intervalo livre de doença e o tempo de sobrevida em cães com linfoma<sup>[7; 111-113]</sup>.

### **2.5.6. Prognóstico**

Muitos fatores condicionam o prognóstico dos linfomas caninos: localização anatômica, estadiamento e sub-estadiamento clínico, classificação histológica, imunofenótipo, curso clínico (indolente/agressivo), protocolo quimioterápico utilizado e tempo de instituição do tratamento, assim como a resposta inicial do paciente ao tratamento, desenvolvimento de resistência quimioterápica e até mesmo o sexo <sup>[8; 75; 103]</sup>.

### **2.5.7. Aspetos epidemiológicos**

A verdadeira incidência de linfomas caninos é difícil de determinar visto que muitos cães são diagnosticados e tratados por veterinários que não fazem uso de um registo de cancro animal<sup>[7; 114]</sup>. Foi estimado que os linfomas caninos representam aproximadamente 90% das neoplasias hematopoiéticas, com uma incidência calculada de 21,7 casos para 100.000 cães<sup>[7]</sup>. Outro estudo revelou uma incidência ajustada para a idade de 107 casos para 100.000 cães, superior à dos seres humanos<sup>[115]</sup>. Aparentemente a incidência parece estar a aumentar em ambas as espécies, sendo o segundo cancro mais frequente nos cães, apenas atrás das neoplasias mamárias<sup>[7]</sup>.

Os linfomas afetam principalmente cães de meia-idade a velhos (idade média de 6 a 9 anos)<sup>[8]</sup> e, tal como nos humanos, há uma maior incidência nos machos, tendo sido ainda reportado um risco mais baixo em fêmeas intactas quando comparadas com fêmeas esterilizadas<sup>[116]</sup>.

Alguns estudos mostram que algumas raças têm um risco significativamente maior de desenvolver linfomas como os Boxers, Bull mastifs, Basset hounds e São Bernardos<sup>[117-121]</sup>, sugerindo que foram introduzidos e/ou perpetuados fatores de risco hereditários em raças específicas<sup>[7]</sup>. Acresce que algumas delas têm predisposição para o desenvolvimento de subtipos específicos<sup>[7]</sup>, como é o caso dos Boxers em que 85% são de células T, apesar de este tipo representar 25% a 35% de todos os linfomas caninos<sup>[74; 119; 121]</sup>. Em contraste, os Basset Hound e Cocker Spaniel quase sempre desenvolvem linfomas B, enquanto os Golden Retriever tendem a desenvolver frequências iguais para linfomas B e T<sup>[7]</sup>. Os cães sem raça definida, assim como a maioria dos cães de raça e os humanos, desenvolvem linfomas B em cerca de 70% dos casos<sup>[7-9; 74]</sup>.

### **2.5.8. Fatores de risco**

Vários fatores ambientais e de estilo de vida têm sido associados ao desenvolvimento de linfomas não-Hodgkin (LNH) em humanos e nos cães<sup>[122]</sup>, parecendo influenciar tanto os linfomas no geral quanto a incidência de alguns subtipos<sup>[123; 124]</sup>. Em seguida são descritos os fatores de risco relatados na literatura internacional.

Fatores de Risco	Humanos	Caninos	Referências
Idade	✓	✓	[12; 125; 126]

Envelhecer é um forte fator de risco para linfomas, mais prevalentes nos humanos acima dos 60 anos e em cães acima dos 8 anos. As razões para este facto têm sido atribuídas a uma diminuição da função imune e uma possível maior suscetibilidade a infeções, levando a uma estimulação crónica do sistema imunológico.

Fatores de Risco	Humanos	Caninos	Referências
Sexo e hormonas sexuais	✓	✓	[116; 127]

De acordo com os dados do SEER (*Surveillance Epidemiology and End Results*) do Instituto Nacional do Cancro dos Estados Unidos da América, o risco de desenvolver linfomas é menor nas mulheres, mas a incidência nestas aumenta após os cinquenta anos, no momento da chegada da menopausa, sugerindo que as hormonas femininas podem exercer um efeito protetor para os LNH. Esse efeito também foi estudado nas cadelas, com uma conclusão similar, baseada no facto de as fêmeas inteiras apresentarem menor risco.

Fatores de Risco	Humanos	Caninos	Referências
Raça	✓	✓	[119-121; 125; 128; 129]

Apesar de a incidência de LNH ter sido historicamente mais alta nos seres humanos brancos do que nos negros, têm sido recentemente observados aumentos desproporcionais neste último grupo. Também nos cães, algumas raças como Boxer, Rottweiler e Bull mastif apresentam um maior risco para desenvolverem linfomas, com diferenças dependentes da região geográfica do estudo.

Fatores de Risco	Humanos	Caninos	Referências
Localização geográfica	✓	✓	[23; 74; 125]

Têm sido observadas diferenças substanciais na incidência e distribuição de muitos subtipos de LNH através de diferentes regiões geográficas. Nos seres humanos, os linfomas foliculares são mais comuns nos países ocidentais do que em outras regiões. A Ásia apresenta uma incidência geral de LNH relativamente baixa, porém são frequentemente de alto grau, linfomas T periféricos e primários extranodais, enquanto na China são observadas maiores taxas de linfomas gastrointestinais e em África o linfoma de Burkitt endémico representa uma proporção substancial.

Em cães a grande maioria dos estudos refere uma maior prevalência de linfomas B embora em algumas regiões, como a área de São Paulo no Brasil, exista uma maior prevalência de linfomas T.

Fatores de Risco	Humanos	Caninos	Referências
Exposição a produtos químicos	✓	✓	[130-134]

A exposição a químicos tem sido proposta como responsável pelo aumento de mutações genéticas e alteração da imunidade celular. Estas substâncias podem ainda provocar um efeito sistémico imunossupressor, que pode interferir como a normal imuno-vigilância. O ácido diclorofenóxiacético (2,4D) é um herbicida que tem sido associado ao aumento de 50-200% de LNH em humanos. Também os linfomas caninos foram associados a proprietários que utilizavam o 2,4D como pesticida em propriedades rurais. A exposição a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HAP), uma classe de químicos formados durante a combustão incompleta de materiais orgânicos, como por exemplo combustíveis fósseis dos veículos, dos cigarros e das madeiras, foi associado a um maior risco para o desenvolvimento de linfomas T em cães. A exposição a solventes e bifenóis também foi associada ao aumento do risco de alguns subtipos de LNH em humanos.

Fatores de Risco	Humanos	Caninos	Referências
Tabagismo	✓	✓	[3; 125; 135-137]

O hábito tabágico tem sido associado a alterações do sistema imune pelo facto de o seu fumo conter substâncias comprovadamente leucemogénicas. No entanto, a maioria dos estudos epidemiológicos não suporta uma associação forte entre fumar e LNH, embora alguns estudos sugiram uma correlação positiva entre o hábito tabágico e o risco de LNH folicular.

Fatores de Risco	Humanos	Caninos	Referências
Campos magnéticos		✓	[138-142]

A exposição a campos magnéticos em humanos está relacionada com um maior risco de desenvolver leucemias e não há estudos que associem aos linfomas. Já nos cães, um estudo caso-controlo revelou que cães que moram em casas com correntes elétricas muito altas apresentaram um risco maior de desenvolver linfomas.

Fatores de Risco	Humanos	Caninos	Referências
Radiações	✓		[1; 130; 143]

Embora a maioria dos estudos proponha que a exposição a radiações ionizantes está associada ao risco de leucemia em humanos, alguns estudos evidenciaram uma associação entre exposição aos raios ultravioleta e risco aumentado de LNH.

A exposição doméstica ao radão, um gás que emite partículas alfa, beta e gama e que se liberta dos solos e rochas, é o segundo fator de risco mais importante para o cancro de pulmão e um estudo revelou que esta exposição aumenta em 7% o risco de LNH em meninas com menos de 20 anos.

Fatores de Risco	Humanos	Caninos	Referências
Poluição atmosférica	✓	✓	[36; 117; 144-149]

Muitos estudos associam o LNH em humanos e caninos à poluição atmosférica em diferentes ambientes tais como: áreas industriais, zonas próximas a estradas e incineradoras de lixo.

Fatores de Risco	Humanos	Caninos	Referências
Ocupações	✓		[150; 151]

Alguns estudos evidenciaram um maior risco de LNH entre agricultores, trabalhadores pecuários, professores primários, pintores, marceneiros, talhantes e mecânicos.

Também os trabalhadores da indústria petroquímica com mais de 10 anos de ligação à produção e polimerização de cloreto de vinilo apresentaram um risco maior de desenvolvimento de LNH, com um período de latência de 20 anos.

Fatores de Risco	Humanos	Caninos	Referências
Doenças autoimunes	✓		[130]

A associação entre doenças autoimunes e LNH em humanos tem sido frequentemente descrita, em particular nos casos de Síndrome de Sjögren, artrite reumatóide e doença celíaca.

Fatores de Risco	Humanos	Caninos	Referências
Infeções	✓		[150; 152]

São bem conhecidos os agentes infecciosos passíveis de causar LNH em seres humanos, que incluem o vírus da imunodeficiência humana (VIH), vírus Epstein-Barr (VEB), vírus T-linfotrófico humano (HTLV-1), herpesvírus humano 8 (HHV-8), vírus da hepatite C, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia psittaci* e *Borrelia burgdorferi*.

Fatores de Risco	Humanos	Caninos	Referências
Peso/condição corporal	✓		[153-157]

Um estudo de coorte na Suécia mostrou que as mulheres obesas têm um maior risco para o desenvolvimento de LNH e que a obesidade mórbida parece aumentar o risco de linfoma B difuso. O índice de massa corporal parece estar também associado a maior risco e mortalidade de LNH.

Nos cães, a associação entre obesidade e risco de linfomas não foi confirmada.

Fatores de Risco	Humanos	Caninos	Referências
Dieta	✓		[150; 158]

Uma dieta rica em frutas e vegetais, particularmente vegetais crucíferos e fibras, mostrou estar associada a um baixo risco de LNH humano. Dietas com elevados teores de gorduras e hidratos de carbono têm sido associadas ao desenvolvimento de LNH.

Fatores de Risco	Humanos	Caninos	Referências
Genética	✓		[125; 150]

O crescimento tendencial da incidência de LNH é provavelmente resultado de fatores ambientais e/ou estilos de vida, mas as inconsistências encontradas em diferentes estudos permitem admitir uma importante influência de fatores genéticos na associação entre os fatores de risco ambientais e o desenvolvimento de LNH. Alguns estudos identificaram alterações polimórficas em alguns genes, associadas às respostas a fatores ambientais<sup>[7]</sup>.

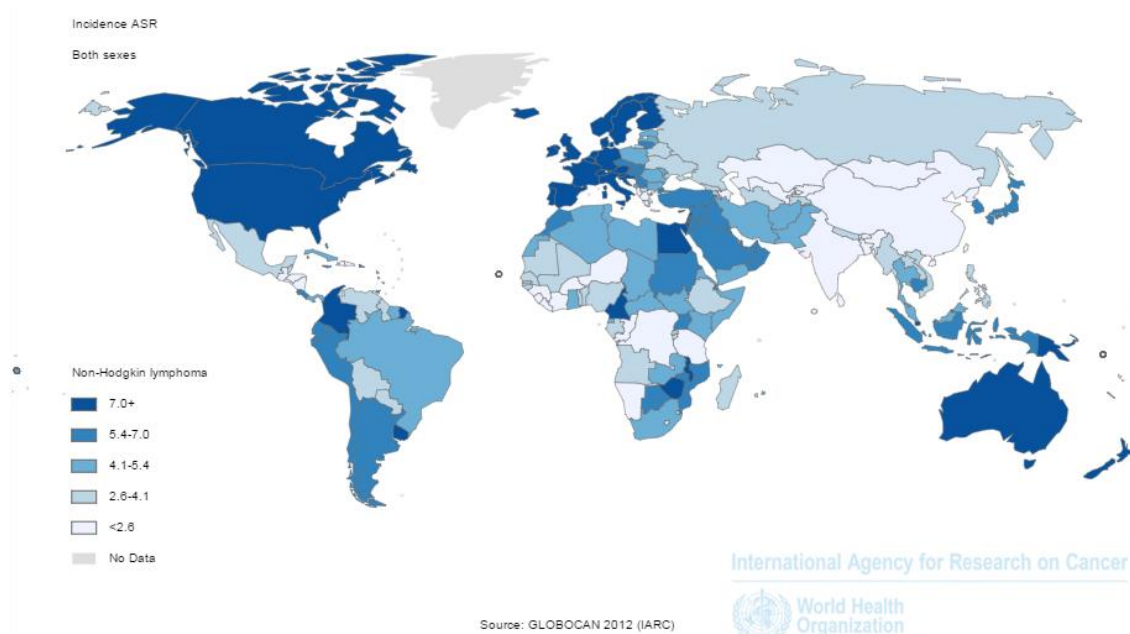


## 2.6. Linfomas não-Hodgkin no mundo

Há décadas que os estudos epidemiológicos têm revelado um aumento na incidência mundial de LNH<sup>[159]</sup>. O LNH é mais frequente nos países desenvolvidos, como ilustrado na figura 2.4, com altas incidências nos Estados Unidos, Austrália, Nova Zelândia e Europa, e baixas incidências na Ásia<sup>[6; 159; 160]</sup>. Mundialmente, o LNH representa o décimo cancro mais diagnosticado enquanto que nos países desenvolvidos sobe para sétimo lugar<sup>[160]</sup>. Segundo dados estimados do IARC, a incidência padronizada mundial de LNH é de 9,8 (casos/100.000 habitantes), 11,9 para homens e 8,0 para mulheres<sup>[6]</sup>.

O subtipo mais comum em países desenvolvidos é, de longe, o linfoma difuso de grandes células B (DLBCL) e o linfoma folicular<sup>[159]</sup>. Todos os outros subtipos representam menos de 1% do total de casos diagnosticados<sup>[159]</sup>. Em oposição, na Ásia há um predomínio de linfomas de células T<sup>[159]</sup>.

A maioria dos subtipos é caracterizada por uma maior proporção de homens, principalmente nos linfomas do manto (70%), enquanto as mulheres predominam nos linfomas foliculares<sup>[159]</sup>.



**Figura 2.4 – Linfoma não-Hodgkin no mundo.** Distribuição geográfica mundial da incidência padronizada pela idade (ASR) do linfoma não-Hodgkin (fonte: GLOBOCAN 2012, IARC).

## **2.7. Porto e São Paulo**

### **2.7.1. Porto**

Portugal tem aproximadamente 10 milhões de habitantes<sup>[161]</sup> <sup>[162]</sup> e a décima maior incidência de LNH de entre os 27 países da União Europeia, com taxas de incidência padronizadas de 15,4 casos para 100.000 habitantes (mulheres: 10,8; homens: 12,9) <sup>[163]</sup>. O Distrito do Porto, situado na região Norte (NUT II), apresentou em 2010 uma taxa de incidência padronizada de 11 casos por 100.000 habitantes (mulheres: 10; homens: 13)<sup>[162]</sup>.

O Grande Porto é uma sub-região da área metropolitana do Porto, com uma população total de 1.287.282 habitantes (censo 2011<sup>[19]</sup>), uma área de 814,52 km<sup>2</sup> e uma densidade demográfica de 1580 habitantes/km<sup>2</sup> <sup>[164]</sup>. É constituída por nove concelhos: Espinho, Gondomar, Maia, Matosinhos, Porto, Póvoa de Varzim, Valongo, Vila do Conde e Vila Nova de Gaia<sup>[164]</sup>.

O Grande Porto conta com uma frota de aproximadamente 900 mil veículos, apresentando uma relação de 2,4 habitantes por veículo<sup>[165]</sup>. As principais vias de acesso são a VCI (Via de Cintura Interna - IC23), uma autoestrada em forma de anel que contorna a zona central do Porto, com uma circulação de 130 mil veículos por dia, e a Circunvalação (EN12) que circula a região do Grande Porto<sup>[166]</sup>. Um estudo recente da Universidade do Porto procurou identificar as fontes de hidrocarbonetos policíclicos (HAP) na cidade e identificou que as emissões automóveis de gasóleo são a sua fonte principal. Também as emissões de aquecimento residencial e da refinaria de petróleo em Matosinhos foram identificadas como contribuintes para os níveis de HAP na respetiva área <sup>[20]</sup>.

Até à atualidade não há dados na literatura sobre a incidência de LNH no Grande Porto nem na cidade do Porto. Segundo um estudo realizado por Almeida (2012)<sup>[24]</sup>, Portugal apresentou uma maior prevalência de linfomas caninos de células B (69%), com 84% dos casos classificados como multicêntricos, sendo as raças Boxer, Cocker spaniel e Rottweiler as mais acometidas.

### **2.7.2. São Paulo**

O Município de São Paulo conta com uma população de mais de 11 milhões de habitantes de acordo com o censo realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE 2011), concentrando mais de 50% da população da Região

Metropolitana de São Paulo, o que representa pouco mais de 6% da população do Brasil<sup>[21]</sup>. Ocupa uma área de 1.522,986 km<sup>2</sup>, dividida em 31 subprefeituras e 96 Distritos Municipais. Apresenta uma população acima dos 65 anos de 915.133 habitantes o que representa 8,1% do total<sup>[21]</sup>. A sua população é predominantemente urbana (99%) e os seus habitantes têm as mais diferentes origens étnicas: italiana, portuguesa, japonesa, espanhola e libanesa<sup>[21]</sup>.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a região metropolitana de São Paulo está na 268<sup>o</sup> posição no ranking das cidades mais poluídas do mundo. A cidade de São Paulo possui uma alta concentração de poluição atmosférica, causada principalmente por cinco milhões de automóveis e um milhão de motocicletas, semelhantes a outras grandes cidades do mundo (México e New York)<sup>[18; 42]</sup>. As principais avenidas de São Paulo têm uma circulação de aproximadamente 500.000 veículos/dia<sup>[18]</sup>. Os registos de poluição do ar mostram que a cidade é altamente poluída por partículas de diversos tamanhos, como PM<sub>2,5</sub> (material particulado com tamanho de 2,5  $\mu$  m) e PM<sub>10</sub> (material particulado com tamanho de 10  $\mu$  m), ambos oriundos principalmente de veículos<sup>[18]</sup>. Na área do centro expandido da cidade de São Paulo é possível encontrar a maior concentração de poluentes (CO, NO<sub>2</sub> e PM<sub>10</sub>), consequência do intenso tráfego<sup>[18]</sup>.

As neoplasias malignas figuraram entre as principais causas de morte no período de 1980 a 2010 para ambos os sexos, no Município de São Paulo<sup>[21]</sup>. Em 2010, o aumento da mortalidade proporcional por cancro e a queda dos óbitos por causas externas contribuíram para a alteração do perfil de mortalidade em ambos os sexos e o cancro passou a ocupar o 2<sup>o</sup> lugar (18,8% para homens e 21,8% para mulheres) entre as principais causas de óbito no Município, precedido apenas pelas doenças do aparelho cardiovascular (31% para homens e 34,8% para mulheres)<sup>[21]</sup>.

A taxa de incidência padronizada para a idade de LNH no município de São Paulo, entre 2001 e 2005, era de 10,2 casos para 100.00 habitantes (homens) e 9,06 para mulheres<sup>[167]</sup>. Em 2016 estima-se uma taxa bruta de incidência de 8,68 (homens) e 9,69 (mulheres)<sup>[167]</sup>.

Entre 1997 e 2008, os linfomas não-Hodgkin representaram o sétimo cancro mais comum nos homens (2,69%) e o décimo nas mulheres (2,15%)<sup>[21]</sup>. A maior prevalência dos casos (53,9%) é em homens com uma média de idade de 58 anos, com predominância do fenótipo B, sendo o linfoma B difuso o subtipo mais comum (49,45%), seguido do linfoma folicular (7,69%).<sup>[22]</sup>

Em relação aos linfomas caninos, segundo o estudo realizado por Kimura et al. (2012) na Universidade de São Paulo com os dados de 65 diagnósticos entre 1995 e 2009, há uma maior prevalência de linfomas de células T (85%)<sup>[23]</sup>. Os cães sem raça

definida foram os mais representados (43%) seguidos pelos Boxers (14%) e Pastores Alemães (11%)<sup>[23]</sup>. A média de idade foi de 8,7 anos e a forma mais frequente a linfadenopatia multicêntrica (37%) seguida por extranodal (23%), cutânea (20%), alimentar (18%) e mediastínica (2%)<sup>[23]</sup>.

## **2.8. Registo de Cancro Animal**

Para uma correta avaliação da ocorrência do cancro e possibilidade de validação das comparações entre populações e espécies ao longo do tempo é necessário que cada caso seja registado<sup>[168]</sup>. Esta é a função primária dos registos de cancro, peça fundamental para a oncologia comparada<sup>[168]</sup>. Os dados de cada registo fornecem, quando reunidos e estudados, um suporte essencial em estudos de causalidade, prevenção, diagnóstico, sobrevida e qualidade de vida dos pacientes, influenciando e direcionando estratégias de saúde pública<sup>[168]</sup>. Entretanto, é necessário um enorme esforço e uma colaboração nacional e internacional para que os dados estejam padronizados e possam gerar resultados fidedignos<sup>[168]</sup>.

A história dos registos de cancro humano evidencia que não foi e nem é uma tarefa fácil<sup>[169]</sup>. Desde o primeiro censo sobre o cancro, realizado sem êxito em Londres em 1728, e após muitas tentativas em diferentes países ao longo dos anos, foi só depois de uma notável conferência em Copenhaga em 1946 com diversos especialistas que o registo de cancro humano ganhou mais força<sup>[169]</sup>. Em 1965, a Organização Mundial de Saúde estabeleceu a Agência Internacional de Pesquisa sobre o cancro (IARC) e, no ano seguinte, foi criada a Associação Internacional de Registos de Cancro (IACR) ganhando força e unindo os mais de 200 registos espalhados pelo mundo<sup>[169]</sup>.

Os registos de cancro em animais de companhia estão na fase inicial do seu desenvolvimento. Além de serem poucos, sofrem de uma falta de padronização, comunicação e colaboração entre si<sup>[168]</sup>. Muitas tentativas têm sido feitas ao longo dos anos em diferentes países: o Registo de Cancro Animal Dinamarquês, estabelecido em 2005; o Registo de Cancro Canino Norueguês, estabelecido em 1990; o Registo Epidemiológico de Cancro em Animais de Companhia de Guelph (CANcER), lançado em 2010 no Canadá<sup>[168]</sup>; e o Registo de Cancro Animal de São Paulo (RCA-SP), o primeiro da América Latina, que iniciou a colheita de dados em 2012 em vários centros de atendimento veterinário no município de São Paulo<sup>[170]</sup>. São conhecidos outros esforços locais para recolher dados e criar estimativas de base populacional sobre a incidência de cancro nos animais de companhia, embora a maioria tenha tido um período de vida curto devido principalmente a questões financeiras<sup>[168]</sup>.

### 3. OBJETIVOS

---

#### 3.1. Objetivos gerais

##### 3.1.1. Oncologia comparada

- ❖ Comparar dados de linfomas não-Hodgkin humanos com linfomas caninos no Grande Porto;
  - Epidemiologia descritiva do linfoma em ambas espécies;
  - Verificar a existência de associação geográfica na distribuição de casos pelos municípios;
  - Verificar o conceito de “sentinela” dos cães com linfomas.

##### 3.1.2. Perspectiva “One Health”

- ❖ Porto, São Paulo e os fatores ambientais
  - Comparar dados de linfomas caninos do Grande Porto com os do município de São Paulo e investigar semelhanças e diferenças nos potenciais fatores ambientais de risco.

#### 3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Estudo imunocitoquímico de linfomas caninos no Distrito do Porto

3.2.2. Estudo imunohistoquímico de linfomas caninos no Distrito do Porto

3.2.3. Estudo de fatores de risco de linfomas caninos – Questionário epidemiológico

3.2.4. Estudo da implantação de um Registo de Cancro Animal em Portugal

## 4. ESTUDOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

### 4.1. **CAPÍTULO I - Estudo imunocitoquímico de linfomas caninos no Distrito do Porto**

#### 4.1.1. **Considerações Gerais**

De acordo com o descrito na revisão da literatura (capítulo 2), o diagnóstico citológico dos linfomas caninos é, de longe, o meio diagnóstico mais realizado na prática clínica veterinária. Em virtude das limitações da prática clínica e principalmente da disponibilidade financeira dos proprietários, esta técnica é bem aceite devido ao elevado custo-benefício e ao facto de não ter de se submeter os cães a anestesia, encarecendo e aumentando os riscos clínicos associados.

Visto isso, o objetivo desta secção do doutoramento foi realizar o estudo imunofenotípico em amostras celulares dos casos suspeitos e/ou já confirmados de linfomas caninos, utilizando técnicas laboratoriais semelhantes ao procedimento de imunohistoquímica já realizado rotineiramente no laboratório do serviço de Patologia Veterinária do ICBAS – UP. Com a implementação desta técnica seria possível, fornecer um diagnóstico mais detalhado das características fenotípicas dos linfomas, auxiliando assim o médico veterinário na tomada da decisão terapêutica mais indicada, e aumentar os dados para o estudo epidemiológico dos linfomas caninos e seus potenciais fatores de risco.

O estudo contemplou o uso de três anticorpos, CD3, PAX5 e Ki67, este último para verificar o comportamento biológico das neoplasias.

Os cães estudados foram provenientes do Hospital Veterinário do ICBAS – UPvet, com a colaboração da Doutora Liliana Martins; reencaminhados pelo CEDIVET, com a colaboração do Dr. Hugo Carvalho e da Doutora Nazaré Pinto da Cunha; do Centro Hospital Veterinário – CHV, com a colaboração do Doutor Hugo Gregório; do Hospital Veterinário de Referência Montenegro, com a colaboração do Dr. Filipe Oliveira; do Hospital Veterinário do Porto, com a colaboração do Dr. Gonçalo Petrucci.

Os resultados foram apresentados durante o Congresso da ESVONC (European Society of Veterinary Oncology) de 2017 em Lyon, França e publicados na Revista *Veterinary World*, 2017 (11), que se reproduz a seguir.

## **Immunocytochemical study of canine lymphomas and its correlation with exposure to tobacco smoke**

K. C. Pinello<sup>1</sup>, M. Santos<sup>2</sup>, L. Leite-Martins<sup>1</sup>, J. Niza-Ribeiro<sup>3,4</sup> and A. J. de Matos<sup>1,5</sup>

1. Department of Veterinary Clinics, Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar, University of Porto, Porto, Portugal; 2. Department of Microscopy, Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar, University of Porto, Porto, Portugal; 3. Department of Population Studies, Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar, University of Porto, Porto, Portugal; 4. EPI Unit, Institute of Public Health, ISPUP – University of Porto, Porto, Portugal; 5. Animal Science and Study Centre, Food and Agrarian Sciences and Technologies Institute, University of Porto, Porto, Portugal.

### **Abstract**

**Aim:** Canine lymphoma is one of the most common canine neoplasms, but little is known regarding the effects of exposure to tobacco smoke on their biologic behavior. As cytology is the most frequent diagnostic method of canine lymphoma, the aims of this study were to perform an immunocytochemical study of canine lymphomas, including subtyping and cell proliferation analysis, and to establish their correlation with tobacco smoke exposure.

**Materials and Methods:** A total of 23 dogs diagnosed with lymphoma were subjected to careful fine-needle biopsies of enlarged lymph nodes. The smears were air-dried, fixed with cold acetone, and immunocytochemically stained using CD3, PAX5, and Ki-67. Owners were requested to complete an epidemiologic questionnaire.

**Results:** According to the updated Kiel classification, 65% were B-cell lymphomas - three low grade (LG) and 12 high grade (HG) and 35% were T-cell - two LG and six HG. Thirteen tumors presented high Ki67 indexes (>40%) (11 HG and 2 LG), two revealed moderate ones (20-40%) (1 HG and 1 LG), and three had low indexes ( $\leq 20\%$ ) (1 HG and 2 LG). Both a significant positive correlation and a significant linear-by-linear association ( $p=0.018$ ) were observed between high Ki67 indexes and smoking owners ( $r=0.753$ ,  $p=0.002$ ) as well as with the number of smokers in the household ( $r=0.641$ ,  $p=0.001$ ). Moreover, the mean percentage of Ki67<sup>+</sup> cells from the group of “smoker owners” was statically higher ( $p=0.011$ ) than that from the “non-smoker owners.”

**Conclusion:** The results suggest that cytological diagnosis of canine lymphomas benefits from being complemented with immunocytochemical studies that include subtyping and assessment of proliferative activity, both contributing for the prognosis and therapeutic planning. Furthermore, exposure to tobacco smoke seems to be related to the biological behavior of canine lymphomas.

**Keywords:** canine lymphoma, immunocytochemistry, proliferation, tobacco smoke.

## Introduction

Lymphomas are a wide and motley group of neoplasms which includes several subtypes with distinct clinical and epidemiological characteristics [1]. They represent one of the most common neoplasms of the dog, comprising approximately 7-24% of all neoplasms in this species [2]. The increasing frequency of canine lymphomas [2,3] mimics a trend in human oncology in which non-Hodgkin's lymphoma (NHL) represents 5% of all new cancer cases, currently being one of the top five leading cancer-related deaths [4]. Dogs and humans are close companions and thus subjected to similar indoor and outdoor environmental influences. Therefore, epidemiological studies using dogs as sentinels provide an opportunity to assess the effects of environmental factors on the biologic behavior of cancer [5,6].

Contrary to human medicine, and often due to financial constraints, cytology plays a key role in the diagnosis of canine lymphoma [3]. The cytological analysis is a suitable, easy, and inexpensive diagnostic method, which is in agreement with the histological classification of most subtypes [3]. According to our experience, more than 70% of lymphoma diagnoses in dogs are achieved through cytology (unpublished data). A recent publication [7] calculated that 90% of all canine lymphoma diagnoses were obtained using cytology. Although immunocytochemistry (ICC) [8] was studied in the past decades, it has not been routinely included in the diagnostic approach of canine lymphomas [9,10].

The updated Kiel classification adapted to the canine species [11] is the most frequently used classification scheme for the cytological diagnosis of canine lymphomas [9,11-13]. Lymphomas are essentially classified on the basis of cell morphology and immunological characteristics and subtyped according to the fundamental distinction between phenotypes (B or T) and malignancy grades (low or high) [13]. Such evaluations allow for a 90% accurate characterization [5,10,14]. As in human medicine, the classification of lymphomas is an important prognostic tool [12,15,16] since, if left untreated, high-grade (HG) lymphomas have significantly higher mortality rates than low-grade (LG) ones [17]. Yet, the former responds better to aggressive chemotherapeutic protocols, sometimes even achieving complete remissions [18]. There are, however, variations in survival rates within similar subtypes and grades, suggesting that an individual accurate prognosis may benefit from additional evaluations, such as the analysis of proliferative activity at the time of diagnosis [9,18].

Epidemiological studies of companion animals have been increasing, defining the dog as a sentinel [19] of potential risk factors for human health, mainly due to shared



environments, shorter disease latency, and spontaneous diseases as lymphomas [6,20-23]. Several environmental and lifestyle factors were associated with human NHL [24], and these seem to influence both the overall and subtypes incidences [1,25]. One of these factors is the exposure to cigarette smoking, which represents a risk factor primarily for follicular lymphomas in human patients [26]. Some studies have shown different risk factors for the development of canine lymphomas such as breed [27], sex and hormonal exposure [28], *Bartonella* infection [29], oxidative stress [30], household chemicals [6,31], herbicides [32], magnetic fields [33], and air pollution [5,19-21,34]. It is noteworthy, though, that no environmental factors were related to the biological behavior of spontaneous canine lymphomas.

Epidemiological data evidenced a correlation between tobacco smoking and numerous human cancers [35]. Furthermore, new insights emerged regarding second-hand smoking, also named “environmental tobacco smoke” (ETS), “passive smoking,” or “involuntary smoking” [36], as well as third-hand smoking (THS) [37]. ETS consists on inhaling both the smoke exhaled by smokers and the sidestream smoke produced by the burning cigarette that contains the same carcinogenic compounds inhaled during active smoking [38]. In addition, when someone smokes, several nicotine-like contaminants are exhaled and settle down on various household surfaces and objects (carpets, table tops, utensils, and furniture), remaining there for weeks or months [37]. These are later reemitted in a gas phase, reacting with oxidants and other environmental compounds, a phenomenon that characterizes the THS [37]. Companion animals are undoubtedly second-hand smokers [39], and most certainly, third-hand smokers when sharing the household with smoking owners. As “active sniffers,” dogs are even more exposed to a wide range of potential chemical carcinogens that easily surpass the exposure to which human adults or children are subjected.

Although human studies suggested a positive association between tobacco exposure and the risk of follicular NHL [38], veterinary studies on the effects of tobacco smoke on lymphomas are inexistent.

The aim of this study was to assess the role of the immunocytochemical evaluation of canine lymphomas in the improvement of current routine diagnosis. Furthermore, another goal was to identify associations between exposure to several environmental factors, including exposure to tobacco smoke, lymphoma subtypes, and their biological behavior.

## **Materials and Methods**

### **Ethical approval**

The study was approved by the Bioethics Committee of the Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar of the University of Porto (ORBEA-ICBAS-UP).

A prospective series of 23 dogs with a cytological diagnosis of lymphoma was considered. From each dog, lymph node cytological specimens were collected for diagnostic purposes. Owners were informed about the aims and methods of the study and signed an informed consent form. Dogs that had received previous chemotherapy were excluded from the study.

### **Immunocytochemistry**

Fine-needle aspiration biopsies, or just fine-needle biopsies (FNB), were obtained using a 21-gauge needle without aspiration. The material inside the needle was immediately smeared using a 10 ml disposable plastic syringe and air-dried. A minimum of six smears per enlarged lymph node were produced. Submandibular lymph nodes were avoided, whenever possible because their drainage of the oral cavity consistently yields marked hyperplastic features [40]. For diagnostic purposes, a minimum of two smears were stained with Hemacolor (Merck, Darmstadt, Germany). Lymphoma was diagnosed when the normal heterogeneous population of lymphocytes was replaced by predominantly immature and/or monomorphic lymphoid cells [41,42].

For the immunocytochemical assays, smears were dried, fixed in cold acetone for 2 min, stored at 2-6°C, and processed within 48 h. Immunocytochemical stains were conducted with commercially available antibodies: The pan T-lymphocyte marker (polyclonal rabbit antihuman) CD3 (Dako, Glostrup, Denmark) for T-lymphocytes, monoclonal mouse anti-PAX5 antibody (Leica Biosystems, Nussloch, Germany) [43] for B-lymphocytes, and anti-Ki67 monoclonal antibody (MIB-1 mouse) (Dako, Glostrup, Denmark) for proliferation assessment. Immunocytochemical procedures were performed according to the manufacturers' protocols (Novolink Polymer®; Leica Microsystems, Nussloch, Germany), using the indirect immunoperoxidase staining technique. Heat-induced epitope retrieval was conducted in a hot water bath (100°C, 23 min) by incubating slides in 10 mM citrated buffer (pH 6.0). The slides were then gradually cooled to room temperature. After being washed in 0.05 M tris-buffer (pH 7), the slides were incubated with the protein block for 5 min. Each section was then incubated for 120 min with primary antibodies diluted in 10% bovine serum albumin (Sigma, Darmstadt, Germany) (CD3 and Ki67 1:50; PAX5 1:40) at room temperature. The endogenous peroxidase activity was neutralized using the peroxidase block, and slides were then incubated with the second antibody (rabbit anti-mouse IgG) for 20 min. Diaminobenzidine was used as a chromogen, and slides were counterstained with Mayer's hematoxylin. Smears of normal spleen were used as positive controls. The

percentage of positive cells was determined by counting 300 cells at  $\times 400$  magnification in selected fields that showed good cell preservation. All cells with the expected staining pattern (membrane/cytoplasmic for CD3 and nuclear for PAX-5 and Ki67) were considered positive, regardless of the staining intensity. The immunophenotype of each lymphoma was based on the most prevalent number of positive cells [43]. For the proliferation assessment, lymphomas were classified, according to the number of positive Ki67 cells, as follows: Low index ( $\leq 20\%$  Ki67+ cells), moderate index (20-40% Ki67+ cells), or high index ( $>40\%$  Ki67+ cells) as previously described [15].

Tumors were classified according to the updated Kiel classification adapted to the canine species [9], based on cell size and shape; cell volume and intensity of cytoplasm staining; nuclear size, shape, and position; nucleoli size, distinctiveness, number and positioning; appearance of nuclear chromatin; and mitotic indexes (MIs) [44].

### **Exposure and covariate assessment**

Owners were requested to answer a 70-question questionnaire about their dog's demographics, health-related characteristics, and environmental exposures. Questions regarding the animal included age; sex; breed; reproductive status; date and origin of acquisition (shelter, breeder, pet shop, stray, or other); hair length; nose length; food type; weight; body type; grooming care; use of flea/tick control products; and physical activity levels. Environmental factors included household smoking; house size; use of carpets, rugs, and curtains; house location; the amount of time the dog spent outdoors; the use of fireplace; and exposure to environmental chemicals such as herbicides, pesticides, fungicides, rodenticides, and cleaning products such as bleach and ammonia. When applicable, the questionnaire included exhaustive details about exposure to tobacco smoke and its circumstances, the number of former or current smoking cohabitants, the number of daily consumed cigarettes (or similar), and the length of smoking time during the past decade.

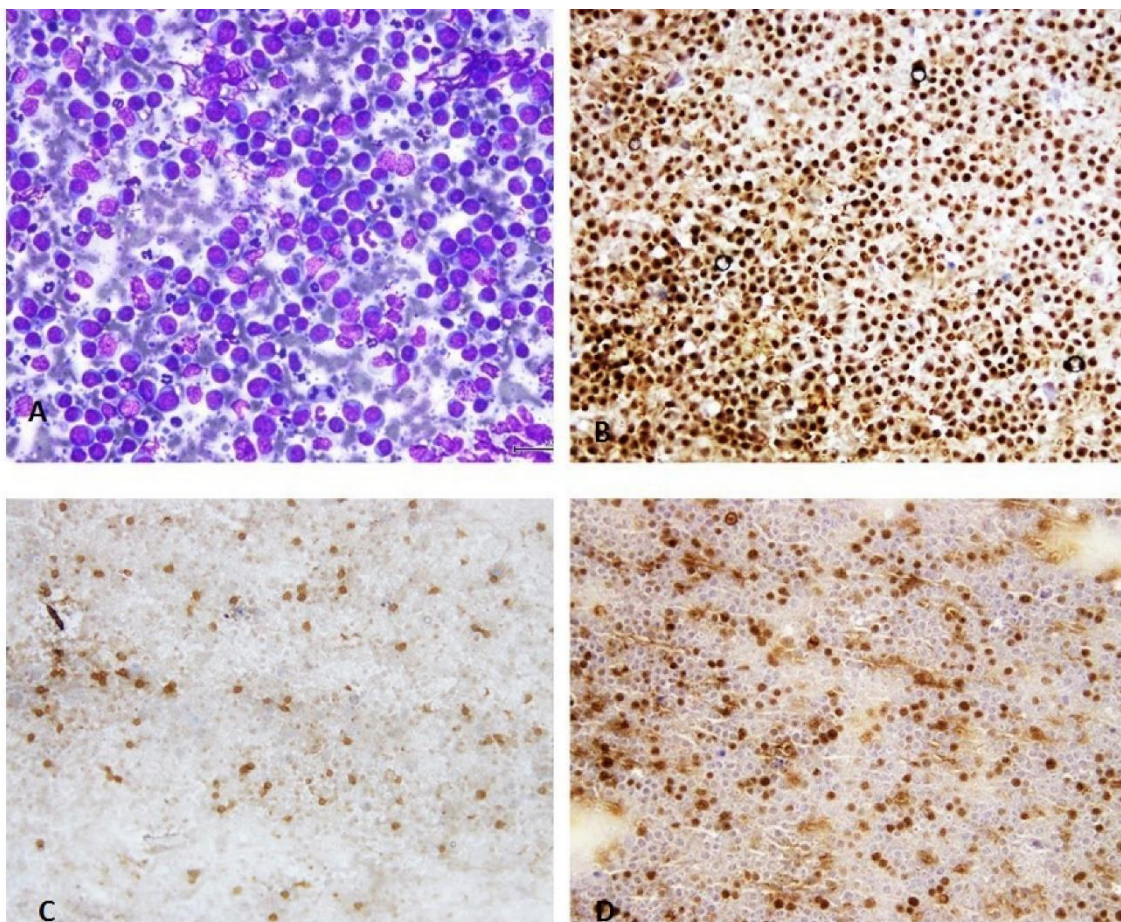
### **Statistical analysis**

Data were analyzed with the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), version 24. A pairwise comparison with all the collected variables was performed, and the significance of the Spearman's rank correlation coefficient was established. The difference between the average percentage of positive Ki67 cells (%Ki67+) in the groups "smoker owners" and "non-smokers owners" was analyzed with one-way ANOVA. The linear-by-linear association between two levels of smoke exposure and three levels of Ki67 - low, moderate, or high, previously described - was tested with the Chi-squared test. For all tests, a two-sided  $p < 0.05$  was considered to be statistically significant.

