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

"TRATAMENTO DO LINFOMA CANINO COM POLIQUIMIOTERAPIA SEGUIDA OU NÃO DE TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE MEDULA ÓSSEA"

Maria Luísa Buffo de Cápua

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
2009

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

"TRATAMENTO DO LINFOMA CANINO COM POLIQUIMIOTERAPIA SEGUIDA OU NÃO DE TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE MEDULA ÓSSEA"

Maria Luísa Buffo de Cápua

Orientador: Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana

Co-orientadora: Prof. Dr[a]. Ana Paula Massae Nakage Canesin

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Fevereiro - 2009

Cápua, Maria Luísa Buffo de
C255t Tratamento do linfoma canino com poliquimioterapia seguida ou não de transplante autólogo de medula óssea / Maria Luísa Buffo de Cápua. – – Jaboticabal, 2009
xxii, 111 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009
Orientador: Aureo Evangelista Santana
Banca examinadora: Carlos Roberto Daleck, Renée Laufer Amorim, Sílvia Ricci Lucas, Márcia Ferreira da Rosa Sobreira
Bibliografia

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

CDU 619:616-006.44:636.7

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

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: TRATAMENTO DO LINFOMA CANINO COM POLIQUIMIOTERAPIA SEGUIDA OU NÃO DE TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE MEDULA ÓSSEA

AUTORA: MARIA LUÍSA BUFFO DE CÁPUA

ORIENTADOR: Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA

Co-Orientador(a): Dra. ANA PAULA MASSAE NAKAGE CANESIN

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em MEDICINA VETERINÁRIA área de CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA pela Comissão Examinadora:

Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA

Dra. RENÉE LAUFER AMORIM

Dra. SÍLVIA REGINA RICCI LUCAS

Dra. MÁRCIA FERREIRA DA ROSA SOBREIRA

Dr. CARLOS ROBERTO DALECK

Data da realização: 30 de janeiro de 2009.

Presidente da Comissão Examinadora
Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARIA LUÍSA BUFFO DE CÁPUA – nasceu em Jaú - SP em 21 de maio de 1980. Filha de Luiz Antônio de Cápua e Carla Maria Buffo de Cápua. Concluiu os cursos primário, ginasial e colegial no "EPEPSG" Pedro Chaves dos Santos em Campo Grande - MS. Graduou-se em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Campus de Jaboticabal, em dezembro de 2002. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica – FAPESP. O título de Mestre em Medicina Veterinária na área de Clínica Médica foi obtido em fevereiro de 2005, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Campus de Jaboticabal, com a dissertação intitulada: "Avaliação hematológica e quantificação de subpopulações linfocitárias no sangue do cordão umbilical de cães", cuja execução teve o apoio financeiro da FAPESP. Ingressou no doutorado em Medicina Veterinária, área de Clínica Médica, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Campus de Jaboticabal em março de 2005.

"Mestre, são plácidas
Todas as horas
Que nós perdemos.
Se no perdê-las,
Qual numa jarra,
Nós pomos flores.

Não há tristezas
Nem alegrias
Na nossa vida.
Assim saibamos,
Sábios incautos,
Não a viver,

Mas decorrê-la,
Tranqüilos, plácidos,
Tendo as crianças
Por nossas mestras,
E os olhos cheios
De Natureza...

À beira-rio,
À beira-estrada,
Conforme calha,
Sempre no mesmo
Leve descanso
De estar vivendo.

O tempo passa,
Não nos diz nada.
Envelhecemos
Saibamos, quase
Maliciosos,
Sentir-nos ir.

Não vale a pena
Fazer um gesto.
Não se resiste
Ao deus atroz
Que os próprios filhos
Devora sempre.

Colhamos flores.
Molhemos leves
As nossas mãos
Nos rios calmos,
Para aprendermos
Calma também.

Girassóis sempre
Fitando o Sol,
Da vida iremos
Tranqüilos, tendo
Nem o remorso
De ter vivido."

"Odes" de Ricardo Reis

Para a minha família

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Aureo Evangelista Santana, pela responsabilidade e apoio ao longo de todos esses anos.

À minha co-orientadora e amiga, Ana Paula Massae Nakage Canesin, que muito contribuiu para minha formação profissional.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

À equipe realizadora deste trabalho: Flávia Eiras Dela Coleta, a primeira a acreditar nesta pesquisa, Aline Vieira Godoy e Mariana Rodrigues Miotto, pelo companheirismo e paciência.

À Sabryna Gouveia Calazans, querida amiga, pela participação tão importante e por compartilhar seus conhecimentos e sabedoria.

A André Escobar, Mariane Fráguas, Lívia Semolin, Simone Crestoni Fernandez, Manuela Cristina Vieira, Carolina Bonduki Sales e Roberto Thiesen pela ajuda sempre que necessária.

Ao professor Carlos Roberto Daleck, pelo apoio e confiança dispensado ao nosso grupo desde o início.

Ao grupo de profissionais do Serviço de Oncologia Veterinária da FCAV-Unesp, Sabryna Gouveia Calazans, Simone Crestoni Fernandez, Thiago Munhoz, Sabrina Costa, João Humberto Teotônio de Castro, Sabrina Marin Rodigheri, pela ajuda incomparável durante todo o processo.

Aos funcionários e residentes do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da FCAV-Unesp, Eugênio de Campos Filho, Matheus Yamazaki Andrade, Andressa Francisca Silva Nogueira, Alessandra Hideko Sumimoto e Letícia Abrahão Anai, que participaram diretamente deste trabalho, sempre com boa vontade e paciência.

Aos funcionários do Hospital Veterinário da FCAV, Unesp, pela paciência e colaboração.

Ao Dr. Mair de Souza Pedro e Dr. Marcus Augusto Mauad por terem nos recebido na Fundação Amaral Carvalho, Jaú – SP, e compartilhado conosco seu

conhecimento tão importante. A experiência de entrar em contato com o vosso trabalho, tão nobre, permanecerá para sempre em nossas mentes e corações.

À Fabiana Rosseto Morais e Patrícia Bonini Palma, da USP de Ribeirão Preto – SP, pelo apoio que se estende desde o mestrado, e por tornarem possível, para o nosso grupo, a utilização da citometria de fluxo.

À Cássia Pacca, diretora clínica do Banco de Sangue Sertãozinho, Sertãozinho – SP, por disponibilizar equipamentos de importância fundamental para esta pesquisa, sempre de forma tão amável e prestativa.

À amiga Elisabeth Moreira dos Santos Schimdt, pela ajuda com as correções da tese, sempre demonstrando seu entusiasmo pela patologia clínica veterinária.

Aos professores Mirela Tinucci Costa, Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, Julieta Roudini Engrácia de Moraes e Antonio Carlos Alessi pelas valiosas considerações por ocasião do exame geral de qualificação.

Aos proprietários dos cães submetidos ao transplante de medula óssea, pela confiança e colaboração.

E, finalmente, aos animais que participaram de forma involuntária deste experimento, e que, apesar disso, mostraram-se sempre felizes em nos encontrar, fazendo jus a mais bela característica da espécie canina.

AUXÍLIO FINANCEIRO

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, processos n° 05/01718-6 e 06/03300-1.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-estar Animal da FCAV-UNESP (protocolo n° 17265-06).

"It should be noted that marrow grafting could not have reached clinical application without animal research, first in inbred rodents and then in outbred species, particularly the dog."

E. Donnall Thomas, Prêmio Nobel, 1990.

SUMÁRIO

Página

Lista de Abreviaturas..... xiv
Lista de Quadros..... xv
Lista de Tabelas..... xvi
Lista de Figuras..... xix

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Linfoma Canino..... 1
2. Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas..... 3
3. Identificação e Quantificação de Células-Tronco Hematopoéticas..... 5
4. Criopreservação e Avaliação da Viabilidade Celular..... 6
5. Objetivos Gerais..... 8
6. Condições de Inclusão das Parcelas no Protocolo Experimental..... 8

CAPÍTULO 2 – ESTUDO DE PARÂMETROS CLÍNICO-LABORATORIAIS DE CÃES COM LINFOMA E AVALIAÇÃO CLÍNICA DURANTE A POLIQUIMIOTERAPIA

Resumo..... 10
Summary..... 11
1. Introdução..... 12
2. Material e Métodos..... 13
  2.1 Parcelas experimentais..... 13
  2.2 Avaliações laboratoriais..... 14
  2.3 Protocolo de quimioterapia..... 15
  2.4 Avaliação das parcelas experimentais..... 15
  2.5 Análise estatística..... 16
3. Resultados e Discussão..... 16
  3.1 Diagnóstico da neoplasia e características gerais dos animais..... 16
  3.2 Alterações clínicas e laboratoriais ao diagnóstico..... 24
  3.3 Evolução clínica e resposta ao tratamento..... 33
4. Conclusões..... 41

CAPÍTULO 3 – TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE MEDULA ÓSSEA EM CÃES COM LINFOMA SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA MIELOSSUPRESSORA

Resumo..... 42
Summary..... 43
1. Introdução..... 44
2. Material e Métodos..... 46
  2.1 Parcelas Experimentais..... 46
  2.2 Avaliação pré-transplante de medula óssea..... 47
  2.3 Transplante autólogo de medula óssea..... 48
    2.3.1 Colheita de medula óssea..... 48
    2.3.2 Processamento das bolsas de medula óssea..... 51
    2.3.3 Contagem total de células nucleadas..... 53
    2.3.4 Quantificação de progenitores hematopoéticos..... 53
    2.3.5 Viabilidade celular..... 55

2.3.6 Congelamento das bolsas de medula óssea..... 56
2.3.7 Regime de condicionamento não-mieloablativo..... 57
2.3.8 Descongelamento das bolsas de medula óssea..... 58
2.3.9. Infusão da medula óssea..... 58
2.3.10 Avaliação das toxicidades decorrentes do TMO autólogo 59
2.3.11 Seguimento clínico dos animais..... 61
2.4 Análise Estatística..... 61
3. Resultados e Discussão..... 61
3.1 Quimioterapia e evolução clínica dos animais antes do TMO..... 61
3.2 Avaliação pré-transplante de medula óssea..... 62
3.3 Transplante autólogo de medula óssea..... 64
3.3.1 Colheita de medula óssea..... 64
3.3.2 Processamento das bolsas de medula óssea..... 64
3.3.3 Regime de condicionamento não-mieloablativo..... 65
3.3.4 Infusão da medula óssea..... 66
3.4 Influência do congelamento..... 66
3.5 Avaliação das toxicidades decorrentes do TMO autólogo..... 73
3.5.1 Toxicidades não-hematológicas..... 73
3.5.2 Toxicidades hematológicas..... 74
3.6 Evolução clínica dos animais após o TMO autólogo..... 82
4. Conclusões..... 86
REFERÊNCIAS..... 87
Apêndices..... 103
A – Protocolo Quimioterápico de Madison-Wisconsin..... 104
B – Valores individuais do hemograma dos cães submetidos ao TMO autólogo.. 105

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT: Alanina aminotransferase
CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média
COP: ciclofosfamida, vincristina e prednisona.
CPDA: Citrato-fosfato-dextrose-adenina.
CTH: Células-tronco hematopoéticas.
DECH: Doença do enxerto contra o hospedeiro.
DMSO: Dimetilsulfóxido.
EDTA: Ácido Etilenodiaminotetracético.
FACS: “Fluorescence Activated Cell Sorter“.
FCAV: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.
FCF: Faculdade de Ciências Farmacêuticas.
FITC: Isotiocianato de fluoresceína.
FSC: “Forward Scatter“.
HES: Hidroxietilstarch.
HV “GLN”: Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”.
ISHAGE: “International Society of Hematotherapy and Graft Engineering”.
LDH: Lactato desidrogenase
OMS: Organização Mundial de Saúde.
PAAF: Punção aspirativa por agulha fina.
PBS: Phosphate-Buffered Saline.
PE: Ficoeritrina.
RPMI: Roswell Park Memorial Institute
SOV: Serviço de Oncologia Veterinária.
SRD: Sem Raça Definida.
SSC: “Side Scatter“.
TCTH: Transplante de células-tronco hematopoéticas.
TMO: Transplante de medula óssea.
VCM: Volume corpuscular médio

LISTA DE QUADROS

Página

Capítulo 2

Quadro 1: Características gerais e evolução clínica de 18 cães com linfoma, atendidos no Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da FCAV/Unesp – Jaboticabal, no período de maio de 2007 a abril de 2008, e tratados com o protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin..... 21

Capítulo 3

Quadro 1: Critérios de Toxicidade (adaptado de Frimberger et al., 2006).. 60

Quadro 2: Características gerais de sete cães no momento do diagnóstico do linfoma e evolução clínica ao longo do tratamento quimioterápico, ou seja, fase de indução da remissão do protocolo de Madison-Wisconsin, antes de serem submetidos ao transplante autólogo de medula óssea..... 63

Quadro 3: Avaliação de toxicidades não-hematológicas em cães previamente submetidos à poliquimioterapia para tratamento de linfoma, em fase de remissão tumoral após transplante autólogo de medula óssea..... 73

Quadro 4: Avaliação da neutropenia em cães, previamente submetidos à poliquimioterapia para tratamento de linfoma, em fase de remissão tumoral após transplante autólogo de medula óssea. 75

Quadro 5: Avaliação da trombocitopenia em cães, previamente submetidos à poliquimioterapia para tratamento de linfoma, em fase de remissão tumoral após transplante autólogo de medula óssea..... 81

LISTA DE TABELAS

Página

Capítulo 2

Tabela 1: Valores da contagem global de hemácias (He), da concentração de Hemoglobina (Hb), do Hematócrito (Ht), do Volume Corpuscular Médio (VCM), da Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) e da contagem global de plaquetas de 18 cães no momento do diagnóstico do linfoma..... 28

Tabela 2: Valores da contagem global de leucócitos (Leu), e das contagens absolutas de basófilos (Bas), eosinófilos (Eos), neutrófilos bastonetes (Bast), neutrófilos segmentados (Seg), linfócitos (Linf) e monócitos (Mon) de 18 cães no momento do diagnóstico do linfoma..... 30

Tabela 3: Valores de creatinina sérica (CS), alanina aminotransferase (ALT), lactato desidrogenase (LDH), proteínas totais (PT), albumina (Alb) e globulinas (Glob) do soro de 18 cães no momento do diagnóstico do linfoma..... 32

Capítulo 3

Tabela 1: Informações individuais relacionadas às etapas de condicionamento e infusão da medula óssea, valores de células nucleadas/kg, células $CD34^+$/kg e células viáveis obtidos das bolsas de medula óssea nos momentos pré e pós congelamento, e evolução clínica após transplante autólogo de medula óssea de sete cães previamente submetidos à poliquimioterapia para tratamento do linfoma..... 68

Tabela 1A: Protoloco Quimioterápico de Madison-Wisconsin (adaptado de RODASKI & DE NARDI, 2006)..... 104

Tabela 1B: Valores da contagem global de hemácias (He), da concentração de Hemoglobina (Hb), do Hematócrito (Ht), do Volume Corpuscular Médio (VCM), da Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), da contagem global de plaquetas, da contagem global de leucócitos (Leu), e das contagens absolutas de basófilos (Bas), eosinófilos (Eos), neutrófilos bastonetes (Bast), neutrófilos segmentados (Seg), linfócitos (Linf) e monócitos (Mon) do Animal 1 nos dias 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 16, 18, 24 e 28 pós transplante autólogo de medula óssea. Administração do Filgrastin®: D+3 a D+7.... 105

Tabela 2B: Valores da contagem global de hemácias (He), da concentração de Hemoglobina (Hb), do Hematócrito (Ht), do Volume Corpuscular Médio (VCM), da Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), da contagem global de plaquetas, da contagem global de leucócitos (Leu), e das contagens absolutas de basófilos (Bas), eosinófilos (Eos),

neutrófilos bastonetes (Bast), neutrófilos segmentados (Seg), linfócitos (Linf) e monócitos (Mon) do Animal 2 nos dias 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ,11, 14, 16 e 28 pós transplante autólogo de medula óssea. Administração do Filgrastin®: D+4 a D+8..... 106

Tabela 3B: Valores da contagem global de hemácias (He), da concentração de Hemoglobina (Hb), do Hematócrito (Ht), do Volume Corpuscular Médio (VCM), da Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), da contagem global de plaquetas, da contagem global de leucócitos (Leu), e das contagens absolutas de basófilos (Bas), eosinófilos (Eos), neutrófilos bastonetes (Bast), neutrófilos segmentados (Seg), linfócitos (Linf) e monócitos (Mon) do Animal 3 nos dias 2, 5, 6, 7, 9, 11, 13, 14, 15 e 28 pós transplante autólogo de medula óssea. Não foi administrado Filgrastin®..... 107

Tabela 4B: Valores da contagem global de hemácias (He), da concentração de Hemoglobina (Hb), do Hematócrito (Ht), do Volume Corpuscular Médio (VCM), da Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), da contagem global de plaquetas, da contagem global de leucócitos (Leu), e das contagens absolutas de basófilos (Bas), eosinófilos (Eos), neutrófilos bastonetes (Bast), neutrófilos segmentados (Seg), linfócitos (Linf) e monócitos (Mon) do Animal 4 nos dias 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 23 e 28 pós transplante autólogo de medula óssea. Administração do Filgrastin®: D+5 a D+9..... 108

Tabela 5B: Valores da contagem global de hemácias (He), da concentração de Hemoglobina (Hb), do Hematócrito (Ht), do Volume Corpuscular Médio (VCM), da Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), da contagem global de plaquetas, da contagem global de leucócitos (Leu), e das contagens absolutas de basófilos (Bas), eosinófilos (Eos), neutrófilos bastonetes (Bast), neutrófilos segmentados (Seg), linfócitos (Linf) e monócitos (Mon) do Animal 5 nos dias 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16 e 28 pós transplante autólogo de medula óssea. Administração do Filgrastin®: D+5 a D+9... 109

Tabela 6B: Valores da contagem global de hemácias (He), da concentração de Hemoglobina (Hb), do Hematócrito (Ht), do Volume Corpuscular Médio (VCM), da Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), da contagem global de plaquetas, da contagem global de leucócitos (Leu), e das contagens absolutas de basófilos (Bas), eosinófilos (Eos), neutrófilos bastonetes (Bast), neutrófilos segmentados (Seg), linfócitos (Linf) e monócitos (Mon) do Animal 6 nos dias 5, 6, 7, 8, 9, 13, 14, 15, 16 e 28 pós transplante autólogo de

medula óssea. Administração do Filgrastin®: D+5 a D+9..... 110

Tabela 7B: Valores da contagem global de hemácias (He), da concentração de Hemoglobina (Hb), do Hematócrito (Ht), do Volume Corpuscular Médio (VCM), da Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), da contagem global de plaquetas, da contagem global de leucócitos (Leu), e das contagens absolutas de basófilos (Bas), eosinófilos (Eos), neutrófilos bastonetes (Bast), neutrófilos segmentados (Seg), linfócitos (Linf) e monócitos (Mon) do Animal 7 nos dias 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, e 28 pós transplante autólogo de medula óssea. Não foi administrado Filgrastin®..... 111

LISTA DE FIGURAS

Página

Capítulo 2

Figura 1: (A) Fotomicrografia de linfoma cutâneo. Aspirado de nódulo cutâneo de cão (Animal 18). Linfócitos médios a grandes, revelando relação núcleo:citoplasma variável, com padrão de cromatina condensado a descondensado, além de localização nuclear excêntrica. Rosenfeld modificado x 1000. (B) Aspecto histológico de nódulo cutâneo do mesmo animal, com áreas de hemorragia (seta). HE x 400..... 17

Figura 2: Distribuição de raças de 18 cães com linfoma, atendidos no Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da FCAV/Unesp – Jaboticabal, no período de maio de 2007 a abril de 2008..... 18

Figura 3: Distribuição anatômica dos linfomas de 18 cães, atendidos no Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da FCAV/Unesp – Jaboticabal, no período de maio de 2007 a abril de 2008..... 19

Figura 4: Estágios clínicos de 18 cães com linfoma, atendidos no Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da FCAV/Unesp – Jaboticabal, no período de maio de 2007 a abril de 2008..... 20

Figura 5: Sub-estágios clínicos de 18 cães com linfoma, atendidos no Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da FCAV/Unesp – Jaboticabal, no período de maio de 2007 a abril de 2008..... 20

Figura 6: Sinais clínicos observados em 12 cães com linfoma, atendidos no Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da FCAV/Unesp – Jaboticabal, no período de maio de 2007 a abril de 2008, e classificados no sub-estágio "b" de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OWEN, 1980)..... 26

Figura 7: Alterações hematológicas observadas nos hemogramas de 18 cães com linfoma, atendidos no Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da FCAV/Unesp – Jaboticabal, no período de maio de 2007 a abril de 2008, por ocasião do diagnóstico da neoplasia..... 26

Figura 8: Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para 18 cães com linfoma, atendidos no Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da FCAV/Unesp – Jaboticabal, e tratados com o protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin. Considerou-se para a confecção da curva, um tempo de 180 dias de seguimento clínico dos animais após o início da quimioterapia..... 35

Figura 9: Curvas de sobrevida de 18 cães com linfoma, atendidos no Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da FCAV/Unesp – Jaboticabal, tratados com o protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin, nos sub-estágios "a" (n=6) e "b" (n=12) (a, sub-estágio a; b, sub-estágio b). Considerou-se para a confecção da curva, um tempo de 180 dias de seguimento clínico dos animais após o início da quimioterapia (p=0,54)..... 37

Figura 10: Representação gráfica da correlação entre o valor do hematócrito (%) e o tempo de sobrevida (dias) para 13 cães com linfoma (r=0,63 e p=0,001). Considerou-se, para a confecção do gráfico, 180 dias de seguimento clínico dos animais após o início da quimioterapia..... 38

Figura 11: Representação gráfica da correlação entre o valor sérico da enzima lactato desidrogenase (U/L) e o tempo de sobrevida (dias) para 12 cães com linfoma (r=0,09 e p=0,32). Considerou-se para a confecção do gráfico um tempo de 180 dias de seguimento clínico dos animais após o início da quimioterapia..... 39

Capítulo 3

Figura 1: Representação esquemática do protocolo do transplante autólogo de medula óssea utilizado para cães previamente submetidos à poliquimioterapia para tratamento do linfoma. Dia -4 (D-4): colheita de medula óssea autóloga (10 mL/kg). Dia -2 (D-2): Condicionamento (administração de ciclofosfamida por via intravenosa). Dia 0 (D0): infusão da medula óssea por via intravenosa..... 48

Figura 2: Colheita de medula óssea da crista ilíaca de cão com agulha de Rosenthal e seringa de 20mL..... 50

Figura 3: Preenchimento da bolsa de sangue com medula óssea canina, utilizando agulha hipodérmica 40x12 e seringa de 60mL..... 50

Figura 4: Depleção de plasma da bolsa de sangue contendo medula óssea canina..... 52

Figura 5: Quantificação de células-tronco hematopoéticas $CD34^+$ em amostra de medula óssea de cão (Animal 5), pela técnica de citometria de fluxo, utilizando-se o protocolo ISHAGE. Gráfico 1: CD45 FITC/SSC - P1: Exclusão de eventos CD45 negativos e células mortas. Gráfico 2: CD34 PE/SSC - P2: Inclusão de células CD34 positivas que se encontram na região P1. Gráfico 3: CD45 FITC/SSC das células $CD34^+$ - P3: Inclui as células com características de baixa granularidade e baixa a intermediária fluorescência para CD45. Gráfico 4: FSC/SSC - P5: Inclusão de todos os eventos que possuem características de células progenitoras com base nos gráficos anteriores. SSC: *Side-angle light scatter* e FSC: *Forward-angle light scatter* identificam características de granularidade e tamanho celular, respectivamente..... 55

Figura 6: Avaliação da viabilidade celular pela técnica de citometria de fluxo em amostra de medula óssea de cão para transplante autólogo. O Gráfico 1 refere-se ao tubo controle. Gráfico 2: Distribuição de fluorescências Anexina V-FITC (A) *versus* Iodeto de Propídeo (PI). Q1 – Células mortas (A^-PI^+). Q2 – Células em estágio de necrose (A^+PI^+). Q3 – Células não

apoptóticas ou viáveis (A^-PI^-). Q4 – Células em estágios iniciais de apoptose (A^+PI^-)..... 56
Figura 7: Quantidade de células nucleadas $x10^8$/kg de peso do paciente, nos momentos pré e pós-congelamento das bolsas de medula óssea de cinco cães em fase de remissão tumoral do linfoma, submetidos ao transplante autológo (p=0,05)..... 67
Figura 8: Quantidade de células-tronco hematopoéticas $CD34^+$ $x10^6$/kg de peso do paciente, nos momentos pré e pós-congelamento das bolsas de medula óssea de cinco cães em fase de remissão tumoral do linfoma, submetidos ao transplante autológo (p=0,28)..... 69
Figura 9: Viabilidade celular (%) de amostras obtidas das bolsas de medula óssea de cinco cães em fase de remissão tumoral do linfoma, submetidos ao transplante autológo, nos momentos pré e pós-congelamento (p=0,06)..... 71
Figura 10: Contagem global de leucócitos e neutrófilos segmentados após transplante autólogo de medula óssea em cães previamente submetidos à poliquimioterapia para tratamento do linfoma. A: Animal 1. Administração do Filgrastin®: D+3 a D+7. B: Animal 2. Administração do Filgrastin®: D+4 a D+8. D+: dias pós-transplante de medula óssea..... 76
Figura 11: Contagem global de leucócitos e neutrófilos segmentados após transplante autólogo de medula óssea em cães previamente submetidos à poliquimioterapia para tratamento do linfoma. A: Animal 4. B: Animal 5. C: Animal 6. Administração do Filgrastin® para os três cães: D+5 a D+9. D+: dias pós-transplante de medula óssea..... 77
Figura 12: Contagem global de leucócitos e neutrófilos segmentados após transplante autólogo de medula óssea em cães previamente submetidos à poliquimioterapia para tratamento do linfoma. A: Animal 3. B: Animal 7. Não foi administrado Filgrastin® para ambos os cães. D+: dias pós-transplante de medula óssea..... 78
Figura 13: Contagem global de plaquetas após transplante autólogo de medula óssea de cão previamente submetido à poliquimioterapia para tratamento do linfoma. Animal 1. D+: dias pós-transplante de medula óssea..... 80
Figura 14: Contagem global de plaquetas após transplante autólogo de medula óssea de cão previamente submetido à poliquimioterapia para tratamento do linfoma. Animal 2. D+: dias pós-transplante de medula óssea..... 80
Figura 15: Contagem global de plaquetas após transplante autólogo de medula óssea de cão previamente submetido à poliquimioterapia para tratamento do linfoma. Animal 5. D+: dias pós-transplante de medula óssea..... 81

Figura 16: Contagem global de plaquetas após transplante autólogo de medula óssea de cão previamente submetido à poliquimioterapia para tratamento do linfoma. Animal 7. D+: dias pós-transplante de medula óssea..... 81
Figura 17: Contagem global de plaquetas após transplante autólogo de medula óssea de cão previamente submetido à poliquimioterapia para tratamento do linfoma. Animal 4. D+: dias pós-transplante de medula óssea..... 82

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Linfoma Canino

O linfoma é um grupo diverso de neoplasias que tem origem nas células linforeticulares, de modo que surge comumente nos tecidos linfóides, como linfonodos, baço e medula óssea, mas pode surgir em quase todos os tecidos do corpo (VAIL & YOUNG, 2007).

