

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

**EXPRESSÃO DE CD45+ NA MEDULA ÓSSEA E  
SANGUE PERIFÉRICO DE CÃES COM LINFOMA  
TRATADOS COM ALTA DOSE DE CICLOFOSFAMIDA  
SUPPORTADA POR TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE  
MEDULA ÓSSEA**

**Mariana Rodrigues Miotto**

Médica veterinária

JABOTICABAL - SÃO PAULO – BRASIL

2009

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

**EXPRESSÃO DE CD45+ NA MEDULA ÓSSEA E  
SANGUE PERIFÉRICO DE CÃES COM LINFOMA  
TRATADOS COM ALTA DOSE DE CICLOFOSFAMIDA  
SUPORTADA POR TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE  
MEDULA ÓSSEA**

**Mariana Rodrigues Miotto**

**Orientador: Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana**

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

JABOTICABAL - SÃO PAULO

Junho – 2009

M669e Miotto, Mariana Rodrigues  
"Expressão de CD45+ na medula óssea e sangue periférico de  
cães com linfoma tratados com alta dose de ciclofosfamida  
suportada por transplante autólogo de medula óssea" / Mariana  
Rodrigues Miotto. - - Jaboticabal, 2009

xvii, 69 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009  
Orientador: Aureo Evangelista Santana  
Banca examinadora: Alessandra Kataoka, Maria Rita Pacheco  
Bibliografia

1. Cães. 2. Linfoma. 3. Transplante autólogo de medula óssea  
I. Título. II. Jaboticabal- Faculdade de Ciências Agrárias e  
Veterinárias.

CDU 619:636.7:616-006.44

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

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**MARIANA RODRIGUES MIOTTO** - nasceu em Jaboticabal, no dia 12 de março de 1982. Filha de José Aparecido Miotto e Maria Trindade Gavioli Rodrigues Miotto. Graduiu-se em Medicina Veterinária no ano de 2005, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP de Jaboticabal, como sétima colocada da turma. Durante a graduação participou de diversos cursos e estagiou em diferentes áreas, inclusive no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP Jaboticabal, onde participou ativamente da rotina e desenvolveu seu Trabalho de Graduação. Ingressou no curso de mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (Clínica Médica) da FCAV-UNESP em março de 2007.

**Ofereço e Dedico**

Às “Marias” de minha vida:

minha amada mãe, minha inspiração, meu exemplo maior onde quer que  
esteja;

minha sobrinha, meu amor mais puro e verdadeiro.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço:

Ao meu sábio Pai, minha fortaleza.

À minha irmã, companheira inseparável.....por todo o sempre.

Aos meus queridos tios Lene e Luís, verdadeiros amigos.

Ao grande Mestre, Prof. Dr. Aureo E. Santana, meu orientador, não só na ciência, mas na vida, por suas lições e caráter.

À Flávia, por sua paciência, cooperação, companheirismo e amizade, e aos demais pós-graduandos do Laboratório e do Serviço de Oncologia, que muito ajudaram.

À imprescindível ajuda de Luis Gustavo S. Monazzi na realização das análises.

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

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

À Ana Livia por ter encarado com seriedade sua iniciação científica, facilitando muito meu trabalho.

Às minhas amigas Carolina e Sabrina, que desde a graduação ocupam um lugar especial em minha vida.

Aos cães com linfoma e aos seus proprietários.

E por último, mas com indescritível importância, ao meu esposo, simplesmente por permitir que minha história de vida se confunda com a dele.

**Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-estar Animal da  
FCAV-UNESP (protocolo nº014424-07).**

**SUMÁRIO**

Página

Lista de Abreviaturas .....	viii
Lista de Tabelas .....	x
Lista de Figuras .....	xi
Lista de Apêndices .....	xiv
Resumo .....	xvi
Abstract .....	xvii
I. INTRODUÇÃO .....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA .....	2
Linfoma .....	2
Transplante de células-tronco hematopoéticas .....	8
Fator estimulador de colônia de granulócitos .....	10
Citometria de fluxo .....	12
III. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS .....	15
IV. MATERIAL E MÉTODOS .....	15
Animais .....	15
Indução da remissão .....	16
Transplante autólogo de medula óssea .....	16
Uso de fator estimulador de colônia .....	20
Obtenção das amostras .....	20
Avaliação das parcelas experimentais.....	21
Análise estatística .....	23
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
VI. CONCLUSÕES .....	40
VII. REFERÊNCIAS.....	41

**LISTA DE ABREVIATURAS**

BCC: “Brazilian Collection Clone”  
COP: ciclofosfamida, vincristina e prednisona  
CD: “Cluster of Differentiation”  
CPDA-1: Citrato-fosfato-dextrose-adenina-1  
CTH: Células-tronco hematopoéticas  
DECH: Doença do enxerto contra o hospedeiro  
DMSO: Dimetilsulfóxido  
EDTA: Ácido Etilenodiaminotetracético  
FAC: Fundação Amaral Carvalho  
FACS: “Fluorescence Activated Cell Sorter”  
FCF: Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
FAV: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias  
FSC: “Forward Scatter”  
FITC: “Fluorescein Isothiocyanate”  
G-CSF: “Granulocyte colony-stimulating factor”  
HES: “Hidroxietilstarch”  
HV GLN: Hospital Veterinário Governador Laudo Natel  
IM: Intramuscular  
IV: Intravenosa  
LPCV: Laboratório de Patologia Clínica Veterinária  
M-W: Madison-Wisconsin  
OMS: Organização Mundial de Saúde  
CAAF: Citologia Aspirativa por Agulha Fina  
PBS: “Phosphate-Buffered Saline”  
PE: “Phicoeritrina”  
RPMI: “Roswell Park Memorial Institute”  
SC: Subcutânea  
SOV: Serviço de Oncologia Veterinária  
SRD: Sem Raça Definida  
SSC: “Side Scatter”  
TCT: Transplante de células-tronco  
TCTH: Transplante de células-tronco hematopoéticas

TMO: Transplante de medula óssea

UNESP: Universidade Estadual Paulista

VO: Via oral

**LISTA DE TABELAS**

Página

Tabela 1: Preparação das amostras de sangue e medula óssea para análise citométrica.....	22
Tabela 2: Valores percentuais individuais, médias e desvios-padrão obtidos para contagem de células CD45 <sup>+</sup> na medula óssea em cães do grupo controle (n=5) em diferentes momentos do período experimental.....	31
Tabela 3: Valores individuais, médias e desvios-padrão obtidos para contagens globais de leucócitos, percentuais e absolutos de células CD45 <sup>+</sup> no sangue periférico em cães do grupo controle (n=5), em diferentes momentos do período experimental.....	33
Tabela 4: Valores percentuais individuais, médias e desvios-padrão obtidos para contagem de células CD45 <sup>+</sup> na medula óssea em cães tratados (n=7) em diferentes momentos do período experimental.....	34
Tabela 5: Valores individuais, médias e desvios-padrão obtidos para contagens globais de leucócitos, percentuais e absolutos de células CD45 <sup>+</sup> no sangue periférico em cães tratados (n=7), em diferentes momentos do período experimental.....	36
Tabela 6: Resultados da análise de variância.....	38
Tabela 7: Médias das percentagens de células CD45 <sup>+</sup> na medula óssea de cães dos grupos tratado e controle.....	39
Tabela 8: Médias dos valores absolutos de células CD45 <sup>+</sup> no sangue de cães dos grupos tratado e controle.....	40

## LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1:	Procedimento de coleta de medula óssea na crista ilíaca de um cão, com vistas ao transplante autólogo de medula óssea.....	18
Figura 2:	Filtragem da medula óssea coletada.....	19
Figura 3:	Infusão da suspensão de células da medula óssea (D0).....	20
Figura 4:	Distribuição das populações leucocitárias observadas na citometria de fluxo, de acordo com o tamanho das células, com seleção (P1) sobre a população de células CD45+ na medula óssea de cão.....	22
Figura 5:	Comportamento dos valores absolutos individuais e médias de leucócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) obtidos para os animais do grupo controle (n=5) em diferentes momentos do protocolo experimental .....	24
Figura 6:	Comportamento dos valores absolutos individuais e médias de neutrófilos segmentados obtidos para os animais do grupo controle (n=5) em diferentes momentos do protocolo experimental.....	24
Figura 7:	Comportamento dos valores absolutos individuais e médias de neutrófilos bastonetes obtidos para os animais do grupo controle (n=5) em diferentes momentos do protocolo experimental.....	25
Figura 8:	Comportamento dos valores absolutos individuais e médias de linfócitos obtidos para os animais do grupo controle (n=5) em diferentes momentos do protocolo experimental.....	25

Figura 9:	Comportamento dos valores absolutos individuais e médias de leucócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) obtidos para os animais do grupo tratado (n=7) em diferentes momentos do protocolo experimental.....	26
Figura 10:	Comportamento dos valores absolutos individuais e médias de neutrófilos segmentados obtidos para os animais do grupo tratado (n=7) em diferentes momentos do protocolo experimental.....	27
Figura 11:	Comportamento dos valores absolutos individuais e médias de neutrófilos bastonetes obtidos para os animais do grupo tratado (n=7) em diferentes momentos do protocolo experimental.....	27
Figura 12:	Comportamento dos valores absolutos individuais e médias de linfócitos obtidos para os animais do grupo tratado (n=7) em diferentes momentos do protocolo experimental.....	28
Figura 13:	Comportamento dos valores percentuais individuais e das médias de células CD45 <sup>+</sup> na medula óssea em cães do grupo controle (n=5) em diferentes momentos do período experimental.....	32
Figura 14:	Comportamento dos valores absolutos individuais e das médias de células CD45 <sup>+</sup> no sangue periférico em cães do grupo controle (n=5) em diferentes momentos do período experimental.....	33

Figura 15: Comportamento dos valores percentuais individuais e das médias de células CD45 <sup>+</sup> na medula óssea em cães do grupo tratado (n=7) em diferentes momentos do período experimental.....	35
Figura 16: Comportamento dos valores absolutos individuais e das médias de células CD45 <sup>+</sup> no sangue periférico em cães do grupo tratado (n=7) em diferentes momentos do período experimental.....	37
Figura 17: Médias das percentagens de células CD45 <sup>+</sup> na medula óssea dos cães dos grupos controle e tratado.....	39
Figura 18: Médias dos valores absolutos de células CD45 <sup>+</sup> no sangue dos cães dos grupos controle e tratado.....	40

**LISTA DE APÊNDICES**

	Página
Apêndice A: Valores de referência para hemograma de cães.....	53
Apêndice B: Valores de referência para contagens totais de leucócitos e fórmulas leucocitárias relativa e absoluta.....	53
Apêndice C: Protocolo Quimioterápico de Madison-Wisconsin (M-W).....	54
Apêndice D: Informações referentes ao Animal 1 do grupo tratado, no momento do diagnóstico do linfoma e ao longo do protocolo quimioterápico de M-W, antes do TMO.....	55
Apêndice E: Informações referentes ao Animal 2 do grupo tratado, no momento do diagnóstico do linfoma e ao longo do protocolo quimioterápico de M-W, antes do TMO.....	56
Apêndice F: Informações referentes ao Animal 3 do grupo tratado, no momento do diagnóstico do linfoma e ao longo do protocolo quimioterápico de M-W, antes do TMO.....	58
Apêndice G: Informações referentes ao Animal 4 do grupo tratado, no momento do diagnóstico do linfoma e ao longo do protocolo quimioterápico de M-W, antes do TMO.....	60
Apêndice H: Informações referentes ao Animal 5 do grupo tratado, no momento do diagnóstico do linfoma e ao longo do protocolo quimioterápico de M-W, antes do TMO.....	62
Apêndice I: Informações referentes ao Animal 6 do grupo tratado, no momento do diagnóstico do linfoma e ao longo do protocolo quimioterápico de M-W, antes do TMO.....	63

Apêndice J: Informações referentes ao Animal 7 do grupo tratado, no momento do diagnóstico do linfoma e ao longo do protocolo quimioterápico de M-W, antes do TMO.....	64
Apêndice K: Valores individuais obtidos para contagens globais e diferenciais de leucócitos no sangue periférico em cães tratados (n=7), em diferentes momentos do período experimental.....	65
Apêndice L: Valores individuais obtidos para contagens globais e diferenciais de leucócitos no sangue periférico em cães do grupo controle (n=5), em diferentes momentos do período experimental.....	68

## **EXPRESSÃO DE CD45+ NA MEDULA ÓSSEA E SANGUE PERIFÉRICO DE CÃES COM LINFOMA TRATADOS COM ALTA DOSE DE CICLOFOSFAMIDA SUPOSTADA POR TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE MEDULA ÓSSEA**

**RESUMO:** O presente estudo teve como objetivos promover a avaliação seqüencial e temporal do quadro leucocitário de cães portadores de linfoma, em remissão, submetidos à alta dose de ciclofosfamida seguida do transplante autólogo de medula óssea, bem como quantificar células CD45+ na medula óssea e sangue periférico dos referidos cães. O transplante consistiu de colheita de MO, preparo e congelamento da bolsa que continha células medulares em suspensão, condicionamento do paciente com 500mg/m<sup>2</sup> de ciclofosfamida, infusão das células hematopoéticas e aplicação de fator estimulador de colônia. Para avaliar a recuperação hematopoética pós-transplante, realizaram-se leucograma e análise citométrica do sangue e medula óssea, por 28 dias após o transplante. O nadir médio dos neutrófilos segmentados foi 513 células/μL, e ocorreu 3 a 7 dias pós-TMO. A duração média da neutropenia foi de 3,2 dias. As mais elevadas contagens de leucócitos, para animais do grupo tratado que receberam G-CSF, foram observadas no último dia de sua aplicação, exceto para um animal. Nenhum animal apresentou febre ou sepse após a alta dose de ciclofosfamida. Desta maneira, pode-se comprovar o fato de que o uso do filgrastim leva a reduções significativas na incidência, severidade e duração da neutropenia. O aumento na quantidade de células CD45+ na medula óssea de cães tratados deveu-se aos efeitos combinados do autotransplante de células hematopoéticas e à ação do G-CSF.

**Palavras-chave:** cão, CD45+, linfoma, transplante autólogo de medula óssea

**CD45+ EXPRESSION ON BONE MARROW AND BLOOD OF DOGS WITH  
LYMPHOMA TREATED WITH HIGH DOSE OF CYCLOPHOSPHAMIDE  
SUPPORTED BY AUTOLOGOUS BONE MARROW TRANSPLANTATION**

**ABSTRACT:** The present study has the goal to promote sequential and timing evaluation of leucocytes of dogs bearers of lymphoma, in remission, submitted to the high dose of cyclophosphamide followed by the autologous bone marrow transplant, as well as to quantify CD45+ cells in the bone marrow and blood of the above-mentioned dogs. The transplant consisted of MO collect, preparation and freezing of the bag that contained medullar cells, conditioning of the patient with 500mg/m<sup>2</sup> of cyclophosphamide, infusion of the hematopoietics cells and application of colony-stimulating factor. In order to evaluate post-transplant hematopoietic recovery, leucogram and cytometric analysis of the blood and bone marrow were carried out for 28 days after the transplantation. The medium nadir of the segmented neutrophils was 513 cells/ $\mu$ L, and it occurred / took place 3 to 7 days after TMO. The medium duration of the neutropenia was of 3,2 days. The highest counts of leucocytes, to animals of the treated group that received G-CSF, could be observed on the last day of its application, except for one animal. None of the animals presented either fever or sepsis after the high dose of cyclophosphamide. Thus, it can be verified that the use of filgrastim leads to significant reductions on the incidence, severeness and duration of the neutropenia. The increase of CD45+ cells in the bone marrow of the treated dogs was due to combined effects of the autotransplant of hematopoietics cells and to the G-CSF action.

**Keywords:** dog, CD45+, lymphoma, autologous bone marrow transplantation

## I. INTRODUÇÃO

O linfoma é a neoplasia hematopoética que mais comumente afeta os cães. Seu diagnóstico está fundamentado nos achados clínicos, clínico-patológicos, citopatológicos, histopatológicos e imunofenotípicos.

A citometria de fluxo é um recurso emergente na Medicina Veterinária, que permite análise rápida, objetiva e qualiquantitativa de células em suspensão, incluindo a identificação de precursores hematopoéticos, contagens celulares diferenciais da medula óssea, contagem diferencial de leucócitos e diagnóstico de neoplasias hematopoéticas. A identificação e quantificação de células estão baseadas em seu tamanho ("Forward scatter" – FSC), granularidade ("Side Scatter" – SSC) e intensidade de fluorescência. Além disso, a referida técnica possibilita a separação de distintas populações de células, cujos antígenos de superfície são marcados com anticorpos específicos. O CD45 é o antígeno comum aos leucócitos e é expresso em intensidades diferentes na superfície de todos eles.

O tratamento do linfoma consiste na utilização de protocolos quimioterápicos convencionais, como o de Madison-Wisconsin. Recentemente, buscando aumentar ainda mais a sobrevivência de animais portadores de linfoma, tem-se utilizado altas doses de ciclofosfamida, cuja toxicidade, principalmente hematológica, é mais intensa que aquela dos tratamentos convencionais. Tentando minimizar tais efeitos excessivamente mielotóxicos, tem-se procurado utilizar o transplante autólogo de medula óssea, com o fito de promover a recomposição da celularidade do tecido sanguíneo. Portanto, com o objetivo de contribuir para um melhor entendimento da hematotoxicidade decorrente da administração de altas doses de ciclofosfamida e, ademais, tentando verticalizar o conhecimento com relação ao papel do transplante autólogo de medula óssea na recomposição do tecido hematopoético, é que se idealizou o protocolo experimental em questão, no qual foram quantificadas células CD45+ no sangue e na medula óssea, bem como avaliadas as características leucométricas dentro de um esquema seqüencial e ao longo do tempo, em sete cães portadores de linfoma em remissão, atendidos junto ao Serviço de Oncologia Veterinária (SOV)

do Hospital-escola da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal – SP.

## II. REVISÃO DE LITERATURA

### LINFOMA

Linfomas (linfossarcomas ou linfomas malignos) são neoplasias malignas caracterizadas pela proliferação de células originárias do tecido linfóide como linfócitos, histiócitos e seus precursores e derivados (CONTRAN et al., 1994). Afetam primariamente os linfonodos ou outros órgãos viscerais sólidos como fígado e baço (VAIL & OGILVIE, 1998). Em alguns casos, pode ocorrer expansão do componente linfomatoso com conseqüente envolvimento do sangue periférico (RUBIN, 1994).

É uma das neoplasias mais comumente diagnosticadas no cão (OGILVIE & MOORE, 1995; MACEWEN & YOUNG, 1996; VAIL & OGILVIE, 1998), sendo superada apenas por tumores mamários e cutâneos (DE MOURA et al., 2003). Representa 7 a 9% das neoplasias malignas na espécie canina (RALLIS et al., 1992; MORRISON, 1998) e aproximadamente 90% das neoplasias do sistema hemolinfático na referida espécie (ROSENTHAL & MACEWEN, 1990; OGILVIE & MOORE, 1995).

Os linfomas acometem principalmente animais de meia-idade ou idosos, que perfazem 80% dos casos (GREENLEE et al., 1990; MOULTON & HARVEY, 1990), podendo ocorrer em animais muito jovens (MOULTON & HARVEY, 1990; VALLI, 1993; SEQUEIRA et al., 1999).

