

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

**AVALIAÇÃO LEUCOMÉTRICA E CITOFUOROMÉTRICA DO
SANGUE PERIFÉRICO DE CÃES COM LINFOMA, APÓS USO
DE rhG-CSF, SUBMETIDOS À ALTA DOSE DE
CICLOFOSFAMIDA SEGUIDA OU NÃO DE TRANSPLANTE
AUTÓLOGO DE MEDULA ÓSSEA.**

Aline Vieira Godoy
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
JUNHO - 2010

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

**AVALIAÇÃO LEUCOMÉTRICA E CITOFUOROMÉTRICA DO
SANGUE PERIFÉRICO DE CÃES COM LINFOMA, APÓS USO
DE rhG-CSF, SUBMETIDOS À ALTA DOSE DE
CICLOFOSFAMIDA SEGUIDA OU NÃO DE TRANSPLANTE
AUTÓLOGO DE MEDULA ÓSSEA.**

Aline Vieira Godoy

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 Doutora em Cirurgia Veterinária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

JUNHO - 2010

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ALINE VIEIRA GODOY - nascida em Sorocaba, em 27 de fevereiro de 1980, de nacionalidade brasileira, graduada em Medicina Veterinária, ano de 2005, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Câmpus de Jaboticabal. Obteve o título de Mestre em Cirurgia Veterinária, em julho de 2006, na supracitada FCAV/Unesp. Ingressou no curso de doutorado, Programa de Cirurgia Veterinária, da mesma FCAV/Unesp, Campus de Jaboticabal, em setembro de 2006. Participou ativamente da rotina do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária e do Setor de Oncologia Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- UNESP, Câmpus de Jaboticabal, onde foi desenvolvida sua tese de doutorado.

“E assim, depois de muito esperar, num dia como outro qualquer, decidi triunfar...

Decidi não esperar as oportunidades e sim, eu mesmo buscá-las. Decidi ver cada problema como uma oportunidade de encontrar uma solução. Decidi ver cada deserto como uma possibilidade de um oásis e cada noite como um mistério a resolver.

Decidi ver cada dia como uma nova oportunidade de ser feliz.

Naquele dia descobri que meu único rival não era mais que minhas próprias limitações e que enfrentá-las era a única e melhor forma de superá-las.

Naquele dia, percebi que eu não era o melhor e que talvez nunca tivesse sido.

Deixei de me importar com quem ganha ou perde. Agora me importa simplesmente saber melhor o que fazer.

Apreendi que o difícil não é chegar lá em cima, e sim deixar de subir; e que o melhor triunfo é poder chamar alguém de amigo. Descobri que o amor é mais do que um simples estado de enamoramento, o amor é uma filosofia de vida.

Naquele dia deixei de ser um reflexo dos meus escassos triunfos passados e passei a ser uma tênue luz no presente. Aprendi que de nada vale ser luz e não iluminar o caminho dos demais.

Naquele dia, decidi trocar tantas coisas...

Naquele dia, aprendi que os sonhos existem para tornar-se realidade. E desde aquele dia já não durmo para descansar... agora simplesmente durmo para sonhar”

(Walter Elias Disney)

Dedico

Aos meus pais, Cida e Fernando, meus irmãos Marcelo, Kika e Marcos, por todo amor, amizade e confiança depositada, carinho, respeito e principalmente pelo exemplo de que o esforço e a dedicação sempre valem à pena.

Ao meu noivo Luciano pela presença fiel, apoio incondicional , incentivo e sobretudo paciência, pela compreensão da minha ausência em momentos importantes e por todo o amor, carinho e amizade, muito obrigada.

Agradeço

À Deus em primeiro lugar, pelo benefício da vida.

Ao meu professor, orientador e amigo, Aureo Evangelista Santana, pela oportunidade oferecida, por confiar em mim e pelo aprendizado proporcionado desde minha iniciação científica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro fornecido.

Aos professores Carlos Roberto Daleck e Mirela Tinucci Costa, pós-graduandos e funcionários que passaram pelo setor de Oncologia Veterinária, pela paciência, ajuda oferecida, pelos ensinamentos, confiança no projeto e por permitir a nossa entrada no setor.

Ao professor Gener Tadeu Pereira pela colaboração durante a realização da análise estatística e pela presença e apoio durante todos os momentos de dúvidas da mesma.

À acima de qualquer coisa, amiga Ana Paula M. Nakage, por mais uma vez estar por perto mesmo quando longe, por ser para mim um exemplo a ser seguido de profissional e pessoa principalmente, pela paciência, por toda ajuda, companheirismo e pelas alegrias e dúvidas repartidas nesses anos.

Às queridas amigas e companheiras de trabalho Maria Luisa Buffo de Capua e Sabryna Gouveia Calazans pelo apoio tanto durante a realização e elaboração do trabalho quanto pelo carinho e companheirismo que desenvolvemos durante esses anos.

A todos os meus familiares, pela ajuda incondicional na realização deste sonho.

Aos funcionários do Hospital Veterinário e do Laboratório de Patologia Clínica, pela convivência harmoniosa e pela colaboração valiosa.

Às colegas de laboratório Manuela, Leticia, Andressa, Alessandra, Flavia, Mariana, pelas valiosas sugestões e exemplos e principalmente por saberem exercer o verdadeiro sentido da expressão trabalho em grupo.

Às professoras Ana Paula Massae Nakage Canesin, Mirela Tinucci Costa, Paola Castro Moraes e Marcia Ferreira da Rosa Sobreira pelas valiosas contribuições e composição da banca de qualificação.

Aos amáveis cães e proprietários que deixaram com que eu me aproximasse, e confiaram em mim em um momento tão difícil e delicado de suas vidas.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	Ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
RESUMO.....	xv
“SUMMARY”.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Importância do estudo do linfoma canino.....	2
2.2 Modelo experimental do estudo das células-tronco em cães.....	5
2.3 Transplante de células-tronco hematopoéticas.....	6
2.4 Transplante de medula óssea (TMO).....	7
2.5 Identificação e quantificação de células-tronco hematopoiéticas.....	9
2.6 Fator Estimulador de colônia de granulócitos	10
3. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 Animais.....	15
4.2 Cronograma.....	15
4.3 Indução da remissão.....	16
4.4 Grupo 1.....	17
4.4.1 Transplante autólogo de medula-óssea.....	17
4.5 Grupo 2.....	21
4.5.1 Condicionamento.....	21
4.6 Uso do fator estimulador de colônia de granulócitos.....	21
4.7 Colheita de material para análise.....	22
4.8 Avaliação quantitativa de células.....	22
4.9 Cálculo da quantificação das células CD34 ⁺	23
4.10 Leucograma.....	23
4.11 Análise Estatística.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
6. CONCLUSÕES.....	41
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	42
8. REFERÊNCIAS.....	43

APÊNDICES 57

LISTA DE ABREVIATURAS

BAS: Basófilo

BCC: “Brazilian Collection Clone”

CAAF: Citologia Aspirativa por Agulha Fina

COP: ciclofosfamida, vincristina e prednisona

CD: “Cluster of Differentiation”

CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

CPDA-1: Citrato-fosfato-dextrose-adenina-1

CTH: Células-tronco hematopoéticas

DECH: Doença do enxerto contra o hospedeiro

DMSO: Dimetilsulfóxido

EDTA: Ácido Etilenodiaminotetracético

EOS: Eosinófilo

FAC: Fundação Amaral Carvalho

FACS: “Fluorescence Activated Cell Sorter”

FCF: Faculdade de Ciências Farmacêuticas

FCAV: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

FSC: “Forward Scatter”

FITC: “Fluorescein Isothiocyanate”

G-CSF: “Granulocyte colony-stimulating factor”

Hb: Hemoglobina

HCM: Hemoglobina Corpuscular Média

He: Hemácias

HES: “Hidroxiethylstarch”

Ht: Hematócrito

HV “GLN”: Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”

IM: Intramuscular

IV: Intravenosa

LEU: Leucócito

LINF: Linfócito

LPCV: Laboratório de Patologia Clínica Veterinária

MON: Monócito

MGG: May-Grunwald-Giemsa

M-W: Madison-Wisconsin

NB: Neutrófilo Bastonete

NS: Neutrófilo Segmentado

OMS: Organização Mundial de Saúde

PBS: "Phosphate-Buffered Saline"

PE: "Phicoeritrina"

RPMI: "Roswell Park Memorial Institute"

SC: Subcutânea

SOV: Serviço de Oncologia Veterinária

SSC: "Side Scatter"

TCT: Transplante de células-tronco

TCTH: Transplante de células-tronco hematopoéticas

TMO: Transplante de medula óssea

UNESP: Universidade Estadual Paulista

VCM: Volume Corpuscular Médio

VO: Via oral

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Valores médios obtidos para o leucograma (células/ μ L) dos cães dos Grupos 1 (quimioterapia, transplante de medula óssea e rhG-CSF), G2 (quimioterapia e rhG-CSF) e G3 (rhG-CSF) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2010.....	25
Tabela 2	Representação do resultado da avaliação estatística. Jaboticabal, 2010.....	26
Tabela 3	Valores médios da interação das variáveis grupos e momentos para os valores de leucócitos totais (células/ μ L) dos cães dos Grupos 1 (quimioterapia, transplante de medula óssea - TMO e rhG-CSF), G2 (quimioterapia e rhG-CSF) e G3 (rhG-CSF) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2010.....	28
Tabela 4	Valores médios da interação das variáveis grupos e momentos para os valores de neutrófilos segmentados (células/ μ L) dos cães dos Grupos 1 (quimioterapia, TMO e rhG-CSF), G2 (quimioterapia e rhG-CSF) e G3 (rhG-CSF) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2010.....	29
Tabela 5	Valores médios da interação das variáveis grupos e momentos para os valores de neutrófilos bastonetes (células/ μ L) dos cães dos Grupos 1 (quimioterapia, TMO e rhG-CSF), G2 (quimioterapia e rhG-CSF) e G3 (rhG-CSF) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2010.....	30
Tabela 6	Valores das médias dos grupos G1, G2 e G3 para a variável eosinófilos (células/ μ L) dos cães dos Grupos 1 (quimioterapia, TMO e rhG-CSF), G2 (quimioterapia e rhG-CSF) e G3 (rhG-CSF). Jaboticabal, 2010.....	31

Tabela 7	Valores médios da interação das variáveis grupos e momentos para os valores de monócitos (células/ μL) dos cães dos Grupos 1 (quimioterapia, TMO e rhG-CSF), G2 (quimioterapia e rhG-CSF) e G3 (rhG-CSF) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2010	33
Tabela 8	Valores das médias dos grupos G1, G2 e G3 para a variável linfócitos (células/ μL) dos cães dos Grupos 1 (quimioterapia, TMO e rhG-CSF), G2 (quimioterapia e rhG-CSF) e G3 (rhG-CSF). Jaboticabal, 2010.....	34
Tabela 9	Valores médios de células CD34 ⁺ (células/ mm^3) dos cães dos Grupos 1 (quimioterapia, transplante de medula óssea e rhG-CSF), G2 (quimioterapia e rhG-CSF) e G3 (rhG-CSF) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2010.....	37

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Procedimento de colheita de medula óssea na crista ilíaca de um cão, com vistas ao transplante autólogo de medula óssea. Jaboticabal, 2010.....	20
Figura 2	Filtragem da medula óssea coletada. Jaboticabal, 2010.....	20
Figura 3	Comportamento dos valores médios obtidos para leucócitos em cães dos Grupos 1 (quimioterapia, transplante de medula óssea - TMO e rhG-CSF), G2 (quimioterapia e rhG-CSF) e G3 (rhG-CSF) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2010.....	28
Figura 4	Comportamento dos valores médios obtidos para NS em animais dos Grupos 1 (quimioterapia, TMO e rhG-CSF), G2 (quimioterapia e rhG-CSF) e G3 (rhG-CSF) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2010.....	29
Figura 5	Comportamento dos valores médios obtidos para neutrófilos bastonetes em cães dos Grupos 1 (quimioterapia, TMO e rhG-CSF), G2 (quimioterapia e rhG-CSF) e G3 (rhG-CSF) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2010.....	30
Figura 6	Comportamento dos valores médios obtidos para eosinófilos dos cães dos Grupos 1 (quimioterapia, transplante de medula óssea - TMO e rhG-CSF), G2 (quimioterapia e rhG-CSF) e G3 (rhG-CSF) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2010.....	31
Figura 7	Comportamento dos valores médios obtidos para basófilos dos cães dos Grupos 1 (quimioterapia, TMO e rhG-CSF), G2	

	(quimioterapia e rhG-CSF) e G3 (rhG-CSF) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2010.....	32
Figura 8	Comportamento dos valores médios obtidos para monócitos em cães dos Grupos 1 (quimioterapia, TMO e rhG-CSF), G2 (quimioterapia e rhG-CSF) e G3 (rhG-CSF) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2010.....	33
Figura 9	Comportamento dos valores médios obtidos para linfócitos em cães dos Grupos 1 (quimioterapia, TMO e rhG-CSF), G2 (quimioterapia e rhG-CSF) e G3 (rhG-CSF) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2010.....	34
Figura 10	Comportamento dos valores médios obtidos para CD34 ⁺ em cães dos Grupos 1 (quimioterapia, TMO e rhG-CSF), G2 (quimioterapia e rhG-CSF) e G3 (rhG-CSF) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2010.....	38

**“AVALIAÇÃO LEUCOMÉTRICA E CITOFUOROMÉTRICA DO SANGUE
PERIFÉRICO DE CÃES COM LINFOMA, APÓS USO DE rhG-CSF, SUBMETIDOS À
ALTA DOSE DE CICLOFOSFAMIDA SEGUIDA OU NÃO DE TRANSPLANTE
AUTÓLOGO DE MEDULA-ÓSSEA”**

RESUMO

O presente estudo teve como objetivos avaliar seqüencial e temporalmente o quadro leucocitário de dez cães portadores de linfoma em remissão, submetidos à alta dose de ciclofosfamida, durante o uso do estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF, filgrastine) seguido ou não do transplante autólogo de medula óssea (TMO), bem como quantificar células CD34+ no sangue periférico dos referidos cães. Para tal avaliação foram utilizados três grupos experimentais, sendo o grupo 1 (G1) formado por cinco animais em remissão de linfoma que passaram por alta dose de ciclofosfamida e TMO seguido do uso de G-CSF; o grupo 2 (G2) formado por cinco animais em remissão de linfoma que sofreram alta dose de ciclofosfamida seguida do uso de G-CSF e o grupo 3 (G3) formado por dez animais saudáveis que receberam apenas o G-CSF. O transplante consistiu na colheita de medula óssea, preparo e congelamento da bolsa que continha células medulares em suspensão, condicionamento do paciente com 500mg/m² de ciclofosfamida, infusão das células hematopoéticas e aplicação do G-CSF. Para avaliar a recuperação hematopoética pós-transplante foi realizado leucograma e análise citométrica do sangue nos dias 7, 8, 9, 10 e 11 após condicionamento. O nadir médio dos neutrófilos segmentados (NS) no grupo com transplante de medula óssea (G1) foi 425 NS/μL, e no grupo sem TMO (G2) foi 637,4 NS/μL e ocorreu sete dias após alta-dose de quimioterápico em ambos os grupos. A duração média da neutropenia foi de três dias. Nenhum animal apresentou febre ou sepse após a alta dose de ciclofosfamida. A dose de 5μg/kg/dia durante quatro dias de filgrastine foi insuficiente na mobilização adequada de células CD34+ nos três grupos estudados, sendo necessários novos estudos para este propósito. Desta maneira, pode-se comprovar o fato de que o uso do G-CSF leva a reduções significativas na incidência, severidade e duração da neutropenia.

