

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**EVOLUÇÃO DA EXPRESSÃO DE CD45⁺ E DO LEUCOGRAMA
DE CÃES LINFOMATOSOS DURANTE QUIMIOTERAPIA COM
O PROTOCOLO DE MADISON-WISCONSIN**

Letícia Abrahão Anai

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Fevereiro de 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**EVOLUÇÃO DA EXPRESSÃO DE CD45⁺ E DO LEUCOGRAMA
DE CÃES LINFOMATOSOS DURANTE QUIMIOTERAPIA COM
O PROTOCOLO DE MADISON-WISCONSIN**

Letícia Abrahão Anai

Orientador: Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2011

Anai, Letícia Abrahão
A532e Evolução da expressão de CD45⁺ e do leucograma de cães linfomatosos durante quimioterapia com o protocolo de Madison-Wisconsin / Letícia Abrahão Anai. -- Jaboticabal, 2011
iv, 49 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011

Orientador: Aureo Evangelista Santana

Banca examinadora: Mirela Tinucci Costa, Raimundo Souza Lopes

Bibliografia

1. Linfoma. 2. Citometria de fluxo. 3. CD45. 4. Cão. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-006:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: EVOLUÇÃO DA EXPRESSÃO DE CD45⁺ E DO LEUCOGRAMA DE CÃES LIN-
FOMATOSOS DURANTE QUIMIOTERAPIA COM O PROTOCOLO DE MADISON-
WISCONSIN

AUTORA: LETÍCIA ABRAHÃO ANAI

ORIENTADOR: Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA
Departamento de Clin e Cir Veterinaria / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. MIRELA TINUCCI COSTA
Departamento de Clin e Cir Veterinaria / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. RAIMUNDO SOUZA LOPES
Departamento de Clínica Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu

Data da realização: 18 de fevereiro de 2011.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LETÍCIA ABRAHÃO ANAI – nasceu em São José do Rio Preto, no dia 15 de fevereiro de 1982. Filha de Gilberto Kenichi Anai e Luisa Maria Abrahão Anai. Graduiu-se em Medicina Veterinária no ano de 2005, pela Universidade Camilo Castelo Branco – Unicastelo, Fernandópolis. Participou do Programa de Aprimoramento do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” no laboratório de Patologia Clínica, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – Unesp, no ano de 2006 e 2007. Ingresso no curso de mestrado do programa de pós-graduação em Cirurgia Veterinária da FCAV-Unesp em março de 2009.

Três verbos existem que, bem conjugado, serão lâmpadas luminosas em nosso caminho - Aprender, Servir e Cooperar.

Três atitudes exigem muita atenção - Analisar, Reprovar e Reclamar.

Dê três normas de conduta jamais nos arrependermos - Auxiliar com a intenção do bem, Silenciar e Pronunciar frases de bondade e estímulo.

Três diretrizes manter-nos-ão, invariavelmente, em rumo certo - Ajudar sem distinção, Esquecer todo mal e Trabalhar sempre.

Três posições devemos evitar em todas as circunstâncias - Maldizer, Condenar e Destruir.

Possuímos três valores que, depois de perdidos, jamais serão recuperados - A hora que passa, A oportunidade e A palavra falada.

Vida Superior - Amor, Humildade e Bom ânimo.

Que o Senhor nos ajude, pois, em nossas necessidades, a seguir sempre três abençoadas regras de salvação -

Corrigir em nós o que nos desagradas em outras pessoas.

Amparar-nos mutuamente.

Amar-nos uns aos outros.

CHICO XAVIER

DEDICO

Aos meus pais Gilberto e Luisa Maria, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e incentivando.

A toda minha família, principalmente a minha avó Tide e minha tias Nezita e Lois, que foram como mães para mim.

Ao meu irmão.

Aos meus amigos, Kalina, Andressa, Luisa, Érika, Ana Paula, Milena, Mileny, Larissa, Patrícia, Mariana e Thiago, que são a família que escolhi.

AGRADECIMENTOS

À Deus...

Ao meu querido Mestre Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana, meu orientador e amigo, pelo apoio e companherismo ao longo desses anos, sempre acreditando em mim.

Ao Eugênio, por toda a sua paciência e sabedoria.

Ao Matheus, Alessandra e Mônica.

As minhas amigas Flávia e Aline, que me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

À Paula e a Meire pela nossa crescente amizade.

As professoras Ana Paula M. Nakage Canesin e Mirela T. Costa, pela composição da banca de qualificação e pela contribuição com suas considerações.

À prof^a Mirela T. Costa e aos pós-graduandos do Serviço de Oncologia Veterinária, que ajudaram intensamente neste trabalho.

Ao prof. Gener pela realização da estatística deste trabalho.

Aos docentes, funcionários, residentes e estagiários do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel", que cooperaram na execução deste.

Aos cães com linfoma e seus proprietários.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) e ao Programa de Pós-Graduação ter me concedido a oportunidade de realizar este mestrado.

À Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
RESUMO	iv
SUMMARY.....	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Linfoma.....	3
2.2 Quimioterapia antineoplásica.....	6
2.3 Anticorpo monoclonal CD45.....	9
3. OBJETIVO.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	17
5.1 Classificação anatômica.....	17
5.2 Estadiamento e sub-estadiamento clínico.....	18
5.3 Avaliação do leucograma.....	20
5.4 Comparação entre as técnicas citométrica e automatizada na obtenção do leucograma.....	26
6. CONCLUSÕES.....	29
7. REFERÊNCIAS	30

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1.	Classificação Clínica do Linfoma segundo a Organização Mundial de Saúde – OMS.....	12
Tabela 2.	Fase de indução da remissão com o emprego do protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin, citado por Nelson & Couto (2006), e utilizado nos 25 cães com linfoma.....	13
Tabela 3.	Valores de referência para leucograma de cães, estabelecidos e validados junto ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, 2011.....	14
Tabela 4.	Preparo das amostras de sangue periférico de cães linfomatosos, com vistas à análise citométrica. Jaboticabal, 2011.....	15
Tabela 5.	Valores médios obtidos para o leucograma de 25 cães portadores de linfoma no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica fundamentada no protocolo Madison-Wiscosin. Jaboticabal, 2011.....	21
Tabela 6.	Valores médios obtidos para as contagens absolutas de granulócitos, linfócitos e monócitos, por intermédio da citometria de fluxo, de 25 cães portadores de linfoma no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica do protocolo Madison-Wiscosin. Jaboticabal, 2011.....	27
Tabela 7.	Valores médios relativos obtidos por intermédio de contagens automatizadas e citométricas, para granulócitos, linfócitos e monócitos de 25 cães portadores de linfoma, durante o protocolo quimioterápico M-W, Jaboticabal, 2011..	28

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Distribuição das populações leucocitárias observadas à citometria de fluxo, de acordo com o tamanho e granularidade das células e superpostas à população de células CD45 ⁺ no sangue periférico de cão linfomatoso. Jaboticabal, 2011.....	16
Figura 2.	Representação gráfica percentual da ocorrência de linfoma, de acordo com a localização anatômica, em 25 cães linfomatosos, submetidos ao protocolo quimioterápico Madison-Wisconsin. Jaboticabal, 2011.....	18
Figura 3.	Porcentagem da ocorrência de linfoma, de acordo com o estadiamento clínico, em 25 cães linfomatosos, submetidos ao protocolo quimioterápico Madison-Wisconsin. Jaboticabal, 2011.....	19
Figura 4.	Porcentagem da ocorrência de linfoma, de acordo com o subestadiamento clínico, em 25 cães linfomatosos, submetidos ao protocolo quimioterápico Madison-Wisconsin. Jaboticabal, 2011.....	20
Figura 5.	Variação dos valores médios obtidos para contagem global de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica. Jaboticabal, 2011.....	22
Figura 6.	Variação dos valores médios obtidos para a contagem absoluta de neutrófilos segmentados ($\times 10^3/\mu\text{L}$) no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica. Jaboticabal, 2011.....	23
Figura 7.	Variação dos valores médios obtidos para a contagem absoluta de eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica. Unesp, Campus de Jaboticabal, 2011.....	24
Figura 8.	Variação dos valores médios obtidos para a contagem absoluta de linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica. Jaboticabal, 2011.....	25
Figura 9.	Variação dos valores médios obtidos para a contagem absoluta de monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica. Jaboticabal, 2011.....	26

EVOLUÇÃO DA EXPRESSÃO DE CD45⁺ E DO LEUCOGRAMA DE CÃES LINFOMATOSOS DURANTE QUIMIOTERAPIA COM O PROTOCOLO DE MADISON-WISCONSIN

RESUMO - O linfoma é o tumor de tecido hematopoético mais comum nos cães e um dos tumores malignos de maior ocorrência nesta espécie. É um ótimo modelo experimental para estudo devido a sua semelhança com o linfoma não-Hodgkin em humanos. Considerando a importância das alterações decorrentes da evolução desta neoplasia e aquelas ocorridas com o emprego da poliquimioterapia, avaliou-se a fórmula leucocitária absoluta e a contagem de células CD45⁺, no sangue de 25 cães linfomatosos, contrastando-as a partir do diagnóstico, uma vez por semana, durante as primeiras oito sessões quimioterápicas do protocolo de Madison-Wisconsin, e também foi comparada as contagens totais dos granulócitos, linfócitos e monócitos, obtidas em contador automático convencional e por intermédio da citometria de fluxo. Observou-se um maior número de animais com linfoma multicêntrico em estadio Vb. No leucograma, as principais alterações foram observadas no momento do diagnóstico e quando analisado o tratamento poliquimioterápico, ao longo do tempo, a maior mielosupressão foi imposta pela vincristina e suas associações. Cães linfomatosos podem ser avaliados tanto por intermédio de contadores eletrônicos como por meio da citometria de fluxo.

Palavras-chave: linfoma, citometria de fluxo, cão, CD45.

EVOLUTION OF CD45+ EXPRESSION AND LEUKOCYTE FROM LYMPHOMATIC DOGS DURING CHEMOTHERAPY USING THE MADISON-WISCONSIN PROTOCOL

SUMMARY - Lymphoma is the most common hematopoietic tumor in dogs and one of the malignant tumors with highest occurrence in that species. It is a great experimental model to study since it has a great resemblance with the non-Hodgkin lymphoma in humans. Considering the importance of the alterations due to the evolution of this malignancy and the ones due to the use of polichemotheapy this work aimed to evaluate the absolute leucocyte count and the counts of CD45+ type cells in the blood of 25 lymphomatic dogs counterpointing them since diagnose, once a week, during the first eight chemotherapic sessions with the Madison-Wisconsin protocol. Furthermore the total counts of granulocytes, lymphocytes and monocytes obtained by conventional automatic counter and by flow cytometry were compared. It was observed a greater number of animals with multicentric lymphoma in stage Vb. The main alterations in the leukon were the ones observed at the moment of diagnose. When analyzing the polichemotherapy treatment the highest myelosupression was caused by vincristine and its associations. It is concluded that dogs with lymphoma can be evaluated by electronic counters as well as by flow cytometry.