Quanto ao sexo, alguns autores relatam predominância em machos, sendo estes acometidos por 68% dos casos de linfoma (RALLIS et al., 1992; DOBSON & GORMAN, 1994; SEQUEIRA et al., 1999). VAN PELT & CONNOR (1968) afirmam que a maior ocorrência dá-se em fêmeas. MOULTON & HARVEY (1990), VAIL & OGILVIE (1998) e FRÁGUAS (2008) afirmam não haver predileção sexual.

De acordo com SEQUEIRA et al. (1999) os animais portadores de linfoma são predominantemente aqueles das raças de grande ou médio porte, como Boxer, Basset hound, Rottweiler, Cocker Spaniel, São Bernardo e Golden

Retriever. Alguns autores afirmam que os animais da raça Boxer representam a maior parcela de cães acometidos por linfoma, sugerindo uma predisposição genética desta raça (FORNEUL-FLEURY et al., 1997; SÖZMEN et al., 2005). Porém, a predisposição racial neste tipo de neoplasia ainda é controversa (MOULTON & HARVEY, 1990).

A etiologia do linfoma canino é multifatorial. Fatores ambientais como exposição crônica a substâncias químicas tais como o herbicida 2,4-ácido fenoxiacético são referidos como predisponentes ao desenvolvimento de linfoma em cães. Por outro lado, em cães de raças puras, a predisposição genética para este tipo de neoplasia pode existir (GREENLE et al., 1990; VALLI, 1993; JONES et al., 1997, MORRISON, 2005). Em outras espécies animais tais como felinos, bovinos, roedores e aves, assim como em alguns primatas, a etiologia viral acha-se bem estabelecida (GREENLE et al., 1990; VALLI, 1993; JONES et al., 1997).

As classificações histológicas e citológicas do linfoma canino baseiam-se no princípio de que as células linfomatosas representam o equivalente maligno dos diferentes tipos de linfócitos normais (FOURNEL-FLEURY et al., 1994). Em Medicina Veterinária, a classificação histológica das neoplasias linfóides esteve por muito tempo baseada em classificações humanas. Em 1974, a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou o primeiro livro que classificou os tumores hematopoéticos e linfóides dos animais domésticos. O texto foi atualizado em 2002, e incluiu a realização da imunofenotipagem dos linfócitos para classificação dos linfomas caninos (CORREIA, 2006). As principais particularidades do linfoma canino com relação ao humano incluem a raridade de linfomas foliculares, a grande quantidade de linfomas centroblasticos e a elevada proporção de linfomas de alto grau no cão (FOURNEL-FLEURY et al., 1994).

A classificação do linfoma é estabelecida de acordo com a sua localização anatômica, característica histológica ou citológica e imunofenótipo. Os linfomas caninos apresentam características semelhantes aos linfomas não-Hodgkin humanos, podendo assim ser classificados anatomicamente em multicêntricos (80 a 85%), digestivos (7%), cutâneos (6%), mediastinais (3%), e extranodais (raros). Os sinais clínicos do linfoma variam de acordo com a sua apresentação anatômica e histológica. (NELSON & COUTO, 2006). Cães com linfoma

multicêntrico têm idade média avançada e a maioria apresenta linfadenopatia generalizada e, 10 a 20%, apresentam sinais clínicos inespecíficos, tais como, inapetência, anorexia, perda de peso e letargia. Os sinais clínicos de cães com linfoma digestivo incluem acentuada perda de peso ou massa abdominal palpável, alças intestinais espessadas e irregularidades na mucosa retal. No linfoma mediastinal, os achados clínicos são traduzidos por dispnéia, taquipnéia e sons cardíacos abafados secundários à efusão pleural. Os achados ao exame físico nos casos de linfoma extranodal são uveíte anterior, hemorragia de retina e hifema (linfoma ocular); placas elevadas (linfoma cutâneo); demência, convulsões e paralisia (linfoma neural); insuficiência renal (linfoma renal) e arritmias (linfoma cardíaco) (COUTO & HAMMER, 1997).

Quanto à classificação citomorfológica os linfomas podem ser classificados como de alto, médio ou de baixo grau. De acordo com o esquema de classificação histológica (Kiel ou “National Cancer Institute”), 80% dos linfomas caninos são similares aos linfomas não-Hodgkin humanos de médio e alto grau. E, quanto à imunofenotipagem, podem ser classificados em linfomas T, linfomas B e linfomas não T/ não B, bem como mistos (B/ T) (MOULTON & HARVEY, 1990; TESKE et al., 1994; JONES et al., 1997; DE MOURA et al., 1999; SEQUEIRA et al., 1999; VAIL, 2003). Aproximadamente 70 a 80% dos linfomas caninos têm derivação imunofenotípica de célula B (VAIL, 2003).

Ademais, o linfoma em cães pode ser classificado em diferentes estádios clínicos durante sua evolução, que correspondem à extensão da doença a outros órgãos, manifestações de síndromes paraneoplásicas e sinais clínicos (DAY, 1995; DE MOURA & SEQUEIRA, 1999). Tal estadiamento permite estabelecer diagnóstico mais preciso e precoce do linfoma, bem como prognóstico clínico possibilitando tratamento mais adequado e uma melhora na taxa de sobrevivência de pacientes linfomatosos (MORENO & BRACARENSE, 2007). Portanto, de acordo com a OMS, no estágio I há envolvimento limitado a um único linfonodo ou tecido linfóide de um único órgão (exceto medula óssea), no estágio II há envolvimento de vários linfonodos regionais com ou sem envolvimento das amígdalas, no estágio III há envolvimento generalizado dos linfonodos, no estágio IV há envolvimento de fígado e/ ou baço, com ou sem envolvimento generalizado dos

linfonodos e no estadio V há envolvimento do sangue, medula óssea e/ ou outros órgãos (OWEN, 1980). A maioria dos animais apresenta-se no estadio III ou IV da doença quando da avaliação clínica (DAY, 1995; DE MOURA et al. 1999). Os sub-estádios são “a” (sem sinais clínicos da doença) e “b” (com sinais clínicos de linfoma) (VAIL, 2003).

Embora o diagnóstico do linfoma esteja fundamentado no exame físico e nas avaliações hematológicas, bioquímico-séricas e exames radiológicos e ultrassonográficos do paciente, o seu diagnóstico definitivo só pode ser firmado pela avaliação citológica ou histológica do órgão afetado (FAN & KITCHELL, 2002; NELSON & COUTO, 2006). Na Medicina Veterinária, há tempos a citologia tem sido aceita como técnica confiável para o diagnóstico de linfoma canino (CARTER & VALLI, 1988; FRÁGUAS, 2008). Entretanto, embora o diagnóstico citológico seja de fácil obtenção, este não permite diferenciar os vários tipos de linfomas (FAN & KITCHELL, 2002; COUTO, 2006) e raramente fornece uma conclusão decisiva (OGILVIE & MOORE, 1995), recomendando-se, quase sempre, análise histológica que pode ser conclusiva (OGILVIE & MOORE, 1995; VAIL & OGILVIE, 1998). Estudos recentes revelam a importância do exame citológico no diagnóstico de linfoma, principalmente quando aliado à imunofenotipagem pela citometria de fluxo (SÖZMEN et al., 2005). O imunofenótipo de neoplasia linfóide em cães pode ser obtido também por imunocoloração de cortes de tecidos ou de preparações citológicas obtidas por aspiração com agulha fina (RASKIN, 2003).

Os achados dos exames complementares em cães linfomatosos estão diretamente relacionados com a localização anatômica do tumor e a gravidade dos sinais sistêmicos. Exames como o hemograma, devem ser realizados para uma melhor definição da fase e do estado geral do animal. Neste caso, os achados comuns são leucocitose, anemia e trombocitopenia (DOBSON & GORMAN, 1993; FURIE, 1993; LATIMER, 1997), esta última em decorrência da infiltração da medula óssea por células neoplásicas (RALLIS et al., 1992).

Embora a contagem global de leucócitos possa estar normal, diminuída ou aumentada, quase sempre se detecta linfocitose (LEIFER & MATUS, 1986; RASKIN & KRENBEL, 1989). A observação de esfregaços de medula óssea é de

grande importância para o estadiamento do linfoma e tem indicação sempre que há anemia e linfocitose (MADEWEKLL & FELDMAN, 1980; MACEWEN & YOUNG, 1996).

O prognóstico clínico para cães com linfoma está relacionado à imunofenótipo e sub-estadio estabelecido pela OMS. Os tumores imunorreativos CD3 (derivados de células T) têm remissão mais curta e os animais com sinais clínicos de linfoma (sub-estadio “b”) têm prognóstico reservado (VAIL, 2000).

Na ausência de tratamento, o linfoma leva muitos cães a óbito em quatro a seis semanas (MACEWEN & YOUNG, 1996). No entanto, é a neoplasia que melhor responde à quimioterapia (ROSENTHAL & MACEWEN, 1990; OGILVIE & MOORE, 1995), e aquela que, adequadamente tratada e monitorada, proporciona consideráveis avanços na duração e qualidade de vida do paciente (OGILVIE & MOORE, 1995).

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

Desde sua descrição na literatura, há 20 anos, o COP (combinação de ciclofosfamida, sulfato de vincristina e prednisona) tem sido a base para muitos protocolos quimioterápicos, no tratamento de linfoma canino, sendo considerado como padrão (MYERS et al., 1997). Porém, apresenta vários efeitos adversos tais como infertilidade, alopecia e pigmentação da pele (FRAZIER & HAHN, 1995), além de mielossupressão e distúrbios gastrintestinais (KOCHEVAR & MEALEY, 1997; KITCHELL & DHALIWAL, 2000).

Outro protocolo que se tornou popular no tratamento do linfoma canino é o de Madison-Wisconsin (M-W) - uma combinação dos fármacos L-asparaginase, vincristina, prednisona, ciclofosfamida e doxorubicina. Há relatos de que o referido protocolo é capaz de promover a mais longa remissão e tempo de sobrevivência para cães com linfoma (MORRISON, 2005), sendo um dos protocolos mais empregados no tratamento de linfoma em cães (CHUN et al., 2000; MORRISON, 2005).

A vincristina, um alcalóide vegetal derivado da vinca, atua interrompendo a metáfase, ligando-se às proteínas dos microtúbulos necessárias à formação dos

fusos mitóticos e mitose celular (KOCHEVAR & MEALEY, 1997; RODASKI & DE NARDI, 2008). Este fármaco pode provocar, como efeitos colaterais hematológicos, a mielossupressão, caracterizada por discreta leucopenia, às vezes acompanhada de anemia e trombocitopenia. Esta toxicidade pode ser maior quando associada à L-asparaginase, uma enzima obtida de organismos como a *Escherichia coli* e a *Erwinia carotovora* capaz de destruir as reservas exógenas do aminoácido asparagina, vital ao processo de síntese protéica das células neoplásicas, que são incapazes de produzir a asparagina endógena. Esta enzima raramente provoca depressão medular, mas inibe a função dos linfócitos T e B, além de promover hepatotoxicidade com aumento nas atividades séricas das enzimas alanina-aminotransferase e aspartato-aminotransferase, e das concentrações de bilirrubina, como também diminuição da albumina sérica (RODASKI & DE NARDI, 2008).

A prednisona, um corticosteróide utilizado nas primeiras quatro semanas do protocolo de M-W, induz os linfócitos normais à apoptose, exercendo efeitos citolíticos em neoplasias linfóides (KOCHEVAR & MEALEY, 1997; LANORE & DELPRAT, 2004; FAN & LORIMIER, 2005). É um hormônio que atua em um receptor linfocitário específico, causando cisão do DNA, prevenindo a divisão celular (RODASKI & DE NARDI, 2008). Como alterações hematológicas clássicas secundárias à utilização dos esteróides incluem-se neutrofilia, linfopenia, eosinopenia e monocitose (DILLON et al., 1980; BARGER & GRINDEM, 2000; STOCKHAM et al., 2003). O tratamento prolongado pode causar aumento das atividades séricas das enzimas hepáticas alanina aminotransferase e fosfatase alcalina (DILLON et al., 1980).

A ciclofosfamida é uma mostarda nitrogenada classificada como agente alquilante que atua inibindo a síntese do DNA e, conseqüentemente, o ciclo celular, de forma não fase-específica. Um de seus efeitos tóxicos é a mielossupressão, principalmente com neutropenia, trombocitopenia e, com menor freqüência, anemia não regenerativa nos casos de pacientes submetidos a terapia prolongada (BARGER & GRINDEM, 2000; RODASKI & DE NARDI, 2008).

A doxorubicina, que integra o referido protocolo, é um antibiótico antitumoral (antraciclina) derivado de culturas de *Streptomyces peucetius*,

variedade caesius, sendo um quimioterápico inibidor da transcriptase reversa e da RNA polimerase, impedindo a síntese do DNA e RNA como agente ciclo celular não específico. Pode causar leucopenia, anemia e trombocitopenia, além de cardiotoxicidade (RODASKI & DE NARDI, 2008).

A toxicidade hematológica é o efeito colateral mais comum nos pacientes sob regime de quimioterapia, pois as células sangüíneas constituem sistema celular de renovação rápida e possuem alta fração de crescimento (KISSEBERTH & MACEWEN, 1996). Neutropenia e trombocitopenia são os primeiros sinais, enquanto a anemia desenvolve-se mais tardiamente em razão da vida média mais longa das hemácias (OGILVIE & MOORE, 1995). Dessa forma, a hematotoxicidade é considerada um fator limitante da quimioterapia, tanto pelo risco potencial de morte do animal em decorrência da hipoplasia do setor granulocitário (neutropenia séptica), quanto por impor diminuição de maneira transitória ou definitiva da dose do quimioterápico, o que pode prejudicar a eficácia do tratamento (LANORE & DELPRAT, 2004). A maioria dos fármacos quimioterápicos é mielotóxica, sendo que a ciclofosfamida possui mielotoxicidade elevada e a vincristina, na dose de 0,75 mg/m<sup>2</sup>, possui mielotoxicidade moderada (LANORE & DELPRAT, 2004).

O nadir de neutrófilos, momento no qual o número de granulócitos é o mais baixo após uma sessão de quimioterapia, é geralmente constatado uma semana após o início do tratamento. A neutropenia, fase mais perigosa do ciclo, persiste por 3 a 5 dias. Em pouco menos de duas semanas, a medula passa por uma fase de recuperação (LANORE & DELPRAT, 2004).

### TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS

As células-tronco hematopoéticas (CTH) são células pluripotentes que dão origem a todas as células heterogêneas funcionais do sangue, inclusive àquelas do sistema imune (GASPER, 2000). Elas dão origem a progenitores oligopotenciais que produzem progenitores de duas ou mais linhagens celulares, que, por sua vez, se diferenciam em células unipotenciais, comprometidas com a produção de uma única linhagem celular (RICHMAN et al., 1978). As CTH

possuem a capacidade de reconstituir o sistema hematopoético de um receptor letalmente irradiado (LU et al., 1996).

O transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) é indicado no tratamento de muitas doenças. Em algumas delas, o transplante corrige defeitos na produção de células hematopoéticas medulares ou da função imunológica, congênitos ou adquiridos. Em outras, ele restaura a hematopoese após terapia citotóxica em doses elevadas (mieloablativa) (LU et al., 1996; HOROWITZ, 1999; BENBOUBKER et al., 2000), revelando-se como excelente coadjuvante no tratamento de doenças malignas recidivantes, tal qual o linfoma (BENBOUBKER et al., 2000).

O TCTH consiste na injeção intravenosa de progenitores hematopoéticos que se desenvolvem em microambientes especializados, nos quais se diferenciam, proliferam e amadurecem. Entretanto, tais células transplantadas carregam antígenos que, uma vez não reconhecidos pelo receptor, poderão desencadear a chamada doença do enxerto contra hospedeiro - DECH (GASPER, 2000). O transplante autólogo envolve a remoção temporária de CTH do próprio receptor, seguida da mielossupressão do referido receptor, induzida quimicamente ou radiologicamente, e reinfusão das CTH, sendo que a técnica é simples e a ocorrência da DECH é rara (GASPER, 2000). A terapia mieloablativa seguida de transplante de CTH em doenças malignas é capaz de evitar a resistência a protocolos quimioterápicos convencionais, pois utiliza doses elevadas de quimioterápicos ou radiação além dos limites da toxicidade medular, porém dentro dos limites de morbidade e mortalidade aceitáveis (HORNING & NADEMANEE, 1999).

FRIMBERGER et al. (2000) realizaram quimioterapia com doses elevadas de ciclofosfamida seguida de transplante autólogo de medula óssea em cães com linfoma. Foi alcançado tempo médio de remissão 10% maior que aquele de cães tratados com quimioterapia convencional. Nos animais tratados, a remissão foi induzida com quimioterapia convencional, seguida de dose única de ciclofosfamida ( $500 \text{ mg/m}^2$ ) e mesna, e infusão de medula óssea autóloga. Estes animais foram monitorados quanto às suas características leucométricas aos 7, 9, 11 e 14 dias, bem como na terceira e quarta semanas e dois, quatro e seis meses

após o supramencionado tratamento, com o principal objetivo de monitorar a recuperação hematopoética, após alta dose de ciclofosfamida.

### FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIA DE GRANULÓCITOS

O uso dos fatores de crescimento hematopoético tem aumentado muito nos últimos anos tanto na medicina humana quanto na veterinária devido ao aumento de sua disponibilidade no mercado. Apesar disso, existem poucos estudos nacionais sobre o uso desses fármacos em cães e gatos (LUCIDI & TAKAHIRA, 2007). Tais citocinas sintéticas regulam a produção, o desenvolvimento e a função das linhagens hematopoéticas e são indicadas para reduzir a morbidade relacionada aos efeitos mielossupressivos induzidos por algumas substâncias tóxicas, incluindo quimioterápicos, radiação e infecções virais (FELDMAN et al., 2000).

O fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) recombinante é um dos fatores de crescimento hematopoético com maior potencial para uso clínico, pois é linhagem-específico e desempenha importante papel na granulopoese, através de sua atuação na medula óssea aumentando a liberação de neutrófilos maduros do compartimento de reserva para a circulação, a proliferação e maturação de precursores granulocíticos e a funcionalidade das células neutrofílicas, de tal forma a incrementar sua capacidade de fagocitose, quimiotaxia e degranulação (HENRY et al., 1998; REWERTS & HENRY, 1998; FELDMAN et al., 2000). Além disso, 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).

O G-CSF é produzido por células do estroma da medula óssea, incluindo os fibroblastos, células endoteliais, monócitos e macrófagos, sob estímulo de citocinas inflamatórias, como IL-1, IL-3 e fator de necrose tumoral (TNF), e endotoxinas bacterianas (HENRY et al., 1998).

O G-CSF recombinante canino (rcG-CSF) tem sido usado com sucesso para aumentar o número de neutrófilos em cães e gatos, levando a um quadro de neutrofilia poucas horas após sua administração (OBRADOVICH et al., 1991; MISHU et al., 1992; OBRADOVICH et al., 1993). Entretanto, ainda hoje, seu uso é

restrito às universidades e centros de pesquisa, fazendo com que o G-CSF recombinante humano (rhG-CSF), de nome genérico filgrastim, seja o mais comumente utilizado na prática médica de pequenos animais (FELDMAN et al., 2000), 5µg/kg/dia, SC (HENRY et al., 1998).

