

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DO FATOR ESTIMULANTE DE COLÔNIA DE
GRANULÓCITOS RECOMBINANTE HUMANO (rhG-CSF) SOBRE
O NÚMERO DE LEUCÓCITOS, PLAQUETAS E SOBRE A
MOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS
CD34⁺ PARA O SANGUE PERIFÉRICO DE CÃES SADIOS.**

Ana Livia Motta Silva

Médica Veterinária

JABOTICABAL- SÃO PAULO-BRASIL

2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DO FATOR ESTIMULANTE DE COLÔNIA DE
GRANULÓCITOS RECOMBINANTE HUMANO (rhG-CSF) SOBRE
O NÚMERO DE LEUCÓCITOS, PLAQUETAS E SOBRE A
MOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTIAS
CD34⁺ PARA O SANGUE PERIFÉRICO DE CÃES SADIOS.**

Ana Livia Motta Silva

Orientador: Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana

Co-orientadora: Prof. Dra. Ana Paula Massae Nakage Canesin

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Clínica Médica Veterinária).

JABOTICABAL- SÃO PAULO-BRASIL

JULHO de 2012

Silva, Ana Livia Motta

S586e Efeito do fator estimulante de colônia de granulócitos recombinante humano (rhg-csf) sobre o número de leucócitos, plaquetas e sobre a mobilização de células-tronco hematopoéticas cd34+ para o sangue periférico de cães saudáveis/ Ana Livia Motta Silva. -- Jaboticabal, 2012 xiv, 71 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012

Orientador: Aureo Evangelista Sanatana

Banca examinadora: Daniel Paulino Júnior, Sabryna Gouveia Calazans

Bibliografia

1. Cães. 2. G-CSF. 3. Células CD34⁺. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:615.2:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
e-mail: anamedvet@hotmail.com

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

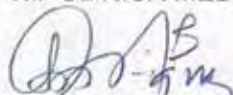
TÍTULO: EFEITO DO FATOR ESTIMULANTE DE COLÔNIA DE GRANULÓCITOS RECOMBINANTE HUMANO (rhG-CSF) SOBRE O NÚMERO DE LEUCÓCITOS, PLAQUETAS E SOBRE A MOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTIAS CD34⁺ PARA O SANGUE PERIFÉRICO DE CÃES SADIOS

AUTORA: ANA LÍVIA MOTTA SILVA PEREIRA

ORIENTADOR: Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA

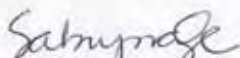
CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. ANA PAULA MASSAE NAKAGE CANESIN

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:



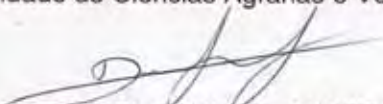
Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Profa. Dra. SABRYNA GOUVEIA CALAZANS

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal / Ribeirão Preto/SP



Prof. Dr. DANIEL PAULINO JUNIOR

Universidade de Franca

Data da realização: 05 de julho de 2012.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANA LÍVIA MOTTA SILVA – nascida em Ribeirão Preto, em 10 de maio de 1984, graduada em Medicina Veterinária, ano de 2009, no Centro Universitário Barão de Mauá, Ribeirão Preto, com auxílio do Programa Universidade para Todos (ProUni) do governo federal. Atua na área de Patologia Clínica Veterinária desde o ano de 2008, ainda durante a graduação quando iniciou suas atividades científicas com projeto de Iniciação Científica contemplado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Exerceu atividade como patologista clínica veterinária no Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias LaborPet, situado na cidade de Ribeirão Preto/SP entre junho de 2010 a março de 2011. Atualmente atua como patologista clínica veterinária no Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias e Hemocentro Veterinário HEMOLABVET, situado na cidade de Ribeirão Preto/SP.

"Nós seres humanos, estamos na natureza para auxiliar o progresso dos animais, na mesma proporção que os anjos estão para nos auxiliar. Portanto quem chuta ou maltrata um animal é alguém que não aprendeu a amar".

Chico Xavier.

Dedico

Ao meu marido, Rafael, pela constante presença ao
meu lado e por todo amor, carinho e incentivo;
Ao meu filho, João Vítor, pelos sorrisos de esperança
que me animavam nos momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

À Deus e aos Espíritos de Luz pela presença constante em minha vida, dando força para superar cada obstáculo.

Aos meus pais pelas palavras de incentivo e por nunca me deixar desistir de meus sonhos.

À minha co-orientadora, Prof. Ana Paula, pela confiança, amizade e ensinamentos.

Ao meu orientador, Prof. Aureo, pela confiança no meu trabalho.

Ao Prof. Daniel e Prof. Sabryna pela brilhante cooperação durante a correção do meu trabalho.

À Rafaela pela ajuda nas coletas de sangue dos cães, no processamento das amostras, sempre me dando forças, mesmo nos finais de semana.

À Mariana pelo auxílio durante execução do projeto, nas contagens de células e coleta de sangue dos cães.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES) pelo apoio financeiro concedido.

Ao Prof. Jair e Prof. Adriana do Centro Universitário Barão de Mauá.

Aos funcionários do canil do Hospital Veterinário do Centro Universitário Barão de Mauá.

Aos cães, sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado.

SUMÁRIO

	Página
LISTA de Figuras.....	viii
LISTA de Tabelas	xi
Lista de Abreviações.....	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT.....	xiv
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA	2
II.1 G-CSF na Medicina Veterinária	2
II.2 Efeito do rhG-CSF sobre o número de plaquetas.....	7
II.3 G-CSF mobiliza células-tronco hematopoéticas (CTH) da medula óssea para o sangue periférico.....	8
II.4 Transplante com sangue periférico mobilizado (SPM)	11
II.5 Células-tronco hematopoéticas CD34+	15
II.6 Identificação e quantificação das CTH CD34+: Citometria de Fluxo ...	17
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
III.1 Comitê de Ética	21
III.2 Animais.....	21
III.3 Aplicações do rhG-CSF	21
III.4 Colheita De Material	22
III.5 Contagem de Leucócitos e Plaquetas	23
III.6 Avaliação Citofluorométrica	23
III.7 Cálculo da Quantificação de Células CD34+	24
III.8 Análise Estatística	26
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27

IV.1 Leucograma.....	27
IV.2 Números de Plaquetas	39
IV.3 Números de CD34 ⁺ no Sangue Periférico.....	44
V. CONCLUSÕES	54
VI. REFERÊNCIAS.....	55

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** cronograma demonstrando os momentos de aplicação do rhG-CSF e coleta de sangue dos cães saudáveis dos três grupos experimentais, Jaboticabal, 2011. 22
- Figura 2:** Quantificação das CTH CD34⁺ do sangue periférico canino através da citometria de fluxo. Os dados analisados pelo aparelho são plotados em gráficos e analisados pelo *software* FACSdiva. Quatro gráficos foram gerados para identificar a população de células CD34⁺. Gráfico A: Determina população de células CD45⁺ (P1), excluindo plaquetas, hemácias e debris celulares (P4); Gráfico B: Determina a partir da *gate* P1 todos os eventos positivos para células CD34⁺ (P2); Gráfico C: a partir da *gate* P2 identifica células com característica de baixa granulosidade e baixa a intermediária intensidade de fluorescência (células CD45⁺ de baixa expressão); Gráfico D: Foi feita uma *gate* da P3 baseada no tamanho e complexidade interna das células, identificando todos os eventos positivos para CD34⁺ (células de tamanho intermediário a grande com pouca granulosidade citoplasmática).
..... 25
- Figura 3:** Valores médios obtidos para Leucócitos/ μ L nos cães sadios dos grupos D5, D10 e D20 em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2011. 31
- Figura 4:** Valores médios obtidos para NS nos cães sadios dos grupos D5, D10 e D20 em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2011. 31
- Figura 5:** Valores médios obtidos para NB nos cães sadios dos grupos D5, D10 e D20 em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2011. 32
- Figura 6:** Valores individuais de leucócitos/ μ L e neutrófilos/ μ L de cães sadios que receberam 5 μ g/Kg/dia de rhG-CSF, Jaboticabal, 2011. 32
- Figura 7:** Valores individuais de leucócitos/ μ L e neutrófilos/ μ L de cães sadios que receberam 10 μ g/Kg/dia de rhG-CSF, Jaboticabal, 2011. 33

Figura 8: Valores individuais de leucócitos/ μL e neutrófilos/ μL de cães sadios que receberam $20\mu\text{g/Kg/dia}$ de rhG-CSF, Jaboticabal, 2011.	33
Figura 9: Valores médios de leucócitos/ μL e de NS/ μL do M0 e M1 dos três grupos experimentais, Jaboticabal, 2011.	34
Figura 10: Box Plot da contagem de leucócitos/ μL dos diferentes grupos durante os momentos M1 a M4, Jaboticabal, 2011. * diferença estatística para $p\leq 0.05$ entre D5 e D20;	36
Figura 11: Box Plot da contagem de NS/ μL dos diferentes grupos durante os momentos M1 a M4, Jaboticabal, 2011. * diferença estatística para $p\leq 0.05$ entre D5 e D20;	36
Figura 12: Box Plot da contagem de NB/ μL dos diferentes grupos durante os momentos M1 a M4, Jaboticabal, 2011. * diferença estatística para $p\leq 0.05$ entre D5 e D10; ** diferença estatística para $p\leq 0.05$ entre D5 e D20.	37
Figura 13: Valores médios obtidos na contagem de leucócitos/ μL nos momentos M0 a M10 nos diferentes grupos, Jaboticabal, 2011.	37
Figura 14: Valores médios obtidos na contagem diferencial de NS/ μL nos momentos de M0 a M10 nos diferentes grupos, Jaboticabal, 2011.	38
Figura 15: Valores médios obtidos na contagem diferencial de NB/ μL nos momentos de M0 a M10 nos diferentes grupos. Jaboticabal, 2011.	38
Figura 16: Valores médios obtidos para plaquetas/ μL nos cães dos grupos D5, D10 e D20 nos diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2011.....	40
Figura 17: Valores médios obtidos na contagem de células plaquetas/ μL dos momentos de M0-M10 nos diferentes grupos (D5, D10 e D20), demonstrando redução dose-dependente. Jaboticabal, 2011.....	41

- Figura 18:** Box Plot da contagem de plaquetas/ μL dos diferentes grupos durante os momentos M1 a M4, Jaboticabal, 2011. * diferença estatística para $p \leq 0.05$ entre D10 e D20; ** diferença estatística para $p \leq 0.05$ entre D5 e D20. 41
- Figura 19:** Valores médios obtidos para células CD34+/ μL nos cães dos grupos D5, D10 e D20 em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2011. 46
- Figura 20:** Quantificação das CTH CD34⁺ do sangue periférico canino através da citometria de fluxo. Os dados analisados pelo aparelho são plotados em gráficos e analisados pelo *software* FACSDiva.. A: M0; B: M1 grupo D5; C: M1 grupo D10; D: M1 grupo D20. Notar a diferença entre as *gates* P5 (população de células CD34⁺)..... 47
- Figura 21:** Valores médios de CD34+/ μL do M0 e M1 dos três grupos experimentais, Jaboticabal, 2011..... 48
- Figura 22:** Valores médios obtidos na contagem de células CD34+/ μL de M0 a M10 nos diferentes grupos (D5, D10 e D20), demonstrando elevação dose-dependente. Jaboticabal, 2011..... 49
- Figura 23:** Box Plot da contagem de células CD34+/ μL dos diferentes grupos durante os momentos M1-M4, Jaboticabal, 2011. * diferença estatística para $p \leq 0.05$ entre D5 e D10; ** diferença estatística para $p \leq 0.05$ entre D5 e D20..... 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores obtidos para leucograma (células/ μ L) dos cães do grupo D5. Jaboticabal, 2011.....	27
Tabela 2: Valores obtidos para leucograma (células/ μ L) dos cães do grupo D10. Jaboticabal, 2011.....	28
Tabela 3: Valores obtidos para leucograma (células/ μ L) dos cães do grupo D20. Jaboticabal, 2011.....	28
Tabela 4: Valores médios obtidos para o número de plaquetas/ μ L nos diferentes momentos e grupos experimentais. Jaboticabal, 2011.....	39
Tabela 5: Valores médios obtidos para o número de células CD34+/ μ L nos diferentes momentos e grupos experimentais. Jaboticabal, 2011.....	44
Tabela 6: número de células CD34 ⁺ / μ L dos momentos M1-M3 (durante aplicação do medicamento) e M4 (24 horas após a última dose) de cada parcela experimental	52

LISTA DE ABREVIações

ADP: adenosina di-fosfato

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CMD: cardiomiopatia dilatada

CMSP: células mononucleares do sangue periférico

CT: células-tronco

CTH: células-tronco hematopoéticas

CTP: células-tronco periféricas

G-CSF: *granulocyte colony-stimulating fator* (fator estimulante de colônia de granulócitos)

HIV: *human immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência humana)

MO: medula óssea

NK: células *natural killer*

rcG-CSF: *recombinat canine granulocyte colony-stimulating fator* (fator estimulante de colônia de granulócitos recombinante canino)

rhG-CSF: *recombinant human granulocyte colony-stimulating fator* (fator estimulante de colônia de granulócitos recombinante humano).

SPM: sangue periférico mobilizado

TCTP: transplante de células-tronco periféricas

TMO: transplante medula óssea

TNF: Fator de Necrose Tumoral

**EFEITO DO FATOR ESTIMULANTE DE COLÔNIA DE GRANULÓCITOS
RECOMBINANTE HUMANO (rhG-CSF) SOBRE O NÚMERO DE LEUCÓCITOS,
PLAQUETAS E SOBRE A MOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTIAS
CD34+ PARA O SANGUE PERIFÉRICO DE CÃES SADIOS.**

RESUMO

O rhG-CSF é uma citocina que eleva o número de neutrófilos e também mobiliza células-tronco hematopoéticas (CTH) para o sangue periférico, porém sua aplicação pode ocasionar a queda de plaquetas. O objetivo do presente trabalho foi estabelecer entre três diferentes doses (5, 10 e 20µg/Kg/dia) do rhG-CSF qual proporcione mobilização de pelo menos 10 CTH CD34⁺/µL ao sangue periférico, elevação do número de neutrófilos, além de avaliar seu efeito sobre o número de plaquetas em cães saudáveis. O rhG-CSF (filgrastine) foi aplicado em cães saudáveis durante quatro dias e a contagem no número de CTH CD34⁺/µL, neutrófilos e plaquetas foi obtida durante a aplicação da citocina e sete dias após o término da aplicação. A leucocitose ocorreu devido à elevação dose-dependente de neutrófilos segmentados que ocorreu 24 horas após a primeira aplicação do medicamento com diferença estatística. Entretanto, 48 horas após a última dose, os valores retornaram aos níveis basais nos três grupos. O número de plaquetas reduziu após a primeira dose e não recuperou até o último momento de avaliação. Em relação às CTH CD34⁺, para os grupos que receberam 10 e 20µg/Kg/dia ocorreu elevação dose-dependente 24h após primeira aplicação com diferença estatística; no grupo que recebeu 5µg/Kg/dia os valores não elevaram. A dose de 5µg/Kg/dia foi suficiente para elevar os valores de neutrófilos, porém não acarretou na mobilização de CTH CD34⁺. As três doses administradas aos animais levou a queda nos valores de plaquetas, sendo necessária precaução ao administrar em cães trombocitopenicos.

Palavras-chaves: cães, células CD34⁺, g-csf, granulócitos, mobilização, plaquetas

EFFECT OF THE RECOMBINANT HUMAN GRANULOCYTE COLONY STIMULATING FACTOR (rhG-CSF) ON THE NUMBER OF LEUKOCYTES, PLATELETS AND ON THE MOBILIZATION HEMATOPOIETIC STEM CELL CD34⁺ PERIPHERAL BLOOD FOR THE HEALTHY DOGS.

ABSTRACT

The rhG-CSF is a cytokine that increase the number of neutrophils and also mobilizes hematopoietic stem cell (HSC) to peripheral blood, but their application can cause a drop in platelets. The aim this work was to establish between three different doses (5, 10 e 20 µg/kg/day) of rhG-CSF which provides mobilization at least 10 HSC CD34⁺/µL to peripheral blood, increased number of neutrophils and to evaluate its effect on the number platelets in normal dogs. The rhG-CSF (Filgrastine®) was applied from healthy dogs for four days and counting the number of HSC CD34⁺, neutrophils and platelets was obtained during the application of cytokine and seven days after the application. The leukocytosis occurred due to increase dose relation of segmented neutrophils that occurred 24 hours after the first application of the drug with a statistical difference. However, 48 hours after the last dose, the values returned to baseline levels in the three groups. The number of platelets reduced after the first dose and not returns to the last time point. Regarding the number HSC CD34⁺, for the groups receiving 10 and 20 µg/kg/day occurred increase dose relation 24 hours after the first application with a statistical difference; in the group that received 5 µg/kg/day, values did not improve. The dose of 5 µg/kg/day was enough to raise the values of neutrophils, but did not result in the mobilization of HSC CD34⁺. All three doses administered to animals led to a drop in platelets, necessitating caution when administering in thrombocytopenic dogs.

Key-words: dogs, granulocyte, HSC CD34⁺, mobilization, platelets.

I. INTRODUÇÃO

O fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF) é uma citocina linhagem específica que inicia o desenvolvimento de células hematopoéticas e estimula a produção e ativação de neutrófilos. Sua utilização na medicina veterinária é feita com sucesso para elevar o número de neutrófilos, amenizando ou revertendo situações de grave neutropenia. Entretanto, apesar da recuperação neutrofílica, há relatos de que a administração de rhG-CSF em cães e humanos reduz os valores de plaquetas na circulação periférica.

Em seres humanos e cães, além da aplicação para reverter quadros neutropênicos, o G-CSF é utilizado com intuito de mobilizar células-tronco hematopoéticas (CTH) da medula óssea para o sangue periférico para posterior transplante autólogo ou alogênico.

A identificação e quantificação das CTH, caracterizadas através da expressão do antígeno de superfície celular CD34⁺, são feitas por meio da citometria de fluxo (CMF), com a utilização de anticorpos monoclonais específicos. A CMF é um recurso emergente na Medicina Veterinária que, embora tenha alto custo e necessidade de técnicos especializados, tem sido aplicada em vários projetos científicos relacionados à hematologia veterinária.

Portanto, este ensaio científico foi formulado buscando compreender a dinâmica de mobilização de CTH da medula óssea ao sangue periférico na espécie canina, no qual diferentes doses de G-CSF foram administradas em cães saudáveis para posterior quantificação de células CD34⁺ no sangue periférico, bem como avaliação do leucograma e trombograma, a fim de verificar qual dose permite mobilização eficiente.

II. REVISÃO DE LITERATURA

II.1 G-CSF na Medicina Veterinária

O uso dos fatores de crescimento hematopoético na medicina humana e veterinária tem ocorrido devido à crescente disponibilidade comercial. Entretanto, existem poucos estudos nacionais sobre o uso desses fármacos em cães (LUCIDI; TAKAHIRA, 2007).

O fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF) é um fator de crescimento hematopoético pertencente à família das citocinas que inicia o desenvolvimento de células hematopoéticas e estimula a produção e ativação de neutrófilos (MOLINEUX et al., 1990; FELDMAN et al., 2000). É produzido pelas células do estroma da medula óssea (MO), fibroblastos, células endoteliais, monócitos e macrófagos, sob estímulo de citocinas inflamatórias, tais como interleucina 1 e 3 (IL-1 e IL-3), Fator de Necrose Tumoral (TNF) e por endotoxinas bacterianas (HENRY et al., 1998).