Keywords: CD45, dogs, flow cytometry, lymphoma.

**Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-estar
Animal da FCAV- UNESP (protocolo nº 007285-09)**

**Apoio Financeiro Fapesp (Processos: 2008/ 07443-7 – bolsa e
2009/13750-2 – auxílio)**

1. INTRODUÇÃO

O linfoma é uma neoplasia maligna caracterizada pela proliferação de células originárias do tecido linfóide tais como linfócitos, histiócitos e seus precursores e derivados. É a neoplasia hematopoética que mais comumente afeta os cães e tem sido frequentemente proposta como modelo experimental para o estudo da etiologia e tratamento de linfomas não-Hodgkin's, que acometem o homem. Seu diagnóstico definitivo está fundamentado no exame de preparações citoscópicas obtidas a partir de citologia aspirativa de linfonodos ou nódulos, bem como no exame histopatológico dos mesmos.

O tratamento convencional do linfoma canino é a quimioterapia. A toxicidade hematológica é o efeito colateral mais comum nos pacientes sob regime de quimioterapia e a neutropenia e trombocitopenia são os primeiros sinais, enquanto que a anemia desenvolve-se mais tardiamente em razão da vida média mais longa das hemácias. Dessa forma, a hemotoxicidade é um fator limitante da quimioterapia, tanto pelo risco potencial de morte do paciente em decorrência da hipoplasia do setor granulopoiético (neutropenia séptica), quanto pelo fato de tal mielotoxicidade impor diminuição de maneira transitória ou definitiva na dose do quimioterápico, prejudicando, conseqüentemente, a eficácia do tratamento.

Além disso, muitos dos fármacos utilizados na quimioterapia do linfoma afetam a proliferação, diferenciação, distribuição e função de células imunologicamente importantes tais como neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos (MILLER, 1997; BARNES, 1998) e, ademais, embora a quimioterapia seja imunossupressora, seus efeitos sobre o sistema imune de cães neoplásicos ainda não são plenamente compreendidos (WALTER et al., 2006). Conseqüentemente, torna-se muito importante a monitoração das células leucocitárias durante o tratamento quimioterápico.

Neste senso, a monitoração das células hematopoéticas, durante o tratamento quimioterápico, abre uma possibilidade bastante alvissareira de monitoramento do

balanço entre a produção e destruição de células do sangue. Da mesma maneira, a quantificação das células CD45⁺, bem como das diferentes variedades leucocitárias que expressam tal marcador, permite melhor entender os efeitos dos quimioterápicos do protocolo Madison-Wisconsin, no quadro leucocitário de cães com linfoma.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LINFOMA

O linfoma é uma neoplasia caracterizada por proliferação clonal de linfócitos malignos e pode originar-se na medula óssea, timo, baço, fígado e linfonodos. Na realidade, pode desenvolver-se em praticamente qualquer órgão, pela contínua migração dos linfócitos pelos diferentes tecidos do organismo (FIGUERA et al., 2002; VAIL & YOUNG, 2007; DALECK et al., 2008).

É a neoplasia hematopoiética que mais comumente afeta o cão (MOULTON & HARVEY, 1990; VAIL & OGILVIE, 1998), podendo representar de 7 a 9% das neoplasias malignas (RALLIS et al., 1992; MORRISON, 1998) e aproximadamente 90% das neoplasias do sistema hematopoiético nesta espécie (ROSENTHAL & MACEWEN, 1990; OGILVIE & MOORE, 1995). Acomete principalmente animais de meia-idade ou idosos, que perfazem 80% dos casos (GREENLEE et al., 1990; MOULTON & HARVEY, 1990), não havendo predileção sexual (VAIL & OGILVIE, 1998).

De acordo com SEQUEIRA et al. (1999) os animais portadores de linfoma são predominantemente aqueles pertencentes às raças de grande ou médio porte, como Boxer, Basset hound, Rottweiler, Cocker Spaniel, São Bernardo, Golden Retriever, entre outros (NELSON & COUTO, 2006). Porém, a predisposição racial neste tipo de neoplasia ainda é controversa (MOULTON & HARVEY, 1990).

No Brasil, poucos são os levantamentos feitos sobre a incidência de linfoma em cães. Fráguas (2008) registrou entre 2003 e 2006, no Hospital Veterinário da FCAV UNESP/Jaboticabal, 108 cães acometidos, com predominância de cães sem raça definida (SRD), adultos jovens e sem predisposição sexual. Resultados semelhantes e obtidos precedentemente também foram reportados após estudos retrospectivos da incidência de linfomas caninos, na região de Botucatu – SP (CARDOSO et al., 2003) e na região norte do Paraná (MORENO & BRACARENSE, 2007).

A etiologia do linfoma canino é multifatorial, e a presença de um componente viral ainda não foi comprovada na espécie canina, ao contrário do que acontece nos

seres humanos, felinos, bovinos, roedores, aves e alguns primatas. Fatores ambientais como exposição crônica a substâncias químicas, tais como o herbicida 2,4 ácido fenoxiacético, são citados como predisponentes ao desenvolvimento de linfoma em cães. De outra parte, em cães de raças puras, a predisposição genética para este tipo de neoplasia parece existir (GREENLE et al., 1990; VALLI, 1993; JONES et al., 1997, MORRISON, 2005).

Tradicionalmente, o linfoma canino é classificado com base na sua distribuição anatômica em multicêntrico, alimentar, mediastinal, cutâneo e extranodular (VAIL & OGILVIE, 1998). Em um estudo retrospectivo realizado por SEQUEIRA et al. (1999), 91,2% dos animais acometidos por linfoma apresentavam a forma multicêntrica. Quanto à classificação cito-histomorfológica podem ser classificados como de alto, médio ou de baixo grau. De acordo com o esquema de classificação histológica (Kiel ou *National Cancer Institute*), 80% dos linfomas caninos são similares aos linfomas não-Hodgkin's humanos de médio e alto grau. E, quanto à imunofenotipagem, podem ser classificados como linfomas T, linfomas B, bem como mistos (B/ T) (MOULTON & HARVEY, 1990; TESKE et al., 1994; JONES et al., 1997; DE MOURA et al., 1999; SEQUEIRA et al., 1999; VAIL, 2000, COLETA, 2009).

O imunofenótipo da neoplasia linfóide em cães pode ser obtido por intermédio da citometria de fluxo, imunocoloração de cortes de tecido ou de preparações citológicas obtidas por aspiração com o auxílio de agulha fina. O diagnóstico é subsidiado, além do mais, pelo exame físico e avaliações hematológicas, bioquímico-séricas e diagnóstico por imagem. Porém, o diagnóstico definitivo só pode ser firmado pela avaliação citológica e/ou histológica do órgão afetado (FAN & KITCHELL, 2002; NELSON & COUTO, 2006; SANTANA et al., 2008).

Os sinais clínicos variam de acordo com a apresentação anatômica e histológica (NELSON & COUTO, 2006). No linfoma multicêntrico normalmente ocorre linfadenopatia bilateral dos linfonodos superficiais (DOBSON & GORMAN, 1993) e podem ocorrer hepatomegalia e esplenomegalia decorrentes da infiltração neoplásica (VAIL, 2000). A forma alimentar é caracterizada pela presença de infiltrado neoplásico no sistema digestório e/ou nos linfonodos mesentéricos, e apresentam como sinais

clínicos mais frequentes vômito, diarreia e estatorreia secundários à síndrome da má absorção (RICHTER, 1992). A forma mediastínica envolve o timo e/ou os linfonodos mediastinais craniais e caudais. A poliúria e a polidipsia são os sinais clínicos mais comuns e são secundários a hipercalcemia, uma síndrome paraneoplásica do linfoma. Além disso, sinais clínicos como intolerância ao exercício, taquipneia, dispneia, regurgitação e anorexia, também são descritos em decorrência da compressão provocada pela linfadenopatia mediastínica (CARDOSO et al., 2004). Já a apresentação cutânea do linfoma é variável e guarda relação com a classificação histológica e imunomorfológica. As lesões cutâneas geralmente são multifocais ou generalizadas, em forma de placas ou nódulos ulcerados, e eritrodermia esfoliativa (SCOTT et al., 1995). As formas mista e extranodal podem acometer qualquer tecido corporal e os sinais apresentam correlação com o(s) órgão(s) acometido(s) (CARDOSO et al., 2004).

No que concerne ao hemograma dos cães com linfoma, pode-se observar anemia moderada, geralmente em 46% deles (JAIN, 1993; MINISCALCO et al., 2003), anemia normocítica normocrômica (61%), trombocitopenia em 55,5%, trombocitose em 11,1% (CÁPUA, 2009) e, leucocitose moderada (18300 células/ μ L) a extrema (342000 células/ μ L), em 33% dos casos. Somente 19% dos casos exibem linfocitose. Os linfoblastos estão presentes em 25% dos casos e, destes, 15% não apresentam linfocitose. Em 10% dos casos observa-se leucopenia e em 25% observa-se linfopenia (JAIN, 1993; MINISCALCO et al., 2003).

O linfoma, em cães, pode ser classificado em diferentes estádios clínicos, cujos estádios servem como guia para o seu prognóstico e tratamento. Tal estadiamento segue o protocolo proposto pela Organização Mundial da Saúde (OMS), sendo que no estágio I há envolvimento limitado a um único linfonodo ou tecido linfóide de um único órgão (exceto medula óssea), no estágio II há envolvimento de vários linfonodos regionais, no estágio III há envolvimento generalizado dos linfonodos, no estágio IV há envolvimento de fígado e/ ou baço, com ou sem envolvimento generalizado dos linfonodos e no estágio V há envolvimento do sangue, medula óssea e/ ou outros

órgãos (OWEN, 1980). Os subestádios incluem “a” - sem sinais clínicos da doença, e “b” - com sinais clínicos (VAIL, 2000).

Segundo MACEWEN & YOUNG (1996), sem tratamento, o linfoma leva muitos cães a óbito em quatro a seis semanas. No entanto, é a neoplasia que melhor responde à quimioterapia (ROSENTHAL & MACEWEN, 1990; OGILVIE & MOORE, 1995).

O prognóstico do linfoma em cães está relacionado ao imunofenótipo da célula neoplásica e subestádio de sua evolução, tal qual proposto pela Organização Mundial da Saúde. Os tumores imunorreativos CD3 (derivados de células T) têm remissão mais curta, assim como os animais com sinais clínicos de linfoma (subestádio “b”) têm prognóstico reservado (VAIL & YOUNG, 2007).