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 em cães e gatos. Na prática médico-veterinária, tal fármaco é indicado no tratamento de neutropenias após quimioterapia (COUTO, 1990; BRAVO et al., 1996; HENRY et al., 1998; COUTO, 2003), radiação (NOTHDURFT et al., 1997; MAC VITTIE et al., 2005), reconstituição da celularidade medular após transplante de medula óssea (STORB et al., 1994), na mobilização de células tronco hematopoiéticas para o sangue periférico (THOMASSON et al., 2003), nas neutropenias causadas por fármacos (HOLLAND et al., 1996) e na neutropenia cíclica do Collie cinza (HAMMOND et al., 1990). Atualmente, a principal aplicação do rhG-CSF na prática médica veterinária tem como objetivo a redução da duração e intensidade das neutropenias conseqüentes à quimioterapia em altas doses (COUTO, 2003). Ressalta-se, entretanto, que o rhG-CSF é indicado apenas nos casos de neutropenias persistentes, nas quais há um defeito na produção ou maturação dos neutrófilos, tal qual na hipoplasia, hematopoese cíclica e alguns casos de produção ineficiente, sendo contra-indicado nas neutropenias agudas e transitórias (LUCIDI & TAKAHIRA, 2007).

Levando-se em conta o tempo de vida média dos componentes sanguíneos, verifica-se que a linhagem granulocítica é a primeira a ser afetada em casos de deficiência na hematopoese, 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 120 dias no cão (CHUN et al., 2001; COUTO, 2003). Na prática, o que se observa em cães é o aumento da liberação de neutrófilos para o sangue, uma a duas horas após a administração do rhG-CSF, e a aceleração da produção em um a três dias (HAMMOND et al., 1991), com o retorno à contagem inicial, três a cinco dias após a suspensão do referido fator de crescimento (OBRADOVICH et al., 1991). A resposta ao tratamento

depende da sua duração e do número de células-tronco viáveis na medula óssea (FELDMAN et al., 2000).

Os fatores de crescimento hematopoético espécie-específicos raramente induzem o desenvolvimento de anticorpos. Porém o uso de rhG-CSF, por semanas consecutivas em cães, pode levar a uma resposta imune, neutralizando sua ação e fazendo com que os neutrófilos voltem aos valores iniciais (HAMMOND et al., 1991; PHILLIPS et al., 2005). Além disso, tratamentos mais prolongados podem induzir à formação de anticorpos anti- G-CSF autólogo, por meio de reação cruzada. Por outro lado, o uso dos fatores recombinantes humanos por curtos períodos, em cães e gatos, não resulta na formação de anticorpos (HENRY et al., 1998; PHILLIPS et al., 2005), fato este que credencia a utilização do rhG-CSF como uma opção segura no tratamento ou prevenção da neutropenia (HENRY et al., 1998).

### CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo é uma tecnologia baseada no emprego de radiação laser, fluxo hidrodinâmico, ótica, substâncias fluorescentes (fluorocromos), recursos de informática, utilizada para determinar algumas características estruturais e funcionais de partículas biológicas em suspensão, como vários tipos de células, protozoários, bactérias e outros (NGUYEN et al., 2007). É um recurso emergente na Medicina Veterinária que permite uma análise rápida, objetiva e qualiquantitativa de células em suspensão (FALDYNA et al., 2001; NAKAGE et al., 2005). Tem uma ampla aplicação na hematologia veterinária, incluindo a identificação de precursores hematopoéticos, contagens celulares diferenciais da medula óssea, quantificação de reticulócitos, pesquisa de eritroparasitas, detecção de anticorpos anti-eritrocitários, contagem diferencial de leucócitos, imunofenotipagem de linfócitos e contagem de plaquetas reticuladas. As desordens mieloproliferativas e linfoproliferativas também podem ser identificadas e classificadas por intermédio da citometria de fluxo (WEISS, 2001; NAKAGE et al., 2005)

O citômetro de fluxo é um separador de células ativado por imunofluorescência (FACS – “Fluorescence Activated Cell Sorter”) que promove a

identificação e quantificação de células com base em seu tamanho (“Forward scatter” – FSC), granularidade (“Side Scatter”– SSC) e intensidade de fluorescência (ROITT et al., 2003).

A avaliação do tamanho relativo da célula (FSC) e da granularidade ou complexidade interna da célula (SSC) permite a classificação dos leucócitos em linfócitos, monócitos e granulócitos (GRINDEM, 1996).

A avaliação da intensidade de fluorescência dá-se por intermédio da utilização de marcadores de superfície, representados por anticorpos monoclonais específicos fluorescentes, ligados a fluorocromos como isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE) (GRINDEM, 1996).

Os anticorpos monoclonais são os marcadores de escolha devido à sua especificidade, reação cruzada mínima e reprodutibilidade (KEREN, 1994). O termo CD (“Cluster of Differentiation” = denominação de grupamento) é utilizado para denominar os anticorpos monoclonais criados em diferentes laboratórios do mundo contra antígenos leucocitários humanos (ROITT, 1999).

Alguns “workshops” têm sido organizados para classificar os anticorpos monoclonais, com um número do CD correspondente à nomenclatura humana, de diversos animais domésticos incluindo os cães (COBBOLD & METCALF, 1994), suínos (SAALMULLER, 1996), eqüinos (LUNN et al., 1996) e ruminantes (NAESSENS et al., 1997). Anticorpos monoclonais também têm sido identificados e classificados em felinos (ACKLEY et al., 1990; ACKLEY & COOPER, 1992; WILLETT et al., 1994; WOO & MOORE, 1997). Sendo assim, atualmente, alguns anticorpos monoclonais específicos para cães e gatos estão disponíveis comercialmente (BYRNE et al., 2000).

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

De acordo com WEISS (2004b), o CD45 pode ser útil na avaliação de leucemias granulocíticas agudas e linfomas com envolvimento da medula óssea. Também pode ser usado na quantificação acurada de granulócitos, mieloblastos,

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

Os leucócitos podem ser analisados no sangue total com anticoagulante ou isolados pelo uso da centrifugação por gradiente de densidade. Nas coletas das amostras de sangue para citometria de fluxo, o anticoagulante recomendado é o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), que apresenta vantagens sobre os demais, pois proporciona uma boa separação das distintas populações leucocitárias e permite que as amostras possam ser analisadas satisfatoriamente dentro de um período de até 24 horas (PAXTON et al., 1989).

A citometria de fluxo tem contribuído enormemente no diagnóstico de linfoma. Amostras ou aspirados com agulhas finas de linfonodos ou outros tecidos, tais como tecido sangüíneo periférico ou central, têm sido freqüentemente analisados (JENNINGS & FOON, 1997).

Trata-se de recurso técnico de uso corrente nos laboratórios de hematologia e bancos de sangue humanos e, mais recentemente, seu emprego vem ganhando corpo na avaliação de imunopatias e malignidades hematopoéticas na medicina de animais de companhia (TOMPKINS et al., 1991; CHABANNE et al., 1995; CULMSEE et al., 2001; CULMSEE & NOLTE, 2002). No caso do linfoma canino, a imunofenotipagem passou a ter importância quando se verificou que linfomas de células T apresentavam pior prognóstico para a sobrevivência e período livre da doença do que linfomas de células B (GREENLEE et al., 1990; KIUPEL et al., 1999). A imunofenotipagem consiste na separação de distintas populações de células, cujos antígenos de superfície são marcados com anticorpos específicos (ROITT et al., 1999) e tem promovido um avanço na

definição e classificação de células sanguíneas, particularmente aquelas de baixo grau de diferenciação (GRINDEM, 1996).

Além disso, muitos dos fármacos utilizados na quimioterapia do linfoma afetam a distribuição, proliferação, diferenciação e função de células imunologicamente importantes como neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos (MILLER, 1997; BARNES, 1998).

### **III. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS**

Embora a quimioterapia seja imunossupressora, os efeitos da mesma sobre o sistema imune dos cães com neoplasia não têm sido estudados de maneira detalhada. Desta forma, torna-se muito importante o monitoramento das células leucocitárias durante o tratamento quimioterápico. Assim, idealizou-se este ensaio com os objetivos principais de se avaliar de forma seqüencial e temporalmente o quadro leucocitário de cães linfomatosos, em remissão, submetidos à alta dose de ciclofosfamida seguida do transplante autólogo de medula óssea, bem como quantificar células CD45+ na medula óssea e sangue periférico dos mesmos.

### **IV. MATERIAL E MÉTODOS**

#### ANIMAIS

O grupo experimental incluiu sete cães portadores de linfoma em remissão submetidos à alta dose de ciclofosfamida suportada por TMO atendidos junto ao Serviço de Oncologia Veterinária (SOV) do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel (HV GLN) da FCAV/UNESP, entre julho de 2007 e agosto de 2008.

No grupo controle foram incluídos cinco cães, SRD, machos ou fêmeas, com peso médio de  $12,03 \pm 1,62$  Kg, alojados no canil do Hospital Veterinário do Centro Universitário Barão de Mauá – Ribeirão Preto – que, após exame físico detalhado e hemograma, foram considerados hígidos. Como valores de referência para as características hematológicas utilizaram-se aqueles estabelecidos junto ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária (LPCV) do HV GLN (Apêndices A e B).

## INDUÇÃO DA REMISSÃO

Para atingir a remissão completa, os animais do grupo tratado foram submetidos ao protocolo quimioterápico de M-W (Apêndice C), que inclui sulfato de vincristina (0,75 mg/m<sup>2</sup>, IV), L-asparaginase (400 UI/kg, IM), ciclofosfamida (250 mg/m<sup>2</sup>, VO), doxorubicina (30 mg/m<sup>2</sup>, perfusão) e prednisona, pelo período mínimo de nove semanas, ou seja, até o término da fase de indução da remissão (DE CÁPUA et al., 2009).

## TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE MEDULA ÓSSEA

Uma semana após o término da fase de indução da remissão, os cães do grupo tratado foram submetidos a uma avaliação pré-transplante da medula óssea, na qual se definiu a condição da doença para cada animal, de modo que seis deles apresentavam-se em remissão completa e um em remissão parcial (Animal T3). As avaliações citoscópicas de amostras de medula óssea, obtidas dos referidos animais, revelaram preparações bem representativas, normocelulares, com adequada relação mielóide:eritróide (M:E) e número normal de megacariócitos, e isentas de componente linfomatoso. Apenas um cão (Animal T4) apresentou medula óssea hipocelular e com relação M:E flagrantemente diminuída, mas sem a presença de células neoplásicas.

Na semana subsequente realizou-se o transplante. Para tanto, o protocolo do TMO foi delineado da seguinte maneira (DE CÁPUA et al., 2009):

- Dia – 4 (D-4): Colheita de medula óssea
- Dia – 2 (D-2): Condicionamento (ciclofosfamida IV)
- Dia zero (D0): Infusão da suspensão de células medulares por via intravenosa

Vale lembrar que os cães linfomatosos foram submetidos à terapia preventiva com sulfametaxazol-trimetoprim, na dose de 25mg/kg, iniciada sete dias antes da coleta da medula óssea e mantida por mais 30 dias (DE CÁPUA et al., 2009), em virtude da mielotoxicidade provocada pela alta dose de ciclofosfamida.

#### A. Coleta de medula óssea e processamento do material (D-4)

A coleta de medula óssea foi realizada, após jejum hídrico de duas horas e alimentar de doze horas, junto à sala de técnica cirúrgica do HV GLN, da FCAV UNESP/Jaboticabal.

Para hidratação e manutenção de acesso venoso, foi administrada solução de NaCl 0,9%, (10mL/kg/h) por intermédio de um cateter adaptado à veia cefálica, logo após tricotomia e anti-sepsia locais.

Como procedimento anestésico e analgésico, foi realizada pré-medicação com meperidina (3mg/Kg, IM) e levomepromazina (0,5mg/kg, IV), indução da anestesia com propofol (5 mg/kg), e manutenção através de anestesia geral inalatória (isofluorano). Para analgesia adequada, foi realizada anestesia peridural no espaço lombossacral com lidocaína 2% sem vasoconstritor (1 mL/5kg), associada a tramadol (2 mg/kg). Após o retorno anestésico procedeu-se à aplicação de tramadol (4 mg/kg, SC), que também foi utilizado para analgesia pós-cirúrgica (2 mg/kg VO, a cada oito horas, durante 2 dias).

Para a coleta de medula óssea, foram realizadas punções na crista ilíaca do paciente utilizando-se de agulhas de Rosenthal e seringas de 20 mL (Figura 1). Para evitar hemodiluição, cada aspiração não excedeu ao volume de 10 mL, sendo que o volume total de material medular colhido foi de 10mL/Kg de peso vivo animal. As alíquotas de MO assim colhidas foram acondicionadas em recipientes contendo meio de cultura RPMI (10mL/100mL de MO), e foram cuidadosa e periodicamente homogeneizadas e, posteriormente, filtradas (Figura 2). Após a retirada do anticoagulante citrato-fosfato-dextrose-adenina-1 (CPDA-1) da bolsa tripla para coleta de sangue, o supra referido filtrado foi transferido para a mesma com auxílio de uma seringa de 60mL.

A medula óssea foi processada de acordo com protocolo utilizado pelo Hemonúcleo e Centro de Hematologia e Hemoterapia Dr. Ary Ferreira Dias, da Fundação Amaral Carvalho (FAC) – Jaú – SP, cujo processamento foi realizado em três etapas:

Primeiramente, foi realizada depleção das hemácias sob a ação do hidroxietilstarch (HES), na proporção de 1:5 que promove a sedimentação dos eritrócitos, possibilitando a transferência destas células para uma bolsa satélite.

Ainda assim, uma camada de eritrócitos, com cerca de 2cm permaneceu na bolsa principal. Todo este procedimento foi realizado em uma capela de fluxo laminar nas instalações do SOV do HV GLN.

Na segunda etapa, após transporte sob refrigeração, a bolsa contendo medula óssea foi centrifugada por 15 minutos, 1810,9 g e 20°C, junto ao Banco de Sangue Sertãozinho, Sertãozinho – SP, e então o plasma sobrenadante foi removido até que o seu volume remanescente fosse igual ou inferior a 2 cm acima da camada de células brancas e, reservado.

Na terceira e última etapa, para suportar a temperatura de congelamento (-80°C), a suspensão de células foi transferida, com uma seringa de 60mL, para uma bolsa de criopreservação de componentes do sangue e o volume final foi anotado. Em uma bolsa de sangue vazia, adicionaram-se 40% do volume final de plasma autólogo, 40% de meio RPMI e 20% de dimetilsulfóxido (DMSO) que, posteriormente, foi transferido para a bolsa de congelamento. Durante a adição de DMSO, manteve-se a bolsa em uma cuba com gelo, para evitar o aquecimento decorrente da adição da referida substância. Iniciou-se então o processo de congelamento manual da bolsa contendo medula óssea, mantendo-a por uma hora em refrigerador (4°C), depois por duas horas a -4°C e finalmente a -80°C, em freezer instalado no Brazilian Collection Clone (BCC), onde permaneceu até seu descongelamento e infusão, quatro dias depois.



**Figura 1:** Procedimento de coleta de medula óssea na crista ilíaca de um cão, com vistas ao transplante autólogo de medula óssea. Jaboticabal, 2009.



**Figura 2:** Filtragem da medula óssea coletada. Jaboticabal, 2009.

#### B. Condicionamento (D-2)

O condicionamento do paciente foi realizado dois dias após a coleta de medula óssea, ou seja, dois dias antes da infusão da mesma. Realizou-se fluidoterapia com solução de NaCl 0,9% (30mL/kg/h, IV) por 30 minutos, seguida da infusão de mesna (dose da ciclofosfamida X 0,4, IV) e, da administração de ondansetrona (0,1 – 0,22 mg/kg VO), sendo a mesma dose repetida oito horas depois. Para o condicionamento, propriamente dito, infundiu-se ciclofosfamida (500 mg/m<sup>2</sup>). A seguir, administrou-se furosemida (2 mg/kg) e manteve-se a fluidoterapia por cinco horas (30mL/kg/h, IV) e repetiu-se a aplicação da mesna na segunda e quinta horas após o término da administração da ciclofosfamida. Todo o procedimento foi realizado no Laboratório de Oncologia do SOV da FCAV/UNESP-Jaboticabal, sendo o preparo dos fármacos sob fluxo laminar.

#### C. Infusão da suspensão de células da medula óssea (D0)

Primeiramente, a bolsa contendo as células hematopoéticas foi descongelada em banho-maria a 37°C, no LPCV do HV GLN da FCAV/UNESP. A infusão da suspensão de células (Figura 3) foi realizada após 30 minutos de fluidoterapia intravenosa (solução de NaCl 0,9%, 30mL/kg/h) e administração de ondansetrona (0,1 – 0,22 mg/kg, VO). Durante o referido procedimento os sinais vitais dos animais foram avaliados, e após o término da infusão os animais

mantiveram-se sob monitoramento e fluidoterapia pelo tempo mínimo de 40 minutos.



**Figura 3:** Infusão da suspensão de células da medula óssea (D0). Jaboticabal, 2009.

### USO DE FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIA

O G-CSF (filgrastim) foi administrado aos animais do grupo tratado, na dose de  $5\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ , por via subcutânea, com o intuito de acelerar a reconstituição hematopoética. A data de início da administração do G-CSF variou para cada animal em virtude da resposta individual das contagens neutrofílicas. Dessa forma, o medicamento foi administrado nos dias D+3 e D+4 para o animal 1 (T1), D+4 a D+8 para o animal 2 (T2) e D+5 a D+9 para os animais 4, 5 e 6 (T4, T5 e T6). Os animais 3 e 7 não receberam o referido fármaco pois apresentaram apenas e tão somente uma leucopenia leve, quando comparados com os outros animais, e que cuja aplicação do fator estimulador de colônia não se fez necessária.

Os animais do grupo controle receberam  $5\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  de G-CSF, por via subcutânea durante 5 dias (D+5 a D+9).

### OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de sangue periférico para leucometria e quantificação de células CD45+ foram obtidas por venipunção cefálica e envasadas em tubos a vácuo contendo EDTA.

As amostras de medula óssea destinadas à análise citométrica foram obtidas por intermédio da punção aspirativa do esterno (1mL), com o auxílio de agulhas 40X12 e, igualmente, preservadas em tubos contendo EDTA.

### AValiação DAS PARCELAS EXPERIMENTAIS

Os animais do grupo tratado foram submetidos à quantificação de células CD45+ presentes no sangue periférico e medula óssea nos dias -4, 7, 14 e 28 e à avaliação do quadro leucocitário nos dias -4, -2, -1, 0, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16 e 28. De outra parte, os animais do grupo controle foram submetidos à análise citométrica quantitativa de células CD45+ no sangue periférico e medula óssea nos dias -4, 7, 14 e 28 e à avaliação do quadro leucocitário nos dias -4, -2, 0, 7, 8, 9, 10, 13, 14 e 28.

#### A. Quantificação de células CD45+

A preparação das suspensões de células foi realizada no LPCV do HV GLN, da FCAV/UNESP-Jaboticabal. Foram utilizados três tubos Falcon nos quais foram adicionados 100 µL da amostra (sangue ou medula óssea) sendo que no tubo 1 não foram adicionados marcadores; no tubo 2 foram adicionados 2 µL de γ2FITC (MCA1212F, SEROTEC) e no tubo 3, 2 µL de CD45FITC (MCA1042F, SEROTEC) (Tabela 1).