O G-CSF é um dos fatores de crescimento hematopoético com maior potencial para uso clínico, pois é linhagem-específico e desempenha importante papel na granulopoese. Atua na medula óssea estimulando o aumento da liberação de neutrófilos maduros do compartimento de reserva para o sangue periférico, incita a proliferação e reduz o tempo de maturação dos precursores granulocíticos, além de aprimorar a função dos neutrófilos com a amplificação de sua capacidade fagocítica, quimiotática e desgranulação (HENRY et al., 1998; REWERTS; HENRY, 1998; FELDMAN et al., 2000). Ademais, também minimiza o fenômeno da apoptose de neutrófilos *in vitro*, de cães saudáveis, levando ao aumento da vida média das referidas células (OGUMA et al., 2005).

Os neutrófilos constituem a primeira linha de defesa do organismo, participando de inflamações, infecções, principalmente bacterianas, e lesões teciduais. Estas células possuem grânulos com enzimas proteolíticas, que participam no processo de digestão de antígenos. A cinética dos neutrófilos dentro dos vasos se constitui basicamente de rolamento pelo tecido endotelial, adesão à célula endotelial do local envolvido na quimiotaxia, migração para o tecido lesado e fagocitose de substâncias estranhas ao organismo (STOCKHAM; SCOTT, 2011). De acordo com o tempo de vida médio dos componentes sanguíneos, é fácil entender por que a linhagem granulocítica é a primeira a ser afetada em casos de deficiência na hematopoiese, pois os neutrófilos duram de quatro a oito horas na circulação, ao passo que as plaquetas têm uma vida média de quatro a seis dias, e as hemácias de 60 dias no gato e de 120 dias no cão (COUTO, 2003).

O rh-GCSF, de nome genérico filgrastim, é a forma aplicável desta citocina, o qual é uma proteína não glicosilada produzida a partir do genoma de *E. coli* (GOMES, 2010), o qual foi registrado no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2002 (BRASIL, 2002). Pode ser utilizado em períodos de intensa neutropenia após altas doses de quimioterápicos seguidas ou não de transplante autólogo de medula óssea (TAMO) em humanos (SHERIDAM et al., 1992) e cães (CÁPUA et al., 2009). Sua aplicação é feita com o intuito de reduzir os efeitos deletérios da imunossupressão pré-transplante, como infecções severas, ao estimular à multiplicação e diferenciação dos progenitores neutrofilicos, aumentar a saída para circulação sanguínea e a funcionalidade dos neutrófilos (HERNANDEZ, 1994). No período pós-transplante, o G-CSF é utilizado com intuito de

acelerar a recuperação hematológica, bem como resgatar a hematopoese, especificamente as células de linhagem mielóide (PATON et al., 2000).

Há disponível o G-CSF recombinante canino (rcG-CSF) que em cães inicia a liberação de neutrófilos para o sangue periférico uma a duas horas após sua administração, intensificando a produção neutrofílica em um a três dias (HAMMOND et al., 1991) com retorno à contagem inicial normal três a cinco dias após a suspensão do medicamento (OBRADOVICH et al., 1991), de maneira que a resposta ao tratamento depende da sua duração e do número de células-tronco viáveis na MO (FELDMAN et al., 2000). Entretanto, o rcG-CSF não é produzido comercialmente, sendo restrito às universidades e centros de pesquisa, fazendo com que rhG-CSF seja o mais comumente utilizado na clínica médica de pequenos animais (FELDMAN et al., 2000), na dose de 5µg/kg/dia por via subcutânea (HENRY et al., 1998).

O uso do rhG-CSF foi referido pela primeira vez na medicina veterinária por Lothrop et al. (1988) no tratamento da neutropenia cíclica do Collie cinza e, desde então, tem sido estudado, conquistando grande importância no tratamento e na prevenção das neutropenias nos animais de companhia. Este medicamento é indicado apenas nos casos de neutropenias persistentes, nas quais há um defeito na produção ou maturação dos neutrófilos, como nos casos de hipoplasia, hematopoiese cíclica e alguns casos de produção ineficiente, logo é contraindicado nos casos de neutropenias agudas e transitórias. Desta forma, a realização de hemogramas seriados e avaliação da medula óssea do paciente são de fundamental importância para a confirmação da necessidade de seu uso (LUCIDI; TAKAHIRA, 2007).

Atualmente, a principal aplicação do rhG-CSF na medicina veterinária é a redução da duração e intensidade das neutropenias, a mais grave das citopenias associadas à quimioterapia em altas doses. As neutropenias decorrentes da utilização de quimioterápicos requerem a suspensão temporária ou permanente do medicamento, podendo gerar resistência das células neoplásicas ao tratamento e comprometer a sobrevida do paciente (COUTO, 2003). Nestes pacientes, a terapia com G-CSF é indicada em casos de neutropenia acompanhada de febre (<1.000 neutrófilos/ μL), neutropenia grave e persistente (<500 neutrófilos/ μL , por mais de 72 horas) ou em animais com histórico de neutropenia acompanhada de febre em quimioterapias anteriores (HENRY et al., 1998). Em um estudo, cães com linfoma tratados com protocolo quimioterápico Madison-Wisconsin, seguido de imunossupressão com ciclofosfamida ($500\text{mg}/\text{m}^2$) e TMO, a dose $5\mu\text{g}/\text{Kg}$ de rhG-CSF durante quatro dias foi suficiente para que os cães resistissem à neutropenia conseqüente à imunossupressão (GODOY, 2010). O tratamento com rhG-CSF em pequenos animais é contra-indicado nos casos de sepse, pois não se observou aumento significativo no número de neutrófilos circulantes ou na sobrevida de animais que receberam o medicamento em relação aos animais que não receberam (MISCHKE et al., 2001; QUEZADO et al., 2001).

Em cães, o rhG-CSF age aumentando o número de neutrófilos circulantes e possui grande potencial para amenizar ou reverter quadros de neutropenia associados às condições de mielotoxicidade e mielosupressão (LUCIDI; TAKAHIRA, 2007). Na prática médico-veterinária, tal fármaco tem sido utilizado e a melhora da neutropenia fora observada em cães nos casos de neutropenias persistentes, nas quais há defeito na produção ou maturação dos neutrófilos, como nos casos de neutropenias após quimioterapia (HENRY et

al., 1998; COUTO, 2003; YAMAMOTO et al., 2011) reconstituição da celularidade medular após TMO (FRIMBERGER, 2006; CÁPUA et al, 2009); após radioterapia (NOTHDURFT et al., 1997, YU et al., 2011); nas neutropenias causadas por fármacos (HOLLAND et al., 1996) e na neutropenia cíclica do Collie cinza (HAMMOND et al., 1990; YANAY et al., 2003).

Os fatores de crescimento hematopoiético espécie-específicos raramente induzem o desenvolvimento de anticorpos, porém, o uso de 10µg/kg/dia de rhG-CSF em cães saudáveis, por via subcutânea, durante 30 dias, promoveu a formação de anticorpos anti-G-CSF canino, resultando em neutropenia persistente por quatro meses após o término da terapia (HAMMOND et al., 1991). Por outro lado, o uso dos fatores recombinantes humanos por poucos dias em cães não resultou na formação de anticorpos (HENRY et al., 1998; PHILLIPS et al., 2005).

Além da recuperação neutrofílica causada pelo uso do rhG-CSF, recentemente alguns estudos vêm comprovando novas aplicações para sua utilização. Foi observado atividade benéfica do uso de G-CSF no tecido cardíaco de cães com cardiomiopatia dilatada (CMD). Em um relato de caso, no qual três pacientes caninos com CMD diagnosticada por ecocardiograma que não respondiam à terapia convencional receberam G-CSF subcutâneo na dose de 10µg/Kg durante cinco dias, demonstrando melhora significativa da função cardíaca, sem efeitos colaterais deletérios, sugerindo que o tratamento com G-CSF pode ter efeitos benéficos em cães com CMD refratária à terapia convencional (PARK et al., 2007). Isso ocorre, pois o G-CSF eleva o número de células-tronco no sangue periférico, as quais migram ao tecido cardíaco lesado e se diferenciam, promovendo reparação estrutural e funcional da área afetada (KOCHER et al., 2001; ORLIC et al., 2001; PARK et al., 2007).

Em um ensaio científico feito com cães, a administração de G-CSF após geração de infarto do miocárdio promoveu o aumento na espessura da parede do vaso lesado, além de revelar, mediante imunoistoquímica, elevação da densidade vascular principalmente na região do epicárdio (YAGI et al., 2008).

II.2 Efeito do rhG-CSF sobre o número de plaquetas

Apesar da recuperação neutrofílica, há relatos de que a administração de G-CSF promove rápido decréscimo na contagem de plaquetas de cães submetidos à irradiação (NOTHDURFT et al., 1997). A administração durante quatro dias de rhG-CSF na dose de 5µg/kg/dia em cães saudáveis e cães com linfoma submetidos ao TMO acarreta na redução dos valores de megacariócitos e plaquetas (SILVA et al., 2010). A aplicação de G-CSF durante sete dias em ratos esplenectomizados induziu trombocitopenia, descartando que a causa da redução na contagem plaquetária seria devido ao sequestro de plaquetas no baço (TAKAMATSU et al., 2007). A trombocitopenia também foi descrita em humanos sob tratamento quimioterápico e tratados com G-CSF (ANTMAN et al., 1988; LIESCHKE; BURGESS et al., 1992; SCHWAB; HECHT et al., 1994).

Tem sido relatada uma possível relação entre a administração de G-CSF e a ocorrência de trombooses em humanos. De acordo com Martino et al. (2012) o G-CSF induz ativação de células endoteliais e do sistema de coagulação, aumentando o risco trombótico. Um estudo *in vitro* demonstrou que a administração de G-CSF induz a hiperagregação plaquetária quando se adiciona ao sangue de voluntários sadios G-CSF e fatores de agregação plaquetária, tais como colágeno e ADP (KAPTAN et al., 2007).

Na medicina humana há relatos de severidade clínica em decorrência de alterações hemostáticas associadas à administração de rhG-CSF. Um doador de CTP da espécie humana desenvolveu tromboembolismo pulmonar agudo após ser submetido ao regime de mobilização de CTH com rhG-CSF, na dose de 10µg/Kg a cada 12 horas por cinco dias (MARTINO et al, 2012). Em pacientes humanos portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) observou-se grave trombocitopenia após seis dias de tratamento com G-CSF e ocorrência de hemorragias (HOLTZER et al., 1997).

II.3 G-CSF mobiliza células-tronco hematopoéticas (CTH) da medula óssea para o sangue periférico

A importante aplicação do rhG-CSF em humanos, além da recuperação neutrofílica após regimes quimioterápicos, é a mobilização das células-tronco hematopoéticas (CTH) para a circulação periférica para posterior transplante autólogo ou alogênico (DÜRSHEN et al., 1988; KÖRBLING; ANDERLINI, 2001; FRUEHAUF; SEGGEWISS, 2003; MENDRONE JR, 2009; RIA et al., 2010). A aplicação clínica bem estabelecida para as CTH da MO é a recomposição do tecido hematopoiético medular após terapia mieloblástica no TMO. Entretanto, o sangue periférico tem sido utilizado como fonte de CTH desde o início dos anos 80 através do transplante de células-tronco periféricas (TCTP) autogênico e alogênico (MENDRONE JR et al., 2008).

As CTH dão origem a todas as células heterogêneas funcionais do sangue e do sistema imune e estão presentes no sangue do cordão umbilical (SCU) (NAKAGE et al., 2009), na MO e no sangue periférico (SP) (GASPER, 2000). As células-tronco periféricas (CTP) são células com capacidade de regenerar a medula óssea de pacientes com doenças

hematopoéticas graves como leucemia e linfoma (KÖRBLING et al. 1981; REIFFERS et al., 1986) e estão presentes normalmente em baixas concentrações no sangue periférico de animais (BARNES; LOUTIT, 1967; ABRAMS, et al., 1981; GOODMAN; HODGSON, 1962) e humanos (MENDRONE JR, 2008), mas aumentam drasticamente durante recuperação de uma terapia citotóxica (ABRAMS et al., 1981) ou após tratamento com fatores de crescimento hematopoiético como G-CSF, GM-CSF (fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos) e SCF (fator de células-tronco) (DÜRSHEN et al., 1988; SOCINSKI et al., 1988). O regime de mobilização CTP em pacientes humanos visando o tratamento de neoplasias considerado tratamento modelo é a administração de rhG-CSF, visto que sua utilização promove mobilização de número suficiente de CTH ao sangue periférico para posterior transplante e sucesso na enxertia (KÖRBLING; ANDERLINI 2001), além de clinicamente seguro (RIA et al., 2010).

As CTH têm sido caracterizadas através de sua expressão do antígeno CD34⁺, sendo que este antígeno está presente de 1% a 4% das células da MO responsáveis pela formação das colônias hematopoéticas e que são capazes de reconstituir a hematopoese, indicando que as células progenitoras pluripotenciais estão presentes dentro deste compartimento (BENDER et al., 1991). As características fenotípicas das CTP coletadas, após a utilização de fatores de crescimento, são uma mistura de precursores hematopoéticos primitivos e comprometidos, não apresentando diferenças marcantes com as da MO e caracterizados igualmente pelo marcador de superfície celular CD34⁺ (VIGORITO; SOUZA, 2009). Somente 0,06% do total de células nucleadas circulantes são CTH, enquanto na MO essa porcentagem é 18 vezes maior (KÖRBLING; ANDERLINI, 2001). Em condições basais

apenas duas a cada 100 mil células mononucleares do sangue periférico são células progenitoras hematopoéticas (KANZ; BRUGGER, 1999). Portanto, para obtenção de um número suficiente de CTH na circulação periférica que permita a reconstituição hematopoética num transplante, as CTH precisam ser mobilizadas da MO para o sangue periférico através da administração do rhG-CSF (DÜRSHEN et al., 1988; BESINGER et al., 1993; KÖRBLING et al., 1995; KÖRBLING; ANDERLINI, 2001; MENDRONE JR, 2009).

Vários pesquisadores utilizam esta citocina como forma de mobilização das CTH à circulação sanguínea periférica em humanos (DÜRSHEN et al., 1988; SHERIDAN et al., 1992; BESINGER et al., 1993; SOLÁ et al., 1999; FRUEHAUF; SEGGEWISS, 2003) e animais (MOLINEUX, et al., 1990; REVEL et al., 1994; SANDMAIER et al., 1996; ZAUCHA et al., 2001; SUTER, 2011), isoladamente ou em associação com outros fatores de crescimento hematopoéticos, juntamente com quimioterapia mielossupressora ou com radioterapia. A administração do G-CSF aumenta o número de CTP acima de 100 vezes do valor basal em pacientes humanos com câncer (DÜRSHEN et al. 1988). O número total de células T, monócitos e *natural killer* (células NK) contido no sangue periférico mobilizado (SPM) é dez vezes maior do que na MO e as proporções entre CTP:MO para células CD3+, CD4- e CD8- é de 9:1 e de células CD19+, 6:1 (KÖRBLING et al., 1995). Em enxertos alogênicos provindos de SPM com G-CSF há de duas a quatro vezes mais células CD34⁺ do que na MO (KÖRBLING; ANDERLINI 2001). Em doadores saudáveis o número de CD34⁺ após aplicação de rhG-CSF aumenta de 16 a 23 vezes em relação ao nível basal de CD34⁺ presente no sangue periférico (KÖRBLING et al., 1995), enquanto Besinger et al. (1993) aplicaram G-CSF em pacientes humanos e observaram um aumento 10 vezes maior no

número de células CD34+ no sangue periférico quando comparado com o período anterior à administração do fator de crescimento. Ao submeter doadores saudáveis ao tratamento de G-CSF e quantificar células CD34⁺ na MO, Couban, et al. (2000) observaram que o número de células CD34⁺ presentes na MO do grupo tratado era semelhante na MO do grupo controle.

II.4 Transplante com sangue periférico mobilizado (SPM)

Em decorrência da facilidade para obtenção das CTH e do menor tempo para reconstituição hematopoética em humanos que recebem o TCTP, o SPM tem progressivamente substituído a MO como fonte de células-tronco para transplante autogênico ou alogênico (MENDRONE JR, 2009; VIGORITO; SOUZA, 2009). De acordo com dados registrados pelo “*European Group for Blood and Marrow Transplantation*”, em 1994, 65% dos transplantes autólogos e 5% dos alogênicos foram realizados com CTH oriundas do SPM. Entretanto, em 2005, 98% dos transplantes autólogos e 74% dos alogênicos realizados na Europa utilizaram CTH do SPM (GRATWOHL et al., 1996; GRATWOHL et al., 2002; GRATWOHL et al, 2007).

As vantagens do TCTP em relação ao TMO, tais como, recuperação mais rápida de neutrófilos e plaquetas, menos tempo de hospitalização, menor requerimento de terapia suporte, menor risco de recaída em pacientes com câncer, maior número de células CD34⁺ infundidas, bem como mais facilidade para coletá-las, fizeram com que SPM progressivamente se tornasse uma alternativa ao TMO autólogo e alogênico (MENDRONE JR., 2008).

A recuperação dos valores das células sanguíneas circulantes em humanos com doenças oncohematológicas ou medulares que receberam TCTP ocorre mais rapidamente do que em pacientes submetidos ao TMO. Pode-se observar recuperação mais rápida de granulócitos e plaquetas, menor número de pacientes que necessitam de terapia suporte após o transplante, menor recidiva da doença, reduzido tempo de internação e de nutrição parenteral, mínima necessidade de transfusões de hemácias e plaquetas (VIGORITO et al., 1998; CHAMPLIN et al., 2000). Em cães irradiados, ocorre recuperação na contagem leucocitária após o transplante com SPM com $rcG-CSF$ (REVEL et al., 1994). No entanto, embora seja observada elevada taxa de recuperação de plaquetas em pacientes que receberam SPM, fora observado que cães saudáveis ou com linfoma submetidos à $5\mu g/Kg/dia$ de $rhG-CSF$ durante quatro dias apresentaram redução nos valores de megacariócitos e plaquetas (SILVA et al., 2010).

O tempo e a eficácia do TCTP estão diretamente ligados ao maior número de células $CD34^+$ presentes no SPM em comparação à MO. A infusão de um número igual ou superior a $2,0 \times 10^6$ células $CD34^+$ /kg de peso é suficiente para promover recuperação hematológica em dez a 12 dias em pacientes humanos (SIENA et al., 2000). Quantidades superiores a $5,0 \times 10^6$ células $CD34^+$ /kg de peso infundidas proporciona incremento na velocidade de recuperação medular em pacientes humanos (SOLÁ et al., 1999). Inversamente, doses inferiores a $1,0 \times 10^6$ células $CD34^+$ /kg de peso, geralmente, levam ao retardo na recuperação neutrofílica (WEAVER et al., 1997). Sandmaier et al. (1996) observaram que $4,6 \times 10^6$ células $CD34^+$ /kg de peso oriundas do SPM foram suficientes para reconstituição hematopoética em

cães. Portanto, o número de CTH coletadas do SPM tem importância fundamental no sucesso do transplante (MENDRONE JR, 2009).

Goodman e Hudgson (1962) submeteram os pais de ratos híbridos à irradiação corpórea e posterior transplante de leucócitos provindos da circulação de seus filhos, verificando a recuperação hematológica dos animais homólogos. Storb et al. (1977) demonstraram a presença de CTP na circulação de primatas, Barnes e Loutit (1967) identificaram CTP no sangue de humanos e Abrams et al. (1981) identificaram CTP em cães após tratamento com ciclofosfamida.