## Results

### Classification

According to the updated Kiel classification, 65% (15/23) were B-cell and 35% (8/23) were T-cell lymphomas. Eight morphological subtypes were identified including five B-cell and four T-cell subtypes. Out of the B-cell ones, three were LG centroblastic/centrocytic (Figure-1) and 12 HGs: One centroblastic large cell, five centroblastic monomorphic, four centroblastic pleomorphic, and two immunoblastic. Out of the eight T-cell lymphomas, two were LG small clear cell, and six were HG: One pleomorphic large cell, one lymphoblastic, and four pleomorphic mixed (Table-1).



**Figure-1:** B-cell centroblastic/centrocytic lymphoma of a 3-year-old mongrel female dog. Fine-needle aspiration biopsies of enlarged pre-scapular lymph node. (a) A population of medium-to-large lymphoid cells admixed with very few mature lymphocytes Hemacolor,  $\times 400$ ; (b) PAX5 immunostain ( $\times 200$ ); (c) CD3 immunostain ( $\times 200$ ); (d) Ki67 immunostain - moderate index: 40% ( $\times 200$ ).

### Proliferation assessment

Ki67 ICC was performed in 18 cases with well-preserved cytological smears. The mean % Ki67+ was 58.1% (standard deviation [SD]=0.28), and the median was 54% (range 8-98%). Thirteen lymphomas were categorized as high proliferation index ( $\bar{X}$ =0.71; SD=0.19), 11 of them being HG ones and two were LG. Two lymphomas presented moderate proliferation indexes ( $\bar{X}$ =0.35; SD=0.06), and three cases presented low Ki67 indexes ( $\bar{X}$  =0.16; SD=0.69) (Table-1).

**Table-1:** Updated Kiel classification, percentage of Ki67-positive cells and Ki67 indexes, and household smoking status of canine lymphomas.

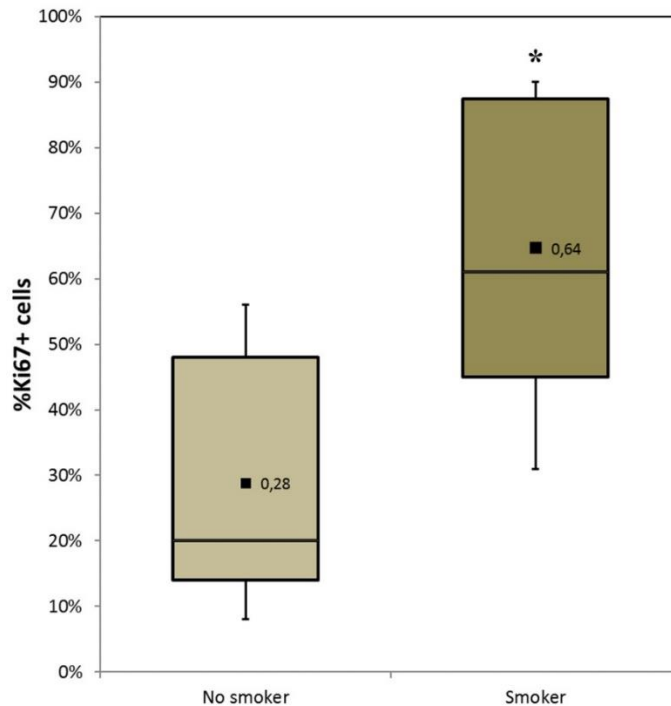
Kiel Classification	%Ki67+	Ki67 Index	Smoker owners	Number of smokers
<b>B-cell lymphomas</b>				
<b>High grade</b>				
Centroblastic large-cell	48%	High	Yes	2
Centroblastic monomorphic	88%	High	Yes	1
Centroblastic monomorphic	52%	High	Yes	2
Centroblastic monomorphic	51%	High	-	-
Centroblastic monomorphic	-	-	Yes	1
Centroblastic monomorphic	-	-	No	0
Centroblastic pleomorphic	31%	Moderate	Yes	1
Centroblastic pleomorphic	89%	High	-	-
Centroblastic pleomorphic	95%	High	-	-
Centroblastic pleomorphic	-	-	Yes	2
Immunoblastic	83%	High	Yes	1
Immunoblastic	90%	High	Yes	1
<b>Low-grade</b>				
Centroblastic/centrocytic	42%	High	Yes	1
Centroblastic/centrocytic	20%	Low	No	0
Centroblastic/centrocytic	40%	Moderate	No	0
<b>T-cell lymphomas</b>				
<b>High-grade</b>				
Lymphoblastic	8%	Low	No	0
Pleomorphic mixed	87%	High	Yes	2
Pleomorphic mixed	61%	High	Yes	1
Pleomorphic mixed	56%	High	No	0
Pleomorphic mixed	-	-	No	0
Pleomorphic large cells	-	-	No	0
<b>Low-grade</b>				
Small clear-cell-type	85%	High	-	-
Small clear-cell-type	20%	Low	No	0

### **Epidemiological study**

The series included seven (30.4%) mongrel and 16 (69.6%) purebred dogs (six labrador retrievers - 26%, two boxers - 8.7%, and one each of pointer, Portuguese hunting dog, bulldog, cocker spaniel, golden retriever, Castro Laboreiro shepherd, and pit bull terrier). Eleven dogs (47.8%) were females (45% spayed), and 12 (52.2%) were males (8% castrated). The mean age was 8.1 years (range, 3-15 years).

The epidemiologic questionnaire was completed by all dog owners although only 19 answered the section concerning smoking habits (Table-1). The results showed that in 11 out of 19 cases (57.89%) either the owners or other cohabitants, from 2005 to 2016, were or had been active smokers. In seven cases (63.7%), the dog lived with one smoker, while in the remaining cases (36.3%), there were two smokers cohabiting with the dog.

Pairwise comparison between all studied variables revealed a statistically significant positive correlation ( $r=0.753$ ,  $p=0.002$ ) and significant linear-by-linear association ( $p=0.018$ ) between the Ki67 index and smoking status. Data also revealed a statistically significant positive correlation between the Ki67 index and the number of smokers who lived with the dog ( $r=0.641$ ,  $p=0.018$ ). The ANOVA test confirmed a significantly different ( $p=0.011$ ) mean percentage of Ki67+ cells between the groups “non-smoker owners” ( $X_{\bar{}}=0.25$ ;  $SD=0.19$ ) and “smoker owners” ( $X_{\bar{}}=0.64$ ;  $SD=0.22$ ) (Figure-2). Neither other environmental factors nor geographical localization revealed significant relations with subtype, grade, or tumor proliferation index.



**Figure-2:** Box-and-whisker diagram depicting the percentage of Ki67+ cells categorized by the smoking status. Represents the mean percentage of Ki67+ cells per group. Lymphomas affecting dogs owned by smokers have a significantly higher mean percentage of Ki67+ cells ( $p < 0.05$ ).

## Discussion

Since lymphomas are a wide group of hematopoietic neoplasms with a broad range of potential outcomes [2,7,16], the simple diagnosis of “lymphoma” is of limited value for the clinical management of patients or even for the conduction of epidemiological studies. ICC plays a unique role in the improvement of the cytological diagnosis of canine lymphoma.

As lymphoid tissues lack in cellular cohesion, they permit a rich cellular harvest, so well-executed cytological collection procedures followed by adequate processing allow for obtaining useful diagnostic information [45]. In our study, FNB was performed without suction (the Zajdela or “French” technique) [8,46]. Although this technique potentially reduces the amount of harvested material, the preparations are more representative, less contaminated with blood and other cells [8] and cells are better preserved, which indeed contributes for the quality of immunocytochemical analysis.

Lymphoma cytological subtyping is challenging, and the use of ICC plays a vital role in both the diagnosis and subtyping [8]. Although all lymphoma immunophenotyping

techniques - immunohistochemistry, flow cytometry, and PARR - have their particular advantages [8], ICC allows for morphological evaluation of stained cells as well as staining location and intensity in a simple smear, thus reducing costs and procedures.

MI and Ki67 immunolabeling are the proliferation parameters more commonly used in veterinary oncology [7]. Counting the number of mitotic figures in cytological preparations can be misleading and lacks representativeness, mainly due to an irregular cell distribution [7]. The ICC for Ki67, a non-histone nuclear protein expressed in all stages of the cell cycle, may overcome this difficulty and thus improve the assessment of the proliferation activity of lymphomas. It has been shown that the Ki67 immunolabeling of cytological smears had high concordance with Ki67 immunohistochemistry in biopsy tissues [9]. In this study, we opted to count 300 cells per tumor, a higher number than previously reported (100 cells), to ensure the reliability of the results [7,47].

In our series, there was a higher prevalence of B-cell (65%) over T-cell lymphomas (35%), and 56.5% were HG tumors (13/23). Interestingly, Ki67 index differences were detected within tumors of similar grades, both in B- and T-cell lymphomas. There was no statistically significant correlation between Kiel's grades and Ki67 indexes or the percentage of Ki67-positive cells. Considering that cytotoxic chemotherapy is the preferred treatment for dogs with lymphoma and that it is known that it yields better responses in highly proliferating tumors, it is possible that subtyping and grading fail as prognostic and predictive indicators if not complemented with proliferation markers. In human mantle-cell lymphoma, the Ki-67 index has already surpassed cytology and growth pattern as prognostic factors [48]. Moreover, survival time discrepancies within canine lymphoma subtypes have already been demonstrated by Ponce *et al.* [12]. In a recent study [15] of HG B-cell lymphomas treated with a modified Wisconsin-Madison protocol, dogs affected by tumors of intermediate Ki67% indexes presented longer survival and relapse-free intervals than those with low or high Ki67%, as determined by flow cytometry. In human medicine, Hall *et al.* [49] analyzed the survival rate of patients with different grades and Ki67 indexes, demonstrating that those affected by LG NHL with high Ki67 indexes had worse survival rates than those with low Ki67 index and that HG NHL with very high Ki67 indexes had better survival rates when compared to those with lower indexes. Therefore, Hoster *et al.* recommended that Ki67 index should be routinely estimated in clinical practice to allow for more accurate individual risk estimation [48].

Some of the described discrepancies between subtypes and proliferation indexes, particularly in the LG T-cell small clear subtype with high Ki67 index, may be related to the process of transformation. As defined by the European canine lymphoma group, "transformation is the evolution of an indolent to an aggressive lymphoma, typically



harboring a very poor prognosis” [3]. In veterinary medicine, this phenomenon has been undervalued, although it is a possible indolent lymphomas’ evolution [50]. To the best of authors’ knowledge, however, there were no reports confirming the transformation of canine indolent lymphomas.

Different factors such as genetic modifications, epigenetic transformations, and microenvironmental conditions may contribute to reprogramming and transforming the original neoplastic mass into a more aggressive one [50,51]. Furthermore, lifestyle factors such as smoking habits, obesity, and alcohol consumption have been shown to influence the overall survival rate of human NHL patients [52].

The potential links between environmental pollutants and the risk of developing human NHL [24,31] and canine lymphomas [6,20,21,53] have been described. There is, however, a lack of studies relating environmental factors to the biological behavior of canine lymphomas, particularly those with potential prognostic or predictive value.

In our series, albeit small, a statistically significant relationship between exposure to tobacco smoke and the lymphomas’ proliferation, as expressed by the Ki67 index, emerged. High Ki67 indexes were positively correlated with the number of smoker cohabitants. These results are consistent with the hypothesis that second- and third-hand exposure to tobacco smoke could be considered as a hazardous factor for dogs with lymphomas by being associated with enhancement of their proliferative activity or transformation. Yet, it should be noted and highlighted that larger and more controlled studies are warranted to confirm this hypothesis. Given the small sample used, the external validity of this study is not possible.

## **Conclusion**

In summary, our results suggest that the cytological diagnosis of canine lymphomas benefits from being complemented with immunocytochemical studies that include subtyping and proliferative assessment, both contributing for the prognosis and the therapeutic planning. Furthermore, exposure to tobacco smoke in second- and third-hand ways seems to be related to higher proliferating indexes of canine lymphomas, independently of their subtype or grade.

## **Authors’ Contributions**

KCP was the research executer and coordinator. MS collaborated in the cytological diagnosis and LLM with sample collection. JNR oriented and supervised data analysis. AJM participated in the study planning, execution, and manuscript revising. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgments

The authors would like to thank Hugo Gregório of the Centro Hospitalar Veterinário (CHV); Gonçalo Petrucci of the Hospital Veterinário do Porto (HVP); Filipe Oliveira of the Hospital Veterinário de Referência Montenegro (HVRM); and Hugo Carvalho and Nazaré Pinto da Cunha of the veterinary laboratory CEDIVET, for their contribution to this study. Moreover, we would like to express our deep gratitude to Professor Dr. Fátima Gartner of the Department of Pathology and Immunology of ICBAS - University of Porto, for enabling the study.

This research was supported by an international PhD fellowship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), Brazil (CSF 0342-13-0).

## Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

## References

1. Bassig, B.A., Lan, Q., Rothman, N., Zhang, Y. and Zheng, T. (2012) Current understanding of lifestyle and environmental factors and risk of non-Hodgkin lymphoma: An epidemiological update. *J. Cancer Epidemiol.*, 2012: 978930.
2. Vail, D.M., Pinkerton, M.E. and Young, K.M. (2012) Canine lymphoma and lymphoid leukemia. In: Elseviers, S., editor. *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 5th ed. Elsevier, St. Louis. p608-638.
3. Comazzi, S., Guscetti, F. and Marconato, L. (2014) First meeting of the European canine lymphoma group. Workshop: State of the art and comparative aspects in canine lymphoma, CH-lugano, 22 June 2013. *Hematol. Oncol.*, 32: 68-71.
4. Siegel, R.L., Miller, K.D. and Jemal, A. (2016) Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J. Clin.*, 66: 7-30.
5. Ponce, F., Marchal, T., Magnol, J.P., Turinelli, V., Ledieu, D., Bonnefont, C., Pastor, M., Delignette, M.L. and Fournel- Fleury, C. (2010) A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. *Vet. Pathol.*, 47: 414-433.
6. Takashima-Uebelhoer, B.B., Barber, L.G., Zagarins, S.E., Procter-Gray, E., Gollenberg, A.L., Moore, A.S. and Bertone-Johnson, E.R. (2012) Household chemical exposures and the risk of canine malignant lymphoma, a model for human non-Hodgkin's lymphoma. *Environ. Res.*, 112: 171-176.
7. Sapierszynski, R., Kliczkowska-Klarowicz, K., Jankowska, U. and Jagielski, D. (2016) Cytodiagnosics of canine lymphomas-possibilities and limitations. *Pol. J. Vet. Sci.*, 19: 433-439.
8. Wiczorek, T.J., Paul, E. and Wakely, J. (2014) Lymph nodes. In: Elseviers, S., editor. *Cytology-Diagnostic Principles and Clinical Correlates*. 4th ed. Elsevier, Churchill Livingstone.
9. Fournel-Fleury, C., Magnol, J.P., Chabanne, L., Ghernati, I., Marchal, T., Bonnefont, C., Bryon, A. and Felman, P. (1997) Growth fractions in canine non-Hodgkin's lymphomas as determined *in situ* by the expression of the Ki-67 antigen. *J. Comp. Pathol.*, 117: 61-72.

10. Sapieryński, R., Dolka, I. and Fabisiak, M. (2012) High agreement of routine cytopathology and immunocytochemistry in canine lymphomas. *Pol. J. Vet. Sci.*, 15: 247-252.
11. Fournel-Fleury, C., Magnol, J.P., Bricaire, P., Marchal, T., Chabanne, L., Delverdier, A., Bryon, P.A. and Felman, P. (1997) Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: Comparison with human non-Hodgkin's lymphomas. *J. Comp. Pathol.*, 117: 35-59.
12. Ponce, F., Magnol, J.P., Ledieu, D., Marchal, T., Turinelli, V., Chalvet-Monfray, K. and Fournel-Fleury, C. (2004) Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. *Vet. J.*, 167: 158-166.
13. Fournel-Fleury, C., Ponce, F., Felman, P., Blavier, A., Bonnefont, C., Chabanne, L., Marchal, T., Cadore, J.L., Goy-Thollot, I., Ledieu, D., Ghernati, I. and Magnol, J.P. (2002) Canine T-cell lymphomas: A morphological, immunological, and clinical study of 46 new cases. *Vet. Pathol.*, 39: 92-109.
14. Lennert, K. (1992) Non-Hodgkin's lymphomas: Principles and application of the Kiel classification. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.*, 76: 1-13.
15. Poggi, A., Miniscalco, B., Morello, E., Gattino, F., Delaude, A., Ferrero Poschetto, L., Aresu, L., Gelain, M.E., Martini, V., Comazzi, S. and Riondato, F. (2016) Prognostic significance of Ki67 evaluated by flow cytometry in dogs with high-grade B-cell lymphoma. *Vet. Comp. Oncol.*, 15(2): 431-440.
16. Kiupel, M., Teske, E. and Bostock, D. (1999) Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. *Vet. Pathol.*, 36: 292-300.
17. Valli, V.E., Kass, P.H., San Myint, M. and Scott, F. (2013) Canine lymphomas: Association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival. *Vet. Pathol.*, 50: 738-748.
18. Sokolowska, J., Micun, J., Malicka, E. and Lechowski, R. (2012) Proliferation activity in canine lymphomas. *Pol. J. Vet. Sci.*, 15: 717-734.
19. Backer, L.C., Grindem, C.B., Corbett, W.T., Cullins, L. and Hunter, J.L. (2001) Pet dogs as sentinels for environmental contamination. *Sci. Total Environ.*, 274: 161-169.
20. Gavazza, A., Presciuttini, S., Barale, R., Lubas, G. and Gugliucci, B. (2001) Association between canine malignant lymphoma, living in industrial areas, and use of chemicals by dog owners. *J. Vet. Intern. Med.*, 15: 190-195.
21. Zanini, D., Kimura, K., Nishiya, A., Ubukata, R., Leandro, R., Brito, C., Trombetti, M., Lagoa, A., Macedo, T., Rodrigues, L., Rosendo, J., Arndt, H., Dias, R. and Dagli, M. (2013) Environmental risk factors related to the development of canine non-Hodgkin's lymphoma. *Ciênc. Rural*, 43: 1302-1308.
22. Ito, D., Frantz, A.M. and Modiano, J.F. (2014) Canine lymphoma as a comparative model for human non-Hodgkin lymphoma: Recent progress and applications. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 159: 192-201.
23. Marconato, L., Gelain, M.E. and Comazzi, S. (2013) The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma: A review. *Hematol. Oncol.*, 31: 1-9.
24. Czarnota, J., Gennings, C., Colt, J.S., de Roos, A.J., Cerhan, J.R., Severson, R.K., Hartge, P., Ward, M.H. and Wheeler, D.C. (2015) Analysis of environmental chemical mixtures and non-hodgkin lymphoma risk in the NCI-SEER NHL study. *Environ. Health Perspect.*, 123: 965-970.
25. Chihara, D., Nastoupil, L.J., Williams, J.N., Lee, P., epidemiology of non-Hodgkin lymphoma and implications for therapy. *Expert Rev. Anticancer Ther.*, 15: 531-544.
26. Lu, Y., Wang, S.S., Reynolds, P., Chang, E.T., Ma, H., Sullivan-Halley, J., Clarke, C.A. and Bernstein, L. (2011) Cigarette smoking, passive smoking, and non-Hodgkin lymphoma risk: Evidence from the California teachers study. *Am. J. Epidemiol.*, 174: 563-573.
27. Dobson, J.M. (2013) Breed-predispositions to cancer in pedigree dogs. *ISRN Vet. Sci.*, 2013: 941275.

28. Villamil, J.A., Henry, C.J., Hahn, A.W., Bryan, J.N., Tyler, J.W. and Caldwell, C.W. (2009) Hormonal and sex impact on the epidemiology of canine lymphoma. *J. Cancer Epidemiol.*, 2009: 591753.
29. Duncan, A.W., Marr, H.S., Birkenheuer, A.J., Maggi, R.G., Williams, L.E., Correa, M.T. and Breitschwerdt, E.B. (2008) Bartonella DNA in the blood and lymph nodes of golden retrievers with lymphoma and in healthy controls. *J. Vet. Intern. Med.*, 22: 89-95.
30. Pasquini, A., Gavazza, A. and Biagi, G. (2013) Oxidative stress in lymphoma: Similarities and differences between dog and human. *Comp. Clin. Pathol.*, 24: 69-73.
31. DellaValle, C.T., Deziel, N.C., Jones, R.R., Colt, J.S., De Roos, A.J., Cerhan, J.R., Cozen, W., Severson, R.K., Flory, A.R., Morton, L.M. and Ward, M.H. (2016) Polycyclic aromatic hydrocarbons: Determinants of residential carpet dust levels and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Causes Control*, 27: 1-13.
32. Hayes, H.M., Tarone, R.E., Cantor, K.P., Jessen, C.R., McCurnin, D.M. and Richardson, R.C. (1991) Case-control study of canine malignant lymphoma: Positive association with dog owner's use of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicides. *J. Natl. Cancer Inst.*, 83: 1226-1231.
33. Reif, J.S., Lower, K.S. and Ogilvie, G.K. (1995) Residential exposure to magnetic fields and risk of canine lymphoma. *Am. J. Epidemiol.*, 141: 352-359.
34. Marconato, L., Leo, C., Girelli, R., Salvi, S., Abramo, F., Bettini, G., Comazzi, S., Nardi, P., Albanese, F. and Zini, E. (2009) Association between waste management and cancer in companion animals. *J. Vet. Intern. Med.*, 23: 564-569.
35. IARC-Working-Group-on-the-Evaluation-of-Carcinogenic-Risks-to-Humans. (2012) Personal habits and indoor combustions. Volume 100E. A review of human carcinogens. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.*, 100: 1-538.
36. IARC-Working-Group-on-the-Evaluation-of-Carcinogenic-Risks-to-Humans. (2004) Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.*, 83: 1-1438.
37. Ganjre, A.P. and Sarode, G.S. (2016) Third hand smoke--a hidden demon. *Oral Oncol.*, 54: e3-e4.
38. Diver, W.R., Teras, L.R., Gaudet, M.M. and Gapstur, S.M. (2014) Exposure to environmental tobacco smoke and risk of non-Hodgkin lymphoma in nonsmoking men and women. *Am. J. Epidemiol.*, 179: 987-995.
39. Roza, M.R. and Viegas, C.A. (2007) The dog as a passive smoker: Effects of exposure to environmental cigarette smoke on domestic dogs. *Nicotine Tob. Res.*, 9: 1171-1176.
40. Carter, R.F. and Valli, V.E. (1988) Advances in the cytologic diagnosis of canine lymphoma. *Semin. Vet. Med. Surg. Small Anim.*, 3: 167-175.
41. Caniatti, M., Roccabianca, P., Scanziani, E., Paltrinieri, S. and Moore, P.F. (1996) Canine lymphoma: Immunocytochemical analysis of fine-needle aspiration biopsy. *Vet. Pathol.*, 33: 204-212.
42. Messick, J. (2008) The lymph nodes. In: Cowell, R., Tyler, R., Meinkoth, J. and de Nicola, B., editors. *Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat*. Mosby Elsevier, St. Louis, MO. p179-191.
43. Willmann, M., Mullauer, L., Guija de Arespacochaga, A., Reifinger, M., Mosberger, I. and Thalhammer, J.G. (2009) Pax5 immunostaining in paraffin-embedded sections of canine non-Hodgkin lymphoma: A novel canine pan pre- B- and B-cell marker. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 128: 359-365.
44. Jankowska, U., Jagielski, D., Czopowicz, M. and Sapierzynski, R. (2015) The animal-dependent risk factors in canine T-cell lymphomas. *Vet. Comp. Oncol.*, 15: 307-314.
45. Schwock, J. and Geddie, W.R. (2012) Diagnosis of B-cell non-hodgkin lymphomas with small-/intermediate-sized cells in cytopathology. *Patholog. Res. Int.*, 2012: 164934.

46. Zajdela, A., Zillhardt, P. and Voillemot, N. (1987) Cytological diagnosis by fine needle sampling without aspiration. *Cancer*, 59: 1201-1205.
47. Bauer, N.B., Zervos, D. and Moritz, A. (2007) Argyrophilic nucleolar organizing regions and Ki67 equally reflect proliferation in fine needle aspirates of normal, hyperplastic, inflamed, and neoplastic canine lymph nodes (n=101). *J. Vet. Intern. Med.*, 21: 928-935.
48. Hoster, E., Rosenwald, A., Berger, F., Bernd, H.W., Hartmann, S., Loddenkemper, C. and Agnelli, E. (2016) Prognostic value of Ki-67 index, cytology, and growth pattern in mantle-cell lymphoma: Results from randomized trials of the European mantle cell lymphoma network. *J. Clin. Oncol.*, 34: 1386-1394.
49. Hall, P.A., Richards, M.A., Gregory, W.M., d'Ardenne, A.J., Lister, T.A. and Stansfeld, A.G. (1988) The prognostic value of Ki67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. *J. Pathol.*, 154: 223-235.
50. Comazzi, S., Aresu, L. and Marconato, L. (2015) Transformation of canine lymphoma/leukemia to more aggressive diseases: Anecdotes or reality? *Front. Vet. Sci.*, 2: 42.
51. Casulo, C. and Friedberg, J. (2017) Transformation of marginal zone lymphoma (and association with other lymphomas). *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, 30: 131-138.
52. Geyer, S.M., Morton, L.M., Habermann, T.M., Allmer, C., Davis, S., Cozen, W., Severson, R.K., Lynch, C.F., Wang, S.S., Maurer, M.J., Hartge, P. and Cerhan, J.R. (2010) Smoking, alcohol use, obesity, and overall survival from non-Hodgkin lymphoma: A population-based study. *Cancer*, 116: 2993-3000.
53. Bertone, E.R., Snyder, L.A. and Moore, A.S. (2002) Environmental tobacco smoke and risk of malignant lymphoma in pet cats. *Am. J. Epidemiol.*, 156: 268-273.

## **4.2. CAPÍTULO II - Estudo imunohistoquímico de linfomas caninos do Serviço de Patologia Veterinária do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto**

### **4.2.1. Objetivos**

Com o objetivo de ampliar o conhecimento do imunofenótipo dos linfomas caninos no Distrito do Porto para análise epidemiológica e de fatores de risco, além de promover um conhecimento mais aprofundado da sua histopatologia e consequente classificação, procedeu-se a imunohistoquímica dos linfomas diagnosticados pelo Serviço de Patologia Veterinária do ICBAS – UP.

### **4.2.2. Materiais e Métodos**

Uma série retrospectiva de 75 amostras teciduais parafinizadas foi selecionada do arquivo do Serviço de Patologia Veterinária do ICBAS – UP, de 2005 a 2016, englobando apenas casos do Distrito do Porto. Dados sobre a raça, sexo e idade foram também levantados e os cães foram categorizados de acordo com o porte (pequeno, médio e grande) em função do estalão da raça ou peso individual de animais sem raça definida.

A técnica de imunohistoquímica foi realizada com os anticorpos marcadores de linfócitos T CD3 (policlonal anti-humano-coelho; Dako, Glostrup, Dinamarca)<sup>[171]</sup> e de linfócitos B PAX5 (monoclonal de rato; Leica Microsystems, Nussloch, Alemanha). Em alguns casos duvidosos foram utilizados os anticorpos CD18 (monoclonal de rato, ThermoFisher) e MUM-1 (monoclonal de coelho, Dako) para excluir as neoplasias histiocitárias e plasmocitárias. A revelação foi realizada com a técnica de imunoperoxidase indireta utilizando um polímero comercial (Novolink Polymer®).

Os subtipos histológicos foram classificados pela arquitetura tecidual, características morfológicas (tamanho, características do núcleo e nucléolos) e índice mitótico. Os linfomas foram diagnosticados morfológicamente de acordo com a classificação da OMS (tabela 2.2, do capítulo da revisão bibliográfica) com a orientação das professoras Doutora Patrícia Pereira, do Departamento de Patologia e Imunologia molecular, e Doutora Marta Santos, do Serviço de Diagnóstico Citológico do Departamento de Microscopia do ICBAS – UP. Os casos em que não foi possível determinar uma classificação foram denominados SOE (sem outra especificação).

### 4.2.3. Resultados

Os cães sem raça determinada (SRD) foram os mais representados (28%; n=21), seguidos pelos cães da raça Cocker spaniel (12%; n=9), Boxer (9%; n=7), Labrador Retriever (6%; n=5), Golden Retriever (5%; n=4), Rottweiler (4%; n=3), Bullmastiff, Pequinês, Caniche, Samoyedo, Dálmata e Husky Siberiano (2.6%; n=2), Bichon, Boiadeiro de Berna, Serra da Estrela, Fila de São Miguel, Yorkshire Terrier, Montanha dos Pirinéus, Doberman, Pastor Alemão, Spaniel Bretão, Pastor de Brie, Whippet, Beagle e Pitbull (1,3%; n=1).

Os resultados apresentados na tabela 4.2.1 mostram uma predominância estatisticamente significativa ( $p=0,03$ ) de fêmeas, que exibiram uma idade média superior à dos machos (9,4 e 8,9 anos, respetivamente). Os cães machos da raça Boxer apresentaram uma idade média superior às fêmeas da mesma raça (11,3 e 7,2 anos, respetivamente) enquanto o inverso ocorreu com os cães da raça Labrador (7 e 13,5, respetivamente).

A análise do porte dos animais permitiu verificar que 10,6% (n=8) eram cães de porte pequeno, com uma média de idade de 10,8 anos; 26,6% (n=20) eram cães de médio porte e 37,7% (n=28) cães de porte grande, ambos com uma idade média de 8,9 anos; 5,3% (n=4) de cães foram considerados gigantes, com uma idade média de 5,75 anos. Em 20% (n=15) dos casos não havia informações suficientes para os classificar quanto ao porte. Os cães foram agrupados em pequeno e médio (P+M) e grande e gigante (G+GG) e os resultados estão descritos na tabela 4.2.1.

Os linfomas de células B foram os mais frequentes (57,3%; n=43) seguidos pelos de células T (37,3%; n=28) e 5,4% (n=4) foram classificados como sendo nulos (nãoB/nãoT). Não foram determinadas diferenças estatisticamente significativas entre os imunofenótipos. As idades médias dos cães afetados pelos diferentes imunofenótipos foram: células B - 9,7 anos (DP=3,0); células T - 8,8 anos (DP=3); e nulo - 7,25 anos (DP=4,1).

Os cães grandes e gigantes apresentaram um risco três vezes superior de desenvolver linfomas T em relação aos cães médios e pequenos (OR:3,08; IC 95% 1.03;9,23). Os cães da raça Boxer apresentaram um predomínio de linfomas de células T enquanto os cães da raça Cocker Spaniel e Rottweiler evidenciaram uma maior proporção de linfomas de células B, embora não estatisticamente significativa.

**Tabela 4.2.1.** – Características dos linfomas caninos do Serviço de Patologia Veterinária – ICBAS/UP, de 2005 a 2016, pertencentes ao Distrito do Porto.

	Sexo – n (%)			Idade Média (DP)			Imunofenótipo# n (%)	
	Total	Machos	Fêmeas	Total	Machos	Fêmeas	B	T
N	75	34 (37)	41 (63)*	9,2 (3,1)	8,9 (3,0)	9,4 (3,2)	43 (57)	28 (37)
<b>Raças mais comuns</b>								
SRD	21 (28)	8 (38)	13 (62)	9,5 (3)	8,3 (3,4)	10,2 (2,6)	15 (65)	5 (31)
Cocker	9 (12)	4 (44,4)	5 (55,6)	9,5 (3,4)	9,5 (4,1)	9,6 (3,2)	6 (76)	3 (24)
Boxer	7 (9,3)	3 (42,8)	4 (57,2)	9,0 (2,7)	11,3 (1)	7,2 (2)	2 (46,3)	5 (53,6)
Labrador	5 (6,7)	3 (60)	2 (40)	9,6 (4,1)	7 (1,7)	13,5 (3,5)	1 (37)	3 (40)
Golden	4 (4)	2 (50)	2 (50)	9,2 (2,2)	10,5 (0,7)	8,0 (2,8)	1 (32,6)	2 (43)
Rottweil.	3 (2,7)	2 (67)	1 (33)	8,0	8,0		2 (82,2)	1 (17,8)
<b>Porte</b>								
Peq + M	28(46,7)	15(47,5)	13(52,4)	9,4 (2,9)	9,1 (3,2)	9,7 (2,6)	20(68,6)	8 (31,4)
Gr + Gig	32(53,3)	13(44,8)	19(55,2)	8,4 (3,2)	8,5 (2,7)	8,4 (3,6)	13(48,7)	16 (42,5)

#As diferenças entre as proporções dos imunofenótipos pertencem ao grupo nulo. \* p<0,05.

De entre os subtipos classificados como linfomas B (tabela 4.2.2), o mais comum foi o linfoma de grandes células B (DLBCL), agrupando todas as variantes, (35%; n=15) seguido pelo linfoma de zona marginal (16%; n=7) e o linfoma B, SOE (12%, n=5).

No grupo de linfomas T, os linfomas de zona T (18%; n=6), intestinal, SOE (18%; n=5) e os linfomas T SOE e anaplásicos (14%; n=4) foram os mais frequentes (tabela 4.2.2).

As localizações anatómicas predominantes foram os linfomas multicêntricos com praticamente metade do total de casos (49,3%; n=37), seguidos pelos esplénicos (22,6%; n=17), cutâneos e gastrointestinais (12%; n=9) e extranodais (4%; n=3).



**Tabela 4.2.2** – Classificação histológica dos linfomas caninos do Serviço de Patologia Veterinária – ICBAS-UP, de 2005 a 2016, pertencentes ao Distrito do Porto.

<b>B</b>	<b>43</b>	<b>57,3%</b>	<b>T</b>	<b>28</b>	<b>37,3%</b>
<b>Linfoma B, SOE</b>	<b>5</b>	<b>11,6%</b>	<b>Linfoma T, SOE</b>	<b>4</b>	<b>14,2%</b>
<b>Linfoblástico</b>	<b>4</b>	<b>9,3%</b>	<b>Linfoblástico</b>	<b>3</b>	<b>10,7%</b>
<b>Linfoplasmocítico</b>	<b>2</b>	<b>4,6%</b>	<u>Nodal</u>		
<b>DLBCL</b>	<b>15</b>	<b>34,8%</b>	<b>Zona T</b>	<b>6</b>	<b>21,4%</b>
DLBCL, SOE	3		SOE	5	
Centroblástico	4		De células intermédias	1	
Imunoblástico	6		<b>Periférico de células T (PTCL)</b>	<b>1</b>	<b>3,5%</b>
DLBCL rico em T	2		<b>Anaplásico</b>	<b>4</b>	<b>14,2%</b>
<u>Foliculares</u>			SOE	1	
<b>Centro folicular</b>	<b>3</b>	<b>7%</b>	grandes células	3	
Grau 2	1		<b>Angioimunoblástico</b>	<b>1</b>	<b>3,5%</b>
Grau 2 esplénico	1		<b>Intestinal</b>	<b>5</b>	<b>17,8%</b>
Grau 3	1		SOE	3	
<b>Manto</b>	<b>2</b>	<b>4,6%</b>	EATL tipo 1	2	
Nodal	1		<u>Extranodal</u>		
Esplénico	1		<b>Periférico</b>	<b>1</b>	<b>3,5%</b>
<b>Zona Marginal</b>	<b>9</b>	<b>20,9%</b>	<b>Cutâneo</b>	<b>3</b>	<b>10,7%</b>
Nodal	7				
Esplénico	1		<b>Nulo</b>	<b>4</b>	<b>5,4%</b>
MALT	1		Linfoma NB/NT		
<b>Cutâneo</b>	<b>2</b>	<b>4,6%</b>			

SOE: sem outra especificação

#### 4.2.4. Discussão

O Serviço de Patologia Veterinária do ICBAS-UP é responsável pelo diagnóstico de biópsias do Hospital Veterinário da Universidade do Porto – UPVet e de centros de atendimento veterinário de diferentes regiões de Portugal. Este tipo de estudo permitiu caracterizar a epidemiologia desta neoplasia no Distrito do Porto.

Em discordância com a maior prevalência de machos descrita em trabalhos anteriores, a nossa série era constituída maioritariamente por fêmeas.<sup>[8; 23; 74; 172]</sup> Também a idade média dos animais à data do diagnóstico foi ligeiramente superior àquela relatada por outros autores: 9,2 anos por oposição ao intervalo 5,9 a 8,7<sup>[8; 74; 173; 174]</sup>

Uma outra divergência dos resultados anteriores prendeu-se com o facto de a raça Cocker Spaniel ter sido a segunda mais frequente, logo após os cães sem raça definida, posição habitualmente ocupada pelos Boxer<sup>[23; 74]</sup>. Entretanto, e tal como descrito na literatura<sup>[119]</sup>, os linfomas de células T constituíram a maioria dos casos em Boxer.