Outros fatores que interferem no prognóstico do linfoma incluem presença de síndromes paraneoplásicas e grau de instalação destas no paciente. As síndromes paraneoplásicas são traduzidas por sinais e sintomas presentes em pacientes com câncer, distantes do tumor ou de suas metástases, e que não são decorrentes da invasão, obstrução ou efeito da neoplasia. Representam um conjunto de manifestações extremamente complexas, podendo envolver vários sistemas do organismo animal; inclusive o hematológico, o dermatológico, o neurológico, o endócrino e o osteomuscular (MANGIERI, 2008). As síndromes de maior frequência no linfoma incluem anorexia, caquexia, anemia, hipercalcemia e hipergamaglobulinemia (RAMOS et al., 2008).

2.2 QUIMIOTERAPIA ANTINEOPLÁSICA

A base para o tratamento do linfoma canino é o protocolo quimioterápico COP, que consiste na combinação dos quimioterápicos ciclofosfamida, sulfato de vincristina e prednisona (KITCHELL & DHALIWAL, 2000; RODASKI & DE NARDI, 2008). Aproximadamente 75% dos casos de linfoma respondem favoravelmente a este protocolo e, embora exista uma variação individual favorável considerável, o tempo médio de sobrevivência é de sete meses e o de remissão de três a seis meses (VAIL & YOUNG, 2007). Outro protocolo que se tornou popular no tratamento do linfoma canino

é o protocolo de Madison-Wisconsin, uma combinação das drogas L-asparaginase, vincristina, prednisona, ciclofosfamida e doxorrubicina. Há relatos de que o referido protocolo é capaz de promover remissão completa em 92,3% dos casos e tempo de sobrevivência de 397 dias para cães com linfoma (GARRETT et. al., 2002; MORRISON, 2005).

As etapas do tratamento quimioterápico do linfoma canino incluem indução da remissão, manutenção da remissão e reindução da remissão ou terapia de resgate (MACEWEN & YOUNG, 1996).

A vincristina é um alcalóide de origem vegetal, derivado da vinca, que atua interrompendo o ciclo celular na metáfase, ligando-se às proteínas dos microtúbulos necessárias à formação dos fusos mitóticos e mitose celular (SOBREIRA, 1999; SANTANA, 2000). Apresenta como efeitos colaterais hematológicos a mielossupressão, caracterizada por discreta leucopenia e, mais raramente, anemia e trombocitopenia, sendo tal mielotoxicidade maior quando associada à L-asparaginase (RODASKI & DE NARDI, 2008). Adicionalmente, dentre outras ações tóxicas da vincristina podem ser incluídas a inibição da síntese de ácidos graxos e proteínas e elevação nos níveis séricos de enzimas hepáticas (RODASKI & DE NARDI, 2004).

A L-asparaginase é uma enzima obtida a partir da ação metabólica de microorganismos como a *Escherichia coli* e a *Erwinia carotovora* capazes de destruir as reservas exógenas do aminoácido asparagina, vital ao processo de síntese protéica das células neoplásicas que, por sua vez, são incapazes de produzir a asparagina endógena. Esta enzima raramente provoca depressão medular, mas inibe a função dos linfócitos T e B, além de promover hepatotoxicidade com aumento nas atividades séricas das enzimas alanino-aminotransferase, aspartato-aminotransferase, aumento nos níveis de bilirrubina e diminuição na taxa de albumina sérica (RODASKI & DE NARDI, 2008).

A prednisona, um corticosteróide utilizado nas primeiras quatro semanas do protocolo M-W, induz os linfócitos normais a apoptose e citólise de linfócitos neoplásicos (LANORE & DELPRAT, 2004; FAN & LORIMIER, 2005). Este hormônio esteroide atua em receptores celulares específicos, levando a uma cisão do DNA,

impedindo a divisão celular (RODASKI & DE NARDI, 2008). Como alterações hematológicas clássicas causadas por sua utilização incluem-se neutrofilia, linfopenia, eosinopenia e monocitose (BARGER & GRINDEM, 2000; STOCKHAM et al., 2003). O tratamento prolongado com prednisona poderá levar ao aumento das atividades séricas das enzimas hepáticas alanino-aminotransferase e fosfatase alcalina (DILLON et al., 1980).

Segundo RODASKI & DE NARDI (2008), a ciclofosfamida é uma mostarda nitrogenada, classificada como agente alquilante que atua inibindo a síntese e divisão do DNA, sendo um fármaco ciclo celular não específico. Um de seus efeitos tóxicos é a mielossupressão, principalmente traduzida por neutropenia, trombocitopenia e, com menor frequência, anemia não regenerativa nos casos dos animais em terapia prolongada (BARGER & GRINDEM, 2000; RODASKI & DE NARDI, 2008).

A doxorubicina é um antibiótico antitumoral (antraciclina) derivado de culturas de *Streptomyces peucetius*, variedade *caesius*, sendo um quimioterápico inibidor da transcriptase reversa da RNA polimerase, impedindo a síntese do DNA e RNA, em função da sua ação como agente ciclo celular não específico. Pode causar leucopenia, anemia e trombocitopenia, além de cardiotoxicidade (DAL FARRA et al., 1995).

A toxicidade hematológica é um fator limitante da quimioterapia, sendo a mais frequente, e mais grave, por dois motivos. Primeiramente, porque pode comprometer a quimioterapia de maneira transitória ou definitiva, uma vez que pode impor diminuição da dose do quimioterápico e, por conseguinte, prejudicar a eficácia do tratamento. O segundo motivo relaciona-se ao risco potencial de morte do paciente em decorrência de neutropenia séptica que pode se instalar devido às bactérias de origem digestiva ou de foco infeccioso existente antes do início da quimioterapia (LANORE & DELPRAT, 2004).

A neutropenia é a mais frequente e mais grave das citopenias, decorrentes da quimioterapia. A maioria dos quimioterápicos é mielotóxica, sendo que a ciclofosfamida apresenta mielotoxicidade muito elevada e a vincristina, na dose de 0,75 mg/m², moderada (LANORE & DELPRAT, 2004). O nadir de neutrófilos, momento no qual o número de granulócitos é o mais baixo, após uma sessão de quimioterapia, é

observado sete dias após a referida sessão. A neutropenia geralmente persiste por três a cinco dias e, em pouco menos de duas semanas, a celularidade da medula óssea passa por uma fase de recuperação (LANORE & DELPRAT, 2004).

2.3 ANTICORPO MONOCLONAL CD45

A citometria de fluxo é um recurso emergente na Medicina Veterinária que permite uma análise rápida, objetiva e quantitativa de células em suspensão (FALDYNA et al., 2001; NAKAGE et. al., 2005). Tem uma ampla aplicação na hematologia veterinária, incluindo a identificação de precursores hematopoéticos, contagens celulares diferenciais da medula óssea, quantificação de reticulócitos, pesquisa de eritroparasitas, detecção de anticorpos antieritrocitários, contagem diferencial de leucócitos, imunofenotipagem de linfócitos e contagem de plaquetas reticuladas (FALDYNA et al., 2001). As desordens mieloproliferativas e linfoproliferativas também podem ser identificadas e classificadas por intermédio da citometria de fluxo (WEISS, 2004; NAKAGE et. al, 2005). Por conseguinte, permite o estudo da hematopoese, a classificação dos tipos celulares do sistema imune, e acompanhamento e análise da dinâmica da resposta imune (LANIER, 2002).

Esta técnica tem contribuído fortemente no diagnóstico de linfoma. Amostras ou aspirados de linfonodos ou outros tecidos, tais como tecidos sanguíneos periférico e central, têm sido analisados, citometricamente, com muito sucesso (JENNINGS & FOON, 1997).

A avaliação da intensidade de fluorescência se dá por intermédio da utilização de marcadores de superfície, representados por anticorpos monoclonais específicos fluorescentes, ligados a fluorocromos como isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritirina (PE). A avaliação do tamanho relativo das células (FSC) e da granularidade ou complexidade interna da célula (SSC) permite a classificação dos leucócitos em linfócitos, monócitos e granulócitos (GRINDEM, 1996). Os anticorpos monoclonais são os marcadores de escolha devido à sua especificidade, reação cruzada mínima e reprodutibilidade (KEREN, 1994).

O CD45 é o antígeno leucocitário comum expresso em intensidades diferentes na superfície de todos os leucócitos (COBBOLD & METCALFE, 1994; GRINDEM, 1996;). Trata-se de uma família de glicoproteínas de 190 a 220kDa encontradas em todas as células de origem hematopoética, exceto hemácias maduras (TIZARD, 1998).

De acordo com WEISS (2004) o CD45 pode ser útil na avaliação de leucemias granulocíticas agudas e linfomas. Também pode ser usado para quantificação acurada de granulócitos, mieloblastos, precursores eritrocitários e linfócitos na medula óssea de cães. Aproximadamente 10% da superfície dos linfócitos T encontram-se recoberta pela molécula CD45. Esta molécula desempenha importante função no controle da transdução do sinal pelos receptores de células T. Ademais, identificaram-se várias formas diferentes de CD45. Neste contexto, tem sido relatado que as células T virgens possuem uma forma de CD45, enquanto que as células T estimuladas, e de memória, possuem uma outra forma (TIZARD, 2002).

Segundo COMAZZI et al., (2006), quanto maior o grau de maturação dos leucócitos, maior a expressão de CD45. Além disso, quando consideradas variáveis morfológicas com base na complexidade interna (SSC), o anticorpo monoclonal correspondente é, usualmente, utilizado para a confecção de “gates” para diferenciar os leucócitos de eritrócitos e debris celulares, sendo possível fazer-se um mielograma por intermédio da citometria de fluxo, de tal forma a separar, assim, cada linhagem, podendo-se estudá-las individualmente quanto ao seu perfil de expressão antigênica (COMAZZI et. al, 2006; LORAND-METZE, 2006).

3. OBJETIVOS

Neste ensaio, objetivou-se avaliar a fórmula leucocitária absoluta e a contagem de células CD45⁺, no sangue periférico de cães linfomatosos, contrastando-as a partir do diagnóstico, uma vez por semana, durante as primeiras oito sessões quimioterápicas do protocolo de Madison-Wisconsin, bem como comparar as contagens totais dos granulócitos, linfócitos e monócitos, de cães linfomatosos, obtidas em contador automático convencional e por intermédio da citometria de fluxo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Animais

O grupo tratado incluiu vinte e cinco (25) cães portadores de linfoma, atendidos junto ao Serviço de Oncologia Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV-UNESP. O diagnóstico de linfoma foi firmado com base nos achados clínicos, citopatológicos e/ou histopatológicos de tecido linfóide, com base nos critérios de classificação morfológica descritos por Fournel- Fleury et al. (2002). Dos 25 animais que compuseram o ensaio em tela, quatorze eram machos (56%) e onze eram fêmeas (44%). A raça predominante foi Rottweiler (28%), seguida por cães sem raça definida – SRD (20%), Boxers (16%), Poodles (8%), Cocker Spaniel (8%), Husky Siberiano (4%), Teckel (4%), Labrador (4%), American Staffordshire Terrier (4%) e Golden Retriever (4%). A idade variou de três a 15 anos ($7,4 \pm 2,8$) e o peso de 6,9 e 49Kg ($27,4 \pm 11,5$).

