

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**“AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA E IMUNOFENOTÍPICA DE CÃES  
COM LINFOMA”**

**Flávia Eiras Dela Coleta**

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**“AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA E IMUNOFENOTÍPICA DE CÃES  
COM LINFOMA”**

**Flávia Eiras Dela Coleta**

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

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Dezembro de 2008

Coleta, Flávia Eiras Dela  
C694a Avaliação hematológica e imunofenotípica de cães com linfoma /  
Flávia Eiras Dela Coleta -- Jaboticabal, 2009  
xxiv, 96f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009

Orientador: Aureo Evangelista Santana

Banca examinadora: Ana Paula Massae Nakage Canesin, Aureo  
Evangelista Santana, Maura Roseana Valério Ikoma, Mirela Tinucci  
Costa, Paulo César Ciarlini.

Bibliografia

1. Citometria de Fluxo 2.Linfócitos 3.Transplante Autólogo de  
Medula Óssea I. Título II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias  
e Veterinárias.

CDU 619:616-072.7:636.7

### **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**FLÁVIA EIRAS DELA COLETA** - nasceu em Araraquara, no dia 22 de Março de 1980. Filha de Roberto Dela Coleta e Laura Helena Eiras Dela Coleta, tornou-se graduada em Medicina Veterinária no ano de 2002, pelo Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos em São João da Boa Vista, Mestre em Medicina Veterinária no ano de 2005, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – Unesp, estagiou no serviço de Hematologia Veterinária da Universidad Autónoma de Barcelona em 2008 e obteve o título de Doutora em Medicina Veterinária no ano de 2009, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal.

*Ofereço e Dedico*

*Aos meus pais, aos meus irmãos e ao meu namorado que foram, são e sempre  
serão meu porto seguro*

## *Agradeço*

*Ao meu orientador, Aureo Evangelista Santana, por acreditar neste trabalho e pelo apoio e companherismo incondicional durante todos estes anos.*

*Ao Dr. Mair Pedro de Souza e ao Dr. Marcos Mauad, pelos fundamentais ensinamentos para a realização deste trabalho e pela simpatia e carinho com que nos receberam no Hospital Dr. Amaral Carvalho.*

*Aos pacientes do Serviço de TMO do Hospital Dr. Amaral Carvalho que permitiram o acompanhamento de seus tratamentos*

*Às grandes amigas e “companheiras de projeto”: Mariana, por estar pronta para ajudar a qualquer momento e pelas “acolhidas” em sua casa, a Malú, por acreditar neste projeto e pela ajuda para que este projeto se tornasse realidade, a Aline que mesmo chegando depois, contribui para a realização deste trabalho .*

*Ao pessoal da Oncologia, em especial a Sabrina Calazans, que ajudou intensamente na realização deste trabalho.*

*As “meninas” da Iniciação Científica, Mariane, Lívia e Fernanda.*

*A imprescindível ajuda, disponibilidade e paciência do amigo Luis Gustavo Silva Monazzi na realização das análises, que tornou esse projeto possível.*

*A Dra. Maura pela ajuda na interpretação das análises.*

*Aos cães com linfoma e aos proprietários da Naja, da Mel, do Tob, do Lord, do Otto, da Gabriela e da Clara que nos ajudaram seguindo nossas recomendações e por nos receberam em suas casas quase que diariamente..*

*À pós-graduação da FCAVJ por ter me concedido a oportunidade de realizar este doutorado.*

*A Fapesp pela bolsa concedida e pelo estágio realizado na Universidad Autônoma de Barcelona.*

*Ao Prof. Josep Pastor Milán por ter me recebido tão gentilmente como estagiária no Serviço de Hematologia Veterinária da Universidad Autônoma de Barcelona.*

*Aos professores Carlos Roberto Daleck, Ana Paula Massae Nakage Canesin, Alessandra Kataoka e Luis Gustavo Silva Monazzi, pela composição da banca de qualificação e pela contribuição com suas considerações.*

*Aos professores Paulo César Ciarlini, Maura Roseane Valério Ikoma, Ana Paula Massae Nakage Canesin e Mirela Tinucci Costa, pela composição da banca de defesa e pela contribuição com suas considerações*

*Ao Eugênio, ao Matheus, a Letícia, a Andressa, a Alessandra e a todos os estagiários do Laboratório de Patologia Clínica que ajudaram na execução deste trabalho*

*Aos docentes, funcionários, residentes e estagiários do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, que contribuíram para a realização deste trabalho.*

*À querida Márcia pelo “abrigo”, amizade, paciência e dedicação.*

*Às amigas e ex-vizinhas Fernanda Gomes Velasque Gama e Paula Nunes Rosato, Patrícia Sampaio Coelho pelo companherismo.*

*Ao Prof. Dalton Guaglianone pela ajuda na elaboração da estatística.*

## SUMÁRIO

	Folha
Lista de Tabelas.....	XI
Lista de Figuras.....	XV
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	
Linfoma Canino.....	2
Definição.....	2
Etiologia.....	2
Predisposição.....	2
Classificação.....	3
Diagnóstico.....	5
Tratamento.....	5
Prognóstico.....	8
Citometria de Fluxo e sua Aplicação Clínica.....	8
Anticorpos Monoclonais.....	9
Imunofenotipagem de Linfócitos.....	10
Imunofenotipagem de Linfócitos Aplicada ao Linfoma.....	12
Objetivos .....	15
Referências.....	16

CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA E IMUNOFENOTÍPICA DE  
LINFÓCITOS DE CÃES COM LINFOMA TRATADOS COM O PROTOCOLO  
QUIMIOTERÁPICO DE MADISON-WISCONSIN

RESUMO.....	24
ABSTRACT.....	24
INTRODUÇÃO.....	25
MATERIAL E MÉTODOS.....	27
Animais.....	27
Tratamento.....	28
Avaliação Hematológica e Imunofenotípica.....	29
Processamento das amostras de sangue periférico e medula óssea para citometria de fluxo .....	30
Análise Estatística.....	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
Gênero.....	34
Raça.....	35
Idade.....	36
Peso.....	36
Classificação Anatômica.....	37
Estadiamento e sub-estadiamento clínico.....	38
Sobrevida.....	40
Hemograma.....	41
Eritrograma.....	42

Plaquetograma.....	45
Leucograma.....	46
Origem celular do linfoma.....	52
Imunofenotipagem de Linfócitos.....	54
CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS.....	63
CAPÍTULO 3 – IMUNOFENOTIPAGEM DE SANGUE PERIFÉRICO E DE MEDULA ÓSSEA CÃES COM LINFOMA SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE MEDULA ÓSSEA	
RESUMO.....	69
ABSTRACT.....	69
INTRODUÇÃO.....	70
MATERIAL E MÉTODOS.....	71
Animais.....	71
Quimioterapia.....	72
Transplante Autólogo de Medula Óssea.....	72
Coleta de medula óssea e processamento do material .....	72
Condicionamento.....	75
Infusão da medula óssea.....	76
Uso do fator estimulador de colônia.....	76
Avaliação Hematológica e Imunofenotípica.....	77
Análise Estatística.....	77

RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
Hemograma.....	78
Eritrograma.....	79
Plaquetograma.....	82
Leucograma.....	83
Imunofenotipagem de Linfócitos.....	86
CONCLUSÕES.....	95
REFERÊNCIAS.....	96

## LISTA DE TABELAS

	Folha
Capítulo 2	
Tabela 1: Sistema de classificação de estadiamento clínico para linfoma em animais domésticos estabelecido pela Organização Mundial as Saúde (OMS) citado por Vail (2000).....	28
Tabela 2: Fase de indução da remissão com o emprego do protocolo quimioterápico de Madison Wisconsin, citado por Nelson & Couto (2006), utilizado nos 27 cães com linfoma.....	28
Tabela 3: Valores de referência para hemograma de cães, utilizados no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinária “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária de Jaboticabal.....	30
Tabela 4: Preparo das amostras de sangue e medula óssea para análise citométrica.....	31
Tabela 5: Valores médios obtidos para o hemograma de vinte e sete cães com linfoma no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão do protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin.....	41
Tabela 6: Valores relativos médios, máximos e mínimos e, desvios padrão, da subpopulação linfocitárias CD5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , CD5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> e CD45 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup> no sangue periférico de cães sadios (grupo controle).....	54

Tabela 7:	Valores absolutos médios, máximos e mínimos e, desvios padrão, das subpopulações linfocitárias CD5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , CD5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> e CD45 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup> no sangue periférico de cães sadios (grupo controle).....	54
Tabela 8:	Valores relativos médios, máximos e mínimos e, desvios padrão, das subpopulações linfocitárias CD5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , CD5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> e CD45 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup> na medula óssea de cães sadios (grupo controle).....	54
Tabela 9:	Valores relativos médios das subpopulações linfocitárias CD5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , CD5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> e CD45 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup> no sangue periférico de vinte e sete cães com linfoma no momento do diagnóstico e após cada sessão quimioterápica.....	55
Tabela 10:	Valores absolutos médios das subpopulações linfocitárias CD5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , CD5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> e CD45 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup> no sangue periférico de vinte e sete cães com linfoma no momento do diagnóstico e após cada sessão quimioterápica.....	55
Tabela 11:	Valores relativos médios das subpopulações linfocitárias CD5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , CD5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> e CD45 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup> na medula óssea de cães com linfoma no momento do diagnóstico e após oito sessões quimioterápicas.....	61

## Capítulo 3

Tabela 1:	Valores médios obtidos para o hemograma de cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea.....	78
Tabela 2:	Valores relativos médios, máximos e mínimos e, desvios padrão, das subpopulações linfocitárias CD5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , CD5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> e CD45 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup> no sangue periférico de cães sadios (grupo controle).....	86
Tabela 3:	Valores absolutos médios, máximos e mínimos e, desvios padrão, das subpopulações linfocitárias CD5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , CD5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> e CD45 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup> no sangue periférico de cães sadios (grupo controle).....	86
Tabela 4:	Valores relativos médios, máximos e mínimos e, desvios padrão, das subpopulações linfocitárias CD5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , CD5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> e CD45 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup> na medula óssea de cães sadios (grupo controle).....	87
Tabela 5:	Valores relativos médios das subpopulações linfocitárias CD5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , CD5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> e CD45 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup> no sangue periférico de cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea.....	87

Tabela 6:	Valores absolutos médios das subpopulações linfocitárias CD5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , CD5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> e CD45 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup> no sangue periférico de cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea.....	87
Tabela 7:	Valores relativos médios das subpopulações linfocitárias CD5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , CD5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> e CD45 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup> na medula óssea de cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, e D+28 do transplante autólogo de medula óssea.....	88

## LISTA DE FIGURAS

	Folha
Capítulo 2	
Figura 1: Distribuição das subpopulações leucocitárias, de acordo com a complexidade e o tamanho das células, com a gate sobre a população de linfócitos.....	32
Figura 2: Distribuição das células de acordo com a complexidade interna da célula (“Side Scatter –SSC”) com a gate (P2) sobre as populações linfocitárias CD5 <sup>+</sup> (A) e CD45 <sup>+</sup> (B).....	33
Figura 3: Gráfico das subpopulações linfocitárias CD5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> (A), CD5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (B) e CD45 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup> (C).....	33
Figura 4: Porcentagem do gênero de vinte e sete cães com linfoma submetidos ao protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin.....	34
Figura 5: Porcentagem das diferentes raças de vinte e sete cães com linfoma submetidos ao protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin.....	34
Figura 6: Porcentagem das faixas etárias de vinte e sete cães com linfoma submetidos ao protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin.....	36
Figura 7: Peso corpóreo de vinte e sete cães com linfoma submetidos ao protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin.....	37

Figura 8:	Apresentação anatômica do linfoma de vinte e sete cães com linfoma submetidos ao protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin.....	38
Figura 9:	Porcentagem dos estadios clínicos do linfoma de vinte e sete cães acometidos, submetidos ao protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin.....	39
Figura 10:	Porcentagem dos sub-estadios clínicos do linfoma de vinte e sete cães acometidos, submetidos ao protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin.....	39
Figura 11:	Freqüência de indivíduos vivos após cada uma das oito sessões quimioterápicas do protocolo de Madison-Wisconsin.....	40
Figura 12:	Médias da contagem global de eritrócitos ( $\times 10^{12}/L$ ) no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.....	43
Figura 13:	Médias da concentração de hemoglobina (g/L) no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.....	43
Figura 14:	Médias da taxa de hematócrito (L/L) no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.....	44
Figura 15:	Porcentagem de animais anêmicos (%) no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.....	44

Figura 16:	Médias do volume corpuscular médio (VCM) (fL) no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica .....	45
Figura 17:	Médias da concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM) (g/L) no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.....	45
Figura 18:	Porcentagem de animais trombocitopênicos no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica .....	46
Figura 19:	Médias da contagem global de leucócitos ( $\times 10^9/L$ ) no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica .....	47
Figura 20:	Porcentagem de animais com leucocitose no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.....	48
Figura 21:	Porcentagem de animais com leucopenia no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.....	48
Figura 22:	Médias da contagem absoluta de neutrófilos segmentados ( $\times 10^9/L$ ) ao longo das nove sessões quimioterápicas do protocolo de Madison-Wisconsin.....	49

Figura 23:	Porcentagem de animais com neutrofilia no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.....	49
Figura 24:	Porcentagem de animais com neutropenia no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.....	50
Figura 25:	Médias da contagem absoluta de eosinófilos ( $\times 10^9/L$ ) no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.....	50
Figura 26:	Médias da contagem absoluta de linfócitos ( $\times 10^9/L$ ) no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.....	51
Figura 27:	Porcentagem de animais com linfopenia no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.....	51
Figura 28:	Valores relativos médios da subpopulação linfocitária $CD5^+CD4^+$ no sangue periférico de vinte e sete cães com linfoma no momento do diagnóstico e após cada sessão quimioterápica.....	56
Figura 29:	Valores absolutos médios da subpopulação linfocitária $CD5^+CD4^+$ no sangue periférico de vinte e sete cães com linfoma no momento do diagnóstico e após cada sessão quimioterápica.....	56

Figura30:	Valores relativos médios da subpopulação linfocitária CD5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> no sangue periférico de vinte e sete cães com linfoma no momento do diagnóstico e após cada sessão quimioterápica.....	57
Figura 31:	Valores absolutos médios da subpopulação linfocitária CD5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> no sangue periférico de vinte e sete cães com linfoma no momento do diagnóstico e após cada sessão quimioterápica.....	58
Figura 32:	Valores relativos médios da subpopulação linfocitária CD45 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup> no sangue periférico de vinte e sete cães com linfoma no momento do diagnóstico e após cada sessão quimioterápica.....	59
Figura 33:	Valores absolutos médios da subpopulação linfocitária CD45 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup> no sangue periférico de vinte e sete cães com linfoma no momento do diagnóstico e após cada sessão quimioterápica.....	59
Figura 34:	Valores relativos médios da subpopulação linfocitária das subpopulações linfocitárias CD5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , CD5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> e CD45 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup> na medula óssea de cães linfoma no momento do diagnóstico e após as oito sessões quimioterápicas.....	60
Capítulo 3		
Figura 1:	Procedimento de colheita de medula óssea na crista ílica de um cão, para o transplante autólogo de medula óssea.....	74

Figura 2:	Procedimento de filtragem de toda a medula óssea colhida..	75
Figura 3:	Procedimento de infusão da bolsa de medula óssea (D0).....	76
Figura 4:	Médias da contagem global de eritrócitos ( $\times 10^{12}/L$ ) em cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea.....	80
Figura 5:	Médias da concentração de hemoglobina (g/L) em cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea.....	80
Figura 6:	Médias do hematócrito (L/L) em cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea.....	81
Figura 7:	Médias do volume corpuscular médio (VCM) (fL) em cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea.....	81
Figura 8:	Médias da concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM) (g/L) em cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea.....	82

Figura 9:	Médias da contagem global de plaquetas ( $\times 10^9/L$ ) em cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea.....	83
Figura 10:	Médias da contagem global de leucócitos ( $\times 10^9$ células/L) em cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea.....	84
Figura 11:	Médias da contagem absolutas de neutrófilos segmentados ( $\times 10^6$ células/L) em cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea.....	85
Figura 12:	Médias da contagem absolutas de linfócitos ( $\times 10^6$ células/L) em cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea.....	85
Figura 13:	Valores relativos médios da subpopulação linfocitária $CD5^+CD4^+$ no sangue periférico de cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea.....	89

Figura 14:	Valores absolutos das subpopulações linfocitárias CD5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> no sangue periférico de cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea.....	89
Figura 15:	Valores relativos das subpopulações linfocitárias CD5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> na medula óssea de cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, e D+28do transplante autólogo de medula óssea.....	90
Figura 16:	Valores relativos das subpopulações linfocitárias CD5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> no sangue periférico de cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea.....	91
Figura 17:	Valores absolutos das subpopulações linfocitárias CD5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> no sangue periférico de cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea.....	92
Figura 18:	Valores relativos das subpopulações linfocitárias CD5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> na medula óssea de cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, e D+28do transplante autólogo de medula óssea.....	92

Figura 19:	Valores relativos das subpopulações linfocitárias CD45 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup> no sangue periférico de cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea .....	93
Figura 20:	Valores absolutos das subpopulações linfocitárias CD45 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup> no sangue periférico de cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea.....	93
Figura 21:	Valores relativos das subpopulações linfocitárias CD45 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup> na medula óssea de cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, e D+28 do transplante autólogo de medula óssea.....	94

**Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-estar Animal da FCAV-UNESP (protocolo nº014423-07)**

# ***Capítulo 1***

**CONSIDERAÇÕES GERAIS****Linfoma canino****Definição**

O linfoma é definido como uma proliferação de células linfóides malignas, originárias do tecido linfóide como linfócitos, histiócitos, seus precursores e derivados, que primariamente afetam linfonodos ou órgãos viscerais sólidos como fígado e baço (COTRAN et al., 1994; VAIL, 2000).

Também chamado de linfossarcoma e linfoma maligno, é um dos tumores malignos de maior ocorrência, que tem sido relatado em todas as espécies domésticas, principalmente em mamíferos. É o tumor do tecido hematopoiético mais comum nos cães, chegando a representar 7 a 9% das neoplasias malignas nesta espécie (RALLIS et al., 1992; MORRISON, 1998; VAIL, 2000).

**Etiologia**

A etiologia do linfoma canino é multifatorial, porém a presença de agentes virais não foi comprovada na espécie canina, ao contrário do que acontece nos seres humanos, felinos, bovinos, roedores, aves e alguns primatas. Fatores ambientais como exposição crônica a substâncias químicas, como o herbicida 2,4 ácido fenoxiacético, são citados 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).

**Predisposição**

Os animais portadores de linfoma pertencem predominantemente às raças de grande ou médio porte, como Boxer, Basset hound, Rottweil, Cocker Spaniel, São Bernardo, Golden Retriever, entre outros (SEQUEIRA ET AL., 1999; COUTO, 2006).

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 um assunto controverso (MOULTON & HARVEY, 1990). Quanto ao sexo, Moulton & Harvey (1990) consideram que não há influência do sexo e Van Pelt & Connor (1968) afirmam que a maior ocorrência se dá em fêmeas. Porém, a maioria dos autores relata predominância de linfomas em machos, sendo que estes respondem por 68% dos casos de linfoma (RALLIS et al., 1992; DOBSON & GORDON, 1994; SEQUEIRA et al., 1999). Quando se analisa a predisposição de sexo com relação à origem celular do linfoma, observa-se que não há predileção de sexo nos animais com linfoma de origem T, mas há uma alta prevalência de machos com relação às fêmeas nos linfomas de origem B. (SÖZMEN et al., 2005) Quanto a idade, o linfoma canino é mais freqüentemente observado em animais adultos e velhos, podendo ocorrer em animais muito jovens (MOULTON & HARVEY, 1990; VALLI, 1993; SEQUEIRA et al., 1999). Sözmen et al. (2005), relatam que os cães acometidos por linfoma de origem celular T tem idade média de 7,9 anos, enquanto que aqueles acometidos por linfoma de origem celular B tem idade média de 8,4 anos.

### **Classificação**

O linfoma canino apresenta características semelhantes ao linfoma não-Hodgkin humano, podendo assim ser classificado anatomicamente em multicêntrico, tímico, digestivo, cutâneo e solitário; cuja a forma mais prevalente em cães é a forma multicêntrica (MOULTON & HARVEY, 1990). Os sinais clínicos variam de acordo com a apresentação anatômica e histológica (COUTO, 2006). No linfoma multicêntrico normalmente ocorre linfadenopatia bilateral dos linfonodos superficiais (DOBSON & GORMAN, 1993) e pode ocorrer hepatomegalia e esplenomegalia decorrentes da infiltração neoplásica (VAIL, 2000). A forma digestiva é caracterizada pela presença de neoplasia no sistema digestório e/ou nos linfonodos mesentéricos, e apresenta como sinais clínicos mais freqüentes vômito, diarreia e esteatorréia secundários à síndrome da má absorção (RICHTER, 1992). A forma mediastínica envolve o timo e/ou os linfonodos mediastinais craniais e caudais. A poliúria e a polidipsia, são os sinais clínicos mais comuns e são secundários a hipercalcemia, uma síndrome paraneoplásica do linfoma. Além disso, sinais clínicos como intolerância ao exercício, taquipnéia, dispnéia, regurgitação e anorexia, também são descritos em decorrência da compressão provocada pela linfadenopatia mediastínica (CARDOSO et al.,

2004). Já a apresentação cutânea do linfoma é variável e guarda relação com a classificação histológica e imunomorfológica. As lesões geralmente são multifocais ou generalizadas, em forma de placas ou nódulos ulcerados e eritrodermia esfoliativa (SCOTT et al., 1995). A forma mista e a extranodal podem acometer qualquer tecido corporal e os sinais estarão relacionados com os órgãos acometidos (CARDOSO et al., 2004).

Quanto à classificação citomorfológica podem ser de alto, médio ou baixo grau, sendo a maioria dos casos em cães constituídos de linfomas de alto grau. E, quanto à imunofenotipagem, podem ser classificados em linfomas T, linfomas B e linfomas não T/ não B, e linfomas mistos (B/ T), sendo a maioria dos casos classificados como linfomas B (MOULTON & HARVEY, 1990; TESKE et al., 1994; JONES et al., 1997; DE MOURA et al., 1999; SEQUEIRA et al., 1999).

O linfoma, em cães, pode ser classificado em diferentes estádios clínicos durante sua evolução, que compreendem a extensão da doença em outros órgãos, presença de síndromes paraneoplásicas e sinais clínicos (DAY, 1995; DE MOURA & SEQUEIRA, 1999). Este estadiamento auxilia na determinação do prognóstico do animal com linfoma, sendo importante para estabelecer um diagnóstico mais preciso e precoce, permitindo um tratamento adequado e uma melhora na taxa de sobrevivência dos animais portadores de linfoma (MORENO & BRACARENSE, 2007). Tal estadiamento segue o protocolo proposto pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e tem uma variação de estádio de I a V, sendo que no estádio I há envolvimento limitado a um único linfonodo ou tecido linfóide de um único órgão (exceto medula óssea). No estádio II há envolvimento de vários linfonodos regionais com ou sem envolvimento das amígdalas. No estádio III há envolvimento generalizado dos linfonodos. No estádio IV há envolvimento de fígado e/ ou baço, com ou sem envolvimento generalizado dos linfonodos e no estádio V há envolvimento do sangue, medula óssea e ou outros órgãos (OWEN, 1980). A maioria dos animais apresenta-se no estádio III ou IV da doença no momento da avaliação clínica (DAY, 1995; DE MOURA & SEQUEIRA, 1999). Além disso, o linfoma pode ser classificado em subestádios de acordo a presença de sinais clínicos, sendo classificado em sub-estádio “a” quando não há sinais clínicos da doença, e em “b” quando há sinais clínicos de linfoma (VAIL, 2000).

### **Diagnóstico**

O diagnóstico do linfoma é baseado no exame físico e nas avaliações hematológicas, bioquímico-séricas e exames radiológicos e ultrassonográficos. Porém, o diagnóstico definitivo só pode ser firmado pela avaliação citológica ou histológica do órgão afetado. Na medicina veterinária, há tempos a citologia tem sido aceita como técnica confiável para o diagnóstico de linfoma canino (CARTER et al., 1986; CARTER & VALLI, 1988). Embora o diagnóstico citológico seja fácil de ser obtido, este não permite diferenciar os vários tipos de linfossarcoma (FAN & KITCHELL, 2002; COUTO, 2006) e raramente fornece uma conclusão decisiva (OGILVIE & MOORE, 1995), recomendando-se um procedimento histológico que pode ser conclusivo (OGILVIE & MOORE, 1995; VAIL & OGILVIE, 1998). Mas estudos recentes revelam a importância da citologia por agulha fina no diagnóstico de linfoma não-Hodking, principalmente quando aliada a imunofenotipagem pela citometria de fluxo (SÖZMEN et al., 2005)

### **Tratamento**

Sem tratamento, muitos cães vão a óbito em quatro a seis semanas (MACEWEN & YOUNG, 1996). No entanto, o linfoma é a neoplasia que melhor responde a 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).

A poliquimioterapia é a modalidade mais utilizada e eficaz no tratamento de cães com linfoma (DHALIWAL et al., 2003) e é constituída de três etapas: indução da remissão, manutenção da remissão e reindução da remissão ou terapia de resgate (MACEWEN & YOUNG, 1996).

O protocolo quimioterápico COP (combinação de ciclofosfamida, sulfato de vincristina e prednisona) é um dos tratamentos para o linfoma canino, e está descrito na literatura há mais de 20 anos (MYERS III et al., 1997), porém apresenta efeitos colaterais tais como infertilidade, alopecia e pigmentação da pele (FRAZIER & HAHN, 1995) além de mielossupressão e distúrbios gastrointestinais (KOCHEVAR & MEALEY, 1997; KITCHELL &

DHALIWAL, 2000). Um outro protocolo, o de Madison-Wiscosin (vincristina, L-asparaginase, prednisona, ciclofosfamida e doxorubicina), apesar de apresentar efeitos colaterais, é capaz de promover a mais longa remissão e tempo de sobrevivência para cães com linfoma, sendo, desta forma, um dos protocolo mais empregados no tratamento dessa neoplasia em cães (CHUN et al, 2000; MORRISON, 2005).

Dentre os fármacos utilizados no protocolo de Madison-Wisconsin, está a vincristina, um alcalóide vegetal derivado da vinca, que atua interrompendo a metástase, ligando-se às proteínas dos microtúbulos necessárias à formação dos fusos mitóticos e mitose celular (KOCHEVAR & MEALEY, 1997; RODASKI & DE NARDI, 2008). A vincristina pode provocar como efeitos colaterais hematológicos, a mielossupressão, caracterizada por discreta leucopenia, as vezes acompanhada de anemia e trombocitopenia. Esta toxicidade pode ser maior quando este fármaco é associado à L-asparaginase (RODASKI & DE NARDI, 2008). A L-asparaginase é 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 poder levar os cães a hepatotoxicose com aumento dos níveis séricos de enzimas como alanina-aminotransferase e aspartato-aminotransferase, bilirrubina e albumina sérica (RODASKI & DE NARDI, 2008).

A prednisona, um corticosteróide utilizado nas primeiras quatro semanas do protocolo de Madison-Wisconsin, induz os linfócitos normais a apoptose, exercendo efeitos citolíticos em neoplasias linfóides (KOCHEVAR & MEALEY, 1997; LANORE & DELPRAT, 2004; FAN & LORIMIER, 2005). É um hormônio que atua em um receptor celular específico e em células sensíveis, causando cisão do DNA, prevenindo a divisão celular (RODASKI & DE NARDI, 2008). Como alterações hematológicas clássicas causadas por sua utilização incluem-se neutofilia, 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, outro fármaco que constitui o protocolo de Madison-Wisconsin, é uma mostarda nitrogenada classificada como agente alquilante que atua inibindo a síntese e divisão do DNA e, possui um ciclo celular não específico. Um de seus efeitos tóxicos é a mielossupressão, principalmente com neutropenia, trombocitopenia e com menor frequência, anemia não regenerativa nos casos dos animais em terapia crônica (BARGER & GRINDEM, 2000; RODASKI & DE NARDI, 2008).