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

O diagnóstico do linfoma deve ser firmado com base em exame físico, hemograma, perfil bioquímico sérico e urinálise. Para a confirmação do diagnóstico é necessária a avaliação histopatológica ou citológica dos tecidos acometidos (ETTINGER, 2003; MORRISON, 2005; VAIL & YOUNG, 2007).

A classificação do linfoma canino 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 os de alto grau (GREENLEE et al., 1990; FOURNEL-FLEURY et al., 1997; SUEIRO et al., 2004).

Com relação à localização anatômica, o linfoma canino pode apresentar-se nas seguintes formas, em ordem decrescente de prevalência: multicêntrica, mediastinal, alimentar, cutânea e extranodal (VAIL & YOUNG, 2007). Os estágios clínicos dos linfomas de animais domésticos, estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde

(OMS), são I (um linfonodo), II (múltiplos linfonodos regionais), III (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 estágios I a IV). Os sub-estágios são “a” (sem sinais clínicos da doença) e “b” (com sinais clínicos de linfoma) (OWEN, 1980).

O prognóstico para cães com linfoma relaciona-se principalmente à imunofenotipagem e sub-estágio estabelecido pela OMS. Cães com tumores derivados de células T (PONCE et al., 2004) ou que apresentem sinais clínicos de linfoma (sub-estágio “b”) (GREENLEE et al., 1990) têm prognóstico reservado.

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

O protocolo quimioterápico padrão para o tratamento de linfoma no cão é a associação de ciclofosfamida, vincristina e prednisona - COP (COTTER & GOLDSTEIN, 1993). Aproximadamente 75% dos casos de linfoma 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).

Recentes avanços 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 doxorrubicina 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 mielotoxicidade dos agentes antineoplásicos é um efeito adverso inespecífico freqüente e grave. É um fator limitante da quimioterapia, podendo comprometê-la de

maneira transitória ou definitiva, uma vez que a diminuição da dose pode prejudicar a eficácia do tratamento. A neutropenia é a mais freqüente e mais grave das citopenias decorrentes da quimioterapia. A ciclofosfamida é um anti-neoplásico 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. Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas

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

Em 1949, estudos envolvendo células da medula óssea e do baço de camundongos letalmente irradiados deram início a uma série de experimentos que levariam à aplicação clínica dos transplantes de células-tronco hematopoéticas (TCTH) (BENJAMIN, 1995; THOMAS, 1999). Na década seguinte, tentativas de tratamento de leucemias humanas 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 levariam 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 sangue do cordão umbilical com sucesso (GLUCKMAN et al., 1989). Dessa forma, os TCTH podem ser de medula óssea, sangue periférico ou sangue de cordão umbilical.

Os TCTH diferem de transplantes de órgãos sólidos principalmente porque não há necessidade de cirurgia, mas apenas a injeção intravenosa de células, que por sua vez vão se desenvolver em ambientes especializados, nos quais se diferenciam, proliferam e amadurecem (GASPER & THRALL, 2000).

O termo transplante alogênico refere-se ao transplante de medula óssea ou sangue periférico para um receptor da mesma espécie, porém geneticamente diferente do doador, exceto quando se trata de gêmeos univitelinos. Neste caso o transplante denomina-se singênico (BENJAMIN, 1995). Nos transplantes alogênicos, as células transplantadas carreiam antígenos que, uma vez não reconhecidos pelo receptor, poderão ilicitar a chamada doença do enxerto contra o hospedeiro - DECH (GASPER & THRALL, 2000). O transplante autólogo envolve a remoção temporária de CTH do próprio receptor, sejam elas oriundas da medula óssea ou sangue periférico, seguida pela mielossupressão, induzida por quimioterapia ou radioterapia, e reinfusão das CTH (GASPER & THRALL, 2000). Nesse caso, não há DECH, pois o material transplantado deriva do próprio receptor (BENJAMIN, 1995).

O transplante de células-tronco é capaz de estimular a reconstituição hematopoiética devido à habilidade de auto-renovação e diferenciação das CTH, de modo que vem sendo crescentemente utilizado após quimioterapia mieloablativa em doenças malignas (LU et al., 1996).

O TCTH é indicado no tratamento de muitas doenças. Em algumas delas, o transplante corrige defeitos de produção medular ou função imunológica, congênitos ou adquiridos. Em outras, ele restaura a hematopoese após terapia citotóxica mieloablativa (HOROWITZ, 1999).

A terapia mieloablativa seguida de TCTH 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 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, é estabelecida com base na classificação histológica da doença e na resposta a tratamentos anteriores. Esse procedimento não é indicado 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 do sistema nervoso central (ATKINSON, 1998).

Historicamente, o cão tem sido modelo valioso para o estudo do transplante de medula óssea (TMO) em humanos, sendo as descobertas no campo da medicina canina diretamente transferidas para protocolos de TMO na clínica humana (LADIGES et al., 1990).

Assim, modelos experimentais em cães têm propiciado a obtenção de informações importantes no transplante autólogo e alogênico de progenitores hematopoéticos, permitindo a transposição destes achados experimentais para os seres 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).

3. Identificação e Quantificação de Células-Tronco Hematopoéticas

As CTH podem ser identificadas e quantificadas pela técnica de citometria de fluxo. O citômetro de fluxo é um separador de células ativado por imunofluorescência (FACS – “Fluorescence Activated Cell Sorter”) que promove a identificação e quantificação de células com base em seu tamanho (“Forward scatter” – FSC), granularidade (‘Side Scatter” – SSC) e intensidade de fluorescência (ROITT et al.,

2003). A técnica de citometria de fluxo contribuiu para uma melhor compreensão das CTH através de sofisticada avaliação de tais células, com o auxílio de anticorpos específicos e reagentes fluorescentes (KEREN, 1994).

As células progenitoras hematopoéticas derivadas da medula óssea, do fígado fetal, do cordão umbilical e do sangue periférico são identificadas por expressarem um marcador celular de superfície caracterizado como uma proteoglicana CD34 (HUSS et al., 2000).

O protocolo ISHAGE ("International Society of Hematotherapy and Graft Engineering") foi proposto pelo Comitê de Enumeração de Células-tronco em 1995, para quantificação de células $CD34^{+}$, com base no trabalho desenvolvido por Sutherland et al. (1996). De acordo com o supracitado autor, trata-se de um método simples, rápido, sensível à técnica de citometria de fluxo e adequado à aplicação clínica.

Os progenitores hematopoéticos de cães podem ser identificados com anticorpos monoclonais conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE). O anticorpo monoclonal 1H6 reage com o CD34, uma glicoproteína com peso molecular de 110kDa presente na superfície das células progenitoras hematopoéticas (McSWEENEY et al., 1998).

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). Isso propiciou a identificação e quantificação das células-tronco hematopoéticas 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).

4. Criopreservação e Avaliação da Viabilidade Celular

De acordo com Lu et al. (1996) a medula óssea pode ser criopreservada antes da quimioterapia e utilizada para recuperação hematopoética.

As células presentes na bolsa de medula óssea permanecem viáveis por apenas dois a três dias quando estocadas a temperaturas acima do congelamento. A estocagem das bolsas de medula óssea em freezer mecânico a -80°C é aceitável para curtos períodos de tempo. A estocagem em longo prazo requer o uso do nitrogênio líquido, que mantém as células viáveis por cerca de três anos (PATTERSON, 1995).

A dose mínima de células CD34 positivas para transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (CTH) baseia-se no número de células (>2 x 10^6 células $CD34^+$/kg de peso) obtidas antes da criopreservação (BENDER et al., 1992; ATKINSON, 1998). Entretanto, o processamento e criopreservação das amostras reduzem significativamente o número de células $CD34^+$ viáveis disponíveis para reinfusão (ALLAN et al., 2002; BOER et al., 2002), de modo que deve haver um número de CTH viáveis após o descongelamento que seja crucial para o sucesso do transplante autólogo (YANG et al, 2003). O número de células $CD34^+$, viáveis, reinfundidas guarda relação com a velocidade de enxertamento hematopoético no transplante autólogo (ALLAN et al., 2002; LEMOLI et al., 2003).

O ensaio citofluorométrico da integridade da membrana de células nucleadas é usado para avaliar a viabilidade celular em enxertos de células progenitoras hematopoéticas, antes e após a criopreservação. O corante iodeto de propídeo penetra nas células que apresentam danos membranários e se liga ao DNA e RNA (YANG et al, 2003). Entretanto, esse método de avaliação da permeabilidade celular não é capaz de mensurar o processo de apoptose celular (SCHIMT et al., 1994).

A apoptose, ou morte celular programada, tem papel importante na homeostase celular de progenitores hematopoéticos diferenciados (IWAI et al., 1994). Anthony et al. (1998) descreveram uma técnica simples para quantificar apoptose de células progenitoras $CD34^+$, por intermédio da citometria de fluxo, utilizando-se da anexina V conjugada com FITC. Esta técnica permite identificar populações de células progenitoras que estão sofrendo apoptose. A anexina V-FITC se liga à molécula de

fosfatidilserina presente na membrana de células apoptóticas. Células viáveis possuem simetria normal de fosfolipídeos de membrana e não se ligam à anexina V (ANTHONY et al., 1998).

A quantificação de células que se ligam a anexina V-FITC adiciona um fator qualitativo na análise de células $CD34^+$ pela citometria de fluxo (ANTHONY et al., 1998).

5. Objetivos Gerais

Avaliar o potencial terapêutico do protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin, seguido ou não de transplante autólogo de medula óssea, em cães com linfoma. Pretendeu-se também avaliar o efeito da criopreservação das bolsas de medula óssea na viabilidade e quantidade das células a serem infundidas nos pacientes submetidos ao transplante autólogo de medula óssea.

6. Condições de Inclusão das Parcelas no Protocolo Experimental

Incluíram-se no presente protocolo experimental todos os cães atendidos no Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" (HV "GLN") da FCAV-UNESP-Jaboticabal, no período de maio de 2007 a maio de 2008, com diagnóstico de linfoma firmado por exame citopatológico e/ou histopatológico, e que iniciaram quimioterapia com o protocolo de Madison-Wisconsin. Os animais que, após um mínimo de nove semanas de quimioterapia, apresentaram-se em remissão completa ou parcial, clinicamente estáveis e sem sinais de outras doenças graves foram considerados candidatos ao TMO. Por outro lado, os animais que vieram a óbito antes das mencionadas nove semanas, ou apresentaram outras doenças concomitantes, não foram submetidos ao TMO, mas foram incluídos no estudo. Dessa forma, vale ressaltar que a distribuição dos animais nos dois tratamentos (quimioterapia e quimioterapia mais TMO) não foi aleatória.

Portanto, julgou-se prudente a apresentação dos resultados sob a forma de capítulos, especialmente pelo fato de haver uma complementaridade nos grupos de animais estudados. O segundo capítulo refere-se ao estudo das características anatomo-clínicas e laboratoriais, assim como à evolução clínica de cães com linfoma, atendidos junto ao HV ”GLN” da FCAV-UNESP, tratados com o protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin. O terceiro capítulo refere-se aos cães com linfoma, atendidos igualmente junto ao HV ”GLN” da FCAV-UNESP, submetidos ao protocolo de quimioterapia supracitado seguido de TMO autólogo, com o fito de se avaliar a viabilidade do referido procedimento, tanto nos aspectos técnicos quanto de toxicidades, bem como da reconstituição da celularidade sangüínea e sobrevida dos pacientes.

CAPÍTULO 2 - ESTUDO DE PARÂMETROS CLÍNICO-LABORATORIAIS DE CÃES COM LINFOMA E AVALIAÇÃO CLÍNICA DURANTE A POLIQUIMIOTERAPIA

RESUMO - Dezoito cães com diagnóstico citopatológico e/ou histopatológico de linfoma foram avaliados quanto às alterações clínicas e clinico-patológicas. Os animais foram submetidos ao protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin e avaliados clinicamente a cada sessão de quimioterapia quanto à sua resposta ao tratamento. Cinqüenta por cento dos cães apresentaram a forma multicêntrica da doença e 33% a forma cutânea. A manifestação clínica mais comum foi a linfadenomegalia superficial, acompanhada dos sinais sistêmicos de hiporexia, apatia e perda de peso. As principais alterações hematólogicas foram anemia normocítica normocrômica, trombocitopenia e leucocitose, associadas às síndromes paraneoplásicas. Elevações nas atividades séricas de lactato desidrogenase foram observadas em 58% dos cães e a hiperproteinemia ocorreu em 38% dos animais, sendo atribuída principalmente ao aumento de globulinas séricas. Vinte e sete por cento dos animais atingiram remissão completa da doença e 33% atingiram sobrevida de seis meses. Houve correlação positiva entre o valor do hematócrito e o tempo de sobrevida para os cães que morreram, entretanto, o mesmo não foi observado para o valor de lactato desidrogenase. Sugere-se a ocorrência da síndrome da lise tumoral aguda para sete animais dado o intervalo de tempo observado entre a quimioterapia e o óbito e o avançado estágio da doença. A ausência de resposta às tentativas de reindução da remissão, observada em quatro cães, pode estar relacionada com o fenômeno de resistência tumoral aos agentes quimioterápicos.

Palavras-chave: bioquímica sérica, cão, hemograma, linfoma, quimioterapia

CLINICAL AND LABORATORIAL FINDINGS IN DOGS WITH LYMPHOMA AND CLINICAL EVALUATION DURING COMBINATION CHEMOTHERAPY

SUMMARY - Clinical and laboratorial evaluation were performed in eighteen dogs with cytopathological and/or histopathological lymphoma diagnosis. Animals underwent the Madison-Wisconsin chemotherapy protocol and were evaluated clinically at each session performed weekly. The multicentric and cutaneous forms of the disease were observed in 50% and 33% of the dogs, respectively. The most common clinical sign was superficial lymphadenomegaly, combined to systemic signs of hyporexia, apathy and weight loss. The main hematological changes were anemia, thrombocytopenia and leukocytosis, associated with paraneoplastic syndromes. Elevated serum activity of lactate dehydrogenase was observed in 58% of the dogs and hyperproteinemia in 38%, attributed to serum globulin increase. Complete remission was achieved in 27% of the animals and the six-month survival rate was 33%. There was a positive correlation between the hematocrit and survival time in dogs that died, however, there was no correlation between lactate dehydrogenase and survival time. The time interval between chemotherapy and death and the advanced stage of the disease in seven animals suggest the occurrence of acute tumor lysis syndrome. The absence of response to attempts of remission reinduction in four animals may be related to the drug tumoral resistance effect.

Keywords: serum biochemistry, dog, complete blood count, lymphoma, chemotherapy

1. Introdução

O linfoma perfaz de sete a 24% de todas as neoplasias caninas e corresponde a 83% das doenças linfoproliferativas (VAIL & YOUNG, 2007). A elevada incidência da doença na população canina mundial certamente contribui para o fato de que o linfoma é a neoplasia mais comumente tratada em cães, havendo pelo menos 38 protocolos de quimioterapia publicados, sejam eles de agentes únicos ou múltiplos (HOSKINS, 2001).

Os estágios clínicos de animais domésticos acometidos por linfoma, estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), incluem I (acometimento de um linfonodo), II (envolvimento de múltiplos linfonodos regionais), III (linfadenopatia generalizada), IV (envolvimento de 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 estágios I a IV). Os sub-estágios são “a” (sem sinais clínicos da doença) e “b” (com sinais clínicos de linfoma) (OWEN, 1980).

Os sinais clínicos do linfoma canino são variados e dependem da classificação anatômica e da extensão da doença (MORRISON, 2005; VAIL & YOUNG, 2007). Na forma multicêntrica, a de maior ocorrência, os sinais mais comuns são de linfadenomegalia, generalizada ou limitada a apenas um ou mais linfonodos periféricos (ETTINGER, 2003). Sinais inespecíficos como hiporexia, perda de peso, vômito, diarréia, poliúria, polidpsia e febre também podem ocorrer, e relacionam-se com o sub-estágio “b” da OMS (ROSENTHAL, 1990).

As anormalidades clínico-laboratoriais encontradas em cães com linfoma são igualmente variadas (MORRISON, 2005). Anemia é a alteração hematológica mais comum nesses pacientes (VAIL & YOUNG, 2007), sendo, na maioria das vezes, normocítica normocrômica (KRUTH & CARTER, 1990). A trombocitopenia também é um achado comum, podendo ocorrer em 30 a 50% dos casos (ETTINGER, 2003; VAIL & YOUNG, 2007). Já as contagens leucocitárias podem estar aumentadas ou diminuídas (MORRISON, 2005).

Anormalidades bioquímicas séricas geralmente refletem o sítio anatômico envolvido pelo linfoma (VAIL & YOUNG, 2007). Dessa forma, o aumento de enzimas

hepáticas pode ser decorrente da infiltração de células linfomatosas no fígado (ETTINGER, 2003; CARDOSO et al., 2004b; VAIL & YOUNG, 2007) assim como o envolvimento renal pode levar ao aumento das concentrações séricas de uréia e creatinina (VAIL & YOUNG, 2007). Ainda com relação à azotemia, é possível que sua causa seja pré-renal, comum em pacientes debilitados com câncer (KRUTH & CARTER, 1990). Hiperglobulinemia pode ser observada no perfil bioquímico de cães com linfoma, e geralmente decorre de hipergamaglobulinemia (CARDOSO et al., 2004b). Seres humanos com doenças malignas podem apresentar aumento da atividade sérica da enzima lactato desidrogenase (LDH) (MADEWELL, 1997), que é considerada um fator prognóstico desfavorável para os linfomas Não-Hodgkin's (CHAU et al., 2003). Entretanto, para os animais, o aumento da concentração dessa enzima é considerado inespecífico (MADEWELL, 1997).

A quimioterapia convencional para o linfoma canino é capaz de induzir remissão completa em 60 a 90% dos animais, com tempo médio de sobrevida de seis a 12 meses, dependendo do protocolo utilizado (VAIL & YOUNG, 2007). O protocolo de Madison-Wisconsin, uma combinação dos fármacos L-asparaginase, vincristina, prednisona, ciclofosfamida e doxorrubicina, tornou-se popular no tratamento do linfoma canino e, acredita-se que seja capaz de promover a mais longa remissão e tempo de sobrevivência para cães com linfoma (MORRISON, 2005).

Neste ensaio objetivou-se estudar as características clínicas e laboratoriais de cães no momento do diagnóstico do linfoma assim como a evolução clínica dos mesmos ao longo da utilização do protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin.

2. Material e Métodos

2.1 Parcelas experimentais

As parcelas experimentais deste estudo englobaram 18 cães, atendidos junto ao Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da FCAV-UNESP/Jaboticabal, no período de maio de 2007 a abril de 2008. Os animais foram selecionados com base nos

resultados de laudos de punções aspirativas com agulha fina (PAAF), elaborados por pessoal qualificado junto ao Serviço de Patologia Clínica do supracitado Hospital Veterinário, ou de laudos histopatológicos provenientes do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV/UNESP, ou de laboratórios particulares de assistência clínico-patológica. Os animais com diagnóstico confirmado de linfoma foram encaminhados ao Serviço de Oncologia Veterinária (SOV) do Hospital Veterinário da FCAV/UNESP para início do tratamento da neoplasia. Aqueles cães cujos proprietários não aceitaram o tratamento, ou aqueles encaminhados para terapia em outros locais foram excluídos da pesquisa.

Definiu-se a classificação anatômica do linfoma, bem como seu estágio clínico, com base nos achados clínicos e clínico-patológicos, incluindo, hemograma, perfil bioquímico sérico, mielograma e urinálise; além de exames radiográficos do tórax e ultra-sonográficos do abdômen, sempre que clinicamente indicados. Com relação ao estágio e sub-estágio clínico, considerou-se a classificação preconizada pela OMS (OWEN, 1980).

2.2 Avaliações laboratoriais

O quadro hematológico periférico dos cães foi avaliado no momento do diagnóstico do linfoma por meio da realização de hemogramas com o auxílio de um contador automático de células ABC Vet (HORIBA ABX, São Paulo, SP, Brasil) e esfregaços sanguíneos corados com o corante hematológico de Rosenfeld modificado. O quadro hematológico central foi avaliado após punção biópsia aspirativa da medula óssea, seguida da confecção de preparações citoscópicas, bem como de sua observação criteriosa com o intuito de verificar a possível presença de células linfomatosas na referida medula óssea.

Com relação ao perfil bioquímico, também no momento do diagnóstico, foram determinados os teores séricos de creatinina (método de Basques-Lustosa), proteínas totais (método do biureto), albumina (método do verde de bromocresol) e as atividades séricas das enzimas alanina aminotransferase - ALT (método cinético ultravioleta), e

lactato desidrogenase – LDH (método cinético ultravioleta). Os testes foram realizados utilizando-se conjuntos de reagentes de uso comercial LABTEST®, e as leituras das amostras foram conduzidas em espectrofotômetro LABQUEST®. A urinálise foi realizada de acordo com a rotina de análise de urina praticada junto ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária "Prof. Dr. Joaquim Ferreira Neto", do HV/FCAV/Unesp, Campus de Jaboticabal.

2.3 Protocolo de quimioterapia

Todos os animais foram tratados de acordo com o protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin, que inclui sulfato de vincristina (0,75 mg/m^2, via intravenosa), L-asparaginase (400 UI/kg, via intramuscular), ciclofosfamida (250 mg/m^2, via oral), doxorrubicina (30 mg/m^2, via intravenosa) e prednisona, administrada no primeiro mês de tratamento, em doses semanais decrescentes (via oral) (GARRETT et al., 2002). O protocolo em questão utiliza os supracitados fármacos, que se repetem ao longo de 25 semanas, com exceção da L-Asparaginase que é administrada apenas na primeira semana. A fase de indução da remissão consiste nas primeiras nove semanas, havendo um intervalo na quinta semana. Após novo intervalo na décima semana, tem início a fase de manutenção da remissão, quando o tratamento passa a ser quinzenal, até a 25^a semana (Ver Apêndice 1).

2.4 Avaliação das parcelas experimentais

Os cães foram avaliados clinicamente a cada sessão de quimioterapia e, enquadrados, conforme sua resposta ao tratamento em animais com remissão completa (desaparecimento da doença clínica), remissão parcial (diminuição maior ou igual a 50% do tamanho do tumor sem novos focos), doença estável (diminuição ou aumento menor que 50% do tamanho do tumor) e doença progressiva (aumento em pelo menos 50% do tamanho do tumor, ou o aparecimento de novos focos) (DHALIWAL et al., 2003). A duração da primeira remissão foi considerada como o tempo decorrido

entre o desaparecimento da doença clínica e o momento da recidiva, e o tempo de sobrevida como o tempo decorrido entre o diagnóstico do linfoma e o óbito do animal.

2.5 Análise estatística

Para avaliação da sobrevida dos animais, confeccionou-se uma curva de sobrevivência pelo gráfico de Kaplan-Meier, utilizando-se o programa estatístico BioEstat 3.0 (2003). Realizou-se a comparação da sobrevida dos cães que se apresentavam no sub-estágio “a” com aqueles no sub-estágio “b” por meio do teste de Log-rank, utilizando-se o software GraphPad Instat®. Analisaram-se as correlações entre as variáveis tempo de sobrevida (em dias) e valor do hematócrito (%), e tempo de sobrevida (em dias) e valor de LDH (U/L) obtidos no momento do diagnóstico da neoplasia, por meio da correlação linear de Pearson (r), utilizando-se, para tanto, o software GraphPad Instat®. Os demais resultados (método de diagnóstico, sexo, idade, raça, tempo de evolução da doença, classificação anatômica, estágio e sub-estágio clínico e parâmetros laboratoriais) foram analisados pela estatística descritiva básica.

3. Resultados e Discussão

3.1 Diagnóstico da neoplasia e características gerais dos animais

A técnica de PAAF foi conclusiva com relação ao diagnóstico do linfoma em 15 casos (83,34%). Para um deles (Animal 18), foi realizada posterior análise histopatológica (Figura 1), que reafirmou o diagnóstico. Em dois casos (11,1%) foi necessária a confirmação pelo exame histopatológico, já que não foi possível pela citologia confirmar os critérios de malignidade celular, permanecendo apenas a suspeita da neoplasia. Para um animal (Animal 14) foi realizado apenas exame histopatológico após esplenectomia.