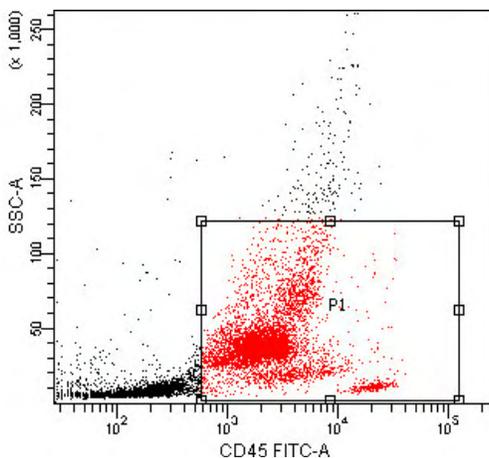
Os tubos foram incubados por 20 minutos à temperatura ambiente no escuro. Um mililitro de tampão de lise de hemácias (FACS Lysing Solution – BECTON DICKINSON) foi adicionado em cada tubo, seguido da homogeneização e incubação por dez minutos no escuro. Posteriormente, foi realizada centrifugação para formação do “pelet” seguida de lavagens da suspensão de células com solução salina tamponada com fosfato 0,01M e pH entre 7,4 e 7,6 (PBS) por três vezes, cujo procedimento consistiu na centrifugação a 651,9g por três minutos, desprezo do sobrenadante e adição de dois mililitros de PBS. Após desprezar o sobrenadante, foram adicionados 500 µL de formol a 1% em PBS/tubo, para conservação das amostras por uma semana a 4°C (WEISS, 2004a).

**Tabela 1:** Preparação das amostras de sangue e medula óssea para análise citométrica. Jaboticabal, 2009.

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

As amostras foram analisadas no citômetro FACSCANTO (Becton Dickinson, San Jose, CA), instalado no Laboratório de Micologia, do Departamento de Análises Clínicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCF) – UNESP, no máximo sete dias após seu preparo.

Foram obtidos 10000 eventos, para identificar e quantificar as células CD45<sup>+</sup>, utilizando-se do programa FACSDiva (BD) (Figura 4). O cálculo dos valores absolutos de células CD45<sup>+</sup> no sangue foi realizado multiplicando-se os valores percentuais das referidas células pela contagem global de leucócitos. Para as células CD45<sup>+</sup> da medula óssea foram obtidos somente os valores relativos, uma vez que a contagem global de células nucleadas na mesma não é um método confiável.



**Figura 4:** Distribuição das populações leucocitárias observadas na citometria de fluxo, de acordo com o tamanho das células, com seleção (P1) sobre a população de células CD45<sup>+</sup> na medula óssea de cão. Jaboticabal, 2009.

### B. Leucograma

A contagem global dos leucócitos foi conduzida com o auxílio de um contador automático de células ABC Vet (HORIBA ABX – São Paulo/Brasil) e a fórmula leucocitária diferencial estabelecida a partir de esfregaço sangüíneo corado com uma mistura de Metanol, May Grunwald e Giemsa (MMG). Tais procedimentos foram realizados no LPCV do HV GLN da FCAV /UNESP-Jaboticabal.

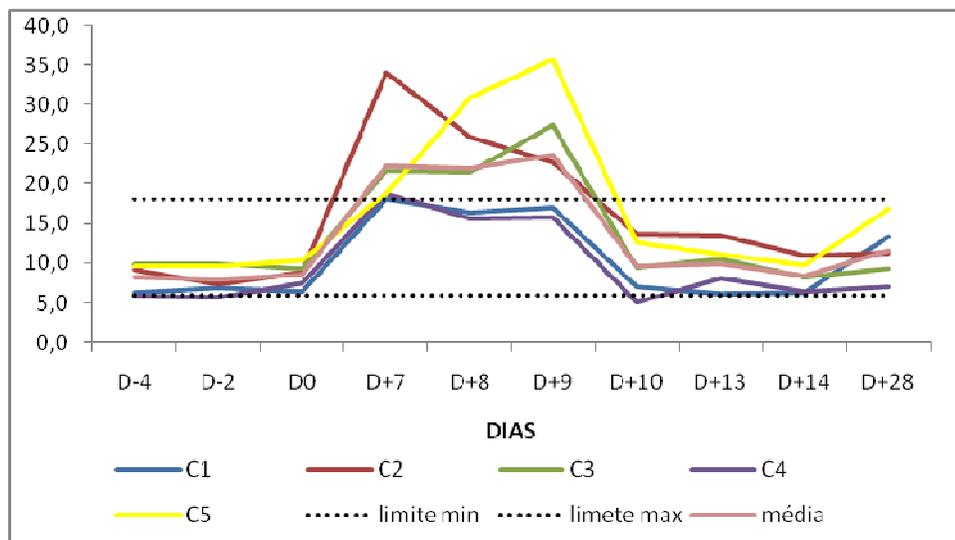
### ANÁLISE ESTATÍSTICA

O método estatístico utilizado foi a análise de variância de medidas repetidas para as variáveis leucócitos, CD45+ e %CD45+. As comparações dos pares das médias foram feitas usando o teste Tukey. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo (ZAR, 1999).

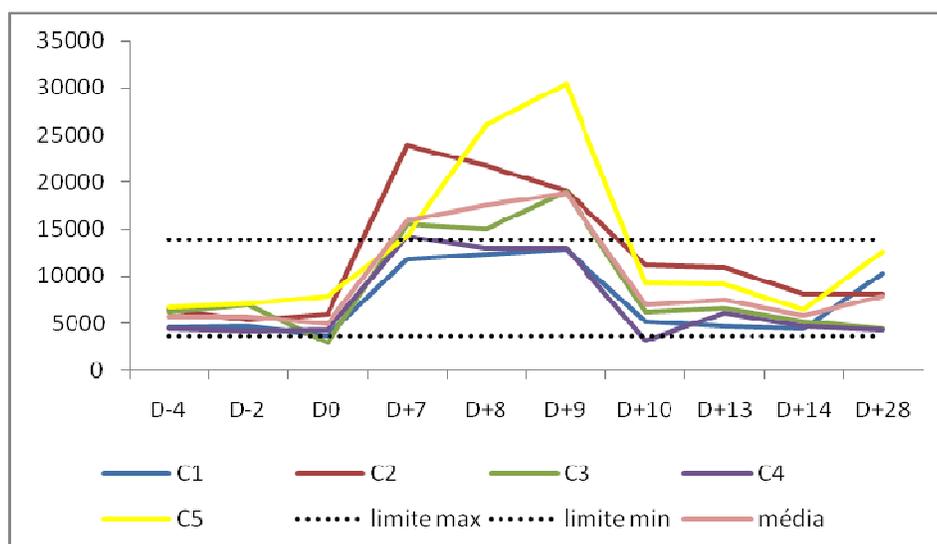
## **V. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### A. Leucograma

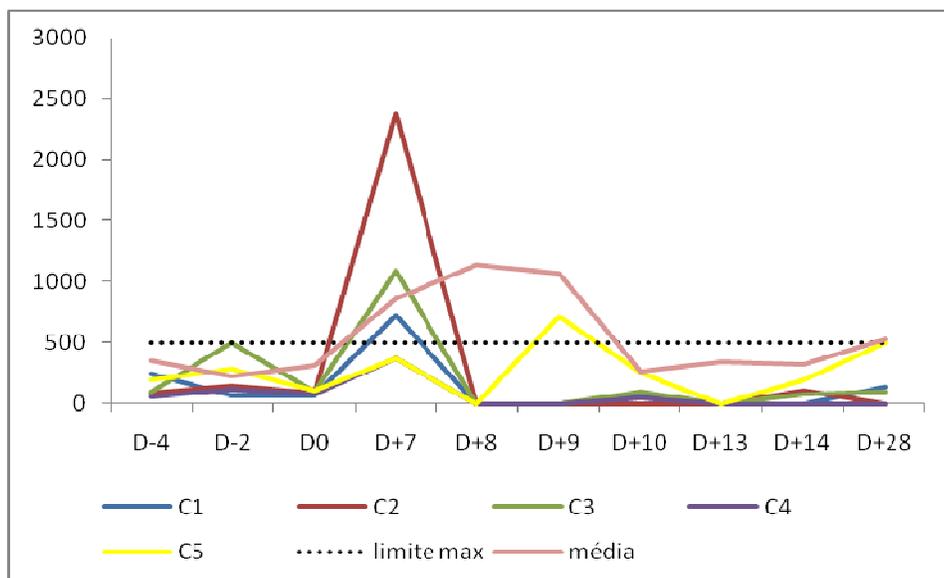
Os valores absolutos individuais e as médias de leucócitos, neutrófilos segmentados, neutrófilos bastonetes e linfócitos dos animais do grupo controle, nos dias -4, -2, 0, 7, 8, 9, 10, 13, 14 e 28, estão apresentados nas figuras 5, 6, 7 e 8, respectivamente. Para melhor visibilização dos valores obtidos para os animais do grupo controle, tracejou-se nas referidas figuras linhas de valores de referência, máximos e mínimos, instituídos no LPCV do HV GLN da FCAV/UNESP-Jaboticabal.



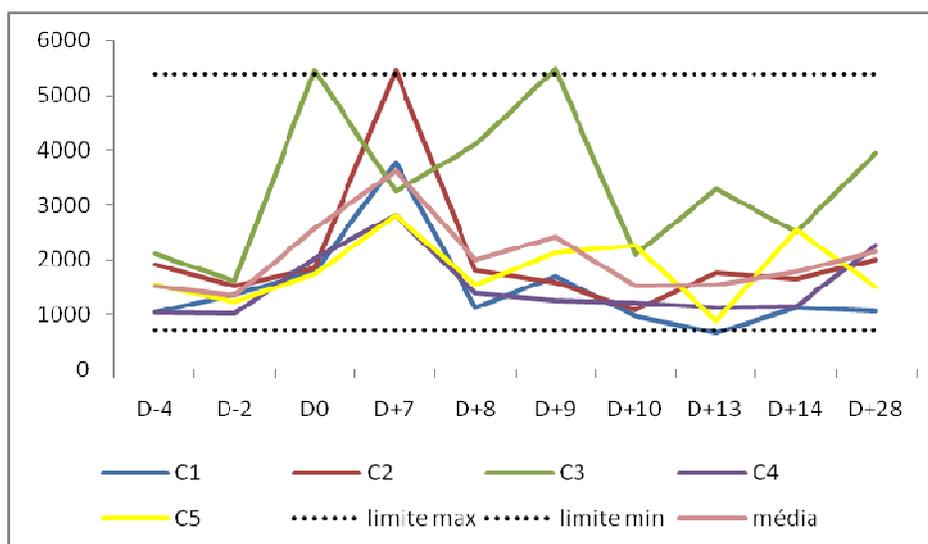
**Figura 5:** Comportamento dos valores absolutos individuais e médias de leucócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) obtidos para os animais do grupo controle ( $n=5$ ) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2009.



**Figura 6:** Comportamento dos valores absolutos individuais e médias de neutrófilos segmentados obtidos para os animais do grupo controle ( $n=5$ ) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2009.



**Figura 7:** Comportamento dos valores absolutos individuais e médias de neutrófilos bastonetes obtidos para os animais do grupo controle (n=5) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2009.



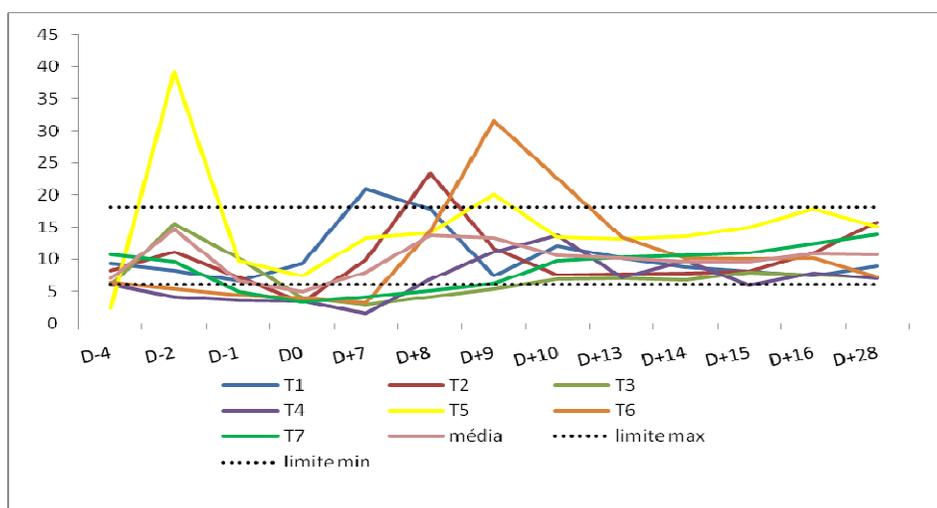
**Figura 8:** Comportamento dos valores absolutos individuais e médias de linfócitos obtidos para os animais do grupo controle (n=5) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2009.

As mais elevadas contagens de leucócitos para os animais do grupo controle ocorreram nos dias D+7 a D+9, por elevação de neutrófilos bastonetes e

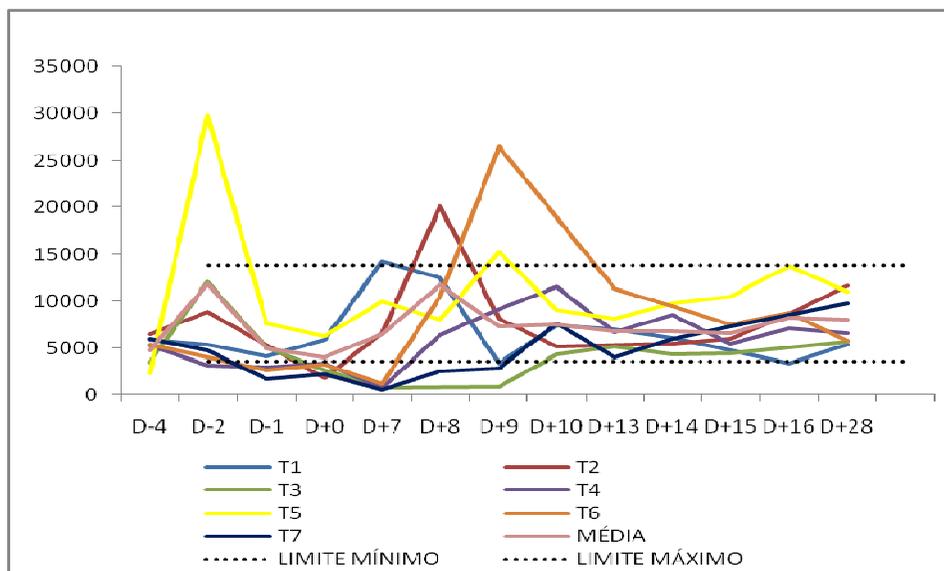
segmentados, corroborando com HAMMOND et al. (1991), que relatam aumento na liberação de neutrófilos para o sangue, uma a duas horas após a administração de G-CSF, e aceleração na produção de células neutrofílicas em um a três dias. No dia D+10, observou-se redução abrupta nas contagens de leucócitos, mas, ainda assim e até o final do protocolo experimental, dentro dos limites normais para a espécie. Contrariamente, OBRADOVICH et al. (1991) afirmam que o retorno à contagem inicial de neutrófilos ocorre de três a cinco dias após a suspensão do medicamento.

De acordo com a bula técnica, o filgrastim promove aumentos evidentes nas contagens de neutrófilos no sangue periférico, com elevações mínimas dos monócitos, fato que pôde ser observado em todos os animais deste protocolo que foram tratados com o referido fármaco. O número médio de linfócitos, monócitos, basófilos e eosinófilos manteve-se dentro dos intervalos de normalidade para a espécie (Apêndice L).

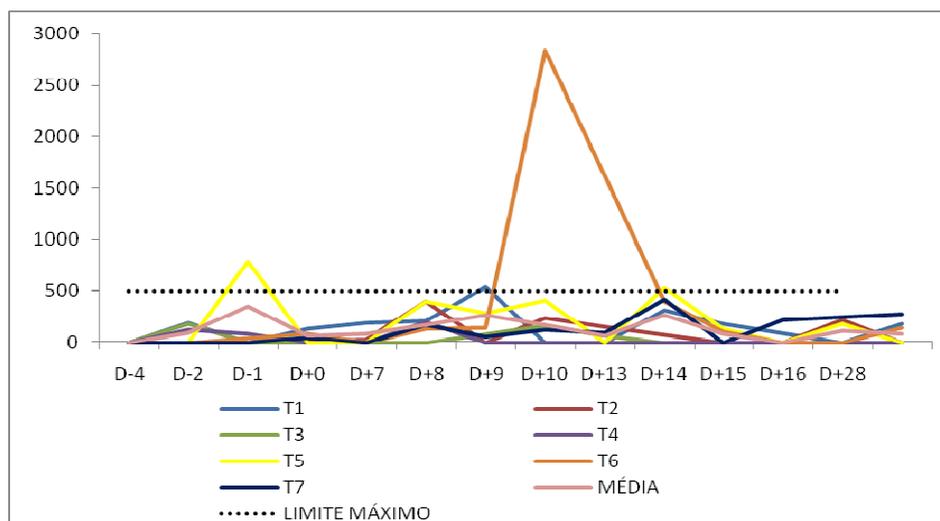
Nas figuras 9, 10, 11 e 12 estão apresentados os valores absolutos individuais e médias de leucócitos, neutrófilos segmentados, neutrófilos bastonetes e linfócitos dos animais do grupo tratado nos dias -4, -2, -1, 0, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16 e 28 do período experimental. Para melhor visibilização dos valores obtidos para os animais tratados, tracejou-se nas referidas figuras linhas de valores de referência máximos e mínimos do LPCV do HV GLN da FCAV/UNESP-Jaboticabal.



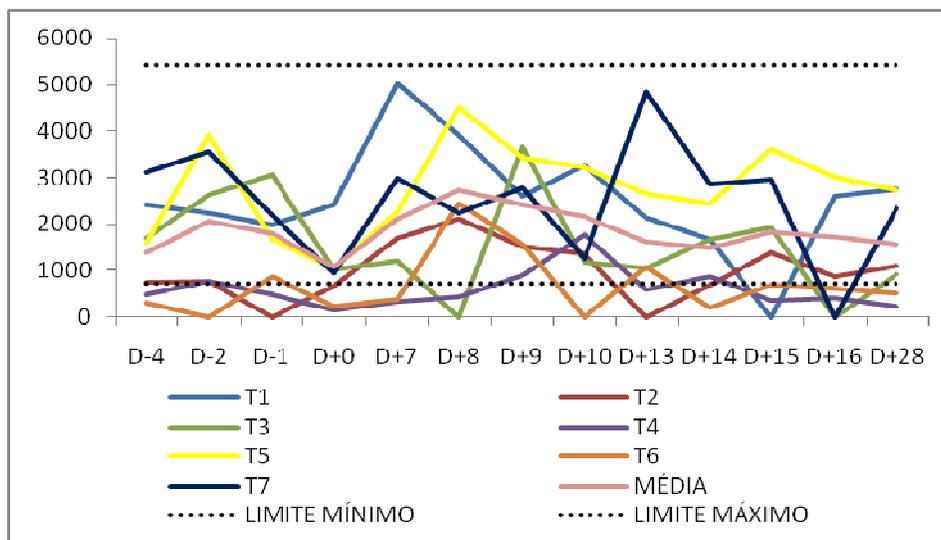
**Figura 9:** Comportamento dos valores absolutos individuais e médias de leucócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) obtidos para os animais do grupo tratado ( $n=7$ ) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2009.



**Figura 10:** Comportamento dos valores absolutos individuais e médias de neutrófilos segmentados obtidos para os animais do grupo tratado (n=7) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2009.



**Figura 11:** Comportamento dos valores absolutos individuais e médias de neutrófilos bastonetes obtidos para os animais do grupo tratado (n=7) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2009.



**Figura 12:** Comportamento dos valores absolutos individuais e médias de linfócitos obtidos para os animais do grupo tratado (n=7) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2009.

Em virtude da variação nos dias da aplicação do G-CSF para os animais do grupo tratado, optou-se por expor e discutir os resultados, primeiramente para cada paciente e, posteriormente lançou-se mão de um painel geral.