A doxorubicina, que completa o protocolo, é um antibiótico antitumoral (antraciclina) derivado de culturas de *Streptomyces peucetius*, variedade *caesius*, sendo um quimioterápico inibidor da transcriptase reversa do RNA polimerase, impedindo a síntese do DNA e RNA como agente ciclo celular não específico. Como efeitos colaterais pode apresentar leucopenia, anemia e trombocitopenia, além de cardiotoxicidade e outros (RODASKI & DE NARDI, 2008).

Independente do protocolo quimioterápico utilizado, a toxicidade hematológica é um fator limitante, e é a toxicidade mais freqüente e mais grave. Pode comprometer a quimioterapia de maneira transitória ou definitiva, e está relacionada ao risco potencial de morte do animal em decorrência de neutropenia séptica (LANORE & DELPRAT, 2004).

A neutropenia é a mais freqüente e mais grave das citopenias induzidas pela quimioterapia. 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 e persiste por três à cinco dias, pois em pouco menos de duas semanas, a medula passa por uma fase de recuperação e a população de neutrófilos se reestabelece (LANORE & DELPRAT, 2004).

Os transplantes autólogos têm se mostrado excelente coadjuvante no tratamento de doenças malignas que tenham recidiva ou sejam de alto risco como o linfoma não-Hodgkin, pois restabelecem a hematopoese normal após a quimioterapia mieloablativa. Desta forma, o transplante autólogo tem sido amplamente utilizado para o tratamento do linfoma humano (BENBOUBKER et al., 2002)

FRIMBERGER et al. (2000) realizaram quimioterapia em doses elevadas seguida de transplante autólogo de medula óssea em cães com linfoma. Foi obtido tempo de remissão médio 10% maior que os cães tratados com quimioterapia convencional. Nos animais tratados, a remissão foi induzida com quimioterapia convencional, seguida de dose única de ciclofosfamida (500 mg/m<sup>2</sup>) e, infusão de medula óssea autóloga.

A ciclofosfamida pode substituir a irradiação corpórea total no preparo de cães para transplante de medula óssea, autólogo ou alogênico (THOMAS & STORB, 1999). A dose máxima tolerada de ciclofosfamida a ser utilizada em cães com linfoma submetidos ao transplante autólogo de medula óssea foi de 500 mg/m<sup>2</sup>, sendo que também foram utilizadas as dosagens de 300 e 400 mg/m<sup>2</sup> (FRIMBERGER et al., 2006).

### **Prognóstico**

O prognóstico nos casos de linfoma canino guarda relação direta com o sub-estadio estabelecido pela Organização Mundial de Saúde e, desta forma, tem sido observado que animais com sinais clínicos de linfoma, no sub-estágio “b” têm prognóstico reservado, enquanto que, com relação à caracterização imunofenotípica dos linfócitos, tumores imunorreativos CD3 (derivados de células T) têm remissão mais curta (VAIL, 2000).

### **Citometria de fluxo e sua aplicação clínica**

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 uma técnica com 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 (FALDYNA et al., 2001; NAKAGE et al., 2005). Desta forma, permite o estudo da hematopoese, a classificação dos tipos celulares do sistema imune, e análise do processo dinâmico acompanhando a atividade da resposta imune (LANYER, 2002).

O citômetro de fluxo é um separador de células ativado por fluorescência (FACS – *Fluorescence Activated Cell Sorter*) que mede a intensidade de fluorescência de cada célula. Assim, identifica e quantifica as células, com base no tamanho relativo da célula (*Forward scatter* – FSC), granularidade ou complexidade interna da célula (*Side Scatter* – SSC) e, na intensidade de fluorescência (GRINDEM, 1996; ROITT et al., 1999).

A avaliação da intensidade de fluorescência se dá por intermédio da utilização de anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos específicos para determinados marcadores de superfície celular (GRINDEM, 1996).

### **Anticorpos monoclonais**

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

Para classificar os anticorpos monoclonais de diversos animais domésticos incluindo cães (COBBOLD & METCALF, 1994), suínos (SAALMULLER, 1996), eqüinos (LUNN et al., 1996) e ruminantes (NAESSENS et al., 1997), alguns *Workshops* têm sido organizados para designar a estes anticorpos uma nomenclatura correspondente à humana. 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).

No “Primeiro Workshop Internacional de Antígeno Leucocitário Canino” (FIRST CLAW – First Canine Leukocyte Antigen Workshop), ocorrido em Cambridge U.K. em 1993, foram

definidos os anticorpos monoclonais que marcam os antígenos leucocitários caninos (COBBOLD & METCALFE, 1994). No qual o CD5 foi definido como principal marcador de superfície para células linfocitárias pan-T caninas, o CD4 como marcador de linfócitos T auxiliares e o CD8 como marcador de linfócitos T citotóxicos (COBBOLD & METCALFE, 1994).

De acordo com BYRNE et al. (2000), os linfócitos B de cães, diferentemente daqueles de humanos e de roedores, não expressam CD5. Portanto, o CD5 canino deve ser utilizado como marcador para células pan-T.

Os linfócitos T têm sido mais extensivamente estudados com respeito à expressão diferencial de antígenos. A maioria dos linfócitos T, é identificado pela expressão dos antígenos CD4 e CD8 (LANIER, 2002).

No cão o CD4 é expresso pelo MHC de classe II restrito a células T-helper. Os neutrófilos caninos podem expressar CD4 e isto difere os neutrófilos caninos dos neutrófilos de outras espécies. Monócitos, macrófagos e células dendríticas também podem expressar este antígeno em algumas situações. O CD5 é expresso por células T maduras, timócitos e algumas células B. Nas células T maduras, o CD5 atua como co-estimulador de receptor de sinais. O CD8 é expresso pelo MHC de classe I restrito a células T-citotóxicas, porém algumas células NK podem expressar o CD8. Já o CD 21 é expresso por células B maduras e células dendríticas foliculares no centro germinativo (VERNAU, 2004).

Aproximadamente 10% da superfície dos linfócitos T encontra-se recoberta pela molécula CD45. Esta molécula tem uma função no controle da transdução do sinal pelos receptores de célula T. Identificaram-se várias formas diferentes de CD45. As células T virgens possuem uma forma de CD45, e as células T estimuladas e de memória possuem uma forma diferente (TIZARD, 2002)

### **Imunofenotipagem de Linfócitos**

Os linfócitos são células responsáveis pelo reconhecimento de antígenos estranhos e pela montagem de respostas imunes. Encontram-se espalhados por todo o corpo, principalmente nos linfonodos, baço e medula óssea. Apesar de sua aparência uniforme, constituem uma mistura diversa de populações celulares, cada uma delas com propriedades e funções características (TIZARD, 2002).

As células T constituem a população predominante de linfócitos circulantes que se desenvolvem dentro do timo e distribuem-se pelos linfonodos paracorticais e pela bainha esplênica periarteriolar. Além disso, podem ser classificadas em citotóxicas, auxiliares ou de memória. Já as células B, constituem uma pequena população de linfócitos circulantes responsáveis pela expressão de imunoglobulinas, e desenvolvem-se na medula óssea, bursa e placas de Peyer e distribuem-se pelos linfonodos do córtex e folículos esplênicos. As células NK, células exterminadoras naturais, constituem uma terceira população distinta de linfócitos que não demonstram propriedades nem de células T e nem de células B e, são encontradas em pequeno número no sangue e distribuem-se largamente por todos os órgãos linfóides (LAYNER, 2002; TIZARD, 2002).

Embora as populações linfocitárias não possam ser identificadas através de suas estruturas, é possível identificá-las com base nas suas proteínas de superfície celular característica, ou seja, pela imunofenotipagem (LAYNER, 2002; TIZARD, 2002).

Segundo Byrne et al. (2000), a análise dos linfócitos pela citometria de fluxo deve ser acompanhada pelas contagens totais e diferenciais de células leucocitárias e subseqüentemente, os números absolutos das subpopulações linfocitárias são determinados utilizando-se as porcentagens da citometria de fluxo, os valores totais de leucócitos e a contagem relativa de linfócitos.

É importante conhecer a distribuição normal das subpopulações de linfócitos em animais sadios para aplicar a citometria de fluxo e utilizá-la na identificação de doenças, monitorar seu progresso, auxiliar no prognóstico e no tratamento (BYRNE et al., 2000).

As desordens mieloproliferativas e linfoproliferativas também podem ser identificadas e classificadas com auxílio da citometria de fluxo (WEISS, 2001).

A quantidade de células presentes na medula óssea é um fator importante no sucesso do transplante, uma vez que as subpopulações de linfócitos do doador mediam um delicado balanço entre rejeição e desenvolvimento da doença do enxerto-versus-hospedeiro após o transplante alogênico de células-tronco. Portanto, a análise das subpopulações linfocitárias com auxílio da citometria de fluxo é fundamental para o monitoramento do paciente após o transplante (ROCHA et al., 2001).

A imunofenotipagem de linfócitos é uma aplicação comum da citometria de fluxo em imunematologia de seres humanos, e tem sido utilizada para estudar os efeitos de doenças e modificações do sistema imune nas populações de linfócitos. Na medicina veterinária, a imunofenotipagem é de uso recente e permite a avaliação da apoptose, progressão das infecções pelos vírus da Imunodeficiência Felina e da Leucemia Felina, resposta aos transplantes de órgãos em modelos caninos e resposta imune às infecções (BYRNE et al., 2000).

### **A imunofenotipagem de linfócitos aplicada ao linfoma**

Na medicina veterinária, bem como na humana, uma das mais importantes aplicações da imunofenotipagem é a diferenciação de leucemia e linfomas em linfóides e não linfóides (DEAN, 2000)

Amostras ou aspirados com agulhas finas de linfonodos ou outros tecidos, assim como sangue e medula óssea, têm sido freqüentemente analisados para o diagnóstico e classificação de linfomas e leucemias (JENNINGS & FOON, 1997).

A imunofenotipagem é um meio auxiliar poderoso, juntamente com a citologia aspirativa por agulha fina no diagnóstico de linfoma, podendo poupar o paciente de um procedimento cirúrgico caro (JENNINGS & FOON, 1997). Na última década tem sido uma ferramenta indispensável no diagnóstico de linfoma em humanos (CULMSEE, 2001). De Moura et al. (2001) estudando o imunofenótipo de linfócitos de cães com linfoma, concluíram que esta neoplasia revela uma heterogenicidade que não pode ser avaliada pela histopatologia clássica. Sendo assim, o conhecimento do imunofenótipo das células neoplásicas, permite uma correlação entre o comportamento clínico do tumor e sua resposta à quimioterapia.

A identificação do imunofenótipo das células linfomatosas utilizando-se de anticorpos monoclonais contra as glicoproteínas de superfície das células (CD), permite diferenciar as neoplasias de origem B (CD79+) das originárias dos linfócitos T (CD3+) em cães (FAN & KITCHELL, 2002)

A determinação de imunofenótipos distintos permite classificar neoplasias linfóides de acordo com a célula de origem, já que tais neoplasias, principalmente as B, simulam estágios normais da diferenciação do linfócito. Esta subclassificação mais precisa permite o diagnóstico e novas modalidades terapêuticas (COSTA et al., 2005)

Um estudo de 78 casos de linfoma em humanos demonstrou a partir da aplicação da imunofenotipagem que 85% dos casos correspondem ao linfoma de origem B e 15% ao de origem T (COSTA et al., 2005).

A detecção do CD21 é frequentemente empregada no diagnóstico de linfoma de célula B e leucemia linfocítica de origem B (VERNAU, 2004). O CD45 é utilizado para o diagnóstico diferencial entre linfomas e tumores metastáticos (BRAYLAN, 2002).

Em um estudo de De Moura et al. (2001), foram realizadas imunofenotipagens de 98 casos de linfossarcomas caninos em tecido incluído em parafina. O imunofenótipo de células T ocorreu na maioria dos casos (60,2%), seguidos pelos linfossarcomas B (32,6%) e T/B (7,2%). Tal achado é contraditório com a literatura, em que a prevalência imunofenotípica dos linfossarcomas é de células B. (TESKE, 1994). Segundo tais autores, a técnica poderia justificar esta discrepância.

Diagnosticar linfomas T por citometria de fluxo é mais desafiador, já que não há um marcador sensível de monoclonalidade. Situações como pós-transplante de medula óssea e infecções virais podem estar associadas com predomínio de linfócitos CD4 e CD8, respectivamente, assim como uma população clonal de células T (COSTA et al., 2005).

Cães com linfossarcomas das células T têm-se revelado com um tempo de remissão e sobrevivência mais curtos que cães com linfossarcoma das células B, além de estarem geralmente sujeitos à hipercalcemia (MACEWEN & YOUNG, 1996). Com a quimioterapia combinada, o tempo de sobrevivência estimado para o linfossarcoma de células B é de nove a 12 meses, contra seis meses para os de células T (FAN & KITCHELL, 2002).

Em 2003, Winnicka e colaboradores., realizando a imunofenotipagem de 20 cães com linfoma multicêntrico, observaram que a porcentagem de subpopulações de células T(CD5+, CD4+ e CD8+) nesses animais era marcadamente menor quando comparados com animais

saudáveis, porém a percentagem e o número de células B eram significativamente maiores (CD21-like+). Com a quimioterapia houve uma diminuição no número de leucócitos totais e linfócitos B, bem como um aumento na percentagem de linfócitos T. Ademais, isto tem sido observado em humanos com linfomas não-Hodgkin's (TESKE, 1994).

Miniscalco et al. (2003) empregando a técnica de citometria de fluxo para a imunofenotipagem de linfócitos em 32 machos e 16 fêmeas com linfoma, observaram que cinco dos 36 animais (14%) que apresentaram linfoma B demonstraram linfocitose de células B (CD21<sup>+</sup>) e quatro casos demonstraram moderado aumento de linfócitos B, sem linfocitose. O aumento de células T CD8<sup>+</sup> foi observado em sete linfomas B. Dois dos setes animais com linfoma de origem T (CD4<sup>+</sup>), apresentaram linfocitose com aumento de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Cinco cães exibiram aumento na relação CD4/CD8 e uma linfocitose extrema foi observada em dois cães com linfoma T CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>.

Em um estudo, CARTER et al. (1986) observaram pela da imunofenotipagem que 70% dos linfomas em cães são de origem B, 25% são de origem T e 5% expressam imunofenótipos não distintos.

De acordo com GAUTHIER et al. (2005), os cães com linfoma submetidos a quimioterapia, tiveram mais de 50% de redução na concentração de linfócitos sanguíneos e um absoluto decréscimo de subtipos de linfócitos. Estes achados foram interpretados como uma representável supressão da regeneração linfocitária pela quimioterapia. Além disso, a correlação com a origem do linfoma (B ou T) sugeriu que, por meio da citometria de fluxo, não é possível detectar a existência da doença residual mínima. No entanto, as mudanças no perfil dos linfócitos de cães com linfoma tratados com quimioterapia pode ser relevante com relação à imunocompetência desses animais.

**Objetivo**

Avaliação hematológica e imunofenotípica dos linfócitos de cães com linfoma, tratados com o protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin e com transplante autólogo de medula óssea.

**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, p.676-68, 2000.
- 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.
- BRAYLAN, R.C. Lymphomas. In: **Clinical flow cytometry – principles and application**. Baltimore: Library of congress, cap. 12, p. 203-234, 2002.
- BYRNE, K. M. et al. A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.73, n.2, p.167-182, 2000.
- CARDOSO, M.J.L.; MACHADO, L.H.A.; MOUTINHO, F.Q.; PADOVANI, C.R. Linfoma canino-achados clínico-patológicos. **Archives of Veterinary Science**, v.9, n.2, p.25-29, 2004.
- CARTER, R. F., VALLI, V. E. O., E LUMADEN, J. H. The Cytology, Histology and Prevalence of Cell Types in Canine Lymphoma Classified According to the National Câncer Institute Working Formulation. **Canadian Journal of Veterinary Research**, n.50, p.154 – 164,1986.
- 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.
- CHUN, J.K.; FAN, T.M.; LORIMIER, L. Treating lymphoma in dogs and cats. **Veterinary Medicine**, apr., p.285-294, 2000.
- COBBOLD, S.; METCALFE, S. Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: summary of the first canine antigen workshop (CLAW). **Tissue Antigens**, v.43, n.3, p.137-154, 1994.

- COSTA, F.P.S. et al. A utilidade da citologia por punção com agulha fina aliada a imunofenotipagem no diagnóstico dos linfomas não-Hodgkin. **Revista Brasileira de hematologia e hemoterapia**, v.27, n.1, p.16-20, 2005.
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Patologia Estrutural e Funcional**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 561-569, 1994.
- 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, cap. 78, p. 864-869, 2006.
- 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.
- DEAN, G.A. CD Antigens and immunophenotyping. In: **SCHALM'S Veterinary hematology**. FELDMAN, B.V.; JAIN, N.C. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 5ed, p. 689-695, 2000.
- DE MOURA, V. M. B. D.; SEQUEIRA, J. L.; AMORIM, R. L.; BANDARRA E. P. Classificação citohistológica dos linfomas caninos. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v. 4, n. 2, p. 53-59, 2001.
- 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.
- 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 tottwo chemotherapeutic protocols. **Journal of Small Animal Practice**, v.35, p.9-15, 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.; LORIMIER, L. Treating lymphoma in dogs and cats. **Veterinary Medicine**, apr., p.285-294, 2005.
- FAN, T. M.; KITCHELL, B. E. An update on diagnosing and treating canine lymphosarcoma. **Veterinary Medicine**, January, p.58-67,.2002.
- 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, cap. 4, 1994.
- FRAZIER, D. L.; HAHN, K. A. Commonly used drugs. In: HAHN, K. A.; RICHARDSON, R. C. **Cancer Chemotherapy - A Veterinary Handbook**. Malvern: Williams & Wilkins, p. 79-149, 1995.
- FRIMBERGER, A.E. et al. A combination chemotherapy protocol with high dose intensification and autologous transplant (VELCAP-HDC) for canine lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v.20, n.2, p.355-364, 2006.
- GAUTHIER, M.J. et al. The immunophenotype of peripheral blood lymphocytes in clinically healthy dogs and dog with lymphoma in remission. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, n.2, p. 193-199, 2005.
- GREENLEE, P.G., FILIPPA, D.A., QUIMBY, F.W. et al. Lymphomas in dogs: a morphologic, immunologic, and clinical study. **Cancer**, 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.
- 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.J., HUNT, R.D., KING, N.W. **Veterinary pathology**. 6.ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1997.
- KEREN, D.F. History and evolution of surface marker assays. In: KEREN, D.F., HANSON, C.A., HARTUBISE, P.E. **Flow cytometry and clinical diagnosis**. Chicago: American Society of Clinical Pathologists, p.1, 1994.
- KITCHELL, B. E.; DHALIWAL, R. S. Hematology. Oncology, Immunology: CVT update: anticancer drugs and protocols using traditional drugs. In: KIRK, R. W.; BONAGURA, J. D., **Current Veterinary Therapy XIII – Small Animal Practice**. Philadelphia: Saunders, p. 465-473, 2000.

- KOCHEVAR D. T.; MEALEY K. Principles of cancer chemotherapy. **Veterinary Medicine**, April, p. 339-349, 1997.
- LANORE, D.; DELPRAT, C. **Quimioterapia Anticancerígena**. São Paulo: Roca, 191p., 2004.
- LAYNER, L.L. Flow cytometry reveals the complexity and diversity of the immune system. In: **Clinical flow cytometry – principles and application**. Baltimore: Library of congress, cap. 4, p. 63 -70, 2002.
- 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.
- 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, cap. 28 B, p. 451-479, 1996.
- MINISCALCO, B.; GUGLIELMINO, R.; MORELLO, E.; TARDUCCI, A.; GEUNA, M. Clinical usefulness of peripheral blood lymphocyte subsets in canine lymphoma. **Veterinary Research Communications**, 27 suppl, v.1, p. 407-409, 2003.
- MORENO, K.; BRACARENSE, A.P.F.R.L. Estudo retrospectivo de linfoma canino no período de 1990-2004 na região norte do Paraná. **Brazilian Journal 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, p. 156,1998.
- MORRISON, W.B. **Lymphoma in dogs and cats**. Texas: Teton New Media, 2005.
- MOULTON, J.E., HARVEY, J.W. Tumors of the lymphoid and hematopoietic tissues. In: MOULTON, J.E. **Tumors in domestic animals**, 3.ed. California: University of California, p.240-244, 1990.
- MYERS III, N. C.; MOORE, A. S.; RAND, W. M.; GLIATTO, J.; COTTER, S. M. Evaluation of a multidrug protocol (ACOPA II) in dogs with lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, November/December, 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.M.; SANTANA, A.E.; CÁPUA, M.B.; COELHO, P.S. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**, v35, n.4, p.966-973, 2005.
- NGUYEN, D.T.; DIAMNOND, L.W.; BRAYLAN, R.C. **Flow Cytometry in Hematopathology: A Visual Approach to Data Analysis and Interpretation**. Humana Press, 220 p, 2007.
- OGILVIE, G. K.; MOORE, A. S. Management of Specific Diseases: Clinical Briefing: Lymphoma. In: \_\_\_\_ **Managing the Veterinary Cancer Patient**. Trenton: Veterinary Learning Systems, p. 228-259, 1995.
- OWEN, L. **TNM classification of tumors in domestic animals**. World Health Organization, p.46-47, 1980.
- 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.
- RICHTER, K.P. Moléstias do intestino grosso, In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. São Paulo: Manole, p. 1462-1486, 1992.
- ROCHA, V. et al. Influence of bone marrow graft lymphocyte subsets on outcome after HLA-identical sibling transplants. **Experimental Hematology**, v.29, n.11, p.1347-1352, 2001.
- RODASK, S.; DE NARDI, A.B. **Quimioterapia Antineoplásica em cães e gatos**. São Paulo: MedVet Livros, 2008.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. São Paulo: Manole, 424p, 1999.
- ROSENTHAL, C.R.; MACEWEN, E. G. Treatment of lymphoma in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 5, p. 774-781, 1990.
- 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, p.1-11, 1999.
- SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. **Dermatologia de Pequenos Animais**. São Paulo: Interlivros, 1130p, 1995.
- 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 conditions. **The Veterinary Clinics of North America – Small Animal Practice**, v.33, p.1335-1357, 2003.
- 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.
- THOMAS, E.D.; STORB, R. The Development of Scientific Foundation of Hematopoietic Cell Transplantation Based on Animal and Human Studies. In: THOMAS, E.D.; BLUME, K.G.; FORMAN, S.J. **Hematopoietic Cell Transplantation**. Malden: Blackwell Science, cap. 1. p.1-11, 1999.
- TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária: uma introdução**; trad. ABEL, L.J. São Paulo, Roca. p. 93-139, 2002.
- VAIL, D. M.; OGILVIE, G. K. Neoplasias Linfóides. In: BICHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders – Clínica de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, cap. 6, p. 218-225, 1998.
- VAIL, D.M. Lymphoma. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, cap. 91, p. 620-625, 2000.
- 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, p.976-989, 1968.
- VERNAU, W. **Flow cytometry assessment of hematopoietic neoplasia in the dog**. 55<sup>th</sup> Annual Meeting of the American college of veterinary pathologist & 30<sup>th</sup> Annual meeting of the American society of clinical pathology, 2004.
- WEISS, D.J. Evaluation of myeloproliferative disorders in canine bone marrow by use of flow cytometric scatter plots and monoclonal antibodies. **Veterinary Pathology**, v.38, n.5, p.512-518, 2001a.

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

WEISS, D.J. Application of flow cytometric techniques to veterinary clinical hematology. **Veterinary Clinical Pathology**, v.31, n.2, p.72-82, 2002.

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.

WINNICKA, A., JAGIELSKI, D., HOFFMANN-JAGIELSKA, M. et al. Cytometric evaluation of peripheral blood lymphocytes in dogs with lymphoma during chemotherapy. **Journal of Veterinary Medical Association**, v. 49, p. 303-306, 2002.

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.

# *Capítulo 2*

**Avaliação Hematológica e Imunofenotípica de Linfócitos de Cães com Linfoma  
Tratados com Protocolo Quimioterápico de Madison-Wisconsin.**

Hematological and Lymphocyte Immunophenotypical Evaluation of Dogs with Lymphoma  
Treated with Madison-Wisconsin Chemotherapeutic Protocol.

**RESUMO:** Considerando a importância da origem celular do linfoma e as alterações decorrentes da evolução desta neoplasia e aquelas ocorridas com o emprego da quimioterapia, avaliaram-se 27 cães com diagnóstico de linfoma, que foram submetidos à indução da remissão, com o protocolo de Madison-Wisconsin. No momento do diagnóstico e uma semana após cada uma das oito sessões quimioterápicas, realizou-se hemograma e análise citométrica das subpopulações linfocitárias  $CD5^+CD4^+$ ,  $CD5^+CD8^+$  e  $CD45^+CD21^+$  no sangue periférico e, na medula óssea as avaliações foram realizadas antes e após o tratamento. Observou-se um maior número de animais machos, das raças Rottweiler e sem raça definida, de meia idade e grande porte, que apresentaram com maior frequência, linfoma multicêntrico em estágio Vb. Com relação à origem celular do linfoma, notou-se predominância de linfoma B. No eritrograma, observou-se anemia normocítica normocrômica na maioria dos animais durante todo o tratamento. No leucograma, notou-se em alguns animais, no momento do diagnóstico, a presença de leucocitose por neutrofilia. Além disso, houve uma considerável depleção de linfócitos no sangue circulante, assim como das subpopulações  $CD5^+CD8^+$  e  $CD45^+CD21^+$ , durante todo o tratamento e, observou-se também, com menor intensidade, uma depleção da subpopulação  $CD5^+CD4^+$ . Na medula óssea observou-se depleção da subpopulação  $CD45^+CD21^+$ . Assim, a imunidade humoral e imunidade mediada por células ficam prejudicadas com a evolução do linfoma e com o emprego da quimioterapia.

**Palavras-chave:** hematologia, imunofenotipagem, quimioterapia.

**ABSTRACT:** Considering the importance of the lymphoma cellular origin and the decurrent alterations of the evolution of this neoplasia and those occurred ones with the chemotherapy, was evaluated 27 dogs with diagnosis of lymphoma, that they were submitted to the induction

of remission, with the protocol of Madison-Wisconsin. At the moment of the diagnosis and one week after each one of the eight chemotherapeutic sessions, became fulfilled hemogram and citometric analysis of CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e CD45<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> lymphocyte subpopulations in peripheral blood and, bone marrow evaluations were carried through before and after the treatment. Was observed a bigger number of male animals, Rottweiler breeder and without defined race, of half age and big tall, that had presented more frequently, multicentric lymphoma in Vb stage. With regard to the lymphoma cellular origin, the B cell lymphoma was noticed. In the eritrogram, was observed in the majority of the animals anemia normocytic normocromic during the treatment. In the leucogram, was noticed in some animals, at the moment of the diagnosis, the presence of leukocytosis with neutrofilia. Moreover, had a considerable depletion of lymphocytes in circulating blood, as well as of CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e CD45<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> subpopulations, during all the treatment and, it was also observed, with lesser intensity, a depletion of CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> subpopulation. In the bone marrow was observed depletion of CD45<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> subpopulation. Thus, the humoral immunity and immunity mediated for cells are harmed with the evolution of lymphoma and the use of chemotherapy.

**Key-words:** hematology, immunophenotyping, chemotherapy.

## **INTRODUÇÃO**

O linfoma, uma neoplasia maligna originada no tecido linfóide, é o principal tumor hematopoiético no cão. Afeta cães de todas as idades, tendo predominância nos animais de meia idade, e acredita-se não ter predileção de gênero (COUTO, 1986; DOBSON & GORMAN, 1993; TESKE, 1994; MILNER et al., 1996). Quanto à raça, pode-se observar prevalência em animais sem raça definida, Poodles, Labradores, Rottweilers e Boxers (RALLIS, 1992; DOBSON, 2001; NELSON & COUTO, 2006; MORENO et al., 2007).

De acordo com a localização anatômica da massa tumoral, o linfoma pode ser classificado em cutâneo, extranodal, alimentar, multicêntrico e mediastínico (NELSON & COUTO, 2006). Com base na extensão da doença nos órgãos e na presença e ausência de sinais clínicos, o linfoma é classificado em estadios e sub-estadios clínicos, o que auxilia no estabelecimento da terapia e do prognóstico (VAIL, 2000).