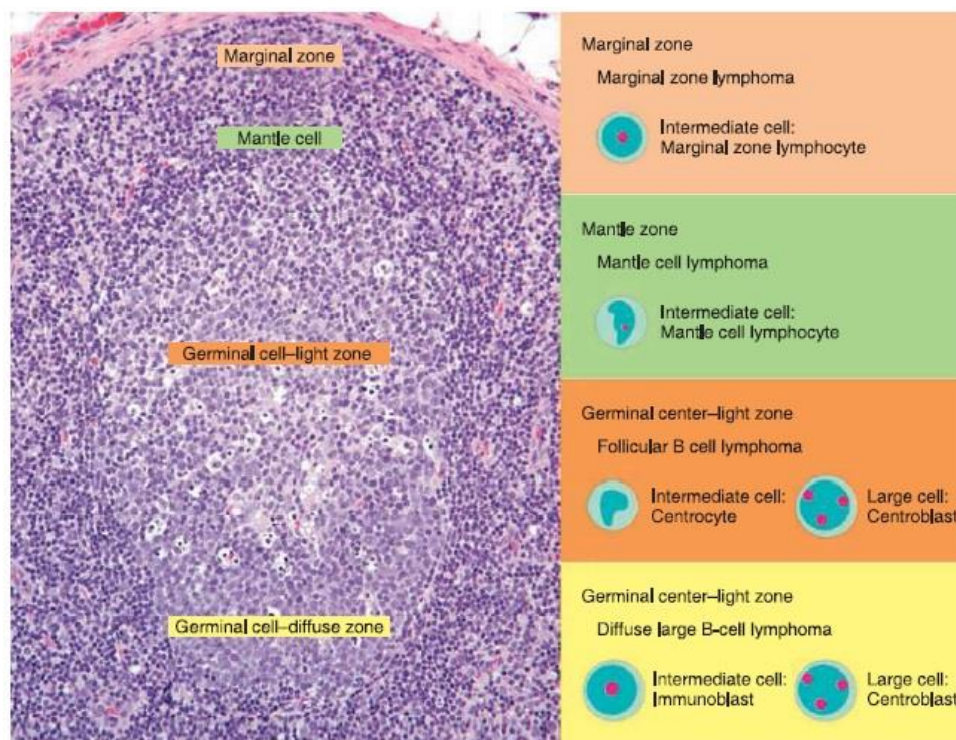
Em linha com os estudos prévios<sup>[23; 74; 174]</sup>, a forma multicêntrica foi a mais encontrada. No entanto, a segunda forma mais frequente foi a esplênica, contrariando a descrição maioritária que identificou as formas cutânea e alimentar como de maior prevalência do que a esplênica<sup>[174]</sup>. De notar que alguns autores não consideraram a classificação de linfomas esplênicos<sup>[8; 12; 103]</sup>.

A informação imunofenotípica, que permite diferenciar o padrão clonal das células neoplásicas como B ou T tem vindo a tornar-se uma ferramenta fundamental, utilizada pelo seu valor prognóstico<sup>[74; 75; 103]</sup>. Tradicionalmente considerava-se que os linfomas de tipo T conduziam inevitavelmente a um mau prognóstico, enquanto os linfomas de células B estavam associados a um bom prognóstico (T= “terrível”, B= “bom”)<sup>[74; 103]</sup>. Essa generalização foi, no entanto, perdendo força à medida que outras características, nomeadamente subtipos, localizações e graus histológicos, foram demonstrando ter maior valor prognóstico<sup>[84; 85]</sup>. No entanto, a informação imunofenotípica tem grande importância em estudos epidemiológicos, tendo-se demonstrado, em linfomas humanos, diferenças nos fatores de risco para cada subtipo<sup>[130; 159; 175]</sup>. Neste estudo não foram encontradas diferenças significativas entre as prevalências dos linfomas de células B e T, contrariando a maioria dos estudos onde se refere uma predominância de linfomas B<sup>[8; 68; 74; 103; 174; 176]</sup> e poucos que evidenciam uma predominância de linfoma T<sup>[23]</sup>

O linfoma de células B mais frequente foi o difuso de grandes células (DLBCL) (34,8%; n=15), o que está de acordo com a literatura<sup>[12]</sup>. A categoria DLBCL é constituída por um misto de populações de imunoblastos e centroblastos e inclui as variantes centroblástica, imunoblástica, SOE e “rico em T”, diferenciáveis pela quantidade de imunoblastos presentes<sup>[12; 69]</sup>. A variante “rico em T”, a mais comum nos cavalos e gatos embora pouco reportada em cães<sup>[12]</sup>, pode ser confundida com um linfoma T devido ao seu elevado número de células T. Para a sua diferenciação é necessária a observação atenta da presença dos centroblastos e imunoblastos, que podem representar menos de 10% da população neoplásica<sup>[12]</sup>.

O diagnóstico dos linfomas foliculares, que incluem os de zona marginal, do manto e os centro-foliculares, requer o conhecimento da estrutura dos folículos linfoides, como descrito no item 2.2.1 (revisão de literatura), e as características identificativas de cada tipo celular. O linfoma de zona marginal (LZM) é, na maioria dos casos, de tipo indolente com uma distribuição em torno dos centros germinativos<sup>[12]</sup>. O linfoma do manto, também um linfoma indolente, é mais raro do que o LZM e surge da bainha interior do manto dos folículos linfoides esplênicos<sup>[12]</sup>. Os linfomas centro-foliculares são distinguidos pela ausência do centro escurecido característico do folículo, sendo

classificados de acordo com a percentagem de centroblastos, cuja quantidade está diretamente relacionada com maior agressividade<sup>[12]</sup> (figura 4.2.1).



**Figura 4.2.1**– Esquema dos linfomas B foliculares baseado na arquitetura normal de um folículo linfóide. (fonte: Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals, 2015<sup>[12]</sup>)

Os linfomas B ou T de células linfoblásticas são considerados agressivos e podem surgir nos linfonodos, baço, mediastino e medula óssea<sup>[12]</sup>. As células possuem tamanho intermediário, núcleo oval com nucléolos indistintos e uma intensa atividade mitótica<sup>[12; 69]</sup>. A linfadenopatia periférica surge rapidamente e o animal rapidamente perde o apetite e começa a apresentar sinais de prostração intensa<sup>[12]</sup>. O imunofenótipo T está frequentemente associado a hipercalcemia<sup>[12]</sup>. Os linfomas linfoplasmocíticos, indolentes, são caracterizados por pequenos linfócitos de tipo plasmocitóide<sup>[69]</sup>.

De entre os linfomas T, o subtipo predominante foi o de zona T (21,4%; n=6) seguido pelo intestinal (17,8%; n=5). Os linfomas de células maduras T são classificados primariamente pelo local da neoplasia – nodal, extranodal, intestinal e cutâneo – nomeando-se os restantes como periféricos SOE<sup>[12]</sup>. Os linfomas de zona T são indolentes, induzindo linfadenomegália regional associada ou não a ligeira linfocitose. Os linfomas T anaplásicos, de células grandes, irregulares e por vezes bizarras, são agressivos e de mau prognóstico<sup>[12]</sup>. Os linfomas angioimunoblásticos caracterizam-se

pela presença de capilares proeminentes através do parênquima dos linfonodos e de agrupamentos de imunoblastos em torno de vasos<sup>[12]</sup>. Os linfomas T intestinais, também denominados linfomas associados a enteropatias (EATL), são mais comuns em gatos e difíceis de distinguir de doença inflamatória crónica intestinal (IBD) em cães<sup>[12; 177]</sup>. São neoplasias de linfócitos intraepiteliais, subdivididas em dois tipos – tipo 1 de células grandes, geralmente associado a um processo inflamatório em cães idosos; tipo 2 de células pequenas e médias, não associado a processo inflamatório e diagnosticado mais frequentemente em gatos idosos<sup>[12]</sup>. Os três casos cutâneos deste trabalho foram classificados como epiteliotrópicos, caracterizados por serem indolentes, por vezes multifocais e localmente extensivo, sendo denominados por vezes como de tipo micose fungóide<sup>[12]</sup>.

Os resultados encontrados para linfomas nulos (nãoB/nãoT) estão de acordo com a literatura, representando menos de 5% dos casos<sup>[11; 68; 78]</sup>.

Este estudo de classificação dos linfomas caninos permitiu caracterizar esta neoplasia no Distrito do Porto.

#### **4.3. CAPÍTULO III - Descrição de potenciais associações de fatores de risco aos linfomas caninos no Distrito do Porto.**

##### **4.3.1. Considerações Gerais e Objetivos**

Ainda que de forma não consensual, foram descritos no capítulo 2.3.8 vários fatores de risco potenciais para o desenvolvimento de linfomas em cães, como a idade, sexo, hormonas sexuais, raça, localização geográfica, exposição a produtos químicos (e.g. herbicidas, inseticidas), tabagismo, campos magnéticos, entre outros. É admissível, porém, que no capítulo de fatores ambientais possam existir variações geográficas que justifiquem, pelo menos em parte, as divergências encontradas em estudos de diferentes regiões. Esta hipótese levou-nos a procurar identificar e caracterizar os hábitos de vida dos cães no Distrito do Porto, procurando diferenças entre afetados ou não por linfomas.

Apesar de a intenção inicial ter sido um estudo caso-controlo, alguma falta de adesão e conseqüente número insuficiente de entrevistados impediu que fosse possível completar um estudo deste tipo, levando-nos a optar pela análise univariada na exploração dos seus resultados. Mesmo sabendo das suas limitações, pareceu interessante proceder a análise e mostrar os resultados e discussão.

##### **4.3.2. Materiais e Métodos**

Foi elaborado um questionário epidemiológico baseado em diversos estudos do tema<sup>[35; 132; 145; 148; 158; 172; 178-180]</sup>, contemplando vários fatores descritos na literatura como associados ao risco de LNH, analisados através de diferentes métodos de abordagem. O questionário foi disponibilizado *on-line* para facilitar e aumentar o número de respostas, utilizando o endereço eletrónico:

<http://www.surveio.com/survey/d/P8T6F4B5P6K2I7N0P> .

Foram entrevistados proprietários/cuidadores de cães com diagnóstico confirmado de linfoma residentes no Distrito do Porto, assim como proprietários/cuidadores de cães sem histórico de qualquer tipo de neoplasia ou doença infecciosa. Os critérios para seleção e exclusão estão descritos na tabela 4.3.1.

Para além da análise dos fatores isolados, foram construídas escalas quantitativas para as seguintes variáveis: nível de poluição externa, nível de poluição interior e nível de exposição ao fumo de tabaco, utilizando as equações que se seguem:

- Exposição ao fumo de tabaco:
  - número de fumadores coabitantes +
  - soma do consumo médio diário de cigarros por cada fumador +
  - hábito de fumar em toda a habitação (1 ponto) +
  - hábito de fumar próximo do cão (0 – nunca a 5 - sempre).
  
- Poluição externa:
  - habitar próximo a estrada movimentada (0 – não; 1 – sim) +
  - frequência de engarrafamento (0 – nunca até 4 – todos os dias) +
  - intensidade do tráfego (0 – leve; 1 – moderado; 2 - intenso) +
  - frequência de queimadas (0 – nunca até 4 – frequentemente) +
  - tipologia da área de residência (0 – rural; 1 - urbana).
  
- Poluição interior:
  - Exposição ao fumo de tabaco +
  - presença de alcatifa (1 ponto) +
  - presença de cortinas (1 ponto) +
  - presença de tapetes (1 ponto) +
  - utilização da lareira (0 - nunca a 4 – durante os meses de inverno) +
  - frequência da utilização de incensos (0 – nunca a 3 - frequentemente).

#### **4.3.3. Análise estatística**

As associações entre as variáveis estudadas e o desenvolvimento de linfoma canino foram determinadas pelo teste de Qui-quadrado, sendo incluídas as variáveis que apresentaram um p igual e/ou inferior a 0,20. O teste de ANOVA foi utilizado para determinar as diferenças entre variáveis contínuas (idade e peso), assim como para os níveis de poluição externa, interna e exposição ao fumo de tabaco. A estatística do teste z foi utilizada para avaliar as diferenças das proporções. Todas as análises foram realizadas no *software* SPSS versão 24 (IBM SPSS Statistics 24).

#### 4.3.4. Resultados

Após serem testadas cinco versões do questionário foi obtida uma versão final (anexo 2), constituída por 67 questões abordando vários dos potenciais fatores de risco descritos na literatura. A organização e avaliação deste construto estão descritas nas tabelas 4.3.1 e 4.3.2.

**Tabela 4.3.1** - Descrição do questionário epidemiológico: fatores de risco para o linfoma canino no Distrito do Porto.

<b>Medir a proporção da resposta</b>		
Participantes		<b>143</b>
- Elegíveis		<b>113</b>
- Grupo Caso	Donos de cães com diagnóstico confirmado de linfoma residentes no Distrito do Porto de 2005 a 2016	<b>55</b>
- Grupo controlo	Donos de cães sem diagnóstico de linfoma residentes no Distrito do Porto	<b>58</b>
- Não elegíveis	Cães com qualquer outro tipo de neoplasia diagnosticada ou suspeita ou qualquer tipo de doença infecciosa.	<b>36</b>
<b>Maximizar a proporção da resposta</b>		
Personalização	Elaboração em folha A3 dobrada para evidenciar a continuidade das perguntas e evitar perdas de folhas	
	Utilização de imagens em questões específicas para padronização (ex. comprimento do nariz)	
	Utilização de caixa sombreada para espaço de preenchimentos de variáveis quantitativas e/ou texto.	
	Disposição uniforme em coluna dupla	
	Estratégias de alteração da sequência das perguntas para evitar respostas induzidas	
Crítérios de emparelhamento	Idade, raça, porte (SRD), sexo, Concelho.	
Afiliação Universitária	Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar - Universidade do Porto	
Tempo médio de preenchimento	15-20 minutos	
Modos de administração	Entrevista pessoal	
	- presencial.....	<b>65</b>
	- telefónica.....	<b>16</b>
	Auto-aplicados	
	- correio .....	<b>1</b>
	- Internet .....	<b>61</b>
	<b>Total</b> .....	<b>143</b>
Questões sensíveis	Questão – Cancro em algum coabitante?	
Codificação	Não realizada para evitar respostas induzidas	
<b>Hipóteses a avaliar</b>		
Têm maior risco de desenvolver linfomas os cães que:	1. Vivem entre fumadores	
	2. Residem em áreas com mais poluição	
	3. Residem na proximidade de torres de alta tensão	

4. Residem em microambientes mais poluídos
5. São expostos a agentes químicos
6. Alimentados com ração
7. Os animais obesos
8. Tem proprietários que também têm/tiveram cancro

**Tabela 4.3.2 – Estrutura e distribuição das questões em domínios e subdomínios.**

Domínios	Subdomínios	Questão nº	Domínios	Subdomínios	Questão nº
<b>Identificação</b>	Código e data		<b>Força da resposta</b>	Habilitações	12
	Nome proprietário	1		Proximidade ao cão	13
	Telefone contacto	2		Aquisição	15,16
	Nome do cão	3		Tempo no mesmo endereço	29
	Grupo	62			
<b>Localização</b>	Endereço	7	<b>Cancro</b>	1ºs Sinais	65
	Tipo habitação			Outro cancro	69
	Código postal	8		Linfoma na vizinhança	68
	Localidade	9		Cancro na família	60
	Concelho	10			
	Distrito	11			
<b>Agentes de risco</b>	<b>Inerentes ao animal</b>				
	Idade	5,6	Peso/condição corporal		17, 18
	Sexo	14	Nariz		20
	Castração	14	Ansiedade		26, 27
	Raça	4	Atividade física		25
	Pelo	19			
	<b>Exposições</b>				
	Água	21	Tintas/solventes		46
	Alimentação	22,24	Herbicidas		47
	Recipientes	23	Fungicidas		48
	Vacinas	61	Inseticidas		49
	Antiparasitários	62	Raticidas		50
	Carraças	63	Lixivia/amoníaco		51
	Banhos	28	Torres de alta tensão		43
	Parques Públicos	38	Períodos fora/dentro de casa		36, 37
	Ocupações	53			
	Habitação (tamanho, piso, cortinas, jardim, acessos)				31 a 35
	Poluição externa (tráfego, queimadas, área urbana/rural)				30, 39 a 42; 45
	Poluição interior (lareira, incensos, locais onde fumam)				44, 52, 58
	Tabagismo (nº fumadores, quantidade de cigarros, período, proximidade)				54 a 57, 59

Foram entrevistados 143 proprietários de cães, sendo 61 de cães com linfomas (casos) e 82 controlos. Trinta e seis animais foram considerados não elegíveis, 12 por não residirem no Distrito do Porto, 18 por terem idade inferior a quatro anos e 6 por não



terem respondido a informações sobre raça, sexo e/ou idade. Para análise final restaram 113 animais, sendo 55 casos e 58 controlos. As tabelas 4.3.3, 4.3.4 e 4.3.5 apresentam os resultados descritivos das variáveis quantitativas idade e peso, das variáveis categóricas sexo e situação reprodutiva e resultados relativos a varável raça, respetivamente. As tabelas 4.3.6 e 4.3.7 apresentam os resultados da análise univariada no domínio relativo às características inerentes ao animal e exposições, respetivamente.

**Tabela 4.3.3–** Análise descritiva das variáveis idade e peso.

Grupo	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Mediana	IC 95% média		mín	máx	P
<b>Idade</b>										
Linfoma	55	9,60	3,23	0,44	10,00	8,71	10,49	4	16	0,163
Controlo	56	8,63	3,97	0,52	8,00	7,58	9,68	4	20	
<b>Peso</b>										
Linfoma	48	28,25*	13,95	2,01	30,00	24,19	32,30	10,0	60,0	0,034
Controlo	48	22,10	14,10	2,03	23,00	18,01	26,19	2,00	58,0	

(\* p<0.05)

**Tabela 4.3.4 –** Análise descritiva das variáveis sexo e situação reprodutiva.

	Fêmeas	Machos	Total
<b>Sexo</b>			
Linfoma	25	30	53
Controlo	28	30	60
<b>Situação reprodutiva</b>			
Linfoma			
Inteiros	11	24	35
Castrados/esterilizados	14	6	20
Controlo			
Inteiros	15	25	40
Castrados/esterilizados	13	5	18

**Tabela 4.3.5 –** Distribuição das principais raças.

SRD	Labrador	Cocker Spaniel	Boxer	Pastor Alemão	Golden Retriever	Beagle	Husky Siberiano	Castro Labreiro
Linfoma	11	4	5	2	4	2	0	2
Controlo	22	4	2	3	1	2	3	1
Total	33	8	7	5	5	4	3	3

Caniche: 1 linfoma, 1 controlo; Rottweiler: 2 linfomas; Serra da Estrela, Pitbull, Barbado da Terceira, Dálmata, Dogue de Bordeaux, Pinsher, Schnauzer, Schnauzer miniatura, Weimaraner, Bulldog francês: 1 de cada no grupo controlo; Bulldog inglês, Cão d'água, Dogue alemão, Rafeiro alentejano, Shar-pei e Pointer: 1 de cada no grupo linfoma.

**Tabela 4.3.6 –** Análise univariada das variáveis do domínio referente as características individuais dos cães.

Variável	Nível	Casos	Controlo	p da variável*	OR	p
Idade	0-5 anos	6	17	0,075	-	-
	6-9 anos	22	21		2,97	0,050
	10-15 anos	22	15		4,15	0,012
	16-20 anos	3	5		1,70	0,054
Peso	<10kg	2	15	0,005	-	-
	10-25kg	23	19		9,08	0,002
	>25kg	28	24		8,75	0,002
Porte	Pequeno	4	15	0,042	-	-
	Médio	15	17		3,30	0,065
	Grande	33	23		5,38	0,004
Raça	SRD	11	22	-	-	-
	Boxer	5	2		5,00	0,062
	Golden	4	1		8,00	0,047
Prática de atividade física	Não <sup>(nunca)</sup>	10	5	-	2,35	0,134
	Sim <sup>(&gt;1x)</sup>	45	53		-	-

\*Qui-quadrado de Pearson

**Tabela 4.3.7 -** Análise univariada das variáveis do domínio referente as exposições.

Variável	Nível	Casos	Controlo	OR	P
Alimentação	Ração seca	49	55	2,37	0,051
	Comida caseira	19	9		
Frutas e vegetais	Não <sup>(n+r)</sup>	21	37	2,85	0,006
	Sim <sup>(o+f+td)</sup>	34	21		
Lixívia	Não <sup>(n+r)</sup>	19	30	2,03	0,066
	Sim <sup>(o+f)</sup>	36	28		
Torres de alta tensão	não	16	22	1,85	0,16
	sim	27	20		
Tabaco	não	24	33	1,70	0,15
	sim	31	25		
Fumar em toda a casa	não	46	55	3,58	0,10
	sim	6	2		
Fumar próximo ao cão	não <sup>(n+r+o)</sup>	32	45	2,04	0,11
	sim <sup>(f+td)</sup>	16	11		
Coabitante com cancro	não	46	49	2,13	0,234
	sim	8	4		

Níveis agrupados - n=nunca; r=raramente; o=ocasionalmente; f=frequentemente; td=todos os dias

Apesar de não se terem verificado diferenças significativas entre os grupos quanto aos níveis de poluição exterior e interior, os resultados evidenciaram uma diferença estatisticamente significativa ( $p=0,037$ ) entre as médias dos dois grupos para a exposição ao fumo do tabaco (tabela 4.3.8).

**Tabela 4.3.8** – Resultados do teste ANOVA para as médias de poluição externa, interna e exposição ao fumo de tabaco entre os grupos linfoma e controlo.

Grupo	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Mediana	IC 95% média		mín	máx	P
						inf	sup			
<b>Poluição externa</b>										
Linfoma	55	3,46	2,2	0,30	4,0	2,8	4,0	0	10	0,95
Controlo	56	3,40	2,7	0,37	3,5	2,7	4,2	0	14	
<b>Poluição interna</b>										
Linfoma	43	14,0	14,2	2,17	6,0	9,6	8	0	59	0,11
Controlo	52	10,1	8,9	1,23	6,0	7,7	12	0	59	
<b>Tabagismo</b>										
Linfoma	52	10,6*	13,6	1,89	5,5	6,79	14,40	0	59	0,037
Controlo	56	6,01	8,3	1,12	0,0	3,77	8,26	0	29	

\*  $p < 0,05$

Quando questionados sobre o tempo decorrido entre os primeiros sinais de doença e o diagnóstico, num total de 48 respostas 37,5% ( $n=18$ ) dos proprietários responderam apenas 1 semana, 29,2% ( $n=14$ ) responderam 1 mês, 14,6% ( $n=7$ ) responderam 2 semanas, 8,3% ( $n=4$ ) responderam 2 meses, 6,3% ( $n=3$ ) mais de 6 meses, e 4,2% ( $n=2$ ) responderam 3 e 6 meses.

#### 4.3.5. Discussão

Apesar de não ter sido possível considerar este estudo como um caso-controlo pela insuficiência de respostas, os resultados evidenciaram aspetos interessantes em relação a possíveis associações a fatores de risco para os linfomas caninos no Distrito do Porto.

A primeira fase, elaboração e construção do questionário, baseou-se em dados publicados sobre o tema através de questionários epidemiológicos<sup>[35; 136; 137; 145; 172; 179; 180]</sup> aliados ao um estudo de possíveis fatores de risco descritos para o linfoma em humanos e em cães.

A inserção de 67 questões pretendeu não só abranger todos os fatores potenciais, mas também permitir uma verificação dos dados fornecidos, para maior robustez do estudo. Este objetivo foi igualmente reforçado através do domínio “*força das respostas*” incluindo questões que, durante a fase de elaboração e testes, demonstrou serem necessárias para possibilitar a verificação da precisão das respostas. Como exemplos, a variável “proximidade” permitiu perceber até que ponto a pessoa que estava a responder tinha conhecimento dos hábitos do cão e as características inerentes ao local de residência. A origem e idade de aquisição do cão assim como a duração de residência no local indicado foram importantes para validar as exposições.

De entre todos os métodos de fornecimento do questionário, a rapidez de resposta foi superior quando este foi disponibilizado *online*. Apesar de permitir um acesso sem restrições de tempo e lugar, a análise das questões respondidas por este método mostrou que 77% das pessoas que iniciaram as repostas desistiram de responder antes de terem completado todo o questionário. O método que se mostrou mais ineficaz foi a disponibilização pelo correio, em que apenas um questionário, entre 17, regressou preenchido. A entrevista por telefone mostrou ser eficaz principalmente com os intervenientes que não têm acesso às tecnologias de informação e sobretudo pelo facto de ter sido apenas uma pessoa a realizar as entrevistas.

Devido ao limitado tamanho amostral, o critério de emparelhamento passível de ter sido realizado foi excluir os animais com idades inferiores a quatro anos do grupo controlo.

Infelizmente, não foi possível realizar-se a validação do questionário através da avaliação da consistência interna, que exige um tamanho amostral muito superior ao deste estudo.

Os resultados são apresentados de seguida de acordo com as categorias e domínios.

➤ **Características inerentes ao animal:**

- Idade - Os cães com linfoma apresentaram uma idade média superior (9,6 anos) aos cães do grupo controlo (8,6) sendo os cães com idades superiores a 5 anos os que apresentam o maior risco de desenvolvimento de linfomas estando ambos os resultados de acordo com a literatura<sup>[8; 11; 68; 145]</sup>.
- Sexo – Apesar de a maioria dos cães serem machos, não se verificaram diferenças significativas com o grupo controle, o que está de acordo com a literatura<sup>[8; 12]</sup>. Neste estudo não foram também encontradas diferenças entre animais castrados/esterilizados e inteiros.

- Peso e Porte – Os cães com linfoma apresentaram um peso médio superior aos cães do grupo controlo. O peso acima dos 10 kg foi o principal fator de risco (OR=8,89) neste estudo, tal como já referido em estudos anteriores<sup>[23]</sup>. Esses dados foram confirmados pelo facto de os casos serem mais prevalentes nos animais de grande porte (OR=5,38), enquanto os animais de porte pequeno apresentaram uma menor prevalência (OR=0,23).
- Raça –A análise univariada revelou que os cães sem raça definida (SRD) e da raça Husky Siberiano apresentaram um efeito de proteção em relação ao desenvolvimento de linfomas, enquanto que os cães da raça Golden Retriever e Boxer apresentaram um maior risco. A raça Boxer emergiu em quase todos os estudos publicados como sendo uma raça geneticamente predisposta ao desenvolvimento de linfoma<sup>[74; 117; 119; 121]</sup>, enquanto os estudos mais recentes evidenciaram uma maior incidência nos cães da raça Golden Retriever <sup>[118]</sup>.
- Atividade física – A falta de prática de exercício físico emergiu como um potencial fator de risco para desenvolvimento de linfoma canino (OR=2,356, p=0,135). Conclusões semelhantes foram determinadas em seres humanos, onde a prática de exercício físico, tanto recreacional<sup>[181]</sup> como intensa<sup>[182]</sup> diminui o risco de LNH.

#### ➤ **Exposição**

- Alimentação – Em contradição com os estudos sobre a relação entre a ingestão de frutas e vegetais crucíferos são um fator de proteção para o LNH<sup>[158]</sup> verificou-se, na nossa amostra, que a ingestão de frutas está significativamente associado ao desenvolvimento da doença (OR=2,85, p=0,006). De notar, no entanto, que a maior parte dos proprietários que fornece este tipo de alimentos também alimenta os seus cães com comida caseira, hábito que demonstrou igualmente uma associação com o desenvolvimento de linfomas (OR=2,37, p=0,05). Nos seres humanos alguns estudos evidenciaram que uma dieta com altos níveis de gordura-*trans*, principalmente nos homens, está associada a um aumento do risco de LNH<sup>[150; 183]</sup>. É possível, portanto, que sejam os teores deste tipo de gordura em dietas caseiras e não a ingestão de frutas que explicam a associação encontrada. O esclarecimento desta questão requer aumentar o tamanho amostral, de preferência com animais sujeitos a alimentação por ração associada à ingestão de frutas.
- Produtos químicos – De entre todos os produtos químicos investigados, incluindo herbicidas, inseticidas, raticidas e amianto, apenas o uso de lixívia apresentou

uma associação com o desenvolvimento de linfoma, ainda que não significativa ( $p=0,06$ ). O hipoclorito de sódio, constituinte primordial da lixívia, é considerado seguro e não carcinogénico embora a sua utilização possa originar a formação de compostos orgânicos voláteis (COVs) que, quando inalados, têm efeitos carcinogénicos<sup>[184]</sup>. A maior proximidade do solo e os hábitos farejadores dos cães podem contribuir para uma maior exposição aos COVs.

- Habitação – O princípio subjacente às questões sobre a presença de alcatifas, cortinas e tapetes foi o seu potencial para a acumulação de poluentes interiores que lhes poderá conferir um efeito potenciador da exposição a estes compostos. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH) são uma classe de químicos oriundos da combustão incompleta de materiais orgânicos cujas principais fontes são veículos, incineração de lixo, combustão de madeira (p. ex. lareiras) e fumo de tabaco<sup>[20]</sup> que têm sido associados a maior risco de LNH em humanos<sup>[134], [185]</sup>.
- Hábitos tabágicos – Apesar do fumo conter substâncias comprovadamente carcinogénicas e ser extensivamente estudado, a maioria dos estudos epidemiológicos não suporta uma associação forte entre fumar e maior risco de desenvolvimento do LNH geral, sugerindo uma correlação positiva apenas ao LNH folicular<sup>[186]</sup>. Os resultados deste estudo evidenciam o risco de tabagismo secundário, assumindo o cão como um fumador passivo e evidenciando um risco 8 vezes superior (fumar sempre próximo ao cão;  $p=0,02$ ) e o risco do tabagismo terciário, quando do risco ser 3 vezes maior para os que fumam em toda a casa ( $p=0,11$ ). Os resultados da análise univariada e do nível de tabagismo sugerem que não só o fator de condição de fumador (sim/não) mas também a intensidade (número de pessoas e cigarros), os locais e a proximidade ao cão devem ser levados em conta em estudos futuros. Fato esse que foi também evidenciado no capítulo 4.1 com o artigo publicado.
- Proximidade a torres de alta tensão – Foram publicados estudos que sugerem um maior risco de leucemia linfoblástica em crianças que residem a menos de 500 metros de distância de uma torre de alta tensão<sup>[187; 188]</sup>. Em Portugal ainda existem torres de média e alta tensão em zonas residenciais, por vezes no próprio jardim das casas de habitação, sem nenhuma barreira física de proteção (e.g. árvores) do campo magnético por elas gerado. Neste estudo encontramos uma maior probabilidade, embora não significativa, de incidência de linfoma em cães residentes a menos de 1 km de torres de alta tensão.

### ➤ **Cancro em coabitantes**

Um dos pontos interessantes do estudo relaciona-se com uma possível associação entre presença de neoplasia nos cães e humanos que coabitam na mesma residência. Por se tratar de uma questão sensível um valor estatístico de p de 0,23 foi levado em consideração.

#### **4.3.6. Conclusão**

A grande extensão do questionário deveu-se à preocupação em englobar os vários fatores anteriormente relacionados com o risco de linfoma, tanto em seres humanos como em animais de companhia. Alguns fatores intrínsecos confirmaram os dados da literatura, incluindo o peso, porte, idade e raça, enquanto a análise de fatores extrínsecos, como a ingestão de comida caseira, a utilização de lixívia e a residência na proximidade de torres de alta tensão, ainda que não conclusiva, aponta para a necessidade de um maior esclarecimento sobre o seu papel. De salientar os dados interessantes sobre a associação entre os hábitos tabágicos e linfoma canino, que não se limitaram à dicotomia dono fumador/ não fumador, mas se estenderam ao nível de tabagismo em todas as suas vertentes.

#### **4.4. CAPÍTULO IV - Distribuição Espacial do Linfoma Não-Hodgkin humano e canino no Grande Porto.**

##### **4.4.1. Considerações Gerais**

Como um dos objetivos maiores desta tese, no âmbito da oncologia comparada, este capítulo descreve o trabalho realizado para a comparação dos linfomas não-Hodgkin humanos e caninos na área do Grande Porto, incluindo a sua caracterização, aspetos de epidemiologia descritiva, riscos padronizados pela idade, e distribuição geográfica para ambas espécies.

Esta parte dos trabalhos foi convertida num artigo científico submetido à revista científica *Veterinary Journal*, que se reproduz a seguir.

#### **Comparative longitudinal and geographical study of human and canine non-Hodgkin lymphoma – A One Health perspective**

**Pinello, KC**<sup>1</sup>; Niza-Ribeiro, J<sup>2-3</sup>; Fonseca, L<sup>4</sup>; de Matos, AJ<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Department of Veterinary Clinics - ICBAS – University of Porto

<sup>2</sup> Department of Population Studies – ICBAS – University of Porto

<sup>3</sup> EPIUnit – Institute of Public Health – ISPUP – University of Porto

<sup>4</sup> Mapis - Mapping Intelligent Solutions – Porto

<sup>5</sup> Animal Science and Study Centre - CECA, Food and Agrarian Sciences and Technologies Institute, University of Porto

##### **Abstract**

Lymphoma is one of the most common neoplasms in dogs and its increasing frequency follows a human oncology trend in which non-Hodgkin's lymphoma (NHL) represents 5% of all new cancer cases, being one of the top five causes for cancer-related deaths. Companion animals' epidemiological studies have been increasing, defining dogs as sentinels of potential risk factors for human health, mainly due to shared environments, shorter disease latencies, and spontaneous disease. The aims of this study were to describe human and canine NHL epidemiologic features; to better understand the similarities between them; and to investigate a possible geographical association between the incidence risks in the larger area of Porto – Greater Porto, in northwestern Portugal.

The postal codes of human NHL patients diagnosed between 2005 and 2010 and residing in Greater Porto, Portugal, were obtained from the Regional Cancer Registries (RORENO and ROR-Centro). Available data from canine lymphomas diagnosed from 2005 to 2016 from several veterinary centers were also collected. Descriptive



epidemiology, mapping cases, and age standardized risks of NHL incidence (ASR) were calculated for both species.

The results showed a higher risk ( $p < 0.05$ ) of NHL in men (ASR - men:18.1; women:14.2 cases/100 000hab) and in male dogs (ASR - males:8.2; females:7 cases/10 000dogs). The geographical distributions of human and canine ASR were well correlated ( $r=0.664$ ,  $p < 0.05$ ). The highest values for human and canine ASR and risk ratios were detected in the same urban municipalities of Greater Porto: Porto, Matosinhos and Maia.

These findings suggest the existence of exposure similarities and strengthen the relevance of cancer surveillance in pet animals as efficient tools to predict health hazards for humans.

## **Introduction**

Cancer is among the commonest causes of death worldwide, particularly in high-income countries (Fitzmaurice et al., 2017), and exposure to environmental carcinogens is considered to be responsible for 2.4 million new human cancer cases each year (OMS, 2011; Ontario, 2016). The increasing incidence of Non-Hodgkin Lymphoma (NHL) in the past decades, both in humans and companion animals, brought up a worldwide concern for this disease. While the incidence and mortality of most neoplasms are decreasing (Muller et al., 2005), human NHL (human-NHL) still represents 3% of all new cancer cases (Ferlay et al., 2015), being one of the top five causes for cancer-related deaths (Siegel et al., 2016), with an age-standardized rate (ASR) of 5.1 cases per 100 000/habitants (Ferlay et al., 2015). Canine lymphomas (canine-NHL) follow a similar trend by being the third most commonly diagnosed tumors in small animal veterinary practice (Ruple et al., 2016) and representing 83% of the canine hematopoietic neoplasms (Vail et al., 2012).

As in human-NHL, canine-NHL are more prevalent in males (Vail et al., 2012; Villamil et al., 2009) reaching an estimated annual incidence of 84 per 100 000 dogs in the 10 to 11 years-old group (Vail et al., 2012). Furthermore, the diffuse large B-cell lymphoma is the most common subtype in both species (Ito et al., 2014).

Portugal locates in the extreme south-western Europe, with nearly 10 million inhabitants (Fundação Francisco Manuel dos Santos, 2016) (RORENO, 2016) and the 10th highest incidence rate of human-NHL amongst the 27 European countries (EUCAN, 2012). In 2015, it was estimated that the country contained 6.7 million pet animals, 38% being dogs, and that there was at least one pet animal in 54% of the households (Costa, 2015). In the District of Porto, situated in the northwest region of Portugal, the standardized incidence rate of human-NHL in 2010 was 20 and 13.3 cases per 100 000 inhabitants for men and women, respectively (RORENO, 2016). In most developed

countries, such as Portugal, people and companion animals share lifestyles and environments (Chandler et al., 2017).

As dogs share indoor and outdoor environments with humans, they may be considered as sentinels for human hazards (Reif, 2011; Shan Neo and Tan, 2017). Furthermore, canine-NHL occurs spontaneously in animals with biologically compressed lifespans allowing them to develop cancer more rapidly than humans (Shan Neo and Tan, 2017), thus providing an “early warning” for public health intervention (Reif, 2011), a crucial advantage of its surveillance (Gavazza et al., 2001; Ito et al., 2014; Marconato et al., 2013; Momanyi, 2016; Takashima-Uebelhoer et al., 2012; Zanini et al., 2013).

The mapping of diseases describes their spatial distribution, aiming to detect geographical variations and associations that may help in the identification of risks; allocation of preventive or therapeutic resources; and to raise etiological hypotheses (Santos, 2007).

Environmental health hazards derive from both natural and unnatural contaminants in air, water, soil or food, that may lead to acute or chronic health problems (Hazards, 1991). The etiology of lymphoma is probably multifactorial, including environmental factors, and remains elusive in spite of extensive research (American Cancer Society; Muller et al., 2005; Vail et al., 2012).

Thereupon, and integrated into the larger “One Health” perspective, related to the ever linkage of the well-being and health of humans, animals and the ecosystems (Zinsstag et al., 2011), we hypothesized that a comparative epidemiological study of the NHL geographical association between dogs and humans could help in revealing shared potential environmental etiologic factors.

The aims of this study were to describe human and canine NHL epidemiologic characteristics; to better understand their similarities; and to investigate a possible geographical association between them in the region of Greater Porto in northern Portugal.

## **Material and Methods**

### Study area

The study was performed in Greater Porto (figure 1), a part of the sub-region called Metropolitan Area of Porto, located in the Northwest of Portugal, with a total population of 1,287 282 habitants <sup>[19]</sup>. Greater Porto has nine municipalities: Espinho (ESP), Gondomar (GDM), Maia, Matosinhos (MAT), Porto (POR), Póvoa de Varzim (POV), Valongo (VAL), Vila do Conde (VLC) and Vila Nova de Gaia (VNG). We considered this spatial unit as the reference to assess risk and spatial clusters.

### Study population

Data from human-NHL diagnosed from 2005 to 2010 were obtained from the North and Central Region Cancer Registry of Portugal (RORENO and ROR-Centro). The data included age, gender, residential postal code, date of the diagnosis, tumors' topography and morphology (CID-O-3). Human-NHL were categorized by the phenotype's information (B or T), when available. The human population data were extracted from the Portuguese Census 2011 from National Institute of Statistics – INE.

Data from canine lymphomas were collected in the following veterinary centers: Veterinary Hospital of University of Porto – UPVet; Veterinary Cytology Service and Laboratory of Animal Pathology from ICBAS-UP; Veterinary Diagnostics Center – CEDIVET; Laboratory of Animal Health and Food Safety - SEGALAB; National Institute of Veterinary Investigation – INIAV; Veterinary Hospital Centre - CHV; Porto Veterinary Hospital - HVP and Montenegro Veterinary Reference Hospital. Data pertained to diagnoses obtained between 2005 and 2016 in the mentioned veterinary centers included age, sex, breed, size (breed standard or dog weight in mongrels), date of diagnosis, diagnostic method (cytology, histopathology or necropsy), classification and immunophenotype (when available). Data source for the canine population was the national microchip identification database (SICAFE) from Direcção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), the Portuguese National Authority for Animal Health.

Both human-NHL and canine lymphomas were topographically categorized into six anatomical sites to allow for comparisons between both species - nodal; gastrointestinal/alimentary; bone marrow/leukemic; skin; mediastinal; extra nodal (e.g. nervous and genitourinary systems; heart, eye, bone; ear canal, mammary gland).

The study was approved by the bioethics body for animal welfare (ORBEA) of the Institute of Biomedical Sciences of Abel Salazar-University of Porto (ICBAS-UP).

### Data and spatial analysis

Data regarding the global Greater Porto and its municipalities' human and canine-NHL cases was used to calculate age standardized risks (ASR). For humans, the number of NHL cases per 100 000 inhabitants was age-adjusted, while for dogs, ASR were calculated as the number of canine lymphoma cases per 10 000 dogs. Dog sizes were grouped into categories, according to their breed standard or weight (in mongrels), as: small (<11kg); medium (11-23kg); large (23.1-40kg) and giant (>40kg).