Körbling et al. (1981) descreveu o que parece ter sido o primeiro caso de recuperação hematopoética em um paciente humano com leucemia mielóide crônica submetido a um transplante autólogo de células mononucleares normais oriundas da circulação periférica. Reiffers (1986) relatou um caso de leucemia aguda não linfocítica tratada com células progenitoras do sangue periférico e Körbling et al. (1986) relatou um caso de linfoma Burkitt em remissão completa tratado também com TCTP. A recuperação hematopoiética em pacientes humanos que recebem TCTP ocorre mais rapidamente do que em pacientes que recebem TMO (MENDRONE JR., 2008). De acordo com Champlin et al. (2000) um estudo com 288 pacientes humanos adultos que receberam TCTP alogênico para tratamento de leucemia mielóide aguda (LMA) ou leucemia linfóide aguda (LLA) ou leucemia mielóide crônica (LMC) entre os anos de 1995 e 1996 recuperaram granulócitos e plaquetas mais rapidamente do que os pacientes do grupo-controle que receberam TMO, com diferença estatisticamente significativa. Neste trabalho observou-se também que foi menor o número de pacientes recebendo G-CSF, GM-CSF ou outro suporte após o transplante e redução na

taxa de recidiva da doença e no tempo de internação. Igualmente, Vigorito et al. (1998) em um estudo realizado na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) com 40 pacientes humanos randomizados para CTP ou MO alogênicas com idade entre 10 e 60 anos com doença oncohematológica, observaram que no grupo de CTP ocorreu recuperação mais rápida de granulócitos, menor necessidade de transfusões de hemácias e plaquetas, menor consumo de antibióticos, menor tempo de internação e nutrição parenteral. Outros autores também observaram em seus estudos recuperação mais rápida de granulócitos e plaquetas com diferenças estáticas significativas em pacientes humanos que receberam TCTP quando comparados com os que receberam TMO para tratamento de tumores hematopoéticos ou não e doenças medulares graves (BESINGER et al., 1993; HELDAL et al., 2000). Levine et al., (2000) observaram recuperação medular mais rápida em crianças que receberam TCTP alogênico para tratamento de doenças medulares malignas e não malignas.

Em ratos, houve maior número de animais sobreviventes que receberam TCTP alogênico em comparação aos que receberam TMO (MOLINEUX et al., 1990). Em cães que receberam TMO alogênico 92% dos animais rejeitaram o transplante (STORB; DEEG 1986), porém, em cães que receberam TCTP alogênico, nenhum rejeitou o transplante (SANDMAIER et al., 1996). Em um estudo feito por Revel et al. (1994), cinco cães irradiados transplantados com células mononucleares do sangue periférico autólogo (CMSP) mobilizado com G-CSF tiveram recuperação de leucócitos, enquanto os cães irradiados sem tratamento com fatores de crescimento hematopoéticos transplantados com CMSP autógeno não obtiveram recuperação medular, sendo que todos os animais deste grupo morreram. Outrora, um estudo feito em cães, nove animais receberam somente TMO, dos quais sete

rejeitaram o transplante entre a oitava e 17^o semana pós-transplante com quimerismo inicial de oito a 25%. Em contraste, o grupo que recebeu CTP apresentou quimerismo inicial entre 30-80% e cinco cães apresentaram quimerismo estável por mais de 30 semanas. Além disso, somente três cães rejeitaram o enxerto entre a oitava e a 18^o semana (ZAUCHA et al., 2001).

II.5 Células-tronco hematopoiéticas CD34⁺

A CTH (*stem cell*) é definida como uma célula com capacidade de auto-renovação e potencial proliferativo, o que possibilita a sua diferenciação em células progenitoras de todas as linhagens sanguíneas e a reconstituição da população hematopoiética a partir de uma única célula (QUESENBERRY; COLVIN, 2001). Morfologicamente, se assemelham aos pequenos linfócitos, apresentando alta proporção núcleo:citoplasma, nucléolo evidente, e citoplasma basofílico ausente de grânulos (GASPER, 2000). A maioria dessas células progenitoras está na fase de repouso do ciclo celular (G₀) e há pouca atividade mitótica no compartimento de células-tronco (CT), no qual ocorre a auto-renovação das referidas células e a manutenção da hematopoiese pela proliferação clônica. O fenótipo da CTH inclui a expressão dos antígenos CD34, uma glicofosfoproteína transmembrânica do tipo I altamente glicosilada, o qual funciona como uma molécula de adesão, CD90 (Thy-1) que parece estar envolvido na sinalização da transdução gênica e ausência do antígeno CD38 (HUMEAU et al., 1996). Um subgrupo primitivo das CTH, correspondente aos precursores das células CD34⁺, o qual não expressa ou expressa quantidades muito baixas de CD34. Essas células podem ser selecionadas por possuírem marcador para CD133 e são parte predominante de um *pool* quiescente de células precursoras hematopoiéticas e mesenquimais. Essas células

CD34⁻ podem se diferenciar em células CD34⁺, circulam no sangue periférico, voltam à MO (*homing*), aumentando a população de células progenitoras (HUSS, 2000). Além desses marcadores de superfície celular, a análise antigênica das células CD34⁺ revela que também coexpressam uma variedade de antígenos de diferenciação. As subpopulações com antígenos mielóides, como o CD33, parecem ser progenitores comprometidos e provavelmente responsáveis pela primeira fase da recuperação hematopoiética e também são precursores endoteliais. Em contraste, as que não apresentam antígenos associados tanto à linhagem (por ex. CD33) ou à ativação (HLA-DR, CD38), são consideradas mais primitivas e contribuem para a sustentação da hematopoiese (células que reconstituem a hematopoese em longo prazo). Assim, podem ser encontradas as seguintes subpopulações: CD34⁺/CD33⁺, CD34⁺/CD38⁻, CD34⁺/HLA-DR (BENDER et al., 1991; KÖRBLING et al., 1995). Sugere-se que a expressão do CD34 varie dependendo do estado de ativação da CTH (SATO et al., 1999).

Estudos recentes em humanos e animais têm revelado a plasticidade das células-tronco hematopoéticas, que podem se diferenciar em células não hematopoéticas de vários tecidos, incluindo células do fígado (ALISON et al., 2000), sistema nervoso central (SIX et al., 2003; BOY et al., 2011), rins (KALE et al., 2003), pâncreas (IANUS et al., 2003), pulmões (THEISE et al., 2002), pele (BADIAVAS et al., 2003), trato gastrintestinal (OKAMOTO et al., 2002), coração (ORLIC et al., 2001; PARK et al., 2007), células endoteliais (QUE-LIN et al., 2008; YAGI et al., 2008; BORLONGAN et al., 2011) e músculo esquelético (FERRARI et al., 1998).

II.6 Identificação e quantificação das CTH CD34⁺: Citometria de Fluxo

Para classificar, identificar e quantificar CTH, estudos citomorfológicos e citoquímicos são métodos clássicos (JAIN, 1993), entretanto técnicas de imunocitoquímica e imunofenotipagem com a utilização de anticorpos monoclonais (AcMo) têm promovido avanço na definição e classificação de células sanguíneas (GRINDEM, 1996).

A CMF é um método moderno de estudo de células, através do qual podem ser determinadas múltiplas propriedades físicas e biológicas de uma célula. A linhagem celular e suas subpopulações podem ser determinadas pelo número e tipo de antígeno de superfície, intracitoplasmático ou mesmo intranuclear, o que propicia a quantificação e classificação imunofenotípica das células, permitindo, o rastreamento rápido de inúmeras populações celulares, a quantificação de pequenas populações com extrema especificidade e sua separação para posteriores estudos (BACAL; FAULHABER, 2003).

O citômetro de fluxo permite análise multiparamétrica de células ou outras partículas em suspensão, alinhadas uma a uma que passam por uma fonte de luz, avaliando a emissão de fluorescência das células marcadas com AcMo e com fluorocromos, sendo que alguns modelos são capazes de separar fisicamente as células, de acordo com as características citométricas (ROITT et al., 2003).

As análises das amostras iniciam quando há passagem de uma célula em frente a um raio laser, fazendo com que a luz deste se disperse em todas as direções. Faz-se a quantificação da luz dispersada frontalmente (*forward scatter-FSC* para avaliar o tamanho da célula) e lateralmente (*side scatter-SSC* para análise da complexidade interna) e a intensidade de fluorescência para detecção de antígenos de superfície diferentes,

denominado imunofenotipagem, consistindo no isolamento de populações de células distintas com diferentes antígenos de superfície marcados com anticorpos fluorescentes específicos (ROITT et al., 2003). As células da amostra em suspensão marcadas com reagentes fluorescentes específicos para detecção de moléculas de superfície são aspiradas e passam em fila para o interior do citômetro através de um canal de fluxo, no qual incide um laser. O fluxo de células que atravessa a câmara é envolvido por uma solução tampão, sendo que de 500 a 4000 células ou partículas passam em fila simples por segundo por meio do sensor eletrônico (ROITT et al., 2003). Nesse mesmo local, detectores internos captam e enviam sinais fluorescentes que são medidos por um computador. Os sinais fluorescentes são plotados em gráficos com escala logarítmica ou linear, o que possibilita a distinção entre populações celulares normais e patológicas (ORFAO et al., 1995).

Os receptores de superfície celular são caracterizados como proteínas com funções diversas e capacidade de seletivamente ligar-se ou aderir-se a outras moléculas sinalizadoras. Existem muitos tipos de receptores, os quais se diferem entre si pela estrutura e pela afinidade a moléculas específicas (YANNAKI; PAPAYANNOPOULOU, 2001).

A fim de identificar e quantificar as CTH através da CMF, é necessário que as células da amostra estejam marcadas em sua superfície com AcMo específicos conjugados a fluorocromos (ROITT et al., 2003). Os AcMo reagem com os epítomos específicos (determinantes antigênicos) na superfície ou no interior das células e são utilizados rotineiramente na CMF (GROUNDS et al., 2002). Os anticorpos monoclonais são os reagentes de escolha devido à sua especificidade, reação cruzada mínima e reprodutibilidade (KEREN, 1994). O termo CD (*Cluster Designation* = denominação de

grupamento) é utilizado para denominar os anticorpos monoclonais criados em diferentes laboratórios de todo o mundo contra antígenos leucocitários humanos (ROITT et al., 2003). Cada fluorocromo usado na marcação de anticorpos possui um padrão espectral específico de absorção e de emissão de luz, sendo que os mais utilizados são o isotiocianato de fluoresceína (FITC) e a ficoeritrina (PE), que emitem luz com diferentes comprimentos de onda. O uso de fluorocromos múltiplos, com diferentes comprimentos de onda, possibilita a análise de parâmetros distintos ou de populações celulares diversas em uma mesma suspensão celular (ORFAO et al., 1995).

Em análises por CMF, a definição de CTH baseia-se principalmente na presença de um marcador de membrana celular denominado CD34⁺. Outros marcadores de membrana podem ainda ser utilizados com a finalidade de tornar a análise mais acurada, como o CD45⁺, para definir a origem hematopoiética das células em questão (KAWADA et al., 2004).

Alguns *workshops* têm sido organizados com o intuito de classificar os AcMo com um número do CD correspondente à nomenclatura humana para diversos animais domésticos. Em relação aos AcMo que marcam os antígenos leucocitários caninos, estes foram definidos durante o “Primeiro Workshop Internacional de Antígeno Leucocitário Canino” (*1th CLAW – First Canine Leucocyte Antigen Workshop*) ocorrido em Cambridge (U.K.) em 1993 (COBBOLD; METCALF, 1994), dos quais alguns dos AcMo específicos para cães estão disponíveis comercialmente (BYRNE et al., 2000), inclusive o CD34 (McSWEENEY et al., 1996).

A citometria de fluxo tem uma ampla aplicação na hematologia veterinária, incluindo a identificação de CTH, contagens celulares diferenciais da medula óssea, quantificação de

reticulócitos, pesquisa de eritroparasitas, detecção de anticorpos anti-eritrocitários, contagem diferencial de leucócitos, imunofenotipagem de linfócitos e contagem de plaquetas reticuladas (NAKAGE et al., 2005). É um recurso emergente na Medicina Veterinária que permite identificar as CTH do cordão umbilical (NAKAGE et al., 2005), do fígado fetal, MO e do sangue periférico (HUSS et al., 2000).

Apesar do alto custo e da necessidade de técnicos especializados para realização da avaliação citofluorométrica, esta técnica tem sido aplicada em projetos científicos relacionados à hematologia veterinária no Brasil (NAKAGE et al., 2005; NAKAGE et al., 2006), incluindo a identificação de CTH utilizando o CD34 canino no SCU (NAKAGE et al., 2009), na MO (CÁPUA et al., 2009) e sangue periférico (GODOY, 2010) de cães.

O objetivo do presente trabalho foi quantificar o número de neutrófilos, células-tronco hematopoéticas (CTH) CD34⁺ e plaquetas no sangue periférico de cães saudáveis submetidos a três diferentes doses do fator estimulante de colônia de granulócitos recombinante humano (rhG-CSF), para determinar a dose que promova elevação na contagem neutrofílica, redução na contagem de plaquetas e mobilização das CTH CD34⁺ para o sangue periférico.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1 Comitê de Ética

O trabalho de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal (Protocolo n. 007958/11, 12 de maio de 2011).

III.2 Animais

Os três grupos experimentais (D5, D10 e D20) foram compostos por cinco parcelas experimentais cada. Os cães saudáveis, adultos, machos ou fêmeas, sem raça definida, com idade entre cinco a 10 anos, peso entre 12 a 21 Kg, castrados, selecionados após avaliação clínica e hematológica permaneceram alojados no canil do Campus Veterinário do Centro Universitário “Barão de Mauá”, Ribeirão Preto, SP alimentados com ração seca balanceada e água *ad libitum*. Os cinco cães incluídos neste ensaio científico foram os mesmos que compuseram os três grupos experimentais. Após um intervalo de 30 dias, os animais eram novamente submetidos à avaliação clínico-hematológica e incluídos no experimento.

III.3 Aplicações do rhG-CSF

O fator estimulante de colônia de granulócitos recombinante humano (rhG-CSF) (filgrastine® 300µg/mL¹) foi administrado animais dos diferentes grupos experimentais nas doses de 5 (D5), 10 (D10) e 20 (D20) µg/kg/dia, por via subcutânea durante quatro dias

¹ Blaüsigel Industria e Comércio Limitada, Cotia, São Paulo, Brasil

consecutivos. A aplicação do medicamento iniciou-se no momento 0 (M0) e se estendeu até o momento 3 (M3), totalizando quatro aplicações.

III.4 Colheita De Material

O sangue destinado para análise de neutrófilos, plaquetas e células CD34⁺ foi colhido por venopunção jugular e envasado em tubos a vácuo contendo anticoagulante EDTA² (ácido etilenodiamino tetra-acético). Logo após a coleta, foi separado em duas alíquotas sendo uma destinada para a contagem de neutrófilos e plaquetas e outra para processamento com marcação com anticorpos para contagem de células CD34⁺ no citômetro de fluxo.

Durante os quatro dias de aplicação do rhG-CSF, o sangue periférico foi colhido imediatamente antes de cada administração em intervalos de 24 horas. Ao término das aplicações, o sangue das parcelas experimentais fora obtido a cada 24 horas durante sete dias para contagem de células CD34⁺, neutrófilos e plaquetas (Figura 1).

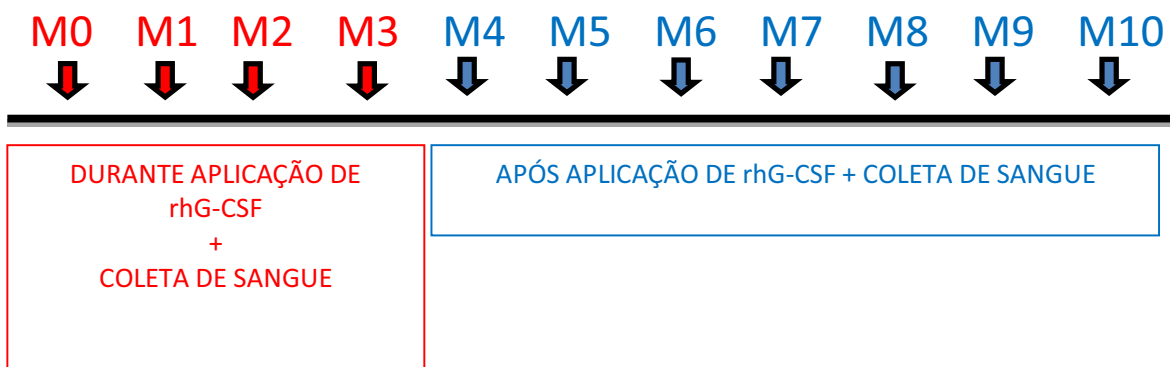


Figura 1: cronograma demonstrando os momentos de aplicação do rhG-CSF e coleta de sangue dos cães saudáveis dos três grupos experimentais, Jaboticabal, 2011.

² Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA

III.5 Contagem de Leucócitos e Plaquetas

A contagem de leucócitos e plaquetas foi obtida com o auxílio de um contador automático de células ABC Vet (HORIBA ABX – São Paulo/Brasil) e a contagem de neutrófilos foi realizada no esfregaço sanguíneo corado com uma mistura de Metanol, May Grunwald e Giemsa (MMG) no Laboratório de Patologia Clínica do HV da FCAV – UNESP Jaboticabal.

III.6 Avaliação Citofluorométrica

A preparação das suspensões de células foi realizada no Laboratório do Campus Veterinário do Centro Universitário “Barão de Mauá”. Utilizou-se o protocolo “*International Society of Hematotherapy and Graft Engineering*” (ISHAGE) (SUTHERLAND et al., 1996) para quantificação de células-tronco CD34⁺. As análises foram realizadas em duplicata, de modo que dois tubos (um marcado como controle e o outro como teste) foram utilizados ambos contendo 100µL da amostra de sangue com EDTA. No tubo controle havia 5µL de anticorpo monoclonal anti-CD45⁺ conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Rat Anti-Dog CD45: FITC - SEROTEC) e 5µL de anti-IgG1 conjugado com ficoeritrina (PE) (PE Mouse Anti-Dog IgG1 – BD Pharmingen) e o tubo teste com 5µL de anticorpo monoclonal anti-CD45⁺ conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Rat Anti-Dog CD45: FITC - SEROTEC) e 5µL anti-CD34⁺ conjugado com ficoeritrina (PE) (PE Mouse Anti-Dog CD34 – BD Pharmingen). Os tubos foram incubados por 20 minutos em temperatura ambiente e protegidos de luz.

Dois mililitros de tampão de lise de hemácias (FACS Lysing Solution® – Becton Dickinson) foram adicionados em cada tubo, os quais posteriormente foram incubados por dez minutos, em temperatura ambiente e protegidos de luz. Posteriormente, foi realizada a lavagem do material com solução salina tamponada com PBS por duas vezes. Ao final, adicionou-se 500µL de PBS em cada tubo e as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo FACSCANTO (Becton Dickinson, San Jose, CA) na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP) (Ribeirão Preto, SP) com auxílio do software FACSDiva. Os dados analisados foram plotadas em gráficos para identificação e quantificação das células CD34⁺ (Figura 2).