Ademais, os referidos animais linfomatosos foram submetidos à classificação anatômica e estadiamento da neoplasia, de acordo com os critérios propostos pela Organização Mundial de Saúde, cujos linfomas foram classificados com base nos exames clínico-patológicos, ultrassonográficos, radiográficos e análises do sangue e da medula óssea, em estádios (I a V) e subestádios (a ou b), como explicitado na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação Clínica do Linfoma, segundo a Organização Mundial de Saúde – OMS.

Estadio I	Envolvimento limitado a um linfonodo
Estadio II	Envolvimento de linfonodos regionais
Estadio III	Aumento generalizado dos linfonodos
Estadio IV	Envolvimento do fígado e/ou baço com ou sem linfadenomegalia
Estadio V	Envolvimento do sangue, medula óssea e/ou outros órgãos

a: sem sinais sistêmicos; b: com sinais sistêmicos

Tratamento

Os animais portadores de linfoma foram tratados de acordo com o protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin, que incluiu sulfato de vincristina (0,75 mg/m², IV), L-asparaginase (400 UI/kg, IM), ciclofosfamida (250 mg/m², VO), doxorrubicina (30 mg/m², perfusão) e prednisona (2 – 0,5 mg/kg/dia), tal qual ilustrado na Tabela 2.

Tabela 2. Fase de indução da remissão com o emprego do protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin, referido por Nelson & Couto (2006), e utilizado nos 25 cães com linfoma.

Semanas	Vincristina	L-asparaginase	Ciclofosfamida	Doxorrubicina	Prednisona
1	X	X	-	-	2 mg/kg/dia
2	-	-	X	-	1,5 mg/Kg/dia
3	X	-	-	-	1,0 mg/Kg/dia
4	-	-	-	X	0,5 mg/Kg/dia
5	intervalo	-	-	-	-
6	X	-	-	-	-
7	-	-	X	-	-
8	X	-	-	-	-
9	-	-	-	X	-

AVALIAÇÃO DAS PARCELAS EXPERIMENTAIS

As amostras de sangue destinadas à obtenção do leucograma e quantificação de células CD45⁺, foram coletadas por venipunção da jugular e envasadas em tubos a vácuo, contendo EDTA (K₂-EDTA). As contagens globais dos leucócitos foram obtidas com auxílio de um contador automático de células (ABC Vet HORIBA ABX – São Paulo/Brasil) e as fórmulas leucocitárias por intermédio de esfregaços sanguíneos corados com uma mistura de Metanol, May-Grunwald e Giemsa – MGG.

No caso dos cães linfomatosos foram coletadas nove amostras de sangue, sendo a primeira no momento do diagnóstico e, as demais, uma semana após cada das sessões quimioterápicas. Como valores de referência utilizaram-se aqueles estabelecidos e validados junto ao “Laboratório de Patologia Clínica Veterinária Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto”, do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, FCAV/Unesp, Campus de Jaboticabal (Tabela 3).

Tabela 3. Valores de referência para leucograma de cães, estabelecidos e validados junto ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2011.

PARÂMETROS	VALORES	
	x 10 ³ /uL	%
Leucócitos Totais	6-18	-
Neutrófilos	3,6-13,8	60-77
Bastonetes	0 – 0,5	0 -3
Eosinófilos	1,2 – 1,8	2 -10
Linfócitos	0,72-5,4	13-30
Monócitos	0,18-1,8	3-10

PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE PARA CITOMETRIA DE FLUXO

As amostras de sangue destinadas à análise citométrica foram processadas dentro de, no máximo, 24 horas após a colheita, no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto, do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - Unesp, utilizando-se de três tubos Falcon, de acordo com a sequência ilustrada na tabela 4.

Tabela 4: Preparo das amostras de sangue periférico de cães linfomatosos, com vistas à análise citométrica. Jaboticabal, 2011.

Tubo	Amostra	Volume Anticorpo	Molécula	Fluorescência	Anticorpo Monoclonal	Tipo celular
1	100µL	-	-	-	-	-
2	100µL	2µL	γ2	FITC	MCA1212	Isotipo controle
3	100µL	2µL	CD45	FITC	MCA1042F	Leucócitos

Anticorpos monoclonais da AbDSerotec

FITC: Isotiocinato de Fluoresceína

Após homogeneização, os tubos foram incubados no escuro e em temperatura ambiente, por 20 minutos. Um mililitro de tampão de lise de hemácias (FACS Lysing Solution – Becton Dickinson) foi adicionado em cada tubo e, novamente, as amostras foram homogeneizadas e incubadas por mais dez minutos, à temperatura ambiente, no escuro. Em seguida, foi realizada a lavagem do material com solução salina tamponada com fosfato 0,01 M pH entre 7,4 e 7,6 (PBS) por três vezes, adicionando-se dois mililitros de PBS por lavagem. Após as lavagens, adicionaram-se 0,5 mL de solução salina tamponada com fosfato 0,01 M pH entre 7,4 e 7,6 (PBS) a 1% de formol, para a preservação das células, até o momento da leitura.

As amostras foram analisadas em até três dias, após o preparo, com o auxílio de um citômetro de fluxo FACSCANTO (Becton Dickinson, San Jose, CA), alocado junto ao Laboratório de Micologia, do Departamento de Análises Clínicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – Unesp. Foram obtidos 10000 eventos, para classificação e quantificação de células CD45⁺, utilizando-se do programa FACSDiva (BD) (Figura 1). Os valores absolutos para as células progenitoras CD45⁺ sanguíneas foram calculados com base nos valores relativos fornecidos pelo programa e contagens de leucócitos totais obtidas no leucograma.

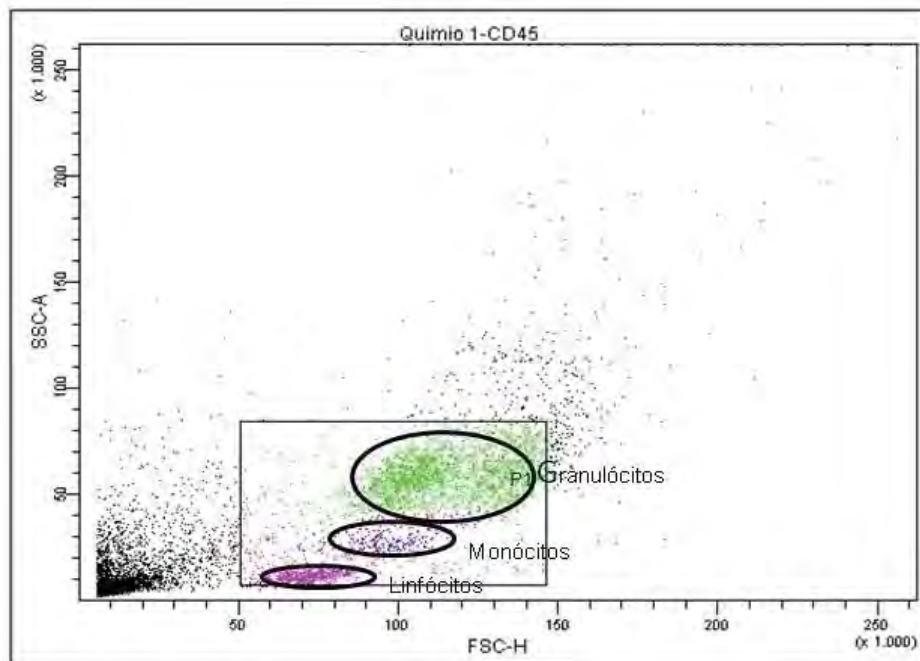


Figura 1. Distribuição das populações leucocitárias observadas à citometria de fluxo, de acordo com o tamanho e granularidade das células e superpostas à população de células CD45⁺ no sangue de cão linfomatoso. Jaboticabal, 2011.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

O esquema de análise estatística foi estabelecido de acordo com protocolo de Análise de Variância do sistema SAS, cujos valores médios obtidos para as diferentes características estudadas foram comparados pelo Teste de Tukey com um nível de probabilidade igual a 5% (SNEDECOR & COCHRAN, 1987).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Classificação Anatômica

Com relação à classificação anatômica, 14 cães apresentaram linfoma multicêntrico (55,5%), oito apresentaram linfoma cutâneo (33,4%), dois extranodal (7,4%) e um alimentar (3,7%) (Figura 2).

A forma multicêntrica, seguida da cutânea, a exemplo do que tem sido relatado em outros estudos, mostrou-se preponderante também neste ensaio, corroborando achados de diversos outros autores (MADWELL & THEILEN, 1987; SEQUEIRA et al., 1999; MORENO et al., 2007). É bem possível que a maior frequência das formas multicêntrica e cutânea esteja relacionada com a precocidade do diagnóstico, uma vez que as alterações clínicas nestas formas são mais perceptíveis e permitem um diagnóstico mais rápido, diferentemente das formas alimentar e mediastínica, que podem ter sua incidência subestimada, pois estas formas apresentam sinais inespecíficos no paciente e dificultam um diagnóstico mais precoce e preciso da doença. Além disso, as formas alimentar e mediastínica, apresentam pior prognóstico, e muitos pacientes vão a óbito mesmo antes de qualquer percepção de suas alterações clínico-patológicas (MORENO et al., 2007).