A PAAF é uma ferramenta diagnóstica que tem como principais vantagens rapidez no diagnóstico e baixo custo, além ser um método pouco invasivo (MEINKOTH

& COWELL, 2002; GHISLENI et al., 2006), justificando sua utilização na rotina da clínica oncológica veterinária. Quando comparada com a histopatologia, a citologia mostra elevada acurácia no diagnóstico de neoplasias em cães e gatos (MENARD et al., 1986; GHISLENI et al., 2006). Entretanto, embora possa fornecer um diagnóstico definitivo de linfoma, somente por meio da histopatologia é possível classificar o tumor adequadamente (MORRISON, 2005), principalmente por ser possível avaliar a arquitetura tecidual que permanece intacta (LARKIN, 1994).

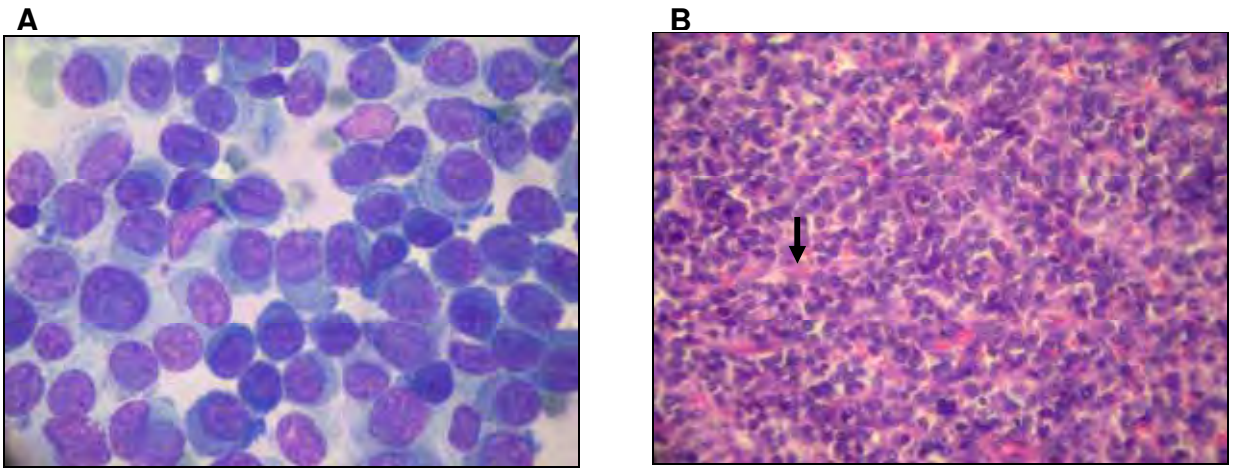


Figura 1: (A) Fotomicrografia de linfoma cutâneo. Aspirado de nódulo cutâneo de cão (Animal 18). Linfócitos médios a grandes, revelando relação N:C variável, com padrão de cromatina condensado a descondensado, além de localização nuclear excêntrica. Rosenfeld x 1000. (B) Aspecto histológico de nódulo cutâneo do mesmo animal, com áreas de hemorragia (seta). HE x 400.

Dos 18 cães que integraram o protocolo experimental, oito eram fêmeas (44,44%) e dez machos (55,55%). A maioria dos animais acometidos era de meia-idade, com uma média e desvio-padrão de 7,9 ± 2,8 anos (limites, quatro e quinze anos), corroborando com dados da literatura (GREENLEE et al., 1990; ETTINGER, 2003). O peso variou entre 7,7 e 49 kg (média e desvio-padrão, 23,38 ± 11,96 kg). Embora o número de cães inseridos neste estudo seja reduzido para se discutir prevalência racial, notou-se uma predominância da raça Rottweiler, com cinco representantes (27,78%). Uma maior ocorrência da doença na raça Rottweiler também foi descrita por Jagielski et al. (2002) e Moreno & Bracarense (2007). Os demais

animais apresentaram a seguinte distribuição: três cães sem raça definida (SRD) (16,67%), três Teckels (16,67%), três Poodles (16,67%), dois Boxers (11,11%), um Husky Siberiano (5,55%) e um Staffordshire Terrier Americano (5,55%) (Figura 2).

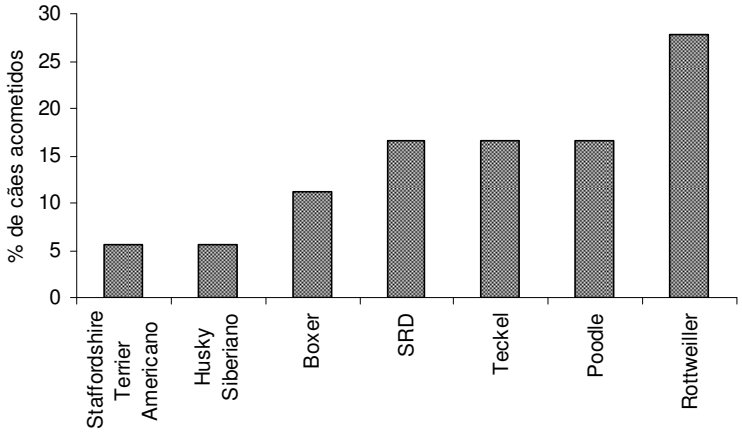


Figura 2: Distribuição de raças de 18 cães com linfoma, atendidos no Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da FCAV/Unesp – Jaboticabal, no período de maio de 2007 a abril de 2008.

O tempo de evolução da doença, considerando-se o início do aparecimento dos sintomas, relatado pelos proprietários, e o início do tratamento, variou de uma semana a um ano (média e desvio padrão de 74,8 ± 114,7 dias). Para um animal (Animal 13) o proprietário não sabia informar o início dos sintomas. A linfadenomegalia generalizada que este paciente apresentava foi notada ao acaso durante um retorno ao HV "GLN", ocasião em que o cão estava em tratamento para displasia coxo-femoral.

Com relação à classificação anatômica da doença, nove cães apresentaram linfoma multicêntrico (50%), seis cães apresentaram linfoma cutâneo (33,5%), um apresentou linfoma mediastinal (5,5%), um extranodal (renal) (5,5%) e um alimentar (5,5%) (Figura 3). Tais achados divergem daqueles encontrados na literatura no que diz respeito ao linfoma cutâneo, descrito como uma forma pouco comum da doença, e perfazendo cerca de 3 a 8% dos casos (MORRISON, 2005; VAIL & YOUNG, 2007). Entretanto, Moreno & Bracarense (2007) relataram ter encontrado uma porcentagem de 12,9% da forma cutânea após analisarem 186 casos de linfoma canino.

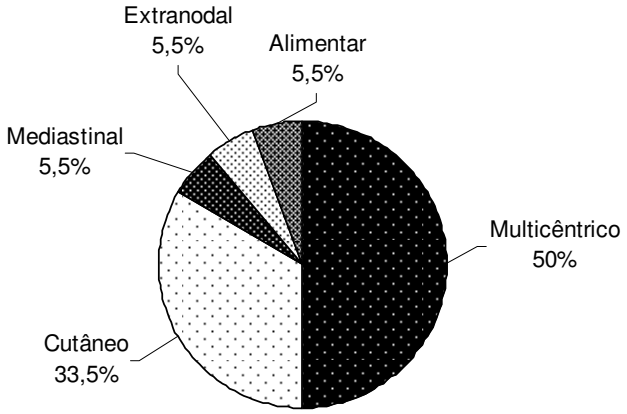


Figura 3: Distribuição anatômica dos linfomas de 18 cães, atendidos no Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da FCAV/Unesp – Jaboticabal, no período de maio de 2007 a abril de 2008.

Onze animais (61,12%) foram classificados no estágio V da OMS (envolvimento da medula óssea ou sangue periférico e/ou algum órgão não linfóide com ou sem os estágios I a IV) no momento do diagnóstico. Vale ressaltar que os linfomas cutâneos, assim como o extranodal, foram considerados como no estágio V, influenciando, portanto, a grande quantidade de animais nesse estágio avançado da doença. Alguns autores consideram os linfomas cutâneos como entidades separadas dos demais (CARDOSO et al., 2003; MORRISON, 2005). Entretanto, optou-se neste estudo por classificá-los juntamente com os outros tipos, da forma como é realizado na rotina oncológica do SOV da FCAV-UNESP/Jaboticabal. Três cães encontravam-se no estágio IV (16,67%), dois no estágio II (11,11%), um no estágio III (5,55%) e um no estágio I (5,55%) (Figura 4). Diversos autores relatam que a maioria dos cães apresenta-se em estágios avançados do linfoma no momento do diagnóstico (GREENLEE, 1990; ROSENTHAL, 1990; SEQUEIRA et al., 1999), o que pode ser explicado pelo fato dos proprietários não identificarem os sinais clínicos nos estágios iniciais da doença (estágios I e II) (GREENLEE, 1990). Aliado a tal fato soma-se o tempo que os proprietários demoram a levar seus animais ao médico veterinário, o que neste trabalho verifica-se pelo longo tempo de evolução da doença relatado pelos mesmos, como descrito acima.

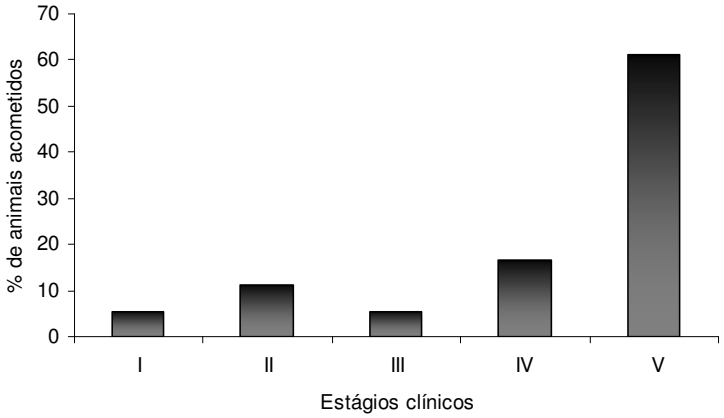


Figura 4: Estágios clínicos de 18 cães com linfoma, atendidos no Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da FCAV/Unesp – Jaboticabal, no período de maio de 2007 a abril de 2008.

Doze animais apresentaram-se no sub-estágio "b" (66,7%) e seis no sub-estágio "a" (33,3%) (Figura 5), se contrapondo aos achados de literatura, cuja maioria dos autores afirma que a maior parte dos cães com linfoma não apresenta sinais sistêmicos da doença no momento do diagnóstico (VAIL & YOUNG, 2007). Em um estudo com 101 cães com linfoma multicêntrico, 72,3% dos animais apresentavam-se no sub-estágio "a" e apenas 27,7% no sub-estágio "b" (HOSOYA et al., 2007). As informações individuais relativas às características acima mencionadas encontram-se no Quadro 1.

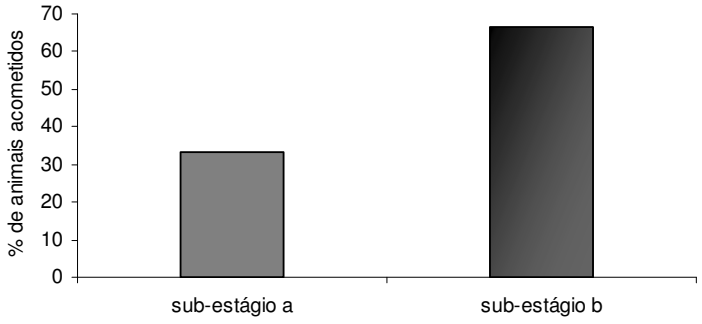


Figura 5: Sub-estágios clínicos de 18 cães com linfoma, atendidos no Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da FCAV/Unesp – Jaboticabal, no período de maio de 2007 a abril de 2008.

Quadro 1: Características gerais e evolução clínica de 18 cães com linfoma, atendidos no Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da FCAV/Unesp – Jaboticabal, no período de maio de 2007 a abril de 2008, e tratados com o protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin.

Animal	Raça, idade, sexo e peso	Classificação do linfoma	Quadro clínico♣ e Meio de diagnóstico	Tempo de evolução da doença	Duração da 1ª RC (semanas)	Sobrevida total (dias)♦
1	Teckel, 11 anos, F, 7,7 kg	Multicêntrico IIb	Linfonodo submandibular. PAAF	2 meses	9	180
2	Rottweiler, 8 anos, F, 32,8 kg	Mediastinal Vb	Linfadenomegalia generalizada; linfonodos craniomediastinais; massa no vestíbulo vaginal. PAAF	1 mês	Não alcançada	3
3	Rottweiler, 6 anos, F, 49 kg	Extranodal (renal) Vb	Massa no rim esquerdo. Citoscopia de sedimento urinário	15 dias	Não alcançada	63
4	Husky Siberiano, 10 anos, F, 36,5 kg	Alimentar Vb	Linfadenomegalia generalizada; massa no intestino delgado; sangue; medula óssea. PAAF	1 mês	Não alcançada	3
5	Poodle, 15 anos, M, 8,3 kg	Cutâneo Va	Nódulos cutâneos. HT	10 dias	4	98
6	SRD, 11 anos, M, 25,5 kg	Multicêntrico IVb	Linfadenomegalia generalizada; nódulo no fígado; hepatomegalia. PAAF	15 dias	Não alcançada	7

Continua…

Continuação...

7	Poodle, 4,5 anos, M, 10,4 kg	Cutâneo Va	Nódulos cutâneos; linfonodos submandibulares. PAAF	1 mês	4	56
8	Teckel, 7 anos e 8 meses, M, 10 kg	Cutâneo Va	Nódulos cutâneos; linfadenomegalia generalizada; sangue; medula óssea. PAAF e HT	1 ano	Não alcançada	*
9	Rottweiller, 5 anos, F, 32 kg	Multicêntrico IVb	Linfonodos submandibulares; nódulo no baço. PAAF	1 ano	26	365
10	Poodle, 4 anos, F, 8,3 kg	Multicêntrico IIb	Linfonodos pré-escapulares e poplíteos. PAAF	20 dias	Não alcançada	7
11	Boxer, 4,5 anos, M, 27,9 kg	Cutâneo Vb	Nódulos cutâneos; Linfonodos submandibulares, pré-escapulares e inguinais. HT	1 mês	Não alcançada	32
12	SRD, 9 anos, 23,1 kg	Multicêntrico IIIb	Linfonodos submandibulares, pré-escapulares e inguinais. PAAF	5 meses	Não alcançada	7
13	Rottweiller, 8 anos, F, 32,5 kg	Multicêntrico Va	Linfadenomegalia generalizada; sangue; medula óssea. PAAF	Não sabe afirmar	Não alcançada	7
14	Teckel, 7 anos, F, 13,7 kg	Multicêntrico IVb	Nódulo no baço. HT	Não sabe afirmar	⌖	*

Continua…

Continuação...

15	SRD, 11 anos, M, 15,2 kg	Cutâneo Vb	Nódulos cutâneos. PAAF	Um ano	Não alcançada	15
16	Rottweiller, 7 anos, M, 32,7 kg	Multicêntrico Vb	Linfonodos poplíteos; efusão abdominal. PAAF	1 semana	Não alcançada	1
17	Boxer, 7,5 anos, M, 26,5 kg	Multicêntrico Ib	Linfonodos submandibulares e poplíteos; nódulo no baço; efusão torácica; medula óssea. PAAF	1 semana	✚	⁎
18	Staffordshire Terrier Americano, 7,5 anos, M, 29 kg	Cutâneo Va	Nódulo cutâneo. HT	20 dias	✞	⁎

♣ O quadro clínico refere-se às alterações observadas no momento do diagnóstico e relacionadas com o envolvimento do linfoma.

♦ A sobrevida total refere-se ao tempo decorrido entre o diagnóstico do linfoma e o óbito do animal.

F: fêmea; M: macho; PAAF: punção aspirativa com agulha fina; HT: histopatológico; RC: remissão completa; RP: remissão parcial.

⁎ Não houve óbito até o final da pesquisa. Tempo de seguimento clínico desde o início do tratamento: Animal 8: um ano. Animais 14, 16 e 18: seis meses.

✞ Desde o início do tratamento, após esplenectomia (Animal 14) e excisão cirúrgica de nódulo cutâneo (Animal 18).

✚ Não é possível afirmar. Animal atingiu RC da doença após a primeira sessão de quimioterapia e não houve recidivas ao longo do tratamento.

3.2 Alterações clínicas e laboratoriais ao diagnóstico

A manifestação clínica mais comumente encontrada nos animais no momento do diagnóstico do linfoma foi a linfadenomegalia superficial, que estava presente em 72% (n=13) dos cães deste estudo, corroborando com os dados da literatura asseverados por vários autores (ETTINGER, 2003; CARDOSO et al., 2004a; MORRISON, 2005; VAIL & YOUNG, 2007). Destes, cinco apresentaram linfadenopatia generalizada (38,4%), e os outros oito apresentaram envolvimento de três, dois ou apenas um linfonodo. A classificação anatômica dos cinco cães que não apresentaram comprometimento dos linfonodos incluiu três linfomas cutâneos (Animais 5, 15 e 18), um extranodal renal (Animal 3) e um multicêntrico com envolvimento apenas do baço (Animal 14).

A apresentação clínica do linfoma cutâneo é variada, podendo surgir como lesões únicas ou múltiplas da pele, e incluir envolvimento mucocutâneo e/ou da cavidade oral (MORRISON, 2005). No presente estudo, apenas um dos animais com a forma cutânea apresentou um único nódulo de pele (Animal 18), todos os outros revelaram a presença de múltiplos tumores. Entretanto, nenhum animal apresentou envolvimento de mucosas. A forma cutânea pode incluir envolvimento extracutâneo nos linfonodos (MORRISON, 2005; VAIL & YOUNG, 2007), o que foi observado em três cães deste estudo. Dois cães (Animais 5 e 11) tinham histórico de dermatite crônica, o que, segundo Brown et al. (1980), pode ocorrer em cerca de 60% dos cães com linfomas cutâneos.

O acúmulo de líquidos extravasculares foi observado em seis animais (33,4%), sendo quatro deles com edema de membros, um com efusão torácica e um com ascite. O edema localizado nos membros torácicos ou pélvicos foi provavelmente causado pela obstrução do fluxo linfático devido à linfadenomegalia regional (CARDOSO et al., 2004a), ou seja, dos linfonodos pré-escapulares, inguinais ou poplíteos.

As efusões abdominal e torácica presentes nos Animais 16 e 17, respectivamente, foram classificadas como transudatos modificados. O linfoma pode causar o acúmulo de líquido cavitário em decorrência da compressão de grandes vasos

que leva ao aumento da pressão hidrostática intravascular e conseqüente extravasamento de líquido para o espaço extravascular (CARDOSO et al., 2004b). Além disso, a pressão coloidosmótica do plasma também influencia a movimentação de fluidos entre o sangue e as cavidades corpóreas (PERMAN et al., 1974), e sua manutenção é altamente dependente da concentração de albumina sérica (REECE & SWENSON, 2006). Dessa forma, para o Animal 16 é importante considerar a diminuição da pressão coloidosmótica do plasma como causa da efusão abdominal, tendo em vista que o referido cão apresentou, no momento do diagnóstico, hipoalbuminemia severa (1,31g/dL) (Tabela 3).

Células neoplásicas podem exfoliar e serem visualizadas nas efusões, facilitando o diagnóstico do linfoma (PERMAN et al., 1974; SIMS et al., 2003), como ocorrido nos Animais 16 e 17, que apresentaram inúmeros linfócitos imaturos (linfoblastos) aos exames citoscópicos de seus derrames cavitários.

Considerando os 12 animais classificados no sub-estágio “b” da doença, os sinais clínicos apresentados foram variados e inespecíficos, corroborando com dados da literatura (CARDOSO et al., 2004a; MORISSON, 2005; VAIL & YOUNG, 2007). A hiporexia foi o sinal clínico mais comumente encontrado, presente em 83% dos cães, seguido de apatia (75%) e perda de peso (33%). Outros sinais observados com menor freqüência incluíram dispnéia (25%), vômito (16,6%), tosse (16,6%) e diarréia (8,3%). Um cão, com linfoma multicêntrico, apresentou sinais oculares de uveíte, hipópio e glaucoma (Figura 6).

Todos os animais apresentaram alterações em seus hemogramas, confeccionados por ocasião do diagnóstico da neoplasia. As alterações hematológicas encontradas foram: anemia normocítica normocrômica (61%), trombocitopenia (55,5%), leucocitose (38,8%), leucopenia (22,2%) e trombocitose (11,1%) (Figura 7).

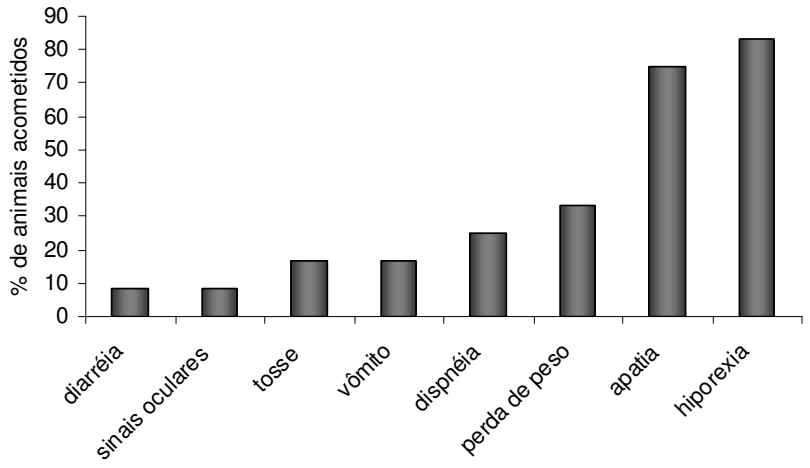


Figura 6: Sinais clínicos observados em 12 cães com linfoma, atendidos no Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da FCAV/Unesp – Jaboticabal, no período de maio de 2007 a abril de 2008, e classificados no sub-estágio "b" de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OWEN, 1980).

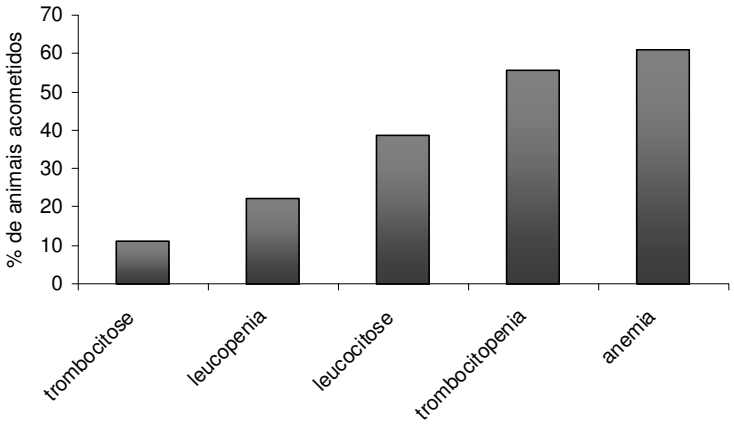


Figura 7: Alterações hematológicas observadas nos hemogramas de 18 cães com linfoma, atendidos no Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da FCAV/Unesp – Jaboticabal, no período de maio de 2007 a abril de 2008, por ocasião do diagnóstico da neoplasia.

Alterações hematológicas em pacientes com câncer podem decorrer da ação direta do tumor nos órgãos envolvidos e/ou de síndromes paraneoplásicas (KRUTH & CARTER, 1990). A anemia, a trombocitopenia e a leucocitose neutrofílica são síndromes paraneoplásicas comuns em cães com linfoma. Essas síndromes são

multifatoriais e caracterizam-se por alterações físicas ou funcionais do organismo que ocorrem em locais distantes do tumor (BERGMAN, 2007).

A anemia é uma das síndromes paraneoplásicas mais comuns em animais e seres humanos (MADEWELL & FELDMAN, 1980) e pode ser caracterizada como anemia de doença crônica, ou ser de origem imunomediada ou decorrente de perda sanguínea (BERGMAN, 2007). A anemia de origem imunomediada é, na maioria das vezes, regenerativa, e em caso de perda sanguínea, a anemia tende a ser microcítica hipocrômica (TVEDTEN & WEISS, 2000). A anemia de doença crônica é normalmente normocítica normocrômica, ou seja, arregenerativa (MADEWELL & FELDMAN, 1980). Esta última é a mais comumente encontrada em pacientes com câncer (KRUTH & CARTER, 1990).

Neste estudo, 61% dos cães apresentaram anemia no momento do diagnóstico da neoplasia (Tabela 1). Para os cães anêmicos (n=11), os valores médios e desvios-padrão da contagem total de hemácias, taxa de hemoglobina e do hematócrito foram de 3,59 ± 0,8 $x10^6$/µL, 8,45 ± 2,16g/dL e 25,1 ± 5,94%, respectivamente. Ademais, os valores obtidos para os índices hematimétricos permitiram classificar a anemia como sendo normocítica normocrômica, ou seja, arregenerativa, com valores médios e desvios-padrão de volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de 70 ± 3,72fL e 32,7 ± 0,9%, respectivamente. Esses resultados corroboram com os relatos de Morrison (2005) e Vail & Young (2007) para cães com linfoma, e sugerem que a anemia em questão seja decorrente de doença crônica. As causas são variadas, e incluem alterações no metabolismo, armazenamento e disponibilidade do ferro, encurtamento da meia-vida das hemácias e, ocasionalmente, diminuição da resposta medular (MADEWELL & FELDMAN, 1980), ainda que a avaliação da medula óssea não revele alterações celulares significativas (BERGMAN, 2007).

Tabela 1: Valores da contagem global de hemácias (He), da concentração de Hemoglobina (Hb), do Hematócrito (Ht), do Volume Corpuscular Médio (VCM), da Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) e da contagem global de plaquetas de 18 cães no momento do diagnóstico do linfoma.