III.7 Cálculo da Quantificação de Células CD34+

A contagem de CD34⁺/µL foi estabelecida através da seguinte fórmula: CD34⁺/µL de sangue periférico = $[(T1+T2) / 2 - T3] \times GB$

Sendo:

T1 =contagem de células positivas para CD34/CD45 no tubo 1;

T2 =contagem de células positivas para CD34/CD45 no tubo 2;

T3 =contagem de células positivas para IgG1;

GB= contagem global de células nucleadas;

Nº total de eventos positivos para CTH CD34⁺= 75.000;

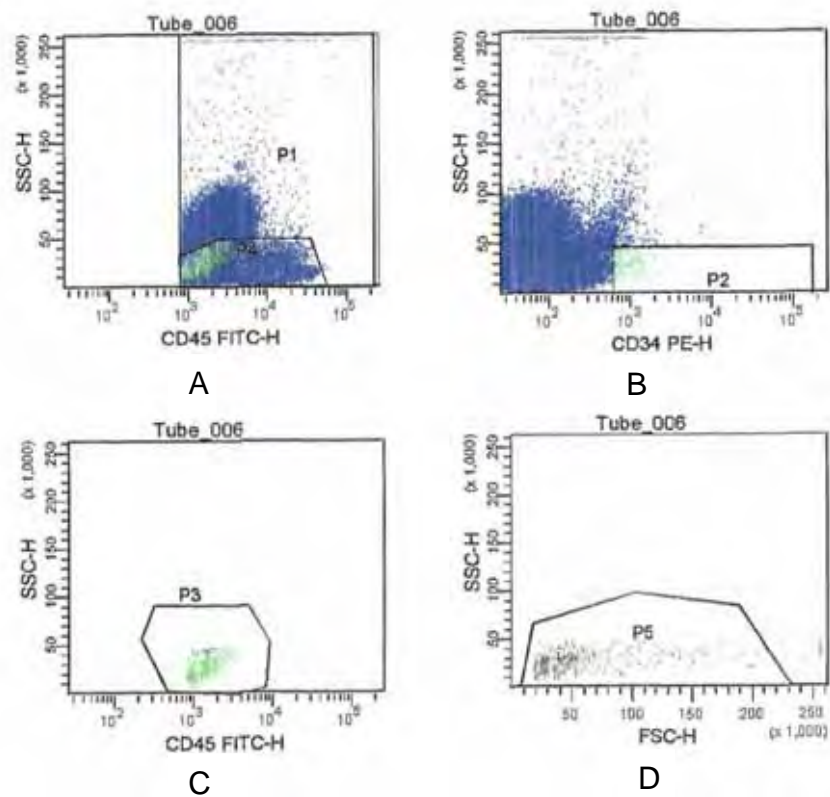


Figura 2: Quantificação das CTH $CD34^+$ do sangue periférico canino através da citometria de fluxo. Os dados analisados pelo aparelho são plotados em gráficos e analisados pelo *software* FACSdiva. Quatro gráficos foram gerados para identificar a população de células $CD34^+$. Gráfico A: Determina população de células $CD45^+$ (P1), excluindo plaquetas, hemácias e debris celulares (P4); Gráfico B: Determina a partir da *gate* P1 todos os eventos positivos para células $CD34^+$ (P2); Gráfico C: a partir da *gate* P2 identifica células com característica de baixa granulosidade e baixa a intermediária intensidade de fluorescência (células $CD45^+$ de baixa expressão); Gráfico D: Foi feita uma *gate* da P3 baseada no tamanho e complexidade interna das células, identificando todos os eventos positivos para $CD34^+$ (células de tamanho intermediário a grande com pouca granulosidade citoplasmática).

III.8 Análise Estatística

Os valores obtidos para contagem de neutrófilos, plaquetas e células CD34⁺ seguiram um delineamento inteiramente casualizado, cujas médias entre os momentos e entre grupos e momentos foram confrontadas pelo teste de Tukey com nível de probabilidade a 5% ($p \leq 0.05$). Para todos os procedimentos utilizou-se o software **SAS**³.

³ Statistical Analysis System: SAS Institute, Cary, NC, USA.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1 Leucograma

Os valores médios obtidos para contagem de leucócitos global e diferencial para os diferentes grupos (D5, D10 e D20) nos diferentes momentos estão descritos abaixo.

Tabela 1: Valores médios obtidos para leucograma (células/ μ L) dos cães do grupo D5. Jaboticabal, 2011.

Momentos	Leucócitos (cél/s/ μ L)	NS (cél/s/ μ L)	NB (cél/s/ μ L)	EOS (cél/s/ μ L)	MON (cél/s/ μ L)	LIN (cél/s/ μ L)	BAS (cél/s/ μ L)
M0	7.283	5.941	13	188	72	1069	00
M1	21.500	16.745	353	174	140	1769	00
M2	21.420	18.654	116	291	142	1789	428
M3	24.300	19.453	150	99	98	1642	98
M4	20.140	18.610	175	203	185	1142	00
M5	10.000	8.180	25	67	89	1639	00
M6	8.982	7.453	13	135	126	1255	00
M7	9.420	6.610	18	205	272	2765	00
M8	9.685	6.230	38	382	287	2748	00
M9	9.063	5.801	63	310	180	2709	00
M10	9.610	5.911	77	499	354	2769	00

Tabela 2: Valores médios obtidos para leucograma (células/ μ L) dos cães do grupo D10. Jaboticabal, 2011.

Momentos	Leucócitos (célus/ μ L)	NS (célus/ μ L)	NB (célus/ μ L)	EOS (célus/ μ L)	MON (célus/ μ L)	LIN (célus/ μ L)	BAS (célus/ μ L)
M0	11.278	9.569	83	200	70	1356	00
M1	26.637	24.200	431	142	102	1762	00
M2	22.779	20.679	363	45	48	1644	00
M3	32.351	27.837	484	166	133	3661	70
M4	20.997	19.007	428	153	127	1282	00
M5	10.269	7.370	41	200	168	2550	00
M6	8.640	7.111	13	135	126	1255	00
M7	7.290	5.940	37	184	76	1053	00
M8	8.342	6.408	55	234	93	1552	00
M9	10.187	7.564	23	305	47	2248	00
M10	10.028	7.185	13	385	00	2445	00

Tabela 3: Valores médios obtidos para leucograma (células/ μ L) dos cães do grupo D20. Jaboticabal, 2011.

Momentos	Leucócitos (célus/ μ L)	NS (célus/ μ L)	NB (célus/ μ L)	EOS (célus/ μ L)	MON (célus/ μ L)	LIN (célus/ μ L)	BAS (célus/ μ L)
M0	8.653	7.135	05	46	66	1406	00
M1	26.719	23.100	340	158	161	2742	218
M2	26.230	23.357	395	117	258	2103	00
M3	33.011	29.268	721	254	344	2424	00
M4	24.326	20.500	316	244	123	3143	00
M5	10.950	8.025	67	370	280	2208	00
M6	8.291	5.710	32	337	176	2036	00
M7	9.199	7.058	16	249	139	1737	00
M8	9.854	7.144	00	379	283	2048	00
M9	10.579	7.713	65	280	145	2376	00
M10	9.367	7.756	12	291	143	1165	00

Elevação estatisticamente significativa nas contagens de leucócitos, NS e NB ocorreram 24 horas após primeira dose da citocina (Figuras 3, 4 e 5), para os três grupos experimentais. Os valores permaneceram elevados durante os momentos de M1-M4, com diferença estatística em relação ao momento anterior à primeira aplicação (M0) e em relação aos momentos posteriores à aplicação (M5-M10) (Figuras 3, 4 e 5). Segundo o estudo de vários autores há elevação significativa na contagem total de leucócitos e de NS logo após a primeira aplicação de G-CSF em cães (LOTHROP et al., 1988; PRATT et al., 1990; HAMMOND et al., 1991; OBRADOVICH et al., 1991; HASEGAWA e INOMATA, 2000; PARK et al., 2007; GODOY 2010; VIEIRA et al., 2011; SUTTORP et al., 2011) e em humanos (MIGLIACCIO et al., 1990; BESINGER et al., 1993; WEAVER et al., 1998; CHEN et al., 2011). Corroborando com o presente estudo, Hammond et al. (1990) posterior ao tratamento de 10µg/Kg/dia rhG-CSF em cães com hematopoese cíclica observaram elevação significativa 24 horas após a administração do referido medicamento. Os valores de granulócitos apresentaram elevação significativa 24 horas após a primeira aplicação de rhG-CSF na dose de 30µg/Kg/dia em cães irradiados (NOTHDURFT et al., 1997) e em cães saudáveis que receberam 2.5µg/Kg/dia da citocina recombinante humana (HASEGAWA; INOMATA 2000). O número médio de monócitos, linfócitos e eosinófilos mantiveram-se dentro do intervalo de referência para a espécie, sem apresentar variações expressivas durante todo período experimental. Segundo Hammond et al. (1990) as flutuações numéricas dessas células permaneceram dentro dos limites de normalidade para a espécie após aplicação de 10µg/Kg/dia de rhG-CSF em cães com hematopoese cíclica. Contrariando os achados do presente estudo, alguns autores observaram linfocitose em cães após aplicação de 2.5µg/Kg de rhG-CSF (HASEGAWA e INOMATA, 2000) e de 5µg/Kg de rcG-CSF (DUFFY et al., 2010) e monocitose após 5µg/Kg de rh-GCSF (LOTHROP et al., 1988) e 5µg/Kg de rcG-CSF (DUFFY et al., 2010). Em humanos, após administração de 6 µg/Kg/dia de rhG-CSF durante quatro dias ocorreu linfocitose (KÖRBLING et al., 1995).

Os valores médios na contagem de leucócitos e NS estiveram acima do intervalo de referência dos momentos de M1-M4 (Figuras 3, 4 e 5), assim como os valores individuais de cada cão nos três grupos (Figuras 6, 7 e 8). Logo, a leucocitose observada neste estudo é causada pela elevação de NS, corroborando com outros estudos feitos em cães (LOTHROP

et al., 1988; PRATT et al., 1990; HAMMOND et al., 1991; OBRADOVICH et al., 1991; HASEGAWA; INOMATA, 2000; GODOY 2010; VIEIRA et al., 2011) e humanos (MIGLIACCIO et al., 1990; BESINGER et al., 1993; WEAVER et al., 1998; CHEN et al., 2011). No ensaio científico feito por Glaspy et al. (1997), humanos com câncer pulmonar tratados com 10µg/Kg/dia de rhG-CSF durante sete dias, apresentaram elevação acima do intervalo de referencia nos valores médios e individuais na contagem de granulócitos durante a aplicação da citocina.

A contagem média de NB também se elevou, embora o número médio tenha permanecido dentro do intervalo de referência para a espécie. De acordo com Sheridan et al. (1992) há elevação de leucócitos após aplicação de rhG-CSF em pacientes humanos com predomínio de NS e de NB. No estudo conduzido por Godoy (2010) há elevação de NB após aplicação de 5µg/Kg/dia de rhG-CSF durante quatro dias em cães saudáveis e em cães com linfoma.

Neste ensaio científico, o valor médio para contagem absoluta de NS se elevou para valores acima do intervalo de referência para a espécie após a primeira dose do medicamento (M1) para os três grupos experimentais. No D5 essa elevação foi de 5.941 células/µL para 16.745 células/µL, no D10 foi de 9.569 células/µL para 24.200 células/µL e no D20 ocorreu um aumento de 7.135 células/µL para 23.100 células/µL (Figura 4). Elevação significativa na contagem de granulócitos fora observada por Obradovich et al. (1991) quando aplicaram, por via subcutânea, 5 µg/Kg/dia de rcG-CSF em cães saudáveis. No referido estudo, o número de NS elevou de 6.537 células/µL para 26.330 células/µL, após 24 horas da primeira aplicação do referido medicamento. Elevação igualmente significativa fora observado por Donahue et al. (2011), de maneira que neste estudo os valores de NS aumentou de 2.930 células/µL para 20.200 células/µL após 24 horas da aplicação de rhG-CSF em humanos.

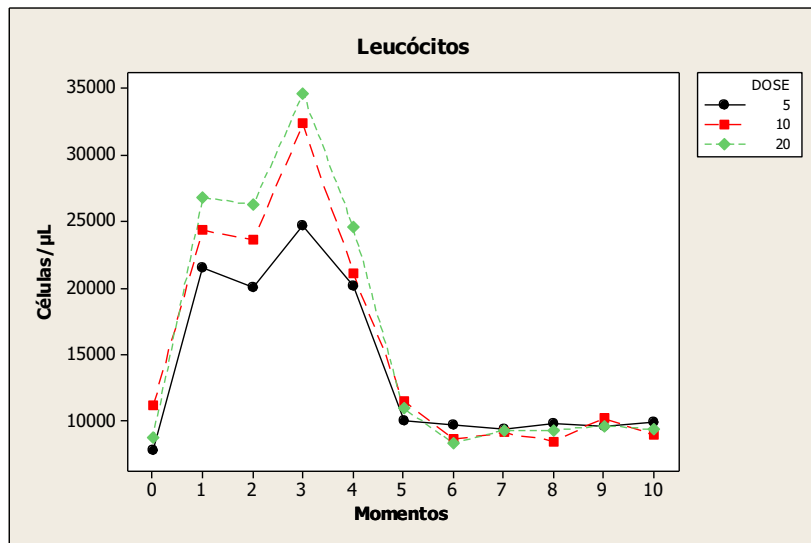


Figura 3: Valores médios obtidos para Leucócitos/ μL nos cães sadios dos grupos D5, D10 e D20 em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2011.

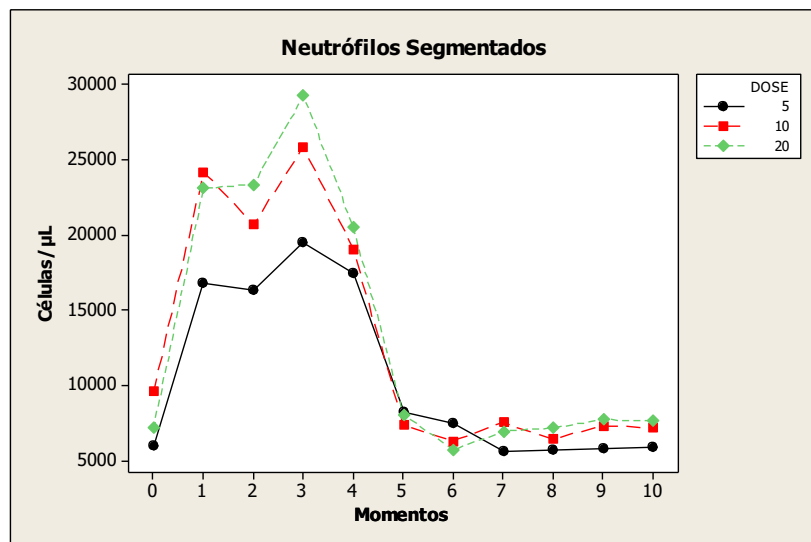


Figura 4: Valores médios obtidos para NS nos cães sadios dos grupos D5, D10 e D20 em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2011.

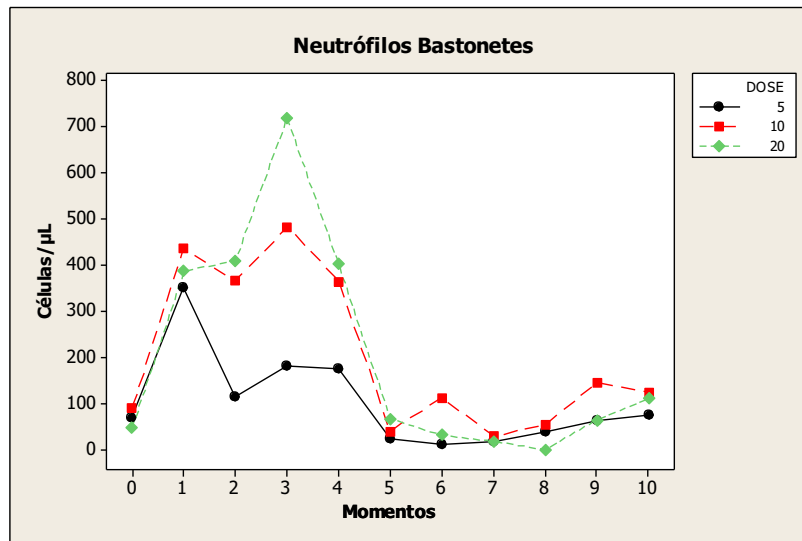


Figura 5: Valores médios obtidos para NB nos cães saudáveis dos grupos D5, D10 e D20 em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2011.

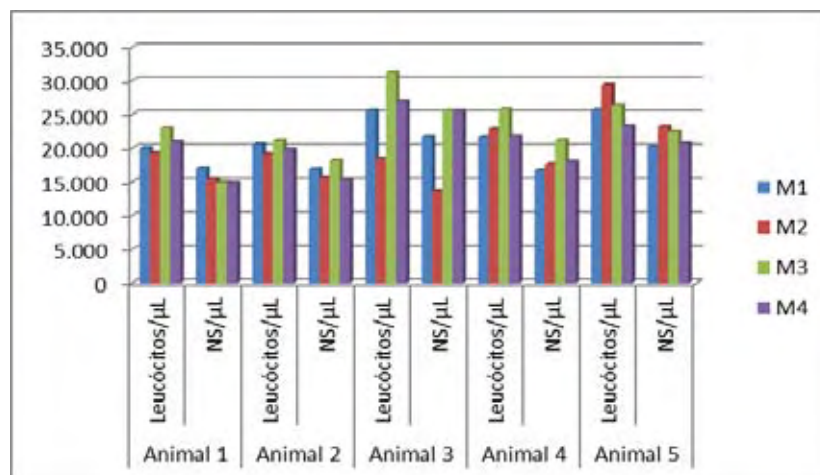


Figura 6: Valores individuais de leucócitos/μL e neutrófilos/μL de cães saudáveis que receberam 5μg/Kg/dia de rhG-CSF, Jaboticabal, 2011.

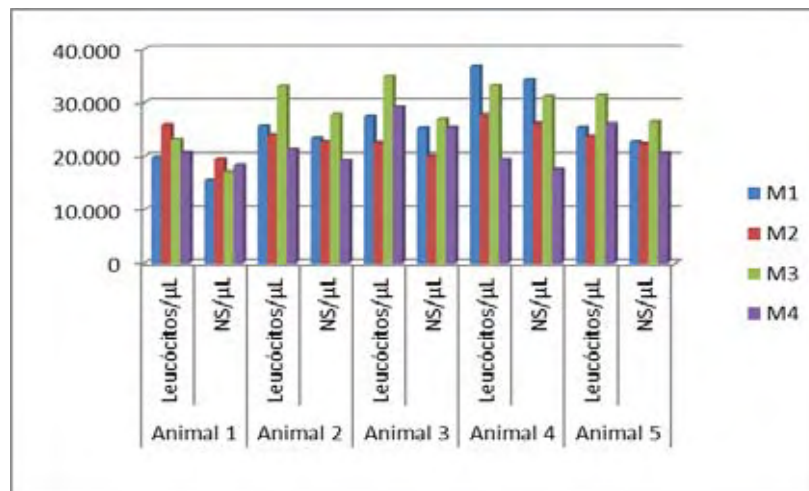


Figura 7: Valores individuais de leucócitos/μL e neutrófilos/μL de cães saudáveis que receberam 10μg/Kg/dia de rhG-CSF, Jaboticabal, 2011.