Os achados dos exames complementares em cães com linfoma 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. Os achados comuns são leucocitose, anemia e trombocitopenia (DOBSON & GORMAN, 1993; FURIE, 1993; LATIMER, 1997). Embora a contagem global de leucócitos possa estar normal, diminuída ou aumentada, quase sempre se detecta a linfocitose (LEIFER & MATUS, 1986; RASKIN & KRENBIEL, 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 marcante (MADEWEKLL & FELDMAN, 1980; MACEWEN & YOUNG, 1996). Algumas alterações hematológicas, como a trombocitopenia, podem ser observadas em decorrência da infiltração na medula óssea por células neoplásicas (RALLIS et al., 1992).

A citometria de fluxo tem sido rotineiramente usada na medicina humana e, recentemente, tem uma grande importância clínica na avaliação de imunopatias e malignidades hematopoiéticas na medicina de animais de companhia (TOMPKINS et al., 1991; CHABANNE et al., 2000; CULMSEE, 2000; CULMSEE et al., 2001; CULMSEE & NOLTE, 2002). No caso do linfoma, a imunofenotipagem passou a ter importância quando se verificou que o linfoma de células T tinha pior prognóstico para o tempo de vida e o período livre da doença do que o linfoma de células B (GREENLEE et al., 1990; KIUPEL et al., 1999).

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). Embora a quimioterapia seja imunossupressora, os efeitos da quimiot

erapia sobre o sistema imune dos cães com neoplasia não tem sido estudado de maneira detalhada (WALTER et al., 2006). Desta forma, torna-se muito importante a monitoração das células leucocitárias durante o tratamento quimioterápico.

Diante disso, objetivou-se realizar o hemograma e quantificar as subpopulações linfocitárias  $CD5^+CD4^+$ ,  $CD5^+CD8^+$  e  $CD45^+CD21^+$  no sangue periférico e na medula óssea de cães com linfoma no momento do diagnóstico e durante a fase de indução da remissão com o protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin.

**MATERIAL E MÉTODOS****Animais**

Compuseram este estudo, como controle, dez cães da raça Beagle, machos e fêmeas, não castrados, com peso médio de  $11.45 \pm 2.54$  Kg, idade média de  $7 \pm 3.20$  anos, procedentes do canil do Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Campus de Jaboticabal, considerados hígidos com base no exame clínico, hemograma, perfil hepático, renal e exame coproparasitológico.

O grupo de animais com linfoma foi composto por vinte e sete cães que foram atendidos pelo Serviço de Oncologia Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV-UNESP.

O diagnóstico de linfoma foi firmado com base nos achados clínicos, citológicos de aspirado de agulha fina e ou biópsia de nódulo um linfonodo com bases nos critérios de classificação morfológica descritos por Fournel- Fleury et al. (2002).

Todos os animais com linfoma foram submetidos ao exame clínico, classificação anatômica e estadiamento da neoplasia de acordo com os critérios propostos pela Organização Mundial de Saúde.

Os animais acometidos foram classificados com base no exame clínico, ultrassonográfico, radiográfico e análise do sangue e da medula óssea, em estádios (I a V) e subestádios (a ou b) de acordo com a tabela 1.

**Tabela 1.** Sistema de classificação de estadiamento clínico para linfossarcoma em animais domésticos estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) citado por VAIL (2000).

Estádio	Características
I	Envolvimento de um único linfonodo
II	Envolvimento de vários linfonodos em uma área regional (com ou sem as tonsilas)
III	Envolvimento generalizado dos linfonodos
IV	Envolvimento do fígado ou baço (com ou sem o estágio III da doença)
V	Manifestação no sangue e envolvimento da medula óssea e/ou outros sistemas (com ou sem os estágios I a IV da doença)
a	Sem sinais sistêmicos da doença
b	Com sinais sistêmicos da doença

O linfoma foi classificado de acordo com a localização anatômica em multicêntrico, cutâneo, extranodal, alimentar e mediastínico.

### Tratamento

Os animais com linfoma foram tratados de acordo com o protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin, 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), doxorrubicina (30 mg/m<sup>2</sup>, perfusão) e prednisona (2 – 0,5 mg/kg/dia) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Fase de indução da remissão com o emprego do protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin, citado por Nelson & Couto (2006), utilizado nos 27 cães com linfoma.

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

**Avaliação Hematológica e Imunofenotípica**

Para a realização dos hemogramas e da análise citométrica do sangue periférico, amostras de sangue foram obtidas por venipunção cefálica e envasadas em tubos a vácuo, contendo EDTA. As contagens globais eritrocitárias, leucocitárias e plaquetárias foram obtidas com o auxílio de um contador automático de células ABC Vet (HORIBA ABX – São Paulo/Brasil). As contagens leucocitárias diferenciais foram realizadas em esfregaços sangüíneos corados com Rosenfeld modificado, uma mistura de Metanol, Maygrund-Giemsa e Wriqth.

Foram obtidas nove amostras de sangue periférico, uma no momento do diagnóstico e as outras, uma semana após cada uma das oito sessões quimioterápicas.

O volume de 1mL de medula óssea foi obtido por punção do osso esterno com agulha hipodérmica 40x12 e seringa de 20mL, contendo uma gota de EDTA, no momento do diagnóstico e ao fim da fase de indução da remissão com o protocolo de Madison-Wisconsin.

Para saber se os valores encontrados para o hemograma estavam dentro da faixa de normalidade, utilizou-se a tabela de valores de referência utilizada no “Laboratório de Patologia Clínica Veterinária” do “Hospital Veterinário Governador Laudo Natel”. (Tabela 3)

**Tabela 3.** Valores de referência para hemograma de cães, utilizados no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinária “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária de Jaboticabal

<b>PARÂMETRO</b>	<b>VALOR</b>
<b>Hemácias</b> ( $\times 10^{12}/L$ )	<b>5,5 – 8,0</b>
<b>Hemoglobina</b> (g/L)	<b>120-180</b>
<b>Hematócrito</b> (L/L)	<b>0,37 – 0,55</b>
<b>VCM</b> (fL)	<b>60 - 77</b>
<b>CHCM</b> (g/L)	<b>310 - 340</b>
<b>Plaquetas</b> ( $\times 10^9/L$ )	<b>180 - 400</b>
<b>Leucócitos</b> ( $\times 10^9/L$ )	<b>6 - 18</b>
<b>Basófilos</b> ( $\times 10^9/L$ )	<b>0</b>
<b>Eosinófilos</b> ( $\times 10^9/L$ )	<b>1,2 – 1,8</b>
<b>Bastonetes</b> ( $\times 10^9/L$ )	<b>0 – 0,5</b>
<b>Segmentados</b> ( $\times 10^9/L$ )	<b>3,6- 13,8</b>
<b>Linfócitos</b> ( $\times 10^9/L$ )	<b>7,2- 5,4</b>
<b>Monócitos</b> ( $\times 10^9/L$ )	<b>0,18 – 1,8</b>

#### **Processamento das amostras de sangue periférico e medula óssea para citometria de fluxo**

As amostras forma processadas em um período máximo de 24 horas após a colheita e o procedimento dói realizado no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - Unesp, utilizando-se de cinco tubos falcon, como descrito na tabela abaixo.

**Tabela 4:** Preparo das amostras de sangue e medula óssea para análise citométrica.

Tubo	Amostra	Volume Anticorpo	Molécula	Fluorescência	Anticorpo Monoclonal	Tipo celular
1	100µL	-	-	-	-	-
2	100µL	2µL	γ1	PE	R104	Isotipo controle
		2µL	γ2	FITC	MCA1212	Isotipo controle
3	100µL	2µL	CD5	FITC	MCA1037	Linfócitos T
		2µL	CD4	PE	MCA1038	Linfócitos T auxiliar
4	100µL	2µL	CD5	FITC	MCA1037	Linfócitos T
		2µL	CD8	PE	MCA1039	Linfócitos T citotóxicos
5	100µL	2µL	CD45	FITC	MCA1042F	Leucócitos
		2µL	CD21	PE	MCA1781	Linfócitos B

Anticorpos monoclonais da AbDSerotec

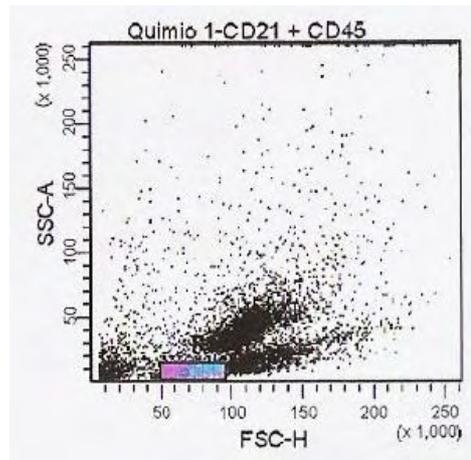
PE: Ficoeritrina

FITC: Isotiocinato de Fluorescência

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

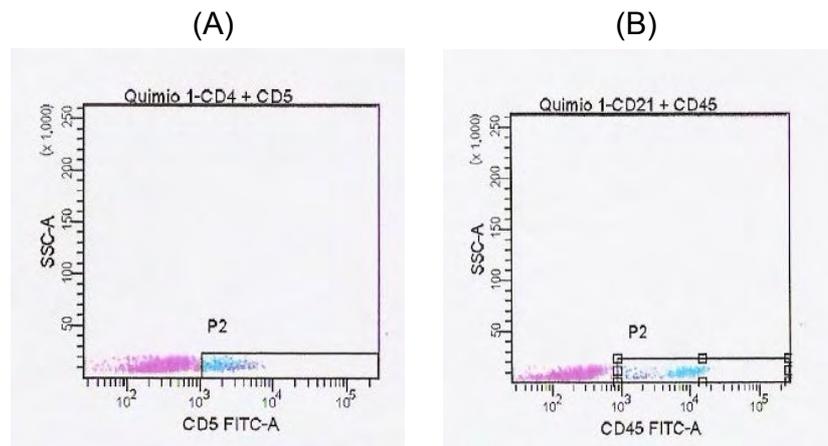
As amostras foram analisadas em até 3 dias após o preparo, no citômetro FACSCANTO (Becton Dickinson, San Jose, CA), localizado no Laboratório de Micologia, do Departamento de Análises Clínicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – Unesp.

Utilizando-se do programa FACSDiva (BD), para identificar e quantificar as células  $CD5^+ CD4^+$ ,  $CD5^+ CD8^+$  e  $CD45^+ CD21^+$ , foram obtidos 10000 eventos e foi realizado um *gate* (P1) sobre a população de linfócitos, tanto do sangue, como da medula óssea.

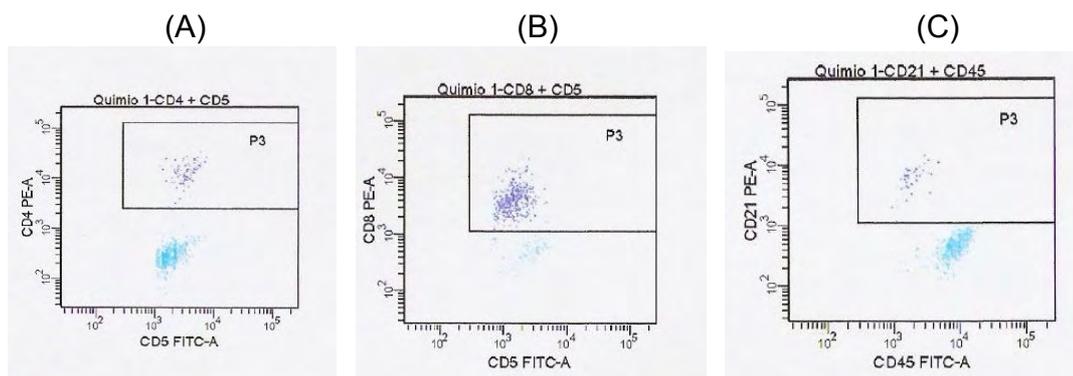


**Figura 1:** Distribuição das subpopulações leucocitárias, de acordo com a complexidade e o tamanho das células, com a *gate* sobre a população de linfócitos.

Foi realizado um novo gráfico com esta população linfocitária e uma nova *gate* (P2) foi colocada para se obter as subpopulações linfocitárias  $CD5^+$  ou  $CD45^+$  (Figura 2). Outro gráfico foi realizado com a população  $CD5^+$  ou  $CD45^+$  e outra *gate* foi realizada para se obter as populações  $CD5^+ CD4^+$ ,  $CD5^+ CD8^+$  e  $CD45^+ CD21^+$ . (Figura 3).



**Figura 2:** Distribuição das células de acordo com a complexidade interna da célula (“Side Scatter – SSC”), com a gate (P2) sobre as subpopulações linfocitárias CD5+ (A) e CD45+(B).



**Figura 3:** Gráfico das subpopulações linfocitárias CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (A), CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (B) e CD45<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> (C).

Foi realizado um cálculo sobre as porcentagens fornecidas pelo programa, assim os valores relativos expressos se referem diretamente sobre a população de linfócitos sanguíneos e sobre o número de células nucleadas na medula óssea. Os valores absolutos sanguíneos foram calculados com base nos valores relativos fornecidos pelo programa e nas contagens absolutas de linfócitos obtidas no hemograma.

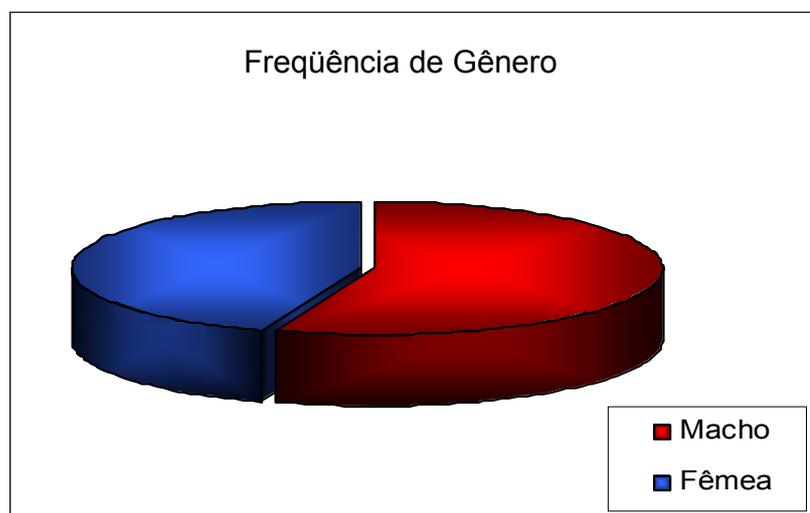
### Análise Estatística

Para análise estatística foi empregado o teste de Kruskal-Wallis, um teste não paramétrico conhecido como teste H, devido a grande variação dos valores das parcelas e pelo fato do número de parcelas não ser o mesmo do início ao fim do tratamento, em decorrência dos óbitos. Quando  $p < 0,05$ , considerou-se a diferença estatisticamente significativa. (AYRES et al., 2003).

## RESULTADOS e DISCUSSÃO

### Gênero

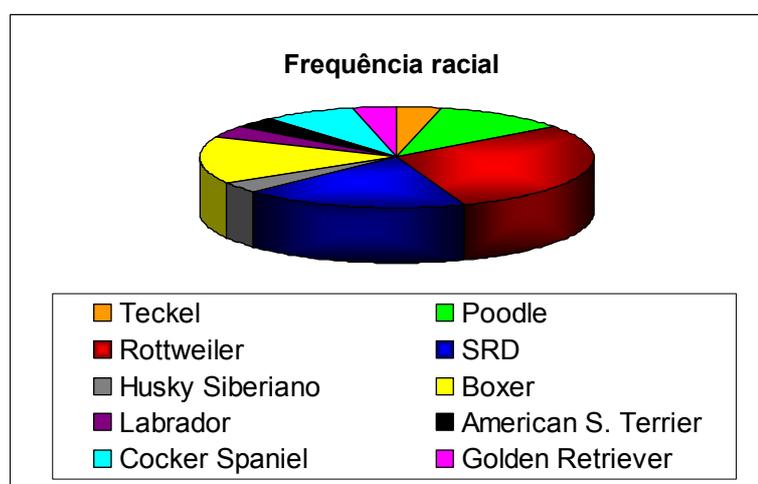
Dos vinte e sete animais, quinze eram machos (55,5%) e doze eram fêmeas (44,5%) (Figura 4). Desta forma, observa-se prevalência da doença em machos, embora não haja uma diferença estatística significativa entre os sexos. Segundo a maioria dos autores (MACEWEWN et al., 1987; DOBSON & GORMAN, 1993; STARRAK et al., 1997), os cães aparentemente não apresentam predisposição de gênero para o linfoma, entretanto Dobson & Gorman (1994), Cardoso et. al. (2003) e MORENO et al., 2007 encontraram uma maior incidência de machos em seus estudos.



**Figura 4:** Porcentagem do gênero de vinte e sete cães com linfoma submetidos ao protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin.

**Raça**

Nos 27 cães com linfoma, a distribuição racial foi a seguinte : oito Rottweilers (29,6%), quatro Boxers (14,8%), cinco sem raça definida - SRD (18,5%), três Poodles (11,1%), dois Cocker Spaniel (7,4%), um Husky Siberiano (3,7%), um Teckel (3,7%), um Labrador (3,7%), um American Stafford Terrier (3,7%) e um Golden Retriever (3,7%). (Figura 5).



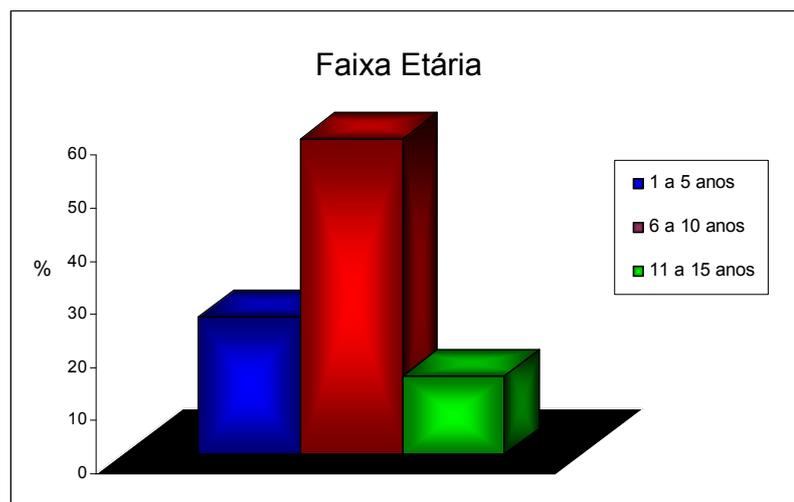
**Figura 5:** Porcentagem das diferentes raças de vinte e sete cães com linfoma submetidos ao protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin.

Embora a predisposição racial neste tipo de neoplasia seja ainda um assunto controverso (MOULTON & HARVEY, 1990), observou-se neste estudo, a predominância de Rottweilers. VAIL et al. (2001) descrevem a predisposição genética para o linfoma em uma família de Rottweilers nos Estados Unidos. Considerando-se que a maior parte dos cães desta raça no Brasil teve origem de cães importados, pode-se sugerir que subseqüentes cruzamentos e falta de controle na população de cães brasileiros, permitiram a difusão desta predisposição genética encontrada nesta família de cães americanos (MORENO et al., 2007). Os animais sem raça definida (SRD), no geral, também apresentaram uma incidência considerável neste estudo, concordando com CARDOSO et al. (2003) e MORENO et al. (2007). Tal fato pode ser decorrente da grande população de animais SRD e, conseqüentemente, do grande número de animais SRD atendidos, porém um levantamento da frequência de raças de todos os cães atendidos no Hospital “Governador Laudo Natel” deve ser realizada para confirmar tal fato. Autores afirmam que os animais da raça Boxer

representam a maior parcela de cães acometidos por linfoma, sugerindo uma predisposição genética desta raça para o linfoma (SÖZMEN et al., 2005; FORNEUL-FLEURY et al., 1997; PRIESTER & MCKAY, 1980), embora não seja a raça de maior frequência, o Boxer também aparece com certa frequência neste estudo.

### Idade

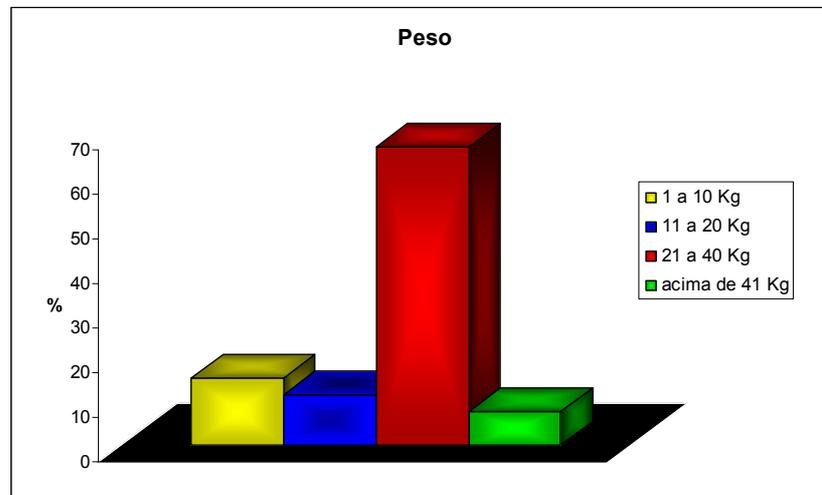
Quanto à faixa etária, observou uma variação de três a quinze anos ( $7,4 \pm 2,8$ ). A maioria dos cães (59,3%) encontra-se na faixa de cinco a dez anos, seguidos por animais na faixa de um a cinco anos (25,9%) e por animais de dez a quinze anos (13,8%) (Figura 3), concordando com os dados obtidos pela maioria dos autores (COUTO, 1986; MACEWEN et al., 1987; MACEWEN & YOUNG, 1996; STARRAK et al., 1997; CARDOSO et al., 2003; MORENO et al., 2007).



**Figura 6:** Porcentagem das faixas etárias de vinte e sete cães com linfoma submetidos ao protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin.

### Peso

Quanto ao peso pode-se notar que este variou entre 6,9 e 49kg ( $27,4 \pm 11,5$ ). A maioria dos cães encontrava-se entre 21 a 40 Kg (66,7%), seguidos de cães com 1 a 10 Kg (14,8%), com 11 a 20 Kg (11,1%) e acima de 41 Kg (7,4%) (Figura 7). Desta maneira, observa-se uma prevalência de animais de grande porte, fato este observado também no estudo de MORENO et al. (2007).

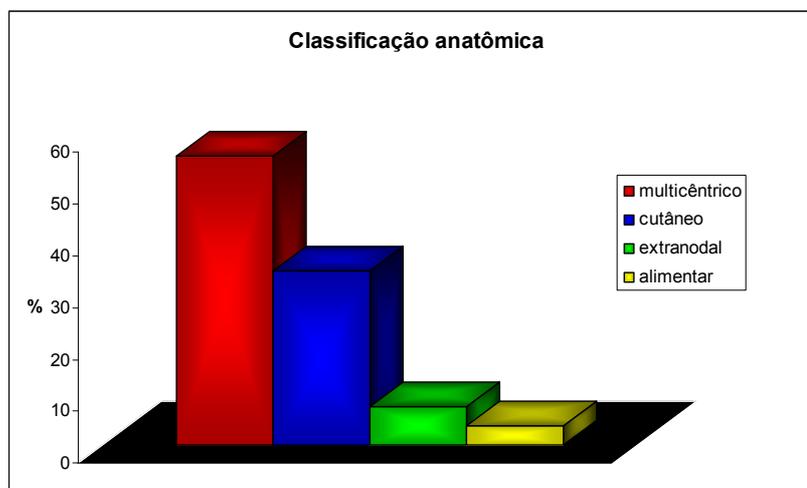


**Figura 7:** Peso corpóreo de vinte e sete cães com linfoma submetidos ao protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin.

### **Classificação Anatômica**

Em relação à classificação anatômica, quinze cães apresentaram linfoma multicêntrico (55,5%), nove apresentaram linfoma cutâneo (33,4%), dois extranodal (7,4%) e um alimentar (3,7%) (Figura 8).

A forma multicêntrica é a apresentação anatômica mais freqüente do linfoma, neste e nos demais estudos (MADWELL & THEILEN, 1987; SEQUEIRA et al., 1999; MORENO et al., 2007). O linfoma cutâneo também teve uma grande incidência neste estudo, assim como no de Moreno et al. (2007) que observaram que esta é a segunda apresentação mais comum. Já Madwell & Theilen (1987) relatam que, assim como a extranodal, a forma cutânea não tem uma grande frequência. Acredita-se que a maior frequência das formas multicêntrica e cutânea esteja relacionada com o diagnóstico, pois as alterações clínicas nestas formas são mais perceptíveis e permitem um diagnóstico mais rápido, diferentemente das formas alimentar e mediastínica, que podem ter sua incidência subestimada, pois estas formas apresentam sinais inespecíficos no paciente e dificultam um correto diagnóstico da doença. Além disso, estas últimas apresentações, tem um pior prognóstico, e muitos animais vão a óbito sem o diagnóstico (MORENO et al., 2007).

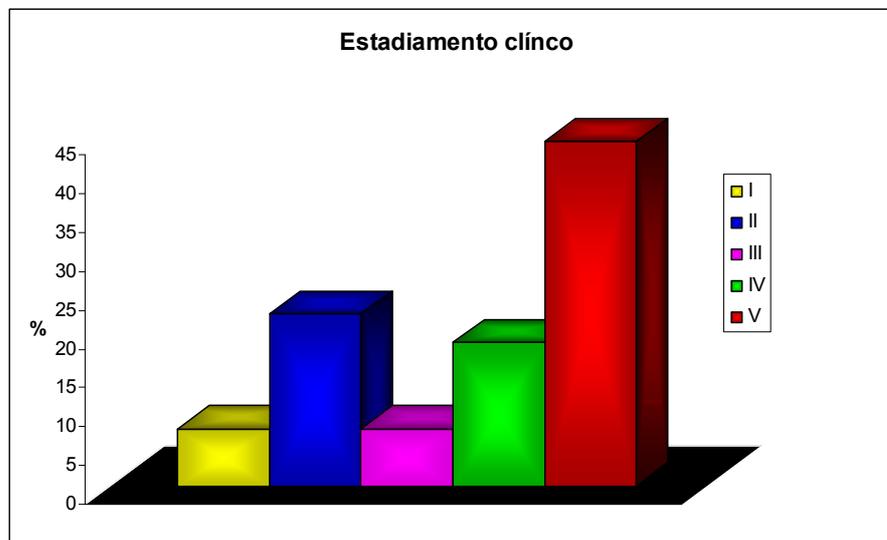


**Figura 8:** Apresentação anatômica do linfoma de vinte e sete cães com linfoma submetidos ao protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin.

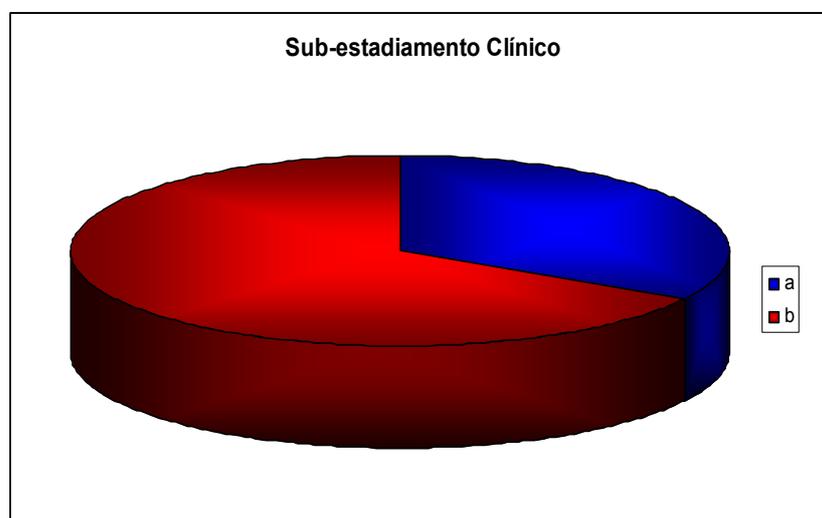
#### **Estadiamento e sub-estadiamento clínico**

Com relação ao estadiamento e sub-estadiamento clínico, descrito pela Organização Mundial da Saúde, baseados respectivamente na infiltração da doença nos órgãos, na presença ou ausência de sinais clínicos, dois animais apresentaram-se no estadio I (7,4%), seis no estadio II (22,2%), dois no estadio III (7,4%), cinco no estadio IV (18,5%) e doze no estadio V (44,4%) (Figura 9). Dos vinte e sete animais, nove animais apresentaram-se no sub-estadio a (33,3%) e dezoito apresentaram-se em sub-estadio b (66,6%) (Figura 7).