To study the potential geographic association between human- and canine-NHL, maps of spatial distribution of cases were performed. The ArcGIS® software was used on updated maps of the municipalities and data from human-NHL were georeferenced on the basis of the postal codes (seven digits) that represented the smallest geographic

code-sections, as well as the wider ones (four digits) that represented the parishes. Data from canine-NHL were georeferenced on the basis of the owners' addresses, as registered in the veterinary centers, or the addresses of the original veterinary centers in referred cases.

### Statistical analysis

The Z-test for the difference of proportions (two-sided, 5% level of significance) was performed for gender, size and breed, tumor immunophenotype and topography. The T-test was used to calculate statistical differences between the mean ages. Age-standardized incidence risks (ASR) were calculated for each municipality both for human and canine data using a standardization factor (SF). SF was calculated as a ratio of observed and expected NHL cases. Thus, a SF below one means a higher ASR than the general Greater Porto's ASR. Associations between human- and canine-NHL ASR, assessed at the municipality level using Pearson's correlations, and a p-value less than 0.05 were considered significant.

## **Results**

### Characteristics of the human-NHL population at Greater Porto

A total of 1242 human-NHL cases were included in the study. There was a statically significant predominance of men (53.4%,  $p=0.017$ ) that presented a higher relative risk (OR=1.27;  $p<0.001$ ; CI:1.14;1.42). However, in the elderly group (>75 years old) the number and percentage of women surpassed men (table 1), although the difference was not statically significant. Men also presented a younger mean age at diagnosis than women (59.89 vs 63.58 years old, respectively) ( $p<0.001$ ). Although there was no information of the immunophenotype in 360 (29.9%) cases, the majority (85.6%;  $n=755$ ;  $p<0.05$ ) was of the B-cell phenotype, predominant in all age groups with the exception of young patients (0 to 14 years old), and in all anatomical sites with the exception of cutaneous lymphomas.

Topographically, lymph nodes were the most commonly affected organs as showed in table 1. Men were also significantly more affected by bone marrow ( $p=0.009$ ), cutaneous ( $p=0.002$ ) and nodal T-cell NHL ( $p=0.05$ ). The mean age in years of mediastinal cases was statistically lower, both in the general population (42.5 y.o;  $p=0.001$ ) and particularly in men (37.7 y.o;  $p=0.006$ ). With the exception of bone marrow and splenic locations, women tended to be older at diagnosis in all locations, with statistically significant differences in nodal ( $p<0.001$ ) and cutaneous NHL ( $p<0.05$ ).

Greater Porto presented an ASR of 16.1 cases/100 000 habitants (18.1 for men and 14.2 for women), with the higher value in the group older than 75 years (55.8 and 40.8 for men and women, respectively).

#### Characteristics of canine-NHL population

From a total of 504 canine-NHL in Greater Porto, the majority (387- 76.8%) were diagnosed by cytology; 101 (20%) using histopathology; 13 (2.5%) by necropsy; and 4 (0.8%) by means of cytology followed by histopathology.

As in human-NHL, males predominated (56.1%;  $p=0.013$ ), although no significant age differences were determined (table 2). The male prevalence increased in parallel with age, reaching significance in animals older than 9 years, in opposition to humans where women tended to prevail in older groups (tables 1 and 2). Dogs followed the same trend towards a B-cell phenotype prevalence, although not as marked as in humans (55% vs. 85.6%). Moreover, in contrast to humans, the proportions of B and T phenotypes were not statistically different in both genders. In both species, cutaneous NHL was the exception to the B phenotype prevalence. Finally, aging had dissimilar effects in humans and dogs.

The breed distribution of our series (table 2) is similar to previous studies (Edwards et al., 2003; Ponce et al., 2010b; Priester, 1967; Vail et al., 2012; Valli, 2015; Valli et al., 2013), with mongrels being the most common (30.5%), followed by Labrador Retrievers and Boxers, the latter, as previously described (Ito et al., 2014; Priester, 1967), more affected by T-cell than B-cell NHL. Rottweilers, the fourth most common breed, showed the youngest mean age (7.4 years old;  $p=0.0003$ ) while Golden Retrievers presented a significantly older mean age at diagnosis ( $p=0.04$ ), also observed in mongrels ( $p<0.001$ ), when compared with the total population.

Concerning the grouped sizes, large and giant dogs were statistically more represented (62.7%) and significantly younger at diagnosis than small/medium breed dogs (8.5 vs. 9.5 years old;  $p=0.018$ ). Small and medium dogs showed significantly more B-cell lymphomas (71.4%,  $p=0.028$ ) than large and giants ones (table 2).

Similar to humans, the nodal form was predominant (80.4%), particularly in males (55%,  $p=0.047$ ). The oldest mean age was determined in extranodal forms while the youngest was in the cutaneous lymphomas.

Dogs of the Greater Porto area presented an ASR of 7.63 cases/10 000 dogs (8.2 for males and 7.0 for females). Males presented the highest value for ASR at age level older than 16 years old, while females showed a peak of risk at age level of 11 to 15 years old (table 4).

**Table 1 - Characteristics of human-NHL cases among residents in Greater Porto, diagnosed from 2005 to 2010.**

	Gender (%)			Mean Age (SD)			Immunophenotype (%)#					
	Total	Men	Women	Total	Men	Women	B-cell			T-cell		
							Total	Men	Women	Total	Men	Women
	1242	664* (53.4)	578 (46.6)	61.61 (15.97)	59.89 (16.44)	63.58** (15.19)	755** (85.6)	391 (51.7)	364 (48.2)	127 (14.4)	83** (65.3)	44 (34.6)
<b>Age group</b>												
0-14	8(0.6)	7(87.5)	1(12.5)	7.2(3.8)	7.4(4.1)	5.4(0)	4(50)	3(75)	1(25)	4(50)	4(100)	0
15-24	13(1.1)	9(69.2)**	4(30.8)	20.4(2.5)	20.4(2.4)	20.3(3)	8(80)	4(50)	4(50)	2(20)	2(100)	0
25-64	645(52)	374(58)**	271(42)	51(10.3)	50.8(10.6)	51.2 (9.8)	395(86)**	223(56.4)	172(43.6)	64(14)	40(62.5)	24(37.5)
65-74	307(24.7)	155(50.5)	152(49.5)	70.1(3.0)	70.1(3.0)	70(2.9)	179(85.2)**	89(49.7)	90(50.3)	31(14.8)	24(77.4)*	7(22.6)
>75	269(21.6)	119(44.2)	150(55.7)	80(4.1)	81(4.2)	80.9(3.4)	169(71.3)**	72(42.6)	97(57.3)	26(28.7)	13(50)	13(50)
<b>Anatomical site</b>												
Nodal	646(52)	329(50.9)	317(49.1)	61,2(16.1)	58,5(16.7)	64,0(15)**	398(91.4)**	200(50.2)	198(49.8)	37(8.5)	25(67.5)*	12(32.5)
Aliment.	170(13.7)	90(53)	80(47)	62,6(14.9)	62,0(14.4)	63,2(15.4)	129(97.7)**	70(54.3)	59(45.7)	3(2.2)	2(66)	1(33)
BM	151(12.2)	92(61)**	59(39)	65,6(13.2) <sup>§</sup>	66,7(12.4)	63,8(14.3)	87(86.1)**	49(56.3)	38(43.7)	14(13.9)	11(78.5)	3(21.5)
Extran.	115(9.2)	63(54.8)	52(45.2)	60,4(16.8)	59,5(17.6)	61,5(15.9)	80(95.2)**	39(48.7)	41(51.3)	4(4.8)	3(75)	1(25)
Skin	111(8.9)	67(60.3)*	44(39.7)	60,3(16.8)	57,8(16.7)	64,1(16)*	19(22)	14(73.7)	5(26.3)	68(78)**	41(60.3)	27(39.7)
Splenic	32(2.6)	13(40.6)	19(59.4)	64,5(10) <sup>§§</sup>	62,30(9.6)	66,0(10.4)	28(100)**	11(39.3)	17(60.7)	0	0	0
Mediast.	17(1.4)	10(58.8)	7(41.2)	42,5(23) <sup>§§</sup>	37,7(25.6)	49,3(20.4)	14(93.3)	8(57.1)	6(42.9)	1(6.7)	1(100)	0

Differences in line \*: Differences in column <sup>§</sup>; \* p<0.05; \*\*p<0.01; #n=882. Anatomical site: Nodal: lymph nodes; aliment.: gastrointestinal; BM: Bone marrow; Extran.: extranodal ; Skin: cutaneous; Mediast.: mediastinal.

**Table 2.** Characteristics of **canine-NHL cases** diagnosed from 2005 to 2016 in Greater Porto.

	Sex - n(%)			Mean Age (SD)			Immunophenotype n(%)					
	Total (%)	Male	Female	Total	Male	Female	B-cell			T-cell		
							Total	Male	Female	Total	Male	Female
	504	280(56.1)*	224(43.8)	9.0(3.55)	9.11(3.55)	8.87(3.54)	58(55)	32(55.2)	26(44.8)	39(45)	21(53.8)	18(46.2)
<b>Most common Breeds</b>												
Mongrel	154(30.5)	89(57.8)	65(42.2)	10.7(3.6) <sup>§§</sup>	10.8(3.7)	10.6(3.4)	17(68)	6(35.3)	11(64.7)	8(32)	5(62.5)	3(37.5)
Labrador	46(9.1)	27(58.7)	19(41.3)	9.5(3.2)	9.9(3.0)	8.9(3.5)	3(42.9)	2(66.7)	1(33.3)	4(57.1)	2(50)	2(50)
Boxer	36(7.5)	18(50)	18(50)	8.4(3.6)	9.2(3.9)	7.7(3.1)	3(37.5)	2(66.7)	1(33.3)	5(62.5)	2(40)	3(60)
Rottweiler	35(6.9)	21(60)	14(40)	7.4(2.2) <sup>§§</sup>	7.5(1.9)	7.2(2.6)	3(60)	3(100)	0	2(40)	2(100)	0
Cocker Sp	30(5.9)	17(56.7)	13(43.3)	9.5(3.7)	9.9(4.1)	9(3.1)	6(75)	3(50)	3(50)	2(25)	0	2(100)
Golden Ret	23(4.5)	13(56.5)	10(43.5)	10.1(2.3) <sup>§</sup>	10.4(2.1)	9.7(2.6)	3(75)	3(100)	0	1(25)	0	1(100)
German Sh	22(4.3)	13(59)	9(41)	9(3.2)	8.6(2.8)	9.4(3.7)	1(50)	0	1(100)	1(50)	1(100)	0
<b>Dog Size</b>												
Small	36(10)	18 (50)	18 (50)	11 (3.3)	10.9 (3.1)	11.1 (3.7)	6 (66.7)	3 (50)	3 (50)	3 (33.3)	1 (33.3)	2 (66.7)
Medium	97(27)	56 (57.7)	41 (42.3)	8.9 (3.7)	9.2 (3.8)	8.5 (3.6)	19 (68)	11 (58)	8 (42)	9 (32)	6 (66.7)	3 (33.3)
<b>S + M</b>	133(37.2)	74(55.6)	59(44.3)	9.5(3.7)	9.6(3.7)	9.3(3.8)	25(71.4)*	14(56)	11(44)	10(28.6)	6(60)	4(40)
Large	201(56.3)	111 (55.2)	90 (44.8)	8.8 (3.0)	9.1 (2.9)	8.4 (3.2)	21(56.7)	11 (57)	9(42.8)	16(43.2)	8 (50)	8 (50)
Giant	23(6.4)	13 (56.5)	10 (43.5)	6.5 (2.2)	6.9 (2.5)	6.1 (1.7)	1 (20)	1 (100)	0	4 (80)	3 (75)	1 (25)
<b>L + G</b>	224(62.7) <sup>§§</sup>	124(55.3)	100(44.7)	8.6(3.0) <sup>§</sup>	8.9(2.9)	8.2(3.2)	21(51.2)	12(57)	9(43)	20(48.7)	11(55)	9(45)
<b>Age group</b>												
0 – 4 years	36(7.5)	15(41.7)	21(58.3)	3.3(0.7)	3.4(0.8)	3.3(0.6)	5(71.4)	3(60)	2(40)	2(28.6)	1(50)	1(50)
5 – 9 years	207(43.3)	112(54.1)	95(45.9)	7.2(1.3)	7.2(1.4)	7.2(1.2)	22(50)	11(50)	11(50)	22(50)	12(54.5)	10(45.5)
>9 years	235(49.2)	135(57.4)*	100(42.6)	12.4(2.1)	12.3(2.3)	12.4(2)	27(67.5)*	14(51.9)	13(48.1)	11(27.5)	7(63.6)	4(36.4)
<b>Anatomic site</b>												
Nodal	403(80.4)	222(55)*	181(45)	9.4(3.4)	9.6(3.4)	9.1(3.5)	38(64.6)*	22(57.9)	16(42.1)	21(35.4)	11(52.4)	10(47.6)
Alimentary	57(11.38)	30(52.6)	27(47.3)	9.7(3.3)	9.9(3.5)	9.5(3.1)	17(56.7)	8(47.1)	9(52.9)	13(43.3)	7(53.8)	6(46.2)
Skin	28(5.6)	18(64.2)	10(35.7)	8.7(3.5)	8.2(3.9)	9.6(2.7)	3(42.8)	2(66.7)	1(33.3)	4(57.2)	3(75)	1(25)
Extranodal	6(1.2)	4(66.6)	2(33.3)	10.3(4.5)	11.2(4.2)	8.5(6.3)	-	-	-	-	-	-
Leukemia <sup>#</sup>	5(1)	3(60)	2(40)	9.2(3.5)	10.3(0.5)	7.5(6.3)	-	-	-	1(100)	-	1(100)
Mediastinal	2(0.4)	2(100)	-	9.5(0.7)	9.5(0.7)	-	-	-	-	1 (100)	-	-

<sup>#</sup>Only blood and bone marrow involved. \* Differences in line; <sup>§</sup> Differences in column; \* p<0.05; \*\* p<0.01

Characteristics of human and canine non-Hodgkin lymphomas across the municipalities of Greater Porto

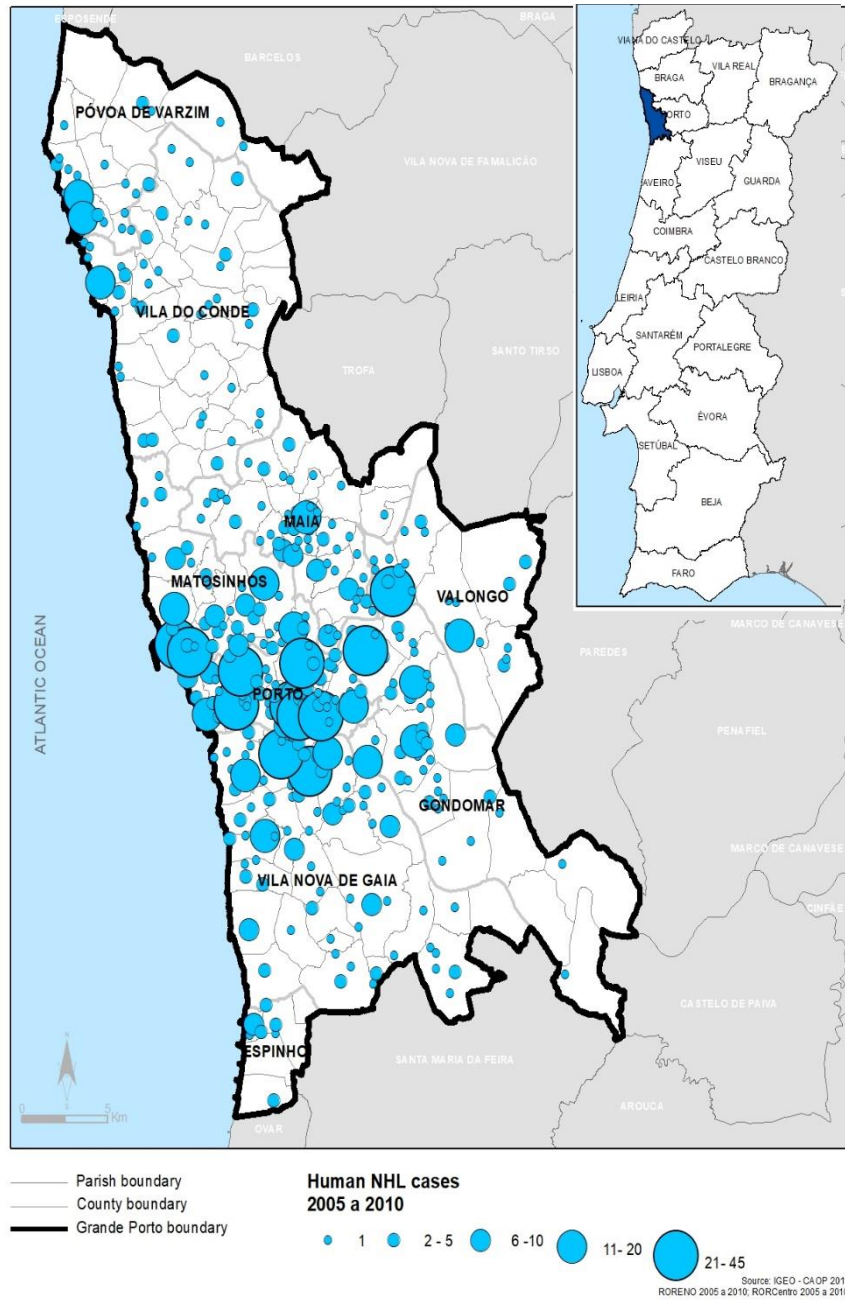
The geographical distributions of human- and canine-NHL cases were quite similar, as showed in figures 1 and 2. As displayed in table 3, the municipality of Porto presented the highest human ASR, followed by Matosinhos, Vila do Conde and Maia. The former presented the highest risks both for men (22.2) and women (18.5). Matosinhos presented the higher risk for boys and Maia for girls (0-14 y.o; 2.6 and 1.5, respectively). Gondomar presented the highest values for young men and Valongo for young women (15 to 24 y.o; 5.3 and 3.2, respectively). Porto presented the highest ASR for men and women adults (25 to 64 y.o.) and also for elderly men (65 to 74 y.o.) (22.2, 17.4 and 68.8, respectively). Vila do Conde presented the highest values for elderly women (65 to 74 y.o.; 55.9) and for men older than 75 years (104.4). Valongo had the highest ASR for women older than 75 years (63.3).

The highest canine ASR were found in the municipalities of Maia, Porto and Matosinhos (table 4), particularly males in Maia (18.6) and females in Porto (12.3). Paralleling age risks in humans, Matosinhos presented the highest ASR for male young dogs (0-2 y.o.; 1.1) and Porto for male old dogs (11 to 15 y.o.; 48.8) and elderly females (>16 y.o; 40.8).

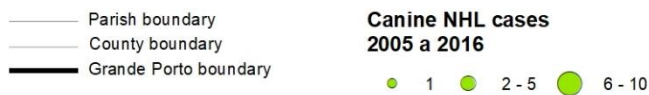
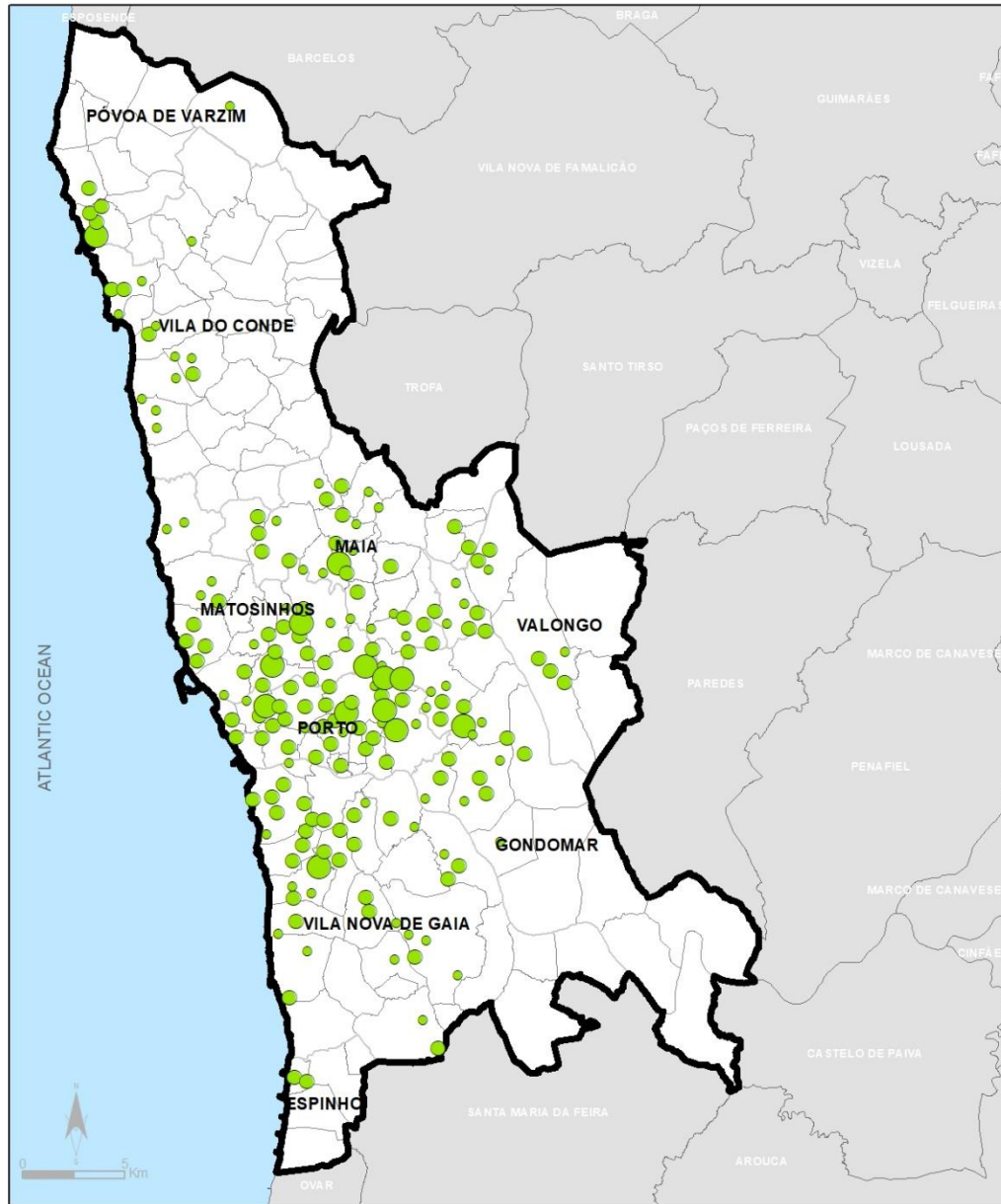
Correlation analyses revealed that there was a significant relationship between human and canine ASR per municipalities ( $r=0.664$ ,  $p=0.036$ ), including men to male dogs (0.671;  $p=0.034$ ) as well as women to female dogs (0.659;  $p=0.038$ ) (table5).



**Figure 1.** Geographic maps illustrating the spatial distribution of **human-NHL cases** across the municipalities of Greater Porto.



**Figure 2.** Geographic maps illustrating the spatial distribution of **canine-NHL cases** across the municipalities of Greater Porto.



Source: IGEU - CAOP 2011; Pinho, K. C., 2016.

**Table 3:** Human annual age-sex standardized risk (ASR) amongst the Greater Porto municipalities, 2005 to 2016 (Cases/100 000).

	ASR	age-levels						age-levels					
		Men	0-14	15-24	25-64	65-74	>75	Wom	0-14	15-24	25-64	65-74	>75
<b>Total</b>	16.1	18.1	1.2	2.1	17.6	49.0	55.8	14.2	0.2	1.0	11.6	39.6	40.8
Esp	10.5	11.1	0.0	0.0	13.7	21.1	28.6	9.9	0.0	0.0	7.2	16.9	45.4
Gdm	14.1	16.5	0.0	5.3	16.9	37.2	48.4	11.9	0.0	0.0	8.5	23.8	55.4
Maia	16.1	20.7	1.4	2.4	18.2	57.3	86.7	11.7	1.5	0.0	11.5	33.4	14.0
Mat	17.8	19.5	2.6	1.7	20.0	43.3	61.1	16.3	0.0	0.0	13.9	50.6	38.6
Porto	20.3	22.2	2.3	1.3	22.2	68.8	54.5	18.5	0.0	1.4	17.4	51.6	44.4
Pov	14.2	15.9	0.0	4.3	17.7	42.4	22.2	12.6	0.0	0.0	10.6	44.7	25.2
Val	14.5	15.9	2.1	0.0	17.7	39.3	25.7	13.2	0.0	3.2	8.1	33.5	63.3
VIC	16.5	18.2	0.0	0.0	17.2	27.8	104.4	15.1	0.0	0.0	10.6	55.9	41.6
VnG	13.7	15.6	0.7	2.0	13.6	50.0	52.8	11.9	0.0	2.1	9.8	29.9	36.4

Esp: Espinho; GDM: Gondomar; Mat: Matosinhos; Pov: Póvoa de Varzim; Val: Valongo; VIC: Vila do Conde; VnG: Vila Nova de Gaia. Wom: women.

**Table 4:** Canine annual age-sex standardized risk (ASR) amongst Greater Porto municipalities, 2005 to 2016 (cases/10 000).

	ASR	age-levels						age-levels					
		Male	0-2	3-5	6-10	11-15	>16	Fem	0-2	3-5	6-10	11-15	>16
<b>Total</b>	7.63	8.2	0.2	2.4	13.6	22.2	23.5	7.0	0.3	2.9	11.8	17.4	12.6
Esp	3.8	6.0	0.0	0.0	15.3	0.0	56.8	1.9	0.0	7.4	0.0	0.0	0.0
Gdm	4.6	5.3	0.0	2.3	9.6	4.9	29.7	3.8	0.7	1.3	5.9	12.4	0.0
Maia	13.3	18.6	0.0	7.9	36.9	31.5	42.3	8.1	0.0	1.3	15.7	21.8	9.2
Mat	10.9	10.2	1.1	3.5	12.9	32.0	34.4	11.7	0.0	4.7	15.1	34.4	34.1
Porto	12.5	12.5	0.8	0.0	18.1	48.8	33.2	12.3	0.0	3.2	20.9	29.1	40.8
Pov	8.2	8.2	0.0	0.0	16.5	12.3	50.5	8.3	0.0	4.9	12.3	17.9	23.6
Val	3.6	4.7	0.0	1.7	9.7	10.7	5.1	2.4	1.2	1.9	3.7	4.1	0.0
VIC	4.0	4.6	0.0	0.9	7.5	19.6	0.0	3.4	0.0	2.2	6.7	5.9	0.0
VnG	6.5	5.6	0.0	2.8	8.7	16.9	7.3	7.4	0.0	3.5	14.0	16.3	8.0

Esp: Espinho; GDM: Gondomar; Mat: Matosinhos; Pov: Póvoa de Varzim; Val: Valongo; VIC: Vila do Conde; VnG: Vila Nova de Gaia. Fem: female.

**Table 5 –** Pearson's correlations (r and p-value) per municipalities between Human and Canine ASR.

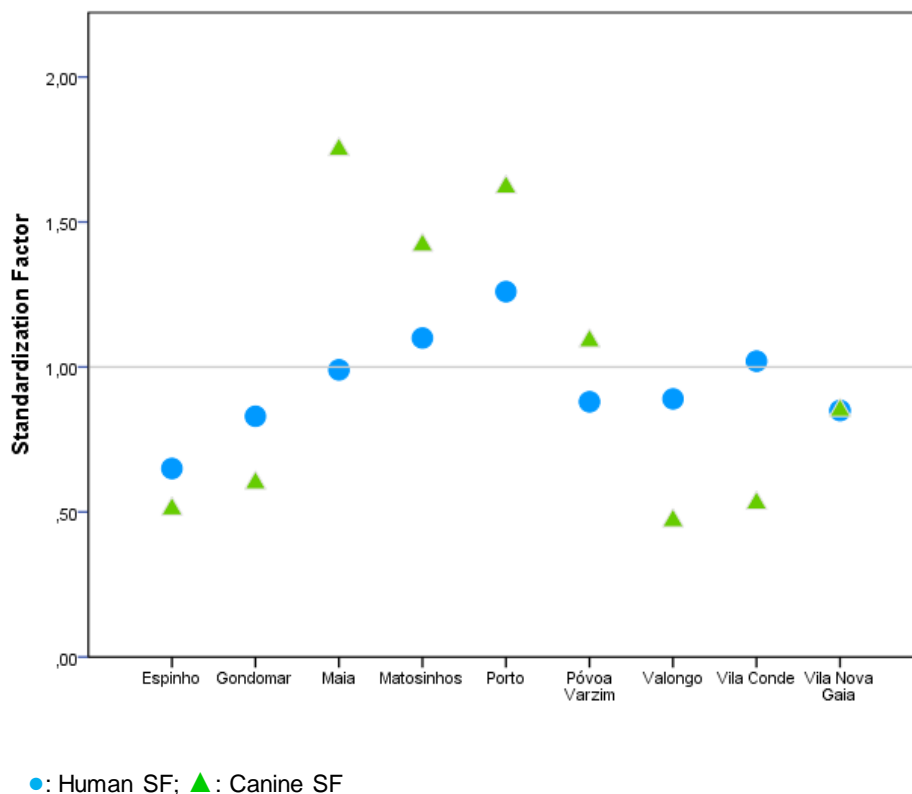
	hASR	Men	Women
<b>cASR</b>	0.664*	0.772*	0.450
p-value	0.036	0.009	0.192
<b>Male</b>	0.486	0.671*	0.204
p-value	0.154	0.034	0.571
<b>Female</b>	0.743*	0.730*	0.659*
p-value	0.016	0.019	0.038

Finally, human and canine standardization factors were correlated ( $r=0.683$ ,  $p=0.043$ ) and showed that Porto and Matosinhos had high SF to human and canine, while Maia presented a peak of value for dogs (table 6 and figure 3)

**Table 6:** Human and canine standardization factor (SF) amongst Greater Porto municipalities.

	human-SF	Men	Women	canine-SF	Male	Female
<b>Espinho</b>	0.65	0.61	0.69	0.51	0.73	0.26
<b>Gondomar</b>	0.83	0.90	0.83	0.60	0.65	0.54
<b>Maia</b>	0.99	1.14	0.82	1.75	2.27	1.15
<b>Matosinhos</b>	1.10	1.07	1.14	1.42	1.24	1.66
<b>Porto</b>	1.26	1.22	1.30	1.62	1.53	1.76
<b>Póvoa de Varzim</b>	0.88	0.87	0.88	1.09	1.00	1.18
<b>Valongo</b>	0.89	0.87	0.92	0.47	0.57	0.33
<b>Vila do Conde</b>	1.02	1.00	1.05	0.53	0.56	0.49
<b>Vila Nova de Gaia</b>	0.85	0.86	0.83	0.85	0.69	1.05

**Figure 3:** Graphic plot of human and canine standardization factor (SF) amongst the municipalities of Greater Porto.



## Discussion

To the best of the authors' knowledge, this is the first study approaching human and canine lymphomas under the "one health" perspective (Zinsstag et al., 2011). By studying the epidemiologic characteristics of human and canine NHL inhabiting the same geographic area during a similar period of time, and thus subjected to similar environmental influences, we were able to describe and compare a similar set of interestingly characteristics in both species. The analysis of the ASR distribution revealed a strong spatial correlation between species suggesting similar and comparable age and sex patterns.

The worldwide human-NHL upsurge, although affecting both genders, is predominant in men, as verified in our population (Fisher and Fisher, 2004; Muller et al., 2005). Males also predominated in dogs, although the genders' age at diagnosis were dissimilar, with men being significantly younger than women while female dogs were not significantly older than males (tables 1 and 2). When grouped by age, gender proportions revealed to be inverted in both species. While the proportion of women increased with age, the opposite occurred in dogs. One explanation for such differences may be related to hormonal influences. It has been postulated that estrogens may exert a protective effect against the development of NHL (Kane et al., 2012; Villamil et al., 2009) so early neutering of female dogs, an ever-growing trend in Portugal, may lower the age incidence of NHL and override the gender natural trends. Although it may be argued that male castration also influences the age at diagnosis, such procedure is much less common in Portugal.

It is consensual that human B-cell NHL prevails in western countries (Chihara et al., 2015; Fisher and Fisher, 2004) and our series is no exception. However, and unlike previously published canine studies (Dobson et al., 2002; Ito et al., 2014; Marconato et al., 2013; Ponce et al., 2010b; Vail et al., 2012; Valli et al., 2013), there were no significant immunophenotype differences in canine NHL. Moreover, our population

revealed a higher T-cell NHL proportion than the ones previously published in Europe (45% vs. 17–39%, respectively) (Fournel-Fleury et al., 2002; Jankowska et al., 2015; Pastor et al., 2009; Ponce et al., 2010a).

Dog breed distribution in this series is similar to previous studies (Edwards et al., 2003; Ponce et al., 2010b; Priester, 1967; Vail et al., 2012; Valli, 2015; Valli et al., 2013) Mongrels predominated (30.5%), followed by Labrador Retrievers. Boxers were affected by more T-cell than B-cell NHL, as previously described (Ito et al., 2014; Priester, 1967).

The point distribution of human- and canine-NHL cases across Greater Porto is quite similar and predominant in urban areas. Also, human- and canine-ASR were both higher in municipalities with elevated urban densities such as Porto, Maia, Matosinhos and Vila do Conde. The differences between human and canine ASR may due to, on one hand, lack of available information in some regions and, on the other, the fact that dogs have a more restricted daily mobility and lower migration frequency than people, leading to higher levels of exposure to potentially hazardous environmental factors. Considering that the accuracy of exposure assessment is a major challenge in human environmental epidemiology (Reif, 2011), it seems reasonable to assume that dogs may contribute to the early identification of risk environments with less bias than humans, strengthening their sentinel role in human health surveillance (Reif, 2011).

Results of statistical analyses strengthened our hypothesis that a comparative epidemiological study of the NHL geographical association between dogs and humans helps revealing potential environmental etiologic factors.

Similar patterns in human and animal cancer epidemiology are very likely related to environment exposures so dogs may be sensitive sentinels for the presence of such hazards (Hazards, 1991).

Canine data base has underrepresentation of the dog population which may introduce bias and affect canine ASR. Also, the location assignment at municipality level, due to

the lack of available information of the precise owner's postal code or address, may have introduced some bias to our results.

Our study strengthens the value of comparative epidemiology for better understanding human and animal cancer risks. There are many similarities between human and canine NHL, two species that increasingly share common environments. If approached together, both species provide valuable information in the complex search for the causes of cancer.

In conclusion, we evidenced a close epidemiological and geographical association between human- and canine NHL in the northern region of Portugal, reinforcing the hypothesised value of the dog as a sentinel for human oncologic epidemiology, with potential benefits for both species.

### **Acknowledgments**

The authors wish to thank all the veterinary centers and professionals involved in this study for their data contribution. We are grateful to Dr. Maria José Bento from RORENO, Joana Vasconcellos from ROR-Centro, Professor Rui Henrique from the Instituto Português de Oncologia do Porto – IPO-Porto, and Professor Ana Monteiro from Geography Department of University of Porto and the Climate, Health and Environment Research Group (CHERG). The authors are thankful for the collaboration of Professors Marta Santos and Patricia Dias-Pereira from ICBAS-University of Porto, for their contribution on the histopathology classification of canine lymphomas. And, Ana Isabel Ribeiro from ISPUP - Institute of Public Health, for the contribution on data analysis and Dr. Yolanda Vaz from DGAV for providing canine population data base.

### **Funding**

This research was supported by an international PhD fellowship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), Brazil (CSF 0342-13-0).

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest related to this study.

## References

- American Cancer Society, Cancer facts & figures, Atlanta, GA.
- Chandler, M., Cunningham, S., Lund, E.M., Khanna, C., Naramore, R., Patel, A., Day, M.J., 2017. Obesity and Associated Comorbidities in People and Companion Animals: A One Health Perspective. *J Comp Pathol*.
- Chihara, D., Nastoupil, L.J., Williams, J.N., Lee, P., Koff, J.L., Flowers, C.R., 2015. New insights into the epidemiology of non-Hodgkin lymphoma and implications for therapy. *Expert Rev Anticancer Ther* 15, 531-544.
- Costa, A., 2015. Portugal tem 6,7 milhões de animais de estimação, In: *Veterinária Atual, Portugal*.
- Dobson, J.M., Samuel, S., Milstein, H., Rogers, K., Wood, J.L., 2002. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J Small Anim Pract* 43, 240-246.
- Edwards, D.S., Henley, W.E., Harding, E.F., Dobson, J.M., Wood, J.L., 2003. Breed incidence of lymphoma in a UK population of insured dogs. *Vet Comp Oncol* 1, 200-206.
- EUCAN, 2012. Non-Hodgkin Lymphoma - Estimated incidence, mortality & prevalence for both sexes, 2012. <http://eco.iarc.fr/eucan2017>).
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F., 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136, E359-386.
- Fisher, S.G., Fisher, R.I., 2004. The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene* 23, 6524-6534.
- Fitzmaurice, C., Allen, C., Barber, R.M., Barregard, L., Bhutta, Z.A., Brenner, H., al., e., 2017. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol* 3, 524-548.
- Fournel-Fleury, C., Ponce, F., Felman, P., Blavier, A., Bonnefont, C., Chabanne, L., Marchal, T., Cadore, J.L., Goy-Thollot, I., Ledieu, D., Ghernati, I., Magnol, J.P., 2002. Canine T-cell lymphomas: a morphological, immunological, and clinical study of 46 new cases. *Vet. Pathol.* 39, 92-109.
- Fundação Francisco Manuel dos Santos, 2016. PORDATA - Base de dados de Portugal contemporâneo, Portugal.
- Gavazza, A., Presciuttini, S., Barale, R., Lubas, G., Gugliucci, B., 2001. Association between canine malignant lymphoma, living in industrial areas, and use of chemicals by dog owners. *J Vet Intern Med* 15, 190-195.
- Hazards, N.R.C.U.S.a.C.o.A.a.M.o.E., 1991. *Animals as Sentinels of Environmental Health Hazards*.
- Instituto Nacional de Estatística, Censos 2011.
- Ito, D., Frantz, A.M., Modiano, J.F., 2014. Canine lymphoma as a comparative model for human non-Hodgkin lymphoma: recent progress and applications. *Vet Immunol Immunopathol* 159, 192-201.
- Jankowska, U., Jagielski, D., Czapowicz, M., Sapierynski, R., 2015. The animal-dependent risk factors in canine T-cell lymphomas. *Vet. Comp. Oncol.* 15, 307-314.
- Kane, E.V., Roman, E., Becker, N., Bernstein, L., Boffetta, P., Bracci, P.M., Cerhan, J.R., Chiu, B.C., Cocco, P., Costas, L., Foretova, L., Holly, E.A., La Vecchia, C., Matsuo, K., Maynadie, M.,



- Sanjose, S., Spinelli, J.J., Staines, A., Talamini, R., Wang, S.S., Zhang, Y., Zheng, T., Krickler, A., InterLymph, C., 2012. Menstrual and reproductive factors, and hormonal contraception use: associations with non-Hodgkin lymphoma in a pooled analysis of InterLymph case-control studies. *Ann Oncol* 23, 2362-2374.
- Marconato, L., Gelain, M.E., Comazzi, S., 2013. The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma: a review. *Hematol Oncol* 31, 1-9.
- Momanyi, N.K.K., R.A.; Mutiga, R.E., 2016. One Health and cancer: A comparative study of human and canine cancers in Nairobi. *Int J One Health* 2, 42-57.
- Muller, A.M., Ihorst, G., Mertelsmann, R., Engelhardt, M., 2005. Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): trends, geographic distribution, and etiology. *Ann Hematol* 84, 1-12.
- OMS, 2011. Environmental and occupational cancers, Fact sheet N°350 ed.
- Ontario, P.H., 2016. Environmental Burden of Cancer in Ontario. Cancer Care Ontario, Ontario.
- Pastor, M., Chalvet-Monfray, K., Marchal, T., Keck, G., Magnol, J.P., Fournel-Fleury, C., Ponce, F., 2009. Genetic and environmental risk indicators in canine non-Hodgkin's lymphomas: breed associations and geographic distribution of 608 cases diagnosed throughout France over 1 year. *J Vet Intern Med* 23, 301-310.
- Ponce, F., Marchal, T., Magnol, J.P., Turinelli, V., Ledieu, D., Bonnefont, C., Pastor, M., Delignette, M.L., Fournel-Fleury, C., 2010a. A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. *Vet. Pathol.* 47, 414-433.
- Ponce, F., Marchal, T., Magnol, J.P., Turinelli, V., Ledieu, D., Bonnefont, C., Pastor, M., Delignette, M.L., Fournel-Fleury, C., 2010b. A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. *Vet Pathol* 47, 414-433.
- Priester, W.A., 1967. Canine lymphoma: relative risk in the boxer breed. *J Natl Cancer Inst* 39, 833-845.
- Reif, J.S., 2011. Animal sentinels for environmental and public health. *Public Health Rep* 126 Suppl 1, 50-57.
- RORENO, 2016. Registo Oncológico Nacional 2010. Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil - EPE.
- Ruple, A., Avery, A.C., Morley, P.S., 2016. Differences in the geographic distribution of lymphoma subtypes in Golden retrievers in the USA. *Vet Comp Oncol*.
- Santos, M.S.S., W.V., 2007. Introdução à Estatística Espacial para a Saúde Pública. Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Brazil.
- Shan Neo, J.P., Tan, B.H., 2017. The use of animals as a surveillance tool for monitoring environmental health hazards, human health hazards and bioterrorism. *Vet Microbiol* 203, 40-48.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A., 2016. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 66, 7-30.
- Takashima-Uebelhoer, B.B., Barber, L.G., Zagarins, S.E., Procter-Gray, E., Gollenberg, A.L., Moore, A.S., Bertone-Johnson, E.R., 2012. Household chemical exposures and the risk of canine malignant lymphoma, a model for human non-Hodgkin's lymphoma. *Environ Res* 112, 171-176.
- Vail, D.M., Pinkerton, M.E., Young, K.M., 2012. Canine lymphoma and lymphoid leukemia, In: *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, 5th ed, pp. 608-638.
- Valli, T.K., M; Bienzle, D, 2015. Hematopoietic system, In: *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals: Volume 1 (Sixth Edition)*, Ontario - Canada.
- Valli, V.E., Kass, P.H., San Myint, M., Scott, F., 2013. Canine lymphomas: association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival. *Vet Pathol* 50, 738-748.
- Villamil, J.A., Henry, C.J., Hahn, A.W., Bryan, J.N., Tyler, J.W., Caldwell, C.W., 2009. Hormonal and sex impact on the epidemiology of canine lymphoma. *J Cancer Epidemiol* 2009, 591753.