Palavras-chave: cão, citometria, G-CSF, imunofenotipagem, linfoma, leucócitos

“LEUKOCYTE AND FLOW CITOFUORIMETRICAL EVALUATION OF PERIPHERAL BLOOD FROM DOGS WITH LYMPHOMA, AFTER rhG-CSF USE, UNDERGONETO HIGH-DOSE CHEMOTHERAPY FOLLOWED OR NOT BY AUTOLOGOUS BONE MARROW TRANSPLANTATION”

ABSTRACT

The aims of this research were to provide an analysis of several counts of leucocytes values in dogs with lymphoma in remission phase, undergone to high-dose chemotherapy with cyclophosphamide, during treatment with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF, filgrastine), followed or not by autologous bone marrow transplantation (BMT), as well to quantify CD34+ cells of peripheral blood from that dogs. For this purpose, three experimental groups were considered. Five dogs in clinical remission undergone to high-dose chemotherapy with cyclophosphamide and BMT, followed by G-CSF use were included in group 1 (G1), while group 2 (G2) was consisted by five dogs undergone to high-dose chemotherapy with cyclophosphamide, followed by G-CSF. Group 3 (G3) was composed of ten healthy dogs undergone to G-CSF only. Transplantation consisted of bone marrow harvest, managing and freezing bags containing lifted marrow cells, cyclophosphamide conditioning ($500\text{mg}/\text{m}^2$), hematopoietic cells infusion and treatment with G-CSF. After transplantation, hematopoietic recovery was evaluated by means of leukograms and flow cytofluorimetical analysis on days 7, 8, 9, 10 and 11 after conditioning. Mean nadir neutrophil (NS) counts in group undergone transplantation (G1) was $425\text{ NS}/\mu\text{L}$ versus $637,4\text{ NS}/\mu\text{L}$ in group without BMT (G2). Nadir was observed on the seventh day after high-dose chemotherapy in both groups and neutropenia mean time was three days. Fever or sepsis was not observed in any dog after high-dose cyclophosphamide. Four days of filgrastine treatment in dose of $5\mu\text{g}/\text{Kg}$, daily, was not enough to mobilize CD34+ cells appropriately in three groups analyzed, requiring new studies for this purpose. Considering these results, it is possible to conclude that G-CSF significantly reduces the incidence, severity and duration of neutropenia.

Keywords: dog, flow cytometry, G-CSF, immunophenotyping, leukocytes, lymphoma.

1. INTRODUÇÃO

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

A citometria de fluxo é um recurso emergente na Medicina Veterinária, que permite análise rápida, objetiva e qualiquantitativa de células em suspensão, incluindo a identificação de precursores hematopoéticos, tais como as células-tronco hematopoéticas, caracterizadas pelo antígeno de superfície CD34. A identificação e quantificação de células estão baseadas em seu tamanho (“Forward scatter” – FSC), granularidade (“Side Scatter”– SSC) e intensidade de fluorescência. Além disso, a referida técnica possibilita a separação de distintas populações de células, cujos antígenos de superfície são marcados com anticorpos específicos.

O tratamento do linfoma consiste na utilização de protocolos quimioterápicos convencionais, como o de Madison-Wisconsin. Recentemente, buscando aumentar ainda mais a sobrevida de animais portadores de linfoma, tem-se utilizado altas doses de ciclofosfamida, cuja toxicidade, principalmente hematológica, é mais intensa que aquela dos tratamentos convencionais. Tentando minimizar tais efeitos excessivamente mielotóxicos, tem-se procurado utilizar o transplante autólogo de medula óssea e estimuladores de colônia de granulócitos, com o propósito de promover a recomposição da celularidade do tecido sanguíneo. Portanto, buscando contribuir para um melhor entendimento da hematotoxicidade decorrente da administração de altas doses de ciclofosfamida e, ademais, tentando verticalizar o conhecimento com relação ao papel do transplante autólogo de medula óssea e uso de estimuladores de colônia de granulócitos na recomposição do tecido hematopoético, é que se idealizou o protocolo experimental em questão, no qual foram quantificadas células CD34+ no sangue, bem como avaliadas as características de leucograma em esquema seqüencial e ao longo do tempo durante administração de G-CSF, em cães portadores de linfoma em remissão submetidos ou não ao transplante de medula óssea, atendidos junto ao Serviço de Oncologia Veterinária (SOV) do Hospital-escola da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal – SP.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DO LINFOMA CANINO

O linfoma é um grupo diverso de neoplasias que tem origem nas células linforreticulares, de modo que surgem comumente nos tecidos linfóides, como linfonodos, baço e medula óssea, mas podem surgir em quase todos os tecidos do corpo. Pode ocorrer uma expansão do componente linfomatoso com consequente envolvimento do sangue periférico (VAIL & YOUNG, 2007).

É a neoplasia hematopoética que mais comumente afeta o cão (MOULTON & HARVEY, 1990; FAN, 2003; DOBSON, 2004; VAIL & YOUNG, 2007), acometendo principalmente animais de meia-idade ou idosos, que perfazem 80% dos casos (GREENLEE et al., 1990; MOULTON & HARVEY, 1990; ETTINGER, 2003), não havendo predileção sexual (VAIL & YOUNG, 2007). Na espécie canina, a etiologia do linfoma é desconhecida (FOURNEL-FLEURY et al., 1997) e provavelmente multifatorial (VAIL & YOUNG, 2007).

Embora o diagnóstico do linfoma esteja fundamentado no exame físico e nas avaliações hematológicas, bioquímico-séricas e exames radiológicos e ultrassonográficos do paciente, o seu diagnóstico definitivo só pode ser firmado pela avaliação citológica ou histológica do órgão afetado (FAN & KITCHELL, 2002; ETTINGER, 2003; MORRISON, 2005; NELSON & COUTO, 2006; VAIL & YOUNG, 2007). Na prática médico-veterinária, a cerca de 30 a 40 anos a citologia tem sido bem aceita como técnica confiável para o diagnóstico de linfoma canino (CARTER & VALLI, 1988; FRÁGUAS, 2008). Entretanto, embora o diagnóstico citológico seja de fácil obtenção, este não permite diferenciar os vários tipos de linfomas (FAN & KITCHELL, 2002; COUTO, 2006) e nem sempre fornece uma conclusão decisiva (OGILVIE & MOORE, 1995), recomendando-se, quase sempre, análise histológica que pode ser conclusiva (OGILVIE & MOORE, 1995; VAIL & OGILVIE, 1998). Estudos recentes revelam a importância do exame citológico no diagnóstico de linfoma, principalmente

quando aliado à imunofenotipagem pela citometria de fluxo (SOZMEN et al., 2005). O imunofenótipo de neoplasia linfóide em cães pode ser obtido também por imunocoloração de cortes de tecidos ou de preparações citológicas obtidas por aspiração com agulha fina (RASKIN, 2003).

A classificação do linfoma é estabelecida de acordo com a sua localização anatômica, fenótipo histológico ou citológico e imunofenotipagem (VAIL & YOUNG, 2007). As classificações morfológicas baseiam-se naquelas propostas para os seres humanos (FOURNEL-FLEURY et al., 1997), sendo as principais particularidades dos linfomas caninos, em relação aos humanos, a raridade de linfomas foliculares e a pequena proporção de linfomas de baixo grau de malignidade, comparados com aqueles de alto grau (GREENLEE et al., 1990; FOURNEL-FLEURY et al., 1997; SUEIRO et al., 2004).

Os estádios clínicos de animais domésticos acometidos por linfoma, estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde, são I (envolvimento de 1 linfonodo), II (envolvimento de múltiplos linfonodos regionais), III (presença de linfadenopatia generalizada), IV (fígado e/ou baço com ou sem o estágio III) e V (envolvimento da medula óssea ou sangue periférico e/ou algum órgão não linfóide com ou sem os estádios I a IV). Os sub-estádios são “a” (sem sinais clínicos da doença) e “b” (com sinais clínicos de linfoma) (OWEN, 1980).

Com relação à localização anatômica, o linfoma multicêntrico (estádio III ou IV) representa a maioria dos casos (80 a 85%) nos cães. As formas alimentar (7%), cutânea (6%), mediastinal (3%) e extranodais diversas (neurológica, óssea, cardíaca, nasal e ocular) são encontradas com menor frequência. De acordo com o esquema de classificação histológica utilizada (Kiel ou *National Cancer Institute*), a maioria (80%) dos linfomas caninos é similar aos linfomas não-Hodgkin humanos de médio e alto grau. Aproximadamente 70 a 80% dos linfomas caninos têm derivação imunofenotípica de célula B e o restante é derivado de células T (FOURNEL-FLEURY et al., 1997; SUEIRO et al., 2004, VAIL & YOUNG, 2007).

O prognóstico de cães com linfoma está relacionado à imunofenotipagem e sub-estádio estabelecido pela Organização Mundial de Saúde. Os tumores imunorreativos

CD3 (derivados de células T) têm remissão mais curta e os animais com sinais clínicos de linfoma (sub-estádio “b”) têm prognóstico reservado (VAIL & YOUNG, 2007).

Outro fator que interfere no prognóstico do linfoma é a presença de síndromes paraneoplásicas e o grau de instalação dessas no paciente em questão. As síndromes paraneoplásicas são sinais e sintomas presentes em pacientes com câncer, distantes do tumor ou de suas metástases, e que não são causadas por invasão, obstrução ou efeito da neoplasia. Representam um conjunto de manifestações extremamente complexas, podendo envolver vários sistemas do organismo animal; dentre eles cita-se o hematológico, o dermatológico, o neurológico, o endócrino e o osteomuscular (MANGIERI, 2008). As síndromes de maior frequência no linfoma são: anorexia-caquexia, anemia, hipercalcemia e hipergamaglobulinemia (RAMOS et al., 2008).

A quimioterapia sistêmica é a melhor opção para o tratamento do linfoma canino. As etapas da quimioterapia incluem a indução da remissão, manutenção da remissão e re-indução da remissão ou terapia de resgate (MACEWEN & YOUNG, 1996; ETTINGER, 2003; VAIL & YOUNG, 2007).

O protocolo quimioterápico padrão para o tratamento de linfoma canino é a associação de ciclofosfamida, vincristina e prednisona - COP (KITCHELL & DHALIWAL, 2000; RODASKI & DE NARDI, 2008). Aproximadamente 90% dos casos de linfoma multicêntrico respondem favoravelmente a este protocolo e, embora exista uma variação individual considerável o tempo médio de sobrevivência é de sete meses e o de remissão é de três a seis meses (VAIL & YOUNG, 2007).

Avanços recentes no tratamento desta neoplasia nos cães, com novas combinações de fármacos, propiciaram o aumento das taxas de remissão e sobrevida para os animais acometidos (FRIMBERGER, 2006). Nesse sentido, o protocolo de Madison-Wisconsin, uma combinação dos fármacos L-asparaginase, vincristina, prednisona, ciclofosfamida e doxorubicina tornou-se popular no tratamento do linfoma canino. Há relatos de que o referido protocolo é capaz de promover tempos de remissão e sobrevida mais longos (MORRISON, 2005) para os animais. Entretanto, ainda não há consenso entre os médicos veterinários oncologistas sobre o protocolo de quimioterapia ideal para a referida doença (HOSKINS, 2001).

A toxicidade hematológica é um fator limitante da quimioterapia sendo a mais frequente, e mais grave, por dois motivos. Primeiramente, pode comprometer a quimioterapia de maneira transitória ou definitiva, uma vez que pode levar a diminuição da dose do quimioterápico pelo clínico e esta pode prejudicar a eficácia do tratamento. O segundo motivo relaciona-se ao risco potencial de morte do animal em decorrência de neutropenia séptica que ocorre devido a bactérias de origem digestiva ou de foco infeccioso existente antes do início da quimioterapia (LANORE & DELPRAT, 2004). A neutropenia é a mais frequente e mais grave das citopenias decorrentes da quimioterapia. A ciclofosfamida é um antineoplásico de elevada mielotoxicidade, e o nadir de neutrófilos, momento no qual o número de granulócitos é o mais baixo, após uma sessão de quimioterapia, é constatado sete dias após sua administração. A neutropenia geralmente persiste por três a cinco dias e, em pouco menos de duas semanas, a medula óssea passa por uma fase de recuperação (LANORE & DELPRAT, 2004).

2.2 MODELOS EXPERIMENTAIS DE ESTUDO DAS CÉLULAS-TRONCO EM CÃES

Historicamente, o cão tem sido um modelo valioso de transplante de medula óssea (TMO), sendo as descobertas no modelo canino diretamente transpostas para protocolos de TMO humano (LADIGES et al., 1990).

Modelos experimentais em cães têm propiciado a obtenção de informações importantes no transplante de progenitores hematopoéticos autólogos e alogênicos, permitindo a transposição destes achados experimentais para outros mamíferos, inclusive humanos (WAGNER & STORB, 1996; STORB, 2003). Os ensaios com cães permitem melhor avaliação clínica, assim como, maior facilidade na colheita e transfusão do sangue (THOMAS, 1999).

A clonagem do cDNA para CD34 canino e a obtenção do CD34 canino homólogo (McSWEENEY et al., 1996) permitiram a produção de anticorpos monoclonais específicos para CD34 canino (McSWEENEY et al., 1998), que propiciaram a identificação e quantificação das células-tronco hematopoéticas (CTH) de cães e estudos pré-clínicos sobre transplantes de CTH, terapia genética e expansão de

progenitores celulares *ex vivo* (McSWEENEY et al., 1998; BRUNO et al., 1999; NIEMEYER et al., 2001; HARTNETT et al., 2002).

2.3 TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS

As CTH são células pluripotentes que dão origem a todas as células heterogêneas funcionais do sangue, inclusive àquelas do sistema imune (GASPER, 2000). Elas dão origem a progenitores oligopotenciais que produzem progenitores de duas ou mais linhagens celulares, que, por sua vez, se diferenciam em células unipotenciais, comprometidas com a produção de uma única linhagem celular (RICHMAN et al., 1978; SANTANA, 1988). As CTH possuem a capacidade de reconstituir o sistema hematopoético de um receptor letalmente irradiado (LU et al., 1996).

O transplante de células-tronco hematopoéticas é capaz de promover a reconstituição hematopoiética, devido à habilidade de auto-renovação e diferenciação das CTH, de modo que o referido transplante apresenta-se como um importante adjuvante, especialmente após quimioterapia mieloablativa em doenças malignas (LU et al., 1996).

O transplante de células-tronco (TCT) consiste na injeção intravenosa de progenitores hematopoiéticos que se desenvolvem em microambientes especializados, nos quais se diferenciam, proliferam e amadurecem. Entretanto, tais células transplantadas carregam antígenos que, uma vez não reconhecidos pelo receptor, poderão causar a chamada doença do enxerto contra hospedeiro - DECH (GASPER & THRALL, 2000).

Os transplantes autógenos e alogênicos de CTH são mais aplicáveis à medicina veterinária. O transplante autógeno está fundamentado na remoção temporária de CTH do próprio receptor, seguida pela mielossupressão, induzida quimicamente ou radiologicamente, e reinfusão das CTH, sendo que a técnica é simples e a ocorrência da DECH é rara. O transplante alogênico consiste na infusão de CTH de um indivíduo da mesma espécie com genoma diferente, sendo que o doador deve ser imunologicamente compatível com o receptor para evitar a DECH (GASPER & THRALL, 2000).

O TCTH é indicado no tratamento de muitas doenças. Em algumas delas, o transplante corrige defeitos de produção de células sanguíneas ou função imunológica, congênitos ou adquiridos. Em outras, ele restaura a hematopoiese após terapia citotóxica em doses elevadas (mieloablativa) (HOROWITZ, 1999). A terapia mieloablativa seguida de transplante de CTH em doenças malignas é capaz de evitar a resistência a protocolos quimioterápicos convencionais, pois utiliza doses elevadas de quimioterápicos ou radiação além dos limites da toxicidade medular, porém dentro dos limites de morbidade e mortalidade aceitáveis (HORNING & NADEMANEE, 1999).