A maioria dos animais encontrava-se em estadio avançado e apresentavam sinais clínicos, indicando que os proprietários procuram tardiamente o tratamento e/ou que é muito difícil observar as alterações nos estágios iniciais, corroborando com a maioria dos estudos (GREENLEE et al., 1990; TESKE, 1994; STARRAK et al., 1997) A maior incidência é de animais em estadio V, o que difere dos resultados obtidos por CARDOSO et al. (2003), que observaram uma maior prevalência de animais em estadio IV. Tal fato deve ser decorrente da alta frequência de linfoma cutâneo neste estudo, já que os animais que apresentam essa forma anatômica dessa neoplasia foram classificados em estadio clínico V, de acordo com a Organização Mundial da Saúde. Além disso, CARDOSO et al. (2003) realizaram um levantamento de animais com diagnóstico de linfoma, diferentemente deste estudo, no qual foram incluídos somente os animais tratados.



**Figura 9:** Porcentagem dos estádios clínicos do linfoma de vinte e sete cães acometidos, submetidos ao protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin.

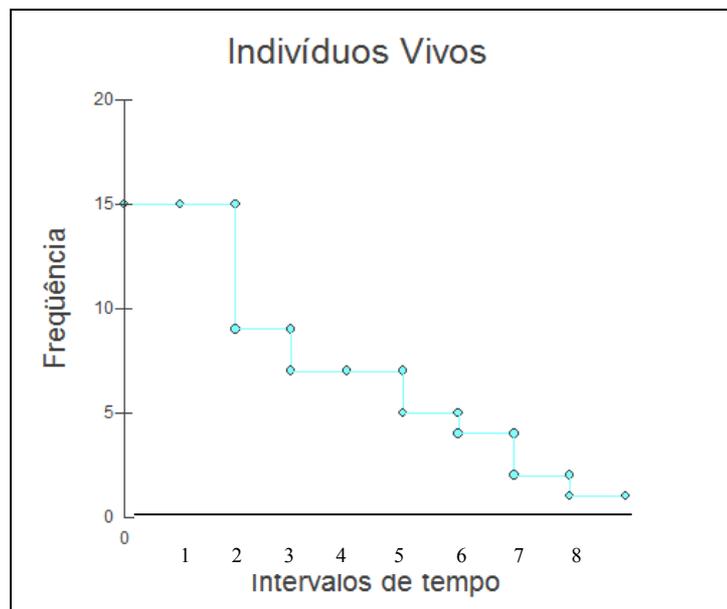


**Figura 10:** Porcentagem dos sub-estádios clínicos do linfoma de vinte e sete cães acometidos, submetidos ao protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin.

**Sobrevida**

Ao analisar-se o número de animais que morreram após cada sessão quimioterápica do protocolo de Madison-Wisconsin, pode-se observar que o maior risco de morte é após a primeira sessão quimioterápica, certamente como consequência da neutropenia, que ocorre com maior intensidade, sete dias após o início do tratamento e está relacionada ao risco potencial de morte do animal (LANORE & DELPRAT, 2004).

Observou-se também que a taxa de sobrevida se manteve na terceira e quarta sessão quimioterápica e quando se analisa as demais sessões, nota-se que a taxa de sobrevida diminui progressivamente.



**Figura 11:** Frequência de indivíduos vivos após cada uma das oito sessões quimioterápicas do protocolo de Madison-Wisconsin.

Os valores médios obtidos para o hemograma no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica, assim como as representações gráficas para este, estão dipostos na tabela 5 e nas figuras de 12 a 27, respectivamente.

As linhas tracejadas nos gráficos se referem aos valores máximos e mínimos do intervalo de valores considerados de referência pelo Laboratório de Patologis Clínica do Hospita Veterinário “Governador Laudo Natel”.

**Tabela 5:** Valores médios obtidos para o hemograma de vinte e sete cães com linfoma no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão do protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin.

	Diag	V +L-a + P	C + P	V + P	D + P	V	C	V	D	p
<b>Hemácias</b> (x10 <sup>12</sup> /μL)	4.99 a	5.21 a	5.30 a	5.19 a	5.12 a	4.92 a	4.96 a	5.01 a	4.87 a	0,96
<b>Hemoglobina</b> (g/L)	110 a	120a	120a	120 a	120 a	110 a	120 a	110 a	120 a	0,97
<b>Hematócrito</b> (L/L)	3,5 a	3,6 a	3,7 a	3,5 a	3,5 a	3,4 a	3,4 a	3,5 a	3,4 a	0,92
<b>VCM</b> (fL)	70 a	70 a	70 a	70 a	69 a	69 a	69 a	69 a	67 a	0,98
<b>CHCM</b> (g/L)	330 a	320 a	330 a	330 a	330 a	330 a	340 a	320 a	320 a	0,21
<b>Plaquetas</b> (x10 <sup>9</sup> /L)	276 a	327 a	417 a	424 a	342 a	412 a	418 a	347 a	306 a	0,22
<b>Leucócitos</b> (x10 <sup>9</sup> /L)	14.91 a	9.06 b	10.89 b	6.96 b	7.75 b	6.68 b	10.15 b	7.02 b	7.40 b	<0,05
<b>Basófilos</b> (x10 <sup>9</sup> /L)	0,02 a	0,04 a	0,01 a	0,02 a	0,01 a	0,04 a	0,01 a	0,01 a	0,06 a	0,99
<b>Eosinófilos</b> (x10 <sup>9</sup> /L)	0,34 a	0,24 a	0,38 a	0,19 a	0,15 a	0,28 a	0,57 a	0,45 a	0,84 b	<0,05
<b>Bastonetes</b> (x10 <sup>9</sup> /L)	0,28 a	0,22 a	0,18 a	0,18 a	0,09 a	0,12 a	0,25 a	0,30 a	0,15 a	0,91
<b>Segmentados</b> (x10 <sup>9</sup> /L)	11,09 a	7,02 b	9,00 a	5,23 b	6,13 b	4,66 b	8,06 b	4,70 b	5,21 b	<0,05
<b>Linfócitos</b> (x10 <sup>9</sup> /L)	2,47 a	0,92 a	0,84 a	0,95 a	1,00 a	1,25 a	1,02 a	1,27 a	0,94 a	0,77
<b>Monócitos</b> (x10 <sup>9</sup> /L)	0,69 a	0,63 a	0,60 a	0,41 a	0,38 a	0,37 a	0,32 a	0,29 a	0,23 a	0,10

VCM: volume corpuscular médio; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média  
 Diag: diagnóstico; V: vincristina; L-a: L-asparaginase; P: pednisona; C: ciclofosfamida; D: doxorubicina  
 p<0,05 Letras iguais não diferem entre si

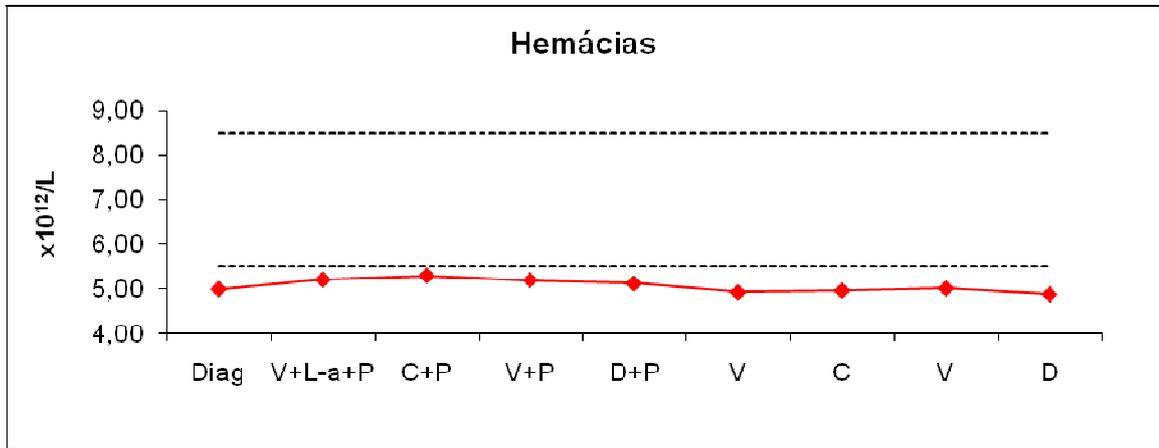
### Eritrograma

A contagem global de hemácias (Figura 12), a concentração de hemoglobina (Figura 13) e o hematócrito (Figura 14), ficaram abaixo dos valores considerados de referência, enquanto que os índices hematimétricos (Figuras 15 e 16), se mantiveram dentro dos valores de referência, caracterizando anemia normocítica normocrômica ao longo de todo o tratamento. Tal achado, condiz com alguns autores, que ressaltam que a anemia é geralmente comum e de caráter crônico (normocítica normocrômica e não regenerativa) ou, com menor freqüência, hemolítica de origem imunomediada (OGILVIE & MOORE, 1995, TESKE, 1996; VAIL et al., 2001; DHALIWAL et al., 2003a; ETTINGER, 2003).

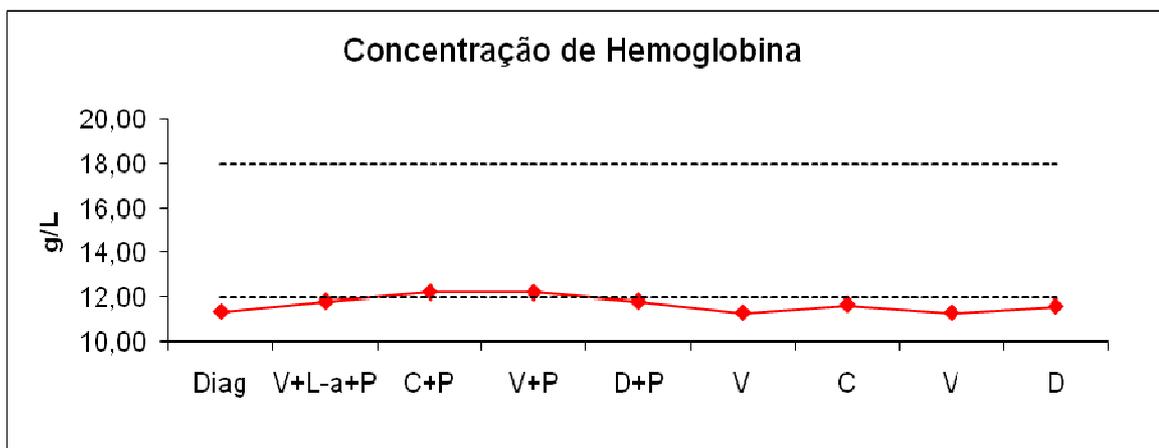
Embora Ogilvie & Moore, (1995) relatem que a anemia associada ao linfoma, é um efeito colateral da quimioterapia e se desenvolva mais tardiamente que a neutropenia e trombocitopenia, em decorrência da vida mais longa das hemácias, os animais incluídos neste estudo, já apresentavam anemia antes do início do tratamento. Desta forma, a quimioterapia não é responsável pela anemia, mas pode ter contribuído para o agravamento desta. Assim como a hiporexia ou anorexia, alterações digestivas e distúrbios hemorrágicos como hematêmese e melena que ocorrem no linfoma, podem contribuir para a ocorrência da anemia (CARDOSO et al., 2004).

De acordo com JAIN (1993) e MINISCALCO et al. (2003) pode-se observar uma modesta a moderada anemia em 46% dos cães com linfoma. No presente estudo, quando se considera o hematócrito para considerar a presença de anemia, nota-se que, com exceção da oitava sessão quimioterápica, mais de 46% dos animais encontravam-se anêmicos quando avaliados (Figura 12).

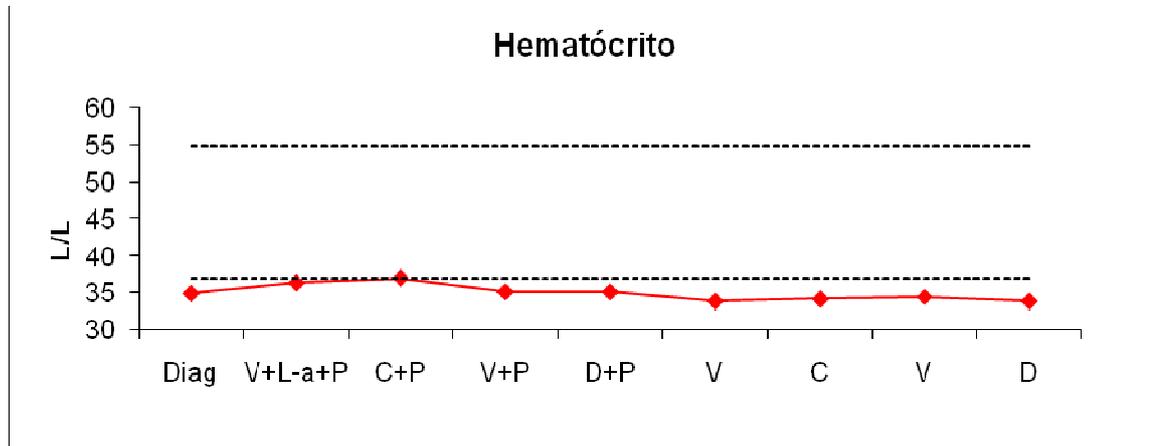
Além disso, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios do eritrograma nos nove momentos estudados.



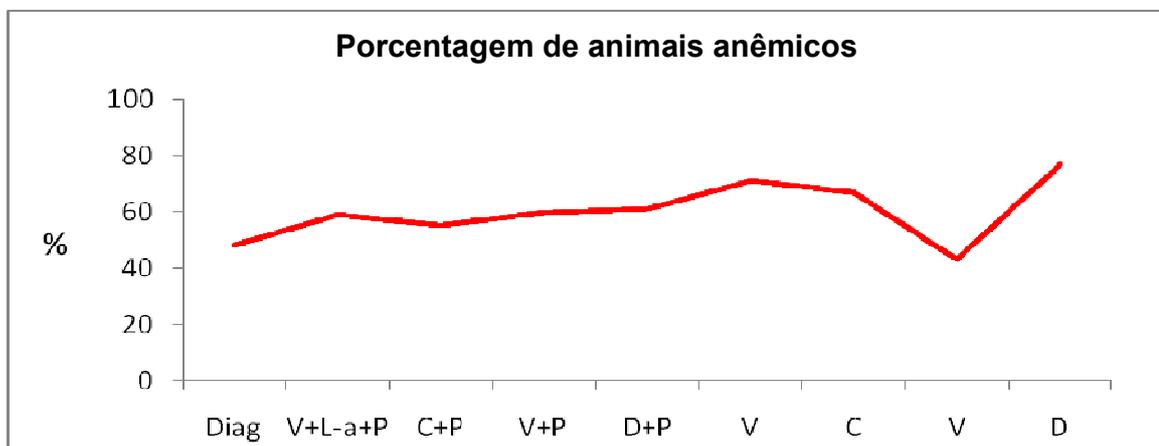
**Figura 12:** Médias da contagem global de hemácias ( $\times 10^{12}/L$ ) no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.



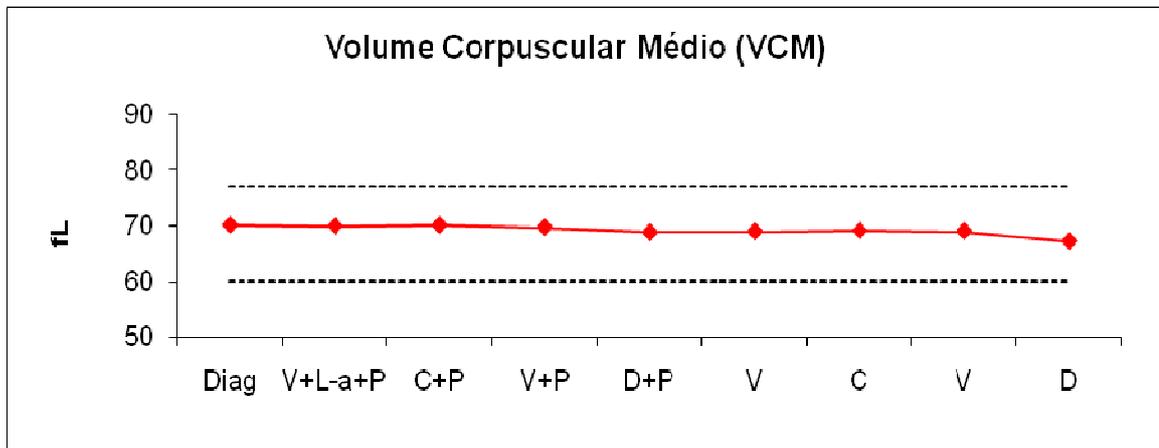
**Figura 13:** Médias da concentração de hemoglobina (g/L) no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.



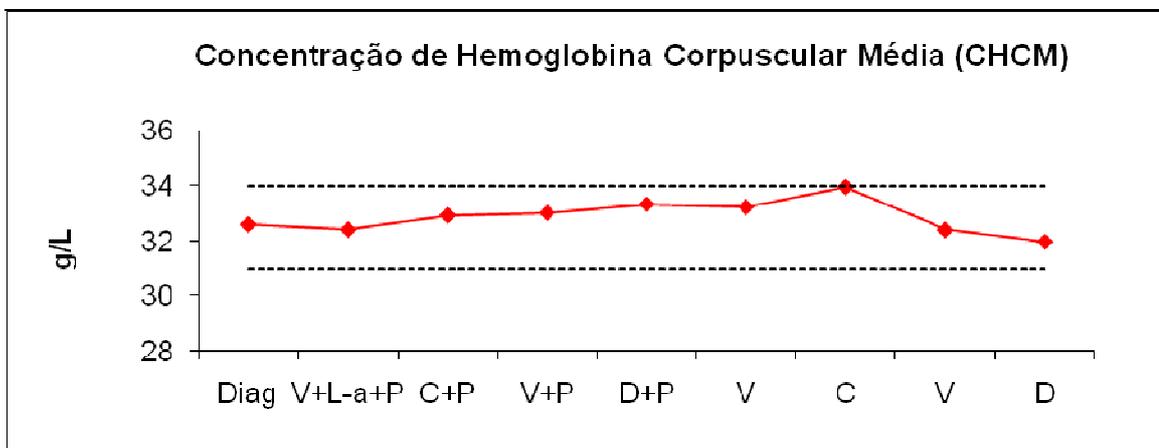
**Figura 14:** Médias da taxa de hematócrito (L/L) no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.



**Figura 15:** Porcentagem de animais anêmicos (%) no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.



**Figura 16:** Médias do volume corpuscular médio (VCM) (fL) no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.

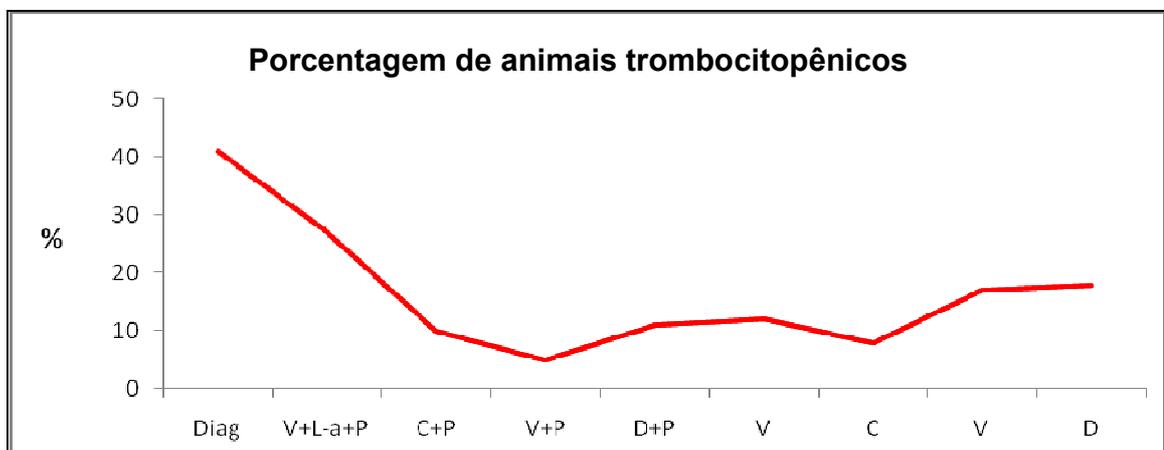


**Figura 17:** Médias da concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM) (g/L) no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.

Plaquetograma

Os valores médios obtidos para a contagem global de plaquetas se mantiveram, na maioria das vezes, dentro da faixa de normalidade e, não apresentaram diferenças significativas entre os momentos (Figura 18).

Embora não se tenha observado trombocitopenia em nenhum momento quando se analisa os valores médios para este parâmetro, 40% dos animais apresentaram trombocitopenia de moderada a severa no momento do diagnóstico (Figura 18). Segundo ETTINGER (2003), a trombocitopenia está presente em 30 a 50% dos casos de linfoma e pode ser explicada pela queda na produção (comprometimento da medula óssea), por destruição (imunomediada) ou consumo (seqüestro esplênico). A trombocitopenia associada à neutrofilia, pode indicar infiltração da medula óssea pelo linfoma (OGILVIE & MOORE, 1995).



**Figura 18:** Porcentagem de animais trombocitopênicos (%) no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.

### Leucograma

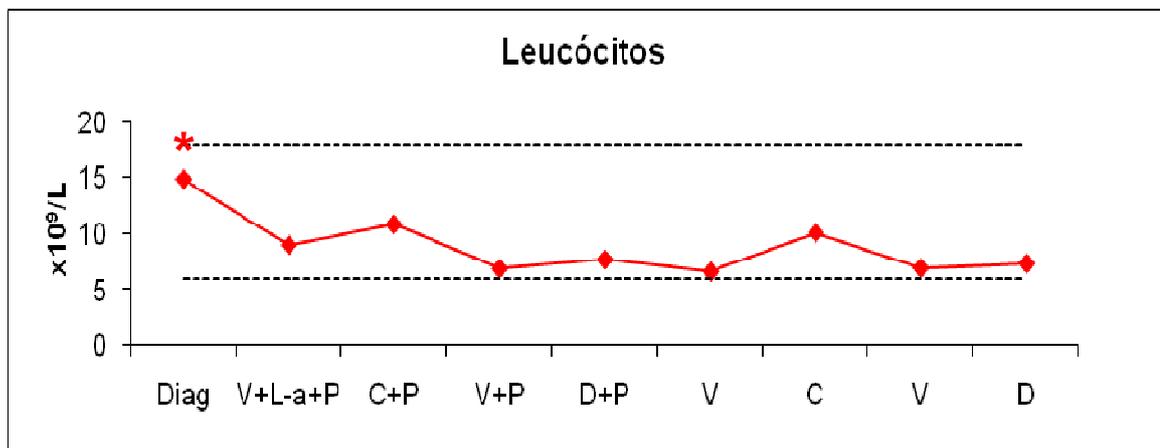
A contagem global de leucócitos apresentou-se dentro do intervalo de valores considerados de referência em todos os momentos estudados (Figura 19). O valor médio encontrado no momento do diagnóstico, no qual se observou a maior contagem global de leucócitos, foi estatisticamente diferente daqueles encontrados após o início do tratamento se. Embora o valor médio para este momento esteja dentro do intervalo de normalidade, 22% dos animais apresentaram leucocitose (Figura 20), valor que difere de Teske (1996), que relata que em aproximadamente 30% dos casos há leucocitose. Além disso, Teske (1996) relata que leucopenia também pode ocorrer nos casos de linfoma, porém com uma

freqüência muito menor, fato este não observado neste estudo, uma vez que 18% dos animais apresentaram leucopenia no momento do diagnóstico (Figura 21).

Na segunda sessão observou-se uma considerável diminuição do número de leucócitos, na qual 45% dos animais apresentaram leucopenia (Figura 21) e 33% apresentaram neutropenia.

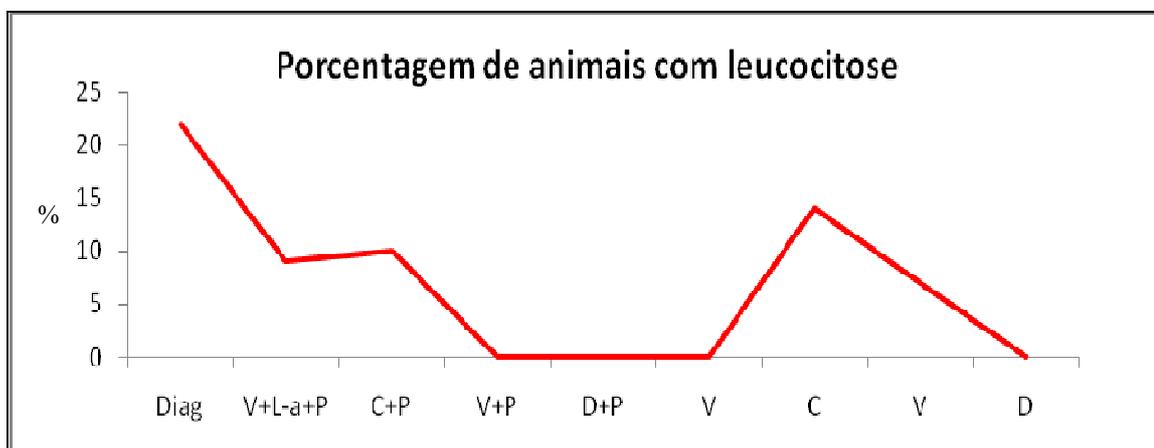
Ao analisar os valores obtidos após uma semana da aplicação da vincristina, associada ou não a L-asparaginase e a prednisona, nota-se que estes são os momentos nos quais há a maior porcentagem de animais leucopênicos e neutropênicos (Figura 21 e 24). Sendo assim, pode-se considerar que a vincristina foi capaz de promover uma maior supressão de leucócitos circulantes em função da diminuição de neutrófilos segmentados, quando comparada com os demais quimioterápicos utilizados. Além disso, as maiores porcentagens de cães com leucocitose e neutrofilia (Figura 21 e 24) foram observadas após a aplicação da ciclofosfamida, com exceção do momento do diagnóstico.

Quando o analisa-se a população de neutrófilos segmentandos (Figura 22), observa-se uma diferença significativa na primeira e na terceira sessão quimioterápica.