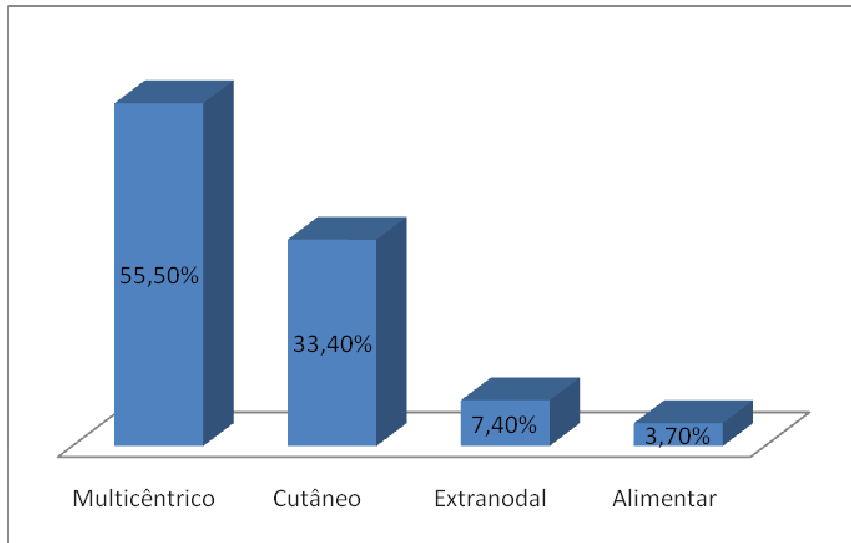


Figura 2. Representação gráfica percentual da ocorrência de linfoma, de acordo com a localização anatômica, em 25 cães linfomatosos, submetidos ao protocolo quimioterápico Madison-Wisconsin. Jaboticabal, 2011.

5.2 Estadiamento e sub-estadiamento clínico

Com relação ao estadiamento e sub-estadiamento clínico, estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde, com fundamento, respectivamente, na infiltração da doença nos órgãos e na presença ou ausência de sinais clínicos, verificaram-se que dois animais apresentaram-se no estadio I (8%), seis no estadio II (24%), dois no estadio III (8%), cinco no estadio IV (20%) e dez no estadio V (40%) (Figura 3). Dos 25 animais, oito apresentaram-se no sub-estadio a (32%) e 17 sub-estadio b (68%) (Figura 4).

A maioria dos animais encontrava-se em estado avançado da doença e com sinais clínicos, indicando, possivelmente, que os proprietários procuram tardiamente o profissional, ou, ainda, que tenham tido dificuldades em perceber as alterações clínicas iniciais do referido paciente, fatos que corroboram com outros estudos relatados (GREENLEE et al., 1990; TESKE, 1994; STARRAK et al., 1997). Neste ensaio, foi bem mais frequente o encontro de pacientes linfomatosos no estadio V. Tal achado difere

daquele relatado por CARDOSO et al. (2003), que observaram uma maior prevalência de animais linfomatosos no estadios IV. Talvez, esse fato possa ser atribuído à grande frequência de linfomas cutâneos, observada neste estudo, já que os animais que se apresentaram com linfoma cutâneo foram aqui classificados no estadios clínico V.

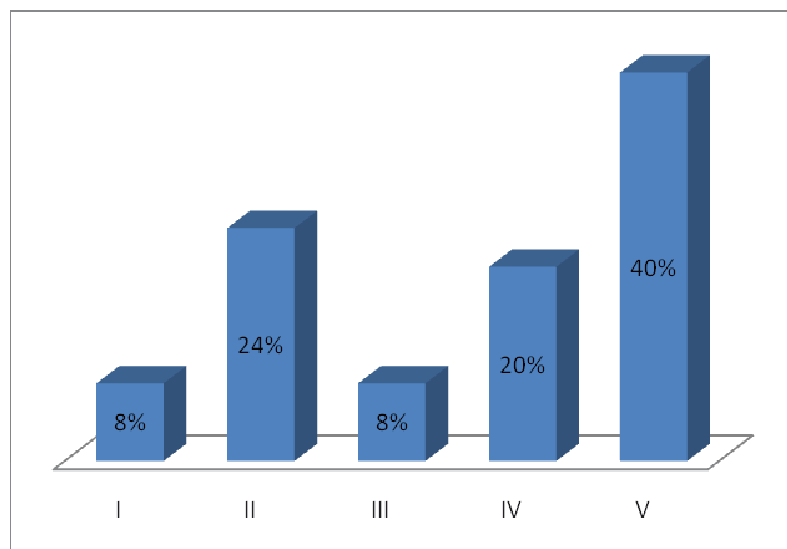


Figura 3. Distribuição percentual de 25 cães linfomatosos, de acordo com o estadiamento clínico, submetidos ao protocolo quimioterápico Madison-Wisconsin. Jaboticabal, 2011.

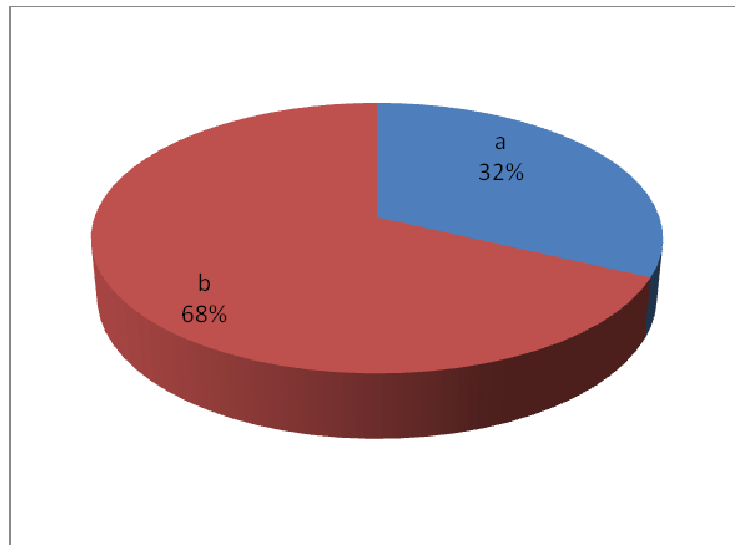


Figura 4. Distribuição percentual de 25 cães linfomatosos, de acordo com o sub-estadiamento clínico, submetidos ao protocolo quimioterápico Madison-Wisconsin. Jaboticabal, 2011.

5.3 Avaliações do Leucograma

No estudo em tela, as médias das contagens globais dos leucócitos apresentaram-se dentro da faixa de valores de referência, reportada para a espécie canina, em todos os momentos estudados. O valor médio encontrado no momento do diagnóstico, no qual observaram-se as maiores contagens globais de leucócitos, revelou-se estatisticamente diferente daqueles encontrados após o início do tratamento (Tabela e Figura 5). Muito embora o valor médio observado na leucometria global, no momento do diagnóstico, tenha se situado dentro do intervalo de normalidade, 24% dos animais apresentaram leucocitose consequente à neutrofilia, acompanhada ou não de linfocitose, achado que difere daqueles de TESKE (1996) e CÁPUA (2009) que, em 30% e 38% dos casos, apresentaram, respectivamente, leucocitose.

TESKE (1996) relata que a leucopenia também pode ocorrer nos casos de linfoma, ainda que, com menor frequência. De fato, neste estudo observou-se que apenas 20% dos animais apresentaram-se leucopênicos, no momento do diagnóstico, e

que tal leucopenia deveu-se, essencialmente, à diminuição absoluta de linfócitos, como observado também por CÁPUA (2009). Cães com linfoma podem apresentar linfopenia (CARDOSO et al., 2004; MORRISON, 2005), entretanto, a literatura é escassa no que diz respeito às causas de tal alteração.

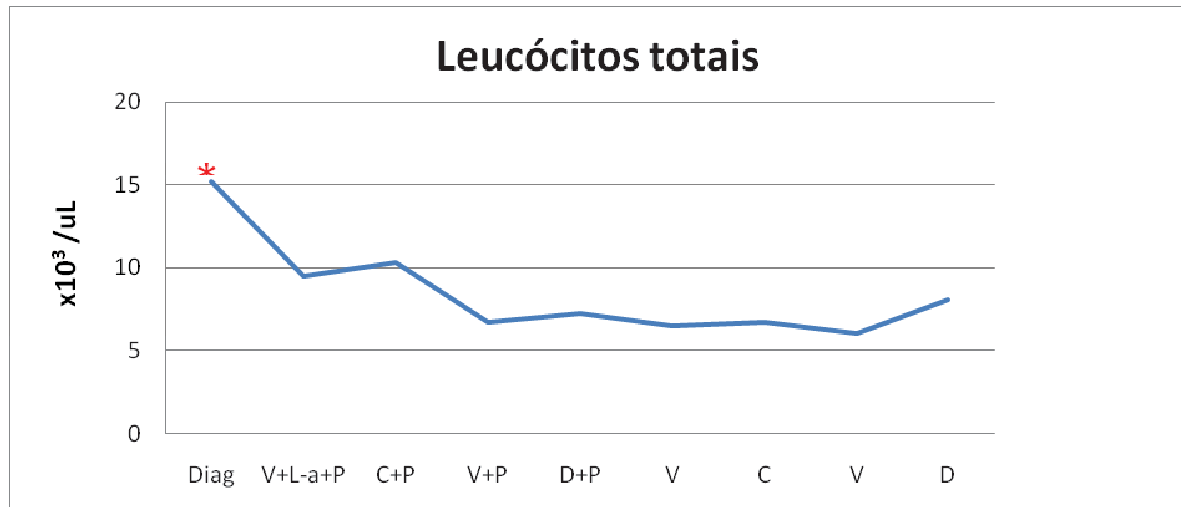
Ao analisar os valores médios obtidos para os leucócitos, após as sessões quimioterápicas com a vincristina, associada ou não a L-asparaginase e prednisona, verificou-se que estas foram as sessões nas quais foram observadas as maiores porcentagens de animais com leucopenia (sessão 1= 47,3%; sessão 3= 55,5%; sessão 6= 53,3% e sessão 8= 33,3%). Em tais sessões a leucopenia decorreu, possivelmente, de neutropenia e/ou linfopenia.

Tabela 5. Valores médios obtidos para o leucograma de 25 cães portadores de linfoma no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica do protocolo Madison-Wiscosin. Jaboticabal, 2011.

	Diag	V+L- a + P	C + P	V + P	D + P	V	C	V	D	p
Leucócitos (x10³/uL)	15,21a	9,48b	10,32b	6,69b	7,27b	6,47b	6,72b	6,06b	8,06b	<0,05
Basófilos (x10³/uL)	0,02a	0,04a	0,01a	0,02a	0,01a	0,04a	0,01a	0,01a	0,06a	0,99
Eosinófilos (x10³/uL)	0,34a	0,24a	0,38a	0,19a	0,15a	0,28a	0,57a	0,45a	0,84a	<0,05
Bastonetes (x10³/uL)	0,28a	0,22a	0,18a	0,18a	0,09a	0,12a	0,25a	0,30a	0,15a	0,91
Neutrófilos (x10³/uL)	11,09a	7,02b	8,55b	5,23b	6,13b	4,66b	8,06b	4,70b	5,21b	<0,05
Linfócitos (x10³/uL)	2,47a	0,92b	0,84b	0,95b	1,00b	1,25b	1,02b	1,27b	0,94b	<0,05
Monócitos (x10³/uL)	0,69a	0,63a	0,60a	0,41a	0,38a	0,37a	0,32a	0,29a	0,23a	0,10

Diag: diagnóstico; V: vincristina; L-a: L-asparaginase; P: prednisona; C: ciclofosfamida; D: doxorubicina.

p < 0,05 letras iguais na mesma linha não diferem entre si.