Em pacientes humanos acometidos por linfoma, a indicação de terapia mieloablativa seguida de transplante autólogo de CTH, provenientes tanto da medula óssea quanto do sangue periférico mobilizado, tem como base a classificação histológica da doença e a resposta a tratamentos anteriores. Essa técnica não é indicada nos casos em que a doença é refratária ao tratamento convencional, quando o paciente se encontra no estágio final da doença após três ou mais regimes de quimioterapia e quando há envolvimento de sistema nervoso central (ATKINSON, 1998).

2.4 TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA (TMO)

Como referido, precedentemente, as CTH são células pluripotentes que dão origem a todas as células heterogêneas funcionais do sangue, inclusive àquelas do sistema imune (GASPER, 2000). Elas dão origem a progenitores oligopotenciais que produzem progenitores de duas ou mais linhagens celulares, que, por sua vez, se diferenciam em células unipotenciais, comprometidas com a produção de uma única linhagem celular (RICHMAN et al., 1978; SANTANA, 1988). As CTH possuem a capacidade de reconstituir o sistema hematopoético de um receptor letalmente irradiado (LU et al., 1996; ATKINSON, 1998).

Em 1949, estudos com foco nas células da medula óssea e do baço de camundongos letalmente irradiados deram início a uma série de experimentos que levaram, mais tarde, à aplicação clínica dos transplantes de células-tronco hematopoéticas (TCTH) (BENJAMIN, 1995; THOMAS, 1999). Na década seguinte, tentativas de tratamento de leucemias em seres humanos com irradiação corpórea total

ou quimioterapia seguida de infusão de medula óssea alogênica foram realizadas com pouco sucesso (THOMAS, 1999). Na década de 60, avanços científicos relacionados ao estudo dos complexos de histocompatibilidade humanos favoreceram os resultados dos transplantes alogênicos de medula óssea (THOMAS & STORB, 1999). Concomitantemente, demonstrou-se a presença de CTH no sangue periférico de camundongos, cães e primatas. Aliado a esse fato, a descoberta dos regimes de mobilização de CTH com o uso de quimioterápicos ou fatores de crescimento celulares iniciaram os estudos que levaram à consolidação dos transplantes de células-tronco do sangue periférico (THOMAS, 1999). Em 1989, demonstrou-se a presença de CTH no sangue do cordão umbilical humano (BROXMEYER et al., 1989) e no mesmo ano realizou-se o primeiro transplante de células-tronco do sangue do cordão umbilical com sucesso (GLUCKMAN et al., 1989). Dessa forma, células-tronco hematopoiéticas transplantáveis podem advir da medula óssea, sangue periférico ou sangue do cordão umbilical.

A irradiação corpórea total, antes, e a imunossupressão com ciclosporina, após o transplante alogênico de medula óssea, em cães com antígeno leucocitário idêntico, e da mesma ninhada, estabeleceram o quimerismo hematopoiético e inibiram as reações de DECH, devido à depleção de linfócitos T da medula óssea (STORB et al., 1994).

O TMO autólogo enriquecido com células CD34⁺ caninas, em cães submetidos à terapia mielossupressiva com irradiação, propiciou a reconstituição hematopoiética e permitiu antecipar uma função importante nos estudos pré-clínicos caninos envolvendo a manipulação *in vitro* de células progenitoras hematopoiéticas (BRUNO et al., 1999).

O transplante de CTH de medula óssea revela todo seu potencial terapêutico nos casos de cães com doenças genéticas (NAKAGE & SANTANA, 2006), doenças do miocárdio (KOVACIC et al., 2004), lesões vasculares (MATSUMURA et al., 2003) e lesões ósseas (DE KOK et al., 2003).

HARTNETT et al. (2002) realizaram transplantes alogênicos de células CD34⁺ de medula óssea em cães com imunodeficiência e verificaram que, a quantidade de células CD34⁺ infundida influenciava a qualidade da reconstituição de linfócitos T, sendo a dose ideal para adequada reconstituição medular superior a 1×10^6 células CD34⁺/kg.

De acordo com GENGOZIAN (2000), a quantidade de CD34⁺ recomendada para transplantes em cães varia de 1,2 a 3,4 x 10⁶/kg de peso vivo.

FRIMBERGER et al. (2006) realizaram quimioterapia com doses elevadas de ciclofosfamida seguida de transplante autólogo de medula óssea em cães com linfoma. Foi alcançado tempo médio de remissão 10% maior que aquele de cães tratados com quimioterapia convencional. Nos animais tratados, a remissão foi induzida com quimioterapia convencional, seguida de dose única de ciclofosfamida (500 mg/m²) e infusão de medula óssea autóloga. Estes animais foram monitorados quanto às suas características leucométricas aos 7, 9, 11 e 14 dias, bem como na terceira e quarta semanas e, dois, quatro e seis meses após o supramencionado tratamento, com o objetivo primordial de monitorar a recuperação hematopoética, após alta dose de ciclofosfamida.

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/m², sendo que também foram utilizadas as dosagens de 300 e 400 mg/m² (FRIMBERGER et al., 2006).

No Brasil o primeiro relato de TMO autólogo em cães foi realizado por Cápua et al. (2009a) na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) Câmpus de Jaboticabal (SP), o TMO do cão com linfoma ocorreu após alta dose de ciclofosfamida (500mg/m²).

2.5 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS

As técnicas de imunocitoquímica e imunofenotipagem têm promovido avanço na definição e classificação de células sanguíneas. Os anticorpos monoclonais conjugados com compostos fluorescentes, tais como o isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE), podem ser incubados com as células a serem analisadas, permitindo a identificação e quantificação citofluorométrica de tais células (GRINDEM, 1996).

A citometria de fluxo é um recurso emergente na Medicina Veterinária que permite uma análise rápida, objetiva e quantitativa de células em suspensão (FALDYNA

et al., 2001). O citômetro de fluxo é um separador de células ativado por imunofluorescência (FACS – “Fluorescence Activated Cell Sorter”) que promove a identificação e a quantificação de células com base no tamanho (“Forward scatter” – FSC), na granularidade (“Side Scatter” – SSC) e na intensidade de fluorescência destas células (ROITT et al., 2003).

As CTH podem ser identificadas com o auxílio de um marcador celular caracterizado como uma glicoproteína CD34 (HUSS et al., 2000). A quantificação de células CD34⁺ a serem transplantadas foi proposta inicialmente por SIENA et al. (1989), como um indicador da capacidade reconstitutiva das células sanguíneas. O protocolo para quantificação de CD34⁺, proposto pelo Comitê de Enumeração de Células-tronco em 1995 foi o ISHAGE (“International Society of Hematotherapy and Graft Engineering”), por ser um método simples, rápido, sensível e adequado à aplicação clínica (SUTHERLAND et al., 1996).

O grupo de pesquisa do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da FCAV - UNESP, Câmpus de Jaboticabal (SP), tem realizado projetos científicos relacionados à citometria de fluxo desde 2000, os quais permitiram a quantificação de células-tronco no cordão umbilical de cães (NAKAGE et al., 2005), de subpopulações linfocitárias no cordão umbilical de equinos (GODOY et al., 2007) e de cães (CÁPUA et al., 2009 b; NAKAGE et al., 2009).

2.6 ESTIMULANTE DE COLÔNIA DE GRANULÓCITOS

O fator estimulador de colônias granulocitárias (G-CSF) é uma glicoproteína descrita há mais de 20 anos, e é largamente utilizada para tratamentos neutropênicos e transplante de medula óssea em humanos. O G-CSF estimula células-tronco hematopoéticas e regula crucialmente a sobrevivência de neutrófilos maduros, pós-mitóticos, através da inibição da apoptose destes. O receptor do G-CSF é típico das citocinas (CD114) com um domínio de transmembrana e de transdução de sinal intracelular. Incluem-se como fontes do G-CSF os monócitos, as células mesoteliais, os fibroblastos e as células endoteliais (MASET et al., 2009).

O uso dos fatores de crescimento hematopoético tem aumentado muito nos últimos anos tanto na medicina humana quanto na veterinária, devido ao aumento de

sua disponibilidade no mercado. Apesar disso, existem poucos estudos nacionais sobre o uso desses fármacos em cães e gatos (LUCIDI & TAKAHIRA, 2007). Tais citocinas sintéticas regulam a produção, o desenvolvimento e a função das linhagens hematopoéticas e são indicadas para reduzir a morbidade relacionada aos efeitos mielossupressivos induzidos por algumas agressões tóxicas, incluindo quimioterápicos, radiação e infecções virais (FELDMAN et al., 2000).

O fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) recombinante é um dos fatores de crescimento hematopoético com maior potencial para uso clínico, pois é linhagem-específico e desempenha importante papel na granulopoese, por intermédio de sua atuação na medula óssea aumentando a liberação de neutrófilos maduros do compartimento de reserva para a circulação, a proliferação e maturação de precursores granulocíticos e a funcionalidade das células neutrofilicas, de tal forma a incrementar sua capacidade de fagocitose, quimiotaxia e degranulação (HENRY et al., 1998; REWERTS & HENRY, 1998; FELDMAN et al., 2000). Além disso, também minimiza o fenômeno da apoptose de neutrófilos *in vitro*, de cães saudáveis, levando ao aumento da vida média das referidas células (OGUMA et al., 2005).

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

O G-CSF recombinante canino (rcG-CSF) tem sido usado com sucesso para aumentar o número de neutrófilos em cães e gatos, levando a um quadro de neutrofilia poucas horas após sua administração (OBRADOVICH et al., 1991; MISHU et al., 1992; OBRADOVICH et al., 1993). Entretanto, ainda hoje, seu uso é restrito às universidades e centros de pesquisa, fazendo com que o G-CSF recombinante humano (rhG-CSF), de nome genérico filgrastim, seja o mais comumente utilizado na prática médica de pequenos animais (FELDMAN et al., 2000), 5µg/kg/dia, SC (HENRY et al., 1998).

O rhG-CSF age aumentando o número de neutrófilos circulantes e possui grande potencial para amenizar ou reverter quadros de neutropenia associados às condições de mielotoxicidade e mielosupressão em cães e gatos. Na medicina veterinária, tal fármaco é indicado no tratamento de neutropenias após quimioterapia (COUTO, 1990;

BRAVO et al., 1996; HENRY et al., 1998; COUTO, 2003), radiação (NOTHDURFT et al., 1997; MAC VITTIE et al., 2005), reconstituição da celularidade medular após transplante de medula óssea (STORB et al., 1994), na mobilização de células tronco hematopoiéticas para o sangue periférico (THOMASSON et al., 2003), nas neutropenias decorrentes da utilização de alguns fármacos (HOLLAND et al., 1996) e na neutropenia cíclica do Collie cinza (HAMMOND et al., 1990). Atualmente, a principal aplicação do rhG-CSF na prática médica veterinária tem como objetivo a redução da duração e intensidade das neutropenias consequentes à quimioterapia em altas doses (COUTO, 2003). Ressalta-se, entretanto, que o rhG-CSF é indicado apenas nos casos de neutropenias persistentes, nas quais há um defeito na produção ou maturação dos neutrófilos, tal qual na hipoplasia, hematopoese cíclica e alguns casos de produção ineficiente, sendo contra-indicado nas neutropenias agudas e transitórias (LUCIDI & TAKAHIRA, 2007).

Levando-se em conta o tempo de vida média das células sanguíneas, verifica-se que a linhagem granulocítica é a primeira a ser afetada em casos de deficiência na hematopoese, pois os neutrófilos permanecem apenas de quatro a oito horas na circulação, ao passo que as plaquetas têm uma vida média de quatro a seis dias, e as hemácias de 120 dias no cão (CHUN et al., 2001; COUTO, 2003).

Na prática, o que se observa em cães é o aumento da liberação de neutrófilos para o sangue, uma a duas horas após a administração do rhG-CSF, e a aceleração da produção em um a três dias (HAMMOND et al., 1991), com o retorno à contagem inicial, três a cinco dias após a suspensão do referido fator de crescimento (OBRADOVICH et al., 1991). A resposta ao tratamento depende da sua duração e do número de células-tronco viáveis na medula óssea (FELDMAN et al., 2000).

Os fatores de crescimento hematopoético espécie-específicos raramente induzem o desenvolvimento de anticorpos. Porém o uso de rhG-CSF, por semanas consecutivas em cães, pode levar a uma resposta imune, neutralizando sua ação e fazendo com que os neutrófilos voltem aos valores iniciais (HAMMOND et al., 1991; PHILLIPS et al., 2005). Além disso, tratamentos mais prolongados podem induzir à formação de anticorpos anti- G-CSF autólogo, por meio de reação cruzada. Por outro lado, o uso dos fatores recombinantes humanos por curtos períodos, em cães e gatos,

não resulta na formação de anticorpos (HENRY et al., 1998; PHILLIPS et al., 2005), fato este que credencia a utilização do rhG-CSF como uma opção segura no tratamento ou prevenção da neutropenia (HENRY et al., 1998)

Mais recentemente alguns estudos vêm comprovando novas aplicações para o G-CSF. Foi demonstrada uma surpreendente atividade deste no SNC, fato que adiciona um potencial regenerativo em várias doenças neurológicas. A administração do G-CSF mobiliza células-tronco da medula óssea para o sangue periférico, as quais, por sua vez, ultrapassam a barreira hematoencefálica e se dirigem à área acometida do cérebro. Este estudo tornou compreensível e atraente a estratégia de administrar agentes mobilizadores de células precursoras que amplificarão as células precursoras endógenas, fornecendo uma via alternativa de reinervação do cérebro danificado e potencializando a resposta compensatória. Além da reinervação foi observado neste estudo regeneração e reparação da vascularização e estímulo da angiogênese. A mobilização de células precursoras é menos problemática em todos os aspectos quando comparada com o transplante, e possui uma sólida base científica (MASET et al., 2009).

Segundo Shatbitz (2003) e Six (2003) em modelo de infarto cerebral da artéria cerebral média, em ratos, o G-CSF reduziu o tamanho do infarto induzido pelo glutamato em 47%, além disso os modelos experimentais tratados com o G-CSF tiveram melhor recuperação funcional e menor taxa de mortalidade.

Em estudos com carcinoma de mama em mulheres, o uso do G-CSF dá suporte a uma nova abordagem terapêutica no uso de altas doses de quimioterápicos. Este estudo baseia-se que ao ultrapassar a limitação da toxicidade medular, o uso de suporte hematopoiético permite aumentar a dose de quimioterapia administrada até atingirem toxicidades extra-hematopoéticas (FARIA et al., 2004). Para alguns fármacos anti-neoplásicos esse aumento da dose é significativo. *In vitro* o aumento linear na dose de citostáticos administrados resulta em aumento exponencial do efeito anti-tumoral (SKIPPER & SCHABEL, 1984).

3. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

O tratamento comumente indicado para cães portadores de linfoma é a poliquimioterapia, cujo fator limitante é a mielotoxicidade, que pode ser revertida pelo transplante de medula óssea (TMO). Antes do TMO, o animal deve ser submetido à terapia imunossupressora para evitar a rejeição. Para recuperação da imunossupressão recomenda-se a administração da citocina G-CSF, que estimula a proliferação e maturação neutrofílica. Portanto, o monitoramento das células-tronco e leucocitárias durante o tratamento quimioterápico é muito importante. Assim, os objetivos deste ensaio foram avaliar, de forma sequencial, os valores do leucograma de cães linfomatosos, em remissão, submetidos à alta dose de ciclofosfamida seguida ou não do TMO autólogo, com posterior uso do G-CSF, bem como quantificar células CD34+ no sangue periférico dos mesmos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Os grupos experimentais 1 (G1) e 2 (G2) incluíram dez cães acometidos por linfoma, sendo cinco animais no G1 e cinco no G2, submetidos às fases de indução da remissão, atendidos junto ao Serviço de Oncologia Veterinária (SOV) do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” (HV “GLN”) da FCAV/UNESP, entre julho de 2007 e junho de 2009. Sendo que, os animais de G1 receberam alta dose de ciclofosfamida suportada por transplante autólogo de medula óssea e fator estimulador de colônia de granulócitos recombinante humano (rhG-CSF). Os cães de G2 foram submetidos à alta dose de ciclofosfamida com posterior aplicação de rhG-CSF.

No grupo controle (Grupo 3 – G3) foram incluídos dez cães, SRD, machos ou fêmeas, sendo cinco do canil do Campus Veterinário do Centro Universitário “Barão de Mauá” – Ribeirão Preto – e outros cinco pertencentes ao canil do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” (HV “GLN”) da FCAV/UNESP, que após exame físico detalhado e hemograma foram considerados hígidos. Como valores hematológicos de referência, para inclusão dos animais no grupo controle, utilizaram-se aqueles estabelecidos junto ao “Laboratório de Patologia Clínica Veterinária” (“LPCV”) do HV “GLN” (APÊNDICES A e B).

O rhG-CSF foi administrado nas parcelas experimentais dos grupos tratados (G1 e G2) e controle (G3) na dose de 5µg/kg/dia durante quatro dias por via subcutânea.

4.2 CRONOGRAMA

- Momento 1 (M1):
 - Grupo 1 e 2: Momento imediatamente antes da quimioterapia;
 - Grupo 3: Como não foi submetido a quimioterapia os valores utilizados para o momento 1, deste grupo, foram os mesmos do momento 2.

- Momento 2 (M2):
 - Grupo 1 e 2: Sete dias após a quimioterapia, momento imediatamente antes da primeira aplicação do filgrastine®;
 - Grupo 3: momento imediatamente antes da primeira aplicação do filgrastine®.
- Momento 3 (M3):
 - Grupo 1, 2 e 3: 24 horas após a primeira aplicação do filgrastine®, momento imediatamente antes da segunda aplicação do fármaco.
- Momento 4 (M4):
 - Grupo 1, 2 e 3: 48 horas após a primeira aplicação do filgrastine®, momento imediatamente antes da terceira aplicação do fármaco.
- Momento 5 (M5)-
 - Grupo 1, 2 e 3: 72 horas após a primeira aplicação do filgrastine®, momento imediatamente antes da quarta e última aplicação do fármaco.
- Momento 6 (M6)-
 - Grupo 1, 2 e 3: 96 horas após a primeira aplicação do filgrastine®.

Para o grupo 1 que foi submetido ao transplante de medula óssea, este ocorreu entre os momentos 1 e 2, sendo que a colheita de medula óssea aconteceu dois dias antes da quimioterapia (condicionamento), e a infusão das células dois dias após a quimioterapia. Estas datas estão melhor explicadas no item 4.4.1 denominado transplante autólogo de medula óssea.

4.3 INDUÇÃO DA REMISSÃO

Para atingir a remissão completa os animais dos grupo 1 e 2 foram submetidos ao protocolo quimioterápico de M-W(APÊNDICE C), incluindo sulfato de vincristina (0,75 mg/m², IV), L-asparaginase (400 UI/Kg, IM), ciclofosfamida (250 mg/m², VO), doxorrubicina (30 mg/m², perfusão) e prednisona pelo período mínimo de nove semanas, ou seja, até o término da fase de indução da remissão (CÁPUA et al., 2009a).

4.4 GRUPO 1

4.4.1 TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE MEDULA ÓSSEA

Uma semana após o término da fase de indução da remissão, os cães do grupo 1 foram submetidos a uma avaliação pré-transplante da medula óssea, na qual se definiu a condição da doença para cada animal. As avaliações citoscópicas de amostras de medula óssea, obtidas dos referidos animais, revelaram preparações bem representativas, normocelulares, com adequada relação mielóide:eritróide (M:E) e número normal de megacariócitos, e isentas de componente linfomatoso.

Na semana subsequente realizou-se o transplante. Para tanto, o protocolo do TMO foi delineado segundo o protocolo empregado por CÁPUA et al. (2009a):

- Dia – 4 (D-4): Colheita de medula óssea;
- Dia – 2 (D-2): Condicionamento (ciclofosfamida IV) – Esta data coincide com o momento 1;
- Dia zero (D0): Infusão da suspensão de células medulares por via intravenosa.

Os cães portadores de linfoma foram submetidos à terapia com sulfametaxazol-trimetoprim, na dose de 25mg/kg, iniciada sete dias antes da colheita da medula óssea e mantida por mais 30 dias (CÁPUA et al., 2009a) no intuito de protegê-los de infecção oportunista em período no qual estariam imunossuprimidos.

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

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

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

Como procedimento anestésico e analgésico, foi realizada pré-medicação com meperidina (3mg/Kg, IM) e levomepromazina (0,5mg/kg, IV), indução da anestesia com propofol (5 mg/kg), e manutenção por intermédio de anestesia geral inalatória

(isofluorano). Para analgesia adequada, foi realizada anestesia peridural no espaço lombossacral com lidocaína 2% sem vasoconstritor (1 mL/5kg), associada a tramadol (2 mg/kg). Após o retorno anestésico procedeu-se à aplicação de tramadol (4 mg/kg, SC), que também foi utilizado para analgesia pós-cirúrgica (2 mg/kg VO, a cada oito horas, durante dois dias).

Para a colheita de medula óssea, foram realizadas punções na crista ilíaca do paciente utilizando-se de agulhas de Rosenthal e seringas de 20 mL (Figura 1). Para evitar hemodiluição, cada aspiração não excedeu ao volume de 10 mL, sendo que o volume total de material medular colhido foi de 10mL/Kg de peso. As alíquotas de MO assim colhidas foram acondicionadas em recipientes contendo meio de cultura RPMI 1640®¹, com bicarbonato de sódio, glutamina e antibiótico (10mL/100mL de MO), e foram cuidadosa e periodicamente homogeneizadas e, posteriormente, filtradas (Figura 2). Após a retirada do anticoagulante citrato-fosfato-dextrose-adenina-1 (CPDA-1) da bolsa tripla para colheita de sangue, o supra referido filtrado foi transferido para a mesma com auxílio de uma seringa de 60mL.

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

Primeiramente, foi realizada depleção das hemácias sob a ação do hidroxietilstarch (HES), na proporção de 1:5 que promove a sedimentação dos eritrócitos, possibilitando a transferência destas células para uma bolsa satélite. Ainda assim, uma camada de eritrócitos, com cerca de dois cm permaneceu na bolsa principal. Todo este procedimento foi realizado em uma capela de fluxo laminar nas instalações do Serviço de Oncologia Veterinária (SOV) do HV “GLN”.

Na segunda etapa, após transporte sob refrigeração, a bolsa contendo medula óssea foi centrifugada por 15 minutos em aproximadamente 1800 g e 20°C, junto ao Banco de Sangue Sertãozinho, Sertãozinho – SP, e então o plasma sobrenadante foi removido até que o seu volume remanescente fosse igual ou inferior a dois cm acima da camada de células brancas e, reservado.

¹ Cultilab- Insumos para cultura celular. Campinas- SP.

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

B. Condicionamento (D-2)

O condicionamento do paciente foi realizado dois dias após a colheita de medula óssea, ou seja, dois dias antes da infusão da mesma. Realizou-se fluidoterapia com solução de NaCl 0,9% (30mL/kg/h, IV) por 30 minutos, seguida da infusão de MESNA² (dose da ciclofosfamida X 0,4, IV) para prevenção da cistite hemorrágica e, da administração de ondansetrona³ (0,1 – 0,22 mg/kg VO) no intuito de prevenir os episódios de vômitos que poderiam ser desencadeados pelo quimioterápico, sendo a mesma dose repetida oito horas depois. Para o condicionamento, propriamente dito, infundiu-se ciclofosfamida (500 mg/m²). A seguir, administrou-se furosemida (2 mg/kg) e manteve-se a fluidoterapia por cinco horas (30mL/kg/h, IV) e repetiu-se a aplicação da MESNA na segunda e quinta horas após o término da administração da ciclofosfamida. Todo o procedimento foi realizado no Laboratório de Oncologia do SOV da FCAV/UNESP-Jaboticabal, sendo a manipulação dos quimioterápicos antineoplásicos sob fluxo laminar.

² Medicamento genérico

³ Medicamento genérico

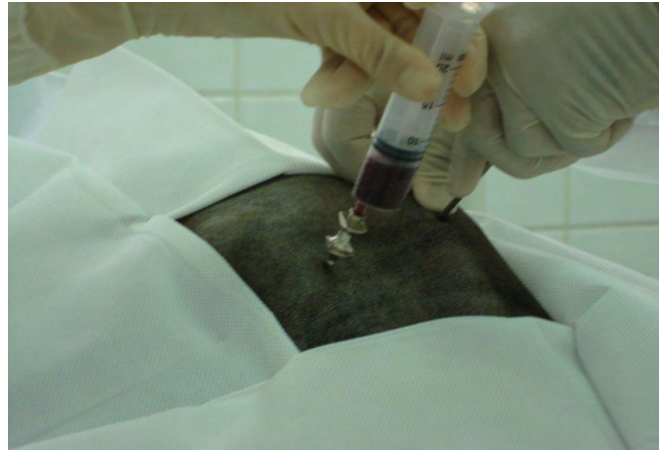


Figura 1. Procedimento de colheita de medula óssea na crista íliaca de um cão, com vistas ao transplante autólogo de medula óssea. Jaboticabal, 2010.



Figura 2. Filtragem da medula óssea coletada. Jaboticabal, 2010.

C. Infusão da suspensão de células da medula óssea (D-0)

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

dos animais foram avaliados, e após o término da infusão os animais mantiveram-se sob monitoramento e fluidoterapia pelo tempo mínimo de 40 minutos.

A administração de ondasetrona foi realizada no intuito de controlar os episódios eméticos que poderiam ocorrer tanto no momento da quimioterapia quanto na infusão da bolsa de medula óssea.

4.5 GRUPO 2

4.5.1 CONDICIONAMENTO

O condicionamento dos pacientes do grupo 2 foi realizado uma semana após o término da fase de indução da remissão, sendo que os cães foram submetidos a avaliação clínica, laboratorial e exames de imagem, com o intuito de verificar se os mesmos estavam realmente em remissão. Estes procedimentos também foram realizados nos animais do G1.

Realizou-se fluidoterapia com solução de NaCl 0,9% (30mL/kg/h, IV) por 30 minutos, seguida da infusão de MESNA (dose da ciclofosfamida X 0,4, IV) e, da administração de ondansetrona (0,1 – 0,22 mg/kg VO), sendo a mesma dose repetida oito horas depois. Para o condicionamento, propriamente dito, infundiu-se ciclofosfamida (500 mg/m²). A seguir, administrou-se furosemida (2 mg/kg) e manteve-se a fluidoterapia por cinco horas (30mL/kg/h, IV) e repetiu-se a aplicação da MESNA na segunda e quinta horas após o término da administração da ciclofosfamida. Todo o procedimento foi realizado no Laboratório de Oncologia do SOV da FCAV/UNESP-Jaboticabal.

4.6 USO DE FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIA DE GRANULÓCITOS

O rhG-CSF (filgrastine®⁴) foi administrado aos animais dos G1, G2 e G3, na dose de 5µg/Kg/dia, por via subcutânea, com o intuito de acelerar a reconstituição hematopoética. A frequência de administração do rhG-CSF nos grupos tratados deu-se do dia sete ao dia dez após alta dose de ciclofosfamida. Os animais do grupo controle receberam 5µg/kg/dia de rhG-CSF, por via subcutânea durante quatro dias.

⁴ Filgrastine® - Blausiegel industria e comércio Ltda, Cotia, SP, Brasil.

4.7 COLHEITA DE MATERIAL PARA ANÁLISE

Amostras de sangue destinadas às análises hematológica e citofluorométrica foram colhidas por venopunção jugular e envasadas em tubos a vácuo contendo EDTA, nos dias 7 a 11 após quimioterapia. A colheita do sangue aconteceu imediatamente antes da aplicação do filgrastine® nos dias sete a dez após quimioterapia com intervalos de 24 horas, e 24 horas após a última aplicação do fármaco. O sangue foi separado em duas alíquotas, sendo uma destinada ao hemograma e outra à marcação com anticorpos para posterior leitura no citômetro de fluxo. As amostras destinadas a avaliação citofluorométricas foram avaliadas em no Máximo 48 horas após a colheita.

4.8 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE CÉLULAS CD34⁺

A preparação das suspensões de células foi realizada no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – Unesp. Utilizou-se o protocolo “International Society of Hematotherapy and Graft Engineering” (ISHAGE) (SUTHERLAND et al., 1996) para quantificação de células-tronco CD34⁺. As análises foram realizadas em duplicata, de modo que foram utilizados dois tubos, ambos contendo 200µL da amostra de sangue com EDTA, 5µL de anticorpo monoclonal anti-CD45⁺ conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Rat Anti-Dog CD45: FITC - SEROTEC) e 5µL de anti-CD34⁺ conjugado com ficoeritrina (PE) (PE Mouse Anti-Dog CD34 – BD Pharmingen). Os tubos foram incubados por 20 minutos em temperatura ambiente e protegidos de luz.

Dois mililitros de tampão de lise de hemácias (FACS Lysing Solution® – Becton Dickinson) foram adicionados em cada tubo que foram incubados por dez minutos, em temperatura ambiente e protegidos de luz. Posteriormente, foi realizada a lavagem do material, duas vezes, em solução salina tamponada com PBS. Ao final, adicionou-se 500µL de PBS em cada tubo e as amostras foram analisadas com auxílio do software FACSDiva que integra o citômetro de fluxo FACSCANTO (Becton Dickinson, San Jose, CA) no laboratório de citometria de fluxo da faculdade de farmacologia da USP, campus de Ribeirão Preto- SP, para identificação e quantificação das células CD34⁺.

4.9 CÁLCULO DA QUANTIDADE DE CÉLULAS CD34⁺

O cálculo da quantidade de células CD34⁺/mm³ foi estabelecido por intermédio da seguinte fórmula:

$$\text{CD34}^+/\text{mm}^3 = \frac{[(T1+T2) / 2 - T3]}{75000} \times \text{GB}$$

Sendo que:

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

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

T3 =contagem de células positivas para CD45.

GB= contagem global de células nucleadas.

N° total de eventos= 75000.

4.10 LEUCOGRAMA

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

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores obtidos para as características leucométricas e quantificação de células CD34⁺ seguiram um delineamento inteiramente casualizado (GOMES PIMENTEL, 1995), cujas médias foram confrontadas segundo teste de Tukey. No intuito de diminuir a variabilidade dos parâmetros basófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos e células CD34⁺, os dados foram transformados em Raiz Quadrada da observação +1. Para todos os procedimentos foi utilizado o software SAS⁵.

⁵ SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios do leucograma para os grupos 1 (G1 - animais com TMO), 2 (G2 - animais sem TMO) e 3 (G3 - grupo controle) nos momentos 1 (quimioterapia), 2, 3, 4, 5 (aplicação do rhG-CSF) e 6 (24 horas após última aplicação) estão representados na tabela 1. A análise estatística do leucograma se encontra na tabela 2.