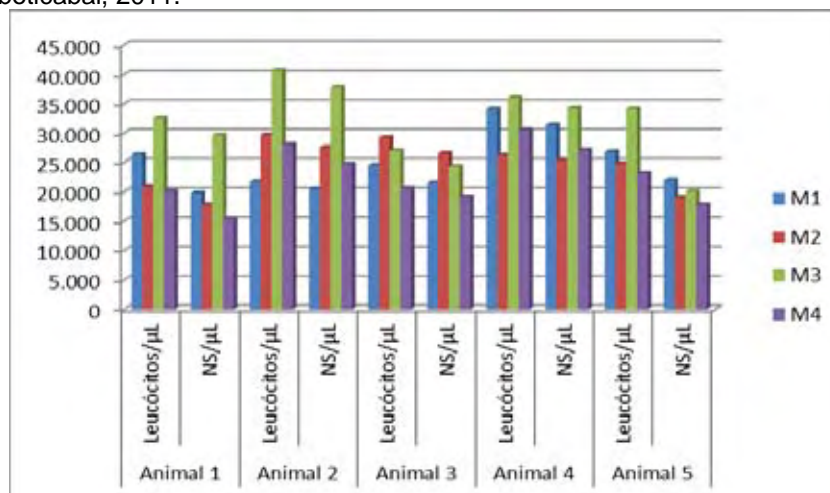


Figura 8: Valores individuais de leucócitos/μL e neutrófilos/μL de cães saudáveis que receberam 20μg/Kg/dia de rhG-CSF, Jaboticabal, 2011.

A contagem global de leucócitos e de NS apresentou uma elevação de aproximadamente três vezes maior após a primeira dose em relação ao momento imediatamente anterior à primeira aplicação (M0) (Figura 9) com pico 72 horas após início da aplicação do medicamento (M3) para os três grupos (Figuras 3, 4 e 5). De acordo com os achados de Hasegawa e Inomata (2000) os valores de leucócitos se elevam três vezes em relação ao valor inicial com pico no terceiro após aplicação de rhG-CSF em cães saudáveis. O mesmo ocorreu em doadores humanos recebendo 10μg/Kg/dia de rhG-CSF (LANE et al., 1995). Valor semelhante também foi observado por Yagi et al. (2008), após aplicar

10 μ g/Kg/dia de rhG-CSF em cães com infarto do miocárdio induzido, pois o número de leucócitos aumentou 4.4 vezes em relação aos animais que não receberam o medicamento.

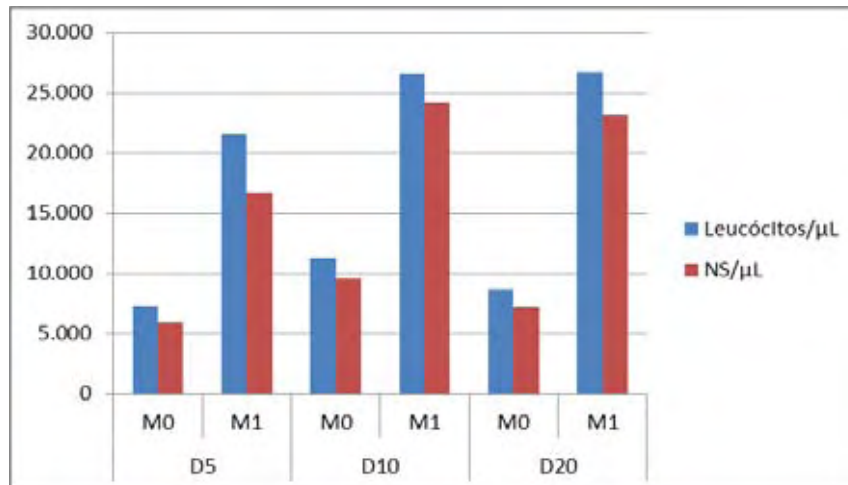


Figura 9: Valores médios de leucócitos/ μ L e de NS/ μ L do M0 e M1 dos três grupos experimentais, Jaboticabal, 2011.

Entretanto, apesar do aumento significativo, a contagem elevada de leucócitos, NS e NB não foi prolongada, pois 24 horas após a última dose ocorreu ligeira queda e 48 horas depois de cessada a administração ocorreu retorno aos níveis basais com diferença estatística em relação ao momento anterior, permanecendo assim até o último dia de análise (Figuras 3, 4 e 5). Curta duração na magnitude dos valores de leucócitos e de NS foi encontrada igualmente por Lane et al., (1995) que após a aplicação de 10 μ g/Kg/dia em humanos saudáveis durante quatro dias, a queda dos valores iniciou-se 24 horas após o término do medicamento. Entretanto, tempo de aplicação maior ou igual há seis dias permite período prolongado de elevação leucocitária e neutrofílica em cães (YAMAMOTO et al., 2011) e humanos (WEAVER et al. 1998). Obradovich et al. (1991) observaram queda aos valores iniciais de leucócitos e neutrófilos após três a cinco dias da suspensão de rcG-CSF em cães que receberam 5 μ g/Kg/dia durante quatro semanas. De acordo com Lothrop et al. (1988) e Hammond et al. (1990) a administração de rhG-CSF em cães com hematopoese cíclica por 30 ou 60 dias leva a uma leucocitose neutrofílica persistente. Porém, longo período de utilização de rhG-CSF em cães saudáveis acarretou na formação de anticorpos imunizando os animais e, assim, induzindo a neutralização do G-CSF canino endógeno, levando a um longo período de neutropenia (HAMMOND et al. 1991).

Analisando entre os diferentes grupos houve diferença estatística para nível de probabilidade a 5% entre os grupos D5 e D20 para a contagem global de leucócitos ($p=0,0008$) e absoluta de NS ($p=0,001$) (Figuras 10 e 11), mas não para o grupo D10 em relação aos grupos D5 e D20 ($p<0.05$). (Figuras 10 e 11). Nos estudos de Yamamoto et al. (2011) não houve diferença estatística na contagem de granulócitos entre as doses de 5 e 10 $\mu\text{g/Kg/dia}$ de rcG-CSF aplicadas em cães tratados com ciclofosfamida. Cães saudáveis após aplicação de 5 e 10 $\mu\text{g/Kg/dia}$ de rhG-CSF não apresentam diferença estatística entre as duas doses na contagem de leucócitos e de NS (VIEIRA et al. 2011). Entretanto, contrariando os achados do presente estudo, Weaver et al. (1998) observaram diferença estatística na contagem global de leucócitos e absoluta de NS entre doses de 10 e 20 $\mu\text{g/Kg/dia}$ de rhG-CSF em pacientes humanos.

Embora não tenha sido observada diferença estatística para o grupo D10 em relação aos grupos D5 e D20, a elevação no número de leucócitos e de NS foi dose-dependente (Figuras 13 e 14), corroborando com Weaver et al. (1998) após tratar pacientes humanos e Yamamoto et al. (2011) após aplicar a citocina em cães. Outros autores também observaram que a utilização de doses crescentes de rhG-CSF em humanos leva à elevação dose-dependente de leucócitos (ARBONA et al., 1998). Para NB houve diferença estatística entre os grupos D5 e D10 ($p=0.0005$) e D5 e D20 ($p<0.0001$) (Figura 12), com elevação dose-dependente (Figura 15).

Apesar da diferença estatística observada entre os grupos D5 e D20 (Figura 11), na dose de 5 $\mu\text{g/Kg/dia}$ ocorreu elevação significativa nos valores de NS, concordando com Henry et al. (1998), os quais relatam que esta dose é suficiente para promover a recuperação nos valores de granulócitos.

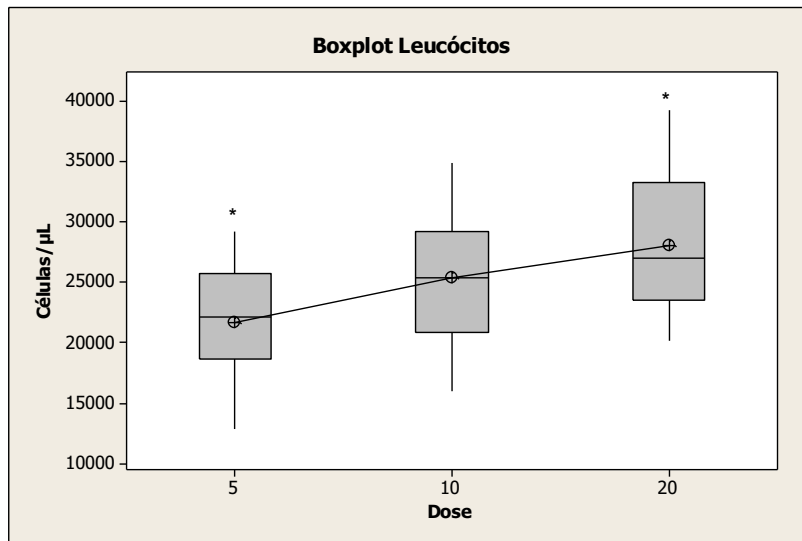


Figura 10: Box Plot da contagem de leucócitos/ μL dos diferentes grupos durante os momentos M1 a M4, Jaboticabal, 2011. * diferença estatística para $p \leq 0.05$ entre D5 e D20;

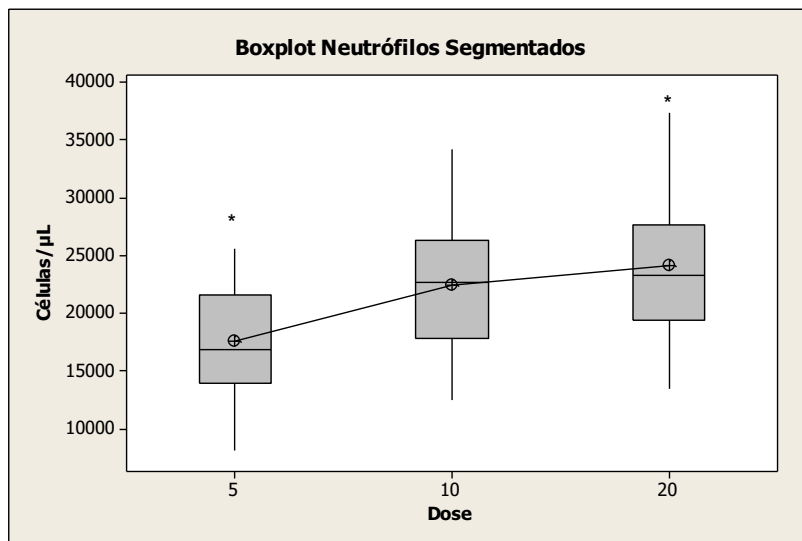


Figura 11: Box Plot da contagem de NS/ μL dos diferentes grupos durante os momentos M1 a M4, Jaboticabal, 2011. * diferença estatística para $p \leq 0.05$ entre D5 e D20;

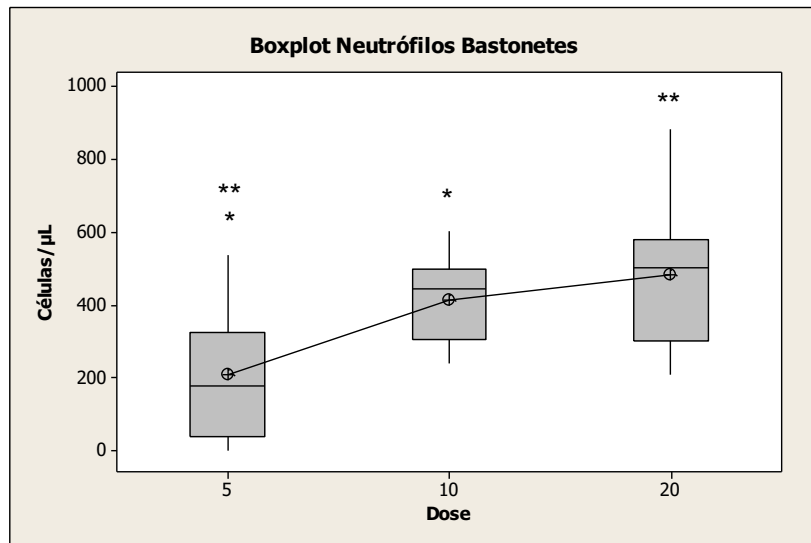


Figura 12: Box Plot da contagem de NB/ μ L dos diferentes grupos durante os momentos M1 a M4, Jaboticabal, 2011. * diferença estatística para $p \leq 0.05$ entre D5 e D10; ** diferença estatística para $p \leq 0.05$ entre D5 e D20.

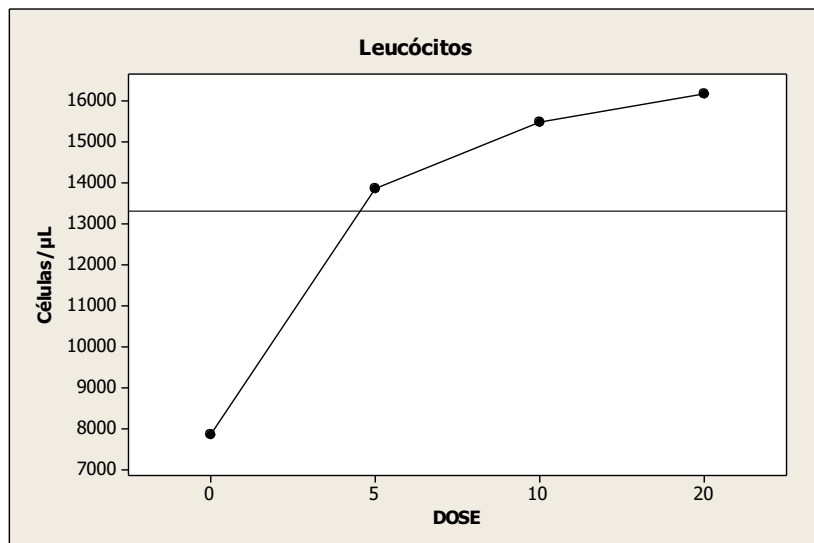


Figura 13: Valores médios obtidos na contagem de leucócitos/ μ L nos momentos M0 a M10 nos diferentes grupos, Jaboticabal, 2011.

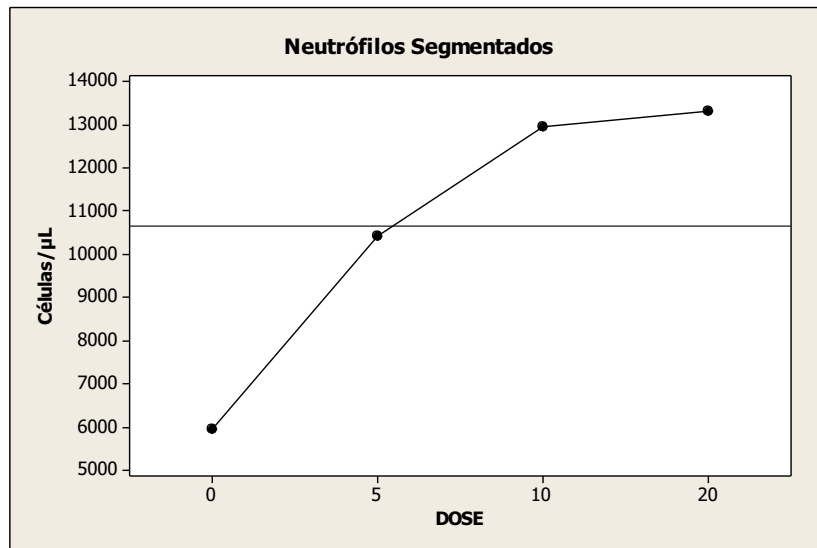


Figura 14: Valores médios obtidos na contagem diferencial de NS/μL nos momentos de M0 a M10 nos diferentes grupos, Jaboticabal, 2011.

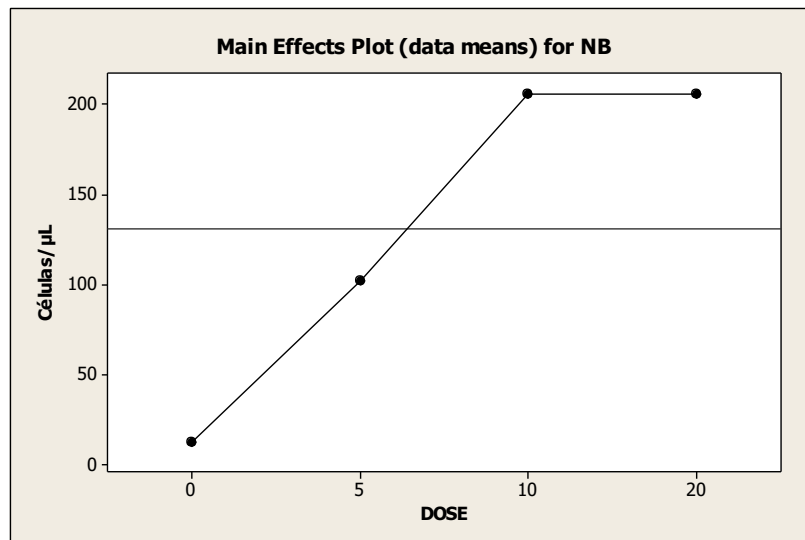


Figura 15: Valores médios obtidos na contagem diferencial de NB/μL nos momentos de M0 a M10 nos diferentes grupos. Jaboticabal, 2011.

IV.2 Números de Plaquetas

Os valores médios obtidos para contagem de plaquetas/ μ L para os diferentes grupos (D5, D10 e D20) nos diferentes momentos estão descritos na tabela 4.

Tabela 4: Valores médios obtidos para o número de plaquetas/ μ L nos diferentes momentos e grupos experimentais. Jaboticabal, 2011.

Momentos	n ^o de plaquetas/ μ L		
	D5	D10	D20
M0	278.000	270.000	248.600
M1	259.600	235.200	196.000
M2	198.400	190.000	144.000
M3	90.500	192.000	154.000
M4	174.000	182.000	136.000
M5	170.000	164.000	182.000
M6	186.000	156.000	168.000
M7	186.000	142.500	185.000
M8	170.000	158.000	188.000
M9	168.000	152.500	178.000
M10	168.000	148.000	190.000

Os valores de plaquetas iniciaram queda 24 horas após a primeira aplicação do medicamento (M1) para os três grupos, embora este valor não tenha sido diferente estatisticamente em relação ao momento anterior à aplicação (M0) (Tabela 4 e Figura 16), ocorrendo tal diferença após a terceira dose do medicamento para o D5, quarta dose para o D10 e segunda dose para o D20. Resultados semelhantes foram encontrados por Weaver et al. (1998), no qual a queda no número de plaquetas iniciou-se 24 horas após a primeira dose de rhG-CSF com diferença estatisticamente significativa em relação ao momento anterior à aplicação no quinto dia de administração nas doses de 10, 30 e 40 μ g/Kg/dia em humanos.

Ao comparar os diferentes grupos pode-se observar que a queda nos níveis de plaquetas foi dose-dependente (Figura 17), com diferença estatística entre os grupos D5 e D20 ($p=0.007$) e D10 e D20 ($p=0.01$) (Figura 18). Contrariando os achados de Stroncek et al. (1996) que não observaram diferença entre doses de 2 e 5 μ g/Kg/dia de rhG-CSF em

humanos, concluindo que a redução na contagem de plaquetas não é dose-dependente. No grupo D20 a queda na contagem de plaquetas foi mais acentuada com nadir 24 horas após a última dose do rhG-CSF (M4), de maneira que, em alguns dias, os níveis estiveram abaixo dos valores de referência para a espécie canina. Porém, 48 horas após a última dose do medicamento o valor se elevou, no entanto não retornou ao valor basal até o último dia de avaliação (Tabela 4; Figura 16). Para os grupos D5 e D10 os valores de plaquetas também estiveram abaixo dos valores de referência em alguns momentos e não retornaram aos níveis anteriores à aplicação até o último momento de avaliação (Tabela 4 e Figura 16).