- Zanini, D., Kimura, K., Nishiya, A., Ubukata, R., Leandro, R., Brito, C., Trombetti, M., Lagoa, A., Macedo, T., Rodrigues, L., Rosendo, J., Arndt, H., Dias, R., Dagli, M., 2013. Environmental risk factors related to the development of canine non-Hodgkin's lymphoma. *Ciência Rural* 43, 1302-1308.
- Zinsstag, J., Schelling, E., Waltner-Toews, D., Tanner, M., 2011. From "one medicine" to "one health" and systemic approaches to health and well-being. *Prev Vet Med* 101, 148-156.

## **4.5. CAPÍTULO V - Comparação internacional - Porto e São Paulo.**

### **4.5.1. Considerações Gerais e Objetivos**

A análise comparativa entre distintas regiões pode constituir-se como um importante contributo para o melhor conhecimento da origem e desenvolvimento de doenças e patologias específicas. A existência de dados sobre linfoma canino na região de São Paulo-Brasil, obtidos num estudo realizado por Kimura, K.C. em 2012 na Universidade de São Paulo<sup>[173]</sup> motivou-nos a procurar dados epidemiológicos e ambientais na região do Porto e tentar estabelecer paralelismos e diferenças entre as duas áreas geográficas. Duas cidades separadas por um oceano, com culturas semelhantes, mas níveis de poluição diferentes, apresentam taxas de incidência similares embora com tipologias distintas. Poderão as explicações para estas similitudes e diferenças ser encontradas em fatores ambientais? Esta foi a pergunta que conduziu ao presente estudo.

Perante a escassez de dados epidemiológicos sobre linfomas caninos no Porto, procedeu-se a uma recolha, o mais exaustiva possível, de informação que permitisse caracterizar a doença na região, descrita no capítulo 4.

Para ser possível formular hipóteses que justifiquem os resultados obtidos e as diferenças encontradas foram estudados os principais fatores ambientais de risco.

Um dos maiores problemas ambientais do município de São Paulo é a poluição atmosférica oriunda do intenso tráfego rodoviário. Sabendo que os níveis oficialmente permitidos em São Paulo são mais elevados do que do Porto e que o volume de tráfego é inferior no Porto, foram obtidos dados sobre a qualidade do ar na região e os principais poluentes detetados, tanto em ambientes exteriores como interiores.

### **4.5.2. Materiais e Métodos**

#### **4.5.2.1. Qualidade do Ar**

##### **4.5.2.1.1. Porto**

A qualidade do ar em Portugal é monitorizada pela Agência Portuguesa do Ambiente e os dados são disponibilizados *on line* (QualAr – Base de Dados on-line sobre a qualidade do ar<sup>[40]</sup>), com base em informação recolhida pelas Comissões de Coordenação e Desenvolvimento Regional (CCDR)<sup>[189]</sup>.

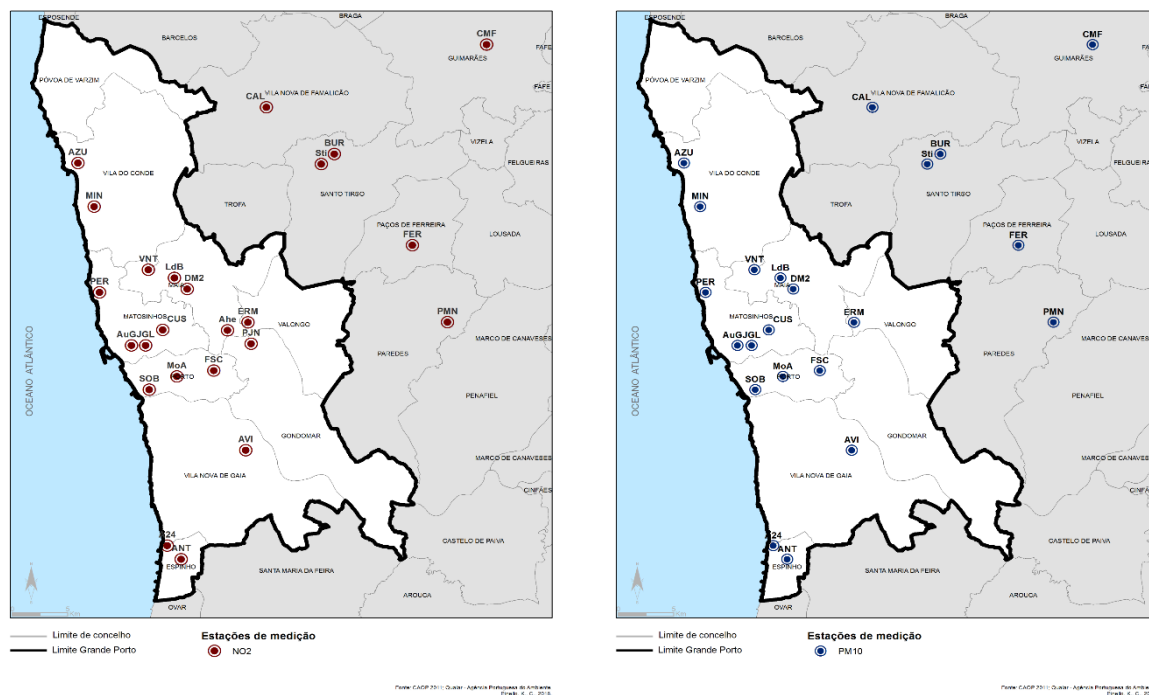
A Rede de monitorização da qualidade do ar (RMQA) da Região Norte é constituída por quatro aglomerações: Porto Litoral, Vale do Ave, Vale do Sousa e Braga e por duas zonas: Norte Litoral e Norte Interior, composta por 24 estações de monitorização distribuídas por 16 Concelhos: Porto, Maia, Matosinhos, Valongo, Gondomar, Vila do Conde, Vila Nova de Gaia, Espinho, Paredes, Paços de Ferreira, Braga, Vila Nova de Famalicão, Guimarães, Santo Tirso, Vila Real e Viana do Castelo. A área metropolitana do Porto possui atualmente 17 estações<sup>[189]</sup>.

As estações estão equipadas com analisadores automáticos que medem em contínuo os poluentes monóxido de carbono (CO), dióxido de azoto (NO<sub>2</sub>), dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>), ozono (O<sub>3</sub>), matéria particulada - PM<sub>10</sub>, PM<sub>2,5</sub> e BTX (compostos orgânicos voláteis) e registam as respetivas concentrações em médias de 15 minutos<sup>[189]</sup>.

As estações são classificadas consoante o ambiente em que se inserem (urbana, suburbana e rural), e também de acordo com a proximidade às principais fontes emissoras - tráfego, industrial e de fundo. As estações de fundo não se encontram sob a influência direta de vias de tráfego ou de qualquer fonte próxima de poluição mas permitem conhecer a exposição média a que qualquer cidadão está sujeito<sup>[189]</sup>. Estas classificações interligam-se entre si, existindo estações urbanas de fundo, rurais de fundo, suburbanas de fundo, urbanas de tráfego e estações industriais<sup>[189]</sup>. A tabela 4.5.1 lista as estações de medição da qualidade do ar de PM<sub>10</sub> e NO<sub>2</sub> nos municípios do Grande Porto e a figura 4.5.1 localiza-as com os respetivos códigos.

**Tabela 4.5.1**– Estações da rede de medição da qualidade do ar no Grande Porto.

Concelho	Estação	Código	Tipo de ambiente	Tipo
Espinho	Avenida 24	A24	Urbana	Tráfego
Espinho	Anta-Espinho	ANT	Suburbana	Suburbana de Fundo
Gondomar	Padre Joaquim Neves	PJN	Urbana	Tráfego
Maia	Vila Nova da Telha	VNT	Suburbana	Suburbana de Fundo
Maia	Dom Manuel II	DM2	Urbana	Tráfego
Maia	Afonso Henriques	Ahe	Urbana	Tráfego
Matosinhos	Meco – Perafita	PER	Suburbana	Industrial
Matosinhos	Augusto Gomes	AuG	Urbana	Tráfego
Matosinhos	João Gomes Laranjo	JGL	Urbana	Tráfego
Matosinhos	Leça Balio	LdB	Suburbana	Suburbana de Fundo
Matosinhos	Custóias	CUS	Suburbana	Suburbana de Fundo
Porto	Francisco Sá Carneiro	FSC	Urbana	Tráfego
Porto	Mouzinho de Albuquerque	MoA	Urbana	Tráfego
Porto	Sobreiras	SOB	Urbana	Urbana de Fundo
V. N. Gaia	Avintes	AVI	Urbana	Urbana de Fundo
Vila do Conde	Mindelo	MIN	Suburbana	Suburbana de Fundo
Vila do Conde	EN 13 – Azurara	AZU	Suburbana	Tráfego



**Figura 4.5.1** – Localização das estações de medição de NO<sub>2</sub> (esquerda) e PM<sub>10</sub> (direita) da rede de monitorização da qualidade do ar no Grande Porto.

#### 4.5.2.1.2. São Paulo

A poluição do ar no município de São Paulo é monitorizada pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), através de 12 estações fixas de monitorização que medem as concentrações de CO, SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, PM<sub>10</sub>, PM<sub>2,5</sub> e ozono<sup>[41]</sup>.

Sabe-se que a concentração de poluentes atmosféricos está fortemente relacionada com as condições meteorológicas<sup>[41-43]</sup>. Alguns fenómenos, como períodos extensos de calma, ventos fracos e inversões térmicas a baixa altitude, favorecem altos índices de poluição<sup>[41][41]</sup>. O último fenómeno é particularmente comum no inverno paulista, quando as baixas temperaturas noturnas se elevam rapidamente durante o dia, provocando alterações do arrefecimento natural do ar, pela formação de uma camada de ar quente sobre a cidade, “aprisionando” a sua atmosfera e impedindo a dispersão dos poluentes<sup>[42]</sup>.

Em 2008, o governo do Estado de São Paulo iniciou um processo de revisão dos padrões de qualidade do ar, baseando-se nas diretrizes estabelecidas pela OMS e definindo novos padrões de qualidade do ar assim como limites máximos permitidos para os poluentes (tabela 4.5.2) <sup>[41]</sup>.

**Tabela 4.5.2** - Alteração dos limites máximos permitidos por lei dos poluentes monitorizados na cidade de São Paulo e valores preconizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS)<sup>[17; 41]</sup>

Valores limites ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	Matéria particulada	SO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub>	O <sub>3</sub>
Antes de 2013	Média anual – 50 Média diária - 150	80	100	160
Depois de 2013	Média anual – 40 Média diária - 120	40	60	140
OMS	Média anual – 20 Média diária - 50	-	40	100

A partir de 2013, os municípios começaram a receber a cada três anos uma classificação legal relacionada com a concentração de cada poluente e não, como anteriormente, com o índice global de qualidade do ar. Os dados de base são a média das concentrações anuais ou, no caso do ozono, a média aritmética do 4º valor diário dos últimos 3 anos<sup>[41]</sup>. A designação baseia-se nos valores limites primários (M1), secundários (M2) e terciários (M3), estabelecidos pela lei<sup>[41]</sup>.

#### 4.5.2.2. Principais poluentes atmosféricos

Os poluentes que ultrapassam os limites permitidos e causam maior preocupação em ambos os países são o dióxido de azoto (NO<sub>2</sub>), as partículas de tamanho superior a 10 micrómetros (PM<sub>10</sub>) e o ozono.

No Grande Porto foram utilizadas as médias anuais de cada estação da Rede de monitorização, cedidos pelo CCDRN, no período de 2000 a 2013, dos poluentes NO<sub>2</sub> e PM<sub>10</sub>. As estações que apresentaram valores acima das médias anuais permitidas por um período superior a 3 anos foram consideradas estações “*em atenção*”.

Para o município de São Paulo, foram utilizadas as classificações relativas a cada poluente, como descrito no item 4.5.2.2.

Para o ozono, foi utilizado o número de ultrapassagens diárias do limite permitido no período de 2005 a 2010 no Grande Porto. Para o município de São Paulo, os dados são mostrados em horas de ultrapassagem, assim como a classificação atribuída ao município pela CETESB<sup>[41]</sup>.

#### 4.5.2.3. Radão

O radão é um gás nobre que se origina nos solos rochosos ricos em urânio<sup>[190]</sup> e pode libertar-se a partir das rochas, materiais de construção e mesmo da água, emitindo partículas alfa, beta e gama cujos efeitos biológicos se produzem após inalação em grandes quantidades. Em Portugal a lei (Diário da República, 1.a série — Nº 235 de 4 de dezembro de 2013) determina que a concentração máxima é de 400 Bq/m<sup>3</sup> no interior dos edifícios, obrigando à sua medição em edifícios construídos nos distritos de maior risco, como é o caso do Porto. O radão é considerado pela OMS como composto carcinogénico<sup>[191]</sup> e potencializador dos efeitos do tabaco no desenvolvimento dos cancro pulmonares humanos (risco 25 vezes superior).

#### 4.5.2.4. Distribuição geográfica dos linfomas

Para o Grande Porto foram incluídos neste estudo os casos de linfomas não-Hodgkin humanos registados entre 2005 e 2010 e os linfomas caninos diagnosticados entre 2005 e 2016 na mesma região (capítulo 4). Ambas as séries foram estudadas através da técnica da Densidade Kernel, uma função não-paramétrica para estimar a função probabilística da densidade de uma variável aleatória, utilizada para calcular a densidade numa área marcada por pontos, ou seja, quanto maior o número de casos (pontos) agrupados, maior a densidade<sup>[192]</sup>. A técnica foi realizada no *software* ArcGIS® versão 10.3, com a largura de banda padrão (1 km).

Os dados apresentados para o município de São Paulo foram descritos no trabalho realizado por Kimura (2012) com base em 629 LNH humanos e 579 linfomas caninos diagnosticados no período de 1996 a 2006<sup>[148; 173]</sup>.

### 4.5.3. Resultados

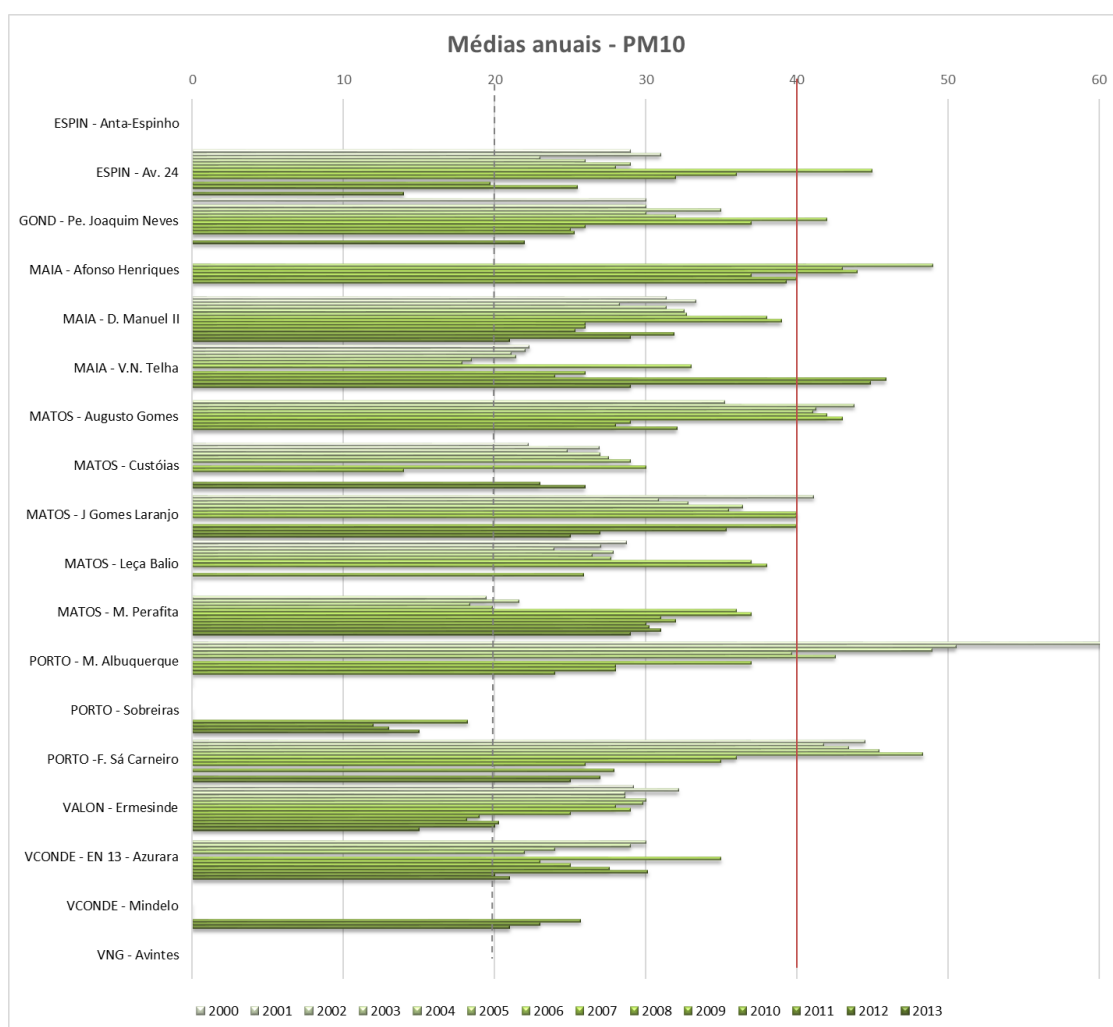
#### 4.5.3.1. Poluição atmosférica

##### Grande Porto

No período entre 2000 e 2013 os níveis de concentração das partículas (PM<sub>10</sub>) e de dióxido de azoto (NO<sub>2</sub>) foram amiúde superiores aos valores limite permitidos, enquanto os níveis de monóxido de carbono (CO), dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>), benzeno e partículas (PM<sub>2,5</sub>) estiveram frequentemente abaixo dos respetivos valores limite<sup>[189]</sup>.

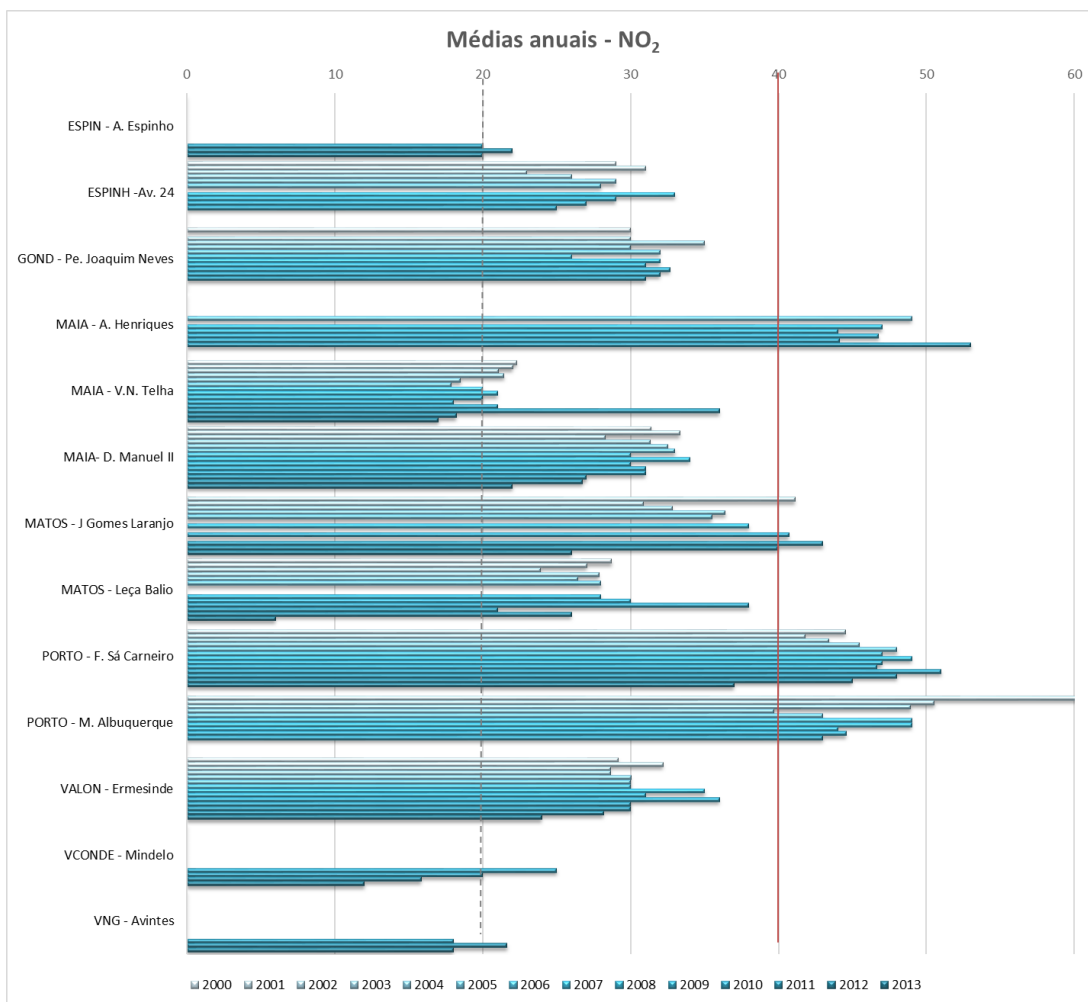
As figuras 4.5.2 e 4.5.3 ilustram as concentrações de PM<sub>10</sub> e NO<sub>2</sub> medidas nas 17 estações do Grande Porto, constando-se que em 4 delas - Mouzinho de Albuquerque

(Porto), Francisco Sá Carneiro (Porto), Afonso Henriques (Maia) e Augusto Gomes (Matosinhos) - os valores anuais foram por vários anos superiores ao limite de 40  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . A figura 4.5.4 mostra a localização geográfica destas estações no Grande Porto para as  $\text{PM}_{10}$  e  $\text{NO}_2$ .

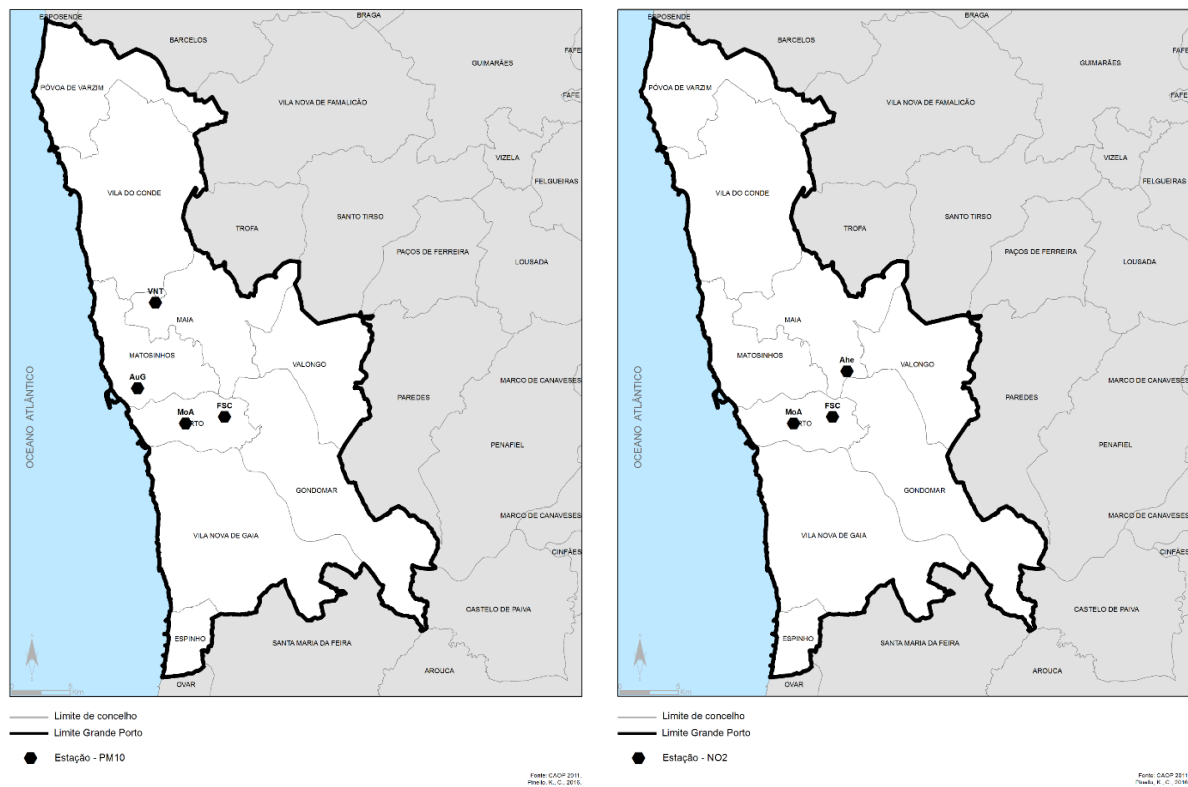


**Figura 4.5.2** – Médias anuais para o poluente  $\text{PM}_{10}$  nas estações de monitorização da qualidade do ar do Grande Porto. Base: dados fornecidos pela CCDRN.



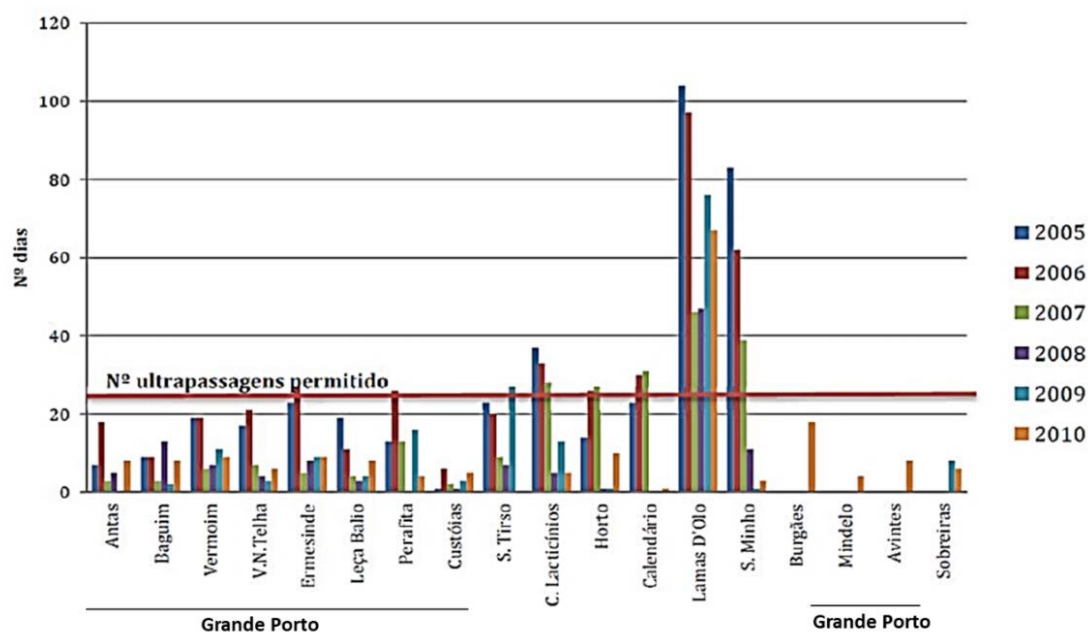


**Figura 4.5.3** – Médias anuais para o poluente **NO<sub>2</sub>** nas estações de monitorização da qualidade do ar do Grande Porto no período de 2000 a 2013. Base: dados fornecidos pela CCDRN.



**Figura 4.5.4** - Localização das estações que apresentaram valores de **PM<sub>10</sub>** (esquerda) e **NO<sub>2</sub>** (direita) acima de 40 µg/m<sup>3</sup> no período de 2000 a 2013. Base: dados fornecidos pela CCDRN.

Os níveis de ozono (O<sub>3</sub>) na região do Grande Porto não apresentaram uma situação tão grave, embora o limite tenha sido ultrapassado nalgumas estações<sup>[43]</sup>. Este facto pode ser explicado pelos fatores de dispersão existentes na região e pelo fato de que, como as reações fotoquímicas que conduzem à formação do ozono demoram uma ou mais horas, os gases responsáveis pela formação do ozono, emitidos na cidade, são medidos algumas dezenas ou centenas de quilómetros a jusante de onde são produzidos, dependentes da direção e sentido do vento<sup>[43]</sup>. Este facto ajuda também a explicar os valores particularmente elevados na estação de monitorização de Lamas D'Olo<sup>[189; 193]</sup>. A figura 4.5.5. ilustra as ultrapassagens anuais dos limites de O<sub>3</sub> nas diferentes estações da Rede de Monitorização do Norte, no período de 2005 a 2010<sup>[189]</sup>.



**Figura 4.5.5** - Número de dias por ano de ultrapassagem dos limites máximos de **Ozono** nas estações da Rede de Medição da Qualidade do ar da Região Norte – CCDRN. Fonte: Evolução da qualidade do ar na Região Norte CCDRN 2010<sup>[189]</sup>.

### São Paulo

A Cidade de São Paulo foi classificada como M1 por exceder nos últimos 3 anos o valor limite primário (o mais elevado) de ozono, sendo considerada em valores-limite aceitáveis para o dióxido de azoto, partículas (MP) e dióxido de enxofre (tabela 4.5.3).

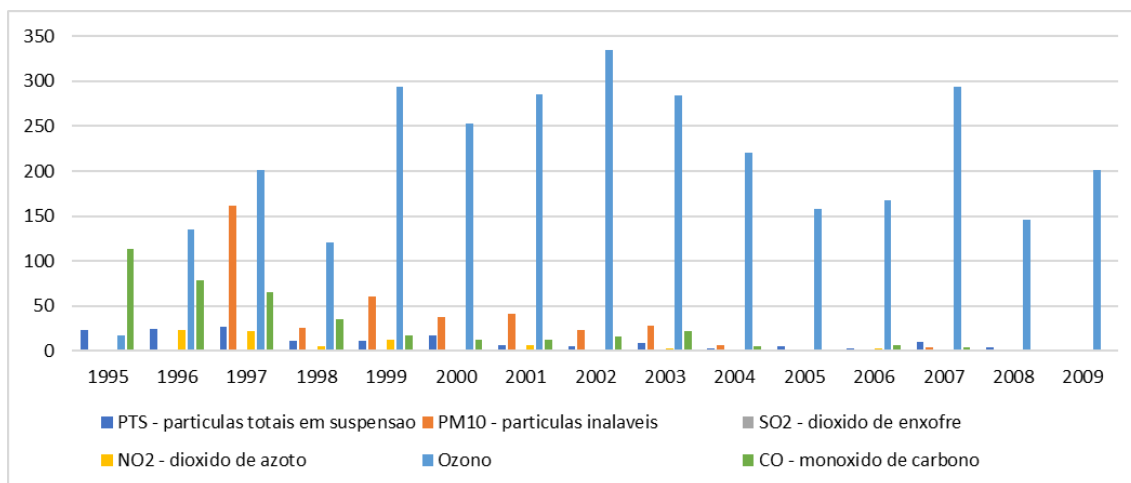
**Tabela 4.5.3** – Classificação do Município de São Paulo relativamente aos poluentes atmosféricos (fonte: CETESB 2017).

Poluente	Classificação	Valores ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	Valores limite ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
MP	M2	$30 < \text{MA} \leq 35$	40
SO <sub>2</sub>	M3	$\text{MA} \leq 20$	40
NO <sub>2</sub>	M3	$40 < \text{MA} \leq 45$	60
O <sub>3</sub>	>M1	$\text{M4MVD} > 140$	140

MA: Média aritmética das médias anuais dos últimos 3 anos representativos

M4MVD: Média aritmética do 4º maior valor diário de cada um dos últimos 3 anos

O IBGE disponibiliza dados em “Séries estatísticas” referentes aos poluentes atmosféricos. A figura 4.5.6 ilustra graficamente o número de ultrapassagens registadas para cada poluente entre os anos de 1996 e 2009.



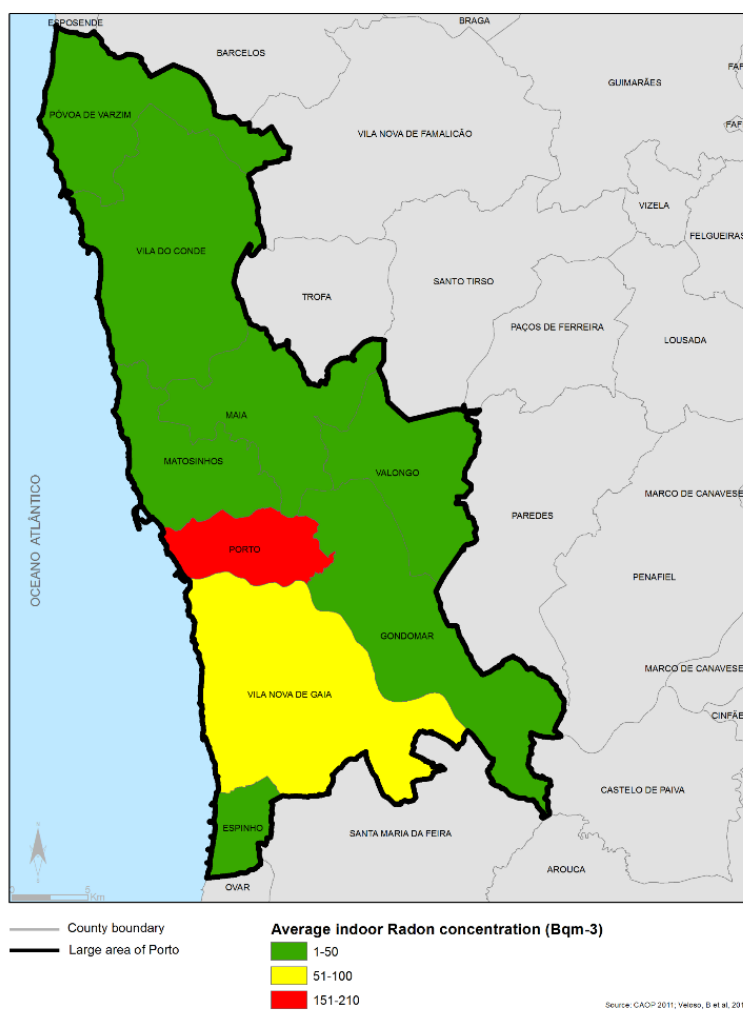
**Figura 4.5. 6** - Número de ultrapassagens, em horas totais, registadas na cidade de São Paulo no período de 1995 a 2009 para os principais poluentes (Fonte: Séries estatísticas do IBGE).

#### 4.5.3.2. Radão

O radão está presente em particamente todo o território português, com maiores concentrações no Norte do país, sendo considerado responsável pelo aumento, em 18 a 28%, dos casos de cancro no pulmão na região<sup>[1]</sup>.

De acordo com o estudo realizado por Veloso et. al.<sup>[1]</sup>, o Porto é o concelho com as concentrações médias interiores mais elevadas (151 a 210 Bq.m<sup>-3</sup>), seguido por Vila Nova de Gaia, conforme ilustrado na figura 4.5.7.

No município de São Paulo, segundo um estudo realizado em 2003 e 2004 em residências, a concentração média do radão foi de 25 Bq.m<sup>3</sup> (11-109)<sup>[194]</sup>.