Animal	**He** ($x10^6/\mu L$)	**Hb** (g/dL)	**Ht** (%)	**VCM** (fL)	**CHCM** (g/dL)	Plaq **($x10^3/\mu L$)**
1	7,17	16,4	51	71	32,1	426
2	2,43	5,3	16,1	66	33,2	107
3	7,36	17,5	55,3	75	31,6	166
4	4,26	10,4	31,9	75	32,5	386
5	6,07	13,8	41,9	69	33	43
6	2,54	6,1	18,1	71	33,8	612
7	5,30	11,9	36,8	69	32,2	102
8	6,65	16,1	49,9	75	32,2	492
9	6,41	15,4	47,4	74	32,5	410
10	2,78	6,6	20,9	75	31,4	195
11	4,38	10,1	31,9	73	31,5	45
12	5,59	12,8	39,2	70	32,6	149
13	3,33	7,2	21,1	63	34,4	360
14	4,21	9,5	28,5	68	33,2	620
15	4,01	9,2	28,9	72	31,8	95
16	2,84	6,6	19,7	69	33,5	65
17	6,10	13,6	41,7	68	32,6	193
18	4,38	10,1	30,4	69	33,2	403
Média	4,76	11,03	33,92	70,66	32,62	270,5
DP	1,62	3,85	12,18	3,42	0,82	193,80
Máximo	7,36	17,5	55,3	75	34,4	620
Mínimo	2,43	5,3	16,1	63	31,4	43

*Valores de referência: He 5,5-8,5 $x10^6/\mu L$; Hb 12-18g/dL; Ht 37-55%; VCM 60-77fL; CHCM 32-36%; Plaq 200-500 $x10^3/\mu L$ (MEINKOTH & CLINKERBEARD, 2000).

A trombocitopenia também foi um achado comum nos cães com linfoma (Tabela 1), assim como descrito na literatura (ETTINGER, 2003; VAIL & YOUNG, 2007). O valor médio e desvio-padrão de plaquetas obtido para os dez cães que apresentaram trombocitopenia foram de $115,7 \pm 57$ $x10^3/\mu L$. A destruição plaquetária imunomediada secundária é a causa mais freqüente de trombocitopenia em pacientes com câncer (SCOTT, 2000). Neste estudo, entretanto, para um cão (Animal 17) observou-se o comprometimento da medula óssea por células neoplásicas, o que, considerando-se o

prejuízo na produção de plaquetas, poderia justificar a trombocitopenia, como asseverado por Ettinger (2003).

Dois animais (Animais 6 e 14) apresentaram trombocitose (Tabela 1) com valor médio e desvio-padrão de plaquetas de 616 ± 5,65 $x10^3$/µL. A trombocitose também é descrita como síndrome paraneoplásica de ocorrência comum em seres humanos com doenças linfoproliferativas, porém é pouco relatada nos animais (BERGMAN, 2007). Para o Animal 14, entretanto, a trombocitose provavelmente decorreu da esplenectomia à qual o cão foi submetido (Quadro 1), assim como relatado por Mandell (2000).

As alterações encontradas no leucograma dos animais foram variadas (Tabela 2), assim como escrito por Morrison (2005) para cães com linfoma. Em sete animais (38,88%) observou-se leucocitose, conseqüente à neutrofilia acompanhada ou não de linfocitose. A contagem global média e desvio-padrão de leucócitos de tais animais foi de 32,2 ± 8,4 $x10^3$/µL. A leucocitose neutrofílica verificada no presente estudo, e manifestada com ou sem desvio à esquerda regenerativo, provavelmente reflete uma condição inflamatória decorrente do tumor (SCHULTZE, 2000). A neutrofilia pode ocorrer em 25 a 40% dos cães com linfoma (VAIL & YOUNG, 2007) e possui pouco significado clínico (BERGMAN, 2007). Quatro animais (22,2%) apresentaram linfocitose, cujo valor médio e desvio-padrão de linfócitos foram de 19,43 $x10^3$ ± 6,41 $x10^3$/µL. Em três desses cães (Animais 4, 8 e 13) foram observadas células neoplásicas na medula óssea e no sangue periférico, sugerindo que a linfocitose, nos referidos pacientes, estivesse relacionada com a proliferação e expansão clonal das células tumorais (KRUTH & CARTER, 1990).

A leucopenia foi observada em quatro animais (22,22%), cujas contagens globais de leucócitos apresentaram valor médio e desvio-padrão de 4,75 ± 1,07 $x10^3$/µL, e foi essencialmente causada pela diminuição da contagem absoluta de linfócitos. Além disso, a linfopenia também ocorreu associada a contagens leucocitárias normais ou aumentadas, de modo que foi observada em nove animais (50%). Para tais cães (n=9) o valor médio e desvio-padrão da contagem de linfócitos foram de 0,44 ± 0,29 $x10^3$/µL. Cães com linfoma podem apresentar linfopenia (CARDOSO et al., 2004b; MORRISON, 2005), entretanto, a literatura é escassa no que diz respeito às causas dessa alteração.

Um aspecto que pode estar relacionado a este fato é a diminuição da população linfocitária recirculante, devido ao bloqueio do fluxo linfático secundário à neoplasia (LATIMER, 1997).

Tabela 2: Valores da contagem global de leucócitos (Leu), e das contagens absolutas de basófilos (Bas), eosinófilos (Eos), neutrófilos bastonetes (Bast), neutrófilos segmentados (Seg), linfócitos (Linf) e monócitos (Mon) de 18 cães no momento do diagnóstico do linfoma.

Animal	**Leu** ($x10^3$/µL)	**Bas** (céls/µL)	**Eos** (céls/µL)	**Bast** (céls/µL)	**Seg** (céls/µL)	**Linf** (céls/µL)	**Mon** (céls/µL)
1	21,5	0	645	0	19565	430	860
2	8,3	0	0	83	7304	581	332
3	12,9	0	387	0	9933	1806	774
4	38,2	0	0	1528	20628	14516*	1528
5	4,4	0	176	132	3916	88	88
6	39,4	0	394	1576	31520	3940	1970
7	3,4	0	136	0	2788	340	136
8	39,6	0	396	396	11880	26536*	396
9	36,1	0	1444	0	16606	17689	361
10	15,9	0	0	159	14151	1431	159
11	6,5	0	195	130	5070	975	130
12	11,5	0	460	230	9200	1065	575
13	30,6	0	612	1530	13770	14076*	612
14	12,9	0	387	387	9030	2322	744
15	7,2	0	0	0	6768	144	288
16	17,3	0	173	173	16089	519	346
17	5,4	0	0	54	5130	216	0
18	5,8	0	116	116	4814	754	0
Média	17,60	0	306,72	360,77	11564,56	5006,78	516,61
DP	13,23	0	354,49	557,77	7366,18	8275,63	524,54
Máximo	39,6	0	1444	1576	31520	26536	1970
Mínimo	3,4	0	0	0	2788	88	0

Valores de referência: Leu 6-17 $x10^3$/µL; Eos 100-1250/µL; Bast 0-300/µL; Seg 3000-11500/µL; Linf 1000-4800/µL; Mon 150-1350/µL (MEINKOTH & CLINKERBEARD, 2000).
*Presença de linfócitos neoplásicos no sangue periférico, visualizados no esfregaço sanguíneo.

No que diz respeito às avaliações bioquímico-séricas, o aumento da concentração de creatinina sérica foi notado em seis animais (33,3%) (Tabela 3). Para tais cães (n=6) o valor médio e desvio-padrão da concentração sérica de creatinina

foram de 2,21 ± 0,6mg/dL. Desses cães, um apresentava linfoma renal (Animal 3) e outro insuficiência renal aparentemente não relacionada com a neoplasia (Animal 9). A urinálise dos dois animais revelou isostenúria (densidades 1.007 e 1.011, respectivamente) e proteinúria, confirmando, portanto, a origem renal da elevação da creatinina (OSBORNE & POLZIN, 1983). De acordo com Osborne et al. (1971), nos linfomas renais, os resultados dos testes de funcionalidade dos rins indicam destruição parenquimatosa severa decorrente da infiltração neoplásica. Ademais, o aumento da creatinina sérica pode ter origem pré-renal, e ocorrer em animais com câncer que estejam debilitados (KRUTH & CARTER, 1990), e/ou com sinais clínicos de vômitos e diarréia (ETTINGER, 2003), como observado em alguns cães deste estudo.

Seis animais (33,3%) apresentaram aumento sérico de ALT (Tabela 3), cujo valor médio e desvio-padrão foram de 138,59 ± 46,08U/L. O aumento sérico de enzimas hepáticas em cães com linfoma pode estar relacionado com o envolvimento da neoplasia no fígado (estágio IV) (ETTINGER, 2003; CARDOSO et al., 2004b), e, no caso da ALT, indica injúria hepatocelular com conseqüente extravasamento enzimático (TENNANT, 1997). Porém, também pode ocorrer doença hepática primária concomitante à neoplasia, e, a diferenciação da causa primária só pode ser realizada mediante exame histopatológico do órgão em questão (CARDOSO et al., 2004b). Independentemente da causa, a avaliação do perfil hepático de cães com linfoma se faz necessário tendo em vista que o metabolismo dos fármacos antineoplásicos é realizado principalmente no fígado (ETTINGER, 2003).

Tabela 3: Valores de creatinina sérica (CS), alanina aminotransferase (ALT), lactato desidrogenase (LDH), proteínas totais (PT), albumina (Alb) e globulinas (Glob) do soro de 18 cães no momento do diagnóstico do linfoma.

Animal	**CS** (mg/dL)	**ALT** (U/L)	**LDH** (U/L)	**PT** (g/dL)	**Alb** (g/dL)	**Glob** (g/dL)
1	0,58	54,87	161	6,80	3,12	3,68
2	1,61	37,99	469	4,40	1,70	2,70
3	2,60	25,33	793	10,62	3,12	7,50
4	1,16	156,20	663	4,77	1,94	2,83
5	0,71	46,43	32	9,80	3,12	6,68
6	0,88	36,67	242	4,54	1,41	3,13
7	0,63	31,43	566	6,58	2,39	4,19
8	0,80	31,40	210	7,20	2,98	4,22
9	3,20	33,77	291	6,46	2,86	3,60
10	0,70	52,38	744	4,20	1,65	2,55
11	2,15	89,05	129	8,24	1,63	6,61
12	1,15	33,77	80	8,80	2,56	6,24
13	1,30	15,71	760	6,00	2,59	3,41
14	1,30	101,30	178	8,20	3,65	4,55
15	0,70	198,00	Nd*	5,80	3,00	2,80
16	2,00	20,95	242	4,73	1,31	3,42
17	1,20	181,50	356	7,81	3,41	4,40
18	1,70	105,50	64	12,00	1,86	10,14
Média	1,35	69,56	351,76	7,05	2,46	4,59
DP	0,73	56,89	261,57	2,25	0,74	2,05
Máximo	3,20	198,00	793	12,00	3,65	10,14
Mínimo	0,58	15,71	32	4,20	1,31	2,55

Valores de referência: CS 0,5-1,5 mg/dL; ALT 10-88 U/L; LDH 45-233 U/L; PT 5,4 – 7,1 g/dL; Alb 2,6 – 3,3 g/dL; Glob 2,7 – 4,4 g/dL (MEYER et al., 1995; KANEKO et al., 1997). *Nd: não determinado.

A avaliação da atividade sérica da enzima LDH para 17 cães no momento do diagnóstico revelou que, em dez deles (58%), sua atividade encontrava-se elevada (Tabela 3) com valor médio de 488 ± 225 U/L (n=10). A lactato desidrogenase sérica engloba cinco isoenzimas distribuídas em uma variedade de tecidos, por isso é considerada não específica; entretanto, necrose muscular ou hepática e hemólise são as principais causas para a sua elevação (TURK & CASTEEL, 1997). Em oncologia humana, essa enzima está altamente relacionada com a proliferação celular em diversas neoplasias (SCHNEIDER et al. 1980). Goldman et al. (1964) foram os

primeiros a relatar o aumento da atividade da referida enzima em amostras de tecidos tumorais humanos de diversas origens em comparação com tecidos sadios e tumores benignos, o que sugere uma possível relação entre o aumento da concentração de LDH e o linfoma, no presente estudo.

Com relação ao proteinograma, sete animais (38,88%) apresentaram hiperproteinemia com valor médio e desvio-padrão de proteínas totais de 9,35 ± 1,53g/dL (n=7). Para dois cães (Animais 14 e 17), essa alteração provavelmente decorreu de um estado de desidratação, já que apresentavam também valores elevados de albumina e globulina (KRUTH & CARTER, 1990). Hiperglobulinemia foi observada nos demais animais, com valor médio e desvio-padrão de globulinas de 7,43 ± 1,63g/dL. Para tais casos, o perfil eletroforético de proteínas séricas, como descrito por Ettinger (2003), poderia elucidar a possível ocorrência de gamopatia monoclonal, uma síndrome paraneoplásica que pode ser observada em cães com linfoma (CARDOSO et al., 2004b; VAIL & YOUNG, 2007).

Hipoproteinemia foi notada em cinco cães (27,77%) (média e desvio-padrão considerando os cinco animais supracitados, 4,52 ± 0,23g/dL), nos quais os valores de albumina encontravam-se igualmente diminuídos, com uma média e desvio-padrão de 1,60 ± 0,24g/dL. Para o Animal 4, a hipoalbuminemia foi provavelmente causada por diminuição na produção de albumina (KRUTH & CARTER, 1990), tendo em vista que o cão apresentou valores muito levados de ALT e LDH (Tabela 3), indicando lesão hepática com comprometimento da função hepática (TENNANT, 1997), não necessariamente relacionado com o linfoma.

3.3 Evolução clínica e resposta ao tratamento

Para avaliar a evolução clínica dos cães com linfoma, efetuou-se um tempo de seguimento clínico de no mínimo 180 dias. Tendo em vista que o protocolo de Madison-Wisconsin tem a duração de 175 dias, foi possível acompanhar os cães até o término da quimioterapia, entretanto, alguns animais foram acompanhados por cerca de um ano (Quadro 1).

Seis animais apresentaram resposta clínica favorável ao tratamento, atingindo remissão completa (cinco cães) ou parcial (Animal 8). Por outro lado, dez animais não responderam à quimioterapia.

Os dois cães remanescentes, dentre os dezoito, apresentaram evolução clínica diferenciada, ou seja, um deles (Animal 14) possuía um nódulo no baço, achado acidental durante uma ovariosalpingohisterectomia em decorrência de uma piometra. Após esplenectomia, a análise histopatológica do tumor, realizada em um laboratório particular, revelou o diagnóstico de linfoma. O outro cão (Animal 18) apresentava um nódulo de pele, que após extirpação cirúrgica foi diagnosticada a neoplasia por meio de exame histopatólogico, realizado no Departamento de Patologia da FCAV-Unesp-Jaboticabal. Nos casos em que o linfoma está limitado a um único sítio, por exemplo, extranodal (VAIL & YOUNG, 2007) ou cutâneo com lesão solitária (MORRISON, 2005), o tratamento pode se limitar à cirurgia ou radioterapia. Entretanto cabe ao médico veterinário e ao proprietário a responsabilidade de monitorar um possível envolvimento sistêmico da doença (VAIL & YOUNG, 2007). Para os dois animais, que não apresentavam alterações clínicas além das descritas acima, optou-se, com o consentimento dos proprietários, pela realização da quimioterapia após a cirurgia. Esses animais foram considerados como em remissão completa da doença desde o início do tratamento anti-neoplásico e não apresentaram recidiva da doença em momento algum, completando o ciclo de 25 semanas do protocolo quimioterápico.

A primeira remissão completa (RC) foi atingida em cinco cães (27,77%) após duas a quatro sessões de quimioterapia. A duração da remissão foi de quatro semanas para dois cães (Animais 5 e 7) e nove semanas para um cão (Animal 1). Um paciente (Animal 9) permaneceu 26 semanas em RC; neste caso, a recidiva da doença se caracterizou pelo ressurgimento dos mesmos sinais clínicos apresentados no primeiro diagnóstico (aumento de linfonodos submandibulares e os sinais oculares de uveíte e hipópio), além da presença de células linfomatosas no sangue periférico e medula óssea. O Animal 17 atingiu RC após a primeira sessão de quimioterapia a permaneceu dessa forma até o final do tratamento, período em que foi acompanhado. Dessa forma, teve a duração da RC de no mínimo 24 semanas.

Cinqüenta e cinco por cento dos animais não responderam ao tratamento, e vieram a óbito em um a 63 dias após a primeira sessão de quimioterapia (média e desvio-padrão, 14 ± 19 dias). Dos cães que atingiram RC, três morreram em 56 a 180 dias após o início do tratamento (média e desvio-padrão, 111 ± 63 dias).

Dessa forma, como pode ser verificado na Figura 8, 18 animais iniciaram o protocolo de quimioterapia e, em 180 dias após o início do tratamento, apenas 33,33% deles estavam vivos, ou seja, apenas seis animais terminaram o tratamento. O Animal 1, entretanto, apresentou óbito após a última sessão de quimioterapia, atingindo sobrevida total de seis meses. Com relação aos demais cães, o Animal 9 foi a óbito 365 dias após o início da quimioterapia, atingindo, portanto sobrevida total de um ano. Os outros quatro animais encontravam-se vivos até o final desta pesquisa, sendo o tempo de seguimento clínico, e consequentemente, tempo mínimo de sobrevida, de um ano para o Animal 8 e seis meses (180 dias) para os Animais 14, 17 e 18 (Quadro 1).

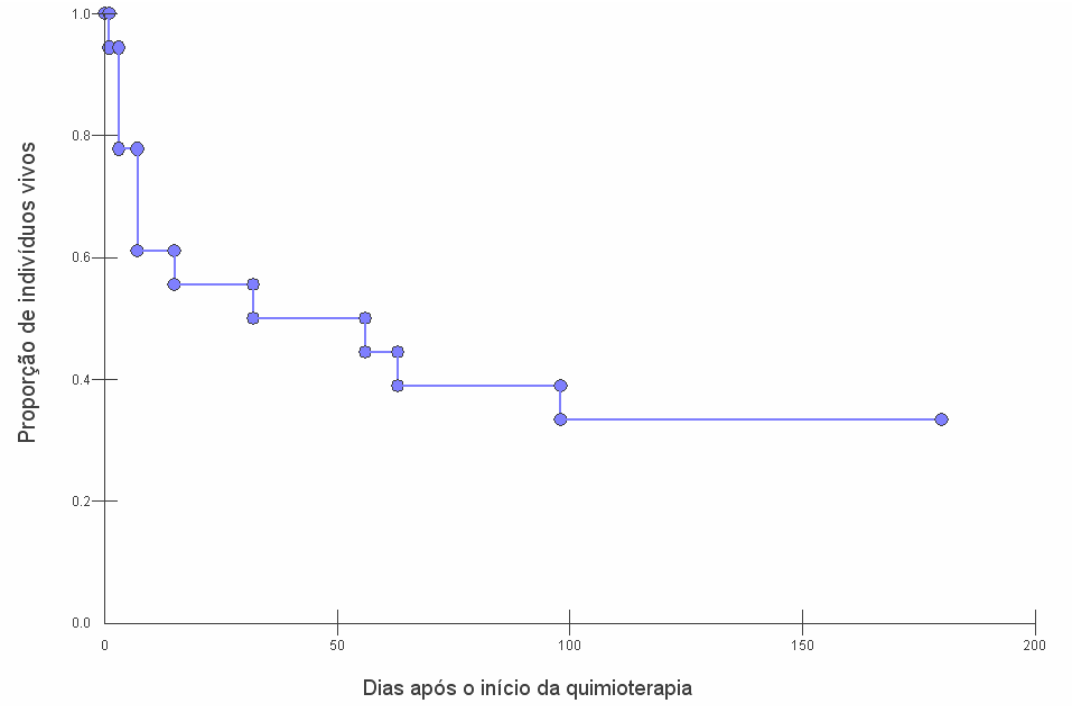


Figura 8: Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para 18 cães com linfoma, atendidos no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/Unesp – Jaboticabal, e tratados com o protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin. Considerou-se para a confecção da curva, um tempo de 180 dias de seguimento clínico dos animais após o início da quimioterapia.

As taxas de remissão e sobrevida dos cães inseridos neste estudo foram inferiores quando comparadas com dados da literatura. O protocolo de Madison-Wisconsin utiliza as cinco drogas consideradas mais efetivas no tratamento do linfoma canino (HOSOYA et al., 2007). Tal protocolo passou por modificações, principalmente com relação à sua duração, desde que foi primeiramente publicado por Keller et al. (1993). No referido trabalho, 55 cães com linfoma foram submetidos ao protocolo de Madison-Wisconsin, delineado com a duração de três anos. Oitenta e quatro por cento desses animais atingiram remissão completa da doença, e 51% atingiram sobrevida de um ano. Outro estudo (GARRETT et al., 2002) utilizou o protocolo de Madison-Wisconsin modificado para 25 semanas de duração e comparou o resultado do tratamento de 53 cães com linfoma com os resultados obtidos por Keller et al. (1993). Não houve diferença significativa com relação à resposta ao tratamento (remissão completa) e sobrevida dos animais entre os dois estudos. Mais recentemente, outra versão do protocolo de Madison-Wisconsin, com 19 semanas de duração, foi publicada (HOSOYA et al., 2007). Nesse trabalho, 30 cães com linfoma foram tratados com a referida versão do protocolo. A remissão completa foi atingida em 77% dos cães e 45% atingiram sobrevida de um ano.

Os resultados referentes às taxas de remissão e sobrevida verificados no presente estudo provavelmente possuem causas diversas. Um fator que deve ser levado em consideração é a condição clínica que os animais se encontravam quando a neoplasia foi diagnosticada, já que o sub-estágio “b” da OMS é um fator prognóstico importante para cães com linfoma (GREENLEE, 1990; VAIL & YOUNG, 2007). Como descrito anteriormente, 66% dos animais encontravam-se com sinais sistêmicos da doença. Esse dado não está de acordo com informações provenientes de estudos internacionais, que relatam de 12 a 43% de animais no sub-estágio “b” da OMS (KELLER et al., 1993; CHUN et al., 2000; GARRETT et al., 2002; HOSOYA et al., 2007). Mas, paradoxalmente, não houve, no presente estudo, diferenças significativas quando comparadas as curvas de sobrevida dos cães classificados nos sub-estágios “a” e “b” (Figura 9).

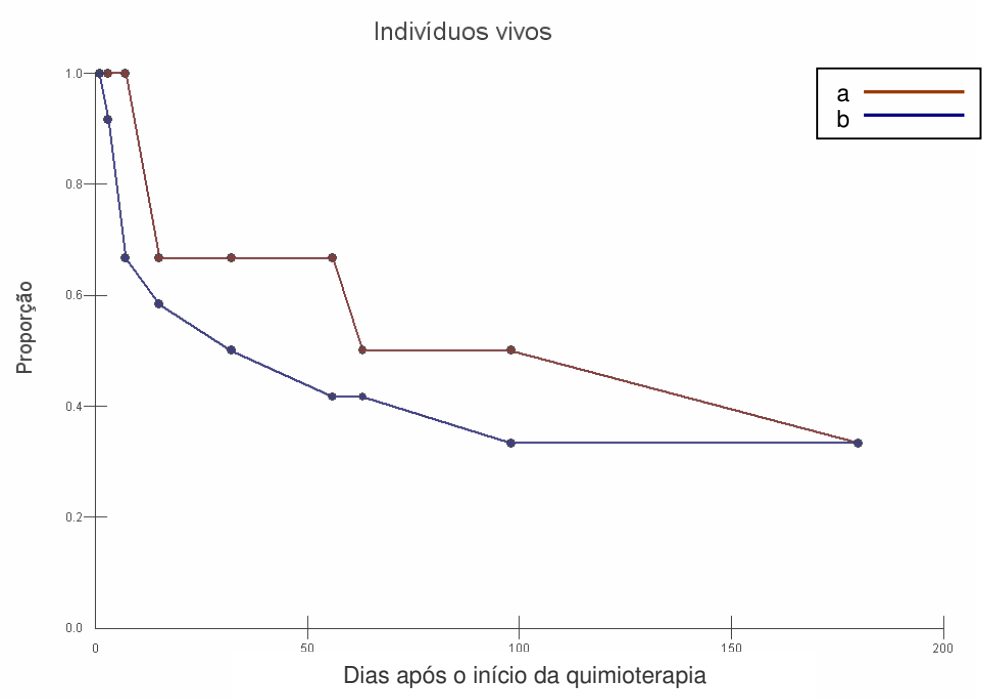


Figura 9: Curvas de sobrevida de 18 cães com linfoma, atendidos no Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da FCAV/Unesp – Jaboticabal, tratados com o protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin, nos sub-estágios "a" (n=6) e "b" (n=12) (a, sub-estágio a; b, sub-estágio b). Considerou-se para a confecção da curva, um tempo de 180 dias de seguimento clínico dos animais após o início da quimioterapia (p=0,54).

A anemia pode exercer efeitos profundos na qualidade de vida e influenciar a resposta ao tratamento e o tempo de sobrevida de animais com câncer (MADEWELL & FELDMAN, 1980; GOULD, 2003). Neste estudo, houve correlação positiva ($p<0,05$) entre o valor do hematócrito (%), obtido no momento do diagnóstico do linfoma, e o tempo de sobrevida, em dias, para os animais que morreram até 180 dias após o início do tratamento (n=13), como pode ser observado na Figura 10. Estudos similares foram realizados por Abbo & Lucroy (2007) e Miller et al. (2009) que, assim como neste trabalho, observaram que a presença da anemia no momento do diagnóstico do linfoma está associada com menor tempo de sobrevida para cães.