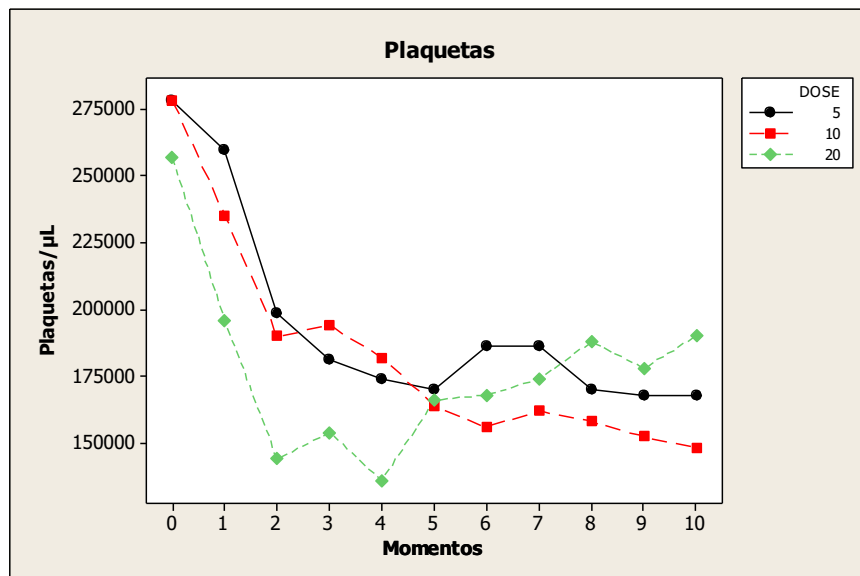


Figura 16: Valores médios obtidos para plaquetas/ μL nos cães dos grupos D5, D10 e D20 nos diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2011.

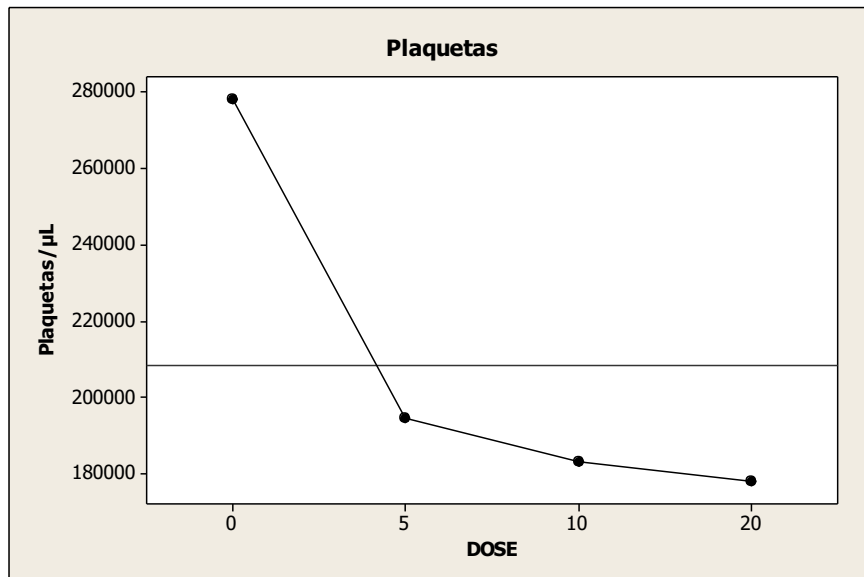


Figura 17: Valores médios obtidos na contagem de células plaquetas/ μL dos momentos de M0-M10 nos diferentes grupos (D5, D10 e D20), demonstrando redução dose-dependente. Jaboticabal, 2011.

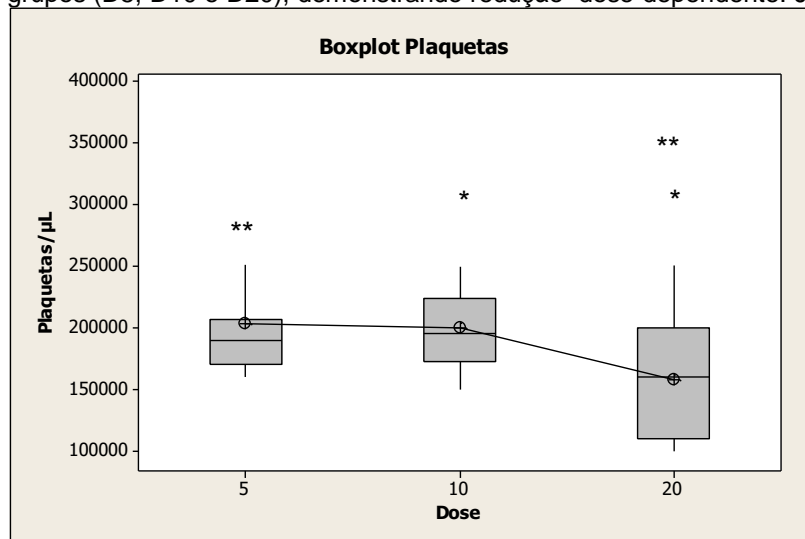


Figura 18: Box Plot da contagem de plaquetas/ μL dos diferentes grupos durante os momentos M1 a M4, Jaboticabal, 2011. * diferença estatística para $p \leq 0.05$ entre D10 e D20; ** diferença estatística para $p \leq 0.05$ entre D5 e D20.

Os resultados do presente estudo indicam que há queda nos níveis de plaquetas após início do tratamento com rhG-CSF, corroborando com Yagi et al. (2008), os quais observaram queda nos níveis de plaquetas após administrar rhG-CSF na dose de $10\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{dia}$ em cães com infarto do miocárdio induzido. No ensaio científico conduzido por

Silva et al. (2010) houve redução na contagem de plaquetas de cães saudáveis e de cães com linfoma durante a aplicação da citocina, além da redução na contagem de megacariócitos, e recuperação 14 dias após suspensão do medicamento. Zaucha et al. (2001) observaram que a aplicação de rG-CSF na dose de 5µg/Kg/dia durante 21 dias acarreta na queda rápida e prolongada da contagem de plaquetas, de maneira que alguns cães não recuperam os valores de plaquetas mesmo após a suspensão do medicamento.

Autores sugerem que a redução na contagem de plaquetas ocorre devido procedimento de aférese feito para coleta das CTH (STRONCEK et al., 1997). Entretanto, de acordo com Weaver et al. (1998) há relatos de que a queda nos níveis de plaquetas ocorre independente do procedimento de aférese. No presente trabalho, a queda na contagem de plaquetas aconteceu provavelmente devido à administração do rhG-CSF, visto que o procedimento de aférese não foi realizado nos cães. No ensaio científico conduzido por Arbona et al. (1998) a contagem de plaquetas de doadores saudáveis reduziu após o início do procedimento de aférese. Entretanto, a contagem plaquetária não diferiu antes e após cada procedimento de coleta de CTH. Portanto, aférese e rhG-CSF promovem a queda dos níveis de plaquetas (ARBONA et al., 1998).

Stroncek et al. (1996) observaram redução de plaquetas quando administrado G-CSF por dez dias em humanos e possível redução na trombopoiese em pacientes que receberam a citocina durante cinco dias e foram submetidos ao procedimento de aférese, afirmando que desconheciam se quatro dias de aplicação de rhG-CSF seria capaz de reduzir os valores de plaquetas. No presente trabalho fora confirmado que uma dose é suficiente para reduzir os valores de plaquetas, dos quais a partir da terceira dose são diferentes estatisticamente em relação ao momento anterior à aplicação.

O mecanismo que leva à redução de plaquetas após administração de G-CSF ainda não foi elucidado (WEAVER et al., 1998). Pode ser devido à ativação de monócitos (NASH et al., 1995), ativação de células endoteliais (MARTINO et al., 2012) ou acúmulo de neutrófilos na vasculatura (DeJESUS et al., 2011). Um estudo in vitro demonstrou que o G-CSF induz a hiperagregação plaquetária (KAPTAN et al., 2007). Há relatos na medicina humana de uma possível relação entre administração de G-CSF e ocorrência de trombozes (KAPTAN et al., 2007) e vasculite (HUSSEINY; MATTAR, 2011). Episódios hemorrágicos foram descritos em

humanos portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (AIDS) que recebiam rhG-CSF por sete dias (HOLTZER et al., 1997). Recentemente foi descrito um caso de formação de trombo na vasculatura pulmonar de um doador da espécie humana que recebeu 10µg/Kg a cada 12 horas por cinco dias (MARTINO et al., 2012). No presente estudo, apesar da queda nos valores de plaquetas, nenhum dos animais apresentou alterações hemostáticas durante todo período de avaliação. De acordo com Martino et al. (2012) apesar deste efeito adverso, casos que envolvem gravidade clínica após administração de G-CSF são raros. Logo, sugerem que alterações hemostáticas são transitórias e dificilmente acarretam risco ao indivíduo que recebe a citocina.

IV.3 Números de CD34⁺ no Sangue Periférico

Os valores médios obtidos para contagem de CTH CD34⁺ para os diferentes grupos (D5, D10 e D20) nos diferentes momentos estão descritos na tabela 5.

Tabela 5: Valores médios obtidos para o número de células CD34⁺/μL nos diferentes momentos e grupos experimentais. Jaboticabal, 2011.

Momentos	n ^o de CD34 ⁺ /μL		
	D5	D10	D20
M0	1,46	6,72	1,0
M1	1,59	55,88	67,7
M2	1,19	21,74	27,9
M3	3,24	27,43	35,67
M4	0,69	7,63	10,43
M5	0,93	4,02	0,81
M6	1,97	1,05	1,97
M7	0,85	3,09	1,07
M8	0,80	0,61	1,05
M9	0,54	0,32	1,2
M10	1,24	0,77	1,40

Elevação estatisticamente significativa na contagem de CTH CD34⁺/μL ocorreu 24 horas após a primeira dose do rhG-CSF para os grupos D10 e D20 com pico nesse mesmo período, permanecendo elevada durante a aplicação do medicamento (M1-M3) com diferença estatística entre os momentos anterior (M0) e posteriores à aplicação da citocina (M4 a M10) (Figura 19). Estes resultados corroboram com estudos feitos em humanos (KOBBE et al. 1999; KRÖGER et al., 2004) e cães (PARK et al. 2007) que após aplicação de rhG-CSF a elevação de CTH CD34⁺/μL ocorreu logo após a primeira dose da citocina e permaneceu elevada durante a aplicação da citocina. Lane et al. (1995) também obtiveram em pacientes humanos elevação no número de células CD34⁺/μL após a primeira dose de 10μg/Kg/dia rhG-CSF, mas o pico somente ocorreu no quinto dia. Benboubker et al. (2001) observaram que 24 horas após a aplicação de G-CSF em humanos a coleta de células progenitoras no sangue periférico pôde ser realizada com sucesso. Entretanto pacientes com neoplasias hematopoiéticas que receberam tratamento quimioterápico antes do regime de

mobilização com rhG-CSF levaram quatro dias para elevar o número de CTH CD34⁺/μL no sangue periférico (ÖZKURT et al., 2010). O mesmo foi observado em cães com linfoma submetidos à quimioterapia anterior a aplicação de rhG-CSF, cuja elevação de CD34⁺/μL levou cinco dias para ocorrer (GODOY, 2010).

Para o grupo D5 ocorreu pequeno aumento no número de células CD34⁺/μL no M3 (72 horas após início do medicamento), entretanto essa elevação não foi estatisticamente significativa em relação ao momento anterior à primeira aplicação (M0) (Tabela 5 e Figura 19). Assim como verificado em cães saudáveis e em cães com linfoma (GODOY, 2010) e em humanos com neoplasias hematológicas (PAVONE et al., 2002; SILVA et al. 2003) tratados com rhG-CSF na dose de 5μg/Kg/dia, cujo valor de CTH CD34⁺/μL não se elevou significativamente. De acordo com Besinger et al. (1993) o máximo de células progenitoras da MO para o sangue periférico é alcançado nas doses de 10 a 30μg/Kg/dia.

Na análise feita por citometria de fluxo (CMF) houve diferença entre os grupos D5, D10 e D20 e no momento M0 no resgate de eventos positivos para CTH CD34⁺. No momento anterior (M0) e 24 horas após a primeira aplicação da citocina para o grupo D5 (M1) foi gerada fraca fluorescência (PE-H anti-CD34) (Figura 20; *Gate* P2), de maneira que raros eventos positivos para HSC CD34⁺ foram identificados (Figura 20; *Gate* P5). Para os grupos D10 e D20, no entanto, essa análise alterou-se, pois 24 horas após a primeira aplicação da citocina (M1), foi gerada forte fluorescência (PE-H anti-CD34) (Figura 20; *Gate* P2), resgatando-se vários eventos positivos para HSC CD34⁺ (Figura 20; *Gate* P5).

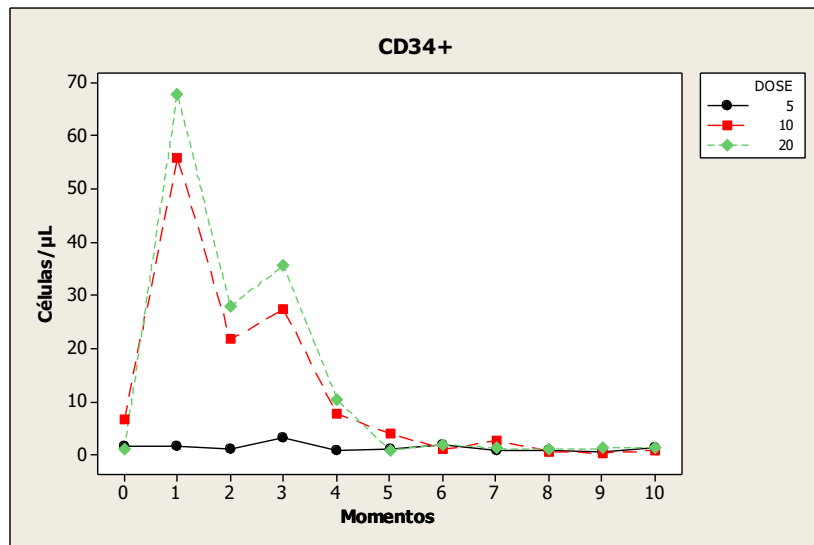


Figura 19: Valores médios obtidos para células CD34+/μL nos cães dos grupos D5, D10 e D20 em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2011.

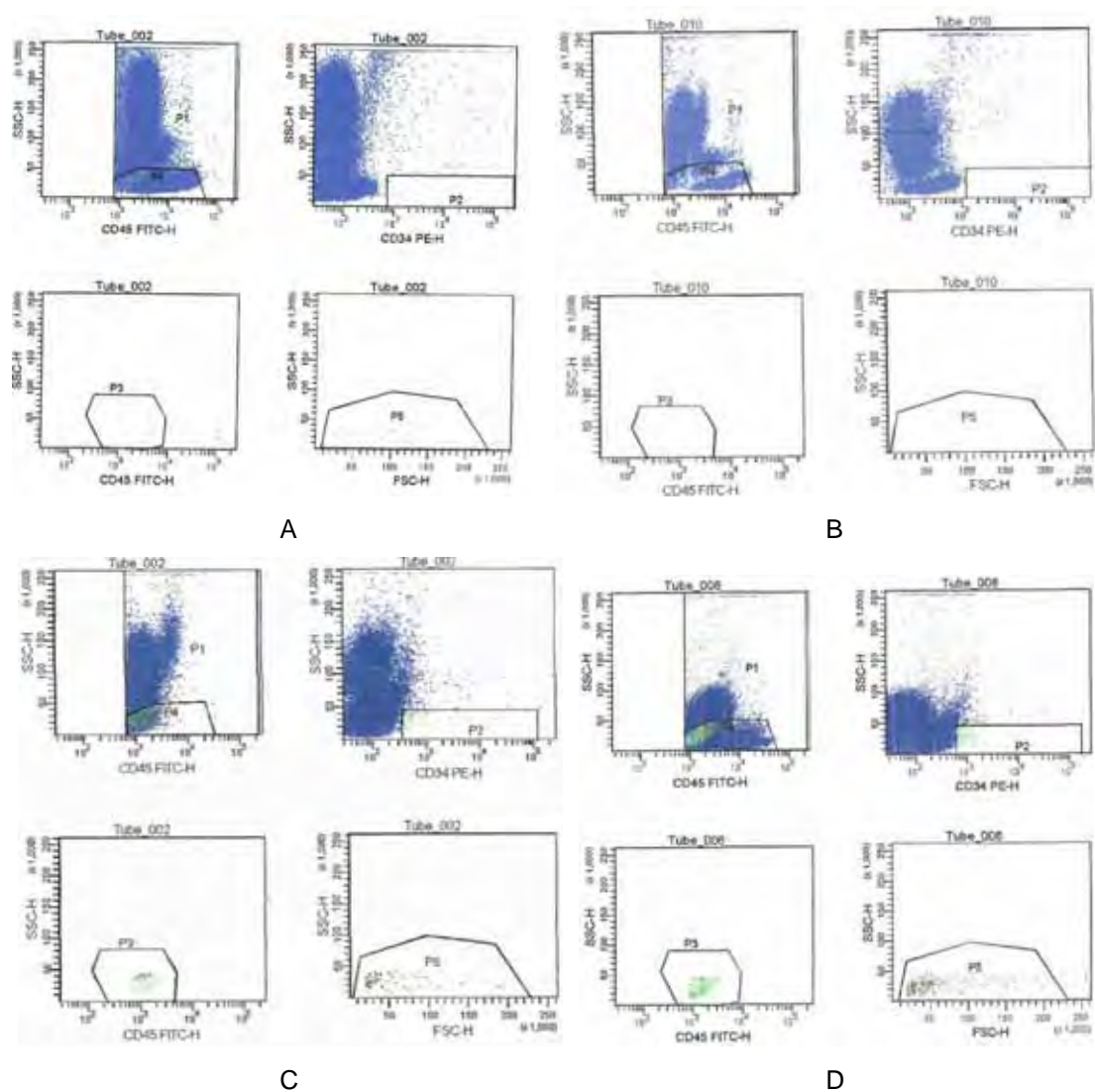


Figura 20: Quantificação das CTH $CD34^+$ do sangue periférico canino através da citometria de fluxo. Os dados analisados pelo aparelho são plotados em gráficos e analisados pelo *software* FACSDiva.. A: M0; B: M1 grupo D5; C: M1 grupo D10; D: M1 grupo D20. Notar a diferença entre as *gates* P5 (população de células $CD34^+$).

Redução para valores abaixo de 10 CTH $CD34^+$ / μ L ocorreu 24 horas após a suspensão rhG-CSF para o grupo D10 e 48 horas para o D20 (Tabela 5 e Figura 19). Logo, a dose de 20 μ g/Kg/dia permite mobilização de CTH $CD34^+$ por um período maior em relação à dose de 10 μ g/Kg/dia. Kobbe et al. (1999) observaram que a dose de 25 μ g/Kg/dia permite elevação dos valores de $CD34^+$ / μ L por mais tempo quando comparada com a dose de 12 μ g/Kg/dia de rhG-CSF em humanos. Lane et al. (1995) no entanto observaram que após

aplicação de rhG-CSF em humanos durante quatro dias na dose de 10µg/Kg/dia, a queda nos níveis de células CD34+/µL iniciou 48 horas após suspensão da citocina.

Os valores médios de CTH CD34+/µL no grupo D10 elevou-se oito vezes e 67.7 vezes no grupo D20 após a primeira aplicação em relação ao M0 (Figura 21). Em humanos foi observado elevação 10 vezes maior de CTH CD34+/µL após aplicação de 16µg/Kg/dia de rhG-CSF durante cinco a sete dias (BESINGER et al. 1993), 16 vezes maior em relação ao valor basal após aplicação de 10µg/Kg/dia por quatro dias (ARBONA et al. 1998) e 16.3 vezes maior com 12µg/Kg/dia de rhG-CSF durante quatro dias (KÖRBLING et al. 1995).