ANIMAL T1 (G-CSF: dias D+3 e D+4). As mais elevadas contagens de leucócitos ocorreram, dentre os dias analisados, em D+7 (20900 células/ $\mu$ L) e D+8 (17800 células/ $\mu$ L), ou seja, três e quatro dias após a última aplicação de G-CSF, corroborando com OBRADOVICH et al. (1991). No caso deste paciente o nadir de leucócitos ocorreu no D-1, ou seja, um dia após o condicionamento com ciclofosfamida.

ANIMAL T2 (G-CSF: dias D+4 a D+8). As mais elevadas contagens de leucócitos ocorreram, dentre os dias analisados, em D+8 (23400 células/ $\mu$ L) e D+9 (11600 células/ $\mu$ L), ou seja, no último dia da aplicação de G-CSF e no dia subsequente. O nadir de leucócitos (3300 células/ $\mu$ L) ocorreu no D0, ou seja, dois dias após o condicionamento com ciclofosfamida.

ANIMAL T3: não recebeu o G-CSF, pois apresentou apenas e tão somente uma leucopenia leve, quando comparado com os outros pacientes, e que cuja aplicação do referido fármaco não se fez necessária. O estado linfomatoso deste

paciente recidivou entre a coleta da medula óssea e a infusão da mesma, mas seguiu no protocolo, assim como ocorreu com quatro cães em um estudo conduzido por FRIMBERGER et al. (2002).

ANIMAL T4 (G-CSF: dias D+5 a D+9). As mais elevadas contagens de leucócitos ocorreram, dentre os dias analisados, em D+9 (11100 células/ $\mu$ L) e D+10 (13700 células/ $\mu$ L), ou seja, no último dia da aplicação de G-CSF e no dia subsequente. O seu nadir de leucócitos (1600 células/ $\mu$ L) ocorreu no D+7.

ANIMAL T5: apresentou mielotoxicidade após cerca de 5 dias de terapia com sulfametaxazol-trimetoprim e, como este período coincidiu com a coleta da medula óssea, foi necessária a utilização de G-CSF por dois dias, fato que ensejou acentuada leucocitose no dia D-2 (figura 9). Este animal recebeu G-CSF também nos dias D+5 a D+9. A mais elevada contagem de leucócitos ocorreu, dentre os dias analisados, em D+9 (20100 células/ $\mu$ L), ou seja, no último dia da aplicação de G-CSF. O nadir de leucócitos (7500 células/ $\mu$ L) ocorreu no D0.

ANIMAL T6 (G-CSF: dias D+5 a D+9). A mais elevada contagem de leucócitos ocorreu, dentre os dias analisados, em D+9 (31600 células/ $\mu$ L), ou seja, no último dia da aplicação de G-CSF. O nadir de leucócitos (3200 células/ $\mu$ L) ocorreu no D+7.

ANIMAL T7: não foi tratado com G-CSF, pois apresentou apenas e tão somente uma leucopenia leve, quando comparado com os outros animais, e que cuja aplicação do fator estimulador de colônia não se fez necessária. O nadir de leucócitos (3400 células/ $\mu$ L) ocorreu no D0, e a leucopenia se estabeleceu 24 horas após a alta dose de ciclofosfamida (D-1) até o dia D+8.

Os animais T3, T4 e T7 não apresentaram contagens totais de leucócitos acima do intervalo de normalidade para a espécie. O paciente T1 não apresentou redução numérica dos seus leucócitos, abaixo dos limites mínimos normais para cães, fato também verificado com relação ao paciente T5, mas, neste caso, pode ter havido influência do G-CSF, aplicado durante o protocolo de TMO.

Neste ensaio, uma semana após a infusão de células da MO, o nadir médio dos neutrófilos segmentados foi 513 células/ $\mu$ L (limites, 80 – 820 células/ $\mu$ L), e ocorreu 3 a 7 dias após o TMO. A duração média da neutropenia foi de 3,2 dias (limites, 2 – 4 dias). FRIMBERG et al. (2002), relatam nadir médio de neutrófilos

segmentados de 396 células/ $\mu$ L (limites, 8 – 3990 células/ $\mu$ L), entre 8 a 10 dias pós-TMO. A duração média da neutropenia absoluta, referida por estes autores, foi de 7 dias (limites, 0– 11 dias), mas a duração da neutropenia, com contagens inferiores a 1000 células/ $\mu$ L, de apenas 3 dias (limites, 0-6).

Os valores médios da contagem global de leucócitos e da contagem absoluta de neutrófilos segmentados, tanto para os indivíduos do grupo controle como para aqueles do grupo tratado (Figuras 5 e 6, 9 e 10, respectivamente), apresentaram-se de forma semelhante ao longo do período estudado. Observou-se que sete dias após o transplante, o pequeno aumento de leucócitos decorreu, em parte, do aumento de neutrófilos bastonetes (Figura 10), que pode ser interpretado como um efeito da aplicação do fator estimulador de colônia de granulócitos, utilizado neste período. As mais elevadas contagens de leucócitos, para animais do grupo tratado que receberam G-CSF, foram observadas no último dia de sua aplicação, exceto para o animal T1.

De acordo com a bula técnica, o filgrastim promove elevações numéricas mínimas dos monócitos, fato que pôde ser observado em todos os animais tratados com o referido estimulador de colônia. Da mesma forma, verificou-se que a variedade celular linfocitária não se alterou, pelo menos numericamente.

Embora em alguns pacientes humanos com neutropenia crônica severa, o uso do filgrastim possa propiciar o aumento no número de eosinófilos e basófilos circulantes, ou até mesmo eosinofilia ou basofilia mais consistente anterior ao tratamento, não se constataram alterações importantes nestas variedades celulares no período em questão.

Após 14 dias do transplante, observou-se pequenas elevações nas contagens global de leucócitos e absoluta de neutrófilos segmentados, quando comparadas aos valores iniciais, que podem ser interpretadas como uma evidência do início da recomposição da celularidade hematopoética, já que, de acordo com a bula técnica do filgrastim, após o término da terapia, a quantidade de neutrófilos circulantes diminui cerca de 50% em 1 a 2 dias, alcançando níveis basais em 1 a 7 dias. Segundo WITTE et al. (1992), pacientes humanos tratados com rhG-CSF durante 14 dias após TMO apresentaram contagens globais de leucócitos e neutrófilos significativamente maiores entre os dias D+9 e D+14, quando comparadas àquelas

de pacientes que receberam placebo, bem como recuperação medular mais rápida e menor incidência de broncopneumonia.

Neste ensaio, nenhum animal do grupo tratado apresentou febre ou sepse após a alta dose de ciclofosfamida. Desta maneira, pode-se inferir que o uso do filgrastim em cães linfomatosos, tal qual em pacientes humanos submetidos à quimioterapia citotóxica ou terapia mieloablativa, leva a reduções significativas na incidência, severidade e duração da neutropenia e neutropenia febril. Efeitos benéficos do filgrastim, segundo EICHACKER (1994), foram notados somente quando sua administração teve início dias antes da ocorrência de sepse experimental, em função do aumento no número de neutrófilos circulantes, bem como da melhora nos mecanismos de defesa dos cães. Da mesma forma, pacientes humanos tratados com quimioterapia citotóxica e filgrastim requerem menor número de admissões hospitalares e dias de hospitalização, requerendo menor carga de antibióticos quando comparados aos pacientes tratados apenas com quimioterapia citotóxica.

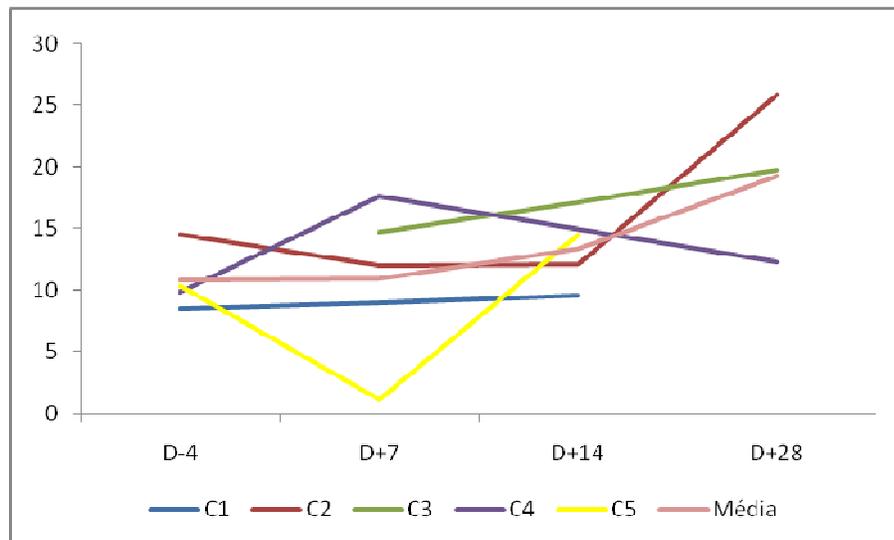
#### B. Quantificação de células CD45+

As percentagens de células CD45+, na medula óssea, nos dia D-4, D+7, D+14 e D+28, em cães hípidos que receberam G-CSF, estão apresentadas na tabela 2 e ilustradas na figura 13.

**Tabela 2:** Valores percentuais individuais, médias e desvios-padrão obtidos para contagem de células CD45<sup>+</sup> na medula óssea em cães do grupo controle (n=5) em diferentes momentos do período experimental. Jaboticabal, 2009.

ANIMAIS	DIAS			
	D-4	D+7	D+14	D+28
C1	8,5	9,0	9,6	**
C2	14,5	12,0	12,1	25,9
C3	**	14,7	17,1	19,7
C4	9,8	17,6	**	12,2
C5	10,3	1,1	14,5	**
<b>MÉDIA</b>	10,78	10,88	13,33	19,27
<b>DP</b>	2,6	6,33	3,21	6,86

\*\* Amostra perdida



**Figura 13:** Comportamento dos valores percentuais individuais e das médias de células CD45<sup>+</sup> na medula óssea em cães do grupo controle (n=5), em diferentes momentos do período experimental. Jaboticabal, 2009.

Nos diferentes momentos de determinação das percentagens de células CD45<sup>+</sup>, na medula óssea em cães do grupo controle verificou-se que os valores médios obtidos mantiveram-se dentro de uma estreita faixa de variação, como ilustra a figura 13.

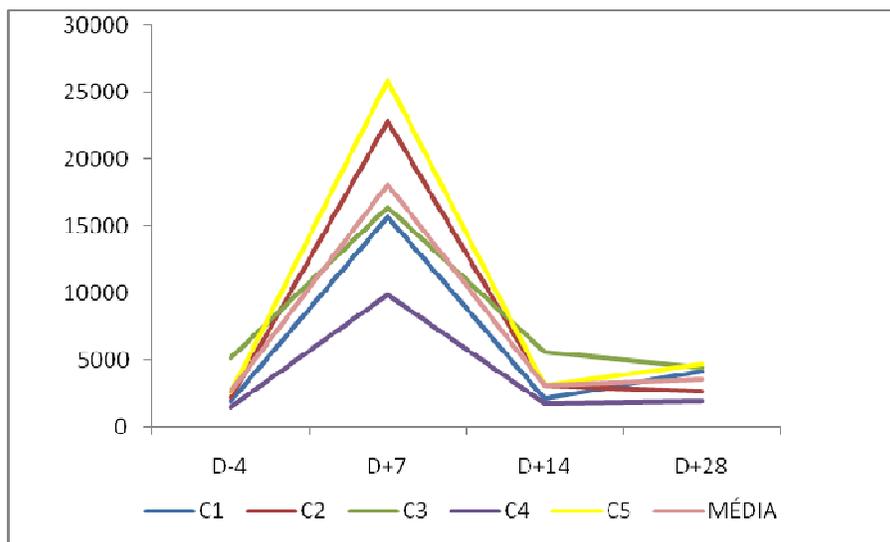
Na tabela 3, estão apresentados os valores das contagens globais de leucócitos, bem como as percentagens e valores absolutos de células CD45<sup>+</sup> no sangue periférico e, na figura 14, estão estampados os valores absolutos individuais e médias das referidas células CD45<sup>+</sup> em cães do grupo controle (n=5) em diferentes momentos do período experimental.

**Tabela 3:** Valores individuais, médias e desvios-padrão obtidos para contagens globais de leucócitos, percentuais e absolutos de células CD45<sup>+</sup> no sangue periférico em cães do grupo controle (n=5), em diferentes momentos do período experimental. Jaboticabal, 2009.

D-4	LEUCÓCITOS (x10 <sup>3</sup> /mL)	% CD45+	Absol. CD45	D+7	LEUCÓCITOS (x10 <sup>3</sup> /mL)	% CD45+	Absol. CD45
C1	6,2	31,2	1934,4	C1	18	87,1	15678
C2	9,1	24,4	2220,4	C2	34,1	66,9	22812,9
C3	10	51,6	5160	C3	21,7	75,8	16448,6
C4	5,8	26,9	1560,2	C4	18,8	52,5	9870
C5	9,6	26,5	2544	C5	31,8	81,4	25885,2
<b>MÉDIA</b>	8,14	32,12	2683,80	<b>MÉDIA</b>	24,88	72,74	18138,94
<b>DP</b>	1,98	11,17	1430,90	<b>DP</b>	7,54	13,55	6307,52

D+14	LEUCÓCITOS (x10 <sup>3</sup> /mL)	% CD45+	Absol. CD45	D+28	LEUCÓCITOS (x10 <sup>3</sup> /mL)	% CD45+	Absol. CD45
C1	6,3	34,2	2154,6	C1	13,3	31,6	4202,8
C2	11	28,0	3080	C2	11,2	23,9	2676,8
C3	8,3	68,5	5685,5	C3	9,4	47,7	4483,8
C4	6,4	29,0	1856	C4	7,1	28,5	2023,5
C5	9,8	31,2	3057,6	C5	16,8	27,8	4670,4
<b>MÉDIA</b>	8,36	38,18	3166,74	<b>MÉDIA</b>	11,56	31,90	3611,46
<b>DP</b>	2,07	17,12	1508,81	<b>DP</b>	3,71	9,25	1186,09



**Figura 14:** Comportamento dos valores absolutos individuais e das médias de células CD45<sup>+</sup> no sangue periférico em cães do grupo controle (n=5) em diferentes momentos do período experimental. Jaboticabal, 2009.

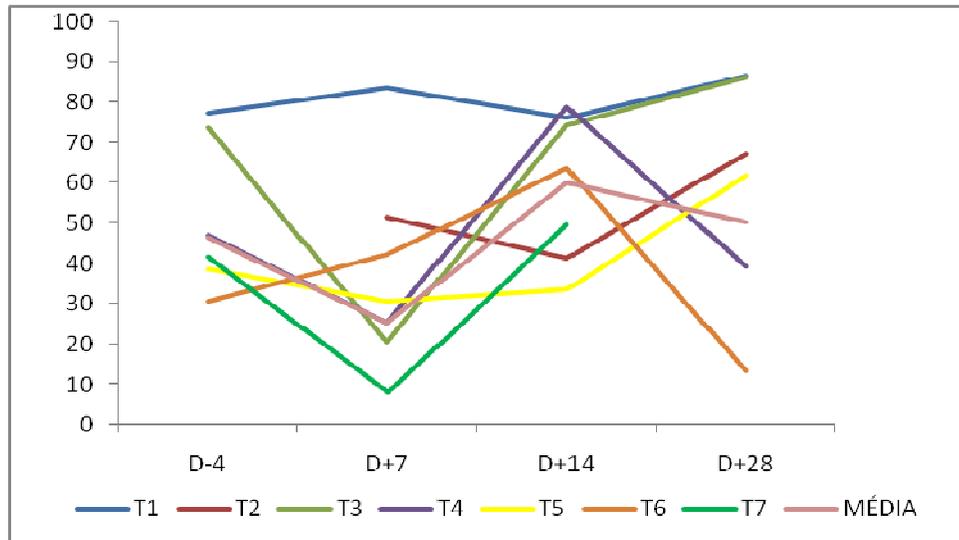
Para os animais do grupo controle, que receberam o G-CSF entre os dias D+5 e D+9, observou-se que houve aumento no número de células CD45+, no dia D+7, possivelmente por ação do supracitado estimulador de colônia, que aumenta a liberação de neutrófilos maduros do compartimento de reserva da medula óssea para a circulação (HAMMOND et al., 1991), neutrófilos estes que apresentam maior expressão de CD45, conforme COMAZZI et al. (2006).

As percentagens de células CD45+, na medula óssea dos cães linfomatosos, em remissão, submetidos à alta dose de ciclofosfamida seguida de transplante autólogo de medula óssea (grupo tratado), nos dias D-4, D+7, D+14 e D+28 do protocolo experimental, estão apresentadas na tabela 4, e ilustradas na figura 15.

**Tabela 4:** Valores percentuais individuais, médias e desvios-padrão obtidos para contagem de células CD45<sup>+</sup> na medula óssea em cães tratados (n=7) em diferentes momentos do período experimental. Jaboticabal, 2009.

ANIMAIS	DIAS			
	D-4	D+7	D+14	D+28
T1	77,3	83,7	76,1	86,6
T2	**	51,4	41,4	67,2
T3	73,8	20,6	74,5	86,3
T4	47	25,2	78,8	39,2
T5	38,5	30,5	33,6	61,8
T6	30,6	42,2	63,6	13,3
T7	41,7	8,1	49,6	**
MÉDIA	46,32	25,32	60,02	50,15
DP	16,47	12,56	18,59	31,20

\*\* Amostra perdida



**Figura 15:** Comportamento dos valores percentuais individuais e das médias de células CD45<sup>+</sup> na medula óssea em cães do grupo tratado (n=7) em diferentes momentos do período experimental. Jaboticabal, 2009.

Na tabela 5, estão apresentados os valores obtidos para as contagens globais de leucócitos, bem como valores percentuais e absolutos de células CD 45+ no sangue periférico em pacientes portadores de linfoma (n=5) e, na figura 16, estão estampados os valores absolutos individuais e médias das referidas células CD45<sup>+</sup> nos supracitados pacientes em diferentes momentos do período experimental.

**Tabela 5:** Valores individuais, médias e desvios-padrão obtidos para contagens globais de leucócitos, percentuais e absolutos de células CD45<sup>+</sup> no sangue periférico em cães tratados (n=7), em diferentes momentos do período experimental. Jaboticabal, 2009.