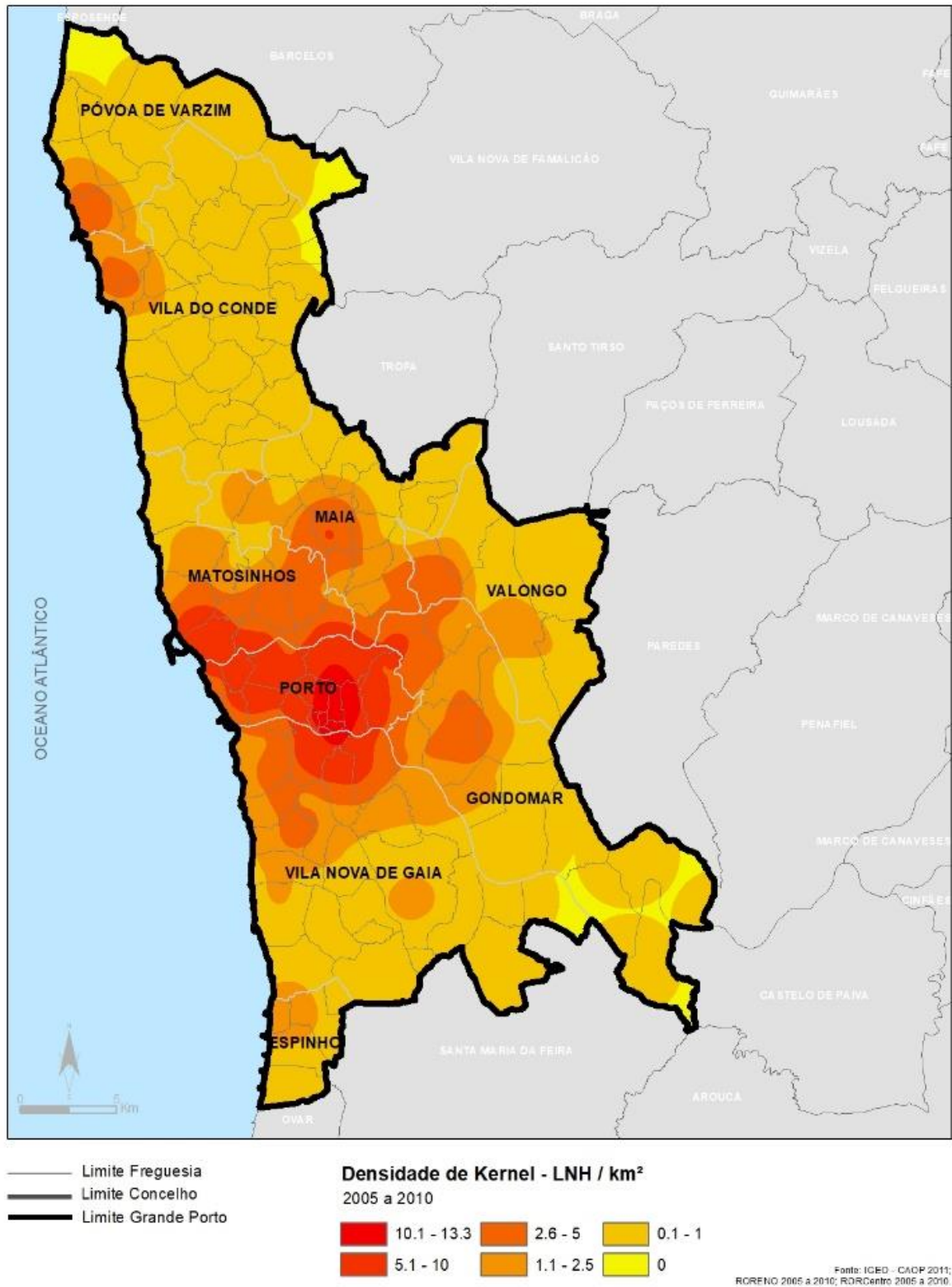


**Figura 4.5.7** – Concentração interior média de radão nos concelhos do Grande Porto. Fonte: Veloso et al., 2012<sup>[1]</sup>

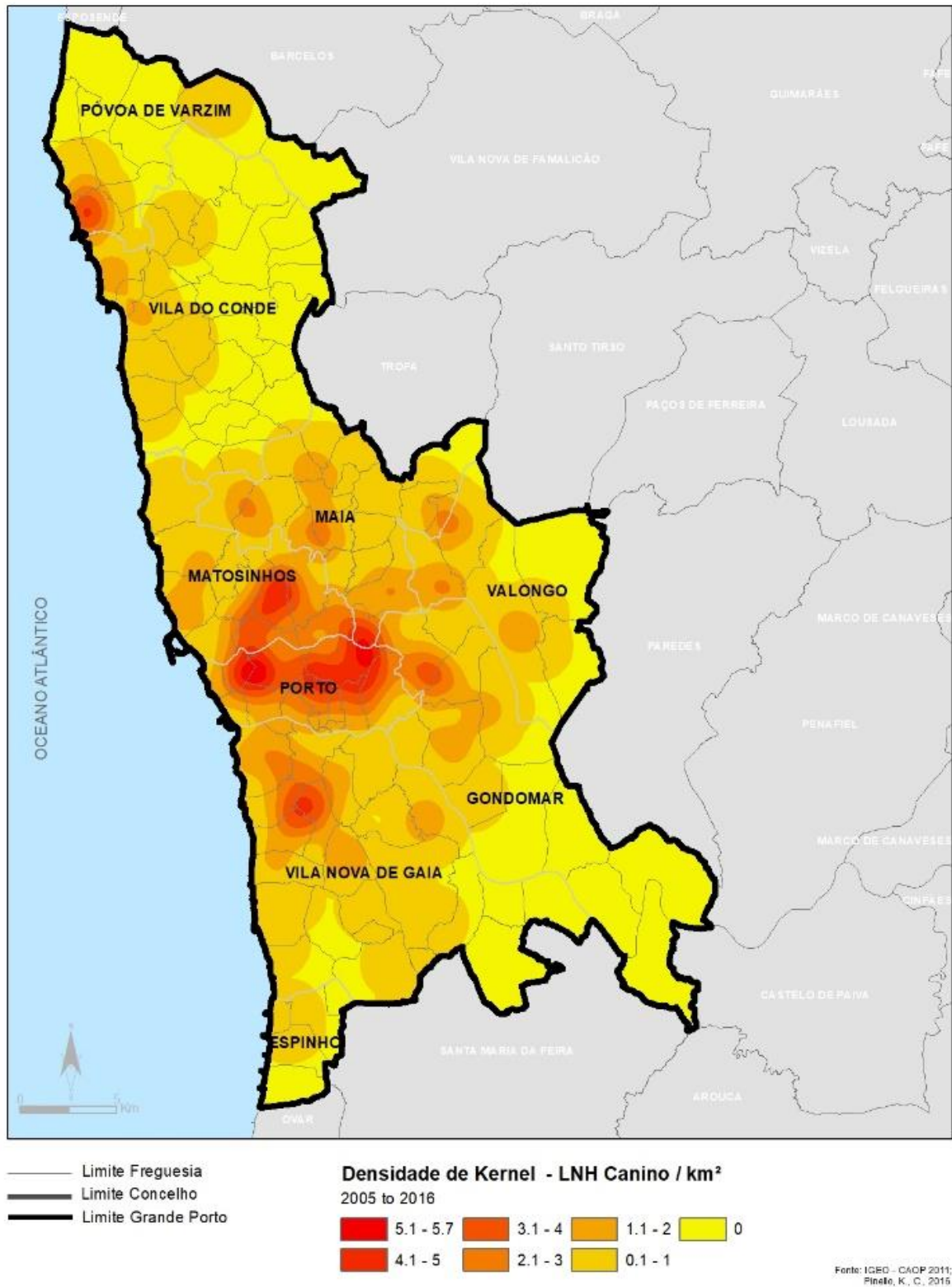
#### 4.5.3.3. Distribuição geográfica dos linfomas

Os resultados da densidade de Kernel para os casos de LNH do Grande Porto estão ilustrados nas figuras 4.5.8 (LNH humanos) e 4.5.9 (linfomas caninos). A análise dos mapas evidencia uma distribuição similar entre os casos em ambas as espécies.

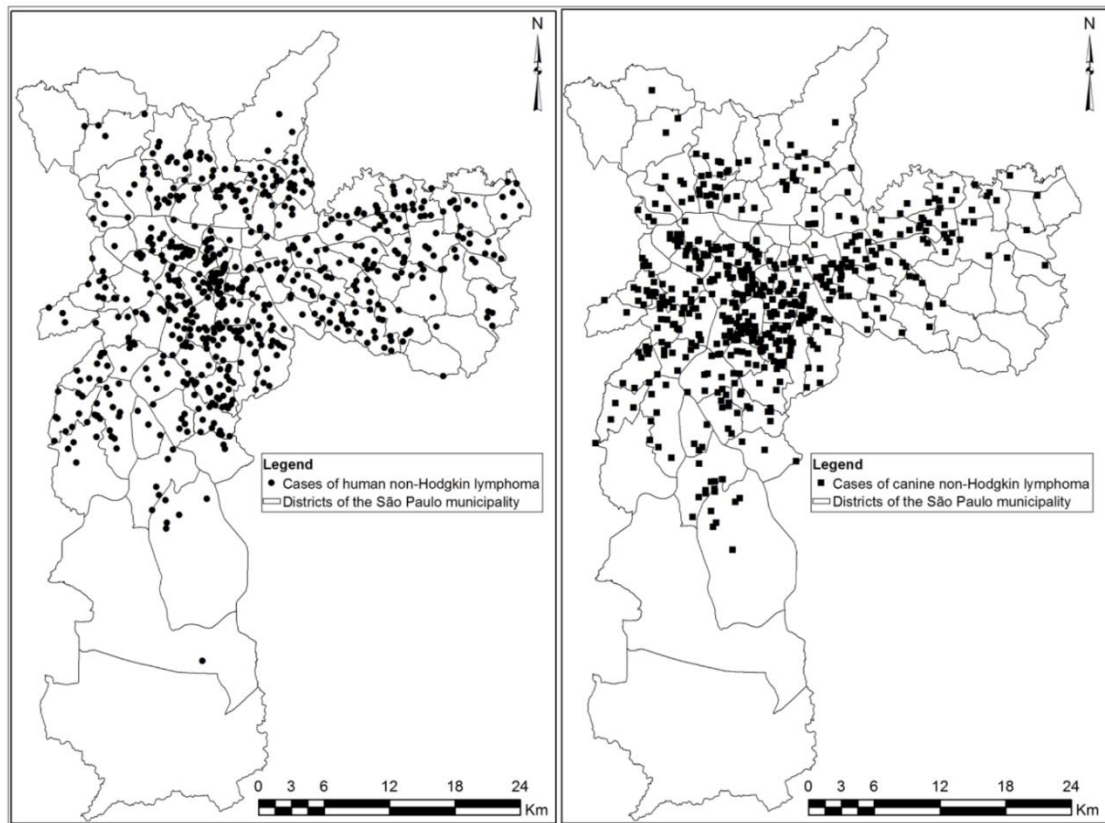
A distribuição geográfica dos casos de LNH humanos e caninos no município de São Paulo está representada na figura 4.5.10. Tal como no Grande Porto, há uma associação entre a distribuição geográfica dos casos de ambas as espécies e a elevada poluição atmosférica, intensa urbanização e tráfego rodoviário da região central da cidade.



**Figura 4.5.8** - Densidade de Kernel da distribuição geográfica dos casos de linfoma não-Hodgkin humanos diagnosticados entre 2005 a 2010 no Grande Porto.



**Figura 4.5. 9** – Densidade de Kernel da distribuição geográfica dos casos de linfomas caninos diagnosticados entre 2005 a 2016 no Grande Porto.



**Figura 4.5.10** - Distribuição espacial dos casos de LNH em humanos (esquerda) e em cães (direita) na cidade de São Paulo no período de 1996 a 2006. Fonte: Tese de Doutorado de Katia Cristina Kimura, 2012, Universidade de São Paulo<sup>[173]</sup>

#### 4.5.4. Discussão

A similaridade espacial dos casos de LNH humanos e caninos encontrada tanto no Grande Porto quanto em São Paulo aumenta a probabilidade de existir uma partilha de fatores etiológicos em ambas as espécies. Não é possível descartar por completo, no entanto, que a proximidade entre os seres humanos e os cães tenha alguma influência neste resultado fazendo com que as diferenças de densidade populacional condicionem a probabilidade de serem diagnosticados mais casos de doença nos centros das cidades, como evidenciado neste estudo.

Em contraste com a semelhança entre as duas áreas – São Paulo e Grande Porto – da maior prevalência dos LNH de células B em seres humanos, os cães aparentam ser mais afetados por linfomas de células T em São Paulo, enquanto no Grande Porto os dois tipos de linfoma, T e B, surgiram igualmente prevalentes. Curiosamente ambos os resultados são divergentes com os descritos noutras regiões do globo, onde foi consistentemente detetada uma maior proporção de linfomas caninos de células B<sup>[74; 91; 117; 176; 195]</sup>.



Em São Paulo foi proposto que esta divergência se deverá à elevada concentração de poluentes atmosféricos oriundos do intenso tráfego. Nesta cidade o problema mais grave aparenta ser uma constante elevação das concentrações de ozono. No Grande Porto, no entanto, a densidade automóvel não é tão elevada e as concentrações de ozono não apresentam valores tão críticos como em São Paulo. É provável que o ozono produzido na região seja dissipado para regiões mais elevadas, justificando-se assim as elevadas medições encontradas na estação de Lamas D'Olo. Este facto, associado às características de variação de temperatura da região, mais suave por influência da proximidade ao mar, pode evitar o fenómeno de inversão térmica responsável pelas elevadas concentrações do gás em São Paulo.

Por outro lado, o Grande Porto enfrenta um problema distinto de poluição, o radão, uma questão tão premente que obrigou a imposições legais de monitorização em concelhos específicos de Portugal. A exposição a este gás é particularmente preocupante em ambientes interiores de construções antigas, prevalentes no centro das cidades e que podem influenciar a maior densidade encontrada de LNH nestas áreas. Num estudo conduzido na cidade de São Paulo em 2005, os valores encontrados representam 30% da concentração média encontrada na Europa<sup>[194]</sup>.

Todas as investigações conduzidas sobre LNH apontam, com raras exceções, para uma etiologia multifatorial<sup>[125; 130; 159; 175]</sup>. De facto, embora para alguns subtipos já existam evidências fortes de fatores etiológicos como os vírus<sup>[175]</sup>, os linfomas “ambientais” podem ser induzidos por qualquer substância que ative cronicamente o sistema imunitário, induzindo uma instabilidade genómica potencialmente incontrolável com progressão para cancro<sup>[196]</sup>.

Tanto São Paulo como o Grande Porto têm níveis de poluição que, embora distintos, atingem níveis preocupantes e podem justificar o desenvolvimento de linfomas nos seres humanos e nos cães. O efeito potenciador do radão sobre os malefícios do fumo de tabaco pode ainda estar na base da associação encontrada neste estudo entre a maior incidência de linfoma canino e os hábitos tabágicos dos seus proprietários.

Em conclusão, embora os valores de incidência de LNH em humanos não sejam particularmente distintos entre as duas áreas estudadas, é provável que os fatores etiológicos ambientais sejam diferentes – ozono em São Paulo e o efeito potencializador do radão nos poluentes atmosféricos no Grande Porto – embora conduzindo ao mesmo desfecho.

Apesar de a prevalência dos dois tipos de LNH – células B e células T – ser semelhante em humanos, ambas as áreas estudadas apresentam uma proporção de linfomas de células T em cães superior à de estudos anteriores noutras regiões geográficas, com predominância do tipo T em São Paulo e equidade entre os dois tipos

no Grande Porto. Ainda que este estudo se tenha debruçado sobre os fatores ambientais, a influência genética não é despicienda em linfomas. De facto, a incidência de tipos histológicos específicos é comprovadamente diferente entre raças e mesmo entre linhagens genealógicas. O facto de o Brasil ter sido uma colónia portuguesa até 1822 e de uma parte importante da emigração portuguesa subsequente se ter dirigido a este país favoreceu, naturalmente, a mobilidade dos cães e o seu cruzamento transatlântico. A miscigenação canina poderá ter promovido o apuramento de linhagens que, na sua origem brasileira, apresentavam uma maior predisposição para o desenvolvimento de linfomas do tipo T, disseminando-as pelas regiões portuguesas de maior origem da emigração.

#### **4.6. CAPÍTULO VI - Estudo da implementação de um Registo de Cancro Animal em Portugal – PTRCA**

##### **4.6.1. Considerações Gerais**

Os registos oncológicos representam o início de todos os tipos de estudos epidemiológicos em cancro, sejam eles de base hospitalar ou populacional. A comunicação e codificação das variáveis inseridas no registo são fundamentais para a partilha de dados e estudo comparativos.

Em 2012 iniciou-se em São Paulo o Registro de Câncer Animal e em 2013 foi proposto iniciar testes de internacionalização desta plataforma. O Registro de Cancro Animal de Portugal (PTRCA) nasceu desta parceria internacional entre a Universidade do Porto e a Universidade de São Paulo com o objetivo de criar uma base de dados internacionalmente padronizada.

##### **4.6.2. Materiais, Métodos e Resultados**

O responsável pelo desenvolvimento do sistema de colheita de dados de São Paulo (RCA-SP) é o médico veterinário e mestre Marcelo Teddardi, pertencente ao Núcleo de Pesquisa em Oncologia Veterinária (NAP-ONCOVET) da Universidade de São Paulo, liderado pela Professora Doutora Maria Lúcia Zaidan Dagli.

Em trabalho conjunto foi realizado um plano de trabalho para a implementação do Registo de Cancro Animal de Portugal (PTRCA), com diversas etapas descritas a seguir.

#### **1. Aquisição do endereço eletrónico para o acesso ao sistema**

Foi adquirido o endereço eletrónico [www.ptrca.com](http://www.ptrca.com) contendo uma página inicial explicativa seguida de um *link* para aceder ao sistema de inserção dos dados. Este *link* é um redirecionamento para um endereço fornecido pelo responsável do sistema em São Paulo que criou uma plataforma inserida no RCA-SP ([www.cdinfor.com.br/rcasp-pt](http://www.cdinfor.com.br/rcasp-pt)).

## 2. Adaptações

Foram estudadas e introduzidas as adaptações linguísticas tidas por necessárias para melhor compreensão dos conteúdos, inseridas raças que estavam ausentes da listagem inicial e as localizações geográficas através dos códigos postais.

## 3. Validação Interna

1ª fase: durante a fase de adaptações, foram sendo realizados testes com a inserção de casos internos para verificação da validade interna, procura de erros, e identificação de dificuldades remanescentes. As necessidades foram comunicadas ao responsável do sistema em São Paulo, que procedeu aos respectivos ajustes.

2ª fase: após as adaptações da 1ª fase, foi feita a validação interna, solicitando-se inicialmente aos estagiários do Hospital Veterinário da Universidade do Porto – UPVet que registassem os casos oncológicos aí atendidos e reportassem eventuais dificuldades ou erros identificados para correção, se tida por necessária. Neste processo, os elementos envolvidos foram questionados sobre o grau de dificuldade na inserção dos dados, a complexidade do sistema e o tempo despendido no seu preenchimento. Após esta fase, foi solicitado aos médicos veterinários do UPVet que utilizassem o sistema, sendo pedida informação semelhante.

Fase de logística de informações: cada centro de atendimento médico-veterinário tem o seu próprio método de arquivamento de informações clínicas sobre os seus pacientes. O ajustamento logístico do Registo para se adaptar às particularidades individuais de cada arquivo foi abordado de diversas formas: utilização direta do RCA-PT pelos elementos do corpo clínico; identificação simples (nome de arquivamento) dos pacientes oncológicos para futura inserção por um elemento auxiliar ou um membro do RCA-PT; arquivamento diferenciado das fichas clínicas de pacientes oncológicos para futura inserção no registo; pesquisa de pacientes através dos relatórios de análise citológica e histopatológica que fossem confirmativos de doença oncológica.

Deste processo de validação interna, obtiveram-se os seguintes resultados:

- Foram alterados diversos termos linguísticos;
- Os estagiários inseriram pacientes no registo, mas ficaram com dúvidas sobre a importância e adequação, para o sistema, de alguns dados clínicos. Alguns inseriram longos textos nos espaços abertos e outros não preencheram corretamente alguns

campos importantes. As suas críticas foram sobretudo dirigidas à quantidade de informações requeridas e tempo gasto na inserção completa de cada animal.

- Os médicos veterinários não tiveram oportunidade para entrar no sistema e fazer o registo por se encontrarem em intensa atividade clínica.

- O registo adequado dos pacientes oncológicos foi mais bem-sucedido quando os animais em causa eram identificados pelo diagnóstico oncológico a partir da qual um elemento do RCA-PT consultava as respetivas fichas clínicas e inseria a informação pertinente nos locais adequados e de acordo com o requerido.

#### **4. Validação Externa**

O processo de validação externa foi realizado através de pedido de colaboração dos seguintes CAMV:

Centro Hospitalar Veterinário (CHV) - Doutor Hugo Gregório

Hospital de Referência Veterinário - Dr. Luis Montenegro e Dr. Filipe Silva

Hospital Escolar da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias–  
Doutora. Andreia Santos

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro - Professora Doutora Felisbina Queiroga.

Todos os elementos contactados usaram o sistema inserindo casos e teceram os seus comentários e críticas, centradas maioritariamente na sua complexidade e na falta de tempo para inserirem os dados a par com a sua atividade clínica.

#### **5. Inserção de Dados e Resultados**

A inserção regular de casos oncológicos foi realizada no ano de 2016 pelos CAMV UPVet e CHV. Foram registados 206 casos, os quais estão apresentados em diferentes tabelas de acordo com as variáveis estudadas (tabelas 4.6.1 a 4.6.5) e estão divididos por espécie (caninos e felinos) e sexo. Na tabela 4.6.1 foram contempladas as variáveis: idade média de diagnóstico, estado reprodutivo, porte, método de diagnóstico, tipo de tratamento instituído e desfecho. A tabela 4.6.2 lista as raças inseridas para ambas espécies. As principais topografias e morfologias acometidas em cada espécie estão descritas nas tabelas 4.6.3 e 4.6.4. A tabela 4.6.5 mostra os concelhos de origem dos proprietários e as figuras 4.6.1 e 4.6.2 são os mapas os quais mostram a área de abrangência do registo.

**Tabela 4.6.1 - Análise descritiva dos casos inseridos no PTRCA em 2016.**

		Caninos			Felinos			TOTAL
		machos	fêmeas	total	machos	fêmeas	total	
<b>Total</b>		66	103	169	16	21	37	206
<b>Média de idade</b>		9,57	9,41	9,43	8,75	11,11	10,00	9,59
<b>Esterilizados</b>								
	<b>não</b>	45	42	87	1	1	2	89
	<b>sim</b>	8	43	51	10	11	21	72
<b>Porte</b>	<b>pequeno</b>	17	22	39	15	17	32	71
	<b>pequeno-médio</b>	8	19	27	1	3	4	31
	<b>médio</b>	11	28	39		1	1	40
	<b>médio-grande</b>	29	34	63				63
	<b>grande</b>	1		1				1
<b>Base Diagnóstico</b>								
	<b>Clínico</b>	7	8	15	3	6	9	22
	<b>Necropsia</b>		1	1				1
	<b>Citologia</b>	27	31	58	9	4	13	71
	<b>Histologia</b>	31	63	94	2	11	13	107
<b>Tratamento</b>								
	<b>Nenhum</b>	4	1	5	1		1	6
	<b>Cirurgia</b>	32	43	75	2	8	10	85
	<b>Quimioterapia</b>	2	11	13	1	1	2	15
	<b>Anti-inflamatórios não esteróides</b>					1	1	1
	<b>Sem informação</b>	28	46	74	12	11	23	97
	<b>Terapia de alvo molecular</b>		2	2				2
<b>Desfecho</b>								
	<b>Sem informação</b>	51	93	144	11	18	29	173
	<b>Vivo</b>	1	3	4		2	2	6
	<b>Óbito natural</b>	1	1	2	1		1	3
	<b>Eutanásia</b>	13	6	19	4	1	5	22

**Tabela 4.6.2 - Raças registadas no PTRCA em 2016.**

Raças	Caninos			Felinos			TOTAL
	machos	fêmeas	total	machos	fêmeas	total	
SRD	12	45	57	9	11	20	77
Europeu				6	10	16	16
Persa				1		1	1
Labrador Retriever	20	14	34				34
Boxer	4	15	19				19
Golden Retriever	6	2	8				8
Cocker Spaniel inglês	8		8				8
Caniche	1	4	5				5
Beagle		4	4				4
Pequinês	2	1	3				3
Pitbull	2	1	3				3
Dogo Argentino		3	3				3
Pug		2	2				2
Bulldog francês	1	1	2				2
Pointer	1	1	2				2
Pastor Alemão	2		2				2
Bullmastiff		2	2				2
Dogue de Bordeaux		2	2				2
Flat Coated Retriever	2		2				2
Rafeiro do Alentejo		1	1				1
Yorkshire Terrier		1	1				1
Cão da Serra da Estrela	1		1				1
Bulldogue	1		1				1
Pinscher		1	1				1
Setter inglês		1	1				1
American Staffordshire Terrier	1		1				1
West Highland White Terrier	1		1				1
Podengo português		1	1				1
Cão de Castro Laboreiro	1		1				1
Braco de Burgos		1	1				1

**Tabela 4.6.3 - Localizações topográficas registradas no PTRCA - 2016.**

Topografias	Caninos			Felinos			TOTAL
	mac	fêm	tot	mac	fêm	tot	
<u>MAMA</u>	0	33	33	0	2	2	35
LESÃO SOBREPOSTA OU MÚLTIPLA EM MAMAS ABDOMINAIS E INGUINAIS		17	17				17
LESÃO SOBREPOSTA OU MÚLTIPLA EM CADEIA MAMÁRIA CONTRALATERAL		8	8		2	2	10
LESÃO SOBREPOSTA OU MÚLTIPLA EM MAMAS TORÁDICAS		4	4				4
MAMA, SOE		4	4				4
<u>PELE</u>	15	26	41	3	1	4	45
PELE DO OMBRO E MEMBROS TORÁDICOS	7	5	12				12
PELE DO TRONCO	3	3	6	3		3	9
PELE DE OUTRAS PARTES E DE PARTES NÃO ESPECIFICADAS DA FACE	4	3	7		1	1	8
PELE, SOE		7	7				7
PELE DO QUADRIL E MEMBROS PÉLVICOS		5	5				5
PELE DA CABEÇA E DO PESCOÇO	1	3	4				4
Sem informação	2	5	7	3	1	4	11
TESTICULO, SOE	8		8				8
BAÇO	5	2	7				7
LINFONODOS DE MÚLTIPLAS REGIÕES		6	6				6
TECIDO CONJUNTIVO	6	6	12	1		1	13
TEC. CONJUNTIVO, SUBCUTÂNEO E OUTROS TECIDOS MOLES DO TÓRAX	2	2	4	1		1	5
TEC. CONJUNTIVO, SUBCUTÂNEO E OUTROS TECIDOS MOLES DO ABDÓMEN.	2	2	4				4
TEC. CONJUNTIVO, SUBCUTÂNEO E OUTROS TECIDOS MOLES DO MEMBRO PÉLVICO E QUADRIL	2	2	4				4
RIM, SOE				2	2	4	4
FÍGADO	2	1	3		1	1	4

mac=machos; fêm=fêmeas; tot:total. SOE: sem outra especificação.



**Tabela 4.6.4** - Tipos histológicos registrados no PTRCA - 2016.

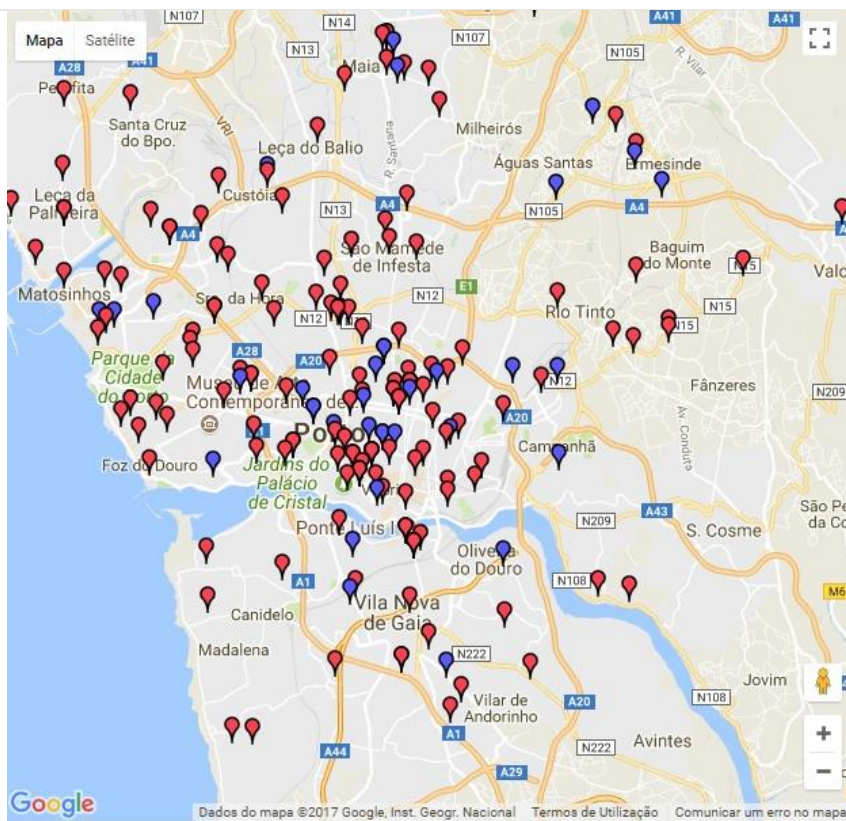
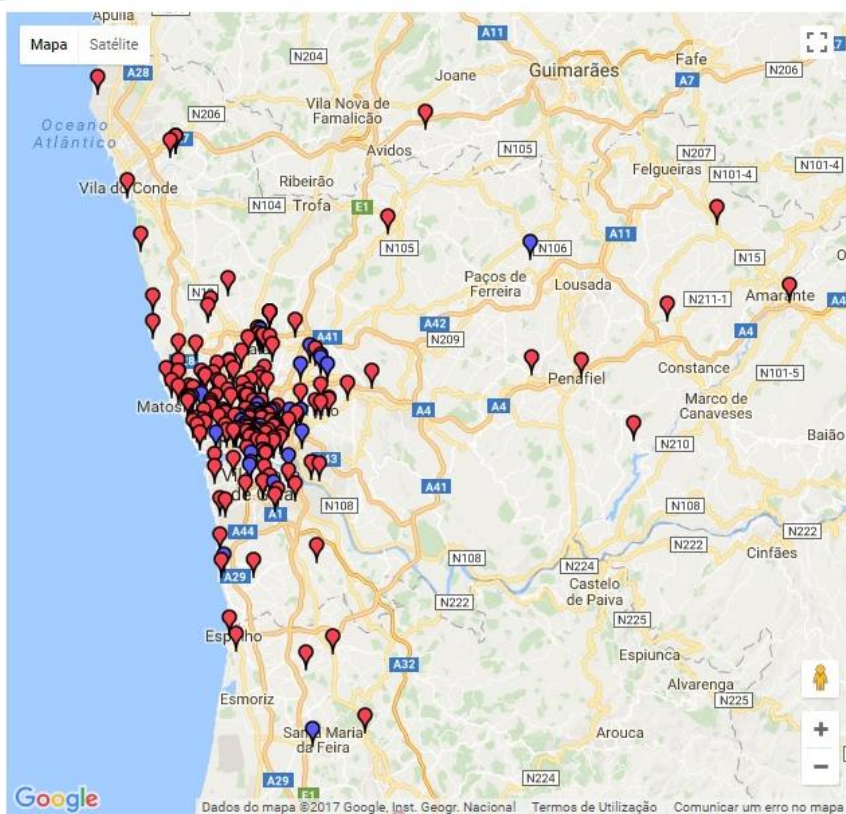
Morfologias	Caninos			Felinos			TOTAL
	macho	fêm	tot	macho	fêm	tot	
Mastocitoma, SOE	9	23	32				32
MAMA		22	22		7	7	29
MAMA - Adenoma complexo		11	11				11
MAMA - Carcinoma túbulo-papilar		3	3		2	2	5
MAMA - Carcinoma sólido		1	1		4	4	5
MAMA - Carcinoma, SOE		2	2		1	1	3
MAMA - Adenoma, SOE		3	3				3
MAMA - Carcinoma complexo		2	2				2
Sem informação	5	8	13	5	5	10	23
Linfoma	3	7	10	5	5	10	20
Linfoma maligno não-Hodgkin, SOE	2		2	3	2	5	7
Linfoma não-Hodgkin, multicêntrico	1	6	7				7
Linfoma não-Hodgkin, alimentar		1	1	2	3	5	6
Hemangiossarcoma	4	5	9				9
Carcinoma escamocelular, SOE	2	4	6				6
Adenocarcinoma, SOE	3	3	6				6
Hemangioma, SOE	2	3	5				5
Melanoma maligno, SOE	4	1	5				5
Osteossarcoma, SOE	2	1	3	1		1	4
Sarcoma, SOE	2	1	3				3
Fibrossarcoma, SOE				2	1	3	3
Carcinoma, SOE	1	2	3				3
Histiocitoma, SOE	3		3				3
Seminoma, SOE	2		2				2
Sertolinoma	2		2				2
Adenocarcinoma hepatóide	1	1	2				2
Células tumorais malignas	1		1		1	1	2
Tumor venéreo transmissível (TVT)		1	1				1
Lipoma, SOE	4	3	7				7
Tumor benigno de células de Leydig	3		3				3
Neoplasia benigna	2		2				2
Epitelioma benigno	2		2				2

fêm=fêmeas; tot:total; SOE: sem outra especificação.

**Tabela 4.6.5** - Distritos e Concelhos de origem registados no PTRCA - 2016.

Distritos e Concelhos	Caninos			Felinos			TOTAL
	machos	fêmeas	tot	machos	fêmeas	tot	
Aveiro	3	5	8	1		1	9
Espinho	2		2				2
Estarreja		1	1				1
Ílhavo		1	1				1
Oliveira de Azeméis	1		1				1
Santa Maria da Feira		3	3	1		1	4
Braga	1	3	4				4
Barcelos		1	1				1
Braga	1	1	2				2
Vila Nova de Famalicão		1	1				1
Porto	60	94	154	15	21	36	190
Amarante	1	1	2				2
Gondomar	3	6	9				9
Maia	6	4	10	4	1	5	15
Matosinhos	11	25	36	2	3	5	41
Paredes		1	1				1
Penafiel	2		2				2
Porto	24	36	60	5	15	20	80
Póvoa de Varzim		2	2				2
Santo Tirso	1		1				1
Valongo		3	3	1		1	4
Vila do Conde	2	1	3				3
Vila Nova de Gaia	10	15	25	3	2	5	30
Viana do Castelo	2		2				2
Viana do Castelo	2		2				2
Viseu		1	1				1
Viseu		1	1				1

tot: total

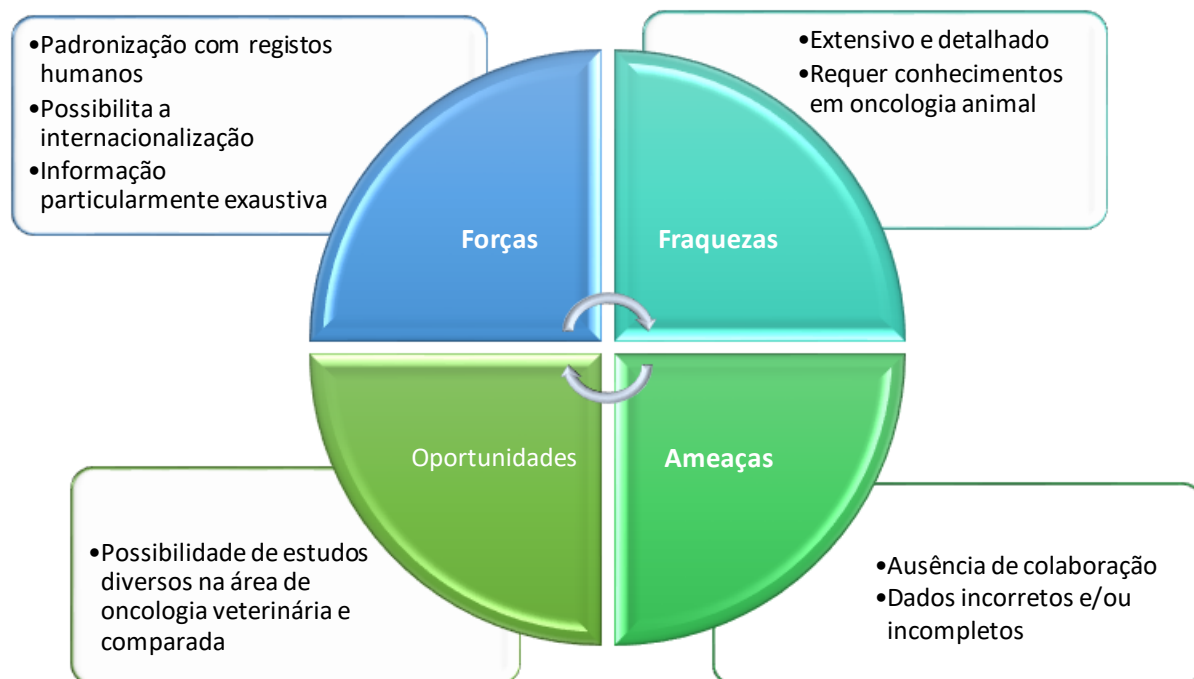


Os pontos vermelhos representam casos caninos e azuis os casos felinos.

**Figura 4.6.1** - Mapas de localização geográfica dos casos registados no PTRCA – 2016.

## 6. Análise SWOT

A Análise SWOT (forças, fraquezas, oportunidades e ameaças) foi utilizada para a avaliação deste estudo, levando-se em conta todas as fases envolvidas, seus resultados e adesão, assim como as críticas e comentários de todos os envolvidos. Essa análise está esquematizada na figura 4.6.3.



**Figura 4.6.2** - Diagrama de análise SWOT do Registo de Cancro Animal de Portugal.

### 4.6.3. Discussão

Mesmo baseados num tamanho amostral reduzido, os resultados começam a mostrar a validade do registo oncológico animal como ferramenta epidemiológica sobre o tema. É possível começar a perceber quais são as espécies e as raças mais acometidas por distintos tipos histológicos em diferentes localizações. A geo-referenciação permite ainda perceber a distribuição geográfica de incidência das neoplasias animais, fornecendo dados importantes para estudos epidemiológicos nas suas várias vertentes. Também a sua comparação com dados de registos similares em países terceiros permitirá o estudo das várias condicionantes que expliquem resultados

distintos, com grande importância a vários níveis, desde a identificação etiológica à escolha das melhores opções terapêuticas.

Este estudo constituiu a primeira tentativa de partilha internacional de dados de registos oncológicos animais, permitindo perceber a dificuldade real da sua implementação, o que pode explicar a inexistência de iniciativas semelhantes até ao presente.

A principal dificuldade prende-se com a aquisição de informação clínica que, na maioria dos casos, exige um dispêndio grande de tempo por parte dos responsáveis pelos pacientes. Embora o cenário ideal fosse que os clínicos inserissem diretamente as informações, constatámos que tal não parece ser viável rotineiramente. Delegar a tarefa para estagiários não parece também ser funcional e coerente visto as dificuldades enfrentadas por estes. Nomear um responsável ligado ao registo cuja função é procurar e inserir as informações, ainda que no momento surja como logisticamente mais eficaz, é oneroso e dificulta o processo de recolha de informação num grande número de CAMV ou em CAMV geograficamente distantes. Estas dificuldades e dilemas são igualmente enfrentados em oncologia humana, tendo os sido mitigados pela obrigatoriedade da inserção dos casos no registo, apesar do menor volume de informações, que é feita não pelo médico oncologista, mas sim pelo pessoal administrativo que recebeu treino específico para executar esta tarefa.

O sistema RCA foi construído como uma ferramenta de monitorização de casos oncológicos animais que corre em paralelo com os *softwares* de gestão normalmente utilizados em CAMV. Idealmente, este registo deveria trabalhar como recetor de dados já inseridos num sistema codificado e padronizado, ou em diferentes sistemas com padrões normalizados, mitigando assim a tarefa de transformação de informações clínicas em dados codificados.

O sucesso de iniciativas de registo de doenças, tanto oncológicas como de outras especialidades, requer um trabalho de consciencialização da sua importância por parte dos clínicos veterinários e das suas organizações como ferramenta para a tomada de decisões e ações de saúde pública e não só para fins de pesquisa científica.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPETIVAS FUTURAS

---

Um artigo recente publicado na revista *Cancer Research*<sup>[197]</sup> evidenciou que o microambiente celular é o principal responsável pela sinalização que conduz ao descontrolo proliferativo e iniciação da carcinogénese. É inquestionável que os efeitos deletérios da exposição a substâncias carcinogénicas alteram os microambientes teciduais e aumentam a seleção de mutações oncogénicas específicas que conferem vantagens na competição evolutiva entre células neoplásicas e saudáveis. Na impossibilidade prática de impedir totalmente a exposição à extensa miríade de tais compostos, prevenir o cancro não pode ficar limitado a esta atuação, mas deverá também favorecer o predomínio de células saudáveis.