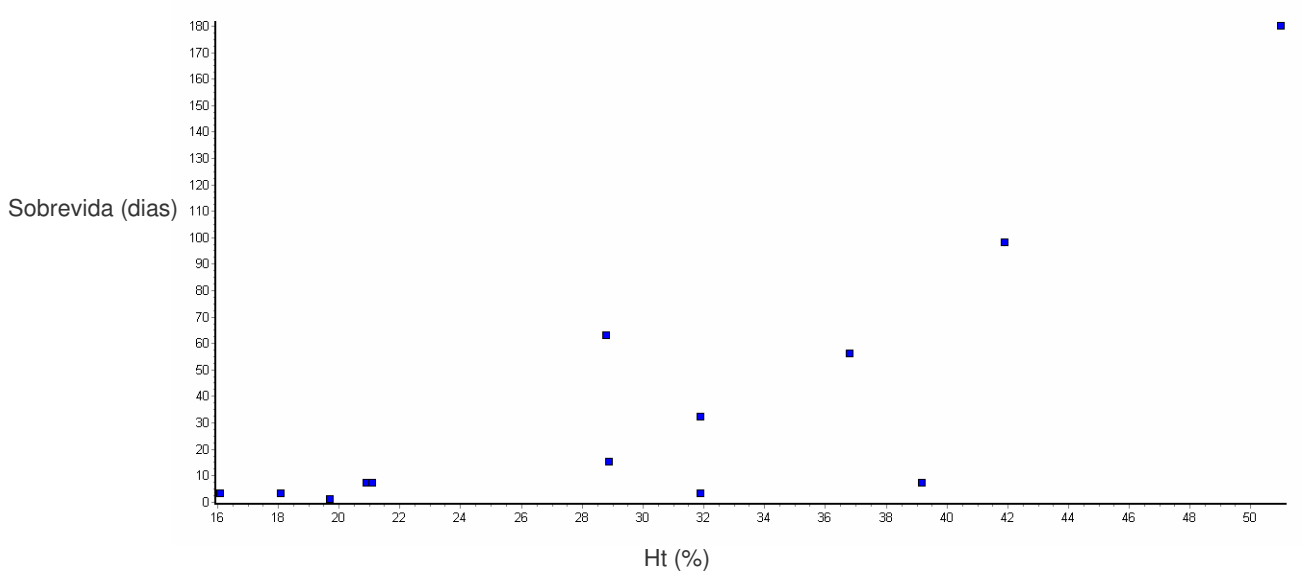


Figura 10: Representação gráfica da correlação entre o valor do hematócrito (%) e o tempo de sobrevida (dias) para 13 cães com linfoma (r=0,63 e p=0,001). Considerou-se, para a confecção do gráfico, 180 dias de seguimento clínico dos animais após o início da quimioterapia.

Não houve correlação positiva entre a atividade sérica de LDH (U/L), obtida no momento do diagnóstico, e o tempo de sobrevida dos cães que vieram à óbito (p>0,05) (Figura 11). Para seres humanos, a magnitude da atividade sérica de LDH é considerada um fator prognóstico para os linfomas Não-Hodgkin's, já que atividade elevada dessa enzima relaciona-se com menor sobrevida (SCHNEIDER et al. 1980; CHAU et al., 2003). A literatura é escassa com relação ao LDH como fator prognóstico para cães com linfoma. Em um estudo desenvolvido por Greenlee et al. (1990) não foi observada correlação entre atividade sérica elevada de LDH no momento do diagnóstico e tempo de remissão e sobrevida de 112 cães com linfoma. Entretanto, Zanatta et al. (2003), em um estudo com 71 cães com linfoma, reportaram que o tempo de sobrevida foi significativamente maior para os animais com menores atividades séricas de tal enzima no momento do diagnóstico. Desta forma, há necessidade de mais estudos para elucidar a referida questão, pois, no presente trabalho, essa relação

pode não ter sido firmada devido ao reduzido número de casos e/ou reduzido tempo de seguimento clínico.

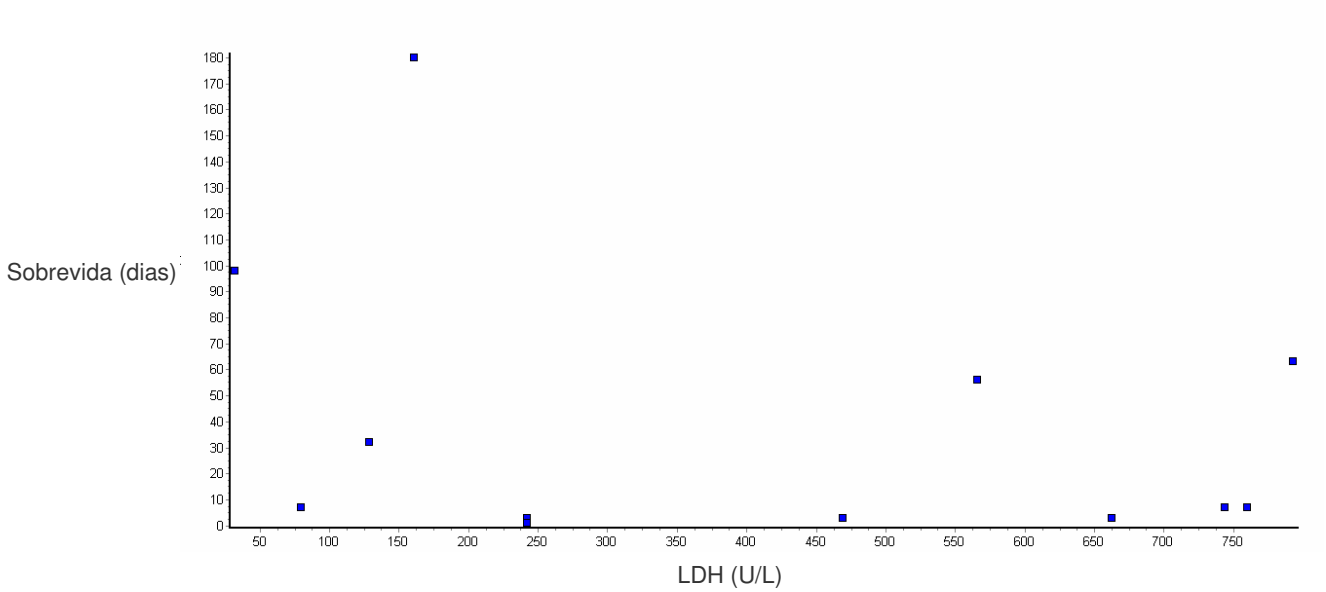


Figura 11: Representação gráfica da correlação entre o valor sérico da enzima lactato desidrogenase (U/L) e o tempo de sobrevida (dias) para 12 cães com linfoma (r=0,09 e p=0,32). Considerou-se para a confecção do gráfico um tempo de 180 dias de seguimento clínico dos animais após o início da quimioterapia.

Com relação aos animais que morreram até sete dias após a primeira sessão de quimioterapia (Animais 2, 4, 6, 10, 12, 13 e 16), deve-se considerar a possibilidade da ocorrência da síndrome da lise tumoral aguda, relacionada com complicações renais e metabólicas decorrentes de acentuada lise de células tumorais (LAING & CARTER, 1988). Foi descrita em cães com linfoma multicêntrico tratados com quimioterapia e/ou radioterapia, e, nesses casos, os fatores predisponentes identificados foram grande volume de massa tumoral com citorredução após o tratamento e comprometimento da função hepática (LAING & CARTER, 1988; COUTO, 1990; MYLONAKIS et al., 2007). Para humanos, outros fatores importantes relacionados com a ocorrência da síndrome da lise tumoral aguda incluem o comprometimento da função renal e atividades elevadas de LDH (COUTO, 1990).

Embora os cães não tenham sido avaliados quanto à ocorrência dessa síndrome no presente estudo, dos sete cães referidos acima, seis apresentavam, no momento do diagnóstico, doença em estágio avançado e grande volume de massa tumoral. Um deles apresentava aumento da atividade sérica de ALT (Animal 4), e, em cinco animais foi verificado aumento da atividade sérica de LDH. Tais achados, analisados em conjunto com o tempo decorrido entre o tratamento quimioterápico e o óbito, dão suporte a suspeita de síndrome da lise tumoral aguda nesses animais.

Outro aspecto importante a ser considerado para os cães que morreram após a primeira sessão de quimioterapia é o efeito da L-Asparaginase no metabolismo hepático. Como essa droga diminui o metabolismo de drogas no fígado, a toxicidade da vincristina pode ser potencializada quando utilizadas as duas drogas em conjunto, como descrito por Rogers (1989) e Chun et al. (2000).

Quanto aos animais que atingiram RC e depois de algum tempo apresentaram recidiva da doença, sem nova resposta ao tratamento, cabe questionar a possibilidade de resistência tumoral aos agentes quimioterápicos.

A resistência das células tumorais aos agentes quimioterápicos é o maior obstáculo para o tratamento efetivo do linfoma. No momento do diagnóstico é provável que a população de células linfomatosas contenha diversas linhagens que sejam resistentes a um ou mais agentes antineoplásicos (HOSKINS, 2001). Esse é um dos motivos pelos quais a poliquimioterapia é considerada mais eficaz do que a quimioterapia de agente único no tratamento referida doença (HOSKINS, 2001; MORRISON, 2005; VAIL & YOUNG, 2007). De acordo com Helfand (1990) o reconhecimento da resistência tumoral é empírico, e normalmente fundamentado na observação clínica da ausência de resposta ao tratamento, considerando-se o emprego de drogas e doses adequadas, como foram os casos dos Animais 1, 5, 7 e 9 do ensaio em questão.

4. Conclusões

Diante das condições experimentais deste estudo, conclui-se que os cães com linfoma apresentam como principal manifestação clínica a linfadenomegalia superficial, acompanhada dos sinais sistêmicos de hiporexia, apatia e perda de peso. O quadro hematológico caracteriza-se principalmente por anemia normocítica normocrômica cuja intensidade relaciona-se com menor tempo de sobrevida para os cães. A elevação na atividade sérica da enzima lactato desidrogenase, embora seja a principal alteração bioquímico-sérica encontrada, não está correlacionada com o tempo de sobrevida dos animais.

CAPÍTULO 3 - TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE MEDULA ÓSSEA EM CÃES COM LINFOMA SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA MIELOSSUPRESSORA

RESUMO – Avaliou-se a viabilidade do transplante autólogo de medula óssea (TMO) em cães com linfoma, quanto aos aspectos técnicos, de toxicidades e terapêuticos, e verificou-se o efeito do congelamento das bolsas de medula óssea sobre a quantidade de células nucleadas, células-tronco $CD34^+$ e sobre a viabilidade celular. Sete cães com linfoma foram submetidos ao TMO autólogo após oito ou nove sessões de quimioterapia referente à fase de indução da remissão do protocolo de Madison-Wisconsin. Os cães foram acompanhados por seis a 18 meses após o TMO. O protocolo do transplante consistiu na colheita de medula óssea (10 mL/kg), seguida da administração de ciclofosfamida (400 ou 500 mg/m^2) e reinfusão da medula óssea por via intravenosa. As bolsas de medula óssea foram processadas em etapas de depleção de hemácias, depleção de plasma e adição de crioprotetores, e foram estocadas em freezer a -80°C por quatro dias. O congelamento não acarretou na perda significativa de células nucleadas/kg, células $CD34^+$/kg e células viáveis, sugerindo que a técnica de processamento das bolsas foi eficaz. O nadir médio de neutrófilos segmentados foi de 506 células/µL e ocorreu três a sete dias pós-TMO. Em 11 dias pós-TMO, todos os cães apresentavam contagens normais de leucócitos e neutrófilos. Três animais, acompanhados por seis, 17 e 18 meses encontram-se em remissão completa da doença. Um cão apresentou recidiva seguida de óbito seis meses após o TMO. Três cães apresentaram recidiva em 12, 40 e 87 dias após o transplante. O TMO autólogo foi minimamente tóxico para os cães e eficaz como suporte para a mielossupressão causada pela ciclofosfamida em alta dose.

Palavras-chave: cão, células-tronco hematopoéticas, linfoma, transplante autólogo de medula óssea

AUTOLOGOUS BONE MARROW TRANSPLANTATION IN DOGS WITH LYMPHOMA SUBMITTED TO MYELOSUPRESSIVE CHEMOTHERAPY

ABSTRACT - The aim of this study was to evaluate the technical, toxic and therapeutic aspects of autologous bone marrow transplantation (BMT) in dogs with lymphoma, as well as the effect of freezing of bone marrow bags on nucleated cell count, $CD34^+$ stem cell count and cell viability. Seven dogs with lymphoma were submitted to autologous bone marrow transplantation after eight or nine chemotherapy sessions related to the remission induction phase of the Madison-Wisconsin protocol and were followed for six to 18 months after BMT. The transplantation protocol consisted of bone marrow harvesting (10 mL/kg), followed by administration of cyclophosphamide (400 or 500 mg/m^2) and intravenous reinfusion of bone marrow. Bags containing bone marrow were processed in steps including red cell depletion, plasma depletion and cryoprotectors addition. Bags were stored at -80°C for four days. Freezing neither modified nucleated cells/kg and $CD34^+$ cells/kg or viability, suggesting that freezing technical procedures were efficacious. The mean segmented neutrophil nadir was 506 cells/μL and occurred three to seven days after BMT. Eleven days after BMT all dogs had normal leukocyte and neutrophil counts. Complete remission was observed in three animals followed for six, 17 and 18 months. One animal showed complete remission for six months followed by relapse and death and three animals showed relapse after 12, 40 and 87 days after transplantation. Autologous BMT was minimally toxic for the animals and supported the myelosuppression caused by high dose cyclophosphamide.

Key-words: dog, hematopoietic stem cells, lymphoma, autologous bone marrow transplantation

1. Introdução

O linfoma é a neoplasia de maior indicação para o transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (TCTH) no homem (SCHMITZ et al., 2007), permitindo a administração de doses elevadas de quimioterápicos com o intuito de reduzir as taxas de recidiva da doença (HORNING & NADEMANEE, 1999).

Os agentes alquilantes, como a ciclofosfamida, são usualmente utilizados nos regimes de condicionamento mieloablativos pré-transplante, pois possuem toxicidades extramedulares aceitáveis. Entretanto, diversos protocolos de radiação e/ou quimioterapia foram consagrados na prática dos TCTH (HORNING & NADEMANEE, 1999). Mais recentemente, iniciaram-se estudos sobre os transplantes não-mieloablativos, principalmente em pacientes idosos (GIRALT et al., 2002), permitindo reduzir a toxicidade do tratamento e, ainda assim, promover benefício antitumoral (FRIMBERGER et al., 2006). Os resultados clínicos dos transplantes autólogos, relacionados principalmente ao tempo de remissão e sobrevida, dependem da classificação do linfoma, de modo que as informações encontradas na literatura variam enormemente. Entretanto, de modo geral, o TCTH autólogo tem se mostrado superior aos regimes terapêuticos convencionais para o tratamento dos linfomas não-Hodgkin de alto risco nos seres humanos (BENBOUBKER et al., 2003) e particularmente efetivo como terapia de resgate para os linfomas difusos de grandes células (COFFEY et al., 2003).

O risco de morte após o TCTH autólogo relaciona-se principalmente com a extensão e duração da neutropenia e trombocitopenia (DAMIANI et al., 1999). A quantidade de células nucleadas e/ou células-tronco hematopoéticas (CTH) $CD34^+$ recebidas pelo paciente por kilograma de peso vivo influenciam a velocidade da reconstituição hematológica. Para os transplantes de sangue periférico mobilizado, o parâmetro que deve ser considerado é a quantidade de células $CD34^+$, sendo a dose mínima sugerida de 2×10^6 células/kg (ATKINSON, 1998; BENDER et al., 1992). Entretanto, para os transplantes de medula óssea (TMO), comumente utiliza-se a quantidade de células nucleadas, obtida das bolsas de medula óssea, a ser infundida

por kilograma de peso do paciente. Dessa forma, a dose mínima de células recomendadas encontra-se entre 1 $x10^8$/kg (PATTERSON, 1995a) e 1,5 $x10^8$/kg (ATKINSON, 1998). A quantificação de CTH pela técnica de citometria de fluxo não é habitualmente realizada na rotina dos TMOs nos hospitais brasileiros, mas somente nos transplantes de sangue periférico mobilizado (PEDRO[1]). Entretanto, apesar de literatura escassa sobre este assunto, Atkinson (1998) relata a obtenção de 0,8 $x10^6$ células $CD34^+$/kg nas colheitas de medula óssea autólogas. Já Damiani (1999), observou valores que variaram de 0,02 a 2,3 $x10^6$ células $CD34^+$/kg, após analisar 53 amostras de medula óssea pré-estimuladas com um fator estimulador de colônia de granulócitos.

Independentemente do tipo de transplante, a criopreservação das bolsas de medula óssea ou sangue periférico mobilizado pode acarretar na redução da quantidade de células nucleadas e/ou células $CD34^+$ (ALLAN et al., 2002; BOER et al., 2002), sendo importante quantificá-las após o descongelamento das bolsas, antes da infusão no paciente (PATTERSON, 1995).

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

FRIMBERGER et al. (2006) conduziram tratamentos quimioterápicos com doses elevadas, seguidos de transplantes autólogos de medula óssea, em cães com linfoma. Verificaram tempo médio de remissão 10% maior quando comparado com controles históricos de cães tratados com quimioterapia convencional. Nos animais tratados, a remissão foi induzida com poliquimioterapia, seguida de dose única de ciclofosfamida (500 mg/m^2) e infusão de medula óssea autóloga.

[1] PEDRO, M.S. (Fundação Amaral Carvalho, Jaú, SP). Comunicação pessoal, 2008.

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 utilizada em cães com linfoma submetidos ao TMO autólogo foi de 500 mg/m^2, as dosagens de 300 e 400 mg/m^2 também foram utilizadas (FRIMBERGER et al., 2006).

O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar a viabilidade do transplante autólogo de medula óssea em cães com linfoma, previamente submetidos à fase de indução da remissão do protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin, quanto aos seus aspectos técnicos, de toxicidades e terapêuticos. Objetivou-se, também, avaliar o efeito do congelamento das bolsas de medula óssea sobre a quantidade de células nucleadas, células-tronco hematopoéticas e sobre a viabilidade celular.

2. Material e Métodos

2.1 Parcelas experimentais

Foram incluídos no presente protocolo experimental sete cães, atendidos no Serviço de Oncologia Veterinária (SOV) do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" (HV "GLN") da FCAV-UNESP, com diagnóstico de linfoma obtido com base nos achados clínicos, citopatológicos e/ou histopatológicos. Destes, três eram machos e quatro fêmeas. A idade variou de três a nove anos e o peso de 12 a 38,7 kg. Dois animais eram da raça Rottweiler, dois Sem Raça Definida (SRD), um Labrador, um Cocker Spaniel e um Golden Retriever. Na ocasião do diagnóstico da neoplasia, definiu-se a classificação anatômica dos linfomas, que apresentou a seguinte distribuição: quatro linfomas cutâneos (Animais 1, 3, 4 e 6), dois multicêntricos (Animais 5 e 7) e um linfoma extranodal (cardíaco) (Animal 2). Com relação ao estágio e sub-estágio clínico da OMS (OWEN, 1980), seis animais encontravam-se no estágio V e um no estágio II (Animal 5) e três animais no sub-estágio "a" e quatro no sub-estágio "b".

Todos os animais foram tratados de acordo com o protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin (Apêndice 1), que inclui sulfato de vincristina (0,75 mg/m^2, via intravenosa), L-asparaginase (400 UI/kg, via intramuscular), ciclofosfamida (250 mg/m^2, via oral), doxorrubicina (30 mg/m^2, via intravenosa) e prednisona em doses semanais decrescentes (via oral) pelo período mínimo de nove semanas, ou seja, até o término da fase de indução da remissão.

Os cães foram avaliados clinicamente a cada sessão de quimioterapia e, enquadrados, conforme sua resposta ao tratamento em animais com remissão completa (desaparecimento da doença clínica), remissão parcial (diminuição maior ou igual a 50% do tamanho do tumor sem novos focos), doença estável (diminuição ou aumento menor que 50% do tamanho do tumor) e doença progressiva (aumento em pelo menos 50% do tamanho do tumor, ou o aparecimento de novos focos) (DHALIWAL et al., 2003).

2.2 Avaliação pré-transplante de medula óssea

Uma semana após o término da fase de indução do protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin, os cães foram submetidos a uma avaliação pré-transplante de medula óssea. Dessa forma, com o intuito de se avaliar a condição clínica dos mesmos, exames clínico-laboratoriais e de imagem foram realizados. Nesta ocasião, obteve-se uma amostra de medula óssea, colhida do esterno com agulha hipodérmica 40x12 e seringa de 10mL, contendo EDTA. Após a confecção de preparações citoscópicas, coradas com o corante hematológico de Rosenfeld modificado, realizou-se a observação detalhada e criteriosa do esfregaço, com o intuito de excluir a possibilidade de contaminação da medula óssea por células linfomatosas. A partir deste momento, os animais aptos para o TMO receberam antibioticoterapia (enrofloxacina, 5 mg/kg, BID, via oral) que se estendeu por duas semanas pós-transplante.

2.3 Transplante autólogo de medula óssea

O TMO autólogo foi realizado na semana subseqüente à avaliação clínica supracitada. Para tanto, o protocolo baseou-se naquele utilizado pelo Hemonúcleo e Centro de Hematologia e Hemoterapia Dr. Ary Ferreira Dias, da Fundação Amaral Carvalho (FAC) – Jaú – SP, e foi delineado da seguinte maneira (Figura 1):

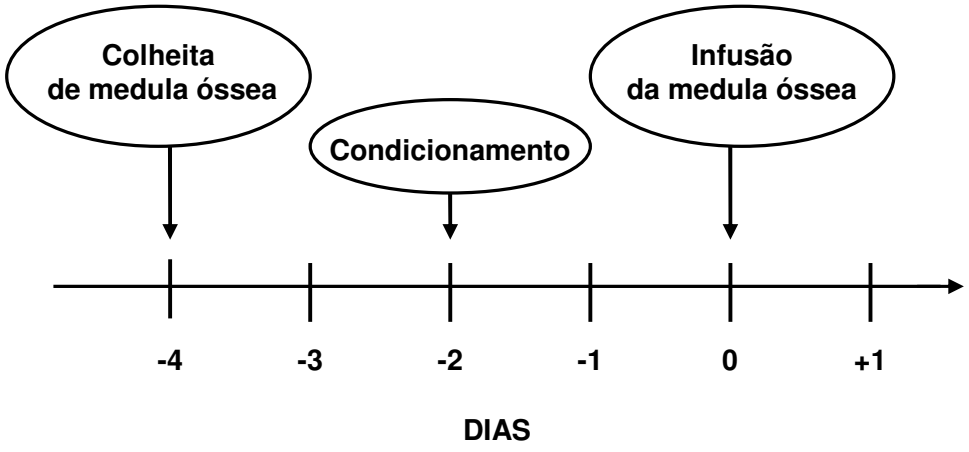


Figura 1: Representação esquemática do protocolo do transplante autólogo de medula óssea utilizado para cães previamente submetidos à poliquimioterapia para tratamento do linfoma. Dia -4 (D-4): colheita de medula óssea autóloga (10 mL/kg). Dia -2 (D-2): Condicionamento (administração de ciclofosfamida por via intravenosa). Dia 0 (D0): infusão da medula óssea por via intravenosa.

2.3.1 Colheita de medula óssea

Os procedimentos descritos a seguir foram realizados no D-4, na sala de técnica cirúrgica do HV “GLN” da FCAV/UNESP – Jaboticabal - SP.

Após jejum alimentar de 12 horas e hídrico de duas, foi realizada a tricotomia e anti-sepsia sobre a região da veia cefálica esquerda, que foi puncionada com um cateter venoso para posterior administração de solução de NaCl a 0,9%, à fração de 10 mL/kg/h, durante todo o procedimento de colheita.

Foi realizada a pré-medicação com a associação de levomepromazina e meperidina nas doses de 0,5 mg/kg e 3 mg/kg, pelas vias intravenosa e intramuscular, respectivamente. A anestesia foi induzida 15 minutos depois com a aplicação intravenosa de propofol na dose de 5 mg/kg, seguida de intubação orotraqueal com sonda de Magill de diâmetro adequado. Os animais foram mantidos sob anestesia geral inalatória pela administração de isofluorano diluído em oxigênio, cujo fluxo total foi ajustado para 30 mL/kg/min por meio de circuito anestésico com reinalação parcial de gases (Aparelho de Anestesia HB Galant, São Paulo, SP, Brasil.) dotado de vaporizador universal. Após o ajuste do plano anestésico, foi realizada anestesia peridural no espaço lombossacral com lidocaína 2%, sem vasoconstritor, na dose de 1mL para cada 5 kg de peso do animal, associado a 2 mg/kg de tramadol.

Antes do início do procedimento de colheita, preparou-se o meio RPMI 1640® (SIGMA) contendo heparina sódica Parinex® (Hipolabor), na proporção de 5:1. Em seguida, adicionou-se a um becker de vidro 5mL do meio contendo heparina e 50mL de solução fisiológica (NaCl a 0,9% - Glicolabor) para lavagem das seringas antes das aspirações. A colheita foi realizada, simultaneamente, por dois operadores devidamente paramentados, e foi alcançada graças a inúmeras aspirações nas cristas ilíacas com agulhas de Rosenthal e seringas de 20mL. Foi colhido um volume final de 10 mL/Kg de peso do animal. Para evitar a hemodiluição, cada aspiração não excedeu ao volume de 10mL (PATTERSON, 1995a) (Figura 2). Na medida em que as amostras de medula óssea eram depositadas em um becker de inox de 1L, um assistente realizava a adição de determinada quantidade de meio preparado, numa proporção de 1mL de meio para 10mL de medula óssea colhida, além da homogeneização periódica do conteúdo. No final do procedimento, o conteúdo do becker onde as seringas foram lavadas foi acrescido ao becker de inox de 1L contendo a medula óssea.