Tabela 1: Valores médios obtidos para o leucograma (células/ μL) dos cães dos Grupos 1 (quimioterapia, transplante de medula óssea e rhG-CSF), G2 (quimioterapia e rhG-CSF) e G3 (rhG-CSF) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2010

	Leu			Bas			Eos			Nb			NS			Lin			Mon		
	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3
M1	5424	7100	8890	0	0	0	626,0	650	769,7	38,0	64	65,6	3050,5	5100	5410,8	721,4	965	2376,1	370,4	279	278,8
M2	1900	1600	8890	0	0	0	400,4	220,4	769,7	0	89	65,6	425,0	637,4	5410,8	770,4	556,4	2376,1	134,2	104,8	278,8
M3	2674	2800	23010	3,0	0	0	487,0	367,2	1197,5	18,0	57,6	209,7	1030,0	1222	18326,2	1042,0	996,8	2595,4	94,0	156,4	681,2
M4	4350	7040	27090	6,4	0	49,8	447,6	275,75	943,5	89,0	151	1127,7	2407,0	6123,5	19678,7	1003,6	836,25	4108,4	396,4	284,75	1181,9
M5	11324	12100	23390	49,6	0	0	335,4	381,2	1253,7	205,4	265,4	0	7882,4	7488,6	18282,2	2264,2	1708,8	2653,8	587,0	737,6	1200,3
M6	21550	16340	26780	58,8	0	16,9	609,8	240	1175,5	928,4	431,25	506,8	16825,4	15289,5	20635,1	2231,6	1849,5	3454,5	896,0	632,25	991,2

Tabela 2 – Representação do resultado da avaliação estatística. Jaboticabal, 2010

RESULTADO DE ANOVA

<i>Níveis mínimos de significância (p)</i>										
Fonte de variação	GI	Leu	NS	Linf	Bas	Eos	NB	Mon	CD34	
Grupos	2	0,0015	0,0016	0,0166	0,4431	0,0188	0,2297	0,0047	0,2551	
Erro (a)	----	----	----	----	----	----	----	----	----	
Momentos	5	----	----	----	----	----	----	----	----	
Momento X Grupo	10	<0,0001*	<0,0001*	0,3202	0,4737	0,6631	0,0020*	0,0189	0,1538	
Erro (b)	-----	----	----	----	----	----	----	----	----	
Coefficiente de Variação		34,81	37,52	33,62	167,42	42,74	160,28	31,65	41,89	
R²		0,81	0,82	0,44	0,22	0,37	0,42	0,62	0,31	

*Diferença estatística a 1% de significância pelo teste de Tuckey (p<0,01) na interação grupos e momentos.

Os valores médios absolutos obtidos para as contagens globais de leucócitos, neutrófilos segmentados, neutrófilos bastonetes, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos dos grupos G1, G2 e G3 nos diferentes momentos de avaliação estão apresentados nas figuras 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, respectivamente. Os resultados da avaliação estatística, segundo o teste de Tukey, estão representados nas tabelas 2, 3, 4, 5, 6, 7, e 8.

Para as variáveis leucócitos totais e neutrófilos segmentados houve diferença estatística ($p < 0,0001$) na interação grupos e momentos. Entre momentos esta diferença apareceu no M6 para os grupos 1 e 2 e, a partir do M3 para o G3, a diferença ocorreu somente entre G3 com G1 e G2 e não entre os dois últimos citados (tabelas 3 e 4 e figura 3 e 4). Os neutrófilos bastonetes apresentaram diferença estatística ($p = 0,002$) na interação grupos e momentos. Entre momentos esta diferença foi notada particularmente entre os momentos 1, 2, 3, 5 e 6 com o M4 (tabela 5 e figura 5).

Neste ensaio, o valor médio obtido para a contagem absoluta de neutrófilos, nos animais controle (G3) se elevou de 5475 células/ μL para 18536 células/ μL no M3 (24 horas após primeira aplicação do rhG-CSF). Aumento tão significativo na contagem total de células neutrofilicas, também foram reportados por Obradovich et al. (1991) quando aplicaram, por via subcutânea, 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ de g-csf recombinante canino (rcG-CSF) em cães saudáveis. No referido estudo, o número de neutrófilos subiu de 6537 células/ μL para 26330 células/ μL , após 24 horas da primeira aplicação do rcG-CSF.

Grande acréscimo no número de neutrófilos logo após a primeira aplicação de rhG-CSF também foi relatado num estudo conduzido em alpacas (MCKENZIE, et al., 2008), no qual, em 24 horas após a primeira aplicação, os valores de neutrófilos foram maiores que aqueles considerados normais para a espécie, fato também verificado após a segunda (M4) e terceira (M5) aplicações do referido fármaco. Tal curva-resposta, caracterizada por aumento crescente no número de neutrófilos, inclusive 24 horas após a última aplicação, pode ser observada também no nosso estudo.

Tabela 3: Valores médios da interação das variáveis grupos e momentos para os valores de leucócitos totais (células/ μ L) dos cães dos Grupos 1 (quimioterapia, transplante de medula óssea - TMO e rhG-CSF), G2 (quimioterapia e rhG-CSF) e G3 (rhG-CSF) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2010

	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Grupo 1	5424 Aa	1900 Aa	2674 Aa	4350 Aa	11324 Aa	21550 Ba
Grupo 2	7100 Aa	1600 Aa	2800 Aa	7040 Aa	12100 Aa	16340 Ba
Grupo 3	8890 Aa	8890 Aa	23010Bb	27090 Bb	23390 Bb	26780 Ba

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem entre si.

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si.

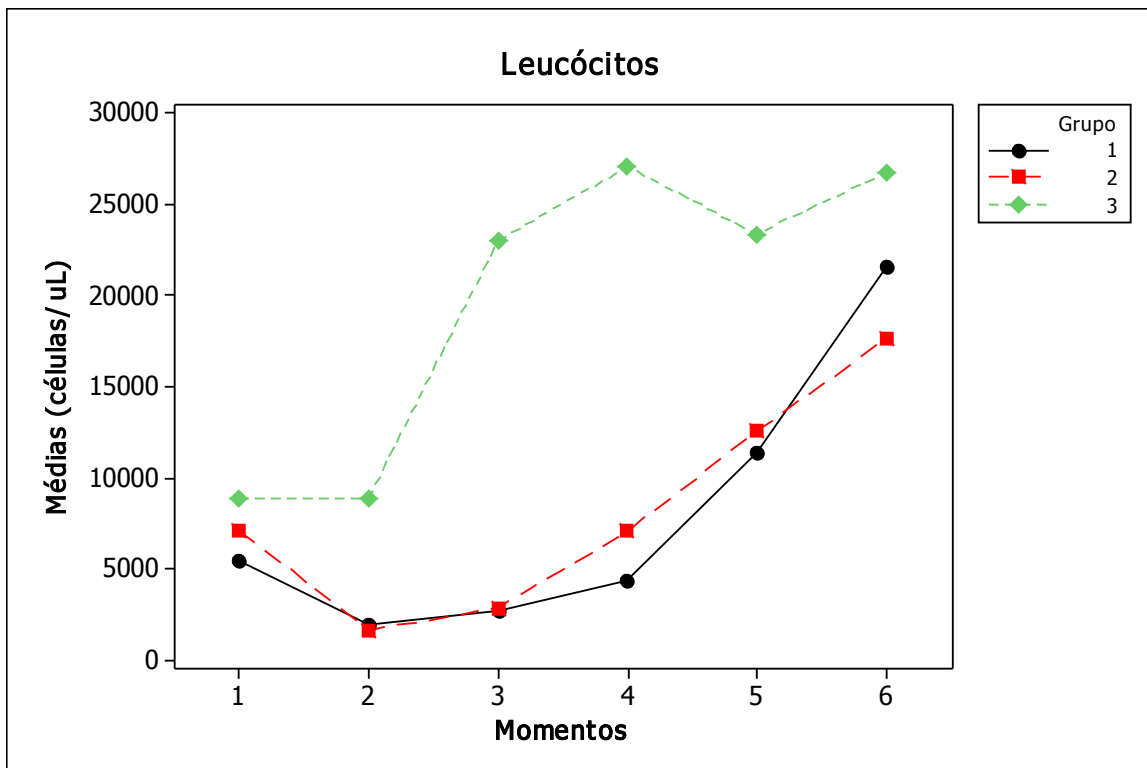


Figura 3: Comportamento dos valores médios obtidos para leucócitos em cães dos Grupos 1 (quimioterapia, transplante de medula óssea - TMO e rhG-CSF), G2 (quimioterapia e rhG-CSF) e G3 (rhG-CSF) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2010

Tabela 4: Valores médios da interação das variáveis grupos e momentos para os valores de neutrófilos segmentados (células/ μ L) dos cães dos Grupos 1

(quimioterapia, TMO e rhG-CSF), G2 (quimioterapia e rhG-CSF) e G3 (rhG-CSF) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2010

	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Grupo 1	3050,5 Aa	425 Aa	1030 Aa	2407 Aa	7882,4 Aa	16825,4 Ba
Grupo 2	5100 Aa	637,4 Aa	1222 Aa	6123,5 Aa	7488,6 Aa	15289,5 Ba
Grupo 3	5410,8 Aa	5410,8 Aa	18326,2Bb	19678,7Bb	18282,2Bb	20635,1 Bb

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem entre si.

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si.

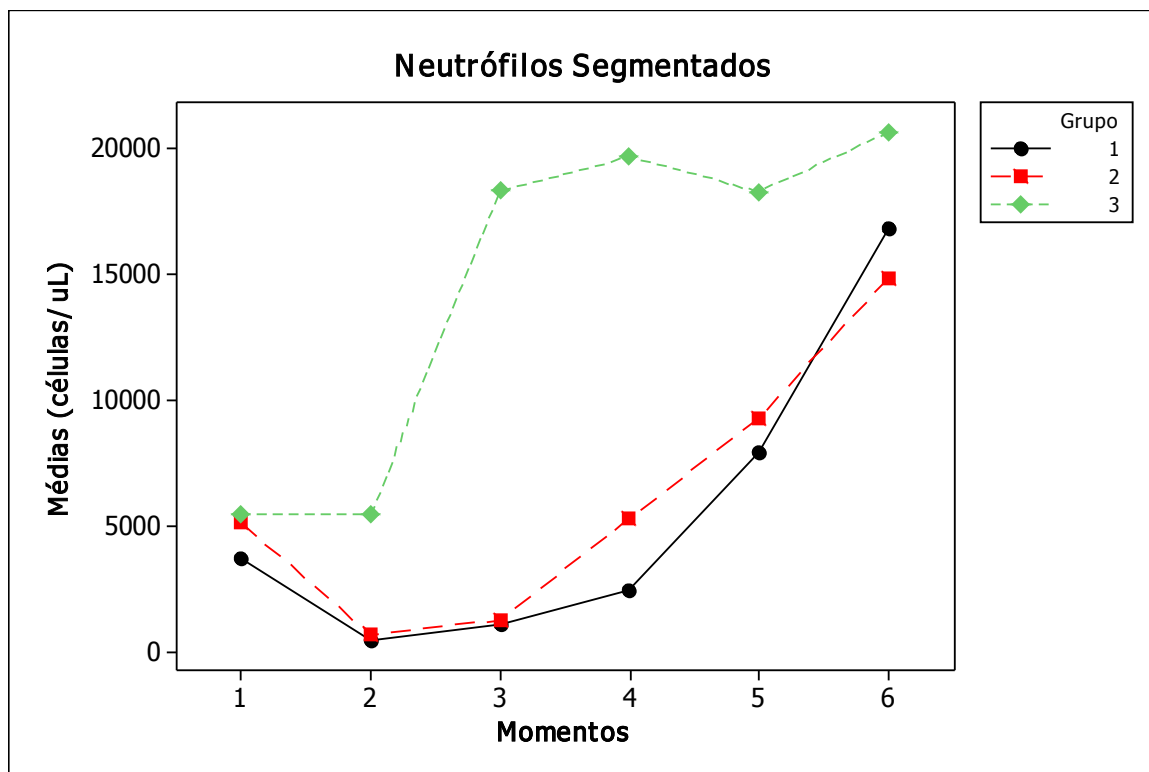


Figura 4: Comportamento dos valores médios obtidos para NS em animais dos cães dos Grupos 1 (quimioterapia, TMO e rhG-CSF), G2 (quimioterapia e rhG-CSF) e G3 (rhG-CSF) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2010

Tabela 5: Valores médios da interação das variáveis grupos e momentos para os valores de neutrófilos bastonetes (células/ μ L) dos cães dos Grupos 1

(quimioterapia, TMO e rhG-CSF), G2 (quimioterapia e rhG-CSF) e G3 (rhG-CSF) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2010

	M1		M2		M3		M4		M5		M6	
Grupo 1	38	Aa	0	Aa	18	Aa	89	Aa	205,4	Aa	928,4	Aa
Grupo 2	64	Aa	89	Aa	57,6	Aa	151	Aa	265,4	Aa	431,25	Aa
Grupo 3	65,6	Aa	65,6	Aa	209,7	Aa	1127,7	Bb	0	Aa	506,8	Aa

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem entre si.

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si.

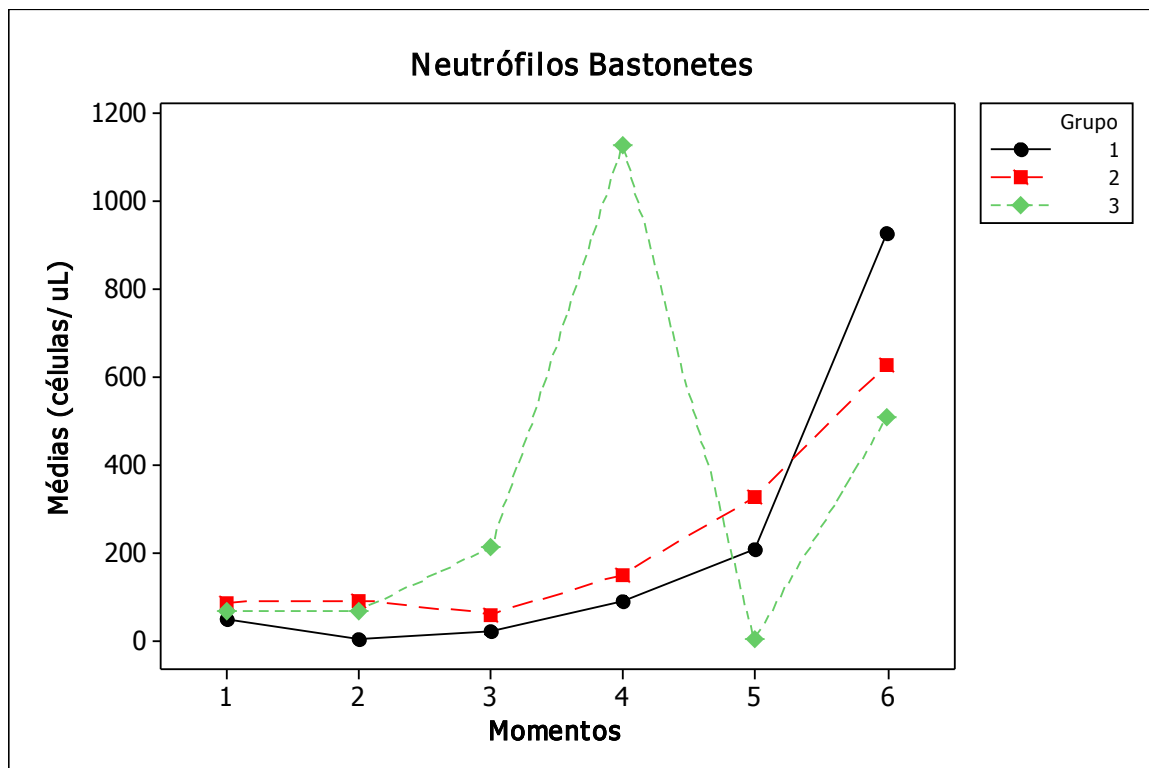


Figura 5: Comportamento dos valores médios obtidos para neutrófilos bastonetes em cães dos Grupos 1 (quimioterapia, TMO e rhG-CSF), G2 (quimioterapia e rhG-CSF) e G3 (rhG-CSF) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2010

A variável eosinófilo apresentou somente diferença estatística significativa entre grupos ($p=0,0188$), sendo que o G3 apresentou-se diferente dos demais grupos (tabela 6). Para a variável basófilos não houve diferença estatística a 5% de significância ($p=$

0,4737) na interação grupos e momentos, nem nos momentos dentro dos mesmos grupos ($p= 0,2575$) e nem entre grupos ($p= 0,4431$).