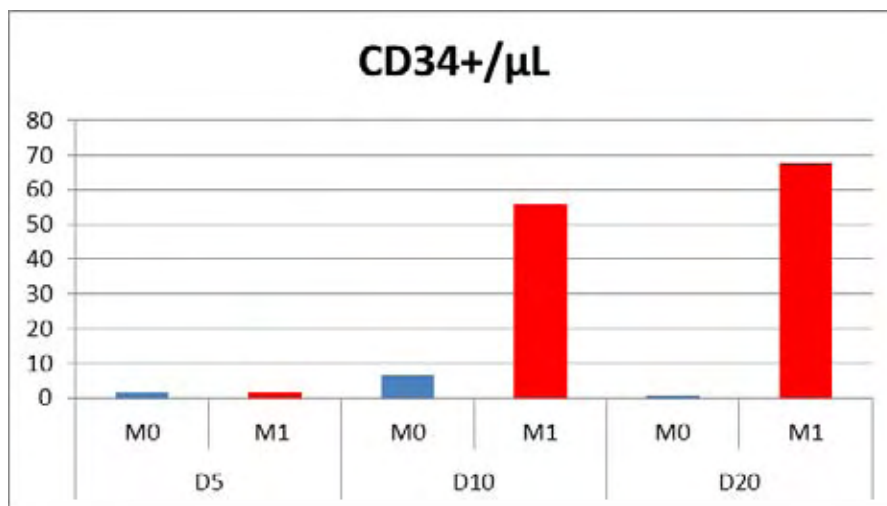


Figura 21: Valores médios de CD34+/µL do M0 e M1 dos três grupos experimentais, Jaboticabal, 2011.

No presente estudo a elevação de células CD34+/µL no sangue periférico de cães que receberam 5, 10 e 20µg/Kg/dia de rhG-CSF foi dose-dependente (Figura 22), assim como verificado em humanos submetidos às doses de 12.5 e 25µg/Kg/dia (KOBBE et al., 1999), 10, 12 e 16 µg/Kg/dia (ARBONA et al., 1998) e 2, 5, 7.5 ou 10 µg/Kg/dia (STRONCEK et al. 1996). Ao contrário do presente estudo, Boy et al. (2011) não encontraram elevação dose-dependente na contagem de células CD34+/µL em humanos que sofreram derrame cerebral tratados com diferentes doses do rhG-CSF.

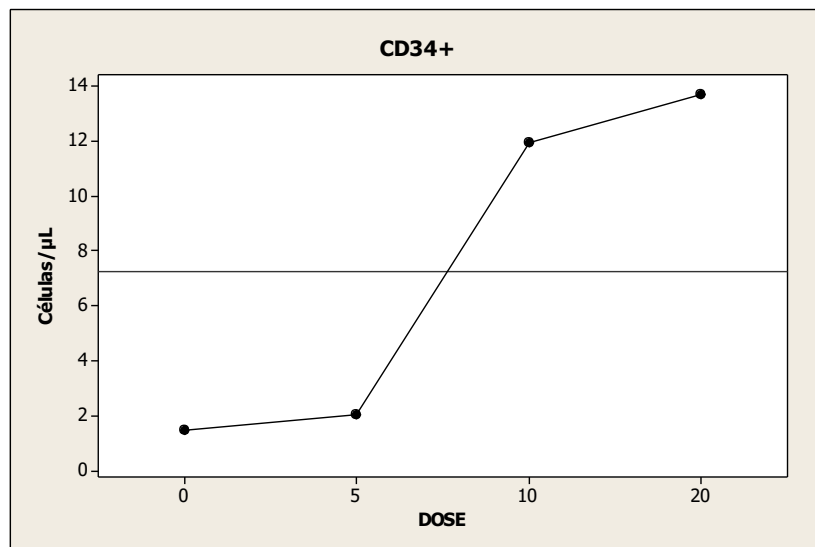


Figura 22: Valores médios obtidos na contagem de células CD34⁺/μL de M0 a M10 nos diferentes grupos (D5, D10 e D20), demonstrando elevação dose-dependente. Jaboticabal, 2011.

Ao compararmos os diferentes grupos entre si podemos observar que houve diferença estatisticamente significativa na elevação de células CD34⁺/μL entre os grupos D5 e D10 ($p=0,0008$), D5 e D20 ($p<0,0001$), mas não entre D10 e D20 ($p=0.05$) (Figura 23).

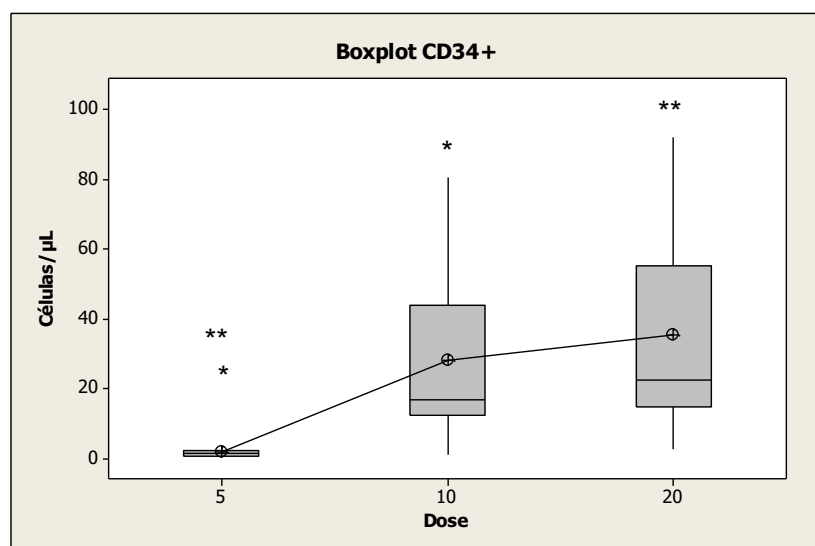


Figura 23: Box Plot da contagem de células CD34⁺/μL dos diferentes grupos durante os momentos M1-M4, Jaboticabal, 2011. * diferença estatística para $p\leq 0.05$ entre D5 e D10; ** diferença estatística para $p\leq 0.05$ entre D5 e D20.

De acordo com Nademanee et al. (1994) e Höglund et al. (1996) houve diferença estatística entre as doses de 5 e 10µg/Kg/dia nos níveis de células CD34⁺/µL em humanos que receberam alta dose. Kobbe et al (1999) obtiveram resultados semelhantes, de maneira que entre as doses de 12 e 25µg/Kg/dia não houve diferença estatisticamente significativa no número de células CD34⁺/µL em pacientes humanos. Contrariando os achados do presente estudo, Chen et al. (2011) observaram que doses superior e inferior a 10µg/Kg/dia em humanos não apresentaram diferença estatisticamente significativa quanto à mobilização de células CD34⁺/µL para o sangue periférico e de acordo com Weaver et al. (1998) houve diferença estatística no número absoluto de células CD34⁺ em humanos que receberam as doses de 10 e 20µg/Kg/dia.

Para que ocorra mobilização eficiente de CTH, em humanos, preconiza-se que os doadores liberem, no mínimo, 10 células CD34⁺/µL no sangue periférico após regime de mobilização para posterior leucaférese – procedimento utilizado para obtenção de células mononucleares do sangue periférico (WEAVER et al., 1998; MENDRONE JR, 2008). De acordo com Özkurt et al. (2010) falha na mobilização é considerada quando não é alcançado um número mínimo de 10 células CD34⁺/µL. No presente estudo pode-se observar que a dose de 5µg/Kg/dia não foi suficiente para estimular a MO de cães saudáveis e promover adequada mobilização, visto que o pico observado foi de 3,24 células CD34⁺/µL (Tabela 5 e Figura 19), corroborando com Godoy (2010) após aplicação de 5µg/Kg/dia de rhG-CSF em cães com linfoma submetidos ou não ao transplante de medula óssea e em cães saudáveis. Em humanos a dose de 5µg/Kg/dia também acarretou em falha na mobilização, porém não influenciou no número de células CD34⁺ coletadas no produto de aférese (PAVONE et al., 2002; SILVA et al. 2003). Contrariando os achados do presente estudo Kopf et al. (2006) obtiveram em pacientes humanos uma média de 146 células CD34⁺/µL no primeiro dia de aférese com a dose de 5µg/Kg/dia. Ainda, Boy et al. (2011) alcançaram o número mínimo de 10 células CD34⁺/µL após essa mesma dose em pacientes que haviam sofrido derrame cerebral.

Embora Russell et al. (2008) tenham observado um pico de 28 células CD34⁺/µL na dose de 5µg/Kg em pacientes humanos, alguns pacientes não alcançaram o mínimo de 10 células CD34⁺/µL. No presente estudo a dose de 5µg/Kg/dia não mobilizou o mínimo de 10

células CD34⁺/μL em nenhuma parcela experimental durante todo período de avaliação, entretanto nas doses de 10 e 20μg/Kg todos os cães alcançaram um mínimo de 10 células CD34⁺/μL quando ocorreu o pico de mobilização (M1) (Tabela 6).

Durante a aplicação de rhG-CSF (M1 a M3) todos os cães dos grupos D10 e D20 obtiveram número de células CD34⁺/μL maior que 10 (Tabela 6). Kröger et al. (2004) também observaram que 100% dos doadores humanos saudáveis tratados com rhG-CSF tiveram mobilização adequada durante a aplicação da citocina. Entretanto, após a última dose (M4), no grupo D10, 40% dos animais obtiveram mais que 10 células CD34⁺/μL e no D20 60%, contrariando os autores supracitados os quais observaram que, mesmo 24 horas após a suspensão da citocina, o número mínimo de 10 CTH CD34⁺/μL no sangue periférico foi obtido em todos os doadores. Quarenta e oito horas após a última dose do medicamento (M5) nenhum dos animais apresentou mobilização adequada, permanecendo assim até o último dia de análise (Tabela 6).

Tabela 6: número de células CD34⁺/μL dos momentos M1-M3 (durante aplicação do medicamento) e M4 (24 horas após a última dose) de cada parcela experimental.

	D5 (5μg/Kg rhG-CSF)		D10 (10μg/Kg rhG-CSF)		D20 (20μg/Kg rhG-CSF)	
	Animal	n ^o de células CD34 ⁺ /μL	Animal	n ^o de células CD34 ⁺ /μL	Animal	n ^o de células CD34 ⁺ /μL
M1	1	0,71	1	26,00	1	82,8
	2	0,30	2	59,00	2	102,7
	3	2,66	3	66,40	3	80,1
	4	1,40	4	46,12	4	59,0
	5	2,90	5	81,90	5	14,0
M2	1	0,6	1	15,30	1	44,0
	2	0,85	2	12,97	2	38,9
	3	0,83	3	28,60	3	21,43
	4	1,88	4	37,40	4	15,8
	5	1,77	5	14,42	5	19,3
M3	1	2,10	1	12,10	1	22,45
	2	7,00	2	12,00	2	32,00
	3	0,38	3	20,20	3	70,41
	4	5,15	4	17,64	4	31,00
	5	1,56	5	75,20	5	22,50
M4	1	0,28	1	5,80	1	18,47
	2	1,34	2	3,53	2	2,61
	3	0,71	3	0,93	3	11,41
	4	0,17	4	13,30	4	7,22
	5	0,93	5	14,60	5	12,46

Os valores em destaque indicam os cães que alcançaram valores ≥ 10 células CD34⁺/μL.

O valor de células CD34⁺/μL mobilizadas da MO para o sangue periférico variou entre as parcelas experimentais dos diferentes grupos (Tabela 6), corroborando com Milone et al. (2003) após aplicação de 10μg/Kg/dia de rhG-CSF em pacientes humanos previamente tratados com quimioterapia e com Chen et al. (2011) após aplicação de 10μg/Kg/dia de rhG-CSF durante cinco dias em humanos. Analisando individualmente cada parcela experimental, o valor máximo de células CD34⁺/μL mobilizadas para o sangue periférico foi de 102.7 células/μL no animal 2 do grupo D20, 24 hora após a primeira dose de rhG-CSF (Tabela 6). Resultado semelhante foi observado no ensaio científico de Milone et al. (2003), no qual um paciente humano alcançou 110 células CD34⁺/μL 24 horas após primeira dose e de Chen et al. (2011), cujo paciente humano mobilizou ao sangue periférico 92 células CD34⁺/μL. Entretanto no trabalho conduzido por Chen et al. (2011) essa elevação ocorreu após cinco doses do referido medicamento, diferentemente do presente trabalho, no qual essa elevação ocorreu após uma dose da citocina (Tabela 6). Autores sugerem que essa diferença na dinâmica de mobilização de CTH CD34⁺/μL da MO ao sangue periférico possa ser devido peculiaridades inerentes ao indivíduo submetido ao regime de mobilização, tais como, idade, sexo, tratamento quimioterápico anterior à mobilização ou alguns tipos de neoplasias (MILONE et al., 2003). Em cães, até o momento, não foram inquiridas quais particularidades poderiam levar a essa discrepância nos valores de CTH CD34⁺ mobilizadas à circulação periférica de cada animal isoladamente.

V. CONCLUSÕES

A elevação nos valores de neutrófilos ocorre logo após a primeira dose com valores acima aos de referência sem efeitos colaterais graves, indicando que tal medicamento pode ser utilizado para amenizar ou reverter quadros de neutropenia em cães de forma segura. A dose de 5µg/Kg/dia foi suficiente para ocasionar esse aumento, permanecendo a dose de escolha, por ser um protocolo menos oneroso. Entretanto, apesar da elevação no número de neutrófilos, pode ocorrer redução no número de plaquetas, devendo ter precaução quando utilizá-lo em animais trombocitopênicos.

Embora a dose de 5µg/Kg/dia seja eficaz para elevar os neutrófilos na circulação periférica, não foi suficiente para promover a mobilização das CTH CD34⁺ para o sangue periférico. O sucesso obtido na mobilização ocorreu nas doses de 10 e 20 µg/Kg/dia, de maneira que não houve diferença no número de CTH CD34⁺ mobilizadas para circulação periférica. Logo, a dose de 10 µg/Kg/dia pode ser utilizada em regimes de mobilização em cães de maneira eficiente.

VI. REFERÊNCIAS

- ABRAMS, R. A. et al. Cyclophosphamide treatment expands the circulating hematopoietic stem cell pool in dogs. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 67, n. 5, p. 1392-1399, 1981.
- ALISON, M. R. et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. **Nature**, v.406, n.6793, p.257-258, 2000.
- ANTMAN, K. et al. Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on chemotherapy induced myelosuppression. **New England Journal of Medicine**, v. 319, n. 10, p. 593-598, 1988.
- ARBONA, C. et al. Comparison between once a day vs twice a day G-CSF for mobilization of peripheral blood progenitor cells (PBPC) in normal donors for allogeneic PBPC transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, v. 22, n. 1, p. 39-45, 1998.
- BACAL, N. S.; FAULHABER, M. H. W. **Aplicação prática em citometria de fluxo**. São Paulo: Editora Atheneu, 2003. 90p.
- BADIAVAS, E.V. et al. Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing. **Journal of Cellular Physiology**, v. 196, n. 2, p. 245-250, 2003.
- BARNES, D. W.; LOUTIT, J. F. Haemopoietic stem cells in the peripheral blood. **Lancet**, v. 2, n. 7.526, p. 1138-1141, 1967.
- BENBOUBKER L. et al. 24-hour evaluation of peripheral blood progenitor cell count following G-CSF injection to define optimal time for graft collection. **European Hematology Association**, 2001.

BENDER, J. G. et al. Identification and comparison of CD34-positive cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow cytometry. **Blood**, v. 77, n. 12, p. 2591-2596, 1991.

BESINGER, W. et al. Autologous transplantation with peripheral blood mononuclear cells collected after administration of recombinant granulocyte stimulating factor. **Blood**, v. 81, n. 11, p. 3158-3163, jun. 1993.

BORLONGAN, C. V. et al. The great migration of bone marrow-derived stem cells toward the ischemic brain: Therapeutic implications for stroke and other neurological disorders. **Progress in Neurobiology**, v. 95, n. 2, p. 213-228, 2011.

BOY, S. et al. Mobilisation of Hematopoietic CD34+ Precursor Cells in Patients with Acute Stroke Is Safe - Results of an Open-Labeled Non Randomized Phase I/II Trial. **PLoS one**, v. 6, n. 8, p. 1-10, 2011.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução RE nº 1316, 23 de julho de 2002. Diário Oficial da União, 2002; jul 25.

BYRNE, K.M. et al. A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 73, n. 2, p. 167-182, 2000.

CÁPUA, M.L.B. et al. T lymphocyte subsets of the umbilical cord blood of dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 791-796, 2009.

CHAMPLIN, R.E. et al. Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. **Blood**, v. 95, n. 12, p. 3702-3709, jun 2000.

CHEN, S. H. et al. The role of donor characteristics and post-granulocyte colony-stimulating factor white blood cell counts in predicting the adverse events and yields of stem cell mobilization. **International Journal of Hematology**, v. 93, n. 5, p. 652-659, 2011.

COBBOLD, S.; METCALFE, S. Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: summary of the first International Canine Leukocyte Antigen Workshop (CLAW). **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 43, n. 3, p. 137-154, 1994.

COUBAN, S. et al. Bone marrow mobilized with granulocyte colony-stimulating factor in related allogeneic transplant recipients: a study of 29 patients. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 6, n. 4, p. 422-427, 2000.

COUTO, C.G. Complications of cancer chemotherapy. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Small animal internal medicine**. 3.ed. St.Louis: Mosby, 2003. Cap.80, p.1108-1116.

DeJESUS, C. E. et al. Transient neutropenia after granulocyte-colony stimulating factor administration is associated with neutrophil accumulation in pulmonary vasculature. **Experimental Hematology**, v. 39, n. 2., p. 142-150, 2011.

DONAHUE, R. E. et al. Leukocyte integrin activation mediates transient neutropenia after G-CSF administration. **Blood**, v. 118, n. 15, p. 4209-4214, 2011.

DUFFY, A. et al. Hematologic improvement in dogs with parvovirus infection treated with recombinant canine granulocyte-colony stimulating factor. **Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 33, n. 4, p. 352-356, 2010.

DÜRSHEN, U. et al. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. **Blood**, Victoria, v. 72, n. 6, p. 2074-2081, 1988.

FELDMAN, B.F. et al. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1344p.

FERRARI, G. et al. Muscle regeneration by bone marrow derived myogenic progenitors. **Science**, v. 279, n. 5356, p.1528-1530, 1998.

FRIMBERGER, A.E. et al. A combination chemotherapy protocol with dose intensification and autologous bone marrow transplant (VELCAP-HDC) for canine lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 2, p. 355-364, 2006.

FRUEHAUF, S.; SEGGEWISS, R. It's moving day: factor affecting peripheral blood stem cell mobilization and strategies for improvement. *British Journal Hematology*, v. 122, n. 3, p. 360-375, 2003.

GASPER, P.W. The hemopoietic system. In: FELDMAN, B.F. et al. **Schalm's Veterinary Hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. cap. 11, p. 63-68.

GLASPY, J. A. et al. Peripheral Blood Progenitor Cell Mobilization Using Stem Cell Factor in Combination With Filgrastim in Breast Cancer Patients. **Blood**, v. 90, n. 8, p. 2939-2951, 1997.

GODOY, A. V. **Avaliação leucométrica e citofluorométrica do sangue periférico de cães com linfoma, após uso de rhg-csf, submetidos à alta dose de ciclofosfamida seguida ou não de transplante de autólogo de medula óssea**. 58 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

GOMES, F. R. **Expressão do fator estimulante de colônia de granulócitos humano recombinante (rhg-csf) em *Escherichia coli***. 2010. 24 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

GOODMAN, J. W.; HODGSON, G. S. **Evidence for Stem Cells in the Peripheral Blood of Mice**. *Blood*, v. 19, n. 6, p. 702-714, 1962.