D-4	LEUCÓCITOS	% CD45+	CD45+
T1	9,3	42,6	3961,8
T2	8,2	**	**
T3	5,9	14,0	826
T4	6,1	37,5	2287,5
T5	2,4	21,2	508,8
T6	6,3	17,2	1083,6
T7	10,7	36,6	3916,2
<b>MÉDIA</b>	6,99	28,18	2097,32
<b>DP</b>	2,71	12,13	1548,42

\*\* Amostra perdida

D+14	LEUCÓCITOS	% CD45+	CD45+
T1	8,8	42,5	3740
T2	7,8	63,9	4984,2
T3	6,7	38,7	2592,9
T4	9,7	50,8	4927,6
T5	13,6	43,7	5943,2
T6	10,1	25,8	2605,8
T7	10,6	48,9	5183,4
<b>MÉDIA</b>	9,61	44,90	4282,44
<b>DP</b>	2,22	11,71	1318,99

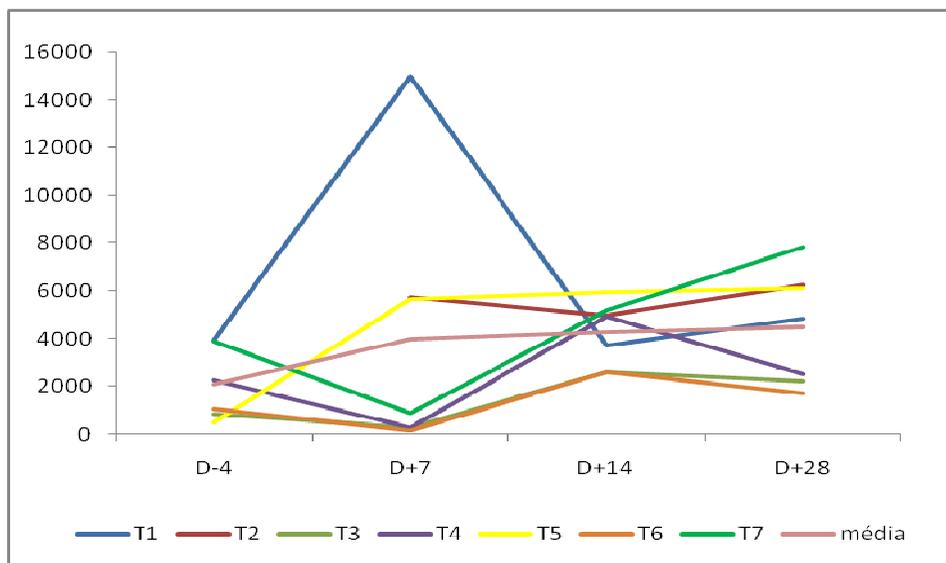
\*\* Amostra perdida

D+7	LEUCÓCITOS	% CD45+	CD45+
T1	20,9	71,6	14964,4
T2	9,9	58	5742
T3	2,9	9,9	287,1
T4	1,6	18,8	300,8
T5	13,3	42,4	5639,2
T6	3,2	5,2	166,4
T7	4,2	21,6	907,2
<b>MÉDIA</b>	8,0	32,5	4001,0
<b>DP</b>	7,10	25,30	5441,68

\*\* Amostra perdida

D+28	LEUCÓCITOS	% CD45+	CD45+
T1	8,9	54,4	4841,6
T2	15,8	39,5	6241
T3	7,2	30,5	2196
T4	7,1	35,5	2520,5
T5	15,1	40,5	6115,5
T6	7,3	23,3	1700,9
T7	13,8	56,9	7852,2
<b>MÉDIA</b>	10,74	40,09	4495,39
<b>DP</b>	3,98	12,13	2382,45

\*\* Amostra perdida



**Figura 16:** Comportamento dos valores absolutos individuais e das médias de células CD45<sup>+</sup> no sangue periférico em cães do grupo tratado (n=7) em diferentes momentos do período experimental. Jaboticabal, 2009.

ANIMAL T1 (G-CSF: dias D+3 e D+4). A percentagem de células CD45+ na medula óssea manteve-se elevada durante todo o período experimental, mas no sangue periférico houve elevação dos valores absolutos no dia D+7, ou seja, três dias após a suspensão da administração do G-CSF, coincidindo com a mais elevada contagem de leucócitos.

ANIMAL T2 (G-CSF: dias D+4 a D+8). A percentagem de células CD45+ na medula óssea apresentou redução no D+14, mas no sangue periférico os valores absolutos mantiveram-se estáveis e acima da média.

ANIMAL T3 (não recebeu o G-CSF). Para este paciente, a mais elevada percentagem de células CD45+ na medula óssea foi observada no dia D+28, entretanto os valores absolutos de tais células no sangue mantiveram-se bem abaixo da média durante todo o período.

ANIMAL T4 (G-CSF: dias D+5 a D+9). A mais elevada percentagem de células CD45+ na medula óssea e valores absolutos das mesmas células no sangue pôde ser observada no dia D+14.

ANIMAL T5 (G-CSF: D-4 e D-3; D+5 a D+9). Na medula óssea verificou-se elevação dos valores percentuais de células CD45+ acima da média somente no

D+28, em contra partida, no sangue, a partir do D+7 os valores absolutos das células em questão estavam acima da média e mostraram comportamento estável até o D+28.

ANIMAL T6 (G-CSF: dias D+5 a D+9). A percentagem de células CD45+ na medula óssea apresentou aumento no D+14 com acentuada redução no D+28. No sangue periférico os valores absolutos mantiveram-se abaixo da média, com discreta elevação no D+14.

ANIMAL T7 (não recebeu G-CSF). Na medula óssea, a mais elevada percentagem de células CD45+ foi observada no dia D+14, mas mesmo assim permaneceu abaixo da média. No sangue, os maiores valores absolutos das células em questão foram constatados no dia D+28.

Em um panorama geral, é possível observar que os valores encontrados para CD45+ na medula óssea e sangue periférico nos animais do grupo tratado foram bastante variáveis.

O indivíduo T1, durante todo o período experimental, apresentou elevada contagem de células CD+45, tanto na medula óssea quanto no sangue circulante.

Os dois animais que não foram tratados G-CSF (T3 e T7), apresentaram comportamento das células CD45+ semelhante tanto na medula óssea, quanto no sangue: redução no dia D+7 e aumento no dia D+14.

Na tabela 6 estão apresentados os resultados da análise de variância para a percentagem de CD45+ na medula óssea e valores absolutos das referidas células no sangue dos animais dos grupos controle e tratados.

**Tabela 6:** Resultados da análise de variância. Jaboticabal, 2009.

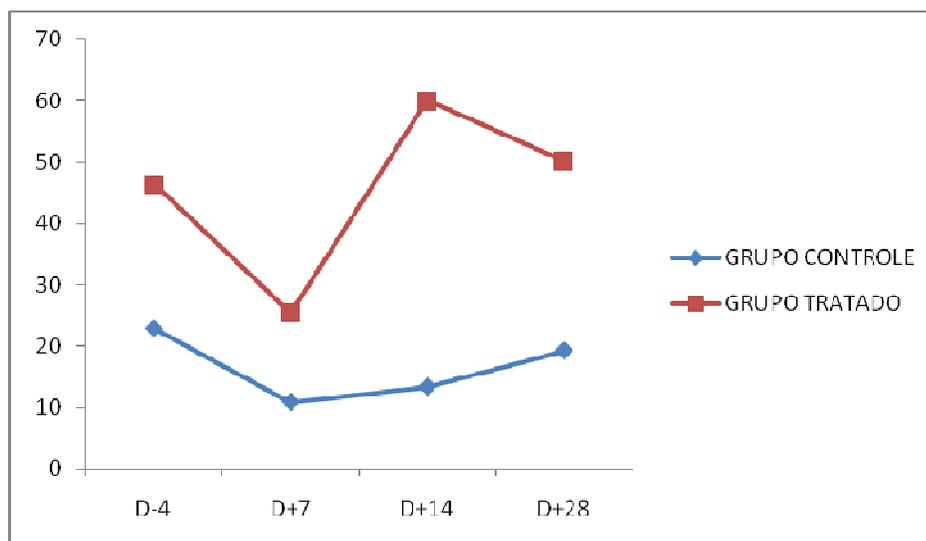
FONTE DE VARIAÇÃO	G.L.	VALOR DE p	
		CD45 (%) MO*	CD45 (SG)
<b>GRUPO</b>	1	0,0031	0,0266
<b>ANIMAL (GRUPO)</b>	10	-	-
<b>MOMENTO</b>	3	0,2779	< 0,0001
<b>GRUPO + MOMENTO</b>	3	0,5126	< 0,0001
<b>R<sup>2</sup></b>	-	0,75	0,81
<b>C.V.</b>	-	24,99	57,63

\* Valores transformados em arcoseno da raiz quadrada da proporção;  
 p<0,05 significativo a 5 %; p<0,01, significativo a 1%; p>0,05, não significativo a 5%.

Para a percentagem de CD45+ na medula óssea, verificou-se que não houve interação grupo x momento, ou seja, os grupos tiveram o mesmo comportamento ao longo do tempo ( $p=0,5126$ ). Não houve diferença significativa entre os momentos ( $p=0,2779$ ), mas houve entre os grupos ( $p=0,0031$ ), como se nota na tabela 7.

**Tabela 7:** Médias das percentagens de células CD45+ na medula óssea dos cães dos grupos controle e tratado. Jaboticabal, 2009.

GRUPO	DIAS				
	D-4	D+7	D+14	D+28	
CONTROLE	22,86	10,88	13,33	19,27	A
TRATADO	46,32	25,32	60,02	50,15	B

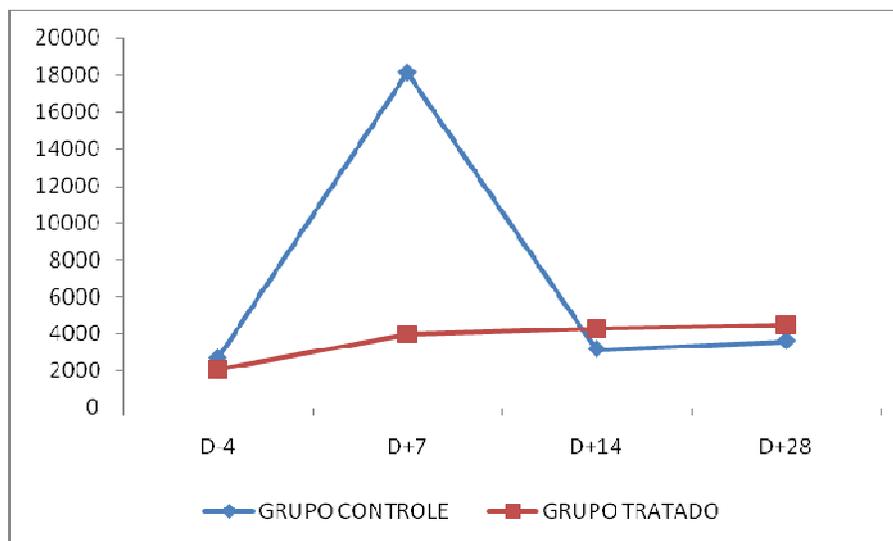


**Figura 17:** Médias das percentagens de células CD45+ na medula óssea dos cães dos grupos controle e tratado. Jaboticabal, 2009.

Para os valores absolutos de células CD45+ no sangue periférico, a interação grupo x momento foi significativa ( $p<0,0001$ ), ou seja, os grupos não tiveram o mesmo comportamento ao longo do tempo, como se observa claramente na figura 18.

**Tabela 8:** Médias dos valores absolutos de células CD45+ no sangue dos cães dos grupos controle e tratado. Jaboticabal, 2009.

GRUPO	DIAS			
	D-4	D+7	D+14	D+28
CONTROLE	2683,8	18138,94	3166,74	3611,46
TRATADO	2097,32	4001,01	4282,44	4495,39



**Figura 18:** Médias dos valores absolutos de células CD45+ no sangue dos cães dos grupos controle e tratado. Jaboticabal, 2009.

## VI. CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado este ensaio, cujo grupo de animais tratados foi estabelecido a partir da casuística de um hospital-escola, e que, portanto, foram mantidos durante toda a experimentação em seus domicílios e, com base nos resultados obtidos, analisados e devidamente interpretados, conclui-se que:

- a dose utilizada de ciclofosfamida (500mg/m<sup>2</sup>) não foi suficiente para condicionar adequadamente todos os animais

- alguns animais não apresentaram leucopenia após o condicionamento e não se fez necessária a utilização do fator estimulador de colônia

- novos estudos devem ser realizados para avaliar a recuperação medular sem o emprego do G-CSF após a alta dose de ciclofosfamida seguida de TMO, bem como para avaliar a recuperação medular com o uso exclusivo de G-CSF após alta dose de quimioterapia

- nenhum animal apresentou febre ou sepse após a alta dose de ciclofosfamida assim, pode-se comprovar o fato de que o uso do filgrastim leva a reduções significativas na incidência, severidade e duração da neutropenia

- a quantificação de células CD45+ em sangue e medula óssea de cães normais pode variar de um laboratório para outro, portanto recomenda-se que cada laboratório estabeleça seus próprios valores de referência

- o intervalo de sete dias, entre o autotransplante de células hematopoéticas e o reinício da avaliação do quadro sanguíneo (D+7), revelou-se demasiadamente longo de tal forma a não deixar sobressair possíveis alterações da crase leucocitária, já que as alterações no leucograma são verificadas decorridas poucas horas após o uso do G-CSF

- o aumento na quantidade de células CD45+ na medula óssea de cães tratados deveu-se aos efeitos combinados do autotransplante de células hematopoéticas e à ação do G-CSF

- animais hígidos apresentaram aumento no número de células CD45+ e leucócitos no sangue, durante exposição ao filgrastim, em função da ação estimuladora de colônia de granulócitos do referido fármaco.

## VII.REFERÊNCIAS

ACKLEY, C.D.; COPPER, M.D. Characterization of a feline T-cell-specific monoclonal antibody reactive with a Cd5-like molecule. **American Journal of Veterinary Research**, v.53, n. 4, p. 466-471, 1992.

ACKLEY, C.D. et al. Identification of a CD4 homologue in the cat. **Tissue Antigens**, v.35, n. 2, p. 92-98, 1990.

BARGER, A.M.; GRINDEM, C.B. Hematologic abnormalities associated with cancer therapy. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL J. G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 5.ed. Canada: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 676-681.

- BENBOUBKER, L.C. VALAT and C.LINASSIER et al., A new serologic index for low-grade non-Hodking's lymphoma based on initial CA125 and LDH serum levels. **Ann. of Oncology**, n. 11, p.1495-1491, 2000.
- BRAVO, L. et al. Serum granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and interleukin-1 (IL-1) concentrations after chemotherapy-induced neutropenia in normal and tumorbearing dogs. **Experimental Hematology**, v.24, n.1, p.11-17, 1996.
- BYRNE, K.M. et al. A standardized gating technique for the generation of cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.73, n.2, p.167-182, 2000.
- CARTER, R.F.; VALLI, V.E. Advances in the cytologic diagnosis of canine lymphoma. **Seminars in Veterinary Medicine Surgery (Small Animal)**, v.3, n.2, p.167-175, 1988.
- CHABANNE, L.; MARCHAL, T.; DENEROLLE, P.; MAGNOL, J. P.; FOURNEL, C.; MONIER, J. C.; RIGAL, D. Lymphocyte subset abnormalities in German shepherd dog pyoderma (GSP) **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.49, p.189-198, 1995.
- CHUN, J.K.; FAN, T.M.; LORIMIER, L. Treating lymphoma in dogs and cats. **Veterinary Medicine**, p 285-294, apr. 2000.
- CHUN, R. et al. Cancer chemotherapy. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. **Small animal clinical oncology**. 3. ed. Philadelphia: Saunders, 2001. cap.9, p.92-118.
- COBBOLD, S.; METCALFE, S. Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: summary of first canine antigen workshop (CLAW). **Tissue Antigens**, v.43, n.3, p. 137-154, 1994.
- COMAZZI, S. et al. Flow cytometric patterns in blood from dogs with non-neoplastic and neoplastic hematologic diseases using double labeling for CD18 and CD45. **Veterinary Clinical Pathology**, v.35, n.1, p. 47-54, 2006.
- CORREIA, J.J. **Contribuição para o estudo do linfoma maligno no cão**. 325 f. Tese (Doutorado em Patologia Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2006
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Patologia estrutural e funcional**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p. 561-569.

- COUTO, C.G. Management of complications of cancer chemotherapy. **Veterinary Clinics of North America – Small Animal Practice**, v.20, n.4, p.1037-1053, 1990.
- COUTO, C.G.; HAMMER, A.S. Afecções dos linfonodos e baço. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. São Paulo: Manole, 1997. cap.144, p.2667-2689.
- 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.
- COUTO, C. G. Oncologia: princípios de tratamento do câncer. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap. 78, p. 864-869.
- CULMSEE, K; NOLTE, I. Flow cytometry and its application in small animal oncology. **Methods Cell Science**, n.24, p49-54, 2002.
- CULMSEE, K., SIMON, D., MISCHKE, R. et al. Possibilities of flow cytometric analysis for immunophenotypic characterization of canine lymphoma. **Journal of Veterinary Medical Association**, v. 47, p.199-206, 2001.
- DAY, M.J. Immunophenotypic characterization of cutaneous lymphoid neoplasia in the dog and cat. **Journal Comparative Pathology**, v.112, p.79-96, 1995.
- DE CÁPIUA, M. L. B. et al. Autologous bone marrow transplantation in a dog with lymphoma: a clinical study. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.2, p.580-584, mar-abr, 2009.
- DE MOURA, V. M. B. D.; SEQUEIRA, J. L.; BANDARRA, E. P. Linfoma Canino. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v.2, n.2, p. 29-33, 1999.
- DE MOURA, V. M. B. D.; SEQUEIRA, J. L.; AMORIM, R. L.; BANDARRA, E. P. Aspectos epidemiológicos do linfoma canino (na região de Botucatu – SP). **Nosso Clínico**, v.6, n.31, p. 32-38, 2003.
- DHALIWAL, R.S.; KITCHELL, B.E.; MESSICK, J.B. Canine lymphosarcoma: clinical features. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.25, n.8, p.573-581, 2003.
- DILLON, A.B.; SPANO, J.S.; POWERS, H.D. Prednisolone induced hematologic, biochemical, and histologic changes in the dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.16, p.831-837, 1980.

- DOBSON, J.M.; GORMAN, N.T. Canine Multicentric Lymphoma. 2: Comparison of response two chemotherapeutic protocols. **Journal of Small Animal Practice**, v.35, p.9-15, 1994.
- EICHACKER, P.Q. et al. Cardiopulmonary effects of granulocyte colony-stimulating factor in a canine model of bacterial sepsis. **Journal of Applied Physiology**, v.77, n.5, p. 2366-2373, 1994.  
p.2366-73, 1994.
- FALDYNA, M. et al. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs – a flow cytometric study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.82, n.1-2, p.23-37, 2001.
- FAN, T. M.; KITCHELL, B. E. An update on diagnosing and treating canine lymphosarcoma. **Veterinary Medicine**, p.58-67, January. 2002.
- FAN, T.M.; LORIMIER, L. Treating lymphoma in dogs and cats. **Veterinary Medicine**, p.285-294, apr. 2005.
- FELDMAN, B.F. et al. **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1344p
- FOURNEL-FLEURY, C. The Lymph Node. In: \_\_\_\_\_ **Atlas en Couleur de Cytologie du Cancer chez le Chien et le Chat/ Color Atlas of Cancer Cytology of the Dog and Cat**. Conference Nationale des Vétérinaires Spécialisés en Petits Animaux, 1994. cap. 4.
- FRÁGUAS, M. S. **Estudo de casos de linfoma canino, ocorridos entre maio de 2003 e dezembro de 2006, junto ao Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da FCAV-UNESP-Jaboticabal**. 2008. 64 f. Monografia (Trabalho de Graduação em Ciências Biológicas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.
- FRAZIER, D. L.; HAHN, K. A. Commonly used drugs. In: HAHN, K. A.; RICHARDSON, R. C. **Cancer Chemotherapy - A veterinary handbook**. Malvern: Williams & Wilkins, 1995. p. 79-149.
- FRIMBERGER, A.E. et al. Autologous bone marrow support for submyeloablative chemotherapy dose intensification in canine lymphoma. **Experimental Hematology**, v.28, n.7, p.52, 2000.