Hoje em dia quase metade da população humana vive em áreas com má qualidade ambiental<sup>[15]</sup>, sendo lógico assumir que uma grande parte dos animais de companhia, ao partilhar os mesmos ambientes, se encontra exposto a riscos semelhantes.

Perante a impossibilidade, eticamente intolerável, de conduzir estudos de exposição deliberada a poluentes atmosféricos em seres humanos e cães, a sua influência na oncogénese tem de basear-se em dados epidemiológicos, naturalmente mais sujeitos a influência de variáveis não abordadas e que obrigam a congregar informação de vários tipos e fontes no sentido de caminhar para explicações deduzidas, mas sustentadas em dados reais. O estudo de doenças comuns a seres humanos e animais é uma excelente forma de alargar a base de dados, abreviando a sua obtenção e beneficiando em simultâneo o avanço das medidas preventivas em ambas as espécies. Este estudo, focando-se num tipo específico de cancro, o linfoma não-Hodgkin, pretendeu contribuir para esse objetivo.

Não deixando de reconhecer que o tema merece a continuação da sua investigação, este estudo permitiu obter as seguintes conclusões principais:

1. O diagnóstico citológico, quando bem executado, é passível de fornecer informação suficiente para o delineamento terapêutico, permitindo, através de técnicas de imunocitoquímica, a caracterização necessária para esse fim.
2. Em ambos os fenótipos de linfoma canino (células B e células T) existem divergências entre o grau histológico e o índice proliferativo, permitindo concluir que ambas as características são importantes no estabelecimento do prognóstico e planeamento terapêutico individual.
3. Os cães que desenvolvem linfomas e coabitam com seres humanos de hábitos tabágicos tendem a ser afetados por linfomas com maiores índices proliferativos.

4. Foram confirmadas as influências previamente descritas das características intrínsecas como a idade, o peso e a raça.
5. Não foi possível demonstrar uma associação entre o desenvolvimento de linfoma canino e a existência de coabitantes humanos afetados pela doença. Admite-se que vieses resultantes de constrangimento ou receio de perda de confidencialidade possam ter influenciado as respostas ao questionário neste ponto. Um estudo baseado num método inverso, i. e. questionar pacientes oncológicos humanos sobre a existência de algum cão com neoplasia, poderá facilitar a exatidão da informação.
6. Existe uma correlação geográfica significativa entre as incidências de linfomas não-Hodgkin humanos e de linfomas caninos, sugerindo uma semelhança de fatores de risco ambientais e reforçando o papel dos cães como sentinelas de riscos para a saúde humana. Os maiores riscos, em ambas as espécies, foram predominantes nos principais centros urbanos do Grande Porto.
7. As prevalências de NHL humano no Grande Porto e na cidade de São Paulo demonstraram-se equivalentes, com predomínio dos mesmos fenótipos, enquanto em ambas as regiões foram identificadas maiores incidências caninas do tipo T do que as relatadas noutras regiões do globo.
8. Enquanto os maiores riscos de poluição ambiental em São Paulo se devem sobretudo à acumulação atmosférica de ozono, no Grande Porto é o radão que aparenta ser o maior problema. Saliente-se que vários dos outros poluentes monitorizados nas duas cidades apresentaram frequentemente concentrações preocupantes em ambos os municípios.
9. Aparenta ser possível a criação de um registo de cancro animal em Portugal com informação detalhada e padronizada que forneça dados para estudos epidemiológicos de larga escala e comparação com registos internacionais. A identificação das maiores dificuldades na sua operacionalização permitirá encontrar as melhores soluções para a sua implementação no terreno, colaboração do maior número possível de centros de atendimento veterinário e obtenção de dados úteis e rigorosos sem comprometer demasiado tempo e recursos no seu preenchimento.

Cabe aqui expressar o valor da continuidade deste trabalho. Muitos aspetos foram verificados e investigados e foi possível perceber que é uma área na qual muito trabalho precisa ainda ser realizado.

## 6. REFERÊNCIAS

---

1. Veloso, B., Nogueira, J.R., and Cardoso, M.F. (2012). Lung cancer and indoor radon exposure in the north of Portugal--an ecological study. *Cancer Epidemiol* 36, e26-32.
2. Schiffman, J.D., and Breen, M. (2015). Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with cancer. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370.
3. Reif, J.S. (2011). Animal sentinels for environmental and public health. *Public Health Rep* 126 Suppl 1, 50-57.
4. National Research Council. (1991). Animals as sentinels of environmental health hazards. In. (Washington, D.C., National Academy Press,), p 160.
5. Evans, B.R., and Leighton, F.A. (2014). A history of One Health. *Rev Sci Tech* 33, 413-420.
6. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136, 359-386.
7. Richards, K.L., and Suter, S.E. (2015). Man's best friend: what can pet dogs teach us about non-Hodgkin's lymphoma? *Immunol Rev* 263, 173-191.
8. Vail, D.M., Pinkerton, M.E., and Young, K.M. (2012). Canine lymphoma and lymphoid leukemia. In *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, S. Elseviers, ed., pp 608-638.
9. Ito, D., Frantz, A.M., and Modiano, J.F. (2014). Canine lymphoma as a comparative model for human non-Hodgkin lymphoma: recent progress and applications. *Vet Immunol Immunopathol* 159, 192-201.
10. Teske, E. (1994). Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma. *Vet Q* 16, 209-219.
11. Fournel-Fleury, C., Magnol, J.P., Bricaire, P., Marchal, T., Chabanne, L., Delverdier, A., Bryon, P.A., and Felman, P. (1997). Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodgkin's lymphomas. *J Comp Pathol* 117, 35-59.
12. Valli, T., Kiupel, M., and Bienzle, D. (2015). Hematopoietic system. In *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals*, M. Grant Maxie, ed. (Elsevier), pp 102-268.
13. Perry, A.M., Diebold, J., Nathwani, B.N., MacLennan, K.A., Muller-Hermelink, H.K., Bast, M., Boilesen, E., Armitage, J.O., and Weisenburger, D.D. (2016). Non-Hodgkin lymphoma in the developing world: review of 4539 cases from the International Non-Hodgkin Lymphoma Classification Project. *Haematologica* 101, 1244-1250.
14. Shan Neo, J.P., and Tan, B.H. (2017). The use of animals as a surveillance tool for monitoring environmental health hazards, human health hazards and bioterrorism. *Vet Microbiol* 203, 40-48.
15. Majkowska-Wojciechowska, B., and Kowalski, M.L. (2012). Allergens, Air Pollutants and Immune System Function in the Era of Global Warming. *Air Pollution - Monitoring, Modelling, Health and Control*.
16. Loomis, D., Huang, W., and Chen, G. (2014). The International Agency for Research on Cancer (IARC) evaluation of the carcinogenicity of outdoor air pollution: focus on China. *Chin J Cancer* 33, 189-196.
17. OMS. (2006). *Air quality Guidelines - Global Update 2005*.
18. Landmann, M.C. (2004). *Estimativa das Emissões de Poluentes dos Automóveis da RMSP Considerando as Rotas de Tráfego.*, Universidade de São Paulo, São Paulo.
19. Instituto Nacional de Estatística. (2011). *Censos 2011*.



20. Slezakova, K., Pires, J.C., Castro, D., Alvim-Ferraz, M.C., Delerue-Matos, C., Morais, S., and Pereira, M.C. (2013). PAH air pollution at a Portuguese urban area: carcinogenic risks and sources identification. *Environ Sci Pollut Res Int* 20, 3932-3945.
21. Michels, F.A.S., Simon, A., Sconza, I.A., Veneziano, D.B., and Latorre, M.R. (2011). Câncer em São Paulo 1997-2008: incidência, mortalidade e tendência de câncer no Município de São Paulo.
22. Gouveia, G.R., Siqueira, S.A., Fischer, D.A., and Pereira, C.J. (2011). Prevalence of non-Hodgkin lymphomas in São Paulo, Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 33, 315-322.
23. Kimura, K., Zanini, D., Nishiya, A., Dias, R., and Dagli, M. (2011). Morphology and Immunophenotypes of Canine Lymphomas: a Survey from the Service of Animal Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology* 4, 199-206.
24. Almeida, J.B. (2012). Contribuição para o estudo do linfoma no cão em Portugal: análise da casuística em dois centros de referência. Mestrado, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa.
25. Natterson-Horowitz, B., and Bowers, K. (2012). *Zoobiquity: what animals can teach us about health and the science of healing.*(Toronto: Doubleday Canada).
26. Thrusfield, M. (2005). *Veterinary Epidemiology.*
27. Burrell, G., and Seibert, F. (1914). Experiments with small animals and carbon monoxide. *J Ind Eng Chem*, 241-244.
28. Gulson, B., Korsch, M., Matisons, M., Douglas, C., Gillam, L., and McLaughlin, V. (2009). Windblown lead carbonate as the main source of lead in blood of children from a seaside community: an example of local birds as "canaries in the mine". *Environ Health Perspect* 117, 148-154.
29. Takeuchi, T., D'Itri, F.M., Fischer, P.V., Annett, C.S., and Okabe, M. (1977). The outbreak of Minamata disease (methyl mercury poisoning) in cats on Northwestern Ontario reserves. *Environ Res* 13, 215-228.
30. Kumar, V., Abbas, A.K., Aster, J.C., and Perkins, J.A. (2018). *Robbins basic pathology.*(Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier).
31. Von Pohl, G.F. (1932). *Les rayons terrestres: provocateurs de maladies et du cancer.*(Berlim).
32. Glickman, L.T., Domanski, L.M., Maguire, T.G., Dubielzig, R.R., and Churg, A. (1983). Mesothelioma in pet dogs associated with exposure of their owners to asbestos. *Environ Res* 32, 305-313.
33. Whitters, F.W. (1939). Squamous cell carcinoma of the tonsill in the dog. *J Pathol Bact* 49, 1429-1432.
34. Reif, J.S., Dunn, K., Ogilvie, G.K., and Harris, C.K. (1992). Passive smoking and canine lung cancer risk. *Am J Epidemiol* 135, 234-239.
35. Reynolds, P.M., Reif, J.S., Ramsdell, H.S., and Tessari, J.D. (1994). Canine exposure to herbicide-treated lawns and urinary excretion of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3, 233-237.
36. Backer, L.C., Grindem, C.B., Corbett, W.T., Cullins, L., and Hunter, J.L. (2001). Pet dogs as sentinels for environmental contamination. *Sci Total Environ* 274, 161-169.
37. National Research Council (U.S.). Committee on Animals as Monitors of Environmental Hazards. (1991). *Animals as sentinels of environmental health hazards / Committee on Animals as Monitors of Environmental Hazards, Board on Environmental Studies and Toxicology, Commission on Life Sciences, National Research Council.*(Washington, D.C.: National Academy Press).
38. OMS. (2016). *Ambient air pollution: a global assessmente of exposure and burden of disease.*

39. Loomis, D., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Baan, R., Mattock, H., Straif, K., et al. (2013). The carcinogenicity of outdoor air pollution. *Lancet Oncol* 14, 1262-1263.
40. Agência Portuguesa do Ambiente. (2016). QualAr - Base de dados Online sobre a Qualidade do Ar.
41. Governo do Estado de São Paulo. (2017). CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo.
42. Secretária Municipal de Planejamento. (2002). Atlas Ambiental do Município de São Paulo: fase I: diagnósticos e bases para a definição de políticas públicas para as áreas verdes no município de São Paulo.
43. Monteiro, A., Fonseca, L., Almeida, M., Sousa, M., Velho, S., and Carvalho, V. (2012). ATLAS DA SAÚDE E DA DOENÇA - Vulnerabilidades climáticas e socioeconômicas. Área Metropolitana do Porto. Concelho do Porto.(Portugal).
44. Bastonini, E., Verdone, L., Morrone, S., Santoni, A., Settimo, G., Marsili, G., La Fortezza, M., Di Mauro, E., and Caserta, M. (2011). Transcriptional modulation of a human monocytic cell line exposed to PM(10) from an urban area. *Environ Res* 111, 765-774.
45. Tizard, I.R. (2017). *Veterinary Immunology*.(St. Louis, Missouri: Elsevier).
46. Maxie, I., Grant, M. (2016). Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals.
47. Jaffe, E.S., Harris, N.L., Vardiman, J.W., Campo, E., and Arber, D.A. (2011). *Hematopathology*.(Elsevier).
48. Catelan, T.T., and Mesquita Jr., D. Linfócitos B: da imunobiologia aos imunobiológicos. *RBM - Revista Brasileira de Medicina*, 35-57.
49. Araújo, J.A., Caselan, T.T., Cruvinel, W.M., Mesquita-Jr.D, Silva, N.P., and Andrade, L.E. (2005). Linfócitos T: da imunobiologia aos imunobiológicos. *RBM - Revista Brasileira de Medicina*, 03-19.
50. Miranda, R.N., Khoury, J.D., and Medeiros, L.J. (2013). *Atlas of lymph node pathology*.(New York: Springer).
51. Rekhtman, N., and Bishop, J.A. (2011). *Quick Reference Handbook for Surgical Pathologists*.
52. Magrath, I.T. (2010). *The lymphoid neoplasm*.(CRC Press).
53. OMS. (2008). *WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*.(Lyon: IARC).
54. Fontaine, J., Heimann, M., and Day, M.J. (2010). Canine cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma: a review of 30 cases. *Vet Dermatol* 21, 267-275.
55. O'Brien, D., Moore, P.F., Vernau, W., Peauroi, J.R., Rebhun, R.B., Rodriguez, C.O., Jr., and Skorupski, K.A. (2013). Clinical characteristics and outcome in dogs with splenic marginal zone lymphoma. *J Vet Intern Med* 27, 949-954.
56. van Stee, L.L., Boston, S.E., Singh, A., Romanelli, G., Rubio-Guzman, A., and Scase, T.J. (2015). Outcome and Prognostic Factors for Canine Splenic Lymphoma Treated by Splenectomy (1995-2011). *Vet Surg* 44, 976-982.
57. Keller, S.M., Vernau, W., Hodges, J., Kass, P.H., Vilches-Moure, J.G., McElliot, V., and Moore, P.F. (2013). Hepatosplenic and hepatocytotropic T-cell lymphoma: two distinct types of T-cell lymphoma in dogs. *Vet Pathol* 50, 281-290.
58. Fry, M.M., Vernau, W., Pesavento, P.A., Bromel, C., and Moore, P.F. (2003). Hepatosplenic lymphoma in a dog. *Vet Pathol* 40, 556-562.
59. Vascellari, M., Multari, D., and Mutinelli, F. (2005). Unicentric extranodal lymphoma of the upper eyelid conjunctiva in a dog. *Vet Ophthalmol* 8, 67-70.
60. Dallman, M.J., and Saunders, G.K. (1986). Primary spinal cord lymphosarcoma in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 189, 1348-1349.
61. Geyer, N.E., Reichle, J.K., Valdes-Martinez, A., Williams, J., Goggin, J.M., Leach, L., Hanson, J., Hill, S., and Axam, T. (2010). Radiographic appearance of confirmed pulmonary lymphoma in cats and dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 51, 386-390.

62. Dhaliwal, R.S., Reed, A.L., and Kitchell, B.E. (2001). Multicentric lymphosarcoma in a dog with multiple-site skeletal involvement. *Vet Radiol Ultrasound* 42, 38-41.
63. Assin, R., Baldi, A., Citro, G., and Spugnini, E.P. (2008). Prostate as sole unusual recurrence site of lymphoma in a dog. *In Vivo* 22, 755-757.
64. Batchelor, D.J., Bright, S.R., Ibarrola, P., Tzannes, S., and Blackwood, L. (2006). Long-term survival after combination chemotherapy for bilateral renal malignant lymphoma in a dog. *N Z Vet J* 54, 147-150.
65. Kessler, M., Kandel-Tschiederer, B., Pfleghaar, S., and Tassani-Prell, M. (2008). Primary malignant lymphoma of the urinary bladder in a dog: longterm remission following treatment with radiation and chemotherapy. *Schweiz Arch Tierheilkd* 150, 565-569.
66. MacGregor, J.M., Faria, M.L., Moore, A.S., Tobias, A.H., Brown, D.J., and de Moraes, H.S. (2005). Cardiac lymphoma and pericardial effusion in dogs: 12 cases (1994-2004). *J Am Vet Med Assoc* 227, 1449-1453.
67. Kaldrymidou, E., Papaioannou, N., Poutahidis, T., Karayannopoulou, M., Gruys, E., Toliou, T., and Tsangaris, T. (2000). Malignant lymphoma in nasal cavity and paranasal sinuses of a dog. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 47, 457-462.
68. Zandvliet, M. (2016). Canine lymphoma: a review. *Vet Q* 36, 76-104.
69. Valli, V.E., San Myint, M., Barthel, A., Bienzle, D., Caswell, J., Colbatzky, F., Durham, A., Ehrhart, E.J., Johnson, Y., Jones, C., et al. (2011). Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria. *Vet Pathol* 48, 198-211.
70. Rappaport, H. (1966). *Atlas of Tumour Pathology*. (Washington, DC,: AFIP).
71. Lukes, R.J., and Collins, R.D. (1974). Immunologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer*, 1488–1503.
72. National Cancer Institute. (1982). The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project: National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. *Cancer*, 2112–2135.
73. Kiupel, M., Teske, E., and Bostock, D. (1999). Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. *Vet Pathol* 36, 292-300.
74. Ponce, F., Marchal, T., Magnol, J.P., Turinelli, V., Ledieu, D., Bonnefont, C., Pastor, M., Delignette, M.L., and Fournel-Fleury, C. (2010). A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. *Vet Pathol* 47, 414-433.
75. Ponce, F., Magnol, J.P., Ledieu, D., Marchal, T., Turinelli, V., Chalvet-Monfray, K., and Fournel-Fleury, C. (2004). Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. *Vet J* 167, 158-166.
76. Diebold, J., Kapanci, Y., Kelenyi, G., Lennert, K., Mioduszewska, O., Noel, H., Rilke, F., Stansfeld, A.G., Sundstrom, C., Van Unnik, J.A., et al. (1989). Updating of the Kiel classification of malignant non-Hodgkin lymphomas. *Ann Pathol* 9, 7-9.
77. Lennert, K. (1992). Non-Hodgkin's lymphomas: principles and application of the Kiel classification. *Verh Dtsch Ges Pathol* 76, 1-13.
78. Caniatti, M., Roccabianca, P., Scanziani, E., Paltrinieri, S., and Moore, P.F. (1996). Canine lymphoma: immunocytochemical analysis of fine-needle aspiration biopsy. *Vet Pathol* 33, 204-212.
79. Sapieryński, R., Kliczkowska-Klarowicz, K., Jankowska, U., and Jagielski, D. (2016). Cytodiagnosics of canine lymphomas - possibilities and limitations. *Pol J Vet Sci* 19, 433-439.
80. Sapieryński, R., Dolka, I., and Fabisiak, M. (2012). High agreement of routine cytopathology and immunocytochemistry in canine lymphomas. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 15.
81. Sapieryński, R. (2010). Practical aspects of immunocytochemistry in canine lymphomas. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 13, 661-668.

82. Harris, N., Jaffe, E., Stein, H., Banks, P., Chan, J., Cleary, M., Delsol, G., De Wolf-Peeters, C., Falini, B., Gatter, K., et al. (1994). A revised European-American classification of lymphoid neoplasma: a proposal for the international lymphoma study group. *Blood*, 1361–1392.
83. Flood-Knapik, K.E., Durham, A.C., Gregor, T.P., Sanchez, M.D., Durney, M.E., and Sorenmo, K.U. (2013). Clinical, histopathological and immunohistochemical characterization of canine indolent lymphoma. *Vet Comp Oncol* 11, 272-286.
84. Valli, V.E., Vernau, W., de Lorimier, L.P., Graham, P.S., and Moore, P.F. (2006). Canine indolent nodular lymphoma. *Vet Pathol* 43, 241-256.
85. Aresu, L., Martini, V., Rossi, F., Vignoli, M., Sampaolo, M., Arico, A., Laganga, P., Pierini, A., Frayssinet, P., Mantovani, R., et al. (2015). Canine indolent and aggressive lymphoma: clinical spectrum with histologic correlation. *Vet Comp Oncol* 13, 348-362.
86. Marconato, L. (2011). The staging and treatment of multicentric high-grade lymphoma in dogs: a review of recent developments and future prospects. *Vet J* 188, 34-38.
87. Altman, A. (2001). Acute tumor lysis syndrome. *Semin Oncol* 28, 3-8.
88. Lawrence, J., Vanderhoek, M., Barbee, D., Jeraj, R., Tumas, D.B., and Vail, D.M. (2009). Use of 3'-deoxy-3'-[18F]fluorothymidine PET/CT for evaluating response to cytotoxic chemotherapy in dogs with non-Hodgkin's lymphoma. *Vet Radiol Ultrasound* 50, 660-668.
89. Comazzi, S., Guscetti, F., and Marconato, L. (2014). First meeting of the European canine lymphoma group. Workshop: state of the art and comparative aspects in canine lymphoma. CH-Lugano, 22 June 2013. *Hematol Oncol* 32, 68-71.
90. Sapierzynski, R., Kliczkowska-Klarowicz, K., Jankowska, U., and Jagielski, D. (2016). Cytodiagnostics of canine lymphomas - possibilities and limitations. *Pol J Vet Sci* 19, 433-439.
91. Comazzi, S., Guscetti, F., and Marconato, L. (2014). First meeting of the European canine lymphoma group. Workshop: state of the art and comparative aspects in canine lymphoma. CH-Lugano, 22 June 2013. *Hematol Oncol* 32, 68-71.
92. Fernandes, N.C., Guerra, J.M., Ressio, R.A., Wasques, D.G., Etlinger-Colonelli, D., Lorente, S., Nogueira, E., and Daggi, M.L. (2016). Liquid-based cytology and cell block immunocytochemistry in veterinary medicine: comparison with standard cytology for the evaluation of canine lymphoid samples. *Vet Comp Oncol* 14 Suppl 1, 107-116.
93. Jankowska, U., Jagielski, D., Czopowicz, M., and Sapierzynski, R. (2015). The animal-dependent risk factors in canine T-cell lymphomas. *Vet Comp Oncol*, 1-8.
94. Wieczorek, T.J., and Wakely, P.E. (2014). Lymph Nodes. In *CYTOLOGY - Diagnostic Principles and Clinical Correlates*, S. Elseviers, ed. (
95. Zajdela, A., Zillhardt, P., and Voillemot, N. (1987). Cytological diagnosis by fine needle sampling without aspiration. *Cancer* 59, 1201-1205.
96. Carter, R.F., and Valli, V.E. (1988). Advances in the cytologic diagnosis of canine lymphoma. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 3, 167-175.
97. Peleteiro, M.C., Marcos, R., Santos, M., Correia, J., Pissarra, H., and Carvalho, T. (2011). *Atlas de citologia veterinária*.(Lidel).
98. Priest, H.L., Hume, K.R., Killick, D., Kozicki, A., Rizzo, V.L., Seelig, D., Snyder, L.A., Springer, N.L., Wright, Z.M., and Robot, C. (2016). The use, publication and future directions of immunocytochemistry in veterinary medicine: a consensus of the Oncology-Pathology Working Group. *Vet Comp Oncol*.
99. Burry, R.W. (2010). *Immunocytochemistry : a practical guide for biomedical research*.(New York: Springer).
100. Willmann, M., Mullauer, L., Guija de Arespachoga, A., Reifinger, M., Mosberger, I., and Thalhammer, J.G. (2009). Pax5 immunostaining in paraffin-embedded sections of canine non-Hodgkin lymphoma: a novel canine pan pre-B- and B-cell marker. *Vet Immunol Immunopathol* 128, 359-365.

101. Owen, L.N. (1980). TNM classification of tumours in domestic animals.(Geneve: World Health Organization).
102. Teske, E. (1994). [Malignant lymphomas in dogs: a review with reference to non-Hodgkin lymphoma in man]. *Tijdschr Diergeneeskd* 119, 705-717.
103. Valli, V.E., Kass, P.H., San Myint, M., and Scott, F. (2013). Canine lymphomas: association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival. *Vet Pathol* 50, 738-748.
104. Ribeiro, R.C., Aleixo, G.A., and Andrade, L.S. (2015). Linfoma canino - revisão de literatura. *Medicina Veterinária (UFRPE)* 9, 10-19.
105. Goodman, I.H., Moore, A.S., and Frimberger, A.E. (2016). Treatment of canine non-indolent T cell lymphoma using the VELCAP-TSC protocol: A retrospective evaluation of 70 dogs (2003-2013). *Vet J* 211, 39-44.
106. Ettinger, S.N. (2003). Principles of treatment for canine lymphoma. *Clin Tech Small Anim Pract* 18, 92-97.
107. Laing, E.J., Fitzpatrick, P.J., Binnington, A.G., Norris, A.M., Mosseri, A., Rider, W.D., Valli, V.E., and Baur, A. (1989). Half-body radiotherapy in the treatment of canine lymphoma. *J Vet Intern Med* 3, 102-108.
108. Brown, E.M., Ruslander, D.M., Azuma, C., Moore, A.S., Bengtson, A.E., Quesenberry, P.J., and Frimberger, A.E. (2006). A feasibility study of low-dose total body irradiation for relapsed canine lymphoma. *Vet Comp Oncol* 4, 75-83.
109. Marconato, L., Buracco, P., and Aresu, L. (2015). Perspectives on the design of clinical trials for targeted therapies and immunotherapy in veterinary oncology. *Vet J* 205, 238-243.
110. Marconato, L., Stefanello, D., Sabattini, S., Comazzi, S., Riondato, F., Laganga, P., Frayssinet, P., Pizzoni, S., Rouquet, N., and Aresu, L. (2015). Enhanced therapeutic effect of APAVAC immunotherapy in combination with dose-intense chemotherapy in dogs with advanced indolent B-cell lymphoma. *Vaccine* 33, 5080-5086.
111. Regan, D., Guth, A., Coy, J., and Dow, S. (2016). Cancer immunotherapy in veterinary medicine: Current options and new developments. *Vet J* 207, 20-28.
112. Warry, E.E., Willcox, J.L., and Suter, S.E. (2014). Autologous peripheral blood hematopoietic cell transplantation in dogs with T-cell lymphoma. *J Vet Intern Med* 28, 529-537.
113. Willcox, J.L., Pruitt, A., and Suter, S.E. (2012). Autologous peripheral blood hematopoietic cell transplantation in dogs with B-cell lymphoma. *J Vet Intern Med* 26, 1155-1163.
114. Merlo, D.F., Rossi, L., Pellegrino, C., Ceppi, M., Cardellino, U., Capurro, C., Ratto, A., Sambucco, P.L., Sestito, V., Tanara, G., et al. (2008). Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *J Vet Intern Med* 22, 976-984.
115. Dobson, J.M., Samuel, S., Milstein, H., Rogers, K., and Wood, J.L. (2002). Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J Small Anim Pract* 43, 240-246.
116. Villamil, J.A., Henry, C.J., Hahn, A.W., Bryan, J.N., Tyler, J.W., and Caldwell, C.W. (2009). Hormonal and sex impact on the epidemiology of canine lymphoma. *J Cancer Epidemiol* 2009, 591753.
117. Pastor, M., Chalvet-Monfray, K., Marchal, T., Keck, G., Magnol, J.P., Fournel-Fleury, C., and Ponce, F. (2009). Genetic and environmental risk indicators in canine non-Hodgkin's lymphomas: breed associations and geographic distribution of 608 cases diagnosed throughout France over 1 year. *J Vet Intern Med* 23, 301-310.
118. Ruple, A., Avery, A.C., and Morley, P.S. (2016). Differences in the geographic distribution of lymphoma subtypes in Golden retrievers in the USA. *Vet Comp Oncol*.

119. Priester, W.A. (1967). Canine lymphoma: relative risk in the boxer breed. *J Natl Cancer Inst* 39, 833-845.
120. Dobson, J.M. (2013). Breed-predispositions to cancer in pedigree dogs. *ISRN Vet Sci* 2013, 941275.
121. Edwards, D.S., Henley, W.E., Harding, E.F., Dobson, J.M., and Wood, J.L. (2003). Breed incidence of lymphoma in a UK population of insured dogs. *Vet Comp Oncol* 1, 200-206.
122. Czarnota, J., Gennings, C., Colt, J.S., De Roos, A.J., Cerhan, J.R., Severson, R.K., Hartge, P., Ward, M.H., and Wheeler, D.C. (2015). Analysis of Environmental Chemical Mixtures and Non-Hodgkin Lymphoma Risk in the NCI-SEER NHL Study. *Environ Health Perspect* 123, 965-970.
123. Bassig, B.A., Lan, Q., Rothman, N., Zhang, Y., and Zheng, T. (2012). Current understanding of lifestyle and environmental factors and risk of non-hodgkin lymphoma: an epidemiological update. *J Cancer Epidemiol* 2012, 978930.
124. Chihara, D., Nastoupil, L.J., Williams, J.N., Lee, P., Koff, J.L., and Flowers, C.R. (2015). New insights into the epidemiology of non-Hodgkin lymphoma and implications for therapy. *Expert Rev Anticancer Ther* 15, 531-544.
125. Muller, A.M., Ihorst, G., Mertelsmann, R., and Engelhardt, M. (2005). Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): trends, geographic distribution, and etiology. *Ann Hematol* 84, 1-12.
126. American Cancer Society. (2017). Non-Hodgkin Lymphoma Risk Factors. 2017.
127. Kane, E.V., Roman, E., Becker, N., Bernstein, L., Boffetta, P., Bracci, P.M., Cerhan, J.R., Chiu, B.C., Cocco, P., Costas, L., et al. (2012). Menstrual and reproductive factors, and hormonal contraception use: associations with non-Hodgkin lymphoma in a pooled analysis of InterLymph case-control studies. *Ann Oncol* 23, 2362-2374.
128. Momanyi, N.K.K., R.A.; Mutiga, R.E. (2016). One Health and cancer: A comparative study of human and canine cancers in Nairobi. *Int J One Health* 2, 42-57.
129. Yau, P., Dhand, N.K., Thomson, P.C., and Taylor, R.M. (2017). Retrospective study on the occurrence of canine lymphoma and associated breed risks in a population of dogs in NSW (2001-2009). *Aust Vet J* 95, 149-155.
130. Fisher, S.G., and Fisher, R.I. (2004). The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene* 23, 6524-6534.
131. Garabrant, D.H., and Philbert, M.A. (2002). Review of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) epidemiology and toxicology. *Crit Rev Toxicol* 32, 233-257.
132. Hayes, H.M., Tarone, R.E., Cantor, K.P., Jessen, C.R., McCurnin, D.M., and Richardson, R.C. (1991). Case-control study of canine malignant lymphoma: positive association with dog owner's use of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicides. *J Natl Cancer Inst* 83, 1226-1231.
133. Takashima-Uebelhoer, B.B., Barber, L.G., Zagarins, S.E., Procter-Gray, E., Gollenberg, A.L., Moore, A.S., and Bertone-Johnson, E.R. (2012). Household chemical exposures and the risk of canine malignant lymphoma, a model for human non-Hodgkin's lymphoma. *Environ Res* 112, 171-176.
134. DellaValle, C.T., Deziel, N.C., Jones, R.R., Colt, J.S., De Roos, A.J., Cerhan, J.R., Cozen, W., Severson, R.K., Flory, A.R., Morton, L.M., et al. (2016). Polycyclic aromatic hydrocarbons: determinants of residential carpet dust levels and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Causes Control* 27, 1-13.
135. Bertone, E.R., Snyder, L.A., and Moore, A.S. (2002). Environmental tobacco smoke and risk of malignant lymphoma in pet cats. *Am J Epidemiol* 156, 268-273.
136. Roza, M.R., and Viegas, C.A. (2007). The dog as a passive smoker: effects of exposure to environmental cigarette smoke on domestic dogs. *Nicotine Tob Res* 9, 1171-1176.

137. Knottenbelt, C.M., Bawazeer, S., Hammond, J., Mellor, D., and Watson, D.G. (2012). Nicotine hair concentrations in dogs exposed to environmental tobacco smoke: a pilot study. *J Small Anim Pract* 53, 623-626.
138. Reif, J.S., Lower, K.S., and Ogilvie, G.K. (1995). Residential exposure to magnetic fields and risk of canine lymphoma. *Am J Epidemiol* 141, 352-359.
139. Verkasalo, P.K. (1996). Magnetic fields and leukemia--risk for adults living close to power lines. *Scand J Work Environ Health* 22 Suppl 2, 1-56.
140. Verkasalo, P.K., Pukkala, E., Kaprio, J., Heikkila, K.V., and Koskenvuo, M. (1996). Magnetic fields of high voltage power lines and risk of cancer in Finnish adults: nationwide cohort study. *BMJ* 313, 1047-1051.
141. Valjus, J., Hongisto, M., Verkasalo, P., Jarvinen, P., Heikkila, K., and Koskenvuo, M. (1995). Residential exposure to magnetic fields generated by 110-400 kV power lines in Finland. *Bioelectromagnetics* 16, 365-376.
142. Verkasalo, P.K., Pukkala, E., Hongisto, M.Y., Valjus, J.E., Jarvinen, P.J., Heikkila, K.V., and Koskenvuo, M. (1993). Risk of cancer in Finnish children living close to power lines. *BMJ* 307, 895-899.
143. Ha, M., Hwang, S.S., Kang, S., Park, N.W., Chang, B.U., and Kim, Y. (2017). Geographical Correlations between Indoor Radon Concentration and Risks of Lung Cancer, Non-Hodgkin's Lymphoma, and Leukemia during 1999-2008 in Korea. *Int J Environ Res Public Health* 14.
144. Gavazza, A., Presciuttini, S., Barale, R., Lubas, G., and Gugliucci, B. (2001). Association between canine malignant lymphoma, living in industrial areas, and use of chemicals by dog owners. *J Vet Intern Med* 15, 190-195.
145. Zanini, D., Kimura, K., Nishiya, A., Ubukata, R., Leandro, R., Brito, C., Trombetti, M., Lagoa, A., Macedo, T., Rodrigues, L., et al. (2013). Environmental risk factors related to the development of canine non-Hodgkin's lymphoma. *Ciência Rural* 43, 1302-1308.
146. Marconato, L., Leo, C., Girelli, R., Salvi, S., Abramo, F., Bettini, G., Comazzi, S., Nardi, P., Albanese, F., and Zini, E. (2009). Association between waste management and cancer in companion animals. *J Vet Intern Med* 23, 564-569.
147. Paz, S., Linn, S., Portnov, B.A., Lazimi, A., Futerman, B., and Barchana, M. (2009). Non-Hodgkin Lymphoma (NHL) linkage with residence near heavy roads--a case study from Haifa Bay, Israel. *Health Place* 15, 636-641.
148. Kimura, K.C., de Almeida Zanini, D., Nishiya, A.T., and Dagli, M.L. (2013). Domestic animals as sentinels for environmental carcinogenic agents. *BMC Proc* 7 Suppl 2, K13.
149. Viel, J.F., Floret, N., Deconinck, E., Focant, J.F., De Pauw, E., and Cahn, J.Y. (2011). Increased risk of non-Hodgkin lymphoma and serum organochlorine concentrations among neighbors of a municipal solid waste incinerator. *Environ Int* 37, 449-453.
150. Bassig, B.A., Lan, Q., Rothman, N., Zhang, Y., and Zheng, T. (2012). Current understanding of lifestyle and environmental factors and risk of non-hodgkin lymphoma: an epidemiological update. *J Cancer Epidemiol* 2012, 978930.
151. Budroni, M., Sechi, O., Cesaraccio, R., Pirino, D., Fadda, A., Grottin, S., Flore, M.V., Sale, P., Satta, G., Cossu, A., et al. (2010). [Cancer incidence among petrochemical workers in the Porto Torres industrial area, 1990-2006]. *Med Lav* 101, 189-198.
152. Schollkopf, C., Melbye, M., Munksgaard, L., Smedby, K.E., Rostgaard, K., Glimelius, B., Chang, E.T., Roos, G., Hansen, M., Adami, H.O., et al. (2008). *Borrelia* infection and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 111, 5524-5529.
153. Romano, F.R., Heinze, C.R., Barber, L.G., Mason, J.B., and Freeman, L.M. (2016). Association between Body Condition Score and Cancer Prognosis in Dogs with Lymphoma and Osteosarcoma. *J Vet Intern Med* 30, 1179-1186.

154. Wolk, A., Gridley, G., Svensson, M., Nyren, O., McLaughlin, J.K., Fraumeni, J.F., and Adam, H.O. (2001). A prospective study of obesity and cancer risk (Sweden). *Cancer Causes Control* 12, 13-21.
155. Geyer, S.M., Morton, L.M., Habermann, T.M., Allmer, C., Davis, S., Cozen, W., Severson, R.K., Lynch, C.F., Wang, S.S., Maurer, M.J., et al. (2010). Smoking, alcohol use, obesity, and overall survival from non-Hodgkin lymphoma: a population-based study. *Cancer* 116, 2993-3000.
156. Willett, E.V., Morton, L.M., Hartge, P., Becker, N., Bernstein, L., Boffetta, P., Bracci, P., Cerhan, J., Chiu, B.C., Cocco, P., et al. (2008). Non-Hodgkin lymphoma and obesity: a pooled analysis from the InterLymph Consortium. *Int J Cancer* 122, 2062-2070.
157. Larsson, S.C., and Wolk, A. (2011). Body mass index and risk of non-Hodgkin's and Hodgkin's lymphoma: a meta-analysis of prospective studies. *Eur J Cancer* 47, 2422-2430.
158. Zhang, S.M., Hunter, D.J., Rosner, B.A., Giovannucci, E.L., Colditz, G.A., Speizer, F.E., and Willett, W.C. (2000). Intakes of fruits, vegetables, and related nutrients and the risk of non-Hodgkin's lymphoma among women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9, 477-485.
159. Ekstrom-Smedby, K. (2006). Epidemiology and etiology of non-Hodgkin lymphoma--a review. *Acta Oncol* 45, 258-271.
160. Ferlay, F., Bray, P., Pisani, P., and Parkin, D.M. (2001). Globocan. *Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide*. In. (Lyon, IARC).
161. Fundação Francisco Manuel dos Santos. (2016). PORDATA - Base de dados de Portugal contemporâneo.
162. RORENO. (2016). Registo Oncológico Nacional 2010. In. (Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil - EPE).
163. EUCAN. (2012). Non-Hodgkin Lymphoma - Estimated incidence, mortality & prevalence for both sexes, 2012.
164. Instituto Nacional de Estatística. (2001). Censos 2001 - Portugal. In. (Portugal).
165. Associação Automóvel de Portugal. (2010). Estatísticas - Parque automóvel em circulação em Portugal. 2017.
166. Barros, N., Brás, C., and Fontes, T. (2004). Impacte na qualidade do ar na saúde pública das grandes linhas de tráfego. *Revista da Faculdade de Ciência e Tecnologia*, 139-142.
167. Instituto Nacional do Cancer. (2016). Estatística do Câncer. In. (Rio de Janeiro).
168. Nodtvedt, A., Berke, O., Bonnett, B.N., and Bronden, L. (2012). Current status of canine cancer registration - report from an international workshop. *Vet Comp Oncol* 10, 95-101.
169. Wagner, G. (1991). History of cancer registration. *IARC Sci Publ*, 3-6.
170. Tedardi, M.V., Veneziano, D.B., Kimura, K.C., Pedra-Mendonca, P., Biondi, L.R., Grandi, F., Latorre Mdo, R., and Dagli, M.L. (2015). Sao Paulo Animal Cancer Registry, the first in Latin America. *Vet Comp Oncol* 13, 154-155.
171. Willmann, M., Mullauer, L., Guija de Arespacochaga, A., Reifinger, M., Mosberger, I., and Thalhammer, J.G. (2009). Pax5 immunostaining in paraffin-embedded sections of canine non-Hodgkin lymphoma: a novel canine pan pre-B- and B-cell marker. *Vet Immunol Immunopathol* 128, 359-365.
172. Gavazza, A., Presciuttini, S., Barale, R., Lubas, G., and Gugliucci, B. (2001). Association between canine malignant lymphoma, living in industrial areas, and use of chemicals by dog owners. *J Vet Intern Med* 15, 190-195.
173. Kimura, K.C. (2012). Linfoma canino: o papel do meio ambiente. PhD, Universidade de São Paulo, São Paulo.
174. Vezzali, E., Parodi, A.L., Marcato, P.S., and Bettini, G. (2010). Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-Hodgkin lymphoma according to the WHO. *Vet Comp Oncol* 8, 38-49.