Tabela 6: Valores das médias dos grupos G1, G2 e G3 para a variável eosinófilos (células/ μ L) dos cães dos Grupos 1 (quimioterapia, TMO e rhG-CSF), G2 (quimioterapia e rhG-CSF) e G3 (rhG-CSF). Jaboticabal, 2010

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
484,53 A	355,76 A	1018,26 B

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem entre si.

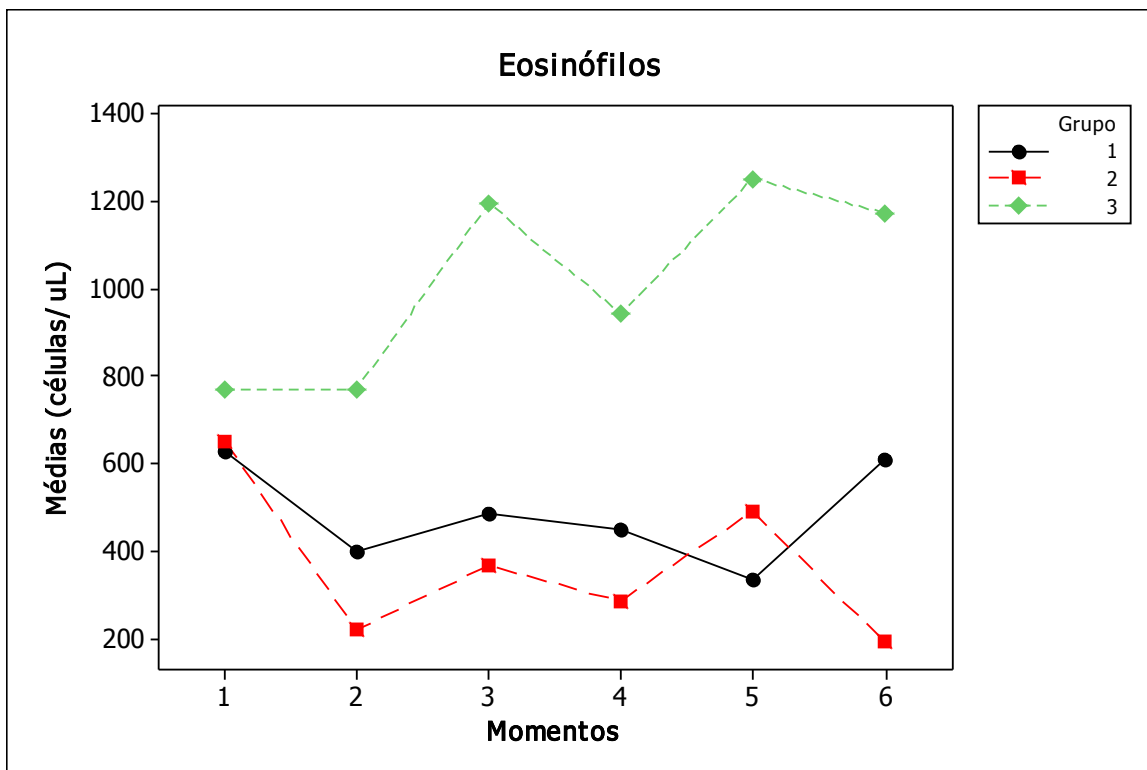


Figura 6: Comportamento dos valores médios obtidos para eosinófilos dos cães dos Grupos 1 (quimioterapia, transplante de medula óssea - TMO e rhG-CSF), G2 (quimioterapia e rhG-CSF) e G3 (rhG-CSF) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2010.

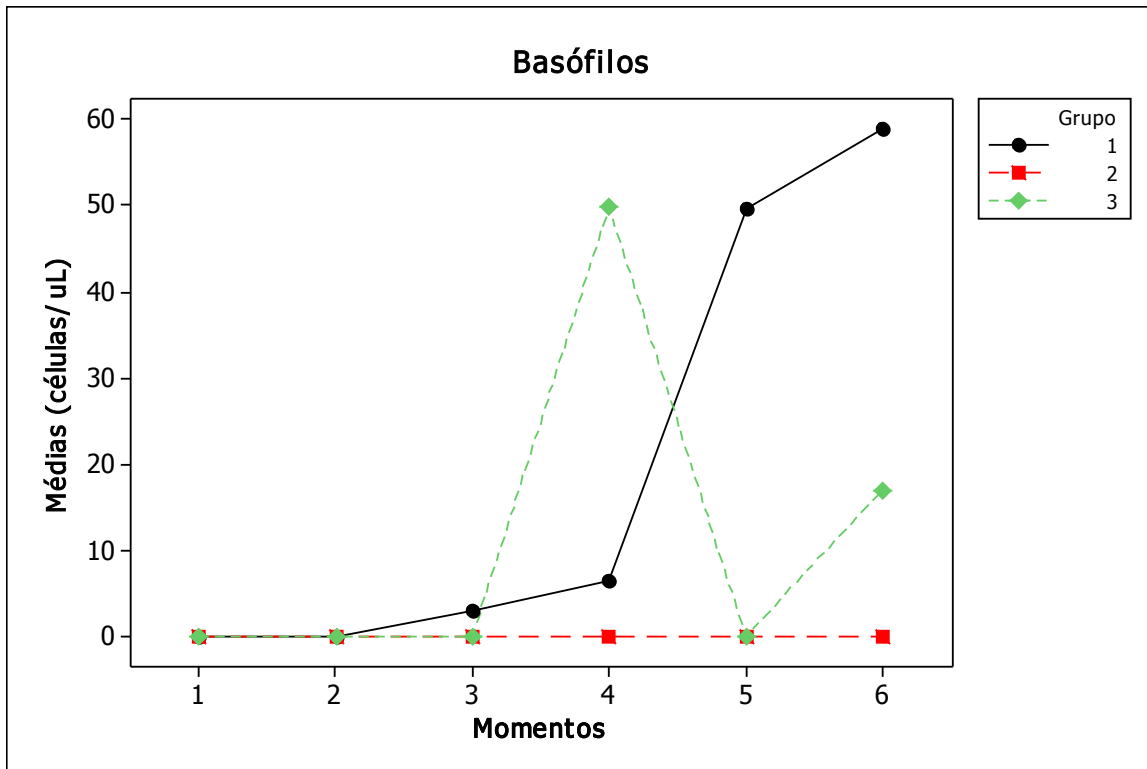


Figura 7: Comportamento dos valores médios obtidos para basófilos dos cães dos Grupos 1 (quimioterapia, TMO e rhG-CSF), G2 (quimioterapia e rhG-CSF) e G3 (rhG-CSF) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2010

A variável monócitos apresentou diferença estatística a 5% de significância pelo teste de Tukey ($p= 0,0189$) na interação grupos e momentos (tabela 7). A diferença entre grupos foi encontrada entre o G3 e os demais grupos, sendo que, os grupos 1 e 2 não diferiram. Os linfócitos não apresentaram diferença estatística a 5% de significância no teste Tukey ($p= 0,3202$) na interação grupos e momentos, no entanto houve diferença significativa entre grupos ($p= 0,0166$), sendo que não houve diferença entre G1 e G2, mas houve entre estes e G3 (tabela 8).

No G3, diferentemente do que foi encontrado por Obradovich et al (1991), embora o número de monócitos tenha aumentado após as aplicações do rhG-CSF, em cães hígdos, neste estudo houve ligeira queda. Obradovich et al (1991) relataram que após quatro aplicações de rcG-CSF o número de monócitos circulantes aumentou de aproximadamente 751 células/ μL para 2514 células/ μL e continuou a subir até o 19º dia de aplicação, quando atingiu a quantidade de 3972 células/ μL . No nosso ensaio o

numero de monócitos aumentou após as tres primeiras aplicações do rhG-CSF, e declinou levemente após a quarta aplicação do referido fármaco.

Tabela 7: Valores médios da interação das variáveis grupos e momentos para os valores de monócitos (células/ μ L) dos cães dos Grupos 1 (quimioterapia, TMO e rhG-CSF), G2 (quimioterapia e rhG-CSF) e G3 (rhG-CSF) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2010

	M1		M2		M3		M4		M5		M6	
Grupo 1	370,4	Aa	134,2	Aa	94	Aa	396,4	Aa	587	Aa	896	Aa
Grupo 2	279	Aa	104,8	Aa	156,4	Aa	284,75	Aa	737,6	Aa	632,25	Aa
Grupo 3	278,8	Aa	278,8	Aa	681,2	Aa	1181,9	Bb	1200,3	Ba	991,2	Ba

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem entre si.

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si.

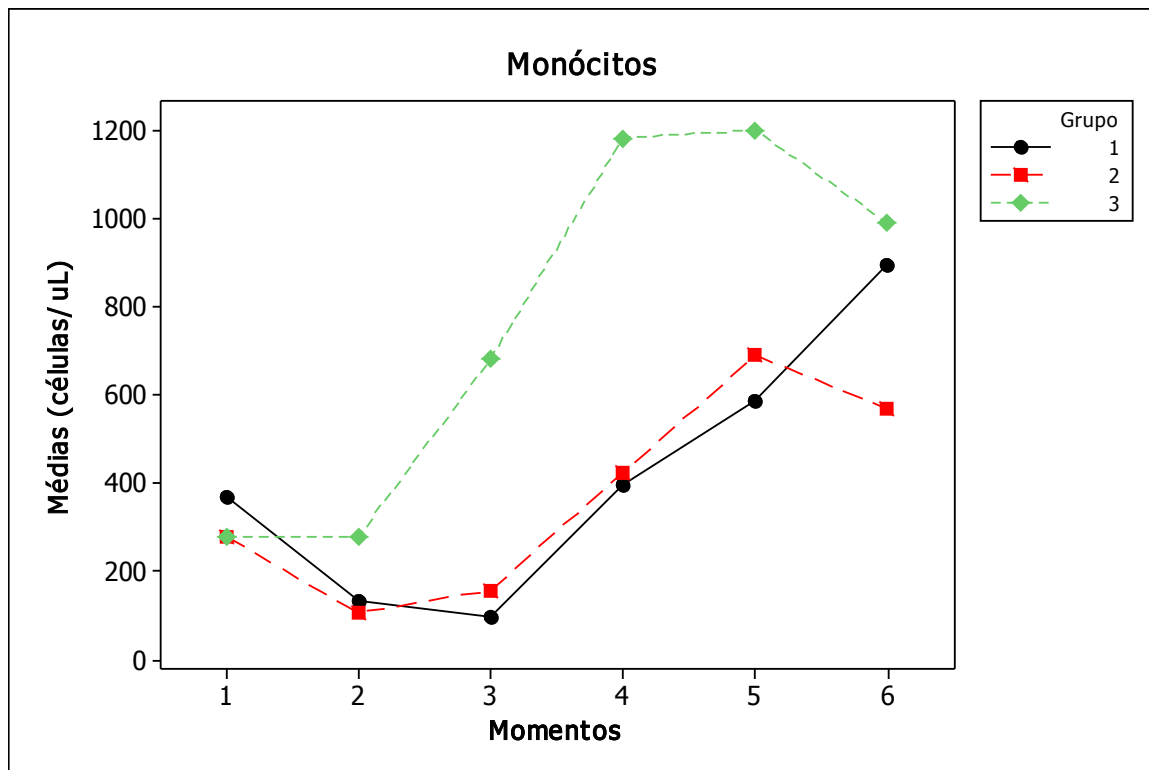


Figura 8: Comportamento dos valores médios obtidos para monócitos em cães dos Grupos 1 (quimioterapia, TMO e rhG-CSF), G2 (quimioterapia e rhG-CSF) e G3 (rhG-CSF) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2010

Tabela 8: Valores das médias para a variável linfócitos (células/ μ L) dos cães dos Grupos 1 (quimioterapia, TMO e rhG-CSF), G2 (quimioterapia e rhG-CSF) e G3 (rhG-CSF). Jaboticabal, 2010

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
1338,86 A	1152,125 A	2927,38 B

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem entre si.

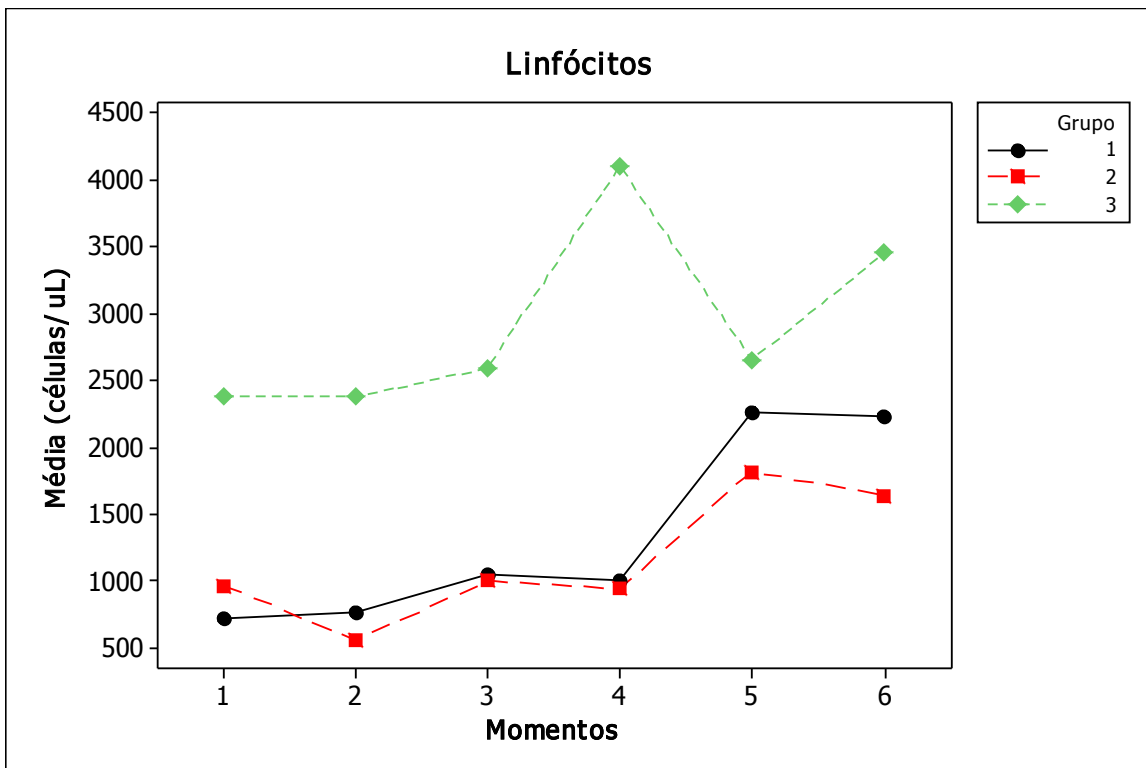


Figura 9: Comportamento dos valores médios obtidos para linfócitos em cães dos Grupos 1 (quimioterapia, TMO e rhG-CSF), G2 (quimioterapia e rhG-CSF) e G3 (rhG-CSF) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2010

Nota-se que a partir do momento 2 (imediatamente antes da primeira aplicação do rhG-CSF) os leucócitos totais dos três grupos experimentais apresentaram-se em curva ascendente, devido elevação de neutrófilos bastonetes e segmentados, corroborando com HAMMOND et al. (1991), que relatam aumento na liberação de

neutrófilos da medula óssea para o sangue, uma a duas horas após a administração de G-CSF, e aceleração na produção de células neutrofílicas em um a três dias; fato este que pode explicar também o aumento de neutrófilos bastonetes na circulação no M4.