Uma vez colhido o volume desejado de medula óssea, filtrou-se todo o conteúdo em um outro becker semelhante, utilizando-se uma peneira redonda de aço inox (Bertel Indústria Metalúrgica LTDA). Como procedimento seguinte, realizou-se a retirada do anticoagulante citrato-fosfato-dextrose-adenina-1 (CPDA-1) da bolsa de sangue (Bolsa Tripla para Coleta de sangue. CPDA-1, Baxter), e então todo o conteúdo já filtrado foi

transferido para a referida bolsa de sangue utilizando-se uma seringa de 60mL e agulha hipodérmica 40x12 (Figura 3). O volume final da bolsa foi anotado.



Figura 2: Colheita de medula óssea da crista ilíaca de cão com agulha de Rosenthal e seringa de 20mL.



Figura 3: Preenchimento da bolsa de sangue com medula óssea canina, utilizando agulha hipodérmica 40x12 e seringa de 60mL.

.

Os animais receberam uma aplicação de 4 mg/kg de tramadol pela via subcutânea após o retorno anestésico e a analgesia pós-operatória foi feita com o mesmo fármaco na dose de 2 mg/kg por via oral a cada oito horas durante dois dias. Após a recuperação anestésica os cães retornaram para suas casas.

2.3.2 Processamento das bolsas de medula óssea

Após a colheita, as bolsas contendo a medula óssea foram processadas em três etapas:

- Depleção de hemácias:

Realizado dentro de uma capela de fluxo laminar, este procedimento permitiu que os eritrócitos fossem sedimentados e removidos da suspensão de células. Para tanto, adicionou-se à suspensão de células das bolsas uma substância que acelera o processo de sedimentação, denominada hidroxietilstarch (HES) (Plasmin® hidroxietilamido 450/0, 7-6%, Halexlstar), na proporção de 1:5 com seringa de 20mL. As bolsas foram então colocadas em posição vertical por 120 minutos. Após esse período, realizou-se a transferência das células vermelhas para a segunda bolsa da Bolsa Tripla de Sangue. Tal procedimento foi realizado no Laboratório de Oncologia do SOV do HV "GLN" da FCAV/UNESP – Jaboticabal - SP.

- Depleção de plasma:

Imediatamente após o término da etapa de depleção de hemácias, as bolsas de medula óssea foram transportadas, em um isopor contendo gelo reciclável, até o Banco de Sangue Sertãozinho, localizado na cidade de Sertãozinho – SP, em um tempo médio de 45 minutos. As bolsas de medula óssea foram então centrifugadas por 15 minutos, a 3000 rotações por minuto (rpm) e 20°C. Após a centrifugação, as bolsas foram colocadas em um extrator de plasma para realizar a remoção do mesmo de maneira a não alterar a interface criada, até 2 cm da camada de células brancas (Figura 4).



Figura 4: Depleção de plasma da bolsa de sangue contendo medula óssea canina.

- Pré-Congelamento:

Em uma capela de fluxo laminar, instalada no Banco de Sangue Sertãozinho, em condições assépticas, aspirou-se todo o conteúdo das bolsas de sangue com seringa de 60mL, que foi transferido para uma bolsa apropriada ao congelamento (Cryocyte® Bolsa para Congelamento dos Componentes do Sangue 500mL, BAXTER). O volume final obtido foi anotado. Na bolsa vazia onde estava o produto, foi realizada uma mistura de 40% de plasma autólogo, retirado da bolsa de medula óssea durante a etapa de depleção de plasma, 40% de RPMI (Meio RPMI 1640, SIGMA) e 20% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Dimesol®, Marcolab). Esse último procedimento foi realizado em uma cuba com gelo com o intuito de evitar uma reação exotérmica causada pelo DMSO que poderia danificar as células (DAVIS & ROWLEY, 1990). A bolsa com a mistura foi homogeneizada, e com seringa de 60mL esse conteúdo foi aspirado e transferido para a bolsa de congelamento.

Após homogeneização do conteúdo da bolsa de congelamento, retirou-se 1,5mL do produto final, sendo que 1mL foi acondicionado em um eppendorf para quantificação de células-tronco hematopoéticas e avaliação da viabilidade celular na Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da Universidade de São Paulo (USP) em Ribeirão Preto-

SP e 0,5mL foi destinado à contagem de células nucleadas na FCAV/UNESP em Jaboticabal – SP.

2.3.3 Contagem total de células nucleadas

O eppendorf contendo 0,5mL da amostra obtida antes do início do congelamento da bolsa de medula óssea foi transportado em um isopor contendo gelo reciclável para a cidade de Jaboticabal em um tempo médio de 45 minutos. A amostra de medula óssea foi então submetida à contagem global de células nucleadas, com o auxílio de um contador automático de células ABC Vet (HORIBA ABX, São Paulo, SP, Brasil), localizado no Laboratório de Patologia Clínica do HV "GLN" da FCAV/UNESP.

2.3.4 Quantificação de progenitores hematopoéticos

O *eppendorf* contendo 1mL da amostra obtida antes do início do congelamento da bolsa de medula óssea foi transportado em um isopor contendo gelo reciclável para a cidade de Ribeirão Preto em um tempo médio de 15 minutos. O volume contido no eppendorf foi transferido para um tubo de polietileno, no qual, ato contínuo, adicionou-se 1mL de solução salina tamponada com fosfato 0,01M, pH entre 7,4 e 7,6 (PBS) contendo CPDA-1 (diluição 1:10), com o intuito de evitar a formação de grumos. Esse procedimento foi sugerido pela equipe técnica do Laboratório de Citometria de Fluxo da FCF/USP de Ribeirão Preto-SP, local onde foram realizadas as análises citofluorométricas. O conteúdo do tubo de polietileno, ou seja, amostra obtida da bolsa de medula óssea com PBS e CPDA-1 foi aquele utilizado para a quantificação de células-tronco hematopoéticas e para a avaliação da viabilidade celular, que será abordada no item 2.3.5.

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 de polietileno, ambos contendo 200µL da amostra de medula óssea com

PBS e CPDA-1, 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 com solução salina tamponada com PBS por duas vezes. Ao final, adicionou-se 500µL de PBS em cada tubo e as amostras foram analisadas com o software FACSDiva no citômetro de fluxo FACSCANTO (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) para identificação e quantificação das células CD34+ (Figura 5).

A partir dos valores obtidos para a contagem global de células nucleadas e das células CD34+ realizou-se um cálculo para determinar a quantidade das mesmas por kilograma de peso, sendo possível obter, também, a quantidade de células nucleadas por kilograma de peso, como descrito abaixo:

- [(Número de eventos $CD34^+$ no tubo 1 + número de eventos $CD34^+$ no tubo 2) ÷ 2] ÷ 75.000 = *V*
- (Volume da bolsa de medula óssea x valor da contagem de células nucleadas obtido da bolsa de medula óssea) = $W \times 10^6$
- *(W* x 10^8) ÷ peso do animal = *Y* x 10^8 = *número de células nucleadas por kilo de peso vivo do paciente*
- $V \times Y = Z \times 10^8$
- $Z \times 10^8 \div 100 =$ *Z* x 10^6 = *número de células $CD34^+$ por kilo de peso vivo do paciente*

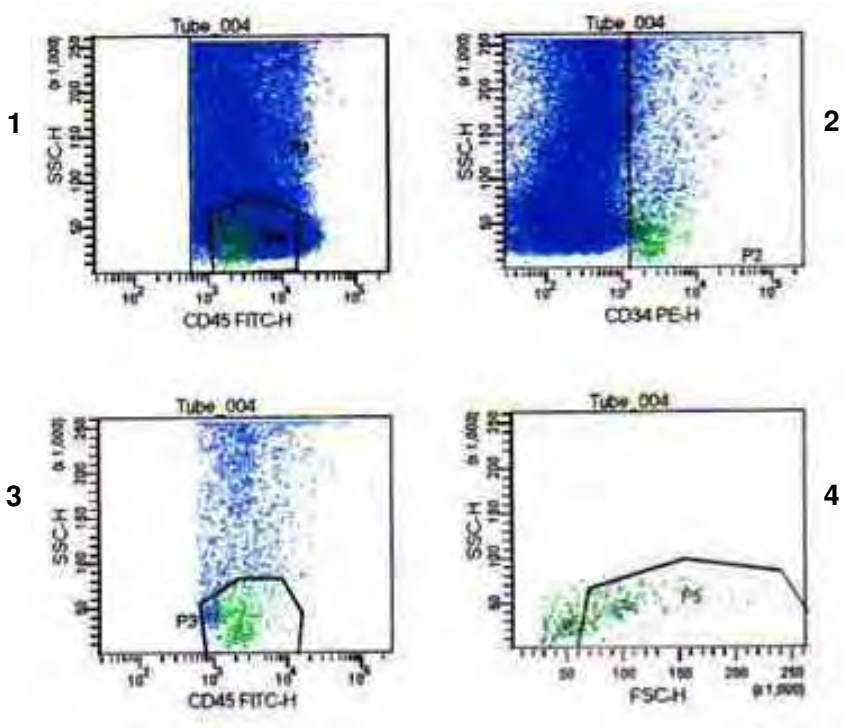


Figura 5: Quantificação de células-tronco hematopoéticas $CD34^+$ em amostra de medula óssea de cão (Animal 5), pela técnica de citometria de fluxo, utilizando-se o protocolo ISHAGE. Gráfico 1: CD45 FITC/SSC - P1: Exclusão de eventos CD45 negativos e células mortas. Gráfico 2: CD34 PE/SSC - P2: Inclusão de células CD34 positivas que se encontram na região P1. Gráfico 3: CD45 FITC/SSC das células $CD34^+$ - P3: Inclui as células com características de baixa granularidade e baixa a intermediária fluorescência para CD45. Gráfico 4: FSC/SSC - P5: Inclusão de todos os eventos que possuem características de células progenitoras com base nos gráficos anteriores. SSC: *Side-angle light scatter* e FSC: *Forward-angle light scatter* identificam características de granularidade e tamanho celular, respectivamente.

2.3.5 Viabilidade celular

Para a avaliação da viabilidade celular, pela técnica de citometria de fluxo, foram utilizados dois tubos, em cada um dos quais se adicionaram 200µL da amostra de medula óssea com PBS e CPDA-1. Os tubos foram então incubados com 2mL de solução de lise sem formol (Pharmlyse®, Pharmingen), para evitar a alteração da

membrana celular, por 15 minutos, protegidos da luz. Posteriormente, foi realizada e lavagem do material com PBS por duas vezes. Ato contínuo, ao tubo 1 adicionaram-se 400µL de PBS e ao tubo 2 400µL da solução tampão do kit Apoptest–FITC® (Dako) e 0,5µL de anexina (Apoptest–FITC®, Dako). Em seguida, os dois tubos foram incubados em um isopor com gelo, protegidos da luz, por 10 minutos. Após esse período, adicionaram-se 5µL de iodeto de propídeo (Apoptest–FITC®, Dako) ao tubo 2, e as duas amostras foram levadas para análise com o software FACSDiva no citômetro de fluxo FACSCANTO (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) para avaliação da viabilidade celular (Figura 6).

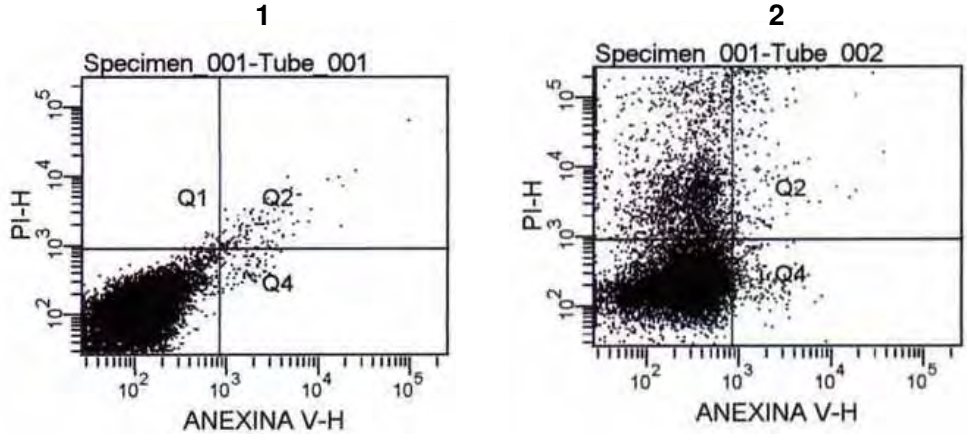


Figura 6: Avaliação da viabilidade celular pela técnica de citometria de fluxo em amostra de medula óssea de cão para transplante autólogo. O Gráfico 1 refere-se ao tubo controle. Gráfico 2: Distribuição de fluorescências Anexina V-FITC (A) *versus* Iodeto de Propídeo (PI). Q1 – Células mortas (A^-PI^+). Q2 – Células em estágio de necrose (A^+PI^+). Q3 – Células não apoptóticas ou viáveis (A^-PI^-). Q4 – Células em estágios iniciais de apoptose (A^+PI^-).

2.3.6 Congelamento das bolsas de medula óssea

As bolsas Cryocyte® contendo medula óssea foram acondicionadas em isopor com gelo reciclável e transportadas do Banco de Sangue Sertãozinho, na cidade de Sertãozinho - SP até a FCAV/UNESP-Jaboticabal – SP, em um tempo médio de 45 minutos. Iniciou-se então o processo de congelamento manual das bolsas de medula

óssea. Para tanto, foram colocadas por uma hora em refrigerador (4°C), depois em freezer (-4°C) por mais duas horas e finalmente em freezer -80°C, instalado no Brazilian Collection Clone (BCC) ou no Departamento de Reprodução Animal, ambos na FCAV/UNESP, onde permaneceram até seu descongelamento e infusão, quatro dias depois.

2.3.7 Regime de condicionamento não-mieloablativo

O condicionamento dos animais foi realizado no D-2, no Laboratório de Oncologia do SOV da FCAV/UNESP. O protocolo proposto para essa etapa foi modificado a partir do protocolo de Frimberger et al. (2006) e daquele utilizado para administração do quimioterápico ifosfamida (LANORE & DELPRAT, 2004). Seguiu-se o seguinte esquema:

- Fluidoterapia intravenosa com solução NaCl a 0,9% (Glicolabor), à fração de 10 mL/kg/h) por 30 minutos.
- Infusão de Mesna (Mitetan® 100 mg/mL, Baxter Oncology) por via intravenosa, com o intuito de prevenir a cistite hemorrágica causada pela ciclofosfamida, sendo a dose utilizada de 40% da dose da ciclofosfamida.
- Administração de Ondansetrona (0,1 – 0,22 mg/kg, Vonau®, Biolab) por via oral, sendo a mesma dose repetida oito horas depois.
- Infusão da ciclofosfamida (Cycram®, Meizler). Dois animais receberam a dose de 400 mg/m^2 e para os outros cinco a dose utilizada foi de 500 mg/m^2. Para tanto, o frasco contendo um grama de ciclofosfamida foi diluído com 50mL de água para injeção, sendo a referida diluição realizada em um fluxo laminar. Após a homogeneização da solução, a quantidade desejada foi transferida para um frasco de 125mL de solução NaCl a 0,9% (Glicolabor) e administrada aos animais por via intravenosa.
- Após o término da infusão da ciclofosfamida, foi administrado furosemida (Teuto), na dose de 2 mg/kg.

- A fluidoterapia continuou por cinco horas, na mesma velocidade citada anteriormente, e a aplicação da Mesna foi repetida nas segunda e quinta horas após o término da administração da ciclofosfamida.

Durante todo esse período foram realizados alguns intervalos para que os animais pudessem beber água e urinar, e após o término do procedimento os cães retornaram para suas casas.

2.3.8 Descongelamento das bolsas de medula óssea

No D0, as bolsas de medula óssea foram retiradas do freezer (-80°C) e colocadas imediatamente em banho-maria a 37°C, no Laboratório de Oncologia do SOV da FCAV/UNESP. Após o descongelamento, retirou-se 1,5mL das bolsas de medula óssea para realização das mesmas avaliações conduzidas no pré-congelamento. A contagem global de células nucleadas, assim como descrito anteriormente, foi realizada com o auxílio de um contador automático de células ABC Vet (HORIBA ABX, São Paulo, SP, Brasil), no Laboratório de Patologia Clínica do HV "GLN" da FCAV-UNESP. A preparação das amostras para a quantificação de células CD34+ e avaliação da viabilidade celular, pela técnica de citometria de fluxo foi realizada no Laboratório supracitado. Em seguida, as amostras foram transportadas, em isopor contendo gelo reciclável, em um tempo médio de uma hora, para o Laboratório de Citometria de Fluxo da FCF/USP de Ribeirão Preto-SP. Realizaram-se os mesmos cálculos, citados anteriormente, para determinar a quantidade de células nucleadas e células CD34+/kg de peso do paciente.

2.3.9 Infusão da medula óssea

Imediatamente após o descongelamento das bolsas, foi realizada a infusão da medula óssea no Laboratório de Oncologia do SOV da FCAV/UNESP. Os animais receberam primeiramente fluidoterapia intravenosa à base de NaCl a 0,9% (Glicolabor) por 30 minutos, na fração de 10 mL/kg/h. Administrou-se Ondansetrona (Vonau®,

Biolab) na dose de 0,1 – 0,22 mg/kg por via oral antes do início da infusão e este foi repetido oito horas depois. Para a infusão da medula óssea, utilizou-se um equipo para infusão de sangue (Embramed). Durante tal procedimento, os animais foram avaliados freqüentemente quanto aos seus sinais vitais.

Após o término da transplantação os animais continuaram a ser monitorados e a receber fluidoterapia pelo tempo mínimo de 40 minutos, para posteriormente retornarem às suas casas.

2.3.10 Avaliação das toxicidades decorrentes do TMO autólogo

As toxicidades decorrentes do TMO foram classificadas em hematológicas e não hematológicas e enquadradas em graus segundo critérios já estabelecidos por Frimberger et al. (2006), como pode ser visualizado no Quadro 1.

Consideraram-se como toxicidades hematológicas a neutropenia e trombocitopenia, decorrentes da mielossupressão causada pela ciclofosfamida, e estas foram avaliadas por meio de hemogramas realizados com o auxílio de um contador automático de células ABC Vet (HORIBA ABX, São Paulo, SP, Brasil). Os hemogramas foram confeccionados ao longo de 28 dias, após o transplante de medula óssea com variações de datas para cada animal, num total de 10 a 13 hemogramas por animal. As alterações celulares foram interpretadas com base nos valores de referência descritos por Meinkoth & Clinkerbeard (2000).

Um fator estimulador de colônia de granulócitos (Filgrastin®, Blausiegel) foi administrado aos animais, na dose de 5 µg/kg/dia, por via subcutânea, durante quatro dias consecutivos após o transplante com o intuito de acelerar a reconstituição hematopoética. A data de início da administração do Filgrastin® variou para cada animal em virtude da resposta individual das contagens neutrofílicas. Dessa forma, o medicamento foi administrado nos dias D+3 a D+4 para o Animal 1, D+4 a D+8 para o Animal 2 e D+5 a D+9 para os Animais 4, 5 e 6. Os Animais 3 e 7 não receberam o referido fármaco.

A toxicidade vesical, alterações de apetite, ocorrência de vômitos e/ou diarréia, ou seja, as toxicidades não-hematológicas foram avaliadas a partir da administração da ciclofosfamida (D-2). A toxicidade vesical foi constatada por meio de urinálises, realizadas após o término da infusão da ciclofosfamida (D-2), e antes e após a infusão da medula óssea (D0), além da observação da coloração da urina. Os demais efeitos tóxicos foram avaliados por meio da observação dos animais, sendo os proprietários instruídos para tanto quando os cães encontravam-se em suas residências.

Quadro 1: Critérios de Toxicidade (adaptado de Frimberger et al., 2006).

Efeito tóxico e Grau	**Critério**
Neutropenia	Neutrófilos/µL
1	1.500-3.000
2	1.000-1.500
3	500-1.000
4	<500
Trombocitopenia	Plaquetas/µL
1	100.000-200.000
2	50.000-100.000
3	15.000-50.000
4	<15.000
Urotelial	Descrição
1	Hematúria microscópica
2	Hematúria macrocópica, sem disúria
3	Hematúria e disúria, auto-limitante
4	Hematúria e disúria necessitando tratamento
Apetite	Descrição
1	Inapetência
2	Anorexia <3 d de duração
3	Anorexia >3 d, mas <5 d de duração
4	Anorexia >5 d de duração
Vômito	Descrição
1	Náusea
2	Esporádico, auto-limitante
3	1-5 episódios/d, <2d
4	6-10 episódios/d; hospitalização
Diarréia	Descrição
1	Fezes amolecidas
2	Diarréia líquida 1-4 episódios/d, <2d
3	Diarréia líquida 4-7 episódios/d ou >2d
4	Diarréia líquida >7 episódios/d; hospitalização.

2.3.11 Seguimento clínico dos animais

Decorrido o primeiro mês pós-TMO, os animais transplantados foram submetidos a avaliações clínicas periódicas, em intervalos de aproximadamente 30 dias. Como os transplantes foram realizados em épocas distintas para os sete cães ao longo de 13 meses, o período total de seguimento clínico variou para cada animal. Dessa forma, os cães foram acompanhados por um tempo mínimo de seis meses e máximo de 18 meses. Os cães foram enquadrados conforme sua resposta ao TMO em remissão completa ou recidiva do linfoma. A variável duração da remissão, em dias, foi considerada do D0 até a ocorrência de recidiva. A variável tempo total de sobrevida, também em dias, foi considerada do D0 até o óbito.

2.4 Análise estatística

Os valores obtidos de células nucleadas/kg e células CD34/kg, assim como os valores de células viáveis, antes do congelamento e após o descongelamento das bolsas de medula óssea foram comparados entre si por meio de um teste T pareado, utilizando-se para tanto o software GraphPad Instat®. Em todas as análises, considerou-se significativo o valor de $p<0,05$. As variáveis nadir de neutrófilos segmentados e de plaquetas foram analisadas pela estatística descritiva básica.

3. Resultados e Discussão

3.1 Quimioterapia e evolução clínica dos animais antes do TMO

Todos os cães foram submetidos ao protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin pelo tempo mínimo de nove semanas, de modo que cinco cães receberam oito sessões de quimoterapia previamente ao TMO. Dois animais receberam uma dose adicional de quimioterápico antes do transplante, um dos quais recebeu vincristina (Animal 1), na dose de 0,75 mg/m^2 e outro recebeu lomustina (Animal 4) (80 mg/m^2) na

tentativa de reindução da remissão uma vez que este apresentou recidiva da doença na oitava semana do protocolo quimioterápico. A segunda remissão completa (RC) foi obtida com sucesso.

O Animal 6 foi submetido à quimioterapia após a excisão cirúrgica do nódulo cutâneo localizado no pavilhão auricular esquerdo. Por não apresentar outras alterações clínicas o cão foi considerado como em RC da doença desde o início do protocolo de Madison-Wisconsin. Com relação aos demais animais, a primeira RC foi obtida em cinco cães após uma a três sessões de quimioterapia. O Animal 4 foi o único animal a manifestar recidiva do linfoma durante a execução do protocolo de quimioterapia, como descrito acima.

Um dos cães (Animal 3), com linfoma cutâneo, apresentou remissão parcial (RP) durante todo o período do protocolo quimioterápico, pois um dos nódulos cutâneos não apresentou modificação em seu aspecto e tamanho durante dez semanas. Realizou-se a excisão cirúrgica do nódulo por ocasião da colheita de medula óssea. A análise histopatológica do mesmo reafirmou o diagnóstico de linfoma. As características gerais e evolução clínica dos animais durante a quimioterapia encontram-se no Quadro 2.

3.2 Avaliação pré-TMO

Definiu-se a condição da doença para cada animal, de modo que seis deles apresentavam-se em RC e um em RP (Animal 3). 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 quantidade satisfatória de megacariócitos, e isentas de componente linfomatoso. Apenas um cão (Animal 4) apresentou medula óssea hipocelular e com relação M:E flagrantemente diminuída, mas sem a presença de células neoplásicas. Os valores individuais obtidos do hemograma dos cães, confeccionado nesta ocasião encontram-se no Apêndice B (Tabelas 1 a 7).

Quadro 2: Características gerais de sete cães no momento do diagnóstico do linfoma e evolução clínica ao longo do tratamento quimioterápico, ou seja, fase de indução da remissão do protocolo de Madison-Wisconsin, antes de serem submetidos ao transplante autólogo de medula óssea.

Animal	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
Raça, idade, sexo e peso	Rottweiler, 3,5 anos, F, 34,3 kg	SRD, seis anos, F, 39 kg	Rottweiler, nove anos, M, 35,5 kg	SRD, oito anos e 10 meses, M, 28,8 kg	Labrador, 6,5 anos, M, 29 kg	Cocker Spaniel, nove anos, F, 13,1 kg	Golden Retriever, três anos, F, 35 kg
Classificação do linfoma	Cutâneo Vb	Extranodal (cardíaco) Vb	Cutâneo Va	Cutâneo Va	Multicêntrico IIb	Cutâneo Va	Multicêntrico Vb
Quadro Clínico♣ e Diagnóstico	Nódulo cutâneo. PAAF	Efusão pericárdica; hepatomegalia. PAAF	Nódulos cutâneos; linfonodo subescapular. PAAF e HT	Nódulos cutâneos. HT	Linfonodos poplíteos e submandibulares. PAAF	Nódulo cutâneo. HT	Linfonodos submandibulares e poplíteos; medula óssea e sangue periférico. PAAF
Tempo de evolução da doença	Um mês	Dois dias	15 dias	Um ano	Um mês	Três meses	Uma semana
Evolução clínica ao longo do tratamento	RC após uma sessão de quimioterapia. Sem recidivas	RC após três sessões de quimioterapia. Sem recidivas	RP após uma sessão de quimioterapia. Sem recidivas	RC após três sessões de quimioterapia. Recidiva após seis semanas. Reindução da remissão com Lomustina (80mg/m^2) atingindo nova RC	RC após a primeira sessão de quimioterapia. Sem recidivas	*	RC após duas sessões de quimioterapia. Sem recidivas

♣ O quadro clínico refere-se às alterações físicas observadas no momento do diagnóstico e relacionadas com o envolvimento do linfoma.
F: fêmea; M: macho; PAAF: punção aspirativa com agulha fina; HT: histopatológico; RC: remissão completa; RP: remissão parcial.
* Animal em remissão completa desde o início do tratamento após excisão cirúrgica de nódulo cutâneo.