- FURIE, W.S. Lymphoma presenting as complex anemia. **Canine Practice**, v.18, n.1, p.23-25, 1993.
- GASPER, P.W. The homopoietic system. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. cap. 11, p. 63-68.
- GREENLEE, P.G. et al. Lymphomas in dogs: a morphologic, immunologic, and clinical study. **Cancer**, Philadelphia, v.66, p.480-490, 1990.
- GRINDEM, C.B. Blood cell markers. **The Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, v.26, n.5, p. 1043-1065, 1996.
- 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.
- 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.
- 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.
- HORNING, S.J.; NADEMANEE, A.P. Autologous Hematopoietic Cell Transplantation for Non-Hodgkin Lymphoma. In: THOMAS, E.D.; BLUME, K.G.; FORMAN, S.J. **Hematopoietic cell transplantation**. Malden: Blackwell Science, 1999, cap. 80, p.939-951.
- HOROWITZ, M.M. Uses and Growth of Hematopoietic Cell Transplantation. In: THOMAS, E.D.; BLUME, K.G.; FORMAN, S.J. **Hematopoietic cell transplantation**. Malden: Blackwell Science, 1999. cap. 2, p. 12-18.
- JENNINGS, C.D.; FOON, K.A. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. **Blood**, v.90, n.8, p.2863-2892, 1997.
- JONES, C.T.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Veterinary Pathology**. 6 ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1997.

- KEREN, D.F. History and evolution of surface marker assay. In: KEREN, D.F.; HANSON, C.A.; HARTUBISE, P.E. **Flow cytometry and clinical diagnosis**. Chicago: American Society of Clinical Pathologists, 1994. p.1.
- KISSEBERTH, W.C.; MACEWEN, E.G. Complications of cancer and its treatment. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. **Small animal clinical oncology**. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1996, cap. 13, p.129-146.
- KITCHELL, B. E.; DHALIWAL, R. S. Hematology, oncology, imunology: CVT update: anticancer drugs and protocols using traditional drugs. In: KIRK, R. W.; BONAGURA, J. D. **Current veterinary therapy XIII – small animal practice**. Philadelphia: Saunders, 2000. p. 465-473.
- KIUPEL, M.; TESKE, E.; BOSTOCK, D. Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. **Veterinary Pathology**, v.36, p.292-300, 1999.
- KOCHEVAR D. T.; MEALEY K. Principles of cancer chemotherapy. **Veterinary Medicine**, p. 339-349, April. 1997.
- LANORE, D.; DELPRAT, C. **Quimioterapia anticancerígena**. São Paulo: Rocca, 2004. cap. 4, p. 53-78.
- LATIMER, K.S. Leucócitos na saúde e na moléstia. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de medicina interna veterinária**. São Paulo: Manole, 1997. p.2616-2666.
- LEIFER, C.E.; MATUS, R.E. Chronic lymphocytic leukemia in dog: 22 cases (1974-1984). **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 189, n. 2, p. 214-217, 1986.
- LORAND-METZE, I. Contribuição da citometria de fluxo para o diagnóstico e prognóstico das síndromes mielodisplásicas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 3, p. 178-181, 2006.
- LU, L. et al. Stem cells from bone marrow, umbilical cord blood and peripheral blood for clinical application: current status and future application. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Boca Raton, v.22, p.61-78, 1996.
- LUCIDI, C. A.; 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, 2007.

- LUNN, D.P. et al. Summary report of the second Equine Leukocyte Antigen Workshop. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 54, n.1-4, p. 159-161, 1996.
- MAC VITTIE, T.J. et al. Defining the full therapeutic potential of recombinant growth factors in the post radiation-accident environment: the effect of supportive care plus administration of G-CSF. **Health Physics**, v.89, n.5, p.546-555, 2005.
- MADEWELL, B.R.; FELDMAN, B.F. Characterization of anemias with neoplasia in small animals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.176, n.5, p.419-425, 1980
- MACEWEN, E. G.; YOUNG, K. M. Canine lymphoma and lymphoid leukemias. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Small animal clinical oncology**, 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1996. cap. 28 B, p. 451-479.
- MISHU, L. et al. Effects of recombinant canine granulocyte colony-stimulating factor on white blood cell production in clinically normal and neutropenic dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.200, n.12,p.1957-1964, 1992.
- MORENO, K.; BRACARENSE, A.P.F.R.L. Estudo retrospectivo de linfoma canino no período de 1990-2004 na região norte do Paraná. **Brazilian Journal of Veterinary Research of Animal Science**, v.44, supl., p. 46-52, 2007.
- MORRISON, W. B. Commonly used protocols: Canine lymphoproliferative neoplasms: Doxorubicin. In: HAHN, K. A.; RICHARDSON; R. C. **Cancer Chemotherapy - a veterinary handbook**. Malvern: Williams & Wilkins, 1998, p. 156.
- MORRISON, W.B. **Lymphoma in dogs and cats**. Jackson: Teton NewMedia, 2005. p. 124.
- MOULTON, J.E.; HARVEY, J.W. Tumors of the lymphoid and hematopoietic tissues. In: MOULTON, J.E. **Tumors in domestic animals**. 3. ed. Berkeley: University of California Press, 1990. p. 231.
- MYERS, N.C.; MOORE, A.S.; RAND, W.M.; GLIATTO, J.; COTTER, S.M. Evaluation of multidrug protocol (ACOPA II) in dogs with lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 11, n.6, p. 333-339, 1997.
- NAESSENS, J. et al. Nomenclature and characterization of leukocyte differentiation antigens in ruminants. **Immunology Today**, v.18, n.8, p.365-368, 1997.

- 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, jul-ago, 2005.
- NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina interna de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 1087-1096.
- NGUYEN, D.T.; DIAMOND, L.W.; BRAYLAN, R.C. **Flow cytometry in hematopathology: a visual approach to data analysis and interpretation**. Humana Press, 2007. 220 p.
- NOTHDURFT, W. et al. Acceleration of hemopoietic 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.
- OBRADOVICH, J.E. et al. Effect of recombinant canine granulocyte colony-stimulating factor on peripheral blood neutrophil counts in normal cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.7, n.2, p.65-67, 1993.
- OGILVIE, G. K.; MOORE, A.S. Management of Specific Diseases: Clinical Briefing: Lymphoma. In:\_\_\_\_\_, **Managing the veterinary cancer patient**. Trenton: Veterinary Learning Systems, 1995. p. 228-259.
- 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.
- OWEN, L. **TNM Classification of tumors in domestic animals**. World Health Organization, 1980. p.46-47.
- 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.
- PAXTON, H. et al. Results of the flow cytometry ACTG quality control program: analysis and findings. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v.52, n.1, p.68-84, 1989.

- RALLIS, T., KOUTINAS, A., LEKKAS, S. et al. Lymphoma in the dog. **Journal of Small Animal Practice**, v.33, p.590-596, 1992.
- RASKIN, R.E. **Atlas de citologia de caes e gatos**. Sao Paulo: Rocca, 2003 p. 79-112.
- RASKIN, R.E.; KRENBIEL, J.D. Prevalence of leukaemia blood and bone marrow in dogs with multicentric lymphoma. **Journal of American Veterinary Association**, Schaumburg, v.194, n.10, 1989, p.1427-1429.
- REWERTS, J.M.; HENRY, C.J. Veterinary uses of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. Part II. Infectious Diseases. **Compendium on continuing education for the practicing veterinarian**, v.20, n.7, p.823-827, 1998.
- RICHMAN, C.M. et al. Purification and characterization of granulocytic progenitor cells (CFU-C) from human peripheral blood using immunologic surface markers. **Blood**, New York, v. 51, n.1, 1978, p.1-8.
- RODASK, S.; DE NARDI, A.B. **Quimioterapia Antineoplásica em cães e gatos**. São Paulo: MedVet Livros, 2008.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. Sao Paulo: Manole, 1999. 424p.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. Sao Paulo: Manole, 2003. 481p.
- ROSENTHAL, C.R.; MACEWEN, E. G. Treatment of lymphoma in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 5, 1990, p. 774-781.
- RUBIN, E. The blood and the lymphoid organs. In: RUBIN, E.; FARBER, J.L. **Pathology**. 2. ed. Philadelphia: Lippincott Company, 1994. cap. 20.
- SAALMULLER, A. Characterization of swine leukocyte differentiation antigens. **Immunology Today**, v.17, n.8, p.352-354, 1996.
- SEQUEIRA, J.L., FRANCO, M., BANDARRA, E.P. et al. Características anatoclínicas dos linfomas caninos na região de Botucatu, São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.3, 1999, p.1-11.
- SOZMEN, M.; TASCA, S.; CARLI, E.; DE LORENZI, D.; FURLANELLO, T.; CALDIN, M. Use of fine needle aspirates and flow cytometry for the diagnosis, classification, and immunophenotyping of canine lymphomas. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, p. 323-329, 2005.
- STOCKHAM, S.L.; KEETON, K.S.; SZLADOVITS, B. Clinical assessment of leukocytosis: distinguishing leukocytoses caused by inflammatory, glucocorticoid,

physiologic, and leukemic disorders or conduction. **The veterinary clinics of North America – Small animal practice**, v.33, p.1335-1357, 2003.

STORB, R. et al. DLA-identical bone marrow grafts after lowdose total body irradiation: the effect of canine recombinant hematopoietic growth factors. **Blood**, v.84, n.10, p.3558-3566, 1994.

TESKE, E.; HEERDE P.V.; RUTTERMAN, G. R.; KURZMAN I. D.; MOORE, P. F.; MACEWEN E.G. Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 205, n. 12, p. 1722-1728, 1994.

THOMASSON, B. et al. Direct comparison of steady-state marrow, primed marrow, and mobilized peripheral blood for transduction of hematopoietic stem cells in dogs. **Human Gene Therapy**, v.14, n.17, p.1683-1686, 2003.

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

TOMPKINS, M. B.; GEBHARD, D. H.; BINGHAM, H. R.; HAMILTON, M. J.; DAVIS, W. C.; TOMPKINS, W. A. F. Characterization of monoclonal antibodies to feline T lymphocytes and their use in the analysis of lymphocyte tissue distribution in the cat. **Veterinary Immunology Immunopathology**, n.26, p.305-317, 1991.

VAIL, D.M. Lymphoma. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. cap. 91, p. 620-625.

VAIL, D.M. Lymphoma. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2003. cap. 4, p. 79-112

VAIL, D. M.; OGILVIE, G. K. Neoplasias Linfóides. In: BICHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders – clínica de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 1998. cap. 6, p. 218-225.

VALLI, V.E.O. The hematopoietic system.In: JUBB, K.V.F., KENNEDY, P.C., PALMER, N. (Ed) **Pathology of domestic animals**. 6.ed. New York: Academic, 1993. v.3, p.149-153.

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

WEISS, D.J. Flow cytometric and immunophenotypic evaluation of canine lymphoproliferative disorders. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.15, n.5, p.589-594, 2001.

WEISS, D.J. Differential counting of bone marrow by flow cytometry. In: **55th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ACVP) & 39th Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology (ASVCP)**. Middleton: American College of Veterinary Pathologists & American Society for Veterinary Clinical Pathology, 2004a. Ithaca: International Veterinary Information Service ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)).

WEISS, D.J. Flow cytometric evaluation of canine bone marrow based on intracytoplasmic complexity and CD45 expression. **Veterinary Clinical Pathology Journal**. v.33, n.2, 2004b, p.96-101.

WILLETT, B.J. et al. Identification of a putative cellular receptor for feline immunodeficiency virus as the feline homologue of CD9. **Immunology**, v.81, n.2, p.228- 233, 1994.

WITTE, T. DE et al. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor accelerates neutrophil and monocyte recovery after allogeneic T-cell- depleted bone marrow transplantation. **Blood**. Disponível em: <<http://www.bloodjournal.org> at CAPES CONSORTIUM>. Acesso em: 28/maio/2009.

WOO, J.C.; MOORE, P.F. A feline homologue of CD1 is defined using a feline specific monoclonal antibody. **Tissue Antigens**, v.49, n.3, p.244-251, 1997.

ZAR, H. J. **Biostatistical analysis**. 4. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1999. 663p.

## APÊNDICES

**APÊNDICE A:** Valores de referência para hemograma de cães. Jaboticabal, 2009.

<b>PARÂMETRO</b>	<b>VALOR</b>
<b>Hemácias</b> ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	<b>5,5 – 8,0</b>
<b>Hemoglobina</b> (g/dL)	<b>12,0 – 18,0</b>
<b>Hematócrito (%)</b>	<b>37 - 55</b>
<b>VCM</b> (fL)	<b>60 - 77</b>
<b>CHCM</b> (g/dL)	<b>31 - 34</b>
<b>Plaquetas</b> ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	<b>180 - 400</b>
<b>Leucócitos</b> ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	<b>6-18</b>
<b>Basófilos</b> (cél/s/ $\mu\text{L}$ )	<b>0</b>
<b>Eosinófilos</b> (cél/s/ $\mu\text{L}$ )	<b>120 – 1800</b>
<b>Bastonetes</b> (cél/s/ $\mu\text{L}$ )	<b>0 - 500</b>
<b>Segmentados</b> (cél/s/ $\mu\text{L}$ )	<b>3600 - 13800</b>
<b>Linfócitos</b> (cél/s/ $\mu\text{L}$ )	<b>720 - 5400</b>
<b>Monócitos</b> (cél/s/ $\mu\text{L}$ )	<b>180 - 1800</b>

Fonte: LPCV - Hospital Veterinário da FCAV/UNESPJaboticabal.

**APÊNDICE B:** Valores de referência para contagens totais de leucócitos e fórmulas leucocitárias relativa e absoluta. Jaboticabal, 2009.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>VALORES RELATIVOS (%)</b>	<b>VALORES ABSOLUTOS (cél/s/<math>\mu\text{L}</math>)</b>
<b>Leucócitos</b>	<b>**</b>	<b>6000 – 18000</b>
<b>Basófilos</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Eosinófilos</b>	<b>2-10</b>	<b>120 – 1800</b>
<b>Bastonetes</b>	<b>0-3</b>	<b>0 – 500</b>
<b>Segmentados</b>	<b>60-77</b>	<b>3600 – 13800</b>
<b>Linfócitos</b>	<b>13-30</b>	<b>720 – 5400</b>
<b>Monócitos</b>	<b>3-10</b>	<b>180 – 1800</b>

Fonte: LPCV - Hospital Veterinário da FCAV/UNESPJaboticabal.

**APÊNDICE C:** Protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin (M-W). Jaboticabal, 2009.

Semanas	Vincristina	L-asparaginase	Ciclofosfamida	Doxorrubicina	Prednisona
Indução					
	0,75 mg/m <sup>2</sup>	400 UI/kg	250 mg/m <sup>2</sup>	30 mg/m <sup>2</sup>	
1	X	X	-	-	2,0 mg/kg/dia
2	-	-	X	-	1,5 mg/kg/dia
3	X	-	-	-	1,0 mg/kg/dia
4	-	-	-	X	0,5 mg/kg/dia
6	X	-	-	-	-
7	-	-	X	-	-
8	X	-	-	-	-
9	-	-	-	X	-
Manutenção					
11	X	-	-	-	-
13	-	-	X	-	-
15	X	-	-	-	-
17	-	-	-	X	-
19	X	-	-	-	-
21	-	-	X	-	-
23	X	-	-	-	-
25	-	-	-	X	-

**APÊNDICE D** – Informações referentes ao Animal 1 do grupo tratado, no momento do diagnóstico do linfoma e ao longo do protocolo quimioterápico de M-W, antes do TMO.

**Tabela D1:** Informações gerais obtidas no momento do diagnóstico do linfoma referentes ao Animal 1 do grupo tratado. Jaboticabal, 2009.

<b>Raça</b>	Rottweiler
<b>Idade (anos)</b>	3,5
<b>Sexo</b>	Fêmea
<b>Peso (kg)</b>	34,3
<b>Sinais clínicos</b>	Hiporexia, apatia, emagrecimento progressivo, presença de um nódulo cutâneo em região cervical
<b>Tempo de evolução</b>	Um ano
<b>Método Diagnóstico</b>	CAAF do nódulo cutâneo
<b>Classificação anatômica</b>	Cutâneo
<b>Estadiamento clínico</b>	Vb
<b>Observações</b>	Sem comprometimento dos linfonodos

**Tabela D2:** Evolução clínica do Animal 1 grupo tratado ao longo do tratamento. Jaboticabal, 2009.

<b>Semana da quimioterapia</b>	<b>Evolução clínica</b>	<b>Observações</b>
<b>S1</b>	-	-
<b>S2</b>	DE	Suspensão da quimioterapia devido à leucopenia (2,8 leucócitos x10 <sup>6</sup> /μL)
<b>S3</b>	RC	Diminuição em 100% da massa tumoral
<b>S4</b>	RC	-
<b>S5</b>	RC	Apatia e hiporexia
<b>S6</b>	-	Intervalo do protocolo quimioterápico
<b>S7</b>	RC	Apatia e hiporexia
<b>S8</b>	RC	-
<b>S9</b>	RC	-
<b>S10</b>	RC	-
<b>S11</b>	-	Intervalo do protocolo
<b>S12</b>	RC	-
<b>S13</b>	RC	Avaliação pré-TMO
<b>S14</b>	RC	TMO autólogo

\* S: semana do protocolo quimioterápico; DE: doença estável; RC: remissão completa.

**APÊNDICE E** – Informações referentes ao Animal 2 do grupo tratado, no momento do diagnóstico do linfoma e ao longo do protocolo quimioterápico de M-W, antes do TMO.

**Tabela E1:** Informações gerais obtidas no momento do diagnóstico do linfoma referentes ao Animal 2 do grupo tratado. Jaboticabal, 2009.

<b>Raça</b>	SRD
<b>Idade (anos)</b>	Seis
<b>Sexo</b>	Fêmea
<b>Peso (kg)</b>	39
<b>Sinais clínicos</b>	Hiporexia, dificuldade respiratória e aumento de volume abdominal
<b>Tempo de evolução</b>	Dois dias
<b>Método Diagnóstico</b>	Exame citopatológico de líquido pericárdico. Exame radiográfico (aumento de área cardíaca e presença de líquido no pericárdio). Exame ecocardiográfico (presença de uma massa no ventrículo esquerdo)
<b>Classificação anatômica</b>	Extranodal (cardíaco)
<b>Estadiamento clínico</b>	Vb
<b>Observações</b>	Sem comprometimento de linfonodos. Análise citoscópica das efusões pleural e abdominal revelou componente inflamatório (pleurite e peritonite, respectivamente)

**Tabela E2:** Evolução clínica do Animal 2 do grupo tratado ao longo do tratamento. Jaboticabal, 2009.

<b>Semana da quimioterapia</b>	<b>Evolução clínica</b>	<b>Observações</b>
<b>S1</b>	-	-
<b>S2</b>	DE	-
<b>S3</b>	DE	-
<b>S4</b>	RC	Desaparecimento da massa tumoral cardíaca e ausência de efusões pericárdica, pleural e abdominal
<b>S5</b>	-	Intervalo do protocolo quimioterápico
<b>S6</b>	RC	-
<b>S7</b>	RC	-
<b>S8</b>	RC	-
<b>S10</b>	RC	Avaliação pré-TMO
<b>S11</b>	RC	TMO autólogo

\* S: semana do protocolo quimioterápico; DE: doença estável; RC: remissão completa.

**APÊNDICE F** – Informações referentes ao Animal 3 do grupo tratado, no momento do diagnóstico do linfoma e ao longo do protocolo quimioterápico de M-W, antes do TMO.

**Tabela F1:** Informações gerais obtidas no momento do diagnóstico do linfoma referentes ao Animal 3 do grupo tratado. Jaboticabal, 2009.