De acordo com a bula técnica, o filgrastine® promove elevação evidente nas contagens de neutrófilos no sangue periférico, com elevações mínimas dos monócitos, fato que pôde ser observado em todos os animais deste protocolo. O número médio de basófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos manteve-se dentro dos intervalos de normalidade para a espécie, sem apresentar variações expressivas durante o período experimental, corroborando com Hammond et al. (1990), que em estudos com collies com neutropenia do collie cinza submetidos ao uso do rhG-CSF apresentavam leucocitose por neutrofilia, e que cujos linfócitos, eosinófilos e monócitos apresentavam flutuações numéricas dentro dos limites de normalidade para a espécie. Em humanos que receberam G-CSF, notou-se neutrofilia e linfocitose (BARRINGTON et al., 1997). Já num outro estudo, dessa vez com felinos, o uso de rhG-CSF acarretou além de neutrofilia, também linfocitose e monocitose (FULTON, et al., 1991). Um quadro de monocitose foi reportado, juntamente com neutrofilia, nos estudos realizados em alpacas (MCKENZIE, et al. 2008).

O nadir médio dos neutrófilos segmentados no G1 foi 425 NS/ μ L, e no G2 foi 637,4 NS/ μ L e ocorreu sete dias após alta dose de quimioterápico nos dois grupos, dado este esperado, uma vez que o nadir de neutrófilos causado pela ciclofosfamida ocorre em torno do oitavo ao décimo quarto dia após aplicação do fármaco (DALECK et al., 2008). A duração média da neutropenia foi de três dias. Neste ensaio, nenhum animal dos grupos 1 ou 2 apresentou febre ou sepse após a alta dose de ciclofosfamida. Desta maneira, pode-se inferir que o uso do rh-GSF em cães linfomatosos, tal qual em pacientes humanos submetidos à quimioterapia citotóxica ou terapia mieloablativa, leva a reduções significativas na incidência, severidade e duração da neutropenia e neutropenia febril (BONONI et al., 2009; CHAN et al., 2010). Efeitos benéficos do filgrastim, segundo EICHACKER (1994), foram observados somente quando sua administração teve início dias antes da ocorrência de sepse experimental, em função do aumento no número de neutrófilos circulantes, bem como

da melhora nos mecanismos de defesa dos cães. Da mesma forma, pacientes humanos tratados com quimioterapia citotóxica e filgrastim requerem menor número de admissões hospitalares e dias de hospitalização, requerendo menor carga de antibióticos quando comparados aos pacientes tratados apenas com quimioterapia citotóxica.

As diferenças observadas no número de neutrófilos circulantes no confronto dos diferentes momentos estão diretamente relacionadas à aplicação do fármaco estudado (G-CSF), no momento anterior. Já as diferenças entre grupos estão relacionadas aos diferentes tratamentos para cada grupo. É importante salientar que em G3 não houve a variável quimioterapia, o que fez com que não ocorresse o nadir de leucócitos e neutrófilos segmentados, ocorrendo assim, somente aumento na contagem global dos leucócitos, em decorrência do aporte de neutrófilos ao sangue circulante, após o uso do rhG-CSF, fato este que poderia justificar a diferença de valores entre os grupos.

Com vista à resposta dos animais frente aos dois tipos de tratamento após quimioterapia (grupos 1 e 2), levando-se em consideração que o G2 retornou aos valores leucocitários fisiológicos no momento 4 e o G1 entre o M4 e M5, pode-se dizer que apenas o tratamento com rhG-CSF é suficiente na recuperação leucocitária do animal após quimioterapia com ciclofosfamida na dose de 500mg/m². Este fato é muito importante se levarmos em consideração que, para os animais foi desnecessária a colheita da medula-óssea, procedimento realizado com os mesmos sob anestesia geral inalatória e que causa um certo grau de mal-estar e dor nos dias que procedem a referida colheita, pois são realizadas inúmeras punções na crista ilíaca do animal. Para o clínico, como a colheita de medula óssea torna-se desnecessária, a realização do protocolo quimioterápico é facilitada devido à diminuição dos custos, em razão da dispensa de equipamentos especializados para processamento da bolsa de medula-óssea e equipe treinada para o procedimento de colheita da medula óssea e processamento da bolsa, facilitando o emprego da técnica em questão. Tal assertiva corrobora as colocações referidas por Renault & Losordo (2007) que afirmam que devido aos custos, dificuldades do TMO e aos procedimentos invasivos, que podem não ser tolerados por alguns pacientes críticos, é oportuna a busca de novas alternativas de tratamento como por exemplo a mobilização de células-tronco

hematopoiéticas para o sangue periférico, como é especialmente recomendado em alguns casos de pacientes cardiopatas.

Os valores médios obtidos para células CD34⁺ dos grupos G1, G2 e G3 nos momentos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 estão apresentados na tabela 9 e figura 10. Os valores de CD34 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p= 0,1538$) na interação grupos e momentos, entre momentos e nem entre grupos, de acordo com o teste de Tukey (tabela 2).

Tabela 9: Valores médios de células CD34⁺ (células/mm³) dos cães dos Grupos 1 (quimioterapia, transplante de medula óssea e rhG-CSF), G2 (quimioterapia e rhG-CSF) e G3 (rhG-CSF) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2010

	CD34 ⁺ (células/mm ³)		
	G1	G2	G3
M1	2.66	0.55	1.64
M2	2.66	1.08	1.64
M3	2.45	0.71	3.16
M4	4.71	8.31	4.99
M5	7.89	0.91	0.61
M6	5.23	3.63	1.27

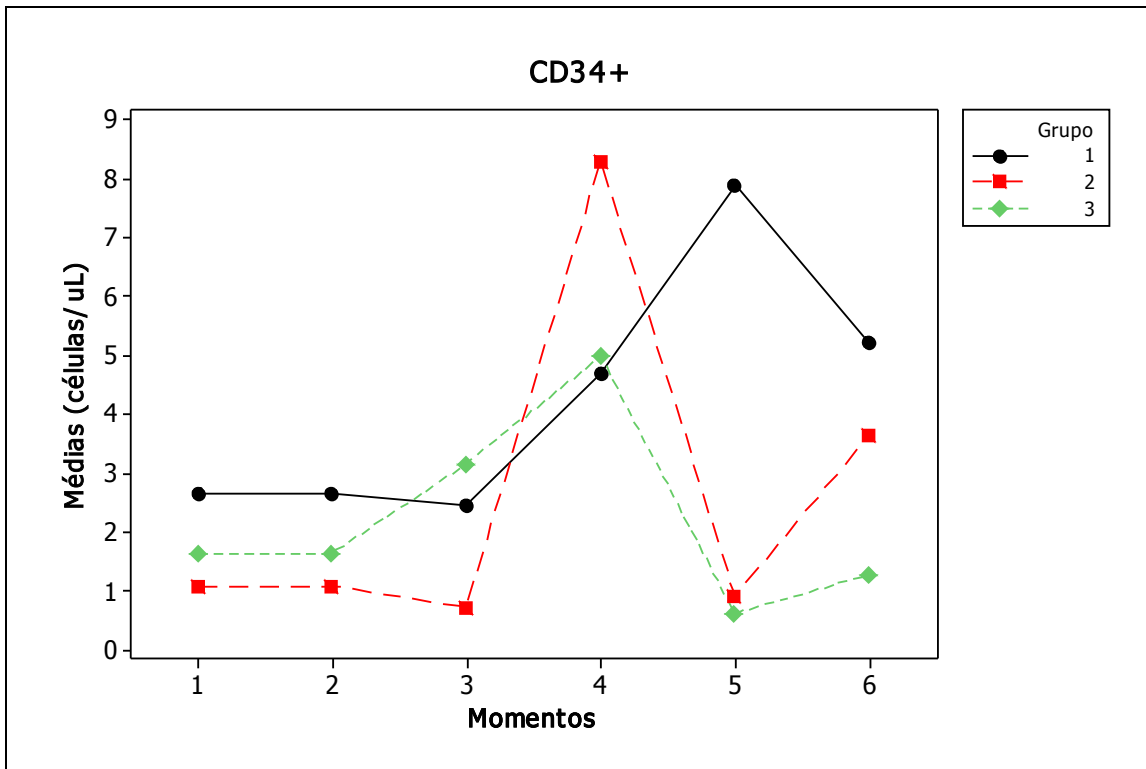


Figura 10: Comportamento dos valores médios obtidos para CD34⁺ em cães dos Grupos 1 (quimioterapia, TMO e rhG-CSF), G2 (quimioterapia e rhG-CSF) e G3 (rhG-CSF) em diferentes momentos do protocolo experimental. Jaboticabal, 2010

A quantidade de células CD34⁺ no sangue periférico de indivíduos adultos e sadios corresponde a 1/10 daquela encontrada na medula óssea (BENDER, 1992). Tal valor pode se elevar após a administração de fatores de crescimento hematopoéticos, tais como G-CSF ou fator de célula-tronco (“stem cell factor” ou STC), que permitem a mobilização de progenitores hematopoiéticos da medula óssea para o sangue periférico de cães submetidos à irradiação corpórea total (REVEL et al., 1994; SANDMAIER et al., 1996).

Vários pesquisadores utilizam o rhG-CSF para mobilização das CTH para o sangue periférico em humanos e animais, isoladamente, ou em associação com outros fatores de crescimento hematopoéticos, durante quimioterapia mielossupressora ou radioterapia (DÜRSHEN et al., 1988; MOLINEUX, et. al., 1990; BESINGER et. al., 1993;

REVEL et. al., 1994; SANDMAIER et. al., 1996; SOLÁ et. al., 1999; FRUEHAUF e SEGGEWISS, 2003).

A administração de rhG-CSF aumenta o número de células-tronco periféricas (CTP) acima de 100 vezes do valor basal em pacientes humanos com câncer (DÜRSHEN et al., 1988). Enxertos alogênicos provindos de sangue periférico mobilizado (SPM) com G-CSF, são capazes de aportar de duas a quatro vezes mais células CD34⁺ em comparação a enxertos oriundos da MO (KÖRBLING e ANDERLINI, 2001). Besinger et al. (1993) aplicaram G-CSF em pacientes humanos e observaram um aumento de 10 vezes no número de células CD34⁺ no sangue periférico, comparado ao período que precedeu a administração de G-CSF, enquanto KÖRBLING et al. (1995) observaram aumento de 16 a 23 vezes no número de CD34⁺ em relação ao nível basal no sangue periférico de doadores saudáveis, após aplicação de rhG-CSF. Ao submeter doadores saudáveis ao tratamento com G-CSF e quantificar suas células CD34⁺ na MO foi observado que o número de células CD34⁺ presentes na MO dos doadores tratados era semelhante àquele encontrado na MO de doadores controle (COUBAN et. al., 2000; KORBLING & ANDERLINI, 2001) .

Para que ocorra mobilização eficiente de CTH, em humanos, preconiza-se que os doadores/pacientes liberem, no mínimo, 10 células CD34⁺/mm³ no sangue periférico para posterior leucaférese – procedimento utilizado para obtenção de células mononucleares do sangue periférico (KORBLING et al., 1980; MENDRONE JR, 2008). Neste estudo, os valores de células CD34⁺ encontrados em seus respectivos picos foram 7,89 células CD34⁺/mm³ no M5 para o G1; 8,31 células CD34⁺/mm³ no M4 para G2 e 4,99 células CD34⁺/mm³ no M4 para o G3 (tabela 9), sendo que para o G1 (quimioterapia, TMO e rhG-CSF), o pico provavelmente foi mais tardio devido à infusão da bolsa de medula-óssea, a qual continha células CD34⁺ na sua composição. Tanto para o G2 (quimioterapia e rhG-CSF) quanto para o G3 (rhG-CSF), o pico de células CD34⁺ não atingiu 10 células/mm³, não tendo ocorrido adequada mobilização das mesmas sob estas condições quando comparado aos valores já padronizados como ótimos para seres humanos (MENDRONE JR, 2008);.Entretanto os animais de G2 apresentou uma quantidade significativamente maior de células CD34⁺, corroborando os achados de Mendrone Júnior (2008), que afirma que a combinação do uso de

quimioterápicos mielossupressores, como a ciclofosfamida, e fatores de crescimento hematopoéticos há uma melhor mobilização destas células, e reduz o risco de contaminação do produto coletado por células tumorais no caso de transplantes autólogos de sangue periférico mobilizado.

Segundo Okano et al. (2008), há uma correlação positiva entre o incremento no número de neutrófilos e de CD34+ circulantes, no nosso estudo isto foi notado durante as primeiras 48 horas para os grupos 2 e 3 e 72 horas para o G1 sofrendo queda no número destas células, após este período, mesmo com o valor de neutrófilos circulantes aumentando, não apresentando uma correlação positiva como afirmaram os autores em questão. É importante ressaltar que para o G1, o número de células CD34+ circulantes sofreu grande influência da bolsa de medula óssea infundida.

Em humanos, a dose de ciclofosfamida usada para mobilização antes da aplicação do G-CSF é de 3 a 4 g/m², enquanto que a dose comum é de aproximadamente 300mg/m² (BONONI et al., 2009). Em cães, a dose convencional utilizada em protocolos quimioterápicos é de 200 a 300mg/m² em média (DALECK et al., 2008) e a dose mais alta relatada como suportada por cães é de 500mg/m² (FRIMBERGER et al., 2006; CÁPUA et al., 2009), podendo ser este um dos pontos importantes a serem estudados para melhor mobilização de células CD34+ em cães.

6. CONCLUSÕES

A administração de 5 µg/Kg/dia, durante quatro dias, do fator estimulador de colônia granulocítica recombinante humano (rhG-CSF) é suficiente como suporte hematológico para a quimioterapia com ciclofosfamida na dose de 500mg/m², tornando desnecessário o uso do transplante de medula óssea (TMO) para esta dose de quimioterápico.

A dose de 5 µg/Kg/dia do rhG-CSF, durante quatro dias consecutivos, não é suficiente para causar mobilização de células CD34⁺, nem quando utilizado isoladamente (G3), nem em conjunto com a ciclofosfamida na dose de 500 mg/m² (G2), evidenciando a necessidade de novos estudos com novas doses de rhG-CSF, ciclofosfamida e associações entre essas.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Novos estudos com diferentes doses e tempo de aplicação do rhG-CSF, ciclofosfamida e combinações entre estas devem ser realizados no intuito de encontrar a melhor dose para cães para mobilização de células CD34+ da medula óssea para o sangue periférico para posterior realização de transplantes de sangue periférico mobilizado em cães.

8. REFERÊNCIAS⁶

ATKINSON, K. Therapeutic Decision Making in Marrow Transplantation for Non-Hodgkin's Lymphoma. In: _____ **BMT Data Book: A Manual for Bone Marrow and Stem Cell Transplantation**. New York: Cambridge University Press, 1998. cap. 8. p.108-149.

BARRINGTON, G. M. et al. Chronic weight loss in an immunodeficient adult llama. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, United States, n. 211, p. 294-298, 1997.