3.3 Transplante autólogo de medula óssea

3.3.1 Colheita de medula óssea

Durante o procedimento de colheita de medula óssea o volume final de 10 mL/kg foi obtido em todos os cães, em alguns mais facilmente do que em outros. Em todos os animais os únicos locais puncionados foram as cristas ilíacas. Para pacientes humanos, as cristas ilíacas anteriores e posteriores são os locais de escolha para colheita de medula óssea e posterior transplantação (PATTERSON, 1995a). Entretanto, para cães com linfoma submetidos ao TMO autólogo, Frimberger et al. (2006) relataram maior facilidade de colheita no úmero. O tempo médio despendido para a colheita de medula óssea, no presente estudo, foi de aproximadamente uma hora.

O procedimento de colheita de medula óssea é frequentemente descrito como uma forma traumática de obtenção de CTH, com possibilidades de complicações relacionadas à anestesia, infecções e principalmente, dor nos locais de punção (PATTERSON, 1995a). No presente estudo, um animal (Animal 6) apresentou dor no local da punção, por dois dias consecutivos, mesmo sendo medicado com cloridrato de tramadol, como descrito no item 2.2.2. do Material e Métodos.

3.3.2 Processamento das bolsas de medula óssea

A etapa de processamento das bolsas de medula óssea foi a mais difícil de ser efetuada, e também a mais longa, com uma duração média de seis horas. Entretanto, à medida que os transplantes eram realizados, os procedimentos tornavam-se mais facilmente exeqüíveis. Uma dificuldade não relacionada à experiência dos operadores referiu-se a etapa de depleção de hemácias. De acordo com Patterson (1995b), esse procedimento deve ser realizado antes do congelamento de medula óssea autóloga. Pequenas quantidades de células vermelhas remanescentes nas bolsas não são prejudiciais. Entretanto, grandes quantidades relacionam-se com maior risco de reação após infusão autóloga (PATTERSON, 1995b), em virtude da hemólise que ocorre

durante o congelamento (ATKINSON, 1995) com possibilidade, inclusive, de promover falência renal aguda (DAVIS & ROWLEY, 1990).

Dessa forma, utilizou-se neste trabalho o agente hidroxietilstarch (HES), na proporção de 1:5, que além de efeito crioprotetor (PATTERSON, 1995b), promove a formação de *rouleaux* de hemácias e acelera sua sedimentação (DAVIS & ROWLEY, 1990). Para alguns animais, entretanto, a sedimentação das células vermelhas não foi obtida com sucesso, havendo nesses casos pouca redução de volume. O volume final das bolsas de medula óssea após o processamento apresentou grande variação, com valor médio e desvio-padrão de 124,4 ± 63,7mL, e valores mínimo e máximo de 37 e 230mL, respectivamente. Fato causado, provavelmente, pela variação na quantidade de células vermelhas retiradas das bolsas durante a etapa de depleção de hemácias. É possível que a adição de uma maior quantidade do agente HES às bolsas de medula óssea caninas facilite a depleção de hemácias das mesmas.

3.3.3 Regime de condicionamento não-mieloablativo

No presente estudo, optou-se, preventivamente, por administrar a ciclofosfamida na dose de 400 mg/m^2 para o primeiro animal transplantado (Animal 1). Com embasamento nos experimentos conduzidos por Frimberger et al. (2006), os resultados observados após o primeiro transplante, deste estudo, permitiram que a dose fosse aumentada para 500 mg/m^2 para os demais cães. Entretanto, para o Animal 4, tendo em vista as condições de leucopenia (Apêndice 4B) e hipoplasia medular (item 3.2 do Resultados e Discussão), que este cão se encontrava por ocasião da avaliação pré-TMO, julgou-se prudente utilizar a menor dose do anti-neoplásico, como efetuado para o Animal 1.

Por ocasião da etapa de condicionamento (D-2) notou-se a ocorrência de recidiva do linfoma no Animal 4, observada pelos proprietários no dia anterior e caracterizada pelo aparecimento de um nódulo de pele de cerca de 2 cm de diâmetro, localizado no ombro direito. A PAAF do nódulo confirmou a recidiva. No dia seguinte à administração da ciclofosfamida houve regressão de 100% do tumor.

3.3.4 Infusão da medula óssea

A infusão intravenosa da medula óssea teve início imediatamente após o descongelamento das bolsas e foi efetuada o mais rapidamente possível, com o intuito de minimizar a morte celular, como sugerido por Patterson (1995a). A etapa de infusão neste estudo, realizada no D0, teve duração média de 51 minutos (limites, 25 – 95 minutos). Um animal (Animal 5) apresentou aparente reação de hipersensibilidade ao procedimento, com hipertermia (40°C) e inquietação verificados dez minutos após o término da infusão. O quadro clínico, entretanto, se normalizou em cerca de 30 minutos, sem o uso de medicamentos. Outras reações observadas foram: coloração avermelhada da urina, observada em dois dos sete animais; vômitos, observados em três animais, e diarréia observada em um animal. Quatro cães apresentaram forte odor de DMSO após a infusão, com duração máxima de um dia.

3.4 Influência do congelamento

Os valores individuais de células nucleadas/kg, células $CD34^+$/kg e células viáveis (%), obtidas nos momentos pré e pós-congelamento encontram-se na Tabela 1.

O valor médio e desvio-padrão de células nucleadas obtidas das bolsas de medula óssea antes do congelamento foram de 0,99 ± 0,46 x 10^8/kg (valores mínimo e máximo, 0,36 e 1,66 x 10^8/kg, respectivamente); enquanto que após o descongelamento o valor médio e desvio-padrão foram de 0,81 ± 0,38 x 10^8/kg (valores mínimo e máximo, 0,31 e 1,42 x 10^8/kg, respectivamente). A diferença entre os valores médios obtidos antes e após o congelamento não foi significativa ($p \geq 0,05$). As quantidades individuais de células nucleadas x 10^8/kg de peso do paciente, obtidas antes do congelamento e após o descongelamento das bolsas de medula óssea dos Animais 1, 3, 4, 5, 6 e 7 encontram-se na Figura 7. Não foi possível quantificar as células nucleadas/kg antes do congelamento para o Animal 2 por problemas de ordem técnica.

Independentemente do processo de congelamento das bolsas de medula óssea, os valores médios de células nucleadas por kilograma de peso do paciente, obtidos no presente estudo foram inferiores aqueles relatados por Frimberger et al. (2006) para cães submetidos ao TMO autólogo. Os supracitados autores obtiveram uma média de 5,5 x10^8 células nucleadas/kg após o descongelamento das bolsas de medula óssea. Nas mesmas condições, e também para cães, outros autores relatam valores médios menores, da ordem de 1,8 x10^8 células nucleadas/kg (DEEG et al., 1985) e 1,3 x10^8 células nucleadas/kg (WEIDEN et al., 1979). Neste estudo, é possível que tenha ocorrido hemodiluição da medula óssea, apesar dos esforços para evitá-la, durante a colheita. Ademais, para o Animal 4, cujo valor de células nucleadas obtido antes do congelamento foi de 0,6 x 10^8/kg (Tabela 1), vale considerar a possível influência da condição de hipocelularidade visualizada nas preparações citoscópicas de medula óssea do mesmo, como descrito por Davis & Rowley (1990).

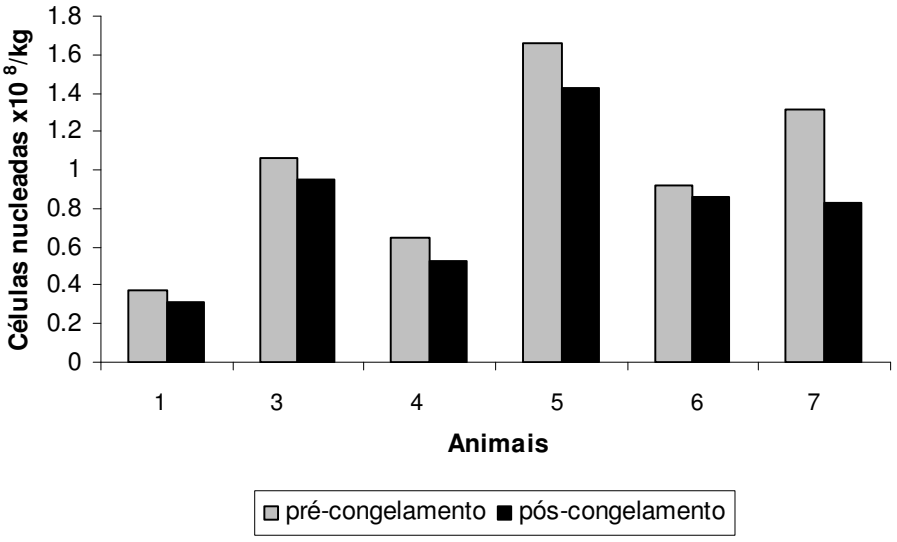


Figura 7: Quantidade de células nucleadas x10^8/kg de peso do paciente, nos momentos pré e pós-congelamento das bolsas de medula óssea de cinco cães em fase de remissão tumoral do linfoma, submetidos ao transplante autológo (p=0,05).

Tabela 1: Informações individuais relacionadas às etapas de condicionamento e infusão da medula óssea, valores de células nucleadas/kg, células $CD34^+$/kg e células viáveis obtidos das bolsas de medula óssea nos momentos pré e pós congelamento, e evolução clínica após transplante autólogo de medula óssea de sete cães previamente submetidos à poliquimioterapia para tratamento do linfoma.

Paciente	1	2	3	4	5	6	7
Número de sessões de quimioterapia pré-TMO	Nove	Oito	Oito	Nove	Oito	Oito	Oito
Status no TMO	RC	RC	RP	RC	RC	RC	RC
Dose de ciclofosfamida no condicionamento (mg/m^2)	400	500	500	400	500	500	500
Volume da bolsa de medula óssea na infusão (mL)	34	112,5	98,5	91	227	103,6	182
Células nucleadas $x10^8$/kg pré-congelamento	0,364	Nd	1,059	0,643	1,668	0,917	1,314
Células nucleadas $x10^8$/kg pós-congelamento	0,316	2,055	0,951	0,528	1,425	0,863	0,832
Células $CD34^+$ $x10^6$/kg pré-congelamento	Nd	Nd	0,022	0,010	0,400	0,051	0,245
Células $CD34^+$ $x10^6$/kg pós-congelamento	Nd	Nd	0,013	0,004	0,165	0,024	0,244
Células viáveis (%) pré-congelamento	96,2	Nd	84,9	91,1	89,2	63,7	Nd
Células viáveis (%) pós-congelamento	96,0	Nd	79,7	90,3	87,2	58,9	73
Aplicação do Filgrastin®	D+3 a D+6	D+4 a D+7	*	D+5 a D+8	D+5 a D+8	D+5 a D+8	*
Seguimento e evolução clínica pós-TMO	RC no D+551	RC no D+504	Recidiva no D+178. Óbito no D+180	Recidiva no D+12. Óbito no D+304	Recidiva no D+40. Óbito no D+95	RC no D+186	Recidiva no D+87. Óbito no D+144

RC: remissão completa; RP: remissão parcial; Nd: não determinado; D+: dias pós-TMO; * Não foi aplicado o Filgrastin®.

Os valores médios e desvios-padrão de células-tronco hematopoéticas $CD34^+$, obtidas das bolsas de medula óssea antes e após o congelamento, foram de 0,145 ± 0,171 x 10^6/kg (valores mínimo e máximo, 0,010 e 0,245 x 10^6/kg, respectivamente) e 0,09 ± 0,108 x 10^6/kg (valores mínimo e máximo, 0,004 e 0,244 x 10^6/kg, respectivamente), respectivamente. A diferença nos dois momentos não foi significativa ($p>0,05$). As quantidades individuais de células $CD34^+$ x10^6/kg obtidas nos momentos pré e pós congelamento encontram-se na Figura 8. A quantificação das células-tronco hematopoéticas $CD34^+$ não foi realizada para os Animais 1 e 2 devido a problemas de ordem técnica.

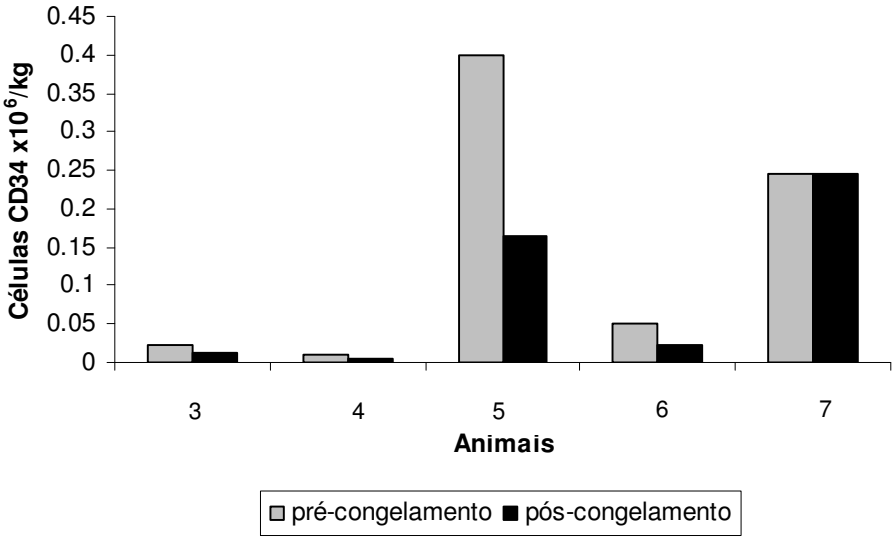


Figura 8: Quantidade de células-tronco hematopoéticas $CD34^+$ x10^6/kg de peso do paciente, nos momentos pré e pós-congelamento das bolsas de medula óssea de cinco cães em fase de remissão tumoral do linfoma, submetidos ao transplante autológo ($p=0,28$).

Poucos estudos utilizaram o protocolo ISHAGE, de dupla marcação, para quantificar células tronco-hematopoéticas $CD34^+$ caninas pela técnica de citometria de fluxo, como os de Nakage et al. (2008), no SCU, e Tsumagari et al. (2007), na medula óssea, sangue periférico e SCU. McSweeney et al. (1998), pioneiros na produção do anticorpo monoclonal específico para o CD34 canino, relatam que na medula óssea de

cães essas células correspondem a 1 a 3% dos leucócitos. Entretanto, os autores, ao realizarem a citometria de fluxo, não utilizaram ensaios de plataforma dupla, ou seja, com dupla marcação para $CD45^{+}/CD34^{+}$. O anticorpo monoclonal anti-CD45 é o marcador de escolha para a população pan-leucocitária (COBBOLD & METCALF, 1994), e, para um melhor caracterização das CTH é importante identificar populações que sejam CD34 de alta expressão e CD45 de baixa expressão, descritas como $CD45^{lo}CD34^{hi}$ (TSUMAGARI et al., 2007). Ao quantificarem CTH com essas características, Tsumagari et al. (2007) relataram encontrar 0,3% dessas células na medula óssea de cães adultos.

No presente ensaio, a utilização do protocolo ISHAGE pela citometria de fluxo possibilitou a quantificação de CTH caninas com baixa expressão de CD45 e alta expressão de CD34 nas amostras provenientes das bolsas de medula óssea. Não foram encontrados estudos que revelassem a quantificação das referidas células-tronco em bolsas de medula óssea de cães, em condições similares de metodologia do presente trabalho. Portanto, pesquisas adicionais são necessárias para investigar a quantidade de CTH $CD34^{+}$ presentes nos enxertos de medula óssea de cães destinados a transplantação.

Os valores médios e desvios-padrão de células viáveis obtidas das bolsas de medula óssea, antes do congelamento e após o descongelamento foram 85,0 ± 12,5% (valores mínimo e máximo, 63,7 e 96,2%, respectivamente) e 80,8 ± 13,4% (valores mínimo e máximo, 58,9 e 96,0%, respectivamente), respectivamente. A diferença entre os valores obtidos nos dois momentos não foi significativa ($p>0,05$) (Figura 9). Não foi realizada a avaliação da viabilidade celular para o Animal 2, e para o Animal 7 esta análise foi realizada somente no pós-congelamento.

Os resultados observados com relação à viabilidade celular no presente estudo são similares àqueles relatados por Frimberger et al. (2006), que obtiveram um valor médio de 83,3% de células viáveis após o descongelamento de bolsas de medula óssea de 28 cães com linfoma antes do TMO autólogo. No ensaio desenvolvido pelos supracitados autores, as bolsas de medula óssea permaneceram congeladas em freezer a -80°C por duas semanas, e não foi estimada a viabilidade das bolsas antes do

congelamento. Entretanto, para avaliar a referida viabilidade, os autores utilizaram um ensaio de integridade de membrana com o corante Azul de Trypan. Esse método é comumente utilizado nos ensaios de viabilidade celular, porém, é prejudicado caso haja grande quantidade de eritrócitos na amostra. O mesmo não ocorre quando se utiliza o corante iodeto de propídeo, que ao penetrar em células com danos de membrana, se liga ao DNA e ao RNA (YANG et al., 2003).

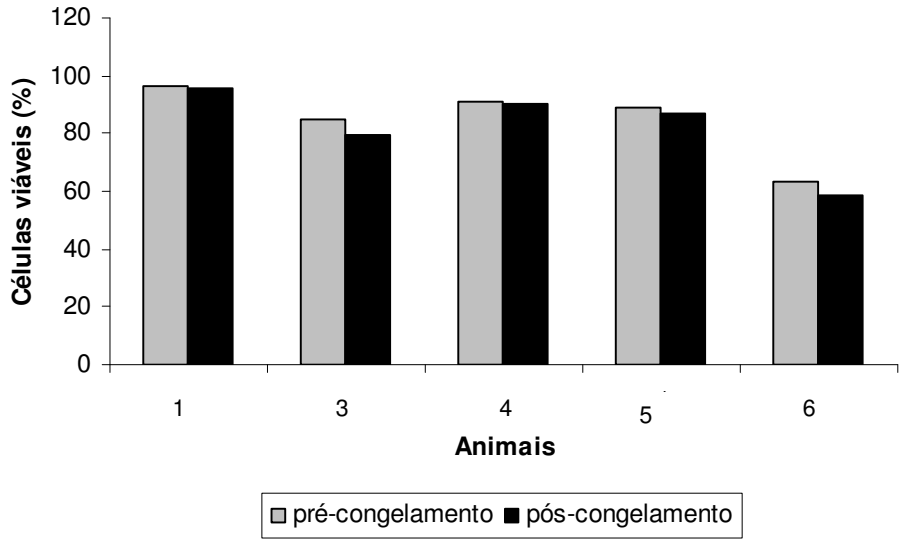


Figura 9: Viabilidade celular (%) de amostras obtidas das bolsas de medula óssea de cinco cães em fase de remissão tumoral do linfoma, submetidos ao transplante autológo, nos momentos pré e pós-congelamento (p=0,06).

Ensaios de viabilidade celular são importantes nos TCTH, já que a quantidade de células viáveis recebidas pelo paciente guarda relação com a velocidade de recuperação hematopoética (ALLAN et al., 2002; LEMOLI et al., 2003; YANG et al., 2003). A utilização da proteína Anexina V juntamente com ensaios de integridade de membrana celular adiciona informações sobre populações de células apoptóticas (ANTHONY et al., 1998). Células em apoptose reagem com Anexina V antes de suas membranas plasmáticas se tornarem permeáveis a corantes como o iodeto de propídeo (DARZYNKIEWICZ et al., 2001). Dessa forma, no presente trabalho, o estudo da viabilidade celular das amostras obtidas das bolsas de medula óssea canina permitiu excluir, além das células mortas, aquelas em estágios de apoptose, ou seja,

caracterizadas como Anexina$^-$Iodeto de propídeo$^-$ (A^-PI^-). De acordo com Anthony et al. (1998), é incerto o efeito de grandes quantidades de células apoptóticas sobre o sucesso da reconstituição hematopoética de pacientes submetidos a transplantes. Entretanto, afirmam que essas células, por apresentarem moléculas de fosfatidilserina expostas em suas membranas plasmáticas, sejam reconhecidas e removidas pelo sistema reticulo-endotelial.

A escolha dos agentes crioprotetores, assim como as condições de estocagem e o processo de descongelamento são importantes fatores a serem considerados durante a etapa de criopreservação de enxertos de medula óssea, relacionados com a possível perda de células (DAVIS & ROWLEY, 1990).

A formação de cristais de gelo intracelulares e extracelulares durante o processo de criopreservação é a principal causa de destruição celular e retardo na recuperação hematológica após a infusão das células descongeladas (MASSUMOTO et al., 1997). O DMSO, um agente crioprotetor penetrante, é efetivo quando utilizado na concentração de 5 a 10% (PATTERSON, 1995b) e seu benefício é atribuído à diminuição do volume de água para a formação de cristais de gelo com conseqüente redução do grau de desidratação das células (MASSUMOTO et al., 1997). No presente trabalho, utilizou-se o DMSO em uma concentração final de 10%, em relação ao volume total contido nas bolsas de medula óssea. O mesmo foi descrito por outros autores no que diz respeito à adição do referido crioprotetor às bolsas de medula óssea canina (STORB et al., 1969; WEIDEN et al., 1979; DEEG et al., 1985; FRIMBERGER et al., 2006).

Em medicina, a técnica padrão para criopreservação de CTH inclui a utilização de câmaras de congelamento programável e subseqüente estocagem em nitrogênio líquido a -196°C. Dessa forma as CTH podem ser estocadas sem danos a viabilidade por até 11 anos (GALMES et al., 1999). Entretanto, diversas técnicas de congelamento mecânico foram desenvolvidas, sem o uso de aparelhos de controle programáveis (PATTERSON, 1995). Nesse sentido, Galmes et al. (1999) afirmam que as bolsas de medula óssea humana podem ser criopreservadas em freezers mecânicos -80°C, como foi efetuado neste trabalho, por até seis meses.

3.5 Avaliação das toxicidades decorrentes do TMO autólogo

3.5.1 Toxicidades não-hematológicas

Quanto às toxicidades não-hematológicas, ou seja, toxicidade vesical, alterações relacionadas ao apetite e ocorrência de vômitos e diarréia, todas ocorreram a partir da data da infusão da medula óssea, ou seja, a partir do D0. Essas alterações estão descritas na literatura como reações adversas após infusão de medula óssea autóloga em seres humanos (ATKINSON, 1998).

As toxicidades não-hematológicas observadas neste estudo foram classificadas em graus de toxicidade, de acordo com o Quadro 1, como pode ser verificado no Quadro 3. Durante a infusão da medula óssea, um animal apresentou náuseas e outro vômitos esporádicos e auto-limitantes (Animais 7 e 1, respectivamente). O Animal 2 manifestou 1 a 5 episódios de vômitos, com menos de dois dias de duração, a partir do DO (toxicidade de grau 3), e foi o único animal no qual se observou diarréia, que se prolongou por dois dias. Alterações de apetite foram observadas em quatro animais, e variaram de inapetência a anorexia com menos de três dias de duração (toxicidades de grau 1 e 2, respectivamente).

Quadro 3: Avaliação de toxicidades não-hematológicas em cães previamente submetidos à poliquimioterapia para tratamento de linfoma, em fase de remissão tumoral após transplante autólogo de medula óssea.

	Graus de Toxicidade			
	Vesical	**Apetite**	**Vômito**	**Diarréia**
Animal 1	*	1	2	*
Animal 2	*	2	3	2
Animal 3	1	*	*	*
Animal 4	*	1	*	*
Animal 5	*	*	*	*
Animal 6	1	1	*	*
Animal 7	*	*	1	*

*Sem alteração.

A toxicidade vesical foi notada em dois dos sete animais (Animais 3 e 6), que apresentaram hematúria microscópica (toxicidade vesical de grau 1), visualizada no sedimento urinário dois dias após a administração da ciclofosfamida, porém antes do início da infusão da medula óssea. Para os animais supracitados, a toxicidade provavelmente decorreu da irritação da parede vesical causada por um metabólito inativo da ciclofosfamida, a acroleína, como asseverado por Lana (2003) e Chun et al. (2007). Entretanto, os animais não apresentaram disúria nem hematúria macroscópica, de modo que a alteração observada foi transitória e auto-limitante. Dessa forma, sugere-se que o protocolo de utilização do agente uroprotetor Mesna, juntamente com a administração de furosemida, foi eficaz no controle da cistite hemorrágica estéril causada pela ciclofosfamida em alta dose no presente estudo.

Os Animais 4 e 5 apresentaram coloração avermelhada da urina imediatamente após o término da infusão da medula óssea. A urinálise desses cães revelou ausência de hematúria. Dessa forma, é provável que a referida alteração da coloração da urina tenha ocorrido em virtude dos corantes presentes no meio adicionado às bolsas, e também devido à lise das hemácias durante a criopreservação, como descrito por Patterson (1995a) e Atkinson (1998).