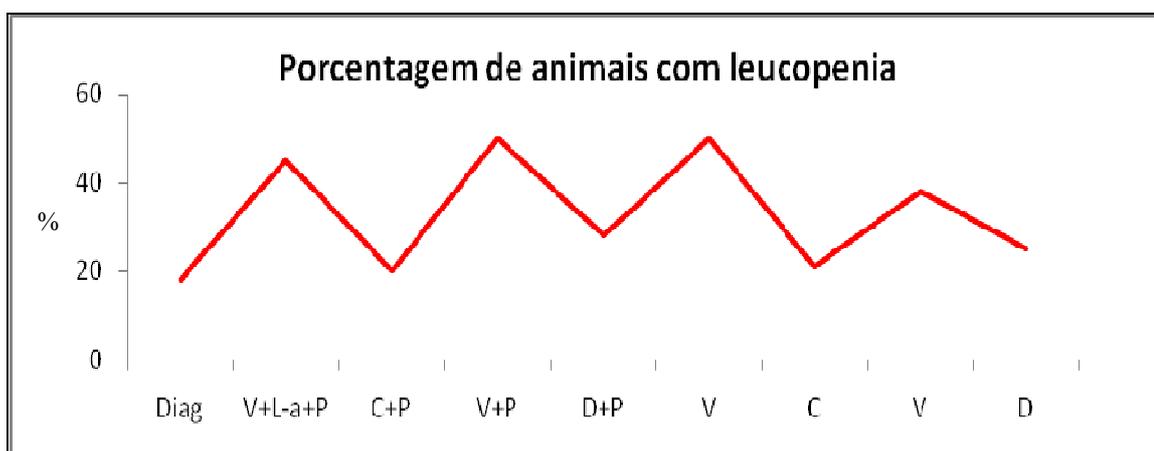


\* diferença estatística significativa

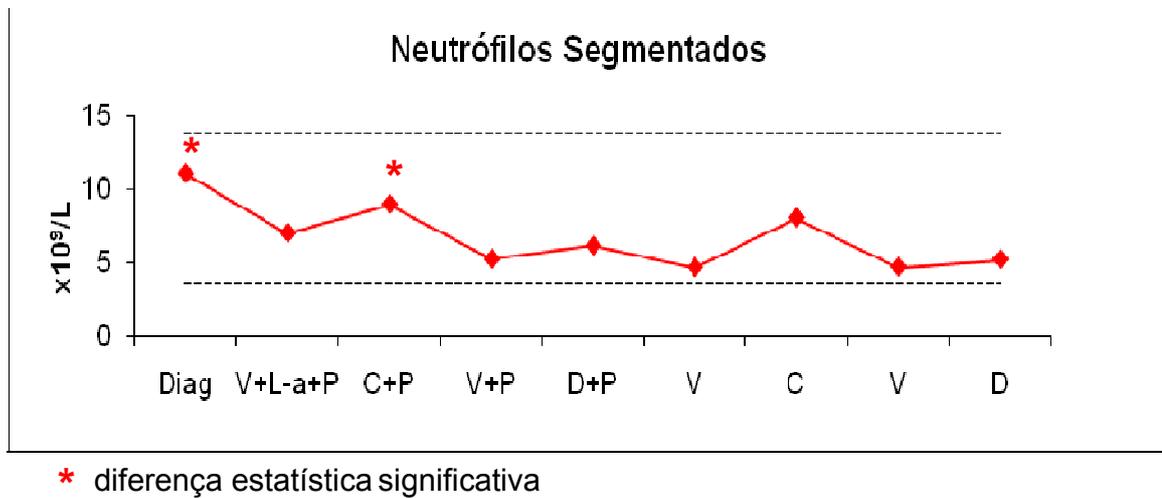
**Figura 19:** Médias da contagem global de leucócitos (x10<sup>9</sup>/L) no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.



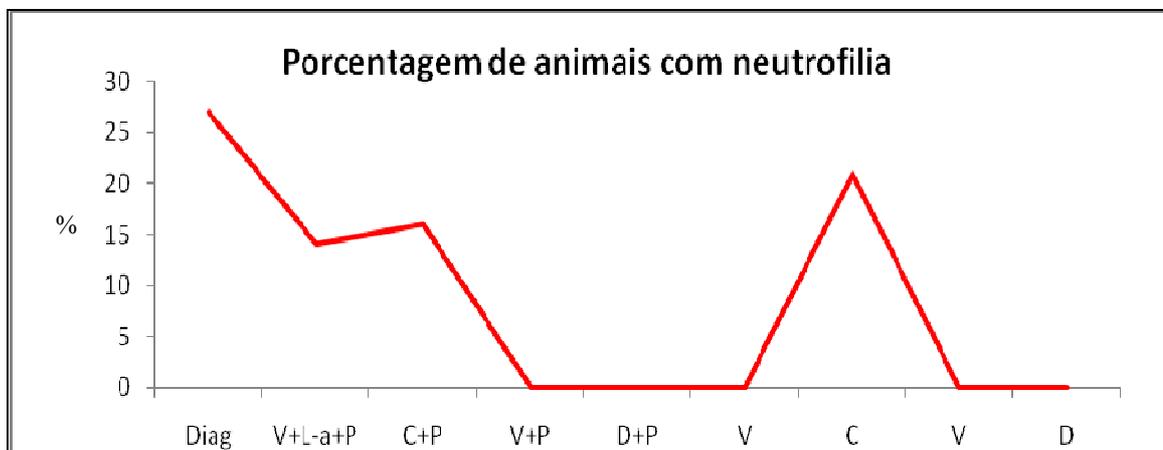
**Figura 20:** Porcentagem de animais com leucocitose no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.



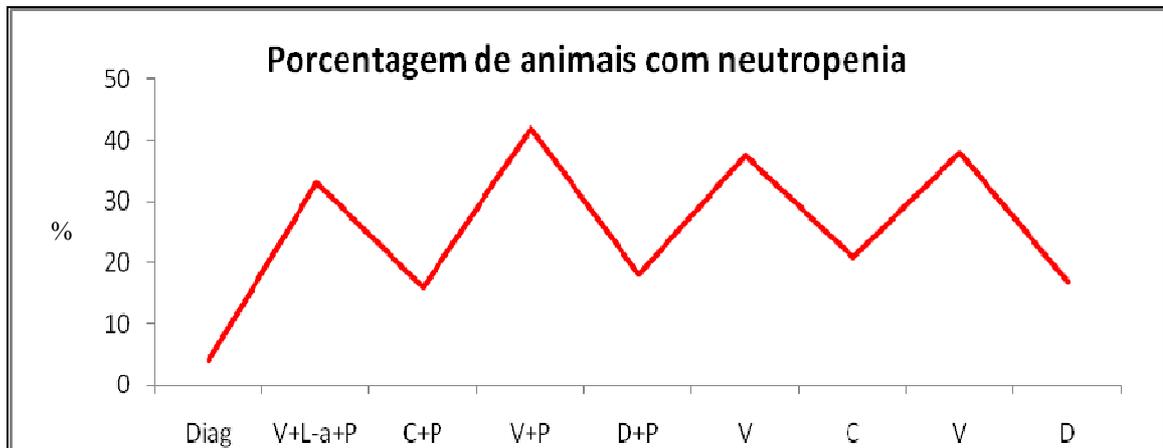
**Figura 21:** Porcentagem de animais com leucopenia no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.



**Figura 22:** Médias da contagem absoluta de neutrófilos segmentados (x10<sup>9</sup>/L) no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.

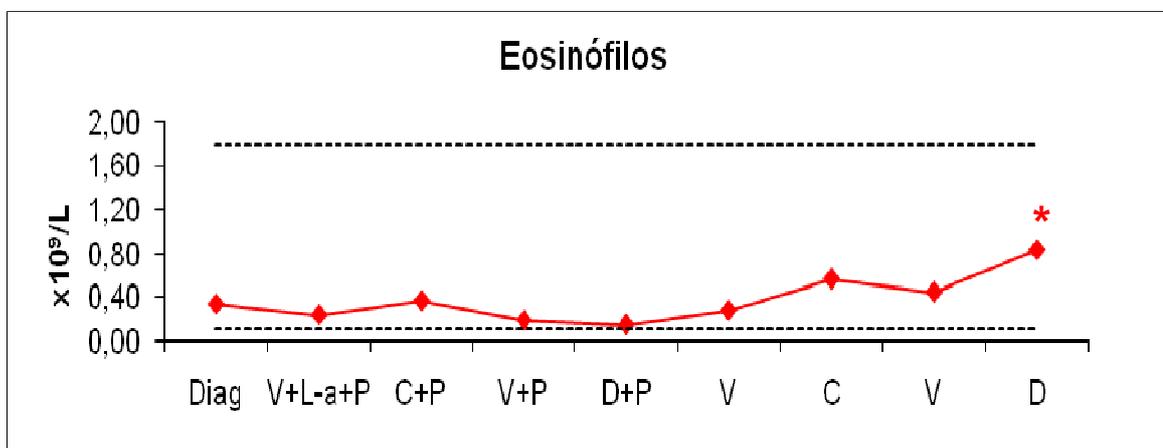


**Figura 23:** Porcentagem de animais com neutrofilia no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.



**Figura 24:** Porcentagem de animais com neutropenia no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.

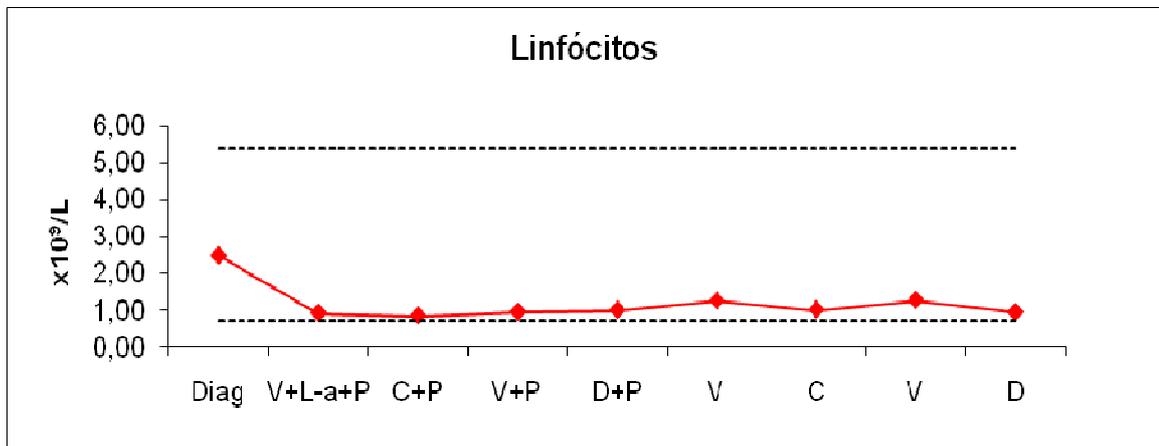
Com relação à população de neutrófilos bastonetes e de basófilos não houve diferença significativa entre os momentos.



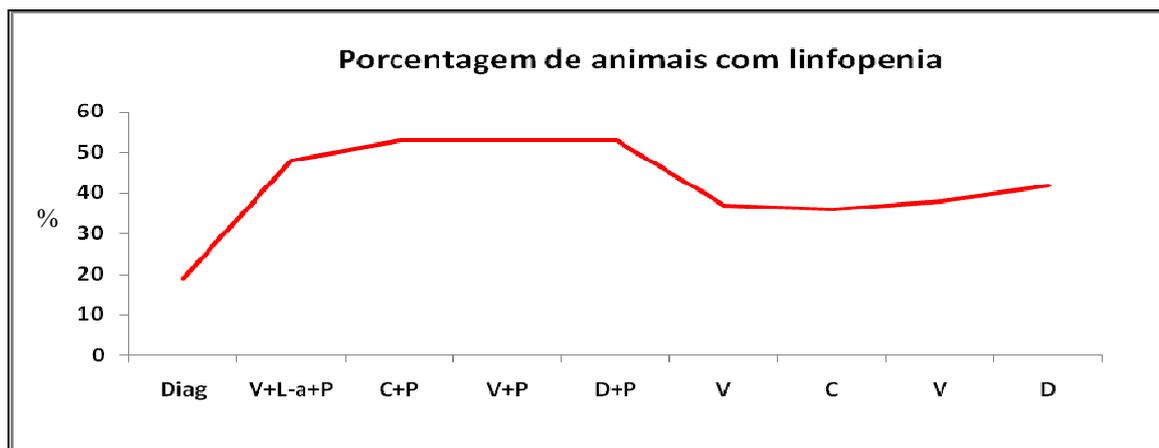
\* diferença estatística significativa

**Figura 25:** Médias da contagem absoluta de eosinófilos (x10<sup>9</sup>/L) no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.

A contagem absoluta de eosinófilos foi diferente significativamente após a última sessão(Figura 25), em decorrência de uma cão que apresentou eosinofilia marcada.



**Figura 26:** Médias da contagem absoluta de linfócitos ( $\times 10^9/L$ ) no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.



**Figura 27:** Porcentagem de animais com linfopenia no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.

Em relação aos linfócitos (Figura 26), pode-se observar que não houve diferença significativa entre os momentos e, com exceção do momento do diagnóstico, no qual 11% dos cães apresentaram linfocitose, a contagem diferencial se manteve muito próximo do limite inferior da faixa de referência para esta célula.

Após a primeira, segunda, terceira e quarta sessão quimioterápica, mais de 50% dos animais apresentaram-se linfopênicos. Desta maneira, pode-se demonstrar uma expressiva supressão da linhagem linfocitária pela quimioterapia, já que de acordo com Gauthier et al.

(2005), os cães com linfoma submetidos a quimioterapia, tem uma considerável redução na concentração de linfócitos sanguíneos e um absoluto decréscimo de subtipos de linfócitos.

Porém, não se pode deixar de considerar os processos que obstruem o padrão circulatório normal dos linfócitos, que ocorre no linfoma, no qual os linfócitos que deixam o sangue, se tornam presos nos linfonodos hipertrofiados ou em efusões quilosas que conduzem ao sequestro do linfócito para cavidades corporais (REBAR, 1998).

Observou-se uma diminuição progressiva no número absoluto de monócitos, mas os valores médios encontrados se mantiveram dentro dos valores de referência e também não se observa diferença significativa entre os momentos. Embora a monocitopenia não tenha um significado específico, ela ocorre especialmente na panleucopenia, decorrente de parvovirose, toxicidade estrogênica e quimioterapia (BIENZLE, 2000).

### **Origem celular do linfoma**

A definição da origem celular do linfoma a partir da imunofenotipagem dos linfócitos no sangue e na medula óssea, só foi possível nos animais que se encontravam em estadiamento clínico V, decorrente do envolvimento do sangue e/ou medula óssea, ou seja, quando havia presença de células linfomatosas nos mesmos.

Dos sete animais que apresentavam envolvimento do sangue, três animais apresentaram linfoma de origem T, sendo que um animal apresentou uma quantidade excessiva de células  $CD5^+CD8^+$  e outros dois de células  $CD5^+CD4^+$ . Os outros quatro animais apresentaram linfoma B, pois se observou uma população predominante de células  $CD45^+CD21^+$ . Estes últimos apresentaram uma discrepância muito maior na distribuição das subpopulações linfocitárias, quando comparados com os animais que apresentaram linfoma T.

Quando analisou-se a medula óssea observou-se que apenas três dos quatro animais que apresentavam linfoma B, demonstraram a mesma distribuição das subpopulações linfocitárias observada no sangue. Enquanto que um destes quatro animais não apresentou alteração na distribuição. Tal fato coincidiu com o observado nos esfregaços de medula óssea, ou seja, destes, em apenas três animais foram encontradas células linfomatosas na medula óssea. Além disso, em outro animal no qual não foram encontradas células

linfomatosas nos esfregaços de sangue periférico e de medula óssea, apresentou uma grande população de linfócitos CD45<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> na medula óssea. O animal que apresentou células linfomatosas no sangue decorrente de uma maior população de células CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, também demonstrou a mesma celularidade no esfregaço de medula óssea e a mesma distribuição na imunofenotipagem da mesma. O mesmo ocorreu com os dois animais com linfoma T com aumento de células CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. Porém, dois animais nos quais não foram encontradas células linfomatosas no sangue e na medula óssea, apresentaram um considerável aumento nas populações CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> dos mesmos. Isto demonstra que o envolvimento do sangue e/ou medula óssea pelo linfoma, nem sempre é detectável em um simples esfregaço sanguíneo. A detecção de células neoplásicas, bem como o imunofenótipo da origem celular da neoplasia, é possível por meio da análise citométrica, mesmo que não haja linfocitose (MINISCALCO et al, 2003).

Embora com uma diferença não significativa entre as origens celulares do linfoma, pode-se notar uma prevalência de linfoma B, o que corrobora com a maioria dos autores consultados, nos quais a prevalência imunofenotípica dos linfossarcomas é de células B. (CARTER et al., 1986; TESKE, 1994; COSTA et al., 2005). Porém diagnosticar linfomas T por citometria de fluxo é mais desafiador, já que não há um marcador sensível de monoclonalidade (COSTA et al., 2005). Assim, o número de linfomas de origem T pode estar subestimado.

### **Imunofenotipagem de linfócitos**

Para ter como referência de valores, foi realizada a imunofenotipagem de linfócitos no sangue periférico e na medula óssea de dez cães considerados hígidos, e o resultados obtidos estão dipostos nas tabelas 6, 7 e 8 a seguir.

**Tabela 6:** Valores relativos médios, máximos e mínimos e, desvios padrão, das subpopulações linfocitárias CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e CD45<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> no sangue periférico de cães sadios (grupo controle).

	Média %	Máximo %	Mínimo %	Desvio Padrão
CD5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	36.95	49,25	26,10	7.51
CD5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	19.95	28,05	12,99	4.74
CD45 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup>	15.24	25,03	8,35	6.02

**Tabela 7:** Valores absolutos médios, máximos e mínimos e, desvios padrão, das subpopulações linfocitárias CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e CD45<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> no sangue periférico de cães sadios (grupo controle).

	Média x10 <sup>6</sup> /L	Máximo x10 <sup>6</sup> /L	Mínimo x10 <sup>6</sup> /L	Desvio Padrão
CD5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	546.18	908,11	275,45	206.78
CD5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	281.50	515,47	169,69	102.79
CD45 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup>	241.11	397,65	94,45	112.94

**Tabela 8:** Valores relativos (%) médios, máximos e mínimos e, desvios padrão, das subpopulações linfocitárias CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e CD45<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> na medula óssea de cães sadios (grupo controle).

	Média %	Máximo %	Mínimo %	Desvio. Padrão
CD5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	0.01	0.05	0.00	0.02
CD5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	0.06	0.31	0.00	0.12
CD45 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup>	0.03	0.10	0.00	0.03

Os estudos em cães com citometria de fluxo são mais frequentemente relacionados à doença, e muitos dos dados normativos e dos valores de referência estabelecidos foram compilados de estudos anteriores (CHABANNE et al., 1995; BOURDOISEAU et al., 1997; PAPPALARDO et al., 2001). Assim, o uso mais difundido da citometria de fluxo, para

detectar e caracterizar subpopulações linfocitárias de sangue periférico na medicina veterinária destacou a necessidade para a definição cuidadosa de valores de referência para as combinações de marcadores para porcentagem e valores absolutos das subpopulações em indivíduos saudáveis (CHABANNE et al., 2000; CULMSEE & NOLTE, 2002; WEISS, 2002).

Após a primeira sessão quimioterápica, foi avaliada a imunidade dos animais em tratamento, quantificando-se as subpopulações linfocitárias CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e CD45<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup>. Principalmente no que se diz respeito às subpopulações linfocitárias T, já que em animais de companhia, a análise destas subpopulações tem sido frequentemente usada para avaliar a imunocompetência, o efeito de fármacos no sistema imune e a progressão de doenças infecciosas (NOLTE, 2003).

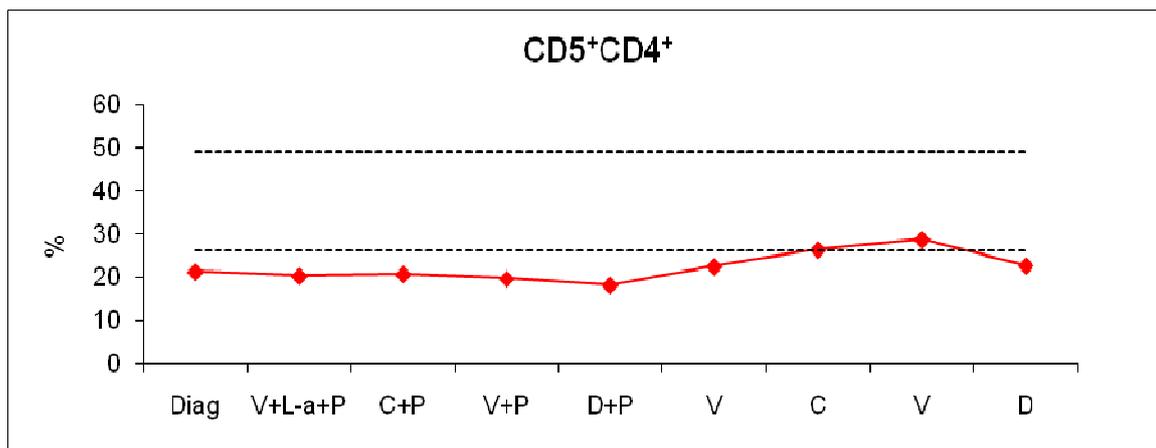
**Tabela 9:** Valores relativos médios das subpopulações linfocitárias CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e CD45<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> no sangue periférico de vinte e sete cães com linfoma no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.

	Diag	V +L-a + P	C + P	V + P	D + P	V	C	V	D	p
CD5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	20.89 a	20.16 a	20.56 a	19.54 a	18.04 a	22.42 a	26.36 a	28.71 a	22.64 a	0,73
CD5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	13.43 a	6.43 a	8.18 a	5.25 a	4.98 a	6.94 a	12.75 a	9.03 a	7.20 a	0,67
CD45 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup>	18.51 a	11.27 a	8.34 a	10.81 a	4.93 a	6.19 a	5.17 a	4.66 a	9.49 a	0,08

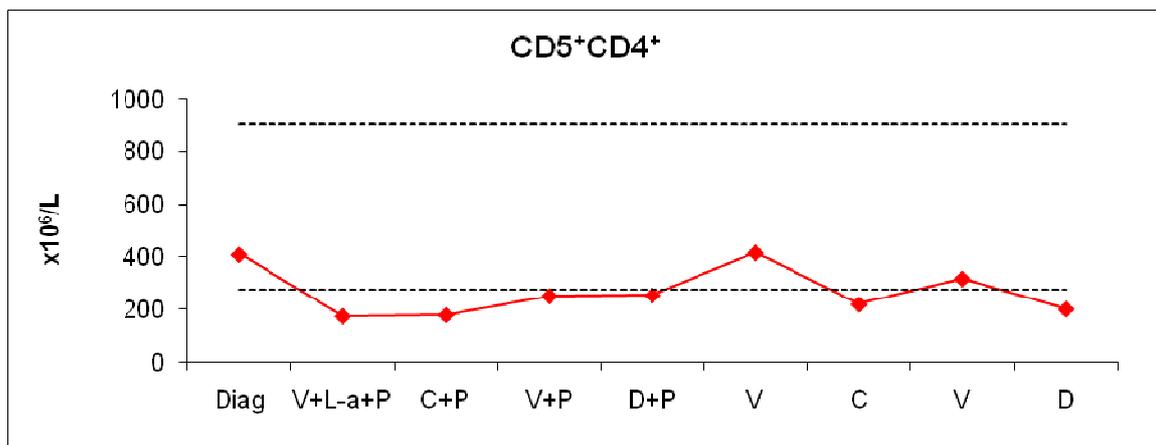
**Tabela 10:** Valores absolutos médios das subpopulações linfocitárias CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e CD45<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> no sangue periférico de vinte e sete cães com linfoma no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.

	Diag	V +L-a + P	C + P	V + P	D + P	V	C	V	D	p
CD5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	410.05 a	174.62 a	178.89 a	251.74 a	254.44 a	416.73 a	219.94 a	317.79 a	201.50 a	0,78
CD5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	354.54 a	74.48 a	39.43 a	83.07 a	43.90 a	90.50 a	68.37 a	64.58 a	58.48 a	0,53
CD45 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup>	592.62 a	90.52 a	54.52 a	84.61 a	33.75 a	62.36 a	36.30 a	40.60 a	103.69 a	0,23

Independente da subpopulação linfocitária e dos momentos estudados, não se observou diferença significativa na imunofenotipagem dos linfócitos sanguíneos.



**Figura 28:** Valores relativos médios da subpopulação linfocitária CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> no sangue periférico de cães com linfoma no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.

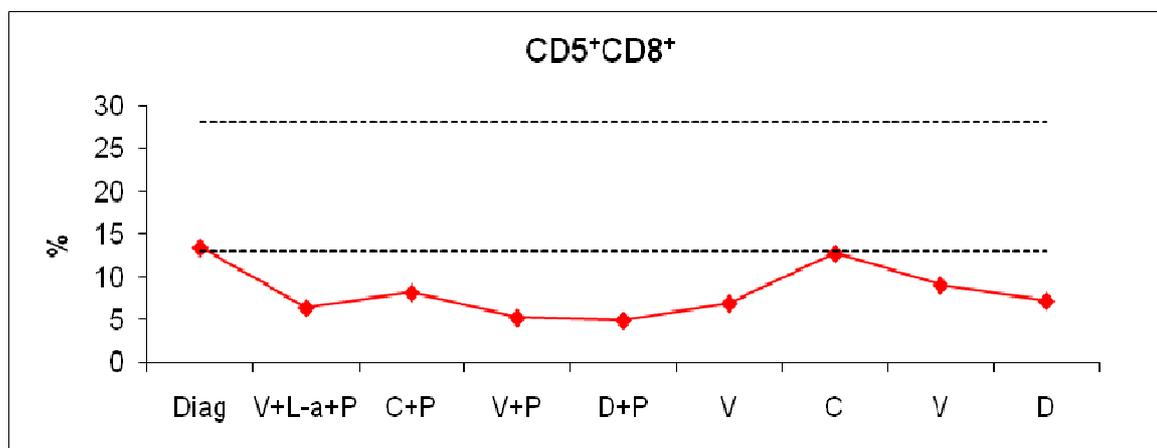


**Figura 29:** Valores absolutos médios da subpopulação linfocitária CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> no sangue periférico de cães com linfoma no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.

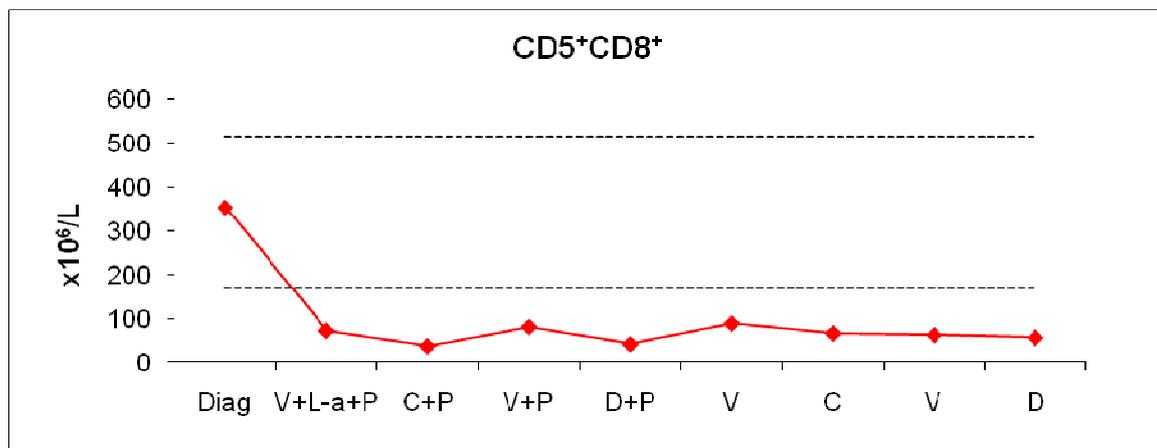
Os valores médios relativos da subpopulação linfocitária  $CD5^+CD4^+$  (Figura 28) apresentaram-se dentro do intervalo obtido para cães sadios somente após a última aplicação de ciclofosfamida e de vincristina. Nos demais momentos, os valores estão abaixo daqueles encontrados no grupo controle. Com relação aos valores absolutos para esta subpopulação linfocitária, observou-se que somente os valores encontrados no momento do diagnóstico e após as duas últimas aplicações de vincristina estavam dentro da faixa de valores do grupo controle.

De acordo com Walter et al. (2006), o decréscimo da subpopulação  $CD4^+$ , pode ser atribuída mais aos efeitos da neoplasia subjacente do que aos efeitos da quimioterapia por si só (WALTER et al, 2006)

A depleção de células T auxiliares é quando se considera as propriedades imunossupressivas da quimioterapia, particularmente da poliquimioterapia (WALTER et al. 2006).



**Figura 30:** Valores relativos da subpopulação linfocitária  $CD5^+CD8^+$  no sangue periférico de cães com linfoma no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.