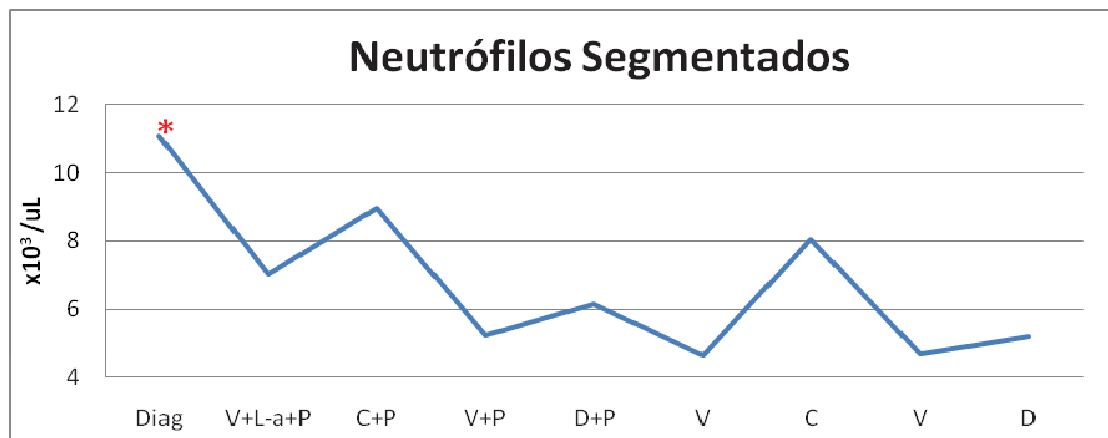
* diferença estatística significativa

Figura 5. Variação dos valores médios obtidos para contagem global de leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$) no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica. Jaboticabal, 2011.

A análise da contagem absoluta de neutrófilos segmentados permite observar diferença significativa apenas no momento do diagnóstico em relação aos demais momentos, aonde encontramos a maior porcentagem de animais com neutrofilia (Tabela 5 e Figura 6). A neutrofilia é um achado encontrado em 25 a 40% dos cães linfomatosos (VAIL & YOUNG, 2007). Neste estudo, o encontro de neutrofilia acompanhada ou não de desvio à esquerda, provavelmente refletiu uma condição inflamatória decorrente do tumor, como asseverado por alguns autores, dentre os quais Schultze (2000).

De outra parte, a presença de neutropenia foi observada principalmente após a quimioterapia com a vincristina (sessão 1= 31,57%, sessão 3= 44,4%, sessão 6= 40% e sessão 8= 33,3%), achado que não foi relatado nos trabalhos de TOMIYASU et. al. (2010b), que reportaram os percentuais de animais neutropênicos que se seguem: sessão 1= 12,5%, sessão 3= 17,5%, sessão 6= 33,3% e sessão 8= 12,5%. A vincristina na dose de $0,75\text{mg}/\text{m}^2$ leva a uma mielotoxicidade moderada (LANORE & DELPRAT, 2004) e, quando associada a L-asparaginase, acentuada (RODASKI & DE NARDI, 2008). Sendo assim, e nas condições do ensaio em questão, pode-se considerar que a

vincristina foi capaz de promover uma maior supressão de leucócitos circulantes em função da diminuição de neutrófilos segmentados, quando comparada aos demais quimioterápicos utilizados. A ciclofosfamida, apesar de levar a uma maior mielossupressão, principalmente traduzida por neutropenia (BARGER & GRINDEM, 2000; RODASKI & DE NARDI, 2008), não revelou, ao menos neste ensaio, tal intensidade de ação mielossupressora, pois apenas 16,6% (sessão 2) e 15,3% (sessão 7) dos animais apresentaram neutropenia, contrariando, os achados de TOMIYASU et. al. (2010b) que observou 25,6% (sessão 2) e 15,6% (sessão 7). É bem possível que tal discrepância tenha sido devida à via de administração do quimioterápico, pois neste estudo foi utilizada a via oral e, no daqueles, a intravenosa.



* diferença estatística significativa

Figura 6. Variação dos valores médios obtidos para contagem de neutrófilos segmentados ($\times 10^3/\mu\text{L}$) no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica. Jaboticabal, 2011.

Com relação às contagens absolutas de neutrófilos bastonetes e de basófilos não houve diferenças significativas entre os momentos (Tabela 5).

A contagem absoluta de eosinófilos mostrou-se significativamente aumentada, após a última sessão de quimioterapia, quando foram comparadas as diferentes sessões do tratamento quimioterápico (Figura 7). Aparentemente, tal comportamento deveu-se ao expressivo número de eosinófilos (4747 eos/ μL) encontrado em um único cão, dentre todos aqueles incluídos no ensaio. Tal fato já foi relato na literatura, tanto

em cães com linfoma T ou B. No entanto, estes casos relatados são raros, e normalmente relacionados ao linfoma T (TOMIYASU et. al, 2010a). Em humanos existem relatos de síndrome paraneoplásica de linfomas com eosinofilia (SHIRAISHI et. al, 2008). Neste estudo, não foi realizado a imunofenotipagem das células linfomatosas, o que impossibilita associar a eosinofilia com algum dos tipos B ou T, bem como não se pode afirmar que foi uma síndrome paraneoplásica, uma vez que as demais causas de eosinofilia não foram descartadas.

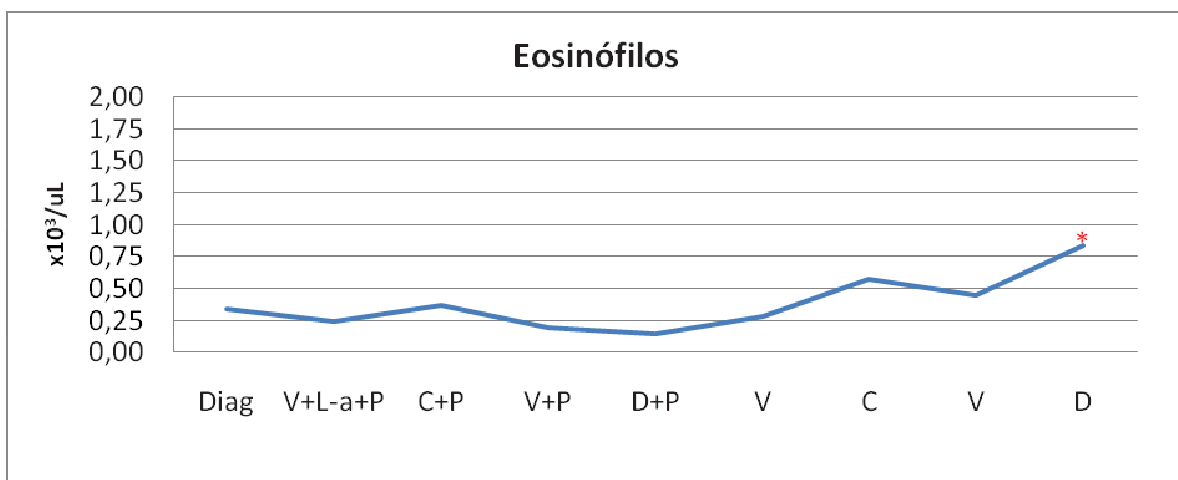
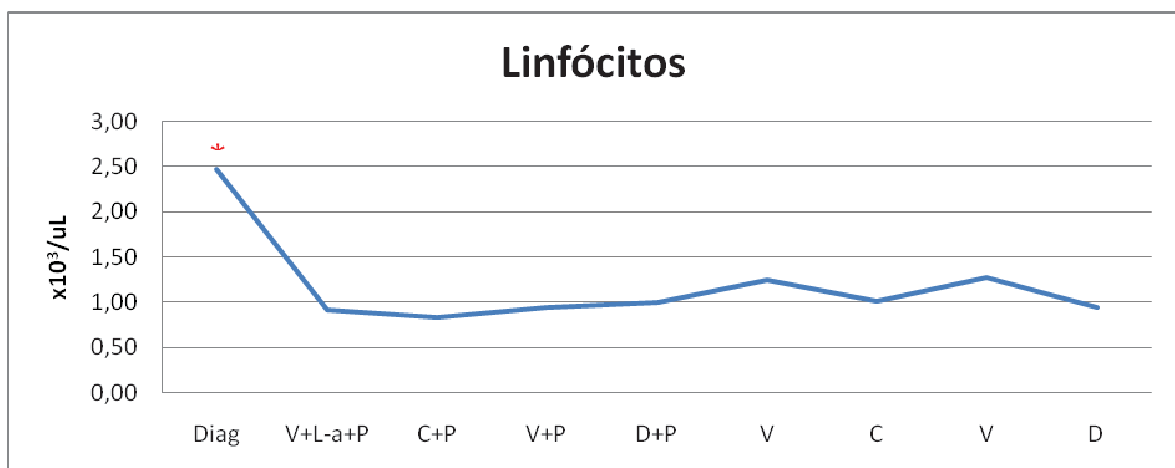


Figura 7. Variação dos valores médios obtidos para a contagem absoluta de eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica. Jaboticabal, 2011.

Já, com relação à contagem absoluta dos linfócitos observou-se diferença significativa apenas no momento do diagnóstico, no qual 12% dos cães apresentaram linfocitose, fato não verificado na comparação entre as sessões quimioterápicas (Tabela 5 e Figura 8). Também, por ocasião do diagnóstico, três cães apresentaram células neoplásicas aos exames da medula óssea e do sangue periférico, sugerindo que a linfocitose, nos referidos pacientes, estivesse relacionada com a proliferação e expansão clonal das células tumorais (KRUTH & CARTER, 1990).

Após as primeiras sessões quimioterápicas, mais de 50% dos animais apresentaram-se linfopênicos, fato que atesta a acentuada toxicidade dos

quimioterápicos no tecido linfóide, tal qual asseverado por Gauthier et al. (2005), segundo os quais os cães com linfoma submetidos a quimioterapia experimentaram considerável redução na concentração de linfócitos sanguíneos. Nas quatro primeiras sessões, foi possível observar os maiores percentuais de animais com linfopenia (sessão 1= 47,3%, sessão 2= 50%, sessão 3= 55,5% e sessão 4= 56,2%), provavelmente devido ao uso da prednisona que induz os linfócitos normais à apoptose e, de outra parte, os linfócitos neoplásicos à citólise (LANORE & DELPRAT, 2004; FAN & LORIMIER, 2005). Porém, é prudente considerar, também, o impedimento da circulação linfática, muitas vezes inerente à evolução da massa linfomatosa (LATIMER, 1997), que frequentemente ocorre no linfoma, e em cuja circunstância os linfócitos que deixam o sangue ficam aprisionados nos linfonodos hipertrofiados ou em efusões quilosas que propiciam a efusão de linfócitos para cavidades corporais (REBAR, 1998).