GRATWOHL A. et al. Hematopoietic precursor cell transplants in Europe: activity in 1994. Report from the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). **Bone Marrow Transplantation**, v. 17, n. 2, p.137-148, 1996.

GRATWOHL A. et al. Current trends in hematopoietic stem cell transplantation in Europe. **Blood**, v. 100, n. 7, p. 2374-2386, 2002.

GRATWOHL A. et al. Results of the EBMT activity survey 2005 on haematopoietic stem cell transplantation: focus on increasing use of unrelated donors. **Bone Marrow Transplantation**, v. 39, n. 2, p. 71-87, 2007.

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

GROUND, M. D. et al. The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. v. 50, n. 5, p. 589-610, 2002.

HAMMOND, W. P. et al. A comparison of treatment of canine cyclic hematopoiesis with recombinant human granulocytemacrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), G-CSF, interleukin-3, and canine G-CSF. **Blood**, v. 76, n. 3, p. 523-532, 1990.

HAMMOND, W.P. et al. Chronic neutropenia. A new canine model induced by human granulocyte colony-stimulating factor. **Journal of Clinical Investigation**, v. 87, n. 2, p. 704-710, 1991.

HASEGAWA, T; INOMATA, T. Effect of recombinant human granulocyte colony stimulating factor on lymphocyte blastogenesis in healthy dogs. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 62, n.11, p. 1205-1207, 2000.

HELDAL, D. et al. A randomised study of allogeneic transplantation with stem cells from blood or bone marrow. **Bone Marrow Transplantation**, v. 25, n. 11, p. 1129-1136, 2000.

HENRY, C.J. et al. Veterinary uses of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. Part I. Oncology. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 20, n. 6, p. 728-734, 1998.

HERNANDEZ, J. D. T. Uso clínico de los Factores de Crecimiento Hematopoyético. **IATREIA**. v. 7, p. 173-180, 1994.

HÖGLUND, M. et al. Dose-dependent mobilisation of haematopoietic progenitor cells in healthy volunteers receiving glycosylated rHuG-CSF. **Bone Marrow Transplantation**, v. 18, n. 1, p. 19-27, 1996.

HOLLAND, M. et al. Pancytopenia associated with administration of captopril to a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 208, n.10, p.1683-1686, 1996.

HOLTZER, C.D. et al. Severe reversible thrombocytopenia caused by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in an AIDS patient receiving chronic ganciclovir therapy. **AIDS**, v. 11, n.11, p. 1403-1405, 1997.

HUMEAU, L. Phenotypic molecular, and functional characterization of human peripheral blood CD34⁺/Thy1⁺ cells. **Blood**, v. 87, n. 3, p. 949-955 1996.

HUSS, R. Isolation of primary and immortalized CD34 hematopoietic and mesenchymal stem cells from various sources. **Stem cells**, v. 18, n. 1, p. 18:19, 2000.

HUSSEINY, N. M. E.; MATTAR, M. M. Aggressive cutaneous vasculitis in a patient with chronic lymphatic leukemia following granulocyte colony stimulating factor injection: a case report. **Journal of Medical Case Reports**, v. 5, n. 88, p. 1-3, 2011.

IANUS, A. et al. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 6, p. 843-850, 2003.

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417 p.

KALE, S. et al. Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 1, p. 42-49, 2003.

KANZ, L.; BRUGGER, W. Mobilization and *ex vivo* manipulation of peripheral blood progenitor cells for support of high-dose cancer therapy In: THOMAS E. D., BLUME K. G., FORMAN S. J. **Hematopoietic Cell Transplantation**. Blackwell Science, Malden, MA, USA. pp, 455-468, 1999.

KAPTAN, K. et al. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) promotes in vitro platelet aggregation. **Hematology**, v. 12, n. 5, p. 441-444, 2007.

KAWADA, H. et al. Nonhematopoietic mesenchymal stem cell can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infaction. **Blood**, v. 104, n. 12, p. 3581-3587, 2004.

KEREN, D. F. History and evolution of surface marker assays. In: KEREN, D. F. et al. **Flow cytometry and clinical diagnosis**. Chicago: American Society of Clinical Pathologists, 1994, p.1.

KOBBE, G. et al. Factors influencing G-CSF-mediated mobilization of hematopoietic progenitor cells during steady-state hematopoiesis in patients with malignant lymphoma and multiple myeloma. **Annals of Hematology**, v. 78, p. 456-462, 1999.

KOCHER, A. A et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. **Nature. Medicine**, v. 7, n. 4, p. 430–436, 2001.

KOPF, B. et al. A randomized study comparing filgrastim versus lenograstim versus molgramostim plus chemotherapy for peripheral blood progenitor cell mobilization. **Bone Marrow Transplantation**, v. 38, n. 6, p. 407-412, 2006.

KÖRBLING M. et al. Successful engraftment of blood derived normal hemopoietic stem cells in chronic myelogenous leukemia. **Experimental Hematology**, v. 9, n. 6, p. 684-690, 1981.

KÖRBLING, M. et al. Autologous transplantation of blood-derived hemopoietic stem cells after myeloablative therapy in a patient with Burkitt's Lymphoma. **Blood**, v. 67, n. 2, p. 529-532, 1986.

KÖRBLING, M. et al. Allogeneic blood stem cell transplantation: peripheralization and yield of donor-derived primitive hematopoietic progenitor cells (CD34⁺ Thy^{-1dim}) and lymphoid subsets, and possible predictors of engraftment and graft-versus-host disease. **Blood**, v. 86, n. 7 p.2842-2848, 1995.

KÖRBLING, M.; ANDERLINI, P. Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter? **Blood**, v. 98, n. 10, p. 2900-2908, 2001.

KRÖGER, N. et al. Kinetics of G-CSF and CD34+ cell mobilization after once or twice daily stimulation with rHu granulocyte-stimulating factor (lenograstim) in healthy volunteers: an intraindividual crossover study. **Transfusion**, v. 44, n. 1, p. 104-110, 2004.

LANE, T. A. et al. Harvesting and enrichment of hematopoietic progenitor cells mobilized into the peripheral blood of normal donors by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) or G-CSF: potential role in allogeneic marrow transplantation. **Blood**, v. 85, n. 1, p. 275-282, 1995

LEVINE, J. E. et al. Cytokine-mobilized allogeneic peripheral blood stem cell transplants in children result in rapid engraftment and a high incidence of chronic GVHD. **Bone Marrow Transplantation**, v. 25, n. 1 p.13-18, 2000.

LIESCHKE, G. J.; BURGESS, A. W. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **New England Journal of Medicine**, v. 327, n. 2, p. 28-35, 1992.

LOTHROP, C.D.JR. et al. Correction of canine cyclic hematopoiesis with recombinant human granulocyte colonystimulating factor. **Blood**, v. 72, n. 4, p. 1324-1328, 1988.

LUCIDI, A.C.; TAKAHIRA, R.K. Uso do estimulante de colônia de granulócitos nas neutropenias em cães e gatos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 915-920, mai-jun 2007.

MARTINO, M. et al. Pulmonary micro-embolism in a healthy donor following G-CSF administration for mobilization of hemopoietic progenitor cells. **Bone Marrow Transplantation**, v. 47, n. 2, p. 308-310, 2012.

McSWEENEY, P.A. et al. Canine CD34: cloning of the cDNA and evaluation of an antiserum to recombinant protein. **Blood**, v. 88, n. 6, p. 1992-2003, 1996.

MENDRONE JR A. et al. Factors affecting hematopoietic progenitor cell mobilization: an analysis of 307 patients. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 39, n. 3, p. 187-192, 2008.

MENDRONE JR, A. Sangue periférico como fonte de células para terapia celular. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, supl. 1, 2009.

MIGLIACCIO, A. R. et al. Hematopoietic progenitors in cyclic neutropenia: effect of granulocyte colony-stimulating factor in vivo. **Blood**, v. 75, n.10, p. 1951-1959, 1990.

MILONE, G. et al. G-CSF alone vs cyclophosphamide plus G-CSF in PBPC mobilization of patients with lymphoma: results depend on degree of previous pretreatment. **Bone Marrow Transplantation**, v. 31, n. 9, p. 747-754, 2003.

MISCHKE, R. et al. Effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) on leukocyte count and survival rate of dogs with parvoviral enteritis. **Research in Veterinary Science**, v.70, n.3, p.221-225, 2001.

MOLINEUX, G. et al. Transplantation potential of peripheral blood stem cells induced by granulocyte colony-stimulating factor. **Blood**, v. 76, n. 10, p. 2153-2158, nov. 1990.

NADEMANEE, A. et al. High-dose therapy followed by autologous peripheral-blood stem-cell transplantation for patients with Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma using

unprimed and granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral-blood stem cells. **Journal of Clinical Oncology**, v. 12, n. 10, p. 2176-2186, 1994.

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.

NAKAGE, A.P.M.; SANTANA, A.E. Células-tronco hematopoéticas em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, 2006.

NASH, R. A. et al. Thrombocytopenia in dogs induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: increased destruction of circulating platelets. **Blood**, v. 86, n. 5, p. 1765-1775, 1995.

NAKAGE, A.P.M. et al. Quantificação de células CD34⁺ do sangue do cordão umbilical de cães. **Ciência Rural**, v. 39, p. 434-441, 2009.

NOTHDURFT, W. et al. Acceleration of hemopoetic recovery in dogs after extended-field partial-body irradiation by treatment with colony-stimulating factors: rhG-CSF and rhGM-CSF. **International Journal Of Radiation Oncology, Biology, Physics**, v. 37, n. 5, p. 1145-1154, 1997.

OBRADOVICH, J.E. et al. Evaluation of recombinant canine granulocyte colony-stimulating factor as an inducer of granulopoiesis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.5, n.2, p.75-79, 1991.

OGUMA, K. et al. *In vitro* effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on canine neutrophil apoptosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 108, n. 3, p. 307-314, 2005.

OKAMOTO, R. et al. Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. **Nature Medicine**, v. 8, n. 9, p. 1011-1017, 2002.

ORFAO A. et al. Flow cytometry: Its applications in Hematology. **Haematologica**, v. 80, p. 69-81, 1995.

ORLIC, D. et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. **Nature**, v. 5, n. 4, p. 701–705, 2001.

ÖZKURT, Z. N. et al. Factors Affecting Stem Cell Mobilization for Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Journal of Clinical Apheresis**, v. 25, n. 5, p. 280-286, 2010.

PARK, C. et al. Therapeutic Trial of Granulocyte-Colony Stimulating Factor for Dilated Cardiomyopathy in Three Dogs. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 69, n. 9, p. 951-955, 2007.

PATON, E. J. A.; COUTINHO, M. A.; VOLTARELLI, J. C. Diagnóstico e Tratamento de Complicações Agudas do Transplante de Células Progenitoras Hematopoiéticas. **Simpósio: Transplante de Medula Óssea**, v. 33, cap. 4, p. 264-277, 2000.

PAVONE, V. et al. Mobilization of peripheral blood stem cells with high-dose cyclophosphamide or the DHAP regimen plus G-CSF in non-Hodgkin's lymphoma. **Bone Marrow Transplantation**, v. 29, n. 4, p. 285-290, 2002.

PHILLIPS, K. et al. FIV-infected cats respond to short-term rHuG-CSF treatment which results in anti-G-CSF neutralizing antibody production that inactivates drug activity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.108, n.3, p.357-371, 2005.

PRATT, H. L. et al. Effects of recombinant granulocyte colony-stimulating factor treatment on hematopoietic cycles and cellular defects associated with canine cyclic hematopoiesis. **Experimental Hematology**, v. 18, n. 11, p. 1199-1203, 1990.

QUE-LIN, M. et al. Effects of granulocyte colony-stimulating factor on repair of injured canine arteries. **Chinese Medical Journal**, v. 121, n. 2, p. 143-146, 2008.

QUESENBERRY, P. J.; COLVIN G. A. In: **Williams Hematology**. BEUTLER, E. et al. 6th ed. McGraw-Hill Companies: North America, p. 153-174, 2001.

QUEZADO, Z. et al. Acute G-CSF therapy is not protective during lethal *E. coli* sepsis. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.281, n.4, p.1177-1185, 2001.

REIFFERS, J. et al. Successful autologous transplantation with peripheral blood hemopoietic cells in a patient with acute leukemia. **Experimental Hematology**, v. 14, n. 4, p. 312-315, 1986.

REVEL, T. et al. Effects of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor, alone and in combination, on mobilization of peripheral blood cells that engraft lethally irradiated dogs. **Blood**, v. 83, n. 12, p. 3795-3799, jun. 1994.

REWERTS, J. M.; HENRY, C. J. Veterinay uses of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. Part II. **Infectious Diseases Compendium on Continuing Education for the Practice Veterinarian**, v. 20, n. 7, p. 823-827, 1998.

RIA, R. et al. Comparison between filgrastim and lenograstim plus chemotherapy for mobilization of PBPCs. **Bone Morrow Transplantation**, v. 45, p. 277-281, 2010.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. Sao Paulo: Manole, 2003. 481p.

RUSSELL, N. et al. A phase 2 pilot study of pegfilgrastim and filgrastim for mobilizing peripheral blood progenitor cells in patients with non-Hodgkin's lymphoma receiving chemotherapy. **Haematologica**, v. 93, n. 3, p. 405-412, 2008.

SATO T. et al. Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 94, n. 8, p. 2.548-2.554, 1999.

SANDMAIER, B.M. et al. Allogeneic Transplants of Canine Peripheral Blood Stem Cells Mobilized by Recombinant Canine Hematopoietic Growth Factors. **Blood**, v. 87, n. 8, p. 3508-3513, 1996.

SCHWAB, G.; HECHT, T. Recombinant methionyl granulocyte-stimulating factor (filgrastim): a new dimension in immunotherapy. **Annals of Hematology**, v. 69, n. 1, p. 1-9, 1994.

SHERIDAM, W.P. et al. Effects of peripheral-blood progenitor cells mobilized by filgrastim (G-CSF) on platelet recovery after high-dose chemotherapy. **The Lancet**, v. 339, p. 640-644, 1992.

SIENA S. et al. Therapeutic relevance of CD34 cell dose in blood cell transplantation for cancer therapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 18, n. 6, p. 1360-1377, 2000.

SILVA, R. et al. Avaliação dos pacientes submetidos à quantificação de células CD34⁺ por citometria de fluxo. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 35, n. 4, p. 195-199, 2003.

SILVA, A. L. M. et al. Avaliação plaquetária de cães com linfoma submetidos à quimioterapia, transplante de medula óssea e fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF). **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, n. 3, p. 307-317, 2010.

SIX, I. et al. Beneficial effect of pharmacological mobilization of bone marrow in experimental cerebral ischemia. **European Journal Pharmacology**, v. 458, n. 3, p. 327-328, 2003

SOCINSKI, M. A. et al. GMC-SF expands the circulating hematopoietic progenitor cell compartment in humans. **Lancet**, v. 331, n. 8596, p. 1194-1198

SOLÁ, C. et al. Bone marrow transplantation: Prognostic factors of peripheral blood stem cell mobilization with cyclophosphamide and filgrastim (r-metHuG-CSF): The CD34⁺ cell dose positively affects the time to hematopoietic recovery and supportive requirements after high-dose chemotherapy. **Hematology**, v. 4, n. 3, p. 195-209, 1999.

STORB, R. et al. Demonstration of hemopoietic stem cells in the peripheral blood of baboons by cross circulation. **Blood**, v. 50, n. 3, p. 537-542, 1977.

STORB, R.; DEEG, H. J. Failure of allogeneic canine marrow grafts after total-body irradiation. allogeneic "resistance" versus transfusion-induced sensitization. **Transplantation**, v. 42, n. 6, p. 571-580, 1986.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. Leukocytes. In: _____. **Fundamentals of veterinary clinical pathology**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2 ed. Cap.2, p.45-90, 2011.

STRONCEK, D. F. et al. Treatment of normal individuals with granulocyte-colony stimulating factor: donor experiences and the effects on peripheral blood CD34⁺ cell counts and on the collection of peripheral blood stem cells. **Transfusion**, v. 36, n. 7, p. 601-610, 1996.

STRONCEK, D.F. et al. Blood counts in healthy donors 1 year after the collection of granulocyte-colony-stimulating factor-mobilized progenitor cells and the results of a second mobilization and collection. **Transfusion**, v. 37, n. 3, p. 304-308, 1997.

SUTER, S. E. Collection of Peripheral Blood CD34⁺ Progenitor Cells from Healthy Dogs and Dogs Diagnosed with Lymphoproliferative Diseases Using a Baxter-Fenwal CS-3000 Plus

Blood Cell Separator. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, n. 6, p. 1406-1413, 2011.

SUTHERLAND, D. R. et al. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. **Journal of Hematotherapy**, v. 5, n. 3, p. 213-226, 1996.

SUTTORP, M. et al. Prevention of oestradiol-associated toxicosis in a Dalmatian by early intervention with granulocyte colony-stimulating factor. **The Veterinary Record**, v. 151, n. 8, p. 244-245, 2002

TAKAMATSU, Y. et al. Thrombocytopenia in association with splenomegaly during granulocyte–colony-stimulating factor treatment in mice is not caused by hypersplenism and is resolved spontaneously. **Transfusion**, v. 47, n. 1, p. 41-49, 2007.

THEISE, N. et al. Radiation pneumonitis in mice: a severe injury model for pneumocyte engraftment from bone marrow. **Experimental Hematology**, v. 30, n. 11, p. 1333-1338, 2002.

VIEIRA, R. B. et al. Efeito do fator estimulante de colônia de granulócitos recombinante humano rh(G-CSF) na contagem neutrofílica de cães saudáveis. In: Congresso Medvep de Especialidades Veterinárias, 2010, Curitiba. **Resumos...** Curitiba: Medvep, 2010. CD-ROM.

VIGORITO, A.C. et al. A randomised, prospective comparison of allogeneic bone marrow and peripheral blood progenitor cell transplantation in the treatment of haematological malignancies. **Bone Marrow Transplantation**, v. 19, p. 647-653, 1998.

VIGORITO A.C.; SOUZA, C.A. Transplante de células-tronco hematopoéticas e a regeneração da hematopoese. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n.4, p. 280-284, 2009.

WEAVER C.H. et al. Engraftment and outcomes of patients receiving myeloablative therapy followed by autologous peripheral blood stem cells with a low CD34+ cell content. **Bone Marrow Transplantation**, v. 19, n.11, 1998.

YANAY, O. et al. Treatment of canine cyclic neutropenia by lentivirus-mediated G-CSF delivery. **Blood**, v. 102, n. 6, p. 2046-2052, 2003.

YANNAKI, E.; PAPAYANNOPOULOU, T. H. Stem cell have an identity crisis. **Haema**, v. 4, n. 3, p. 158-166, 2001.

YAGI, T. et al. G-CSF Augments Small Vessel and Cell Density in Canine Myocardial Infarciton. **Keio Journal of Medicine**, v. 57, n. 3, p. 139-149, 2008.

YAMAMOTO, A. Recombinant canine granulocyte colony-stimulating factor accelerates recovery from cyclophosphamide-induced neutropenia in dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 142, n. 15, p. 271-275, 2011.

YU, Z. Y. et al. RhG-CSF improves radiation-induced myelosuppression and survival in the canine exposed to fission neutron irradiation. **Journal of Radiation Research**, v. 52, n. 4, p. 472-480, 2011.

ZAUCHA, F. M. et al. G-CSF–mobilized peripheral blood mononuclear cells added to marrow facilitates engraftment in nonmyeloablated canine recipients: CD3 cells are required. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 7, n. 11, p. 613-619, 2001.