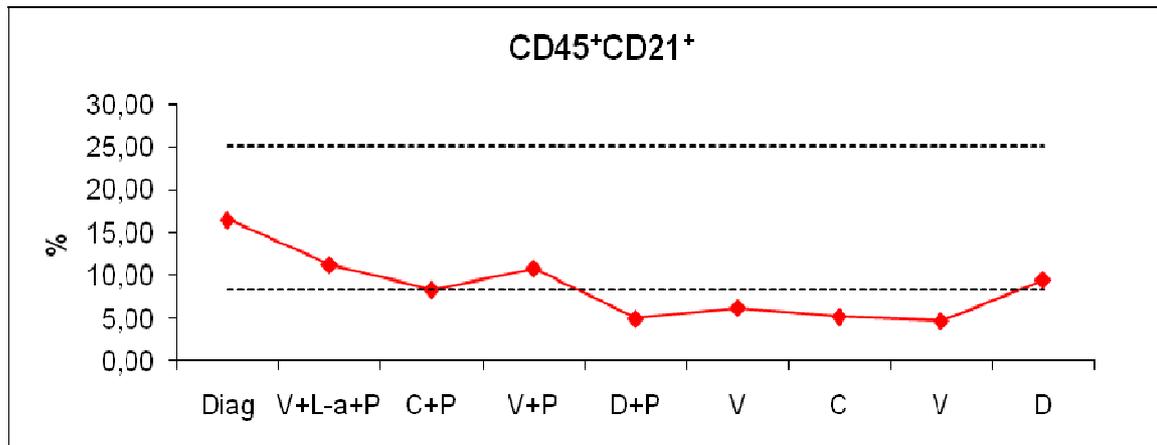


**Figura 31:** Valores absolutos médios da subpopulação linfocitária CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> no sangue periférico de cães com linfoma no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.

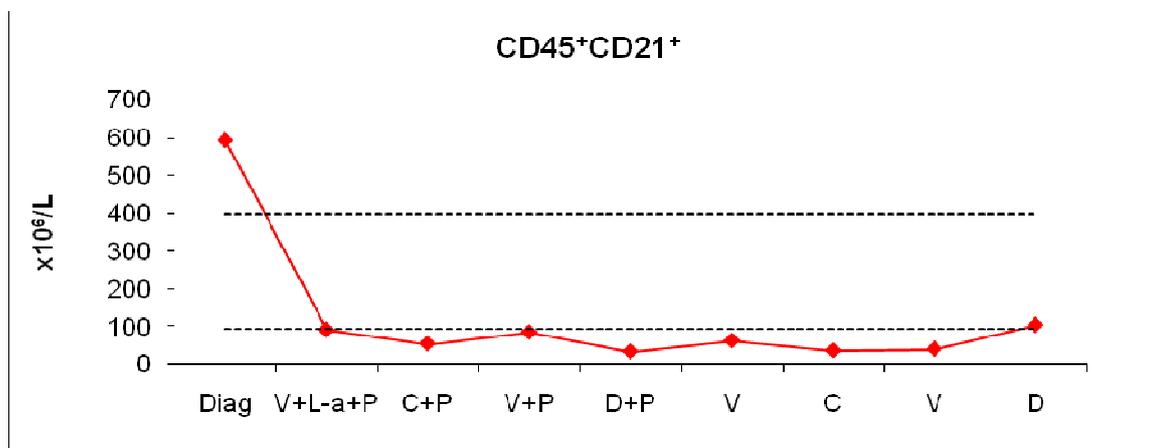
O único valor médio obtido que se encontra dentro da faixa de normalidade, quando se observa o valor absoluto (Figura31), foi no momento do diagnóstico. Quando analisa-se os valores relativos, observa-se que além do momento do diagnóstico, o valor obtido após a última aplicação de ciclofosfamida também se encontra sobre a linha de valor mínimo. Assim, nota-se que a subpopulação linfocitária CD5+CD8+ sofreu depleção durante todo o tratamento.

Em estudos com a administração de corticosteróide em única dose e em doses repetidas, demonstrou-se que há uma linfopenia absoluta profunda, mas transitória, com a depleção de todas as subpopulações linfocitárias, principalmente de células CD8<sup>+</sup> (RINKKARDT et al., 1999; NOLTE, 2003). Neste estudo, verificou-se uma depleção de células T citotóxicas por todo o período estudado, que talvez poderia ser explicado pela associação do corticosteróide a outros agentes quimioterápicos.

De acordo com Nolte (2003), as células citotóxicas caninas são relativamente mais susceptíveis aos efeitos linfopênicos de fármacos imunossupressores do que as células T auxiliares. Fato este que foi observado quando comparas-e os dados obtidos para as duas subpopulações de células T neste estudo.



**Figura 32:** Valores relativos médios da subpopulação linfocitária CD45<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> no sangue periférico de cães com linfoma no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.

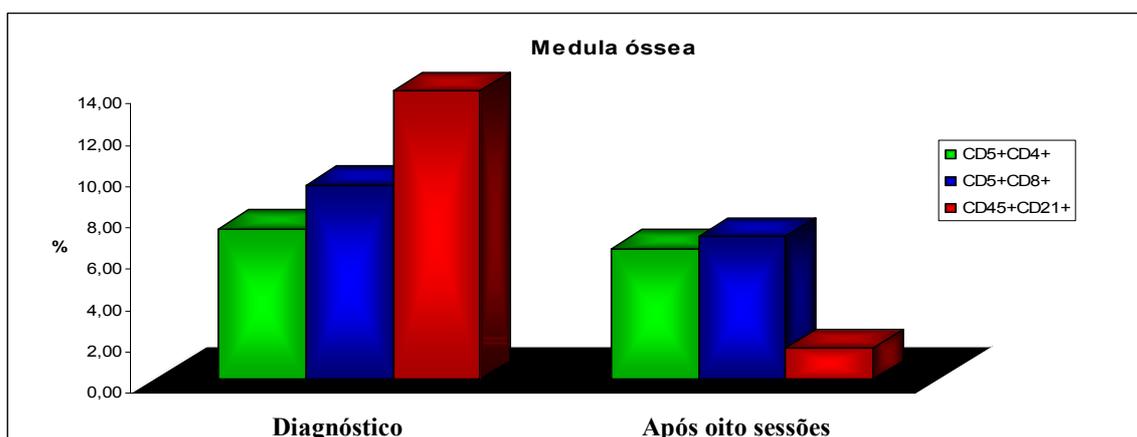


**Figura 33:** Valores absolutos médios da subpopulação linfocitária CD45<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> no sangue periférico de cães com linfoma no momento do diagnóstico e uma semana após cada sessão quimioterápica.

Quando analisa-se a população de células B (Figura 32 e 33), nota-se que na primeira sessão, encontra-se a maior porcentagem destas células e o maior valor absoluto, sendo este último, superior aos valores da faixa de referência. Tal fato se deve aos quatro animais que apresentavam linfoma B, com repercussão no sangue e, como relatado

anteriormente, estes animais apresentaram uma porcentagem muito elevada destas células e, concomitantemente, apresentavam números elevados na contagem de linfócitos no momento do diagnóstico. Nota-se também uma queda brusca dos valores encontrados na primeira sessão para a segunda, principalmente nos valores absolutos, já que houve também uma diminuição no número de linfócitos absolutos neste momento. Os picos observados na após a aplicação da vincristina associada a predinisona e após a última aplicação de doxiciclina, expressos com maior intensidade nos valores relativos, se devem a recidiva do linfoma em dois animais, nos quais houveram apenas aumento da porcentagem, sem haver aumento do número de linfócitos.

De maneira geral, o número de células B decresceu progressivamente ao longo da quimioterapia. Walter et al. (2006) também observou um decréscimo significativo no número de células B depois da primeira semana de tratamento e uma diminuição significativa pelo restante dos seis meses de estudo. Desta maneira, de acordo com Walter et al. (2006) pode-se dizer que a administração da poliquimioterapia é capaz de induzir uma rápida e sustentável diminuição no número de células B, ou seja, é capaz de alterar a imunidade humoral.



**Figura 34:** Valores relativos médios das subpopulações linfocitárias CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e CD45<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> na medula óssea de cães com linfoma no momento do diagnóstico e após as oito sessões de quimioterapia.

**Tabela 11:** Valores relativos médios das subpopulações linfocitárias CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e CD45<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> na medula óssea de cães com linfoma no momento do diagnóstico e após oito sessões quimioterápicas.

	Diagnóstico	Após 8 sessões
CD5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	7,28	6,31
CD5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	9,39	6,91
CD45 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup>	13,96	1,51

Os valores médios relativos obtidos para as subpopulações linfocitárias CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e CD45<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> na medula óssea antes e após o tratamento, demonstram que os animais com linfoma B, apresentam também na medula óssea uma expressão maior de células B, quando comparados com os animais com linfoma T em relação às células T auxiliar e citotóxica. Além disso, assim como no sangue periférico, ocorre uma depleção mais intensa de células B após o tratamento.

No que se diz respeito às células T, se vê que há uma maior porcentagem de células CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, quando comparadas com as células CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, antes e após ao tratamento.

Porém, o que se é mais notável, é a diferença entre os valores obtidos para os animais sadios daquelas obtidos para os animais com linfoma antes e após o tratamento. Embora a linhagem linfocítica esteja bem representada, quando se observa os esfregaços de medula óssea dos animais saudáveis, as subpopulações linfocitárias estudadas quase não estão representadas quando se realiza a análise citométrica da medula destes animais.

**Conclusões**

Diante dos resultados obtidos, analisados e interpretados, pode-se concluir que as principais alterações no hemograma foram observadas no momento do diagnóstico e, desta maneira, se referem ao linfoma e não ao tratamento empregado. Quanto à utilização da imunofenotipagem de linfócitos para definir a origem celular do linfoma pode-se concluir que estes marcadores utilizados no sangue periférico e na medula óssea, não são suficientes para determinar o tipo celular do linfoma em todos os animais estudados. E quanto à quantificação das subpopulações linfocitárias  $CD5^+CD4^+$ ,  $CD5^+CD8^+$  e  $CD45^+CD21^+$  pode-se concluir que há uma redução no número destas células após o início da quimioterapia, embora não se possa assumir que estes efeitos são decorrentes exclusivamente do tratamento. Além disso, os valores relativos médios da subpopulações linfocitárias estudadas na medula óssea, obtidos nos animais saudáveis são muito inferiores àqueles obtidos para animais com linfoma, necessitando assim de um estudo mais amplo com a medula óssea de animais saudáveis para comprovar tal fato e buscar uma explicação para esta diferença;

**Referências**

- BARNES, P. J. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. **Clinical Science**, n. 94, p.557-572, 1998.
- BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C; MAGNOL, J. P.; SAINT-ANDRÉ, I.; CHABANNE, L. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology** n. 56, p.345-351, 1997.
- CARDOSO, M.J.L.; MACHADO, L.H.A; ROCHA, N.S.; MOUTINHO, F.Q.; CIAMPOLINI, P. A. Linfoma canino: revisão de cinquenta e quatro casos. **Bioscience Journal**, v.19, n.13, p131-142, 2003.
- CHABANNE, L., FOURNEL C., C. CAUX, J. BERNAUD, C. BONNEFOUND, J. C. MONIER, and D. RIGAL (1995): Abnormalities of lymphocyte subsets in canine lupus erythematosus. **Autoimmunity** 22, 1-8
- 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.189-198,2000.
- CARTER, R. F.; VALLI, V. E.; LUMSDEN, J. H. The cytology, histology and prevalence of cell types in canine lymphoma classified according to the National Cancer Institute Working Formulation. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.50, n.2, p.154–164, 1986.
- COSTA, F.; Pereira, F.G.; VASSALO, J.; FREITAS, L.L.L.; LORAND-METZE, I. A utilidade da citologia por punção com agulha fina aliada a imunofenotipagem no diagnóstico dos linfomas não-Hodgkin. **Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia** [online], v. 27, n. 1, p. 16-20, 2005.
- 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, cap. 78, p. 864-869, 1986.
- CULMSEE, K. Durchflußzytometrische Untersuchungen von Knochenmark und Blut gesunder und leukämiekranker Hunde. Hannover, tierärztl. Hochsch., Diss, 2000.
- 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.
- CULMSEE, K; NOLTE, I. Flow cytometry and its application in small animal oncology.

**Methods Cell Science**, n.24, p49-54, 2002.

DHALIWAL, J. S.; BALASUBRAMANIAM, T.; QUEK, C. K.; GILL, H. K.; NASURUDDIN, B. A. Reference ranges for lymphocyte subsets in a defined Malaysian population. **Sigapore Medicine Journal**, n.36, p.288-291, 1995.

DHALIWAL, J.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.

DOBSON, J.M., GORMAN, N.T. Canine Multicentric lymphoma. 2: Comparison of response to two chemotherapeutic protocols. **Journal of Small Animal Practice**, v.35, p.9-15, 1993.

DOBSON, J.M. et al. Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma. **Journal of Small Animal Practice**, v.42, p.377-384, 2001.

ETTINGER, S.N. Principles of treatment for canine lymphoma. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.18, n.2, p. 92-102, 2003.

FOURNEL-FLEURY, C.; PONCE, F.; FELMAN, P.; BLAVIER, A.; BONNEFONT, C.; CHABANNE, L.; MARCHAL, T.; CADORE, J.L.; GOY-THOLLOT, I.; LEDIEU, D.; GHERNATI, I.; MAGNOL, J.P. Canine T-cell lymphoma: a morphological, immunological, and clinical study of 46 new cases. **Veterinary Pathology**, v.39, p.92-109, 2002.

FURIE, W.S. Lymphoma presentig as complex anemia. **Canine Practice**, v.18, n.1, p.23-25, 1993.

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

GREENLEE, P.G., FILIPPA, D.A., QUIMBY, F.W. et al. Lymphomas in dogs: a morphologic, immunologic, and clinical study. **Cancer**, v.66, p.480-490, 1990.

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

KIUPEL, M.; TESKE, E.; BOSTOCK, D. Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. **Veterinary Pathology**, v.36, p.292-300, 1999.

LANORE, D.; DELPRAT, C. **Quimioterapia Anticancerígena**. São Paulo: Roca, 191p, 2004.

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 the dog: 22 cases (1974-1984). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.189, n.2, p.214-217, 1986.
- MACEWEN, E.G.; HURVITZ, A.I. Diagnosis and management of monoclonal gamopathies. **Veterinary Clinics of North America - Symposium on Clinical Veterinary Oncology**, v.7, n.1, p.119-132, 1977.
- 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, . cap. 28 B, p. 451-479, 1996
- MADEWEKLL, B.R.; FELDMAN, B.F. Caracaterization of anemias with neoplasia in small animals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.176, n.5, p.419-425, 1980
- MILLER, E. Immnusuppression – An Overview. **Seminars of Veterinary Medical Surgery (Small Animal)**, v.12, p.144-149, 1997.
- MADWELL, B.R.; THEILEN, G.H. Hematopoietic neoplasms, sarcomas and related conditions. Part IV: Canine. In: THEILEN, G.H.; MADWELL, B.R. **Veterinary cancer medicine**. Philadelphia: Lea Febiger, 2ed., p.392-401, 1987.
- MINISCALCO, b.; GUGLIELMINO, R.; MORELLO, E.; TARDUCCI, A; GEUNA, M.; Clinical usefulness of pheripheral blood lymphocytes subsets in canine lymphoma. **Veterinary Research Communications**, n. 1, sup. 27, p. 407- 409, 2003.
- MILNER, R.J. et al. Immunophenotypic classification of canine malignat lymphoma on formalin-fixed paraffin wax-embedded tissue by means of CD2 and CD79a cell markers. **Onderspoort Journal of Veterinary Research**, v.63, p.309-313, 1996.
- MOULTON, J.E., HARVEY, J.W. Tumors of the lymphoid and hematopoietic tissues. *In*: MOULTON, J.E. **Tumors in domestic animals**, 3.ed. Califórnia: University of California, p.240-244, 1990.
- 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. 46-42, 2007.
- NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina interna de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 1087-1096, 2006.

- OGILVIE, G. K.; MOORE, A. S. Management of Specific Diseases: Clinical Briefing: Lymphoma. In:\_\_\_\_\_. Managing the Veterinary Cancer Patient. New Jersey: **Veterinary Learning Systems**, p.228-259, 1995.
- PAPPALARDO, B. L.; BROWN, T. T., TOMPKINS, M.; BREITSCHWERDT, E. B. Immunopathology of Bartonella vinsonii (berkhoffii) in experimentally infected dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 83, p.125-147, 2001.
- PRIESTER, W.A., McKAY, F.W. **The occurrence of tumors in domestic animals. Bethesda**, 166p, 1980.
- 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.; KRENBIEL, J.D. Prevalence of leukaemia blood and bone marrow in dogs with multicentric lymphoma. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.194, n.10, p.1427-1429, 1989.
- RINKARDT, N. E., KRUTH, S. A.; KAUSHIK, A. The effects of prednisone and azathioprine on circulating immunoglobulin levels and lymphocytes subpopulations in normal dogs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, n. 63, p. 18-24, 1999.
- STARRAK, G.S.; BEARY, C.B.; PAGE, R.L.; JOHNSON, J.L.; THRALL, D.E. Correlation between thoracic radiographic changes and remission/survival duration in 270 dogs with lymphosarcoma. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, Raleigh, v.38, n.6, p.411-418, 1997.
- 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 Diagnostical Investigation* n.17, p.323–329, 2005.
- 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.
- TESKE, E. Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma. **The European Journal of Companion Animal Practice**, v. 6, p. 59-71, 1996.
- 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, cap. 91, p. 620-625, 2000.

VAIL, D.M.; MACEWEN, G.E.; YOUNG, K.M. Canine lymphoma and lymphoid leukemias. In: WITHROW, S.; MACEWEN, G.E. **Small Animal Clinical Oncology**. 3 ed. Philadelphia: WB Saunders, p. 558-590; 2001.

WALTER, C.U.; BILLER, B.J.; LANA, S.E.; BACHAND, A.M., DOW, S.W. Effects of chemotherapy on immune responses in dogs with cancer. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, n. 20, p. 342-347, 2006.

WEISS, D. J. Application of flow cytometric techniques to veterinary clinical hematology. **Journal of Veterinary Clinical Pathology**, n.31, p. 72-82, 2002.

# *Capítulo 3*

**Avaliação Hematológica e Imunofenotípica de Cães com Linfoma em Remissão  
Submetidos ao Transplante Autólogo de Medula Óssea.**

Hematological and Immunophenotypical Evaluation of Dogs with Lymphoma in Remission  
Submitted to Autologous Bone Marrow Transplantation.

**RESUMO:** No presente estudo foram realizados transplantes autólogos de medula óssea em sete cães com linfoma em remissão. O transplante consistiu de coleta de medula óssea, preparo e congelamento da bolsa que continha o material coletado, condicionamento do animal com 500 mg/m<sup>2</sup> de ciclofosfamida, infusão da medula óssea e aplicação de fator estimulador de colônia. Para avaliar a recuperação hematopoiética pós-transplante, realizou-se hemograma e análise citométrica do sangue e medula óssea, quantificando as subpopulações linfocitárias CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e CD45<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> por 120 dias após o transplante. Embora não tenha ocorrido diferença significativa entre os resultados obtidos, a alteração mais expressiva no hemograma foi a presença de anemia normocítica normocrômica e na imunofenotipagem de linfócitos, observou-se diminuição da população CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, concomitante com o aumento da população CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, sete dias após o transplante. Além disso, a população de células B diminuiu por 60 dias. Por fim, a recuperação da imunidade mediada por células, somente ocorreu após 120 dias do transplante autólogo de medula óssea e a recuperação da imunidade humoral não ocorreu durante os 120 dias de estudo.

**Palavras-chave:** hemograma, citometria de fluxo, quimioterapia com alta dose.

**ABSTRACT** In the present study, seven dogs with lymphoma in remission were submitted to autologous bone marrow transplantation. The transplant consisted in harvest of bone marrow, preparation and freezing of the stock bag that contained the collected material, conditioning of the animal with 500mg/m<sup>2</sup> of cyclophosphamide, infusion of the bone marrow and infusion of colony stimulator factor. To evaluate the post-transplant hematological recovery, were done by hemogram and cytometric analysis of the blood and bone marrow, quantifying the

lymphocytic subpopulations CD5+CD4+, CD5+CD8+ and CD45+CD21+ per 120 days after the transplant. Although there weren't significant difference in the results, the most expressive alteration in the hemogram was the presence of normocytic normocromic anemia and in the immunophenotyping, the reduction of CD5+CD4+ subset population was observed, concomitant with the increase of the CD5+CD8+ subset population, seven days after the transplant. Moreover, the population of cells B decrease for 60 days. Finally, the recovery of the cell immunity occurred at day 120 of the autologous bone marrow transplantation and the humoral immunity didn't occur until of 120 days of study.

**Key-words:** hemogram, flow cytometry, high dose chemotherapy.

## **INTRODUÇÃO**

O transplante de células-tronco hematopoiéticas consiste na infusão de células com a função de restabelecer a hematopoiese no receptor. É atualmente utilizado para o tratamento de diversas doenças neoplásicas (leucemias, linfomas, mieloma múltiplo) e não neoplásicas (aplasia medular, hemoglobinopatias, distúrbios metabólicos ou imunológicos congênitos e doenças auto-imunes) (BITTENCOURT & ROCHA, 2006).

O transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas consiste no uso de doses mieloablativas de quimioterapia, associada ou não à radioterapia, com o intuito de contornar a resistência das células neoplásicas às doses usuais, seguida do uso das células-tronco para resgatar ou acelerar a recuperação da hematopoiese (BITTENCOURT & ROCHA, 2006).

Por mais de quatro décadas, o cão serviu como modelo animal para o estudo dos princípios e técnicas dos transplantes de células tronco hematopoiéticas, aplicáveis aos seres humanos (THOMAS & STORB, 1999). Experimentos utilizando regimes de condicionamento mieloablativos, de irradiação corpórea total (WEIDEN et al., 1979; DEEG et al., 1985) ou ciclofosfamida em doses letais (EPSTEIN et al., 1969), seguidos de transplante autólogo de medula óssea em cães com linfoma, foram realizados com pouco sucesso devido às muitas complicações relacionadas ao transplante, resultando na morte precoce dos animais, além de tempo insuficiente de acompanhamento dos mesmos.

FRIMBERGER et al. (2000) conduziram tratamentos quimioterápicos com doses elevadas, seguidos de transplantes autólogos de medula óssea, em cães com linfoma.

Verificaram tempo médio de remissão 10% maior do que aquele dos cães tratados com quimioterapia convencional. Nos animais tratados, a remissão foi induzida com poliquimioterapia, seguida de dose única de ciclofosfamida ( $500 \text{ mg/m}^2$ ) e infusão de medula óssea autóloga.

De acordo com MARIN et al. (1999), após o transplante de medula óssea, ocorre um período variável de imunoincompetência, e durante este período, como o número e a proporção de células T e B estão deprimidos, ocorrem infecções bacterianas, virais e fúngicas oportunistas. Desta forma, a imunofenotipagem de linfócitos pode oferecer uma oportunidade para avaliar o processo de repopulação.

Além disso, o conteúdo de linfócitos presentes no enxerto influencia o desfecho dos transplantes de células-tronco hematopoiéticas de diferentes maneiras. A “pega” tanto de transplante autólogo quanto alogênico é facilitada pela presença de determinadas subpopulações de linfócitos no enxerto. Por outro lado, a retirada de células T do enxerto está associada a uma maior probabilidade de “não pega” do enxerto (BITTENCOURT & ROCHA, 2006).

Diante disto, se propôs quantificar as subpopulações linfocitárias  $\text{CD5}^+\text{CD4}^+$ ,  $\text{CD5}^+\text{CD8}^+$  e  $\text{CD45}^+\text{CD21}^+$  no sangue periférico e na medula óssea de cães com linfoma em remissão que foram submetidos ao transplante autólogo de medula óssea, nos primeiros 120 dias decorridos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Animais**

Compuseram este estudo, como controle, dez cães da raça Beagle, machos e fêmeas, não castrados, com peso médio de  $11.45 \pm 2.54$  Kg, idade média de  $7 \pm 3.20$  anos, procedentes do canil do Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Campus de Jaboticabal, considerados hígidos com base no exame clínico, hemograma, perfil hepático, renal e exame coproparasitológico.

O grupo de animais com linfoma em remissão foi composto por sete cães que foram atendidos pelo Serviço de Oncologia Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV-UNESP.

O diagnóstico prévio de linfoma foi firmado com base nos achados clínicos, citológicos de aspirado de agulha fina e ou biópsia de nódulo um linfonodo com bases nos critérios de classificação morfológica descritos por Fournel- Fleury et al. (2002).

Todos os animais com linfoma foram submetidos ao exame clínico, classificação anatômica e estadiamento da neoplasia de acordo com os critérios propostos pela Organização Mundial de Saúde.

Os animais acometidos foram classificados com base no exame clínico, ultrassonográfico, radiográfico e análise do sangue e da medula óssea, em estádios (I a V) e subestádios (a ou b).

## **Tratamento**

### **Quimioterapia**

Os animais com linfoma foram tratados de acordo com o protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin, para indução da remissão, que incluiu sulfato de vincristina ( $0,75 \text{ mg/m}^2$ , IV), L-asparaginase (400 UI/kg, IM), ciclofosfamida ( $250 \text{ mg/m}^2$ , VO), doxorubicina ( $30 \text{ mg/m}^2$ , perfusão) e prednisona (2 – 0,5 mg/kg/dia).

### **Transplante autólogo de medula óssea**

Ao fim da fase de indução da remissão, os animais foram submetidos a uma terapêutica com sulfa-trimetoprim, na dose de 25mg/kg. Este tratamento foi instituído por 30 dias.

Após 15 dias da última sessão quimioterápica, os animais foram submetidos a uma avaliação clínica-hematológica e foram submetidos a transplante autólogo de medula óssea que consistiu das seguintes etapas:

- Coleta de medula óssea e processamento do material (D-4): O procedimento de coleta de medula óssea foi realizado, após o jejum hídrico de duas horas e alimentar de doze horas, na sala de técnica cirúrgica do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – Unesp.

A hidratação com solução de NaCl à 0,9%, à fração de 10mL/kg/h e a manutenção de um acesso venoso durante todo o procedimento de colheita, foi realizado através de um cateter devidamente colocado na veia cefálica, após tricotomia e anti-sepsia local.

Como procedimento anestésico e analgésico, foi realizada a pré-medicação com meperidina pela via intramuscular na dose de 3 mg/Kg e com levomepromazina pela via intravenosa na dose de 0,5 mg/kg. Após 15 minutos desta pré-medicação, foi utilizado para indução da anestesia, o propofol na dose de 5 mg/kg, e, para manutenção, foi utilizada a anestesia geral inalatória, com intubação orotraqueal utilizando-se de sonda de Magill, pela administração de isofluorano diluído em oxigênio, cujo fluxo total foi ajustado para 30 mL/kg/min através de circuito anestésico com reinalação parcial de gases (Aparelho de Anestesia HB Galant, São Paulo, SP, Brasil.) dotado de vaporizador universal. Para uma analgesia adequada, foi realizada a anestesia peridural no espaço lombossacral com lidocaína 2%, sem vasoconstritor, na dose de 1 mL para cada 5kg de peso do animal, associado a 2 mg/kg de tramadol. Ao final, foi realizada um aplicação de 4 mg/kg de tramadol pela via subcutânea após o retorno anestésico e, a analgesia pós-operatória, foi feita com o mesmo fármaco na dose de 2 mg/kg por via oral a cada oito horas durante dois dias.

Para o procedimento de coleta de medula óssea, foram necessárias três pessoas. Duas pessoas realizavam simultaneamente as punções na crista ilíaca do animal com o uso de agulhas de Rosenthal e seringas de 20 mL (Figura 1). Para evitar a hemodiluição, cada aspiração não excedia ao volume de 5 mL. Uma terceira pessoa recebia a material coletado e o depositava em uma proveta de vidro de 500 mL e, a cada 100 mL de medula óssea, adicionava 10 mL de meio previamente preparado. O material coletado era cuidadosamente e periodicamente homogeneizado com um bastão de vidro. Chegado o volume final de 10 mL de medula óssea por Kg de peso do animal, o material coletado foi filtrado (Figura 2). Após a retirada do anticoagulante citrato-fosfato-dextrose-adenina-1 (CPDA-1) da bolsa de sangue (Bolsa Tripla para Coleta de sangue. CPDA-1, Baxter.), o material filtrado foi introduzido na mesma com o auxílio de uma seringa de 60 mL.