* diferença estatística significativa

Figura 8. Variação dos valores médios obtidos para a contagem absoluta de linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica. Jaboticabal, 2011.

Ainda com relação aos leucócitos mononucleares observou-se diminuição progressiva no número absoluto de monócitos, mas os valores médios encontrados se mantiveram dentro dos valores de referência, para a espécie canina, e também não se observaram diferenças significativas entre os momentos (Tabela 5 e Figura 9).

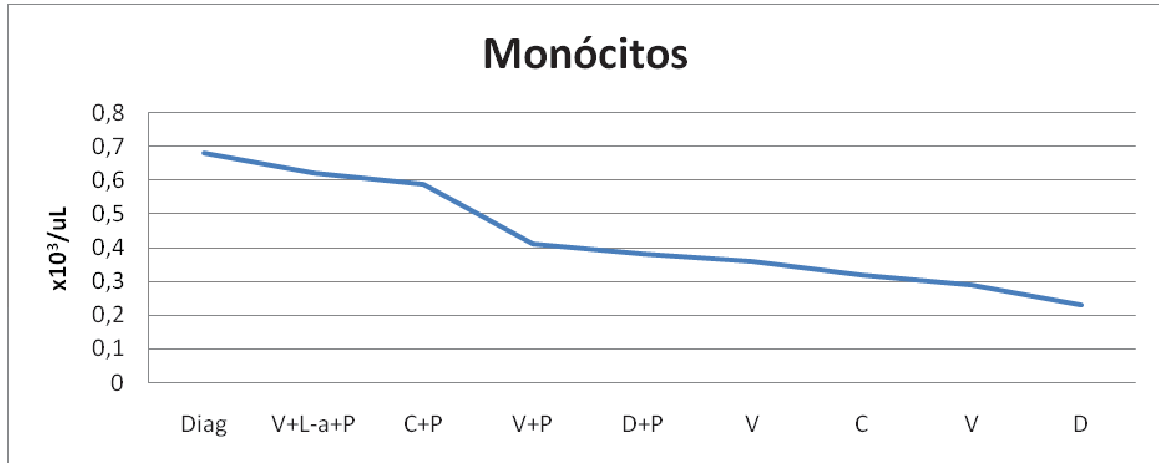


Figura 9. Variação dos valores médios obtidos para a contagem absoluta de monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica. Jaboticabal, 2011.

5.4 Comparação entre as técnicas citométrica e automatizada na obtenção do leucograma

Na comparação das técnicas de contagens globais de granulócitos, linfócitos e monócitos, por intermédio da citometria de fluxo (imunomarcagem de CD45^+) e contagem automatizada (contador automático ABC-VET), foi verificado que, os resultados obtidos, foram bastante semelhantes em ambas as técnicas. A tabela 6 ilustra os resultados das contagens citométricas, ao longo do período de experimentação.

Tabela 6. Valores médios obtidos para as contagens absolutas de granulócitos, linfócitos e monócitos, por intermédio da citometria de fluxo, de 25 cães portadores de linfoma no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica do protocolo Madison-Wiscosin. Jaboticabal, 2011.

	Diag	V+L- a + P	C + P	V + P	D + P	V	C	V	D	P
Granulócitos (x10³/uL)	11,42a	6,71b	8,27b	4,87b	5,71b	4,47b	5,27b	4,27b	5,55b	<0,05
Linfócitos (x10³/uL)	2,87a	1,77b	1,06b	1,13b	0,91b	1,26b	0,81b	1,07b	1,22b	<0,05
Monócitos (x10³/uL)	0,35a	0,30a	0,21a	0,13a	0,12a	0,13a	0,05a	0,17a	0,16a	0,10

Diag: diagnóstico; V: vincristina; L-a: L-asparaginase; P: prednisona; C: ciclofosfamida; D: doxorubicina.

p < 0,05 letras iguais na mesma linha não diferem entre si

As contagens globais obtidas para granulócitos, linfócitos e monócitos, por intermédio da citometria de fluxo, foram comparadas àquelas obtidas pelo método automatizado (Contador de Células ABC-VET), cujos resultados estão apresentados na tabela 7. O valor médio relativo obtido para os granulócitos foi de 72,54% pela citometria de fluxo e 75,16% pelo método automatizado. Para os linfócitos o valor médio relativo foi de 15,78% por citometria de fluxo e 13,04% na contagem automatizada e, no caso dos monócitos, o valor médio relativo obtido na citometria foi de 2,15% e na contagem automatizada igual a 4,91%.

Quando comparadas as duas técnicas utilizadas (citometria de fluxo e o método automatizado), verifica-se que houve diferenças significativas apenas entre os monócitos, sendo que as contagens de granulócitos e linfócitos não apresentaram diferenças significativas em função das técnicas de contagem empregadas. Tais diferenças entre as contagens monócitárias, na comparação das duas técnicas, talvez, possam ser atribuídas à pequena quantidade destas células no sangue periférico, como também em razão da sua grande variabilidade numérica. WEISS (2004) correlacionou mielogramas obtidos de forma convencional àqueles obtidos citometricamente

(imunofenotipagem de CD45⁺), em amostras de medula óssea de cães com desordens hematológicas, e obteve coeficiente de correlação igual a 0,90 entre granulócitos e linfócitos, asseverou boa associação entre as duas técnicas, ainda que no caso dos monócitos, o índice de correlação entre as referidas técnicas tenha sido baixo (0,54).

Tabela 7. Valores médios relativos obtidos por intermédio de contagens automatizadas e citométricas, para granulócitos, linfócitos e monócitos de 25 cães portadores de linfoma, durante o protocolo quimioterápico M-W, Jaboticabal, 2011.

	Granulócitos	Linfócitos	Monócitos
Método Automatizado (%)	75,16±5,46	13,04±2,83	4,91±1,27
C.F (%)	72,54±4,78	15,78±3,4	2,15±0,68
p	0,15	0,23	<0,0001

C.F: citometria de fluxo. Valores de $p < 0,05$ significativo a 5%.

6. CONCLUSÕES

Nas condições deste ensaio e diante dos resultados obtidos, analisados e interpretados, pode-se concluir que:

- As principais alterações no leucograma foram observadas no momento do diagnóstico e, portanto, se referem ao estado linfomatoso.

- A maior mielosupressão leucocitária é imposta pela vincristina e/ou suas associações.

- O leucograma de cães linfomatosos pode ser avaliado tanto por intermédio de contadores eletrônicos como por meio da citometria de fluxo.

7. REFERÊNCIAS

- BARGER, A.M.; GRINDEN, C.B. Hematologic abnormalities associated with cancer therapy. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Toronto: Lippincott Williams_Wilkins, 2000. p.676-681.
- BARNES, P. J. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. **Clinical Science**, London, n. 94, p.557-572, 1998.
- BERGMAN, P. J. Paraneoplastic syndromes. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology**. 4. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. P. 77 – 94.
- BIENZLE, D. Monocytes and Macrophages. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. cap. 49, p. 318- 325.
- CÁPUA, M. L. B. **Tratamento do linfoma canino com poliquimioterapia seguido ou não de transplante autólogo de medula óssea**. 111f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.
- CARDOSO, M.J.L.; MACHADO, L.H.A.; MOUTINHO, F.Q.; PADOVANI, C.R. Linfoma canino-achados clínico-patológicos. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v.9, n.2, p.25-29, 2004.
- CARDOSO, M.J.L. et al. Linfoma canino: revisão de cinquenta e quatro casos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 19, n. 3, p. 131-142, 2003.
- COBBOLD, S.; METCALFE, S. Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: summary of the first canine antigen workshop (CLAW). **Tissue Antigens**, Copenhagen, v.43, n.3, p.137-154, 1994.
- COLETA, F. E. D. **Avaliação hematológica e imunofenotípica de cães com linfoma**. 96f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

- COMAZZI, S. et al. Flow cytometric patterns in blood from dogs with non-neoplastic and neoplastic hematologic diseases using double labeling for CD18 and CD45. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Bárbara, v. 35, n.1, p. 47-54, 2006.
- DALECK, C.R.; CALAZANS, S.G.; De NARDI, A.B. Linfomas. In: DALECK, C.R.; De NARDI, A.B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2008. p. 481-505.
- DAL FARRA, M.C.T.; CAMARGO, A. A.; DIAS, M. A.; SANTANA, A. E. Estudo dos efeitos cardiotoxicos em cães tratados com doxorubicina (Andriblastina). **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 11, n. 1, p. 6-16, 1995.
- DE MOURA, V. M. B. D.; SEQUEIRA, J. L.; BANDARRA E. P. Linfoma canino. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 29-33, 1999.
- DILLOM, A.B.; SPANO, J.S.; POWERS, H.D. Prednisolone induced hematologic, biochemical and histologic changes in the dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakewood, v.16, p.831-837, 1980.
- DOBSON, J.M., GORMAN, N.T. Canine Multicentric lymphoma. 2: Comparison of response to two chemotherapeutic protocols. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v.35, p.9-15, 1993.
- FAN, T.M.; LORIMIER, L. Treating lymphoma in dogs and cats. **Veterinary Medicine**, Tenexa, p.285-294, abr. 2005.
- FAN, T. M.; KITCHELL, B. E. An update on diagnosing and treating canine lymphosarcoma. **Veterinary Medicine**, Tenexa, p.58-67, jan 2002.
- FIGUERA, R.A.; SOUZA, T.M.; BARROS, C.S.L. Linfossarcoma em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 5, p. 895-99, 2002.
- FRAZIER, D. L.; HAHN, K. A. Commonly used drugs. In: HAHN, K. A.; RICHARDSON, R. C. **Cancer chemotherapy - a veterinary handbook**. Malvern: Williams & Wilkins, 1995. p. 79-149.
- FALDYNA, M. et al. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs – a flow cytometric study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Netherlands, v.82, n.1-2, p.23-37, 2001.

FRÁGUAS, M.S. **Estudo de casos de linfoma canino ocorridos entre maio de 2003 e dezembro de 2006 junto ao Hospital Veterinário Governador Laudo Natel da FCAV-UNESP-Jaboticabal**. 2008. 64 f. Trabalho de iniciação científica (modalidade bacharelado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

GARRETT et. al. Evaluation of a 6-month chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. Lawrence, n.16, p.704-709, 2002.