BENDER, J. G. Defining a therapeutic dose of peripheral blood stem cells. **Journal of Hematotherapy**, New York , v.1, n. 4, p.329-341, 1992.

BENJAMIN, S. Introduction. In: TRELEAVEN, J. & WIERNIK, P. **Color Atlas and Text of Bone Marrow Transplantation**. London: Mosby-Wolfe, 1995. cap. 1, p. 9-17.

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

BONONI, A. et al. Predictive value of hematological and phenotypical parameters on postchemotherapy leukocyte recovery. **Cytometry part B (clinical cytometry)**, United States, v. 76B, p. 328-333, 2009.

BRAVO, L. et al. Serum granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and interleukin-1 (IL-1) concentrations after chemotherapy-induced neutropenia in normal and tumor bearing dogs. **Experimental Hematology**, v.24, n.1, p.11- 17, 1996.

⁶ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR-6023**: Informação e documentação, referências, elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

BROXMEYER, H. E. et al. Human umbilical cord blood as a potencial source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.86, p.3828-3832, 1989.

BRUNO, B. et al. CD34⁺ selected bone marrow grafts are radioprotective and establish mixed chimerism in dogs given high dose total body irradiation. **Transplantation**, Baltimore, v.68, n.3, p.338-344, 1999.

CÁPUA, M. L. B. et al. Autologous bone marrow transplantation in a dog with lymphoma: a clinical study. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.2, p.580-584, 2009a.

CÁPUA, M. L. B. et al. T lymphocyte subsets of the umbilical cord blood of dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 4, p. 791-796, 2009b.

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.

CHAN, A. et al. Impact of colony-stimulating factors to reduce febrile neutropenic events in breast cancer patients receiving docetaxel plus cyclophosphamide chemotherapy. **Support care cancer**. Alemanha, Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/e608n0l238866261/fulltext.pdf>>. Publicado em 17 de março de 2010. Acesso em 14 de abril de 2010.

CHUN, R. et al. Cancer chemotherapy. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. **Small Animal Clinical Oncology**. 3.ed. Philadelphia: Saunders, 2001. Cap.9, p.92-118.

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

COUTO, C. G. Management of complications of cancer chemotherapy. **Veterinary Clinics of North America – Small Animal Practice**, v.20, n.4, p.1037-1053, 1990.

COUTO, C. G.; HAMMER, A. S. Afecções dos linfonodos e baço. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. São Paulo: Manole, 1997. cap.144, p.2667-2689.

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

COUTO, C. G. Oncologia: princípios de tratamento do câncer. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap. 78, p. 864-869.

DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2008, 612p

DE KOK, I. J. et al. Investigation of allogeneic mesenchymal stem cell-based alveolar bone formation: preliminary findings. **Clinical Oral Implants Research**, Copengahen, v. 14, n. 4, p. 481-489, 2003.

DOBSON, J. M. Classification of canine lymphoma: a step forward. **The Veterinary Journal**, London, v.167, p.125-126, 2004.

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

EICHACKER, P. Q. et al. Cardiopulmonary effects of granulocyte colony-stimulating factor in a canine model of bacterial sepsis. **Journal of Applied Physiology**, v.77, n.5, p. 2366-2373, 1994.

ETTINGER, S. N. Principles of treatment for canine lymphoma. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, Philadelphia, v.18, n.2, p.92-97, 2003.

FALDYNA, M. et al. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs – a flow cytometric study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 82, n. 1-2, p. 23-37, 2001.

FAN, T. M. Lymphoma updates. **The Veterinary Clinics of North America – Small Animal Practice**, Philadelphia, v.33, n.3, p.455-471, 2003.

FAN, T. M.; KITCHELL, B. E. An update on diagnosing and treating canine lymphosarcoma. **Veterinary Medicine**, p.58-67, 2002.

FARIA, R. L. et al. Quimioterapia intensiva com suporte hematopoiético autólogo em doentes com carcinoma de mama, **Acta Médica Portuguesa**, v. 17, n. 1, p. 35-41, 2004.

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

FOURNEL-FLEURY, C. et al. Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human Non-Hodgkin's lymphomas. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 117, p.35-39, 1997.

FRÁGUAS, M. S. **Estudo de casos de linfoma canino, ocorridos entre maio de 2003 e dezembro de 2006, junto ao Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da FCAV-UNESP-Jaboticabal**. 2008. 64f. Trabalho de Graduação (Bacharel em

Ciências Biológicas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

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

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.

FULTON, R. et al. Effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoiesis in normal cats. **Experimental Hematology**, Copenhagen, v. 19, p. 759-767, 1991.

GASPER, P. W. The hemopoietic system. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. cap. 11, p. 63-68.

GASPER, P. W & THRALL, M. A. Hematopoietic Stem Cell Transplantation. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. cap. 17, p. 97-101.

GENGOZIAN, N. Identification and isolation of hemopoietic progenitors. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. cap.16. p. 91-96.

GLUCKMAN, E. et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from a HLA-identical sibling. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v.321, p. 1174-1178, 1989.

GODOY, R. F. et al. Quantificação de subpopulações linfocitárias no sangue do cordão umbilical de eqüinos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 734-739, 2007.

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

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

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

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

HARTNETT, B. J. et al. Transplantation of X-linked sever combined immunodeficient dogs with CD34⁺ bone marrow cells. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, Charlottesville, v. 8, n. 4, p. 188-197, 2002.

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

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

HORNING, S. J.; NADEMANEE, A.P. Autologous Hematopoietic Cell Transplantation for Non-Hodgin Lymphoma. In: THOMAS, E.D.; BLUME, K.G.; FORMAN, S.J.

Hematopoietic Cell Transplantation. Malden: Blackwell Science, 1999, cap. 80, p.939-951.

HOROWITZ, M. M. Uses and Growth of Hematopoietic Cell Transplantation. In: THOMAS, E.D.; BLUME, K.G.; FORMAN, S.J. **Hematopoietic Cell Transplantation.** Malden: Blackwell Science, 1999. cap. 2. p. 12-18.

HOSKINS, J. Confirmation needed for lymphoma. **Biological & Agricultural DVM**, v.32, p.16S-20S, 2001.

HUSS, R. et al. Evidence of peripheral blood-derived, plastic-adherent CD34 (-/low) hematopoietic stem cell clones with mesenchymal stem cell characteristics. **Stem Cells**, Dayton, v. 18, n. 4, p. 252-260, 2000.

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

KORBLING, M. et al. Successful engraftment of blood derived normal hematopoietic stem cells in chronic myelogenous leukemia. **Experimental Hematology**, Washington, v. 9, 684-690, 1981.

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

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

KOVACIC, J. C. et al. Stem-cell therapy for myocardial diseases. **Lancet**, London, v. 363, n. 9422, p. 1735-1736, 2004.

LADIGES, W. C. et al. Canine models of bone marrow transplantation. **Laboratory Animal Science**, Memphis, v. 40, n. 1, p. 11-15, 1990.

LANORE, D.; DELPRAT, C. **Quimioterapia Anticancerígena**. São Paulo: Rocca, 2004. cap. 4, p. 53-78.

LU, L. et al. Stem cells from bone marrow, umbilical cord blood and peripheral blood for clinical application: current status and future application. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Boca Raton, v.22, p.61-78, 1996.

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

MACEWEN, E. G.; YOUNG, K. M. Canine lymphoma and lymphoid leukemias. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Small Animal Clinical Oncology**, 2 ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1996. cap. 28 B, p. 451-479.

MAC VITTIE, T. J. et al. Defining the full therapeutic potential of recombinant growth factors in the post radiation-accident environment: the effect of supportive care plus administration of G-CSF. **Health Physics**, v.89, n.5, p.546-555, 2005.

MANGIERI, J. Síndromes paraneoplásicas. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2008. Cap. 14, p. 237-252

MASET, A. L. et al. O G-CSF na terapia do acidente vascular cerebral. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 109-114 , 2009.

MATSUMURA, G. et al. First evidence that bone marrow cells contribute to the construction of tissue-engineered vascular autografts *in vivo*. **Circulation**, Baltimore, v. 108, n. 14, p. 1729-1734, 2003.

MCKENZIE, E. C., et al. Hematologic effects of subcutaneous administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim) in healthy alpacas. **American Journal Veterinary Research**, United States, n. 6, v. 69, p. 770-776, 2008.

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

McSWEENEY, P. A. et al. Characterization of monoclonal antibodies that recognize canine CD34. **Blood**, New York, v.91,n.6, p.1977-86, 1998.

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

MORRISON, W. B. **Lymphoma in Dogs and Cats**. Jackson: Teton NewMedia, 2005. 124p.

MISHU, L. et al. Effects of recombinant canine granulocyte colony-stimulating factor on white blood cell production in clinically normal and neutropenic dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.200, n.12, p.1957-1964, 1992.

MOULTON, J. E. & HARVEY, J. W. Tumors of the lymphoid and hematopoietic tissues. In: MOULTON, J. E. **Tumors in domestic animals**. 3. ed. Berkeley: University of California Press, 1990. p. 231.

NAKAGE, A. P. M. et al. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 966-973, jul-ago 2005.

NAKAGE, A. P. N. & SANTANA, A. E. Células-tronco hematopoéticas em cães. **Ciência Rural**. Santa Maria. v. 36, n. 1, p. 325-29, 2006.

NAKAGE, A. P. N. Et al. Quantificação de células CD34+ no sangue do cordão umbilical de cães. **Ciência Rural**. Santa Maria. V. 39, n. 2, p. 434-441, 2009.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006, p. 1087-1096.

NIEMEYER, G. P. et al. Isolation and characterization of canine hematopoietic progenitor cells. **Experimental Hematology**, Amsterdam, v. 29, n. 6, p. 686-693, 2001.

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

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

OBRADOVICH, J. E. et al. Effect of recombinant canine granulocyte colony-stimulating factor on peripheral blood neutrophil counts in normal cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.7, n.2, p.65-67, 1993.

OGILVIE, G. K.; MOORE, A. S. Management of Specific Diseases: Clinical Briefing: Lymphoma. In:_____ **Managing the Veterinary Cancer Patient**. Trenton: Veterinary Learning Systems, 1995. p. 228-259.

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

OKANO, A. et al. Predictive parameters for granulocyte colony-stimulating factor-induced peripheral blood stem cell mobilization. **Journal of Clinical Apheresis**, United States, n. 23, p. 171-177, 2008.

OWEN, L. **TNM Classification of tumors in domestic animals**. Geneva. World Health Organization, 1980; p. 46-47.

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

RAMOS, R. S., et al. Estudo da prevalência das principais síndromes paraneoplásicas de 14 cães com linfoma- relato de casos. **Veterinária e Zootecnia**, supl. ao v. 15, n. 3, dez., p. 38-39, 2008.

RASKIN, R. E. In: RASKIN R. E.; MEYER, D. J. **Atlas de citologia de cães e gatos**, trad. FAGLIARI, J. J. Sao Paulo: Rocca, p.79-112, 2003.

RENAULT, M. A and LOSORDO, D. W. Therapeutic myocardial angiogenesis. **Microvascular Research**, United States, v. 74, n. 2-3, p. 159-171, 2007.

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

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

RICHMAN, C. M. et al. Purification and characterization of granulocytic progenitor cells (CFU-C) from human peripheral blood using immunologic surface markers. **Blood**, New York, v. 51, n.1, p.1-8, 1978.

RODASK, S.; DE NARDI, A. B. **Quimioterapia Antineoplásica em cães e gatos**. São Paulo: MedVet Livros, 2008.

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

SANDMAIER, B. M. et al. Allogeneic transplants of canine peripheral blood stem cells mobilized by recombinant canine hematopoietic growth factors. **Blood**, New York, v. 87, n. 8, p. 3508-3513, 1996.

SANTANA, A. E. **Benzenismo experimental: desenvolvimento da medula óssea ectópica**. Ribeirão Preto, 1988, Tese (doutorado em fisiologia) Faculdade de medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

SCHÄBITZ, W. R. *et al.* Neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor after focal cerebral ischemia. **Stroke**. v. 34, n. 3, p. 745-751, 2003.

SIENA, S. et al. Circulation of CD34⁺ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Blood**, New York, v. 74, n. 6, p. 1905-1914, 1989.

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

SKIPPER H. E., SCHABEL F. M. J. R.: Tumor cell heterogeneity: implications with respect to classification of cancer by chemotherapeutic effect. **Cancer Treatment Reports**, United States, v. 68, n. 1, p. 43-61, 1984.

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

SOZMEN, M. et al. 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.

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

STORB, R. Allogenic hematopoietic stem cell transplantation – Yesterday, today, and tomorrow. **Experimental Hematology**, Amsterdam, v.31, p.1-10, 2003.

SUEIRO, F. A. R. et al., Canine lymphomas: a morphological and immunohistochemical study of 55 cases, with observations on p53 immunoexpression. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 131, p.207-213, 2004.

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

THOMAS, E. D. Historical Review: a history of haemopoietic cell transplantation. **British Journal of Haematology**, Oxford, v.105, p.330-339, 1999.

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.

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

WAGNER, J. L. & STORB, R. Preclinical large animal models for hematopoietic stem cell transplantation. **Current Opinion in Hematology**, Philadelphia, v.3, n.6, p.410, 1996.

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

VAIL, D. M.; YOUNG, K. M. Canine Lymphoma and Lymphoid Leukemia. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. 4. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. cap. 31. p. 699-769.

APÊNDICES

APÊNDICE A: Valores de referência para hemograma de cães. Jaboticabal, 2010.

PARÂMETRO	VALOR
Hemácias (x10 ⁶ /μL)	5,5 – 8,0
Hemoglobina (g/dL)	12,0 – 18,0
Hematócrito (%)	37 - 55
VCM (fL)	60 - 77
CHCM (g/dL)	31 - 34
Plaquetas (x10 ³ /μL)	180 - 400
Leucócitos (x10 ³ /μL)	0-18
Basófilos (cél/s/μL)	0
Eosinófilos (cél/s/μL)	120 – 1800
Bastonetes (cél/s/μL)	0 - 500
Segmentados (cél/s/μL)	3600 - 13800
Linfócitos (cél/s/μL)	720 - 5400
Monócitos (cél/s/μL)	180 - 1800

Fonte: LPCV - Hospital Veterinário da FCAV/UNESP Jaboticabal.

APÊNDICE B: Valores de referência para contagens totais de leucócitos e fórmulas leucocitárias relativa e absoluta. Jaboticabal, 2010.

PARÂMETROS	VALORES RELATIVOS (%)	VALORES ABSOLUTOS (cél/s/μL)
Leucócitos	**	6000 – 18000
Basófilos	0	0
Eosinófilos	2-10	120 – 1800
Neutrófilos Bastonetes	0-3	0 – 500
Neutrófilos Segmentados	60-77	3600 – 13800
Linfócitos	13-30	720 – 5400
Monócitos	3-10	180 – 1800

Fonte: LPCV - Hospital Veterinário da FCAV/UNESP Jaboticabal.

APÊNDICE C: Protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin (M-W). Jaboticabal, 2010.

Semanas	Vincristina	L-asparaginase	Ciclofosfamid a	Doxorrubicin a	Prednisona
Indução					
1	X	X	-	-	2,0 mg/kg/dia
2	-	-	X	-	1,5 mg/kg/dia
3	X	-	-	-	1,0 mg/kg/dia
4	-	-	-	X	0,5 mg/kg/dia
6	X	-	-	-	-
7	-	-	X	-	-
8	X	-	-	-	-
9	-	-	-	X	-
Manutenção					
11	X	-	-	-	-
13	-	-	X	-	-
15	X	-	-	-	-
17	-	-	-	X	-
19	X	-	-	-	-
21	-	-	X	-	-
23	X	-	-	-	-
25	-	-	-	X	-