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. O processamento foi realizado em três etapas, a primeira consistiu da depleção das hemácias. Com a utilização de hidroxietilstarch (HES) (Plasmin® hidroxietilamido 450/0, 7-6%, HalexIstar), na proporção de 1:5, promoveu-se a sedimentação dos eritrócitos, permitindo que se transferisse estas células para uma bolsa satélite. Ainda assim, uma camada de eritrócitos, com cerca de 2 cm permaneceu na bolsa principal. Todo este procedimento foi realizado em uma capela de fluxo laminar, localizado nas instalações

do Serviço de Oncologia Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”. Na segunda etapa, após o transporte refrigerado até o Banco de Sangue Sertãozinho, localizado na cidade de Sertãozinho – SP, que durou cerca de 30 minutos, a bolsa de medula óssea foi centrifugada por 15 minutos, a 3000 rotações por minuto (rpm) e 20°C. Após a centrifugação, o plasma foi extraído, deixando um volume que não atingisse até 2 cm da camada de células brancas. Na terceira etapa, a bolsa foi preparada para o congelamento e congelada. Para suportar a temperatura de congelamento (-80°C), o material foi transferido com uma seringa de 60 mL, para uma bolsa especial (Cryocyte® Bolsa para Congelamento dos Componentes do Sangue 500 mL, da marca BAXTER) e o volume final foi anotado. Na bolsa vazia, adicionou-se 40% do volume final em plasma autólogo, 40% de RPMI (Meio RPMI 1640 - SIGMA) e 20% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Dimesol® Marcolab). Ao adicionar este último, manteve-se a bolsa em uma cuba com gelo, para evitar os danos nas células, provocados pelo aquecimento na adição do DMSO. Homogenizou-se este preparado e transferiu-se este conteúdo para a bolsa de congelamento com uma seringa de 60 mL. Iniciou-se então o processo de congelamento manual da bolsa de medula óssea. Manteve-se a bolsa por uma hora em refrigerador (4°C), depois por mais duas horas em freezer (-4°C) e finalmente no freezer -80°C, instalado no Brazilian Collection Clone (BCC) ou no Departamento de Reprodução Animal da FCAV/UNESP-Jaboticabal – SP, onde permaneceu até seu descongelamento e infusão, quatro dias depois.



**Figura 1:** Procedimento de coleta de medula óssea na crista ilíaca de um cão, para o transplante autólogo de medula óssea.



**Figura 2:** Procedimento de filtragem de toda a medula óssea colhida.

- Condicionamento (D-2): O condicionamento dos animais com linfoma foi realizado dois dias após a colheita, ou seja, dois dias antes da infusão da medula óssea. O protocolo utilizado, uma modificação do protocolo de Frimberger et al. (2006) e daquele utilizado para administração do quimioterápico ifosfamida (LANORE & DELPRAT, 2004), foi realizado em três etapas. Na primeira, realizou-se fluidoterapia intravenosa com solução NaCl a 0,9% (Glicolabor), à fração de 30 mL/kg/h por 30 minutos, seguida da infusão de Mesna (Mitetan® 100 mg/mL Baxter Oncology) por via intravenosa, sendo que a dose utilizada foi a dose da ciclofosfamida X 0,4 e, da administração de Ondansetrona (Vonau® 0,1 – 0,22 mg/kg Biolab) por via oral, sendo a mesma dose repetida oito horas depois. A segunda etapa, foi o condicionamento propriamente dito, no qual se infundiu a ciclofosfamida (Cycram® Meizler) previamente diluída com 50 mL de água para injeção, na dose de 500 mg/m<sup>2</sup>, que foi transferida para um frasco de 125 mL de solução NaCl a 0,9% (Glicolabor) para ser infundida. Na terceira etapa, administrou-se furosemida (2 mg/kg) (Teuto) e manteve-se a fluidoterapia por cinco horas (fração de 30 mL/kg/h) e repetiu-se a aplicação da Mesna na segunda e quinta horas após o término da administração da ciclofosfamida. Todo este procedimento foi realizado no Laboratório de Oncologia do SOV da FCAV/UNESP – Jaboticabal – SP.

Infusão da medula óssea (D0): Primeiramente, a bolsa de medula óssea foi retirada do freezer (-80°C) e colocada imediatamente em banho-maria a 37°C, no laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da FCAV/UNESP. A infusão da suspensão de células da bolsa de medula óssea foi realizada após 30 minutos de fluidoterapia intravenosa à base de NaCl a 0,9% (Glicolabor), na fração de 30mL/kg/h e após a administração de Ondansetrona (Vonau®, Biolab) na dose de 0,1 – 0,22 mg/kg por via oral. Para a infusão da bolsa de medula óssea, utilizou-se um equipo para infusão de sangue (Embramed). Durante tal procedimento e após o término do transplante, os animais foram monitorados frequentemente quanto aos seus sinais vitais. A fluidoterapia foi mantida pelo tempo mínimo de 40 minutos.



**Figura 3:** Procedimento de infusão da bolsa de medula óssea (D0).

#### **Uso de fator estimulador de colônia:**

Um fator estimulador de colônia de granulócitos (Filgrastin® - Blausiegel) foi administrado aos animais (5 µg/kg/dia) por via subcutânea, durante quatro dias consecutivos após o transplante com o intuito de acelerar a reconstituição hematopoética. A data de início da administração do Filgrastin® variou para cada animal em virtude da resposta individual das contagens neutrofílicas. Dessa forma, a administração deste fármaco variou entre o dia

D+3 e D+9. Dois animais não receberam o referido fármaco, pois apresentaram leucopenia leve e assim, a aplicação do fator estimulado de colônia não se fez necessária.

### **Avaliação Hematológica e Imunofenotípica**

A avaliação hematológica e imunofenotípica do sangue foram realizadas quatro dias antes e sete, 14, 28, 60, 90 e 120 dias após a infusão da medula óssea. A avaliação imunofenotípica da medula óssea ocorreu quatro dias antes e sete, 14 e 28 dias após a infusão da medula óssea. Todos os procedimentos realizados foram os mesmos daqueles descritos no capítulo 2.

### **Análise Estatística**

A análise estatística empregada foi o teste de Kruskal-Wallis, um teste não paramétrico conhecido como teste H, devido à variação dos valores das parcelas e pelo fato do número de parcelas não ser o mesmo do único ao fim da avaliação, em decorrência do óbito de um animal. (AYRES et al., 2003).

## **RESULTADOS**

Após 20 meses de acompanhamento, três animais estão vivos e em remissão clínica e hematológica completa. Dos cinco animais que vieram a óbito, um animal recidivou entre a colheita da medula óssea e a infusão da mesma e, veio a óbito após os 120 dias de estudo. Um outro animal, recidivou entre os 60 e 90 dias, vindo a óbito logo após os 90 dias do transplante. Um terceiro animal recidivou aos 90 dias do transplante e veio a óbito após os 120 dias. Estes três animais foram submetidos novamente ao protocolo de Madison-Wisconsin, assim estes animais foram excluídos do protocolo experimental quando recidivaram, para evitar influência da quimioterapia de resgate. O quarto animal teve recidiva súbita após os 120 dias, vindo a óbito logo em seguida da recidiva.

Com relação a antibioticoterapia, um animal apresentou mielotoxicidade após cerca de 5 dias de terapêutica e, como este período coincidiu com a colheita da medula óssea, foi necessária a utilização de fator estimulador de colônia de granulócitos por dois dias.

**Hemograma**

Os valores médios obtidos para o hemograma, assim como as representações gráficas para este, estão dipostos na tabela 1 e nas figuras de 4 a 12, respectivamente.

As linhas tracejadas nos gráficos se referem aos valores máximos e mínimos do intervalo de valores considerados de referência pelo Laboratório de Patologis Clínica do Hospita Veterinário “Governador Laudo Natel”.

**Tabela 1:** Valores médios obtidos para o hemograma de cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea.

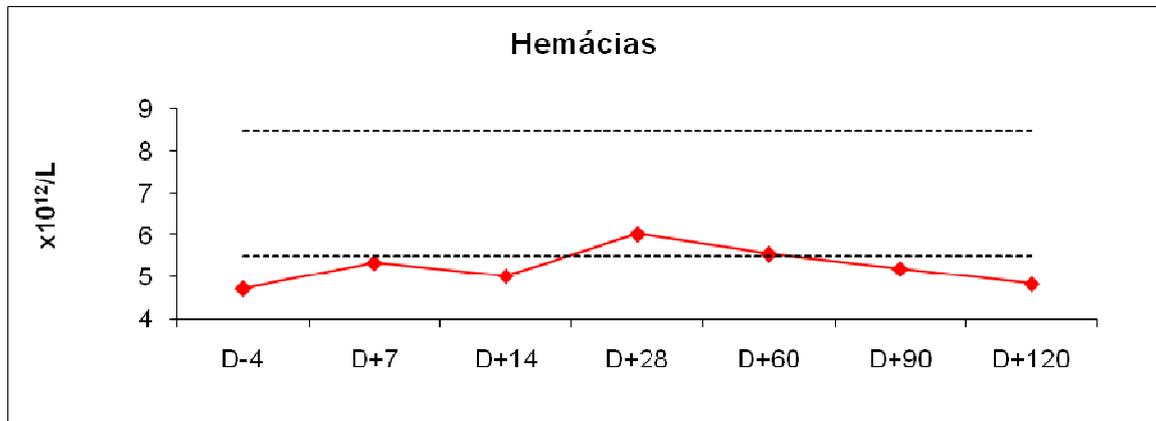
	D-4	D+7	D+14	D+28	D+60	D+90	D+120	p
<b>Hemácias</b> (x10 <sup>12</sup> /μL)	4,74	5,35	5,03	6,02	5,60	5,32	4,73	0,12
<b>Hemoglobina</b> (g/L)	110	120	120	130	130	120	110	0,63
<b>Hematócrito</b> (L/L)	3,2	3,7	3,5	4,1	3,8	3,6	3,2	0,13
<b>VCM</b> (fL)	68	69	69	69	68	68	68	0,80
<b>CHCM</b> (g/L)	340	330	340	310	330	330	340	0,61
<b>Plaquetas</b> (x10 <sup>9</sup> /L)	260	230	339	386	318	364	302	0,17
<b>Leucócitos</b> (x10 <sup>9</sup> /L)	6,71	8,00	9,64	10,74	9,76	8,74	5,00	0,36
<b>Basófilos</b> (x10 <sup>9</sup> /L)	0,00	0,03	0,01	0,00	0,02	0,00	0,00	0,99
<b>Eosinófilos</b> (x10 <sup>9</sup> /L)	0,37	0,42	0,55	0,81	0,35	0,50	0,44	0,77
<b>Bastonetes</b> (x10 <sup>9</sup> /L)	0,04	0,21	0,07	0,08	0,20	0,09	0,00	0,06
<b>Segmentados</b> (x10 <sup>9</sup> /L)	4,62	4,91	7,10	7,99	6,95	7,10	3,76	0,37
<b>Linfócitos</b> (x10 <sup>9</sup> /L)	1,38	1,98	1,42	1,51	2,02	0,85	0,69	0,70
<b>Monócitos</b> (x10 <sup>9</sup> /L)	0,34	0,45	0,49	0,35	0,22	0,20	0,10	0,20

### Eritrograma

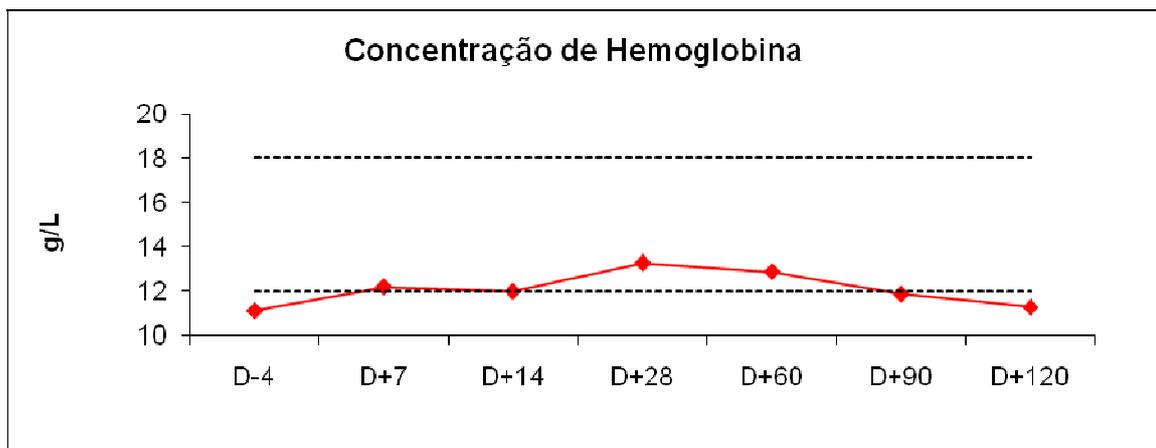
Os valores médios obtidos para a contagem global de hemácias (Figura 4), concentração de hemoglobina (Figura 5) e taxa de hematócrito (Figura 6), apresentaram-se abaixo dos valores considerados de referência em quase todos os momentos, com exceção do dia D+28 e D+60 do transplante autólogo de medula óssea. Os menores valores para este parâmetro foram observados no início e ao fim da avaliação, ou seja, no D-4 e D+120.

Assim, nota-se que os animais já se apresentavam anêmicos antes do transplante, ou seja, a anemia possivelmente não está relacionada com o transplante e sim, com a quimioterapia utilizada anteriormente, para a indução da remissão, pois Olgive & Moore, (1995) relatam que a anemia é um efeito colateral da quimioterapia e se desenvolve mais tardiamente que a neutropenia e trombocitopenia.

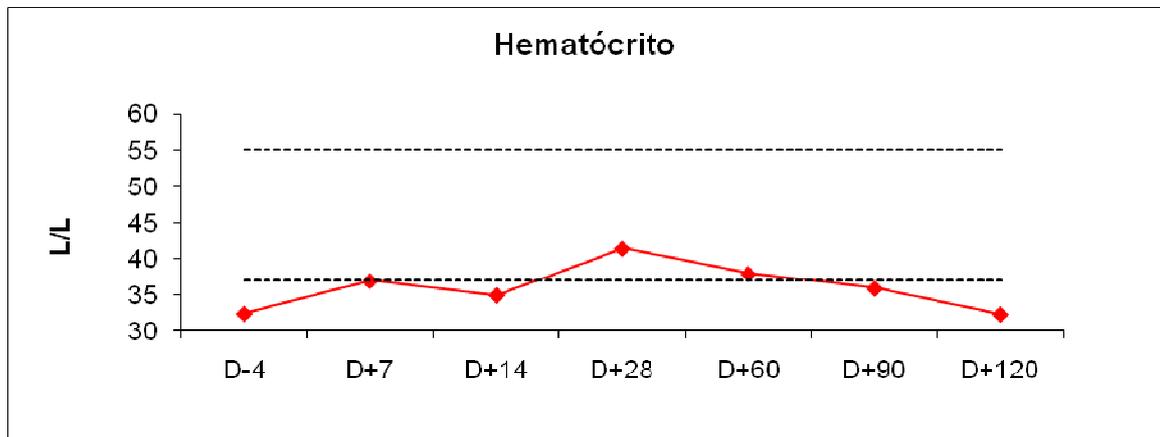
Quando analisa-se o volume das hemácias (figura 7), verifica-se que a distribuição do volume corpuscular médio ao longo dos dias foi linear, demonstrando assim, uma anemia normocítica. Em relação a concentração de hemoglobina corpuscular média (Figura 8), verifica-se que esta foi inversamente proporcional a distribuição da contagem global de hemácias, mas praticamente se manteve dentro do intervalo de referência. Desta forma, pode-se considerar a anemia como normocrômica. Fato este, que condiz com alguns autores, que ressaltam que a anemia é geralmente comum, e de caráter crônico (normocítica normocrômica e não regenerativa) ou, com menor frequência, hemolítica de origem imunomediada (OGILVIE & MOORE, 1995, TESKE, 1996; VAIL et al., 2001; DHALIWAL et al., 2003a; ETTINGER, 2003).



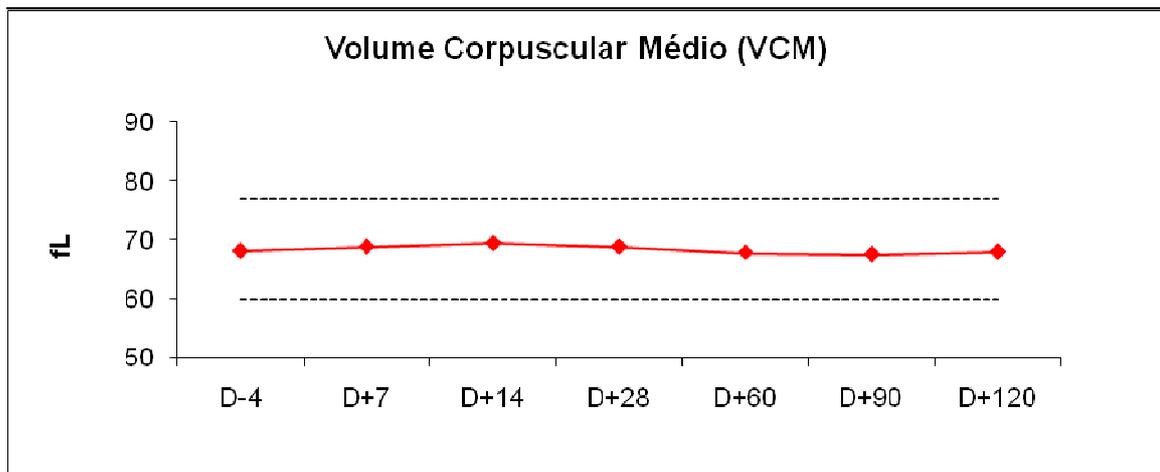
**Figura 4:** Médias da contagem global de hemácias ( $\times 10^{12}/L$ ) em cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea.



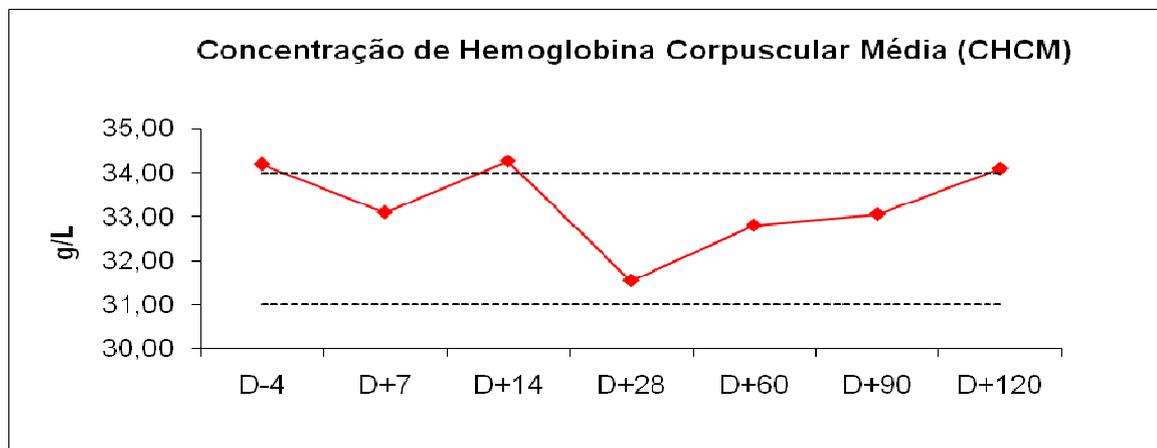
**Figura 5:** Médias da concentração de hemoglobina (g/L) em cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea



**Figura 6:** Médias do hematócrito (L/L) em cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea



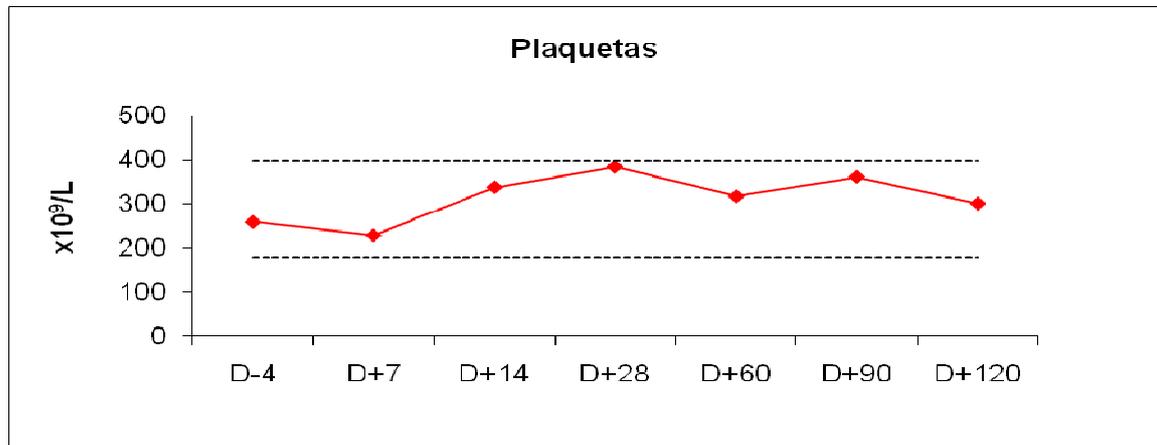
**Figura 7:** Médias do volume corpuscular médio (VCM) (fL) em cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea.



**Figura 8:** Médias da concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM) (g/L) em cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea.

### Plaquetograma

Os valores médios obtidos para a contagem global de plaquetas, embora não tenham demonstrado diferenças significantes quando analisados estatisticamente e permanecerem dentro do intervalo de referência, apresentaram uma pequena diminuição sete dias após o transplante e um aumento 14 dias após o transplante. Esta pequena diminuição pode estar relacionada com o emprego da ciclofosfamida em alta dose, concomitantemente com o uso do filgrastim e, o aumento aos 14 dias, pode significar que não há mais influência de fármacos, pelo menos no que se diz respeito ao filgrastim, já que os efeitos deste medicamento cessam após sete dias do fim de sua utilização.



**Figura 9:** Médias da contagem global de plaquetas ( $\times 10^9/L$ ) em cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea.

#### Leucograma

Ao analisar os valores médios da contagem global de leucócitos e da contagem absoluta de neutrófilos segmentados (Figura 10 e 11), nota-se que estes valores apresentaram-se de forma semelhante ao longo do período estudado. Observa-se que sete dias após o transplante, o pequeno aumento de leucócitos é em decorrência, em parte, do aumento de neutrófilos bastonetes (Figura 12), que pode ser interpretado como um efeito da aplicação do fator estimulador de colônia de granulócitos, utilizado neste período.

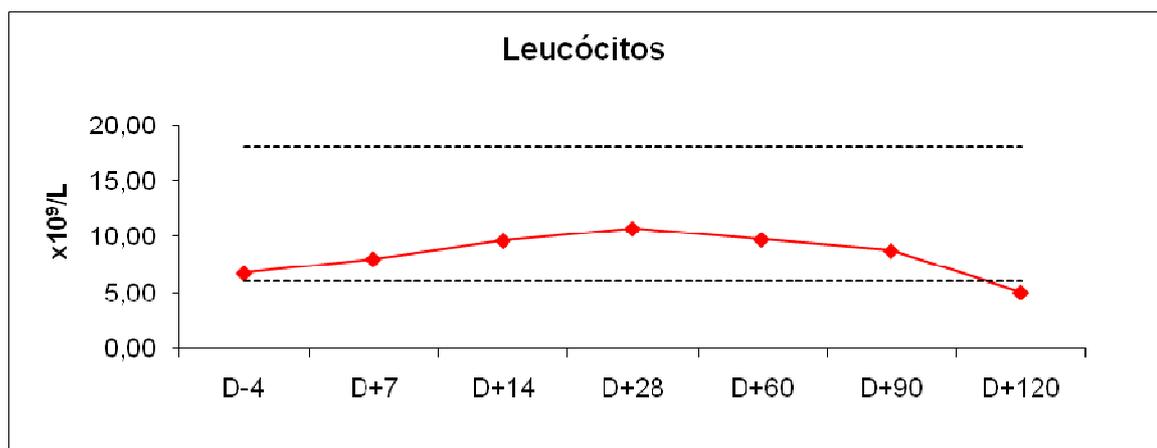
De acordo com a bula técnica deste medicamento, o filgrastim provoca aumento evidente nas contagens de neutrófilos no sangue periférico em vinte e quatro horas, com elevações mínimas dos monócitos, fato que pode ser observado em todos os animais que foram submetidos a este tratamento. Porém, a maior contagem de leucócitos, foi observada em um único animal, que apresentou uma leucocitose de  $20 \times 10^9$  células/L, decorrente do aumento de neutrófilos segmentado e bastonetes, após quatro dias de aplicação de filgrastim.

Após 14 dias do transplante, observa-se um pequeno aumento na contagem global de leucócitos e na absoluta de neutrófilos segmentados, que pode ser interpretada como um início da recuperação hematopoiética, já que, de acordo com a bula técnica do filgrastim,

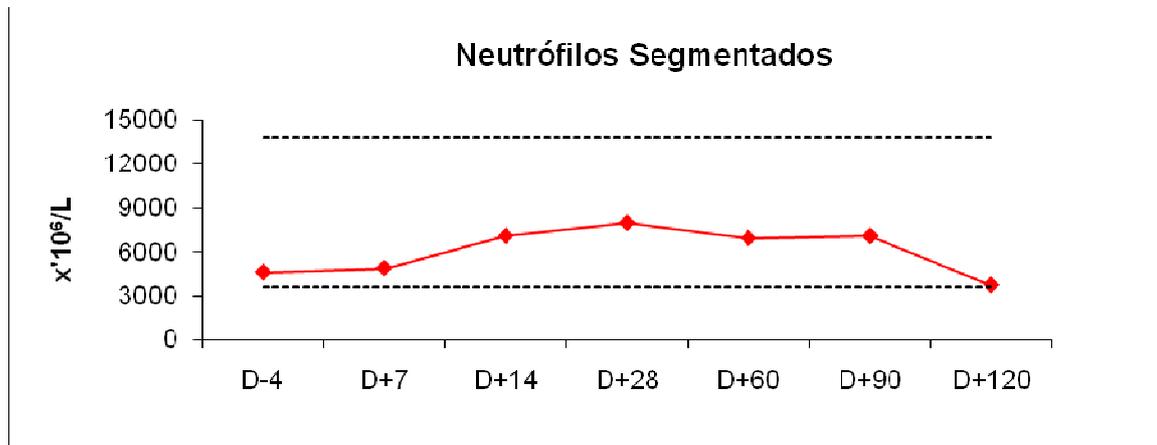
após o término da terapêutica a quantidade de neutrófilos circulantes diminui cerca de 50% em um a dois dias, e para níveis normais em um a sete dias.

Desta maneira, pode-se comprovar o fato relatado na bula técnica do filgrastim de que o uso deste fármaco, assim como em pacientes humanos submetidos à quimioterapia citotóxica ou terapia mieloablativa leva a reduções significativas na incidência, severidade e duração da neutropenia e neutropenia febril. Além disso, os pacientes humanos tratados com quimioterapia citotóxica e filgrastim requerem menor número de admissões hospitalares e dias de hospitalização, apresentando necessidade reduzida de antibióticos quando comparados aos pacientes tratados apenas com quimioterapia citotóxica.

A contagem global de leucócitos e a absoluta de neutrófilos segmentados, começou a diminuir após os 28 dias do transplante e, o menor valor para estes três parâmetros, foi observado aos 120 dias após o transplante.

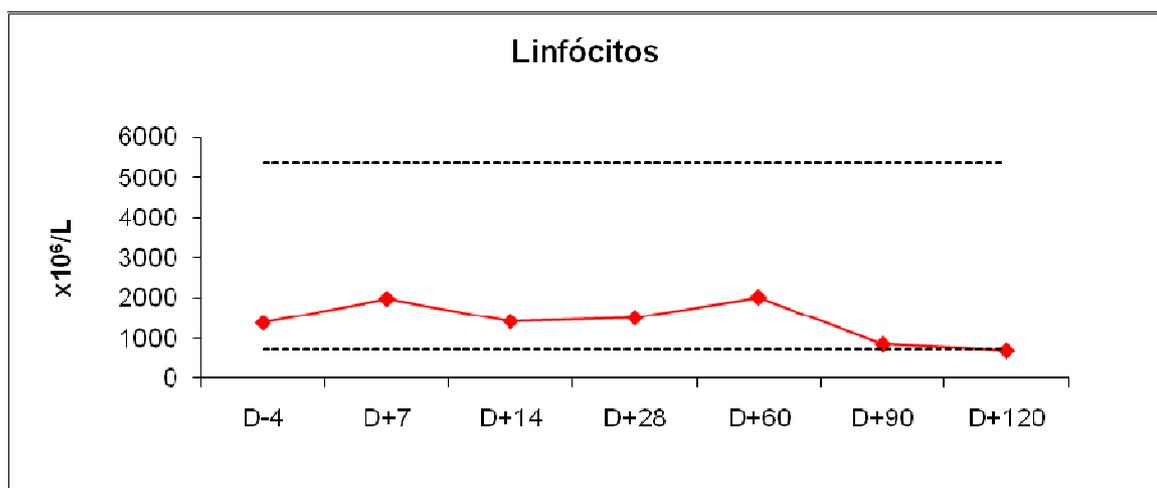


**Figura 10:** Médias da contagem global de leucócitos ( $\times 10^9/L$ ) em cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea.