GAUTHIER, M.J.; AUBERT, I.; ABRAMS-OGG, A.; WOODS, J.P.; BIENZLE, D. The Immunophenotype of Peripheral Blood Lymphocytes in Clinically Healthy Dogs and Dogs with Lymphoma in Remission. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 19. p.193-199, 2005.

GREENLEE, P.G. et al. Lymphomas in dogs: a morphologic, immunologic, and clinical study. **Cancer**, Philadelphia, v.66, 1990, p.480-490.

GRINDEM, C.B. Blood cell markers. The **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v.26, n.5, p.1043-1065, 1996.

JAIN, C.N. **Essentials of Veterinary Hematology**, Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, p. 334-335.

JENNINGS, C.D.; FOON, K.A. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. **Blood**, New York, v.90, n.8, p. 2863-2892, 1997.

JONES, C.J., HUNT, R.D., KING, N.W. **Veterinary pathology**. 6.ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1997.

KITCHELL, B. E.; DHALIWAL, R. S. Hematology. Oncology, Immunology: CVT update: anticancer drugs and protocols using traditional drugs. In: KIRK, R. W.; BONAGURA, J. D., **Current Veterinary Therapy XIII – Small Animal Practice**. Philadelphia: Saunders, 2000. p. 465-473.

KEREN, D.F. History and evolution of surface marker assays. In: KEREN, D.F., HANSON, C.A., HARTUBISE, P.E. **Flow cytometry and clinical diagnosis**. Chicago: American Society of Clinical Pathologists, 1994, p.1.

- KRUTH, S. A.; CARTER, R. F. Laboratory abnormalities in patients with cancer. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 4, p. 897 – 917, 1990.
- LANORE, D.; DELPRAT, C. **Quimioterapia anticancerígena**. São Paulo: Roca, 2004. 191p.
- LATIMER, K.S. Leucócitos na saúde e na moléstia. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de medicina interna veterinária**. São Paulo: Manole, 1997. p.2616-2666.
- LAYNER, L.L. Flow cytometry reveals the complexity and diversity of the immune system. In: BAVER, K. D.; DUQUE, R. E.; SHANKEY, T. V. **Clinical flow cytometry – principles and application**. Baltimore: Library of congress, 2002. cap. 4, p. 63 -70.
- LORAND-METZE, I. Contribuição da citometria de fluxo para o diagnóstico e prognóstico das síndromes mielodisplásicas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 3, p. 178-181, 2006.
- MACEWEN E.G. Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 205, n. 12, p. 1722-1728, 1994.
- MACEWEN, E. G.; YOUNG, K. M. Canine lymphoma and lymphoid leukemias. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Small Animal Clinical Oncology**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1996. cap. 28 B, p. 451-479.
- MADWELL, B.R.; THEILEN, G.H. Hematopoietic neoplasms, sarcomas and related conditions. Part IV: Canine. In: THEILEN, G.H.; MADWELL, B.R. **Veterinary cancer medicine**. 2 ed. Philadelphia: Lea Febiger, p.392-401, 1987.
- MANGIERI, J. Síndromes paraneoplásicas. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2008. cap. 14, p. 237-252.
- MILLER, E. Immunosuppression – An Overview. **Seminars of Veterinary Medical Surgery**, Small Animal, v.12, p.144-149, 1997.
- MINISCALCO, b.; GUGLIELMINO, R.; MORELLO, E.; TARDUCCI, A; GEUNA, M.; Clinical usefulness of peripheral blood lymphocytes subsets in canine lymphoma. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, n. 1, sup. 27, p. 407- 409, 2003.

- MORENO, K.; BRACARENSE, A.P.F.R.L. Estudo retrospectivo de linfoma canino no período de 1990-2004 na região norte do Paraná. **Brazilian Journal Veterinary Animal Science**, São Paulo, v. 44, p. 46-52, 2007.
- MOULTON, J.E., HARVEY, J.W. Tumors of the lymphoid and hematopoietic tissues. In: MOULTON, J.E. **Tumors in domestic animals**. 3 ed. California: University of California, p.240-244, 1990.
- MORRISON, W.B. Lymphoma in dogs and cats. Texas: Teton New Media, 2005.
- MORRISON, W. B. Commonly used protocols: Canine lymphoproliferative neoplasms: Doxorubicin. In: HAHN, K. A.; RICHARDSON, R. C. **Cancer chemotherapy - a veterinary handbook**. Malvern: Williams & Wilkins, 1998. p. 156.
- MOULTON, J.E.; HARVEY, J.W. Tumors of the lymphoid and hematopoietic tissues. In: MOULTON, J.E. **Tumors in domestic animals**. 3. ed. Berkeley: University of California Press, 1990. p. 231.
- NAKAGE, A.P.M. et al. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**, v. 35, n.4, p. 966-973, 2005.
- NGUYEN, D.T; DIAMOND, L.W.; BRAYLAND, R.C. Flow cytometry in hematopathology: a visual approach to data analysis and interpretation. **Humana Press**, p.220, 2007.
- NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina interna de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 1087-1096.
- OGILVIE, G. K.; MOORE, A. S. Management of Specific Diseases: Clinical Briefing: Lymphoma. In: **Managing the Veterinary Cancer Patient**. Trenton: Veterinary Learning Systems, 1995. p. 228-259.
- OWEN, L. **TNM classification of tumors in domestic animals**. World Health Organization, 1980. p.46-47.
- PAXTON, H. et al. Results of the flow cytometry ACTG quality control program: analysis and findings. **Clinical Immunology and Immunopathology**, New York, v.52, n.1, p.68-84, 1989.
- RALLIS, T.; KOUTINAS, A.; LEKKAS, S. Lymphoma in the dog. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v.33, p.590-596, 1992.

- RAMOS, R. S., et al. Estudo da prevalência das principais síndromes paraneoplásicas de 14 cães com linfoma- relato de casos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 3, p. 38-39, 2008.
- RICHTER, K.P. Moléstias do intestino grosso, In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de medicina interna veterinária**. São Paulo: Manole, 1992, p. 1462-1486.
- RODASK, S.; DE NARDI, A.B. **Quimioterapia Antineoplásica em cães e gatos**. São Paulo: MedVet Livros, 2008.
- ROSENTHAL, C.R.; MACEWEN, E. G. Treatment of lymphoma in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 196, n. 5, p. 774-781, 1990.
- SANTANA, A. E.; SEKI, M. C.; GAMA, F. G. V.; SOBREIRA, M. F. R.; NAKAGE, A. P. Citologia Aspirativa com agulha fina aplicada ao estudo das neoplasias. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2008. cap, 4, p. 76-88.
- SANTANA, A. E. **Efeitos hematotóxicos de dois diferentes níveis de dosagens de sulfato de vincristina (oncovin®) em cães (Canis familiaris, Linnaeus, 1758)**. 2000. 106f. Tese (Livre-Docência em Patologia Clínica Veterinária²⁵) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.
- SCHULTZE, A. E. Interpretation of canine leukocyte responses. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 366- 381.
- STOCKHAM, S.L.; KEETON, K.S.; SZLADOVITS, B. Clinical assessment of leukocytosis: distinguishing leukocytoses caused by inflammatory, glycocorticoides, physiologic and leukemic disorders or conduction. **The veterinary clinics of North America**. Small Animal Practice, Philadelphia, v. 33, p. 1335-1357, 2003.
- SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. **Dermatologia de pequenos animais**. São Paulo: Interlivros, 1995, 1130p.
- SEQUEIRA, J.L., FRANCO,M., BANDARRA, E.P. et al. Características anatoclínicas dos linfomas caninos na região de Botucatu, São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.51, n.3, p.1-11, 1999.

SHIRAISHI, J.; NAKAGAWA, Y.; KURATA, M.; YAMAMOTO, K.; ABE, Y.; TOYODA, Y.; SUZUKI, K.; KITAGAWA, M.; TAKEMURA, T. Follicular lymphoma with marked infiltration of eosinophils. **Pathol. Int.** v. 58, p. 701 -705, 2008.

SOBREIRA, M. F. R. **Estudo das alterações hematológicas e das provas funcionais hepáticas e renal em cães (Canis familiaris) sadios expostos ao sulfato de vincristina (Oncovin®)**. 1999. 113f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1999.

STARRAK, G.S.; BEARY, C.B.; PAGE, R.L.; JOHNSON, J.L.; THRALL, D.E. Correlation between thoracic radiographic changes and remission/survival duration in 270 dogs with lymphosarcoma. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, Raleigh, v.38, n.6, p.411-418, 1997.

TESKE, E. et al. Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 205, n. 12, p. 1722-1728, 1994.

TESKE, E. Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma. **European Journal of Companion Animal Practice**, Paris, v. 6, p. 59-71, 1996.

TIZARD, I.R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. São Paulo, Roca, 2002, p. 93-139.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 5 ed .São Paulo: Roca,1998. p.531.

TOMIYASU, H.; FUJINO, Y.; UGAI, J.; GOTO-KOSHINO, Y.; IDE, T.; TAKAHASHI, M.; OHNO, K.; UCHIDA, K.; NAKAYAMA, H.; TSUJIMOTO, H. Eosinophilia and eosinophilic infiltration into splenic B-cell high-grade lymphoma in a dog. **The journal of veterinary medical science**. Tokyo, v. 72, n. 10, p. 1367 – 1370, 2010a.

TOMIYASU, H.; TAKAHASHI, M.; FUJINO, Y.; OHNO, K.; TSUJIMOTO, H. Gastrointestinal and hematologic adverse events after administration of vincristina, cyclophosphamide, and doxorubicin in dogs with lymphoma that underwent a

- combination multidrug chemotherapy protocol. **The journal of veterinary medical science**, Tokyo, v. 72, n. 11, p. 1391 – 1397, 2010b.
- WALTER, C.U.; BILLER, B.J.; LANA, S.E.; BACHAND, A.M., DOW, S.W. Effects of chemotherapy on immune responses in dogs with cancer. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, n. 20, p. 342-347, 2006.
- WEISS, D.J. Flow cytometric evaluation of canine bone marrow based on intracytoplasmic complexity and CD45 expression. **Veterinary Clinical Pathology Journal**, Boston, v.33, n.2, p.96-101, 2004.
- VAIL, D. M.; OGILVIE, G. K. Neoplasias Linfóides. In: BICHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders – clínica de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 1998. cap. 6, p. 218-225.
- VAIL, D.M. Lymphoma. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. cap. 91, p. 620-625.
- VAIL, D.M.; YOUNG, K.M. Hematopoietic tumors. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. **Small animal clinical oncology**. 4. ed. Missouri: Saunders, 2007. p. 699-784.
- VALLI, V.E.O. The hematopoietic system. In: JUBB, K.V.F., KENNEDY, P.C., PALMER, N. (Ed). **Pathology of domestic animals**. 6 ed. New York: Academic, 1993. v.3, p.149-153.