175. Chiu, B.C., and Hou, N. (2015). Epidemiology and etiology of non-hodgkin lymphoma. *Cancer Treat Res* 165, 1-25.
176. Marconato, L., Gelain, M.E., and Comazzi, S. (2013). The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma: a review. *Hematol Oncol* 31, 1-9.
177. Carrasco, V., Rodriguez-Bertos, A., Rodriguez-Franco, F., Wise, A.G., Maes, R., Mullaney, T., and Kiupel, M. (2015). Distinguishing Intestinal Lymphoma From Inflammatory Bowel Disease in Canine Duodenal Endoscopic Biopsy Samples. *Vet Pathol* 52, 668-675.
178. Sonnenschein, E.G., Glickman, L.T., Goldschmidt, M.H., and McKee, L.J. (1991). Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: a case-control study. *Am J Epidemiol* 133, 694-703.
179. Precioso, J., Araújo, A.C., Machado, J., Samorinha, C., Becoña, E., Ravara, S.B., Vitória, P., Rosas, M., Bonito, J., and Antunes, H. (2012). Exposição das Crianças ao Fumo Ambiental do Tabaco em Casa e no Carro. *Millenium*, 7-25.
180. OMS. (2017). Global Adult Tobacco Survey (GATS). 2014, The Global Adult Tobacco Survey (GATS) is a nationally representative household survey that was launched in February 2007 as a new component of the ongoing Global Tobacco Surveillance System (GTSS).
181. Pan, S.Y., Mao, Y., Ugnat, A.M., and Canadian Cancer Registries Epidemiology Research, G. (2005). Physical activity, obesity, energy intake, and the risk of non-Hodgkin's lymphoma: a population-based case-control study. *Am J Epidemiol* 162, 1162-1173.
182. Boyle, T., Gallagher, R.P., Gascoyne, R.D., Connors, J.M., Le, N.D., and Spinelli, J.J. (2015). Lifetime physical activity and the risk of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 24, 873-877.
183. Shivappa, N., Hebert, J.R., Taborelli, M., Montella, M., Libra, M., Zucchetto, A., Crispo, A., Grimaldi, M., La Vecchia, C., Serraino, D., et al. (2017). Dietary inflammatory index and non-Hodgkin lymphoma risk in an Italian case-control study. *Cancer Causes Control* 28, 791-799.
184. Odabasi, M. (2008). Halogenated volatile organic compounds from the use of chlorine-bleach-containing household products. *Environ Sci Technol* 42, 1445-1451.
185. Ganjre, A.P., and Sarode, G.S. (2016). Third hand smoke--A hidden demon. *Oral Oncol* 54, e3-4.
186. Sergentanis, T.N., Kanavidis, P., Michelakos, T., and Petridou, E.T. (2013). Cigarette smoking and risk of lymphoma in adults: a comprehensive meta-analysis on Hodgkin and non-Hodgkin disease. *Eur J Cancer Prev* 22, 131-150.
187. Feizi, A.A., and Arabi, M.A. (2007). Acute childhood leukemias and exposure to magnetic fields generated by high voltage overhead power lines - a risk factor in Iran. *Asian Pac J Cancer Prev* 8, 69-72.
188. Sohrabi, M.R., Tarjoman, T., Abadi, A., and Yavari, P. (2010). Living near overhead high voltage transmission power lines as a risk factor for childhood acute lymphoblastic leukemia: a case-control study. *Asian Pac J Cancer Prev* 11, 423-427.
189. Comissão de Coordenação de Desenvolvimento Regional do Norte. (2011). Evolução da qualidade do na Região Norte e aplicação de medidas de melhoria (2005-2010).
190. Carvalho, F. (2010). RADÃO E EDIFÍCIOS. Qualidade do ar interior. In. (Instituto Tecnológico e Nuclear, Departamento de Protecção Radiológica e Segurança Nuclear), pp 127-135.
191. OMS. (2011). Environmental and occupational cancers.
192. Santos, M.S.S., W.V.;. (2007). Introdução à Estatística Espacial para a Saúde Pública.
193. Gonçalves, F.M. (2013). Avaliação do ozono troposférico em Portugal - Análise Integradora. Universidade de Aveiro.

194. Silva, A.A. (2005). Radônio e filhos em residências da cidade de São Paulo. Doutorado, Universidade de São Paulo.
195. Marconato, L., Leo, C., Girelli, R., Salvi, S., Abramo, F., Bettini, G., Comazzi, S., Nardi, P., Albanese, F., and Zini, E. (2009). Association between waste management and cancer in companion animals. *J Vet Intern Med* 23, 564-569.
196. Vanasse, G.J., Concannon, P., and Willerford, D.M. (1999). Regulated genomic instability and neoplasia in the lymphoid lineage. *Blood* 94, 3997-4010.
197. DeGregori, J. (2017). Connecting Cancer to Its Causes Requires Incorporation of Effects on Tissue Microenvironments. *Cancer Res* 77, 6065-6068.

## 7. ANEXOS

---

- Questionário Epidemiológico
- Posters apresentados no Congresso da ESVONC – 2017
- Poster apresentado no Congressos GEOMED - 2017

**Questionário Epidemiológico**  
**Linfoma Canino: Portugal x Brasil – O papel do ambiente**

Clínica Veterinária ou Hospital: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

1. Nome do Proprietário:

2. Telefone para Contacto:

3. Nome do Cão:

4. Raça:

5. Idade

6. Data de nascimento:

7. Endereço:  Apartamento  Moradia

8. Código Postal

9. Localidade

10. Concelho

11. Distrito:

12. Habilitações literárias:

- Nunca estudou
- Até o 4º ano (1º ciclo)
- Até ao 6º ano (2º ciclo)
- Até ao 9º ano (3º ciclo)
- Até ao 12º ano (Secundário)
- Ensino Superior (Universidade)

13. Qual o seu grau de proximidade com o cão?

- É proprietário e cuidador direto do animal
- É proprietário mas não o cuidador direto do animal
- Não é proprietário mas é o cuidador direto do animal
- Apenas convive com o animal (familiar ou funcionário do cuidador)
- Outro: \_\_\_\_\_

14. Sexo do Animal:

- Fêmea
- Fêmea castrada no ano de \_\_\_\_\_
- Macho
- Macho castrado no ano de \_\_\_\_\_

15. Como foi adquirido o seu cão?

- Comprado numa petshop
- Comprado num criador
- Adotado de um canil/associação
- Encontrado na rua  Não sei
- Outro: \_\_\_\_\_

16. Qual era a idade do seu cão quando foi adquirido?

- Cachorro (até 1 ano de idade)
- Adulto
- Sénior (mais de 7 anos de idade)

17. Peso do animal: \_\_\_\_\_ kgs

- < 10kg  10-25kg  > 25kg

18. O seu cão pode ser considerado:

- Magro  Abaixo de peso
- Normal  Excesso de peso
- Obeso  Não sei



19. Qual o tipo de pelo do seu cão?

- Comprido  Médio  Curto

20. O nariz do seu cão é:

- Comprido  Médio  Curto



21. O seu cão bebe água proveniente de:

(Pode marcar mais de uma resposta)

- Torneira  Engarrafada  Piscina
- Chuva  Lago  Rio  Poço
- Outros: \_\_\_\_\_

22. Qual o tipo de comida que seu cão come **mais frequentemente?**

- Caseira  Comercial
- Seca  Húmida
- Marca: \_\_\_\_\_

23. Em que tipo de recipiente o seu cão come?  
(Pode marcar mais de uma resposta)  
 Vidro  Cerâmica  Inox  Plástico  
 Barro  Outro: \_\_\_\_\_
24. O seu cão come frutas e/ou vegetais crus?  
 Nunca  Raramente  Ocasionalmente  
 Frequentemente  Todos os dias  Não sei
25. O seu cão pratica atividade física (passeios, jogos, etc) com que frequência?  
 Nunca  1x/semana  2x/semana  
 3x/semana  Mais de 3x/semana
26. Qual o nível de atividade do seu cão?  
 Muito calmo/sedentário  Calmo  
 Ativo  Muito ativo  Não sei
27. O seu cão apresenta pelo menos um destes sinais quando fica sozinho: vocalizações, destruições, micções ou defecações em casa?  
 Não  Raramente  Ocasionalmente  
 Frequentemente  Não sei
28. Qual a frequência de banhos que o seu cão toma?  
 Menos de 1x/mês  1x/mês  2-3x/mês  
 Todas as semanas  Não sei
29. Há quanto tempo o seu cão vive no mesmo endereço?  
 \_\_\_\_ anos \_\_\_\_ meses; Data do início: \_\_\_\_\_
30. O seu cão vive a maior parte da sua vida em área:  
 Urbana  Rural
31. Qual o tamanho da vossa habitação? \_\_\_\_\_ m<sup>2</sup>  
 T0  T1  T2  T3  T4  T5  > T6
32. O seu cão vive:  
 Apenas dentro de casa  
 Dentro de casa e quintal/jardim  
 Apenas no quintal/ jardim
33. Assinale quais as áreas a que seu cão tem acesso.  
 Em toda a casa  Carro  
 Varandas  Casa de banho  Cozinha  
 Sala de jantar  Sala de estar  Quartos
34. O interior da casa tem:  
(Pode marcar mais de uma resposta)  
 Alcatifa  Piso de madeira  Piso cerâmico  
 Tapetes  Cortinados
35. O quintal/jardim da sua casa tem:  
(Pode marcar mais de uma resposta)  
 Cimento  Piso cerâmico  Horta  
 Relva  Plantas ornamentais  
 Terra apenas  Outros (Ex<sup>o</sup> árvores): \_\_\_\_\_  
 Não tenho quintal/jardim
36. Quanto tempo o seu cão fica fora de casa durante o verão?  
 Nunca  Raramente  Ocasionalmente  
 Frequentemente  Todos os dias
37. Quanto tempo o seu cão fica fora de casa durante o inverno?  
 Nunca  Raramente  Ocasionalmente  
 Frequentemente  Todos os dias
38. O seu cão tem acesso a parques/jardins públicos?  
 Nunca  Raramente  Ocasionalmente  
 Frequentemente  Todos os dias  
 Qual? \_\_\_\_\_
39. O seu cão vive a menos de 100 metros de uma rua/estrada movimentada?  
 Não  Sim  
 Qual o nome da rua: \_\_\_\_\_
40. Costuma haver engarrafamentos nessa rua/estrada?  
 Nunca  Raramente  Ocasionalmente  
 Frequentemente  Todos os dias
41. Qual o volume de tráfego nessa rua/estrada?  
 Leve: ≤ 1 carro por minuto  
 Moderado: 1 carro a cada 30 segundos  
 Intenso: ≥ 1 carro a cada segundo
42. O volume de tráfego referido na questão anterior é:  
 Durante todo o dia.  
 Somente nos horários de ponta  
 Não sei
43. O seu cão vive a menos de 1 Km de torres de alta tensão ou antenas de rádio/telecomunicações?  
 Não  Sim  Não sei
44. Costuma acender a lareira ou utilizar fogões a lenha no local onde o cão vive?  
 Nunca  Raramente  Ocasionalmente  
 Frequentemente  Apenas nos meses de inverno  
 Não sei

45. Costumam ocorrer queimadas próximo do local em que o cão vive?

- Não  Raramente  Ocasionalmente  
 Frequentemente  Não sei

46. O seu cão tem acesso a produtos de construção (por ex.: tintas, solventes, vernizes, lacas, amianto)?

- Nunca  Raramente  Ocasionalmente  
 Frequentemente  Não sei  
 Qual material? \_\_\_\_\_

47. O seu cão tem contacto com herbicidas?

- Nunca  Raramente  Ocasionalmente  
 Frequentemente  Não sei  
 Qual produto? \_\_\_\_\_

48. O seu cão tem contacto com fungicidas (para eliminar fungos ou doenças causadas por fungos)?

- Nunca  Raramente  Ocasionalmente  
 Frequentemente  Não sei  
 Qual produto? \_\_\_\_\_

49. Utiliza inseticidas no local onde vive o seu cão?

- Nunca  Raramente  Ocasionalmente  
 Frequentemente  Não sei  
 Qual produto? \_\_\_\_\_

50. Utiliza raticidas (produto para eliminar ratos) no local onde vive o seu cão?

- Nunca  Raramente  Ocasionalmente  
 Frequentemente  Não sei  
 Qual produto? \_\_\_\_\_

51. Costuma utilizar produtos com lixívia e/ou amoníaco onde o seu cão circula?

- Nunca  Raramente  Ocasionalmente  
 Frequentemente  Não sei  
 Qual produto? \_\_\_\_\_

52. Utiliza incensos, velas, fragrâncias ou óleos perfumados onde o animal vive?

- Nunca  Raramente  Ocasionalmente  
 Frequentemente  Não sei

53. Alguém que tenha contacto com o cão trabalha em:

- Indústria (Qual? \_\_\_\_\_)  
 Construção civil  
 Pintura de automóveis  
 Agricultura  
 Marcenaria/Carpintaria  
 Nenhuma das alternativas anteriores

54. Na casa onde o cão vive há fumadores ou ex-fumadores?

- Não  
 Sim

(Se respondeu não a essa questão pode passar para a questão 60)

55. Quantos fumadores ou ex-fumadores há na casa onde o cão vive?

- 0  1  2  3  4  5  >6

### Hábitos Tabágicos

Estas questões foram elaboradas para poder medir a exposição dos cães ao Fumo Ambiental de Tabaco nos seus domicílios e no veículo onde costumam ser transportados. Para poder realizar esse estudo, pedimos-lhe para responder as próximas questões, com franqueza, sobre todas as pessoas que **fumam** atualmente ou **fumaram** e que habitam no mesmo domicílio que o cão.

56. Preencha o quadro sobre o número de cigarros que os membros do agregado familiar **fumam ou fumavam por dia**.

Pessoa do agregado familiar	Número de cigarros/dia			
	<10	11-20	21-30	>31
Pessoa 1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pessoa 2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pessoa 3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pessoa 4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pessoa 5	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

57. Assinalar os anos em que os membros do agregado familiar **fumam ou fumaram**.

Pessoa do agregado familiar	Período que fumam ou fumaram						
	2005 a 2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Pessoa 1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pessoa 2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pessoa 3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pessoa 4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pessoa 5	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

58. Em que locais se costuma fumar?

(Pode marcar mais de uma resposta)

- Somente no exterior da casa  
 Varandas  Jardim  Cozinha  
 Sala de jantar  Sala de estar  
 Casa de banho  Quartos  À janela  
 Em toda a casa  Carro

59. O seu cão está em contacto próximo quando fumam ou fumavam?

- Nunca  Raramente  Ocasionalmente  
 Frequentemente  Todos os dias

60. Alguém em casa tem ou teve algum tipo de cancro?

(Resposta não obrigatória)

- Não  Sim Qual? \_\_\_\_\_  Não sei

Para as próximas questões, se não souber pergunte ao seu veterinário

61. O seu cão é vacinado:

- Sim, está com todas as vacinas em dia (Esgana, Hepatite contagiosa, Parvovirose, Leptospirose, Raiva)  
 Sim, mas está com as vacinas em atraso  
 Sim, mas apenas a vacina da Raiva  
 Não, nunca foi vacinado.

62. Que tipo de antiparasitário externo costuma utilizar no seu cão?

Nome: \_\_\_\_\_

Método:  Pipeta *Spot on*  Spray  Colar  
 Pó  Banho  Comprimidos

Frequência: \_\_\_\_\_x/ano

Não utilizo

63. O seu cão já teve carraças?

- Não, nunca  
 Sim, ocasionalmente  
 Sim, frequentemente  
 Não sei

64. O seu cão foi diagnosticado com linfoma?

- Não  Sim

65. Se respondeu *SIM* à questão anterior, qual foi o tempo decorrido entre os primeiros sinais que o levaram a preocupar-se e o diagnóstico veterinário de linfoma?

- 1 semana  2 semanas  
 1 mês  2 meses  3 a 6 meses  
 Mais de 6 meses  Não sei

66. O seu cão teve ou tem algum outro tipo de tumor?

Não  Sim Qual? \_\_\_\_\_

Data do diagnóstico: \_\_\_\_\_

Tratamento:

- Cirurgia  Quimioterapia  
 Paliativo  Outros \_\_\_\_\_

67. O seu cão toma algum medicamento e/ou suplemento alimentar?

- Não  
 Sim Qual? \_\_\_\_\_  
Há quanto tempo: \_\_\_\_\_

68. Existe algum cão com linfoma na vizinhança ou na família do seu cão?

- Não  Sim  
 Não sei

69. Acha que o seu cão está exposto a alguma causa específica que poderia provocar um tumor?

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

#### APENAS PARA CÃES COM LINFOMA

(Senão souber, por favor pergunte ao veterinário)

##### •Localização:

- Multicêntrico  Gástrico ou intestinal  
 Mediastinal  Cutâneo  
 Extra Nodal (renal, neurológico, ocular, ósseo, articular, etc.)

##### • Estadiamento:

- I – apenas um linfonodo envolvido.  
 II – Envolvimento de múltiplos linfonodos superficiais, com ou sem envolvimento das amígdalas.  
 III - Linfadenomegalia generalizada (todos os linfonodos envolvidos).  
 IV – Envolvimento de fígado e/ou baço, com ou sem linfadenomegalia generalizada.  
 V – Envolvimento de sangue, medula óssea e outros órgãos (olho, pele, etc.)


##### • Sub-estádios:

- a – Qualquer estádio sem sinais clínicos sistémicos.  
 b – Qualquer estádio com sinais clínicos sistémicos.

*Autoriza ser contactado posteriormente para esclarecimentos que se façam necessários?*

- Não  
 Sim Contacto: \_\_\_\_\_

MUITO OBRIGADO PELA PARTICIPAÇÃO!




**U. PORTO**  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS  
BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR  
UNIVERSIDADE DO PORTO

# Immunocytochemical study of canine lymphomas:

a practical and reliable tool in classification, proliferation assessment, prognosis and search  
for risk factors

**Pinello, KC<sup>1</sup>; Santos, M<sup>2</sup>; Leite-Martins, L<sup>1</sup>; Niza-Ribeiro, J<sup>3,4</sup>; de Matos, AJ<sup>1-5</sup>**



**CAPES**

<sup>1</sup>Department of Clinical Sciences; <sup>2</sup>Department of Microscopy; <sup>3</sup>Department of Population Studies – ICBAS – University of Porto; <sup>4</sup>EPIUnit – Institute of Health Public – ISPUP – University of Porto; <sup>5</sup>Animal Science and Study Centre, Food and Agrarian Sciences and Technologies Institute, University of Porto, Porto, Portugal

**Introduction**

Lymphomas are a widely heterogeneous group that includes several subtypes with distinct clinical and epidemiological characteristics and represents one of the most common neoplasms of the dog. Often due to financial availability, **CYTOLOGY** is the main choice for the diagnostic and **immunocytochemistry (ICC)** is not routinely included in the diagnostic approach of canine lymphomas. The updated **Kiel classification** categorizes lymphomas according to their phenotypes (B or T) and malignant grades (low or high), representing an **important prognostic tool**. Survival variations within given categories suggest that individual accurate prognosis may benefit from additional evaluations, such as the proliferative activity (**Ki67 index**).

Epidemiological studies of companion animals have been increasing, presenting the **dog as sentinels** of potential risk factors for human health, mainly due to shared environments, shorter disease latency and spontaneous disease. Little is known about the effects of **second- and thirdhand smoking** on canine lymphomas.

*The aims of this study were to demonstrate the potential value of the immunocytochemical evaluation of canine lymphomas, and to relate the subtype and proliferation with environmental factors, including tobacco smoke.*

**Materials and Methods**

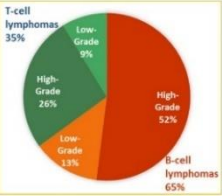
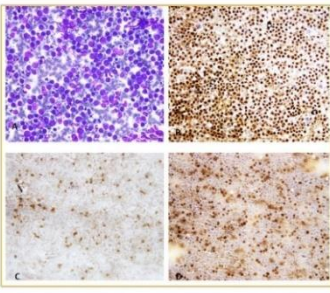
Carefully performed fine-needle aspirations biopsies (FNAB) were obtained from enlarged lymph nodes of **23 dogs** with lymphoma.

The smears were air-dried, stained for diagnosis, and fixed with cold acetone to proceed to immunocytochemistry using **CD3, PAX5** and **Ki-67** with Novolink Polymer® (Leica Byosystems), an indirect immunoperoxidase staining technique and counting 300 cells on each slide.

The owners were asked to complete an epidemiologic questionnaire which included questions about environmental characteristics.

**Results**

⇒ B-cell: 65% (15/23)  
 ⇒ T-cell: 35% (8/23)  
 ⇒ 8 morphological subtypes:  
 ⇒ **Ki67 Index** (17 cases)  
 Low: ≤20%; Moderate: 21-59%;  
 High: ≥60%

Classification	%Ki67 Index	Classification	%Ki67 Index
<b>B-cell High-Grade</b>		<b>T-cell High-Grade</b>	
Centroblastic large cell	48%	Lymphoblastic	8%
Centroblastic monom.	51%	Pleomorphic mixed	56%
Centroblastic monom.	51%	Pleomorphic mixed	61%
Centroblastic monom.	88%	Pleomorphic mixed	87%
Centroblastic pleom.	31%		
Centroblastic pleom.	89%		
Centroblastic pleom.	95%		
Immunoblastic	83%		
<b>B-cell Low-grade</b>		<b>T-cell Low-grade</b>	
Centroblastic/centroc	20%	Small clear cell	20%
Centroblastic/centroc	40%	Small clear cell	85%
Centroblastic/centroc	42%		

**B-cell centroblastic/centrocytic lymphoma from a three years old mongrel female dog. FNAB from enlarged prescapular lymph node.**  
 A – medium to large lymphoid cells admixed with very few mature lymphocytes Hemacolor, x400; B – **PAX5** (x200); C – **CD3** (x200); D – **Ki67** - moderate index: 40% (x200).

**Discussion**


- The simple diagnosis of lymphoma is of limited value for the clinical management of patients or the conduction of epidemiological studies.
- Different Ki67 indexes within the same subtype

+

- Current chemotherapy yields better results in highly proliferating tumors

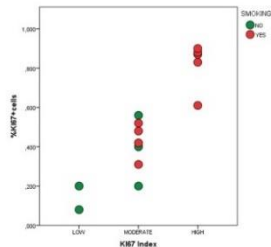
↓

- Subtyping and grading can be misleading as prognostic and predictive indicators if not complemented with proliferation markers.

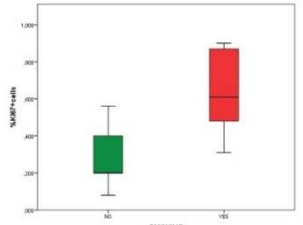


**Exposure to second- and thirdhand smoke may be considered a hazardous factor for dogs with lymphoma by enhancing their proliferative activity.**

**Tobacco exposure**



The ANOVA test confirmed a significant difference (P = 0.011) of the mean percentage of Ki67+ cells between the groups "no smoker owners" (X=0.28; SD= 0.19) and "smoker owners" (X=0.64; SD=0.22).



Pairwise comparison between all variables revealed a statistically significant positive correlation between the **Ki67 index and owner smoking status** (r=0.67, P = 0.009)

**The authors wish to thank**  
 Hugo Gregório - Centro Hospitalar Veterinário **CHV**  
 Gonçalo Petrucci - Hospital Veterinário do Porto **HVP**  
 Filipe Oliveira -H.Vet Referência Montenegro **HVRM**  
 Hugo Carvalho and Nazaré Pinto da Cunha **CEDIVET**

This research was supported by an international PhD fellowship from **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) - Brazil (CSF 0342-13-0).



# Histopathological classification and immunophenotyping of canine lymphomas in Porto – Portugal: a survey

Pinello, KC<sup>1</sup>; Santos, M<sup>2</sup>; Dias-Pereira, P<sup>3</sup>; Niza-Ribeiro, J<sup>4,5</sup>; de Matos, AJ<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Sciences, <sup>2</sup>Department of Microscopy, <sup>3</sup>Department of Molecular Pathology and Immunology, <sup>4</sup>Department of Population Studies  
Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar—ICBAS—University of Porto  
<sup>5</sup>EPIUnit—Institute of Health Public—ISPUP—University of Porto  
<sup>6</sup>Animal Science and Study Centre, Food and Agrarian Sciences and Technologies Institute, University of Porto, Porto, Portugal.

## Introduction

Lymphomas are the most prevalent hematopoietic neoplasms in dogs and in humans. As dogs are considered models for human lymphomas, their regional prevalence and subtypes distribution deserve to be studied.

The aim of this study was to provide an epidemiology overview of canine lymphomas in Porto, Portugal, diagnosed at the Veterinary Pathology Services of ICBAS-University of Porto, from 2005 to 2016.

## Materials and Methods

A total of 75 canine lymphomas from the Porto district were enrolled.

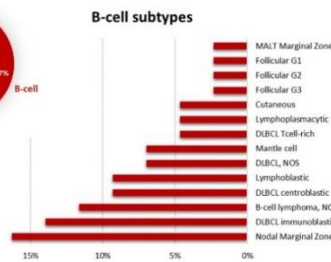
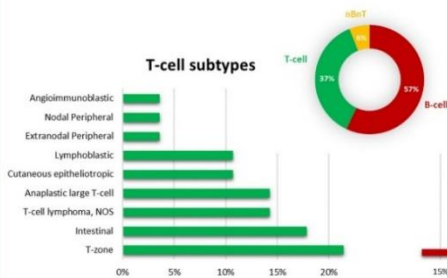
All cases were immunophenotyped for CD3 and PAX5. Cases with histiocytic or plasmocytic proliferation were evaluated for CD18 and MUM1, respectively.

The lymphomas were classified according to the current WHO classification.



## Results

The District of Porto followed the international trend for higher prevalence of B-cell (57%) lymphomas in dogs. T-cell lymphomas represent 37%, while 6% were classified as non-B/non-T cell lymphomas.

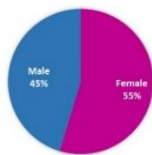


The most common B-cell subtypes were:

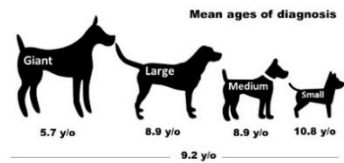
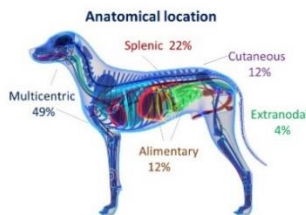
- Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) (35%)
- Marginal zone (16%)
- Unclassified (B-cell lymphoma, NOS) (12%)

T-cell subtypes were:

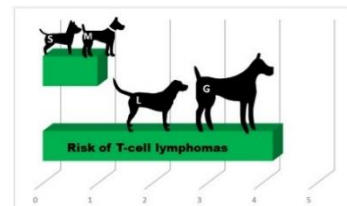
- T-zone (18%)
- Intestinal (18%)
- Unclassified (T-cell lymphoma, NOS) (14%)



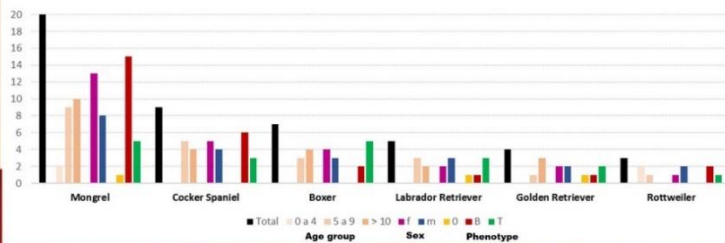
No sex predisposition



The mean age at diagnosis was 9.2 years old, showing an inverse relation with size.



Large and giant dogs presented a 4-fold risk of developing T-cell lymphomas when compared to small and medium dogs (OR:4.2; CI 95% 1.2;14).



## The authors wish to thank:

Professor Dr. Fátima Gärtner, Department of Molecular Pathology and Immunology from ICBAS—University of Porto.

This research was supported by an international PhD fellowship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) – Brazil (CSF 0342-13-0).



# Implementation and preliminary results of an Animal Cancer Registry in Portugal (RCA-PT) in partnership with RCA-SP.



Pinello, KC<sup>1</sup>; Martins, L<sup>1</sup>; Gregório, H<sup>2</sup>; Santos, A<sup>3</sup>; Queiroga, FL<sup>4</sup>; Oliveira, F<sup>5</sup>; Tedardi, MV<sup>9</sup>; Dagli, ML<sup>9</sup>; Niza-Ribeiro, J<sup>6,7</sup>; de Matos, AJ<sup>1-8</sup>

<sup>1</sup> Department of Clinical Sciences - ICBAS - University of Porto; <sup>2</sup> CHV - Centro Hospitalar Veterinário - Porto; <sup>3</sup> Department of Veterinary Sciences - Lusófona University; <sup>4</sup> Department of Veterinary Sciences - University of Trás-os-Montes e Alto Douro; <sup>5</sup> HVRM - Montenegro Veterinary Hospital - Porto; <sup>6</sup> Department of Population Studies - ICBAS - University of Porto; <sup>7</sup> EPIUnit - Institute of Public Health - ISPUP - University of Porto - PORTUGAL; <sup>8</sup> Animal Science and Study Centre, Food and Agrarian Sciences and Technologies Institute, University of Porto, Porto, Portugal; <sup>9</sup> Department of Veterinary Pathology and Toxicology - FMVZ - University of São Paulo/BRAZIL



Cancer registration is a key tool for cancer control and prevention strategies, both in human and veterinary medicine, and provides valuable information for the development of Comparative Oncology.

The Portuguese Animal Cancer Registry (PTRCA) was born as an international partnership between the Universities of Porto/Portugal and São Paulo/Brazil. Both SPRCA and PTRCA aim to provide comparative and standardized comprehensive data of spontaneous neoplasms in animals, including location, morphology, diagnosis, staging, treatment, survival, geography and epidemiology. After adjustments, adaptations, validation and tests, PTRCA was used in 2016 by two veterinary hospitals in Porto, UPVET<sup>1</sup> and CHV<sup>2</sup>.

## 1. Adjustments

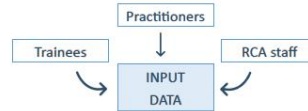


## 2. Internal Validation

### A System validation



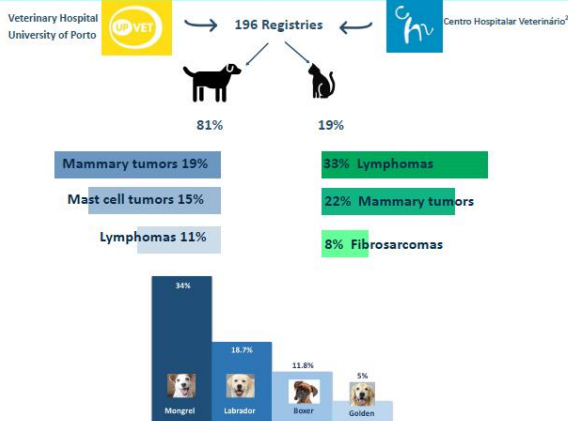
### B Method validation



### C Sources validation



## 4. Loaded Data (2016)



## 3. External Validation




## GLOBAL NETWORKING

We aim to cooperate with similar registries in other countries to promote global information networks on animal and comparative oncology.




This research was supported by an international PhD fellowship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) - Brazil (CSF 0342-13-



**U. PORTO**  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS  
BIOMÉDICAS ABEL SALGADO  
UNIVERSIDADE DO PORTO


# Geographical distribution of Human and dog lymphomas in “Large area of Porto” – a case study of Porto city.



BRASIL

**Pinello, KC<sup>1</sup>; Fonseca, L<sup>2</sup>; Monteiro, A<sup>3-4-5</sup>; Niza-Ribeiro, J<sup>6-7</sup>; de Matos, AJ<sup>1-8</sup>**

<sup>1</sup> Department of Clinical Sciences - ICBAS – University of Porto ; <sup>2</sup> Mapis - Mapping Intelligent Solutions – Porto; <sup>3</sup> Department of Geography- FLUP- University of Porto; <sup>4</sup> CITTA - Research Centre for Territory, Transports and Environment; <sup>5</sup> CEGOT – Centre of Studies on Geography and Spatial Planning; <sup>6</sup> Department of Population Studies – ICBAS – University of Porto; <sup>7</sup> EPIUnit – Institute of Public Health – ISPUP – University of Porto; <sup>8</sup> Animal Science and Study Centre, Food and Agrarian Sciences and Technologies Institute, University of Porto, Porto, PORTUGAL.



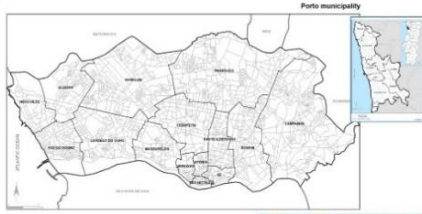
**Lymphomas** are a widely heterogeneous group of neoplasms which originate from lymphoid cells.

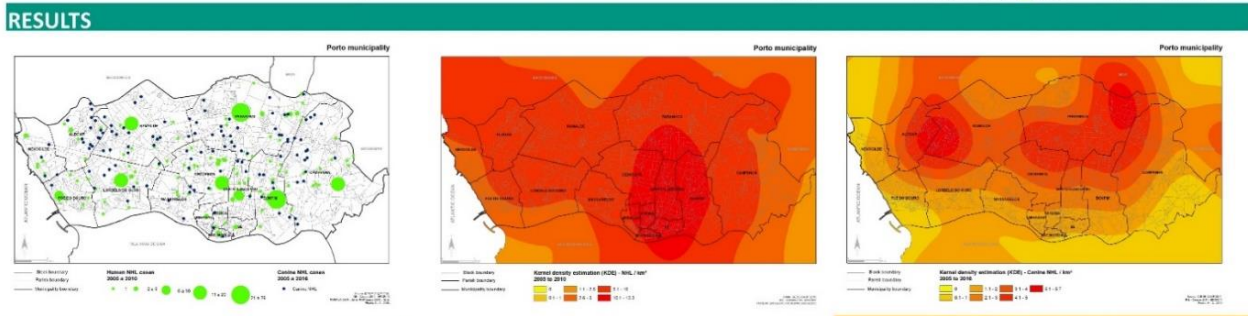
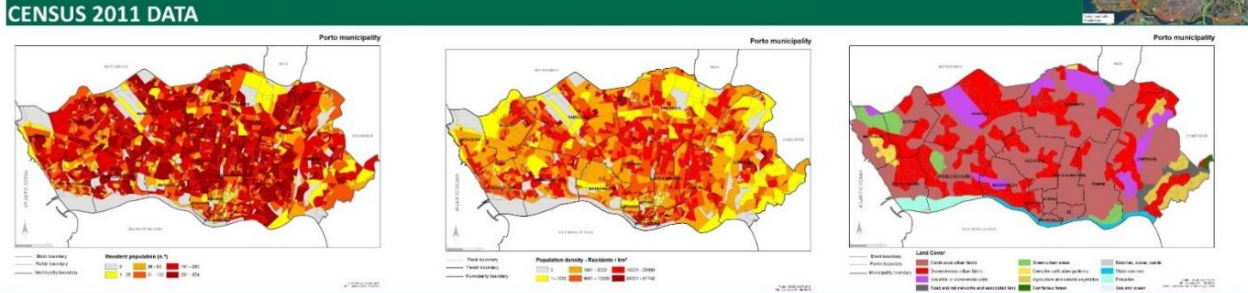
**Canine lymphoma** is one of the most common neoplasms in dogs and its increasing frequency mimics a trend in **human** oncology in which **non-Hodgkin’s lymphoma (NHL)** represents 5% of all new cancer cases and is one of the top five leading cancer-related deaths .

Dogs are considered **sentinels** of potential risk factors to human health, mainly due to shared environments, shorter disease latency, spontaneous disease and more specifically to the similarity between canine lymphoma and NHL in humans .

**Aim:** To compare the geographical data of human and canine lymphomas and to associate them with environmental factors.

**Materials and Methods:** The postal codes of NHL patients, diagnosed between 2005 and 2010 and residing in the Large area of Porto, Portugal, were obtained from RORENO (Northern Regional Cancer Registry) and ROR-Centro. Available data from canine lymphomas diagnosed from 2005 to 2016 in several veterinary centers were also collected. Cases’ mapping, Kernel density estimation (KDE) and Bayesian spatial regressions were performed.

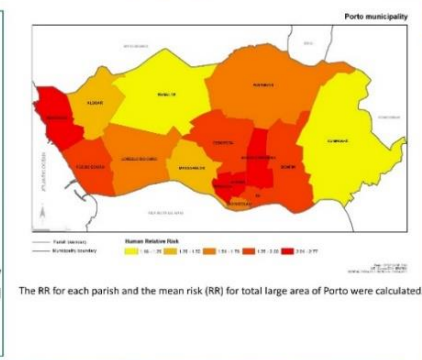




**Cases’ mapping:**  
332 human-NHL cases and 119 canine-NHL.  
Pearson’s correlation: 0.799,  $p < 0.001$   
Pearson’s correlation to resident population:  
Human–and Canine- NHL cases: 0.91,  $p < 0.001$

**Kernel Density Estimation:**  
Human-NHL cluster: urban fabric; old buildings  
Canine-NHL clusters: industrial areas; traffic pollution

**Bayesian regression model:**  
The global human mean RR was 0.839 (CI: 0.762 – 0.920).  
The parishes with higher values of RR are mainly in the city center of Porto: Santo Idelfonso, Miragaia, Vitória and Nevogilde.



### DISCUSSION

- Human and canine NHL geographical distribution are similar showing statistically high correlation.
- The estimated human RR had a strong spatial structure (i. e. the RR of a given area tended to be similar to the RR of its neighbors), suggesting the existence of local environmental risk factors.
- The typical and common artificial urban elements, impervious soil, lack of green spaces, traffic pollution, soil contamination, among others, seem to be spatially coincident with the peaks of the density of this disease.
- The need of more accurated data and an official animal registry and censos.
- The importance of cancer surveillance in pet animals as an efficient tool to predict, prevent and control hazards for humans.

The authors wish to thank all the veterinary centers involved: Cedivet, ICBAS, Segalab, INIAV, CHV, HVRM, HVP; Dr. Maria José Bento from RORENO, Dr. Joana Vasconcelos from ROR-Centro, Prof. Dr. Rui Henrique from IPO-Porto and Prof. Oswaldo Baquero for Bayesian modelation from University of São Paulo.  
This research was supported by an international PhD fellowship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) - Brazil (CSF 0342-13-0).