<b>Raça</b>	Rottweiler
<b>Idade (anos)</b>	Nove
<b>Sexo</b>	Macho
<b>Peso (kg)</b>	35,5
<b>Sinais clínicos</b>	Presença de diversos nódulos cutâneos nas regiões do pescoço e membro torácico esquerdo.
<b>Tempo de evolução</b>	15 dias
<b>Método Diagnóstico</b>	CAAF dos nódulos cutâneos
<b>Classificação anatômica</b>	Cutâneo
<b>Estadiamento clínico</b>	Va
<b>Observações</b>	Sem comprometimento de linfonodos

**Tabela F2:** Evolução clínica do Animal 3 do grupo tratado ao longo do tratamento. Jaboticabal, 2009.

<b>Semana da quimioterapia</b>	<b>Evolução clínica</b>	<b>Observações</b>
<b>S1</b>	-	-
<b>S2</b>	DE	-
<b>S3</b>	RP	Desaparecimento dos nódulos cutâneos com exceção daquele localizado no membro torácico
<b>S4</b>	RP	Quadro de diarreia e vômitos após a quimioterapia.
<b>S5</b>	-	Intervalo do protocolo quimioterápico
<b>S6</b>	RP	-
<b>S7</b>	RP	-
<b>S8</b>	RP	-
<b>S9</b>	RP	-
<b>S10</b>	RP	Avaliação pré-TMO. Ao exame ultra-sonográfico verificou-se a presença de múltiplos cistos prostáticos
<b>S11</b>	RP	TMO autólogo. Extirpação cirúrgica do nódulo cutâneo e posterior análise histopatológica

\* S: semana do protocolo quimioterápico; DE: doença estável; RP: remissão parcial.

**APÊNDICE G** - Informações referentes ao Animal 4 do grupo tratado, no momento do diagnóstico do linfoma e ao longo do protocolo quimioterápico de M-W, antes do TMO.

**Tabela G1:** Informações gerais obtidas no momento do diagnóstico referentes ao Animal 4 do grupo tratado. Jaboticabal, 2009.

<b>Raça</b>	SRD
<b>Idade (anos)</b>	Oito anos e 10 meses
<b>Sexo</b>	Macho
<b>Peso (kg)</b>	28,8
<b>Sinais clínicos</b>	Presença de três nódulos cutâneos no flanco esquerd.
<b>Tempo de evolução</b>	Um ano
<b>Método Diagnóstico</b>	Exame histopatológico de nódulo cutâneo retirado há um ano e CAAF dos nódulos cutâneos atuais
<b>Classificação anatômica</b>	Cutâneo
<b>Estadiamento clínico</b>	Va
<b>Observações</b>	Animal havia sido tratado anteriormente por colega veterinário com as drogas prednisona e vincristina encontrava-se na segunda recidiva da doença

**Tabela G2:** Evolução clínica do Animal 4 do grupo tratado ao longo do tratamento. Jaboticabal, 2009.

<b>Semanas da quimioterapia</b>	<b>Evolução clínica</b>	<b>Observações</b>
<b>S1</b>	-	-
<b>S2</b>	RC	Quadro de diarreia.
<b>S3</b>	RC	Hematúria
<b>S4</b>	RC	-
<b>S5</b>	-	Intervalo do protocolo quimioterápico
<b>S6</b>	RC	Hiporexia
<b>S7</b>	RC	-
<b>S8</b>	RC	Quimioterapia realizada na cidade de residência do proprietário em decorrência dos feriados de final de ano
<b>S9</b>	RC	Suspensão da quimioterapia devido à leucopenia
<b>S10</b>	Recidiva	Surgimento de novos nódulos cutâneos Reindução da remissão com Lomustina (80mg/m <sup>2</sup> ).
<b>S11</b>	RC	Não foi realizada quimioterapia
<b>S12</b>	RC	-
<b>S13</b>	RC	Avaliação pré-TMO. Leucopenia (2,3 x10 <sup>3</sup> leucócitos/ $\mu$ L). Iniciou uso do Filgrastim (5 $\mu$ g/kg/SID) por quatro dias.
<b>S14</b>	RC	TMO autólogo.

\* S: semana do protocolo quimioterápico; DE: doença estável; RC: remissão completa.

**APÊNDICE H** – Informações referentes ao Animal 5 do grupo tratado, no momento do diagnóstico do linfoma e ao longo do protocolo quimioterápico de M-W, antes do TMO.

**Tabela H1:** Informações gerais obtidas no momento do diagnóstico do linfoma referentes ao Animal 5 do grupo tratado. Jaboticabal, 2009.

<b>Raça</b>	Labrador
<b>Idade (anos)</b>	6,5
<b>Sexo</b>	Macho
<b>Peso (kg)</b>	29
<b>Sinais clínicos</b>	Hiporexia, aumento dos linfonodos submandibulares e poplíteos
<b>Tempo de evolução</b>	Um mês
<b>Método Diagnóstico</b>	CAAF dos linfonodos submandibulares e poplíteos
<b>Classificação anatômica</b>	Multicêntrico
<b>Estadiamento clínico</b>	Ila
<b>Observações</b>	-

**Tabela H2:** Evolução clínica do Animal 5 do grupo tratado ao longo do tratamento. Jaboticabal, 2009.

<b>Semanas da quimioterapia</b>	<b>Evolução clínica</b>	<b>Observações</b>
<b>S1</b>	-	-
<b>S2</b>	RC	-
<b>S3</b>	RC	-
<b>S4</b>	RC	-
<b>S5</b>	-	Intervalo do protocolo quimioterápico
<b>S6</b>	RC	-
<b>S7</b>	RC	-
<b>S8</b>	RC	-
<b>S9</b>	RC	-
<b>S10</b>	RC	Avaliação pré-TMO
<b>S11</b>	RC	TMO autólogo

\* S: semana do protocolo quimioterápico; DE: doença estável; RC: remissão completa.

**APÊNDICE I**– Informações referentes ao Animal 6 do grupo tratado, no momento do diagnóstico do linfoma e ao longo do protocolo quimioterápico de M-W, antes do TMO.

**Tabela I1:** Informações gerais obtidas no momento do diagnóstico do linfoma referentes ao Animal 6 do grupo tratado. Jaboticabal, 2009.

<b>Raça</b>	Cocker Spaniel
<b>Idade (anos)</b>	Nove
<b>Sexo</b>	Fêmea
<b>Peso (kg)</b>	13,1
<b>Sinais clínicos</b>	Presença de um nódulo na orelha esquerda de cerca de 1 cm
<b>Tempo de evolução</b>	Três meses
<b>Método Diagnóstico</b>	Exame histopatológico do nódulo cutâneo após excisão cirúrgica do mesmo
<b>Classificação anatômica</b>	Cutâneo
<b>Estadiamento clínico</b>	Va
<b>Observações</b>	Histórico de tumor mamário e mastectomia total há um ano

**Tabela I2:** Evolução clínica do Animal 6 do grupo tratado ao longo do tratamento. Jaboticabal, 2009.

<b>Semanas do protocolo quimioterápico</b>	<b>Evolução clínica</b>	<b>Observações</b>
<b>S1</b>	-	Otite ouvido direito.
<b>S2</b>	RC	Quadro de apatia após a quimioterapia anterior.
<b>S3</b>	RC	-
<b>S4</b>	RC	-
<b>S5</b>	-	Intervalo do protocolo.
<b>S6</b>	RC	-
<b>S7</b>	RC	-
<b>S8</b>	RC	-
<b>S9</b>	RC	-
<b>S10</b>	RC	Avaliação pré-TMO.
<b>S11</b>	RC	TMO autólogo.

\* S: semana do protocolo quimioterápico; DE: doença estável; RC: remissão completa.

**APÊNDICE J** – Informações referentes ao Animal 7 do grupo tratado, no momento do diagnóstico do linfoma e ao longo do protocolo quimioterápico de M-W, antes do TMO.

**Tabela J1:** Informações gerais obtidas no momento do diagnóstico do linfoma referentes ao Animal 7 do grupo tratado. Jaboticabal, 2009.

<b>Raça</b>	Golden Retriever
<b>Idade (anos)</b>	Três
<b>Sexo</b>	Fêmea
<b>Peso (kg)</b>	35
<b>Sinais clínicos</b>	Hiporexia, apatia, aumento de linfonodos submandibulares e poplíteos
<b>Tempo de evolução</b>	Uma semana
<b>Método Diagnóstico</b>	CAAF dos linfonodos e medula óssea
<b>Classificação anatômica</b>	Multicêntrico
<b>Estadiamento clínico</b>	Vb
<b>Observações</b>	Infiltração de células linfomatosas na medula óssea e no sangue periférico

**Tabela J2:** Evolução clínica do Animal 7 do grupo tratado ao longo do tratamento. Jaboticabal, 2009.

<b>Semanas da quimioterapia</b>	<b>Evolução clínica</b>	<b>Observações</b>
<b>S1</b>	-	-
<b>S2</b>	DE	-
<b>S3</b>	RC	-
<b>S4</b>	RC	-
<b>S5</b>	-	Intervalo do protocolo
<b>S6</b>	RC	-
<b>S7</b>	RC	-
<b>S8</b>	RC	-
<b>S9</b>	RC	-
<b>S10</b>	RC	Avaliação pré-TMO
<b>S11</b>	RC	TMO autólogo

\*S: semana do protocolo quimioterápico; DE: doença estável; RC: remissão completa.



**APÊNDICE K:** Valores individuais obtidos para contagens globais e diferenciais de leucócitos no sangue periférico em cães tratados (n=7), em diferentes momentos do período experimental. Jaboticabal, 2009.

T1	D-4	D-2	D-1	D0	D+7	D+8	D+9	D+10	D+13	D+14	D+15	D+16	D+28
<b>Leu</b> ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	9,3	8,3	6,6	9,3	20,9	17,8	7,4	12,1	10,2	8,8	**	7,4	8,9
<b>Bas</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**	0	0
<b>Eos</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	465	581	66	465	627	178	1258	1210	306	528	**	1258	534
<b>Bast</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	186	0	132	186	209	534	0	0	306	176	**	0	178
<b>Seg</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	5859	5312	4092	5859	14212	12460	3404	7381	7038	6072	**	3404	5340
<b>Linf</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	2418	2241	1980	2418	5016	3916	2590	3267	2142	1672	**	2590	2759
<b>Mon</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	372	166	330	372	836	712	148	242	408	352	**	148	89
T2	D-4	D-2	D-1	D0	D+7	D+8	D+9	D+10	D+13	D+14	D+15	D+16	D+28
<b>Leu</b> ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	8,2	11,1	**	3,3	9,9	23,4	11,6	7,6	**	7,8	8,1	10,9	15,8
<b>Bas</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	0	0	**	66	198	0	116	76	**	0	0	0	0
<b>Eos</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	738	1110	**	594	495	702	1044	608	**	1170	486	654	2686
<b>Bast</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	0	0	**	33	396	0	232	152	**	0	0	218	0
<b>Seg</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	6560	8880	**	1881	6633	20124	8120	5168	**	5538	5994	8720	11692
<b>Linf</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	738	777	**	660	1683	2106	1508	1368	**	702	1377	872	1106
<b>Mon</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	164	333	**	66	495	468	580	228	**	390	243	436	316

T3	D-4	D-2	D-1	D0	D+7	D+8	D+9	D+10	D+13	D+14	D+15	D+16	D+28
<b>Leu</b> (x10 <sup>3</sup> /µL)	5,9	15,5	10,2	4,0	2,9	**	5,3	6,9	7,0	6,7	8,0	**	7,2
<b>Bas</b> (célis/µL)	0	0	102	0	0	**	0	69	0	0	160	**	0
<b>Eos</b> (célis/µL)	118	310	612	120	580	**	318	552	210	402	1120	**	288
<b>Bast</b> (célis/µL)	177	0	0	0	0	**	159	69	0	0	0	**	0
<b>Seg</b> (célis/µL)	3540	12090	5100	2720	812	**	901	4347	5180	4288	4480	**	5688
<b>Linf</b> (célis/µL)	1711	2635	3060	1040	1218	**	3657	1173	1050	1675	1920	**	936
<b>Mon</b> (célis/µL)	354	465	1326	120	290	**	265	690	560	335	320	**	288

T4	D-4	D-2	D-1	D0	D+7	D+8	D+9	D+10	D+13	D+14	D+15	D+16	D+28
<b>Leu</b> (x10 <sup>3</sup> /µL)	6,1	4,2	3,6	3,5	1,6	6,9	11,1	13,7	7,2	9,7	5,9	7,8	7,1
<b>Bas</b> (célis/µL)	61	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Eos</b> (célis/µL)	61	42	144	35	224	138	333	137	0	194	59	312	0
<b>Bast</b> (célis/µL)	122	84	0	0	192	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Seg</b> (célis/µL)	5246	3192	2916	3325	800	6348	9102	11508	6624	8536	5428	7098	6532
<b>Linf</b> (célis/µL)	488	756	468	140	320	414	888	1781	576	873	354	390	213
<b>Mon</b> (célis/µL)	122	126	72	0	64	0	777	274	0	97	59	0	355

T5	D-4	D-2	D-1	D0	D+7	D+8	D+9	D+10	D+13	D+14	D+15	D+16	D+28
<b>Leu</b> (x10 <sup>3</sup> /µL)	2,4	39,2	9,8	7,5	13,3	14,1	20,1	13,4	13,2	13,6	15,0	17,8	15,1
<b>Bas</b> (célis/µL)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Eos</b> (célis/µL)	192	1176	0	150	133	564	0	402	528	272	300	178	604
<b>Bast</b> (célis/µL)	0	784	0	0	399	282	402	0	528	136	0	178	0
<b>Seg</b> (célis/µL)	240	29792	7644	6300	9975	8037	15276	9112	8184	9792	10500	13706	11023
<b>Linf</b> (célis/µL)	1584	3920	1666	1050	2261	4512	3417	3216	2640	2448	3600	3026	2718
<b>Mon</b> (célis/µL)	384	3528	490	0	532	705	1005	670	1320	952	600	712	755

T6	D-4	D-2	D-1	D0	D+7	D+8	D+9	D+10	D+13	D+14	D+15	D+16	D+28
<b>Leu</b> ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	6,3	**	4,4	4,0	3,2	14,4	31,6	**	13,4	10,1	10,0	10,2	7,3
<b>Bas</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	0	**	0	0	0	0	0	**	0	0	0	0	0
<b>Eos</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	378	**	440	360	768	144	0	**	134	202	1000	612	730
<b>Bast</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	0	**	88	0	128	144	2844	**	402	101	0	0	146
<b>Seg</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	5418	**	2728	3360	1280	10512	26544	**	11390	9494	7600	8772	5840
<b>Linf</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	315	**	880	240	384	2448	1580	**	1072	202	700	612	511
<b>Mon</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	189	**	264	40	640	1152	632	**	402	101	700	204	73

T7	D-4	D-2	D-1	D0	D+7	D+8	D+9	D+10	D+13	D+14	D+15	D+16	D+28
<b>Leu</b> ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	10,7	9,6	5,0	3,4	4,2	5,2	6,2	9,8	10,3	10,6	11,0	**	13,8
<b>Bas</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**	0
<b>Eos</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	642	672	600	102	126	104	62	98	618	954	110	**	828
<b>Bast</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	0	0	50	0	168	52	124	98	412	0	220	**	276
<b>Seg</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	5992	4800	1800	2312	630	2600	2852	7644	4017	5936	7370	**	9798
<b>Linf</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	3103	3552	2200	952	2982	2236	2790	1274	4841	2862	2970	**	2346
<b>Mon</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	963	576	350	34	294	208	372	686	412	848	330	**	552

\*\* Amostra perdida

**APÊNDICE L:** Valores individuais obtidos para contagens globais e diferenciais de leucócitos no sangue periférico em cães do grupo controle (n=5), em diferentes momentos do período experimental. Jaboticabal, 2009.

C1	D-4	D-2	D0	D+7	D+8	D+9	D+10	D+13	D+14	D+28
<b>Leu</b> ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	6,2	6,9	6,4	18,0	16,3	16,9	7,0	6,1	6,3	13,3
<b>Bas</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	0	0	0	0	0	169	0	0	0	0
<b>Eos</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	186	621	704	1080	2197	1352	630	549	567	1463
<b>Bast</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	246	69	64	720	0	0	70	0	0	133
<b>Seg</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	4526	4623	3648	11880	12388	12844	5180	4636	4473	10241
<b>Linf</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	1054	1380	1792	3780	1141	1690	980	671	1134	1064
<b>Mon</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	186	207	192	540	652	845	140	244	126	399

C2	D-4	D-2	D0	D+7	D+8	D+9	D+10	D+13	D+14	D+28
<b>Leu</b> ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	9,1	7,3	8,8	34,1	25,9	22,7	13,6	13,5	11,0	11,2
<b>Bas</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Eos</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	364	146	352	1023	1036	1135	952	405	220	784
<b>Bast</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	91	146	88	2387	0	0	0	0	110	0
<b>Seg</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	6461	5329	5984	23870	21756	19068	11152	10935	8140	8064
<b>Linf</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	1911	1533	1848	5456	1813	1589	1088	1755	1650	2016
<b>Mon</b> (célis/ $\mu\text{L}$ )	273	146	528	1364	1295	908	408	405	880	336

C3	D-4	D-2	D0	D+7	D+8	D+9	D+10	D+13	D+14	D+28
<b>Leu</b> (x10 <sup>3</sup> /µL)	10,0	10,0	9,4	21,7	21,6	27,4	9,5	10,6	8,3	9,4
<b>Bas</b> (célis/µL)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Eos</b> (célis/µL)	600	700	564	1085	1512	1644	950	530	415	752
<b>Bast</b> (célis/µL)	100	500	94	1085	0	0	95	0	83	94
<b>Seg</b> (célis/µL)	6100	6900	2820	15407	14904	18906	6080	6466	5146	4324
<b>Linf</b> (célis/µL)	2100	1600	5452	3255	4104	5480	2090	3286	2490	3948
<b>Mon</b> (célis/µL)	500	300	470	868	1080	1370	285	318	166	282

C4	D-4	D-2	D0	D+7	D+8	D+9	D+10	D+13	D+14	D+28
<b>Leu</b> (x10 <sup>3</sup> /µL)	5,8	5,7	7,5	18,8	15,6	15,8	5,1	8,1	6,4	7,1
<b>Bas</b> (célis/µL)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Eos</b> (célis/µL)	58	171	975	564	780	790	459	648	448	284
<b>Bast</b> (célis/µL)	58	114	75	376	0	0	51	0	0	0
<b>Seg</b> (célis/µL)	4408	4218	4275	14288	12948	12956	3162	6156	4672	4260
<b>Linf</b> (célis/µL)	1044	1026	2025	2820	1404	1264	1224	1134	1152	2272
<b>Mon</b> (célis/µL)	232	171	150	752	468	790	204	162	128	284

C5	D-4	D-2	D0	D+7	D+8	D+9	D+10	D+13	D+14	D+28
<b>Leu</b> (x10 <sup>3</sup> /µL)	9,6	9,6	10,3	18,8	31	35,8	12,6	11,1	9,8	16,8
<b>Bas</b> (célis/µL)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Eos</b> (célis/µL)	576	672	412	564	1240	1074	504	555	294	840
<b>Bast</b> (célis/µL)	192	288	103	376	0	716	252	0	196	504
<b>Seg</b> (célis/µL)	6720	7104	7828	14288	26040	30430	9324	9102	6468	12600
<b>Linf</b> (célis/µL)	1536	1248	1751	2820	1550	2148	2268	888	2548	1512
<b>Mon</b> (célis/µL)	576	288	206	752	2170	1432	252	555	294	1344