**Figura 11:** Médias da contagem absoluta de neutrófilos segmentados ( $\times 10^6/L$ ) em cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea.

Embora em alguns pacientes humanos com neutropenia crônica severa, o uso do filgrastim possa induzir um leve aumento no número de eosinófilos e basófilos circulantes e, alguns destes pacientes possam também apresentar eosinofilia ou basofilia anterior ao tratamento, não se observaram alterações importantes nestes tipos celulares no período em questão.



**Figura 12:** Médias da contagem absoluta de linfócitos ( $\times 10^6/L$ ) em cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea.

A população de linfócitos não se alterou até os sessenta dias após o transplante e, aos 90 e 120 dias notou-se uma diminuição desta população, que pode ser interpretada como uma supressão prolongada nos animais em remissão.

Os valores médios da contagem absoluta de monócitos também se apresentaram de maneira uniforme e diminuídos principalmente a partir dos 60 dias após o transplante. Mas a monocitopenia não tem um significado específico (BIENZLE, 2000).

### Imunofenotipagem de linfócitos

Para ter como referência de valores, foi realizada a imunofenotipagem de linfócitos no sangue periférico e na medula óssea de cães considerados hígidos, e o resultados obtidos estão dipostos nas tabelas 2, 3 e 4 a seguir.

**Tabela 2:** Valores relativos médios, máximos e mínimos e, desvios padrão, das subpopulações linfocitárias CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e CD45<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> no sangue periférico de cães sadios (grupo controle).

	Média %	Máximo %	Mínimo %	Desvio Padrão
CD5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	36.95	49,25	26,10	7.51
CD5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	19.95	28,05	12,99	4.74
CD45 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup>	15.24	25,03	8,35	6.02

**Tabela 3:** Valores absolutos médios, máximos e mínimos e, desvios padrão, das subpopulações linfocitárias CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e CD45<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> no sangue periférico de cães sadios (grupo controle).

	Média x10 <sup>6</sup> /L	Máximo x10 <sup>6</sup> /L	Mínimo x10 <sup>6</sup> /L	Desvio Padrão
CD5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	546.18	908,11	275,45	206.78
CD5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	281.50	515,47	169,69	102.79
CD45 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup>	241.11	397,65	94,45	112.94

**Tabela 4:** Valores relativos (%) médios, máximos e mínimos e, desvios padrão, das subpopulações linfocitárias CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e CD45<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> na medula óssea de cães sadios (grupo controle).

	Média %	Máximo %	Mínimo %	Desvio. Padrão
CD5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	0.01	0.05	0.00	0.02
CD5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	0.06	0.31	0.00	0.12
CD45 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup>	0.03	0.10	0.00	0.03

Embora os valores encontrados para a medula óssea de cães sadios pareçam estar subestimados, estes são muito semelhantes daqueles encontrados em seres humanos (JEE OH et al., 1997). Além disso, foram obtidos somente dentro da “gate” de linfócitos e a dupla marcação exclui a possibilidade de se marcar outras células.

**Tabela 5:** Valores relativos médios das subpopulações linfocitárias CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e CD45<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> no sangue periférico de cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea.

%	D-4	D+7	D+14	D+28	D+60	D+90	D+120	P
CD5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	25,12	14,09	21,46	14,88	4,60	5,85	29,96	0,16
CD5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	11,88	14,47	17,26	12,09	9,79	4,52	14,32	0,61
CD45 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup>	9,53	3,51	3,93	5,55	3,92	10,19	15,05	0,97

**Tabela 6:** Valores absolutos médios das subpopulações linfocitárias CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e CD45<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> no sangue periférico de cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea.

x10 <sup>6</sup> /L	D-4	D+7	D+14	D+28	D+60	D+90	D+120	P
CD5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	296,28	339,44	342,94	100,57	81,53	79,51	501,47	0,07
CD5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	224,31	284,26	276,39	77,92	166,94	50,00	193,72	0,36
CD45 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup>	277,80	118,52	49,08	37,86	48,59	109,43	188,67	0,89

**Tabela 7:** Valores relativos médios das subpopulações linfocitárias CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e CD45<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> na medula óssea de cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14 e D+28 do transplante autólogo de medula óssea.

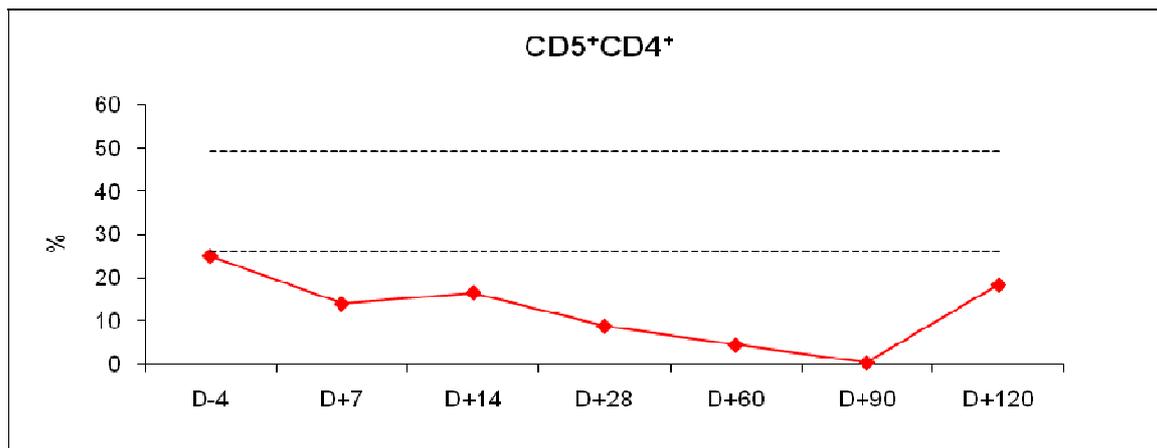
%	D-4	D+7	D+14	D+28	P
CD5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	6,39	1,35	2,20	1,73	0,12
CD5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	6,08	2,36	4,09	3,26	0,34
CD45 <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup>	0,60	0,19	0,77	3,85	0,69

A diminuição relativa da subpopulação linfocitária CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> observada sete dias após o transplante, corrobora com os achados de Marin et al. (1999) que encontrou esta depleção neste mesmo período, quando avaliou a subpopulação CD4<sup>+</sup> em pacientes humanos após transplante autólogo ou alogênico de medula óssea. Na medula óssea, esta diminuição, embora não significativa, foi muito mais evidente do que a observada no sangue periférico. Assim, pode-se interpretar estas alterações no sangue periférico, como um reflexo do que ocorreu na medula.

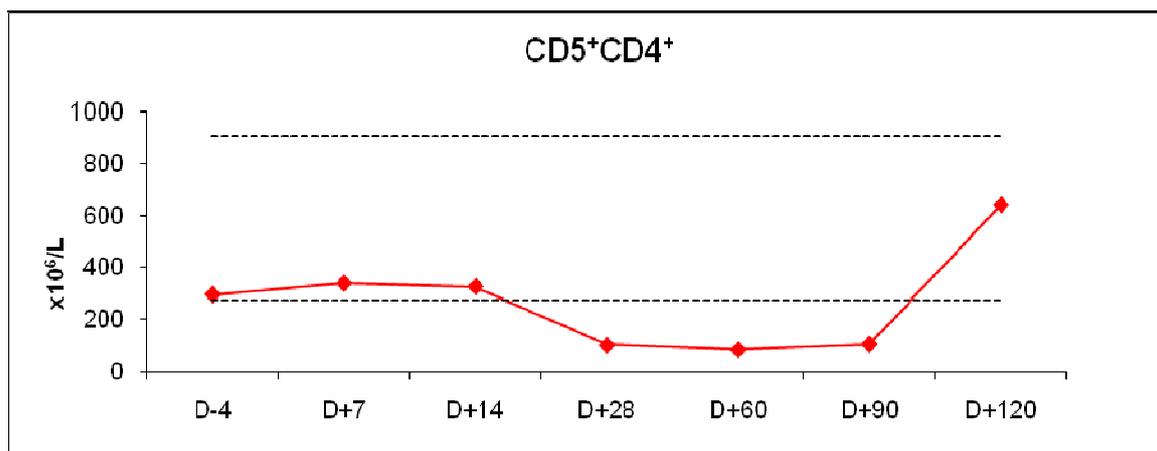
Tanto relativo quanto absoluto, os menores valores de células T auxiliares foram observados aos 60 e 90 dias após o transplante e, o maior valor aos 120 dias após o transplante.

Após quimioterapia intensiva e após o transplante de medula óssea, a regeneração das células T CD4<sup>+</sup> é relativamente rápida em crianças que apresentam aumento de isoformas de alto peso de células CD45<sup>+</sup> e apresentam aumento do timo após a conclusão da quimioterapia. Em contraste, adultos demonstram prolongada depleção de células CD4<sup>+</sup> após quimioterapia que promove supressão de células T e após o transplante de medula óssea (MACKALL, 1997). Assim, pode-se considerar que, com em crianças, a recuperação

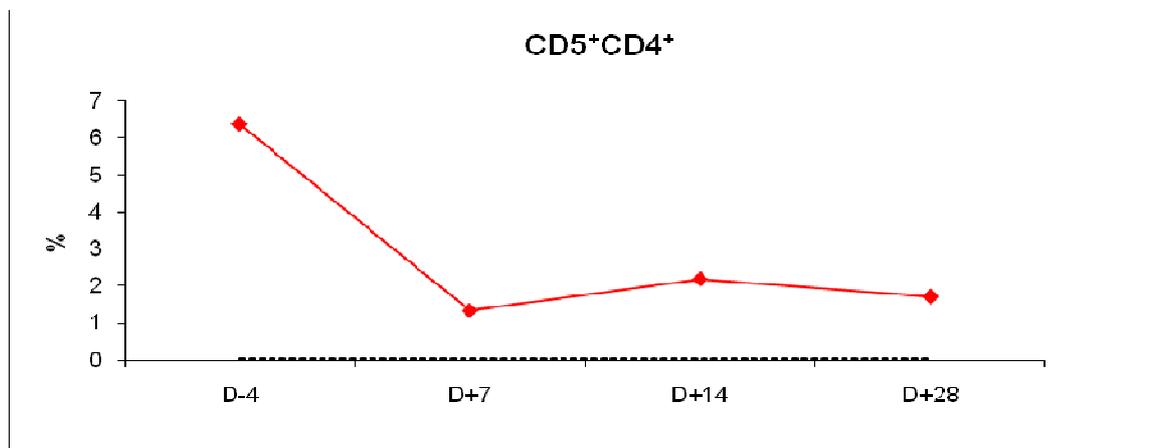
de células T CD4<sup>+</sup> é rápida, já que ocorre até 120 dias após o transplante. Porém, deve-se levar em consideração que a dose quimioterápica utilizada neste estudo é submieloablativa.



**Figura 13:** Valores médios relativos da subpopulação linfocitária CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> no sangue periférico de cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea.



**Figura 14:** Valores absolutos médios da subpopulação linfocitária CD5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> no sangue periférico de cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea.



**Figura 15:** Valores relativos médios da subpopulação linfocitária  $CD5^+CD4^+$  medula óssea de cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14 e D+28 do transplante autólogo de medula óssea.

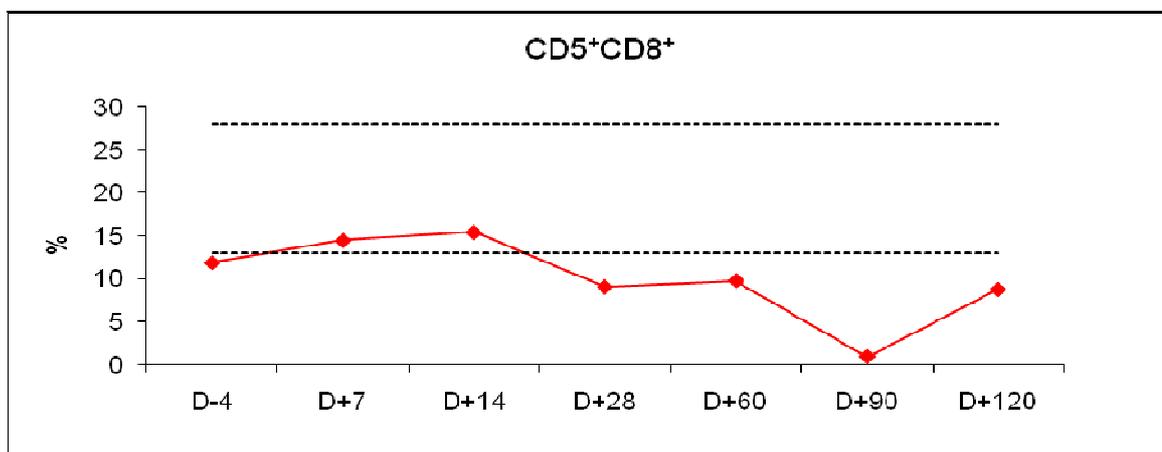
Marin et al. (1999) observaram que enquanto a subpopulação  $CD4^+$  diminuía aos sete dias após o transplante, as células  $CD8^+$  aumentavam, fato que também ocorreu no presente estudo. O mesmo não foi observado na medula óssea, que poderia ser explicado por uma mobilização destas células para o sangue periférico.

De acordo com Bittencourt & Rocha (2006), um conteúdo aumentado de células  $CD3^+CD8^+$  no enxerto de medula óssea proporciona recuperação mais rápida dos neutrófilos após o transplante. Isto pode explicar, juntamente com o uso do filgrastim, o aumento de neutrófilos bastonetes no sangue periférico aos sete dias após o transplante. Porém, o aumento de neutrófilos segmentados só ocorreu posteriormente, aos 14 dias. Além disso, quando se observa aos 120 dias a recuperação de células T citotóxicas, não se observaram aumento nas contagens de neutrófilos jovens e maduros.

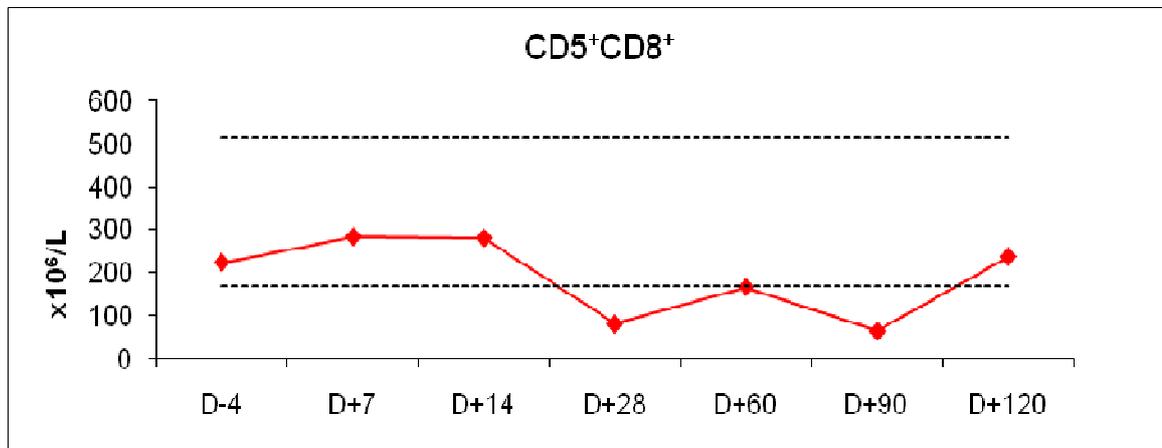
MACKALL, 1997 afirma que assim com das células T  $CD4^+$ , a recuperação das células T  $CD8^+$  também tem início aos 120 dias após o transplante de medula óssea, fato que

também foi observado neste estudo, pois é neste momento que ocorre aumento destas subpopulações linfocitárias após um período de depleção.

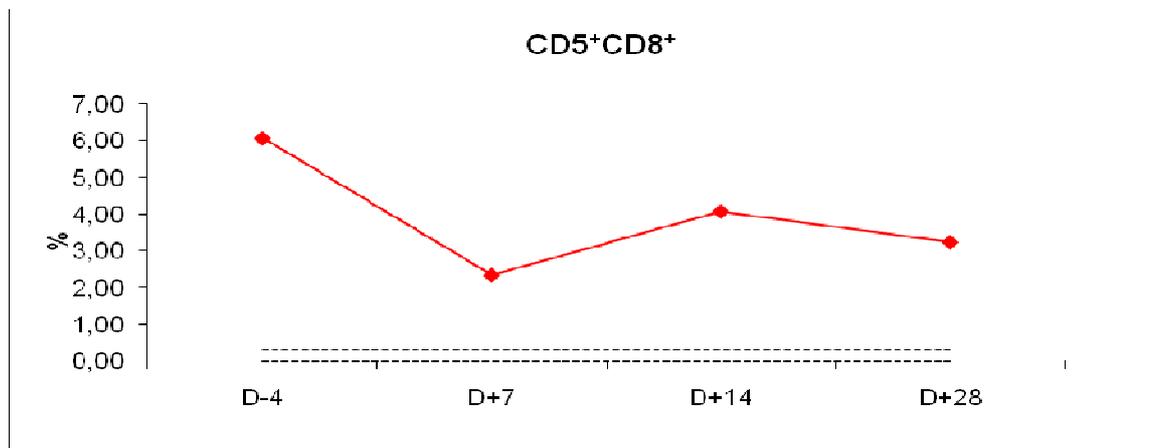
Embora a recuperação rápida de linfócitos T citotóxicos esteja relacionada com a estimulação gênica observada no transplante alogênico, esta explicação não pode ser aplicada ao transplante autólogo, já que não ocorre estimulação gênica neste último (MACKALL, 1997).



**Figura 16:** Valores médios relativos da subpopulação linfocitária CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> no sangue periférico de cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea.

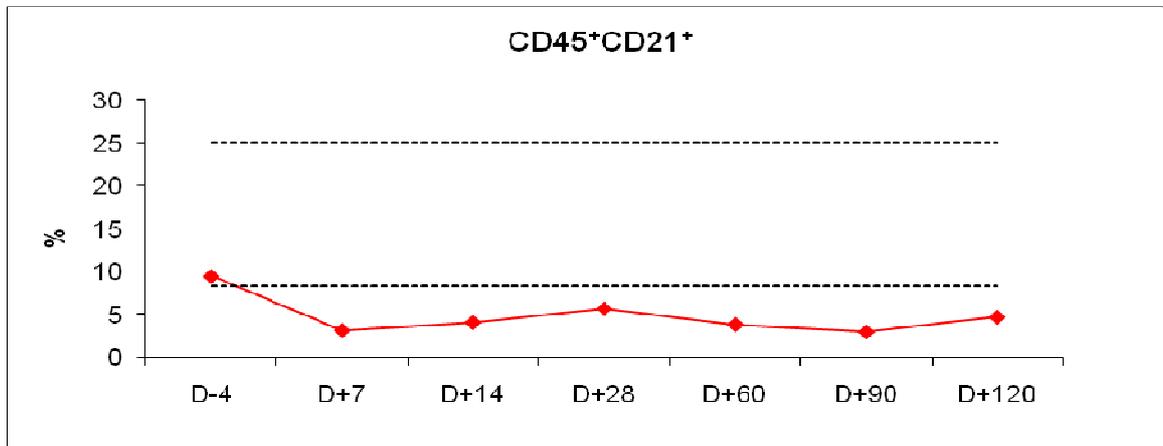


**Figura 17:** Valores médios absolutos da subpopulação linfocitária CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> no sangue periférico de cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea.

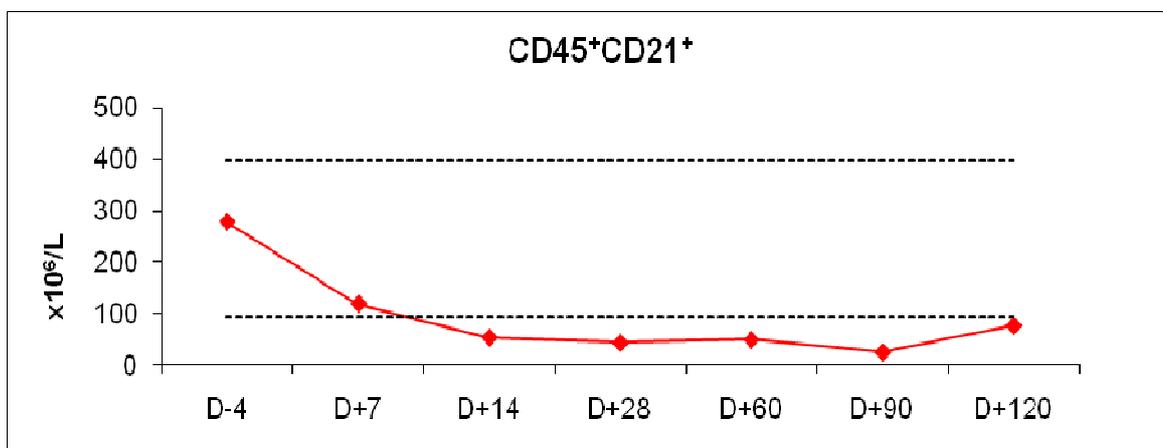


**Figura 18:** Valores relativos médios da subpopulação linfocitária CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> na medula óssea de cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14 e D+28 do transplante autólogo de medula óssea.

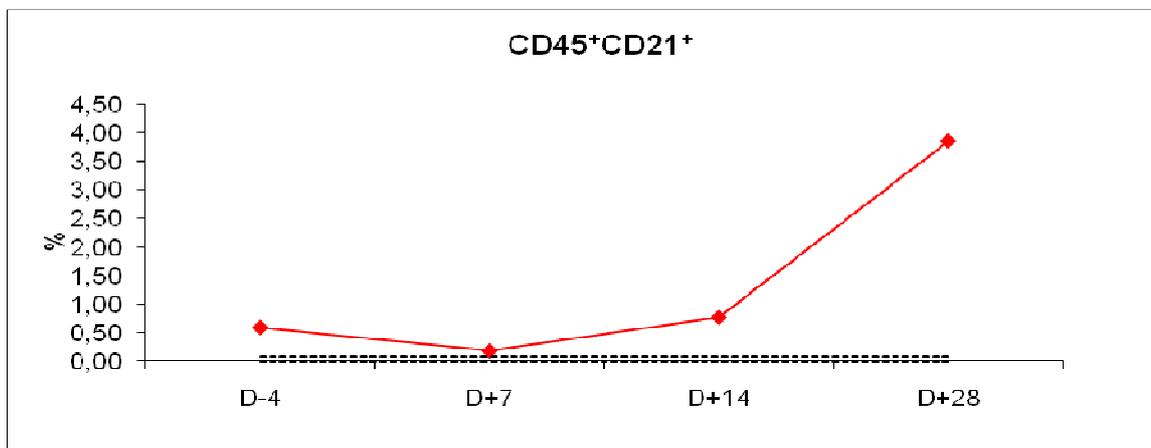
Os linfócitos B apresentaram-se reduzidos no sangue periférico por até 60 dias após o transplante e na medula óssea por 28 dias. No estudo de Marin et al. (1999) observou-se também esta diminuição, porém por 90 dias. Esta variação pode ser explicada pela recidiva de um animal que apresentava linfoma B, aos 90 dias após o transplante.



**Figura 19:** Valores médios relativos da subpopulação linfocitária CD45<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> no sangue periférico de cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea.



**Figura 20:** Valores médios absolutos da subpopulação linfocitária CD45<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> no sangue periférico de cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea.



**Figura 21:** Valores médios relativos da subpopulação linfocitária CD5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> na medula óssea de cães com linfoma em remissão nos dias D-4, D+7, D+14 e D+28 do transplante autólogo de medula óssea.

**Conclusões**

Diante dos resultados obtidos, analisados e interpretados pode-se concluir que a anemia presente nos animais transplantados não é decorrente do transplante autólogo de medula óssea e sim da imunossupressão prévia causada pelo tratamento quimioterápico para a indução da remissão. Quanto à recuperação das subpopulações linfocitárias estudadas, pode-se afirmar que esta ocorre de maneira relativamente rápida após o transplante autólogo de medula óssea em cães com linfoma em remissão, provavelmente em decorrência da dose quimioterápica submieloablativa. Além disso, a dose de 500 mg/m<sup>2</sup> de ciclofosfamida não foi suficiente para condicionar adequadamente todos os animais, pois alguns animais não apresentaram leucopenia e não se fez necessário o uso de fator estimulador de colônia e, também os cães que apresentaram um maior período de imunossupressão, não apresentaram recidiva durante 20 meses de acompanhamento. Assim, o condicionamento com a alta dose de quimioterapia pode ser a explicação para as remissões e para as recidivas.

**Referências**

- BIENZLE, D. Monocytes and Macrophages. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. cap. 49, p. 318-325.
- BITTENCOURT, H.; ROCHA, V. A célula-tronco hematopoética e seu uso clínico. In: **Células Tronco: a nova fronteira da medicina**. Ribeirão Preto: Atheneu, 2006; cap.9.
- 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.
- 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.
- DEEG, H.J. et al. Autologous marrow transplantation as consolidation therapy for canine lymphoma: Efficacy and toxicity of various regimens of total body irradiation. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 46, n. 9, p. 2016-2018, 1985.
- EPSTEIN, R.B. et al. Autologous bone marrow grafts in dogs treated with lethal doses of cyclophosphamide. **Cancer Research**, Chicago, v.29, p.1072-1075, 1969.
- ETTINGER, S.N. Principles of treatment for canine lymphoma. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.18, n.2, p. 92-102, 2003.
- FRIMBERGER, A.E. et al. Autologous bone marrow support for submyeloablative chemotherapy dose intensification in canine lymphoma. **Experimental Hematology**, Amsterdam, v.28, n.7, s.1, p.52, 2000.
- GAUTHIER, M.J. et al. The immunophenotype of peripheral blood lymphocytes in clinically healthy dogs and dog with lymphoma in remission. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, n.2, p. 193-199, 2005.
- JEE OH, M.D.; DO HEE KIM, M.T; YONG GOO KIM, M.D. et al. Immunophenotyping of normal human bone marrow by flow cytometric analysis. v.32, n.1, 1997)
- LANORE, D.; DELPRAT, C. **Quimioterapia Anticancerígena**. São Paulo: Roca, 2004. 191p.

MACKALL, C.L.; FLEISHER, T.A.; BROWN, M.R. Distinctions between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. **Blood**, v.89, n.10, p. 3700-3707, 1997.

MARIN, G.H.; MENDEZ, M.C.; MENNA, M.E. et al. Immune recovery after bone marrow and peripheral blood stem cell transplantation. **Transplantation Proceedings**, n.31, p. 2582-2584, 1999.

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.

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, 1996.

THOMAS, E.D.; STORB, R. The Development of Scientific Foundation of Hematopoietic Cell Transplantation Based on Animal and Human Studies. In: THOMAS, E.D.; BLUME, K.G.; FORMAN, S.J. **Hematopoietic Cell Transplantation**. Malden: Blackwell Science, 1999. cap. 1. p.1-11.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária: uma introdução**; trad. ABEL, L.J. São Paulo, Roca. p. 93-139, 2002.

VAIL, D.M. Lymphoma. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 20001. cap. 91, p. 620-625.

WEIDEN, P.L. et al. Prolonged disease-free survival in dogs with lymphoma after total body irradiation and autologous marrow transplantation consolidation of combination-chemotherapy-induced remissions. **Blood**, New York, v. 54, p. 1039-1049, 1979.