Outro efeito colateral descrito na literatura, e observado em quatro cães neste ensaio, foi a exalação do odor pungente do DMSO por 24 a 72 horas após a infusão da medula óssea (ATKINSON, 1998). Fato decorrente da excreção do DMSO pelos pulmões (PATTERSON, 1995b).

3.5.2 Toxicidades hematológicas

A toxicidade hematológica foi avaliada por meio de hemogramas realizados após o transplante em datas que variaram para cada animal, em virtude da disponibilidade dos proprietários, e devido ao fato de nenhum deles residir na cidade de Jaboticabal, o que dificultou, portanto, o acesso aos cães. Por esse motivo, não é possível definir a duração da neutropenia ou trombocitopenia dos animais. Entretanto, é possível afirmar que o nadir médio e desvio-padrão dos neutrófilos segmentados, ou seja, a menor

contagem dessas células foi de 506 ± 269 células/μL (valores mínimo e máximo, 84 e 828 células/μL, respectivamente), e que ocorreu em três a sete dias pós-TMO (valores de referência, 3.000 – 11.500 células/μL). A neutropenia foi classificada em graus de toxicidade (Quadro 1) para cada animal, como pode ser verificado no Quadro 4. Os hemogramas completos dos cães após o TMO autólogo encontram-se no Apêndice B (Tabelas 1 a 7).

Quadro 4: Avaliação da neutropenia em cães, previamente submetidos à poliquimioterapia para tratamento de linfoma, em fase de remissão tumoral após transplante autólogo de medula óssea.

Animal	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4	Momento
1				X	D+3
2				X	D+3
3			X		D+7
4				X	D+6
5				X	D+4
6			X		D+6
7			X		D+7

D+: dias pós-TMO.

Ao observar as Figuras 10, 11 e 12, nota-se que a leucopenia foi causada principalmente pela diminuição da quantidade de neutrófilos segmentados. Tal achado reafirma o fato da neutropenia ser a primeira e mais freqüente alteração causada pela administração de quimioterápicos mielossupressores (LANORE & DELPRAT, 2004). Os efeitos deletérios dos agentes anti-neoplásicos mielossupressores refletem-se principalmente nas células que possuem meia-vida curta, como os neutrófilos (BARGER & GRINDEM, 2000). A ciclofosfamida, um anti-neoplásico da categoria dos agentes alquilantes, atua na replicação do DNA assim como na transcrição do RNA, de modo que sua interferência na fase de mitose do ciclo celular resulta em mielossupressão (BARGER & GRINDEM, 2000). Dessa forma, a principal manifestação da mielossupressão causada pela ciclofosfamida é a neutropenia, seguida da trombocitopenia e, menos comumente, anemia (O´KEEFE & HARRIS, 1990).

A variação da ocorrência do nadir dos neutrófilos segmentados foi influenciada pela administração do fator estimulador de colônias de granulócitos Filgrastin®. Como pode ser verificado na Figura 10, os dois primeiros cães submetidos ao TMO (Animais 1 e 2), apresentaram contagens muito baixas de leucócitos e neutrófilos segmentados no D+3 (2700 e 1800 leucócitos/µL e 432 e 500 neutrófilos segmentados/µL, respectivamente), no terceiro dia após o TMO. Dessa forma, iniciou-se o uso do Filgrastin® com o intuito de acelerar a recuperação hematológica, como medida preventiva para possíveis complicações que pudessem ocorrer, como a neutropenia séptica, por exemplo (O´KEEFE & HARRIS, 1990; LANORE & DELPRAT, 2004).

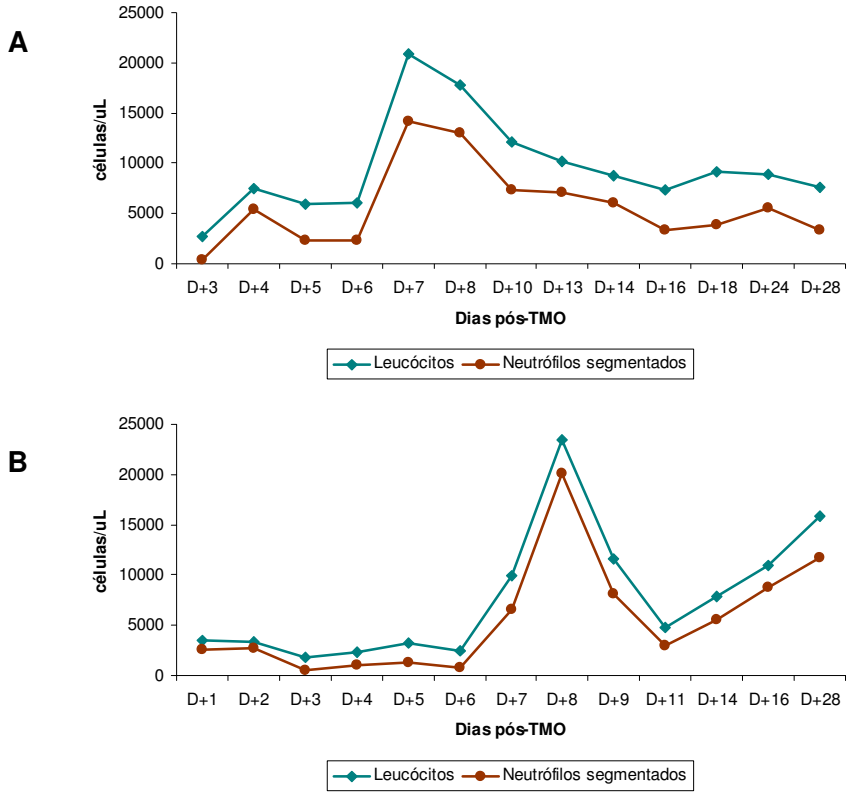


Figura 10: Contagem global de leucócitos e neutrófilos segmentados após transplante autólogo de medula óssea em cães previamente submetidos à poliquimioterapia para tratamento do linfoma. A: Animal 1. Administração do Filgrastin®: D+3 a D+7. B: Animal 2. Administração do Filgrastin®: D+4 a D+8. D+: dias pós-transplante de medula óssea.

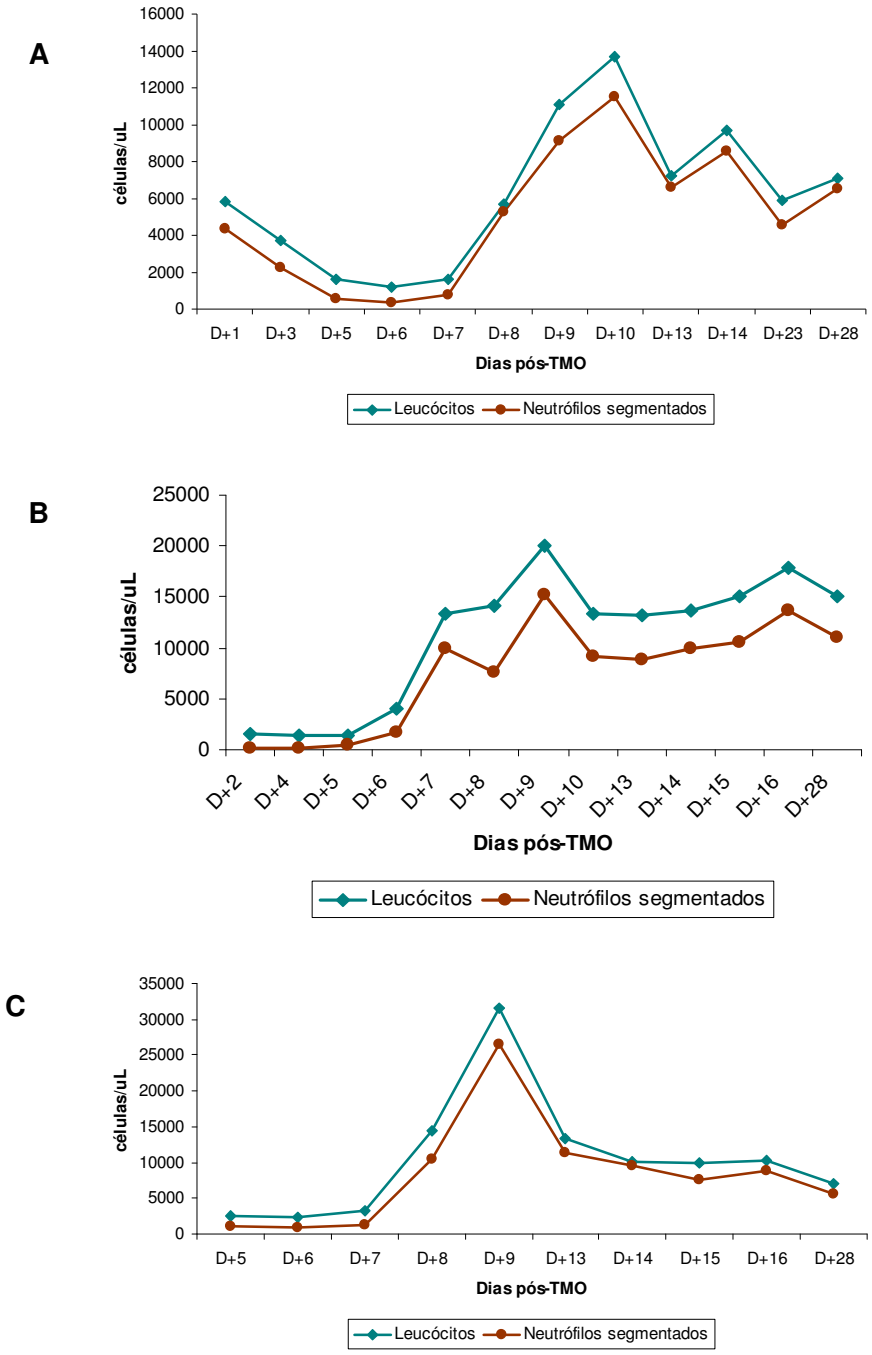


Figura 11: Contagem global de leucócitos e neutrófilos segmentados após transplante autólogo de medula óssea em cães previamente submetidos à poliquimioterapia para tratamento do linfoma. A: Animal 4. B: Animal 5. C: Animal 6. Administração do Filgrastin® para os três cães: D+5 a D+9. D+: dias pós-transplante de medula óssea.

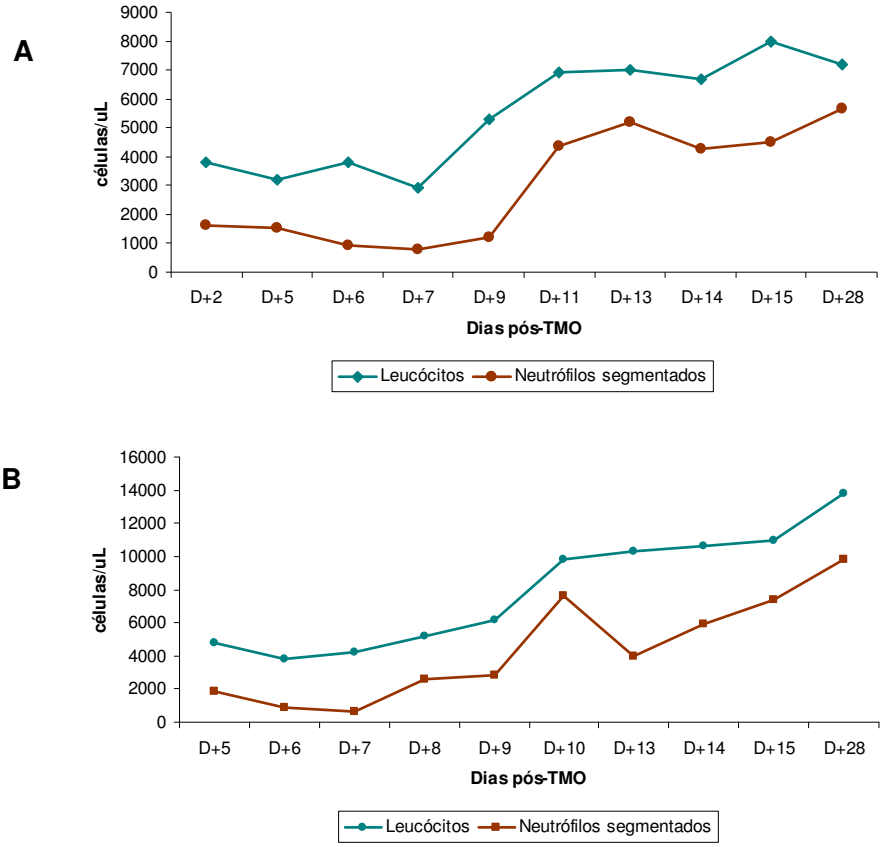


Figura 12: Contagem global de leucócitos e neutrófilos segmentados após transplante autólogo de medula óssea em cães previamente submetidos à poliquimioterapia para tratamento do linfoma. A: Animal 3. B: Animal 7. Não foi administrado Filgrastin® para ambos os cães. D+: dias pós-transplante de medula óssea.

O Animal 5 teve o nadir de neutrófilos segmentados no D+4 e os Animais 4 e 6 no D+6. Esses cães receberam o Filgrastin® do D+5 ao D+9 (Figura 11). Os Animais 3 e 7 não receberam o fator estimulador de colônias de granulócitos, e diferentemente dos outros cães, apresentaram o nadir de neutrófilos segmentados no D+7 (Quadro 4), ou seja, nove dias após a administração da ciclofosfamida. De acordo com a literatura, o nadir médio de neutrófilos segmentados ocorre sete dias após a administração da ciclofosfamida (MEDLEAU et al., 1983; LANORE & DELPRAT, 2004; VAIL & YOUNG, 2007). É possível que os animais que receberam o Filgrastin® apresentassem ainda declínio de suas contagens celulares se não o tivessem utilizado, entretanto, tendo em vista o risco de neutropenia séptica, optou-se, neste estudo pela segurança dos

animais. Comparando a Figura 12 com as Figuras 10 e 11, verifica-se que os cães que não receberam o Filgrastin® não apresentaram picos de contagens leucocitárias e neutrofílicas, sugerindo que o fármaco poderia ter sido utilizado por menos tempo, como por exemplo, por três dias ao invés de quatro.

Fatores de crescimento hematopoéticos, como o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), são usualmente utilizados em medicina humana para auxiliar a reconstituição hematológica após TCTH, autólogo ou alogênico (DELILIERS et al., 1998; FOSTER, 2006). No que diz respeito à recuperação hematológica pós-TMO dos cães deste estudo, não foi notada influência dos valores de células nucleadas, células $CD34^+$ e células viáveis no tempo decorrido para a normalização das contagens leucocitárias e neutrofílicas. Pode-se afirmar que em 11 dias após o TMO, ou seja, no D+11, todos os animais apresentavam valores de leucócitos e neutrófilos segmentados dentro da normalidade. Frimberger et al. (2006) relataram que o mesmo ocorreu em no máximo 15 dias pós-TMO. Os supracitados autores utilizaram o G-CSF recombinante canino, por sete dias consecutivos, anteriormente à colheita de medula óssea de cães, com a justificativa de facilitar o procedimento de colheita.

No presente estudo, o uso do Filgrastin® mostrou-se útil para alguns animais, e não foi necessário para outros. Estudos futuros poderão demonstrar a necessidade, assim como o momento e o tempo de utilização ideal desse medicamento em cães com linfoma, submetidos à mielossupressão e posterior TMO autólogo. Há necessidade de mais estudos para conhecer a influência da quantidade de células nucleadas e/ou CTH $CD34^+$ na velocidade de reconstituição hematológica de cães submetidos à quimioterapia não-mieloablativa e TMO autólogo.

Cinco cães apresentaram trombocitopenia após o transplante de medula óssea, sendo o nadir médio e desvio-padrão de plaquetas para os cinco animais de 111.600 ± 43.666 células/μL (valores mínimo e máximo, 48.000 e 149.000 células/μL, respectivamente), ocorrido cinco a oito dias pós-TMO (valores de referência, 200.000 – 500.000 células/μL). Um animal (Animal 1) apresentou contagem inferior a 50.000 células/μL (trombocitopenia de Grau 3) (Figura 13). Três cães apresentaram trombocitopenia de Grau 1 (Animais 2, 5 e 7) (Figuras 14, 15 e 16) com contagens de

plaquetas entre 100.000 e 200.000 células/µL e um cão (Animal 4) apresentou contagens entre 50.000 e 100.000 células/µL (trombocitopenia de Grau 2) (Figura 17) (Quadro 5). Nenhum animal apresentou sinais clínicos decorrentes da trombocitopenia. Esses resultados suportam a informação presente na literatura de que a toxicidade medular da ciclofosfamida atinge a linhagem megacariocítica em menor extensão (CHUN et al., 2007). Os resultados deste estudo corroboram com os achados de Frimberger et al. (2006), que relataram nadir médio de plaquetas de 128.000 células/µL ocorrido em cinco a dez dias pós-TMO.

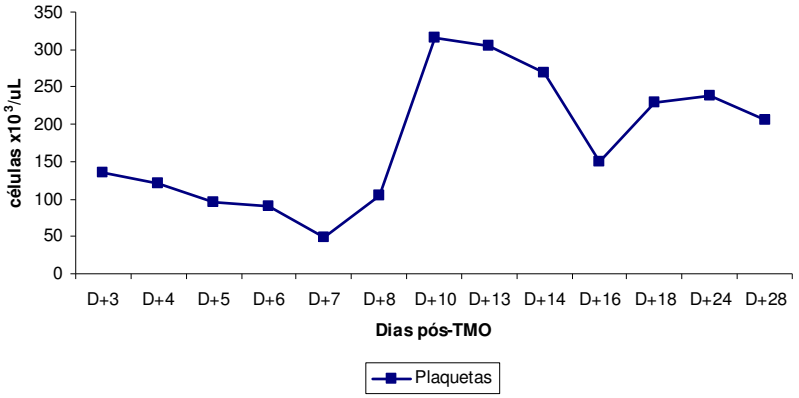


Figura 13: Contagem global de plaquetas após transplante autólogo de medula óssea de cão previamente submetido à poliquimioterapia para tratamento do linfoma. Animal 1. D+: dias pós-transplante de medula óssea.

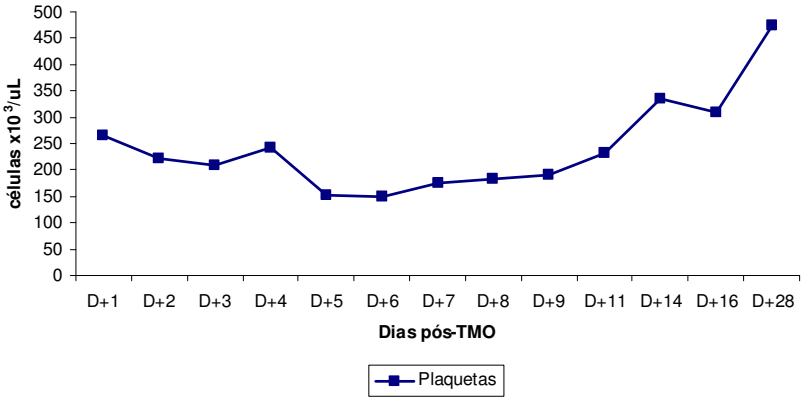


Figura 14: Contagem global de plaquetas após transplante autólogo de medula óssea de cão previamente submetido à poliquimioterapia para tratamento do linfoma. Animal 2. D+: dias pós-transplante de medula óssea.

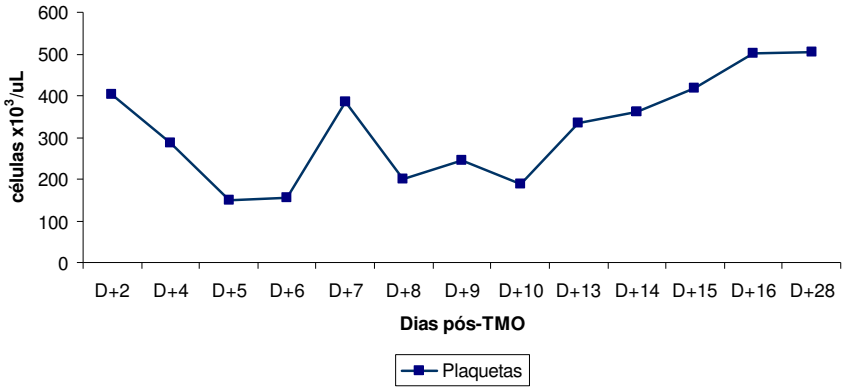


Figura 15: Contagem global de plaquetas após transplante autólogo de medula óssea de cão previamente submetido à poliquimioterapia para tratamento do linfoma. Animal 5. D+: dias pós-transplante de medula óssea.

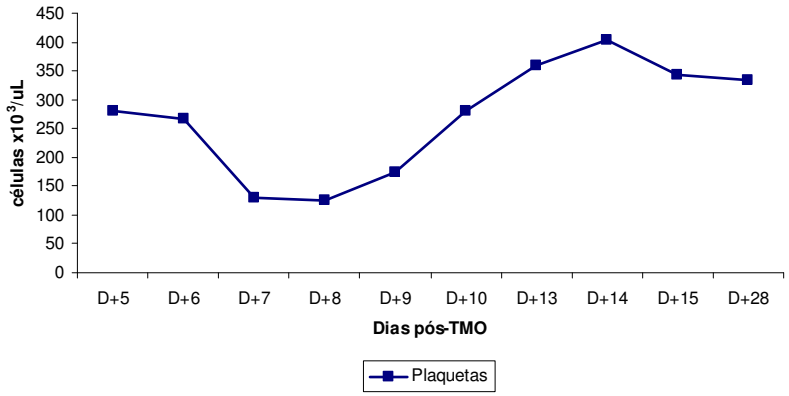


Figura 16: Contagem global de plaquetas após transplante autólogo de medula óssea de cão previamente submetido à poliquimioterapia para tratamento do linfoma. Animal 7. D+: dias pós-transplante de medula óssea.

Quadro 5: Avaliação da trombocitopenia em cães, previamente submetidos à poliquimioterapia para tratamento de linfoma, em fase de remissão tumoral após transplante autólogo de medula óssea.

Animal	Sem alteração	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4	Momento
1				X		D+8
2		X				D+6
3	X					-
4			X			D+5
5		X				D+5
6	X					-
7		X				D+8

D+: dias pós-TMO.

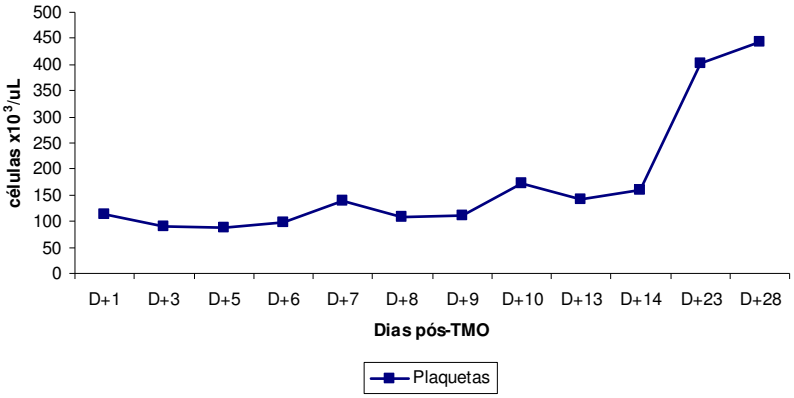


Figura 17: Contagem global de plaquetas após transplante autólogo de medula óssea de cão previamente submetido à poliquimioterapia para tratamento do linfoma. Animal 4. D+: dias pós-transplante de medula óssea.

3.6 Evolução clínica dos animais após o TMO autólogo

Os cães foram acompanhados por períodos diferentes, uma vez que os transplantes foram realizados em épocas distintas ao longo de 13 meses (Tabela 1). Os Animais 1 e 2 foram acompanhados por 18 e 17 meses pós-TMO, respectivamente, e permaneceram em remissão completa da doença durante todo o período.

No D+266 o Animal 2 foi submetido a uma cesariana e, na seqüência, ovariosalpingohisterectomia. Nasceram cinco filhotes sadios. A manutenção da função reprodutiva em cães submetidos à irradiação corpórea total não-mieloablativa seguida de transplante alogênico de medula óssea foi verificada por Bukholder et al. (2006). Os animais, portadores da deficiência de adesão leucocitária, foram submetidos ao TMO na fase pré-púbere (BAUER et al., 2004) e, cerca de três anos depois se observou a conservação da fertilidade, tanto nos machos quanto nas fêmeas (BUKHOLDER et al., 2006). Os agentes alquilantes, como a ciclofosfamida, são considerados mutagênicos com potencial de injúria às células germinativas, acarretando em maior risco de abortos e partos prematuros para mulheres submetidas a altas dose de quimioterapia pré-TMO (SANDERS et al., 1996). No presente estudo, pode-se afirmar que a dose não-mieloablativa de 500 mg/m^2 de ciclofosfamida não resultou em prejuízos no que diz respeito à fertilidade e desenvolvimento dos filhotes no Animal 2.

O Animal 3 veio a óbito subitamente no D+180. De acordo com o proprietário, o cão apresentou sinais clínicos de tosse e dispnéia. Foi levado a um colega médico veterinário na cidade onde tem residência o referido proprietário dois dias depois do início dos sintomas, e verificou-se a presença de efusão torácica e aumento dos linfonodos submandibulares. Foi administrada ao animal uma medicação diurética e este veio a óbito no mesmo dia. Infelizmente, o cão não foi trazido até a FCAV/UNESP – Jaboticabal para que se pudesse avaliá-lo. Entretanto, devido às informações fornecidas pelos proprietários e pelo colega médico veterinário que o atendeu, o cão apresentou uma recidiva extremamente agressiva do linfoma, levando-o ao óbito rapidamente.

O Animal 4 apresentou recidiva do linfoma no D+12, verificado pelo surgimento de quatro novas lesões cutâneas, sendo o diagnóstico confirmado por PAAF das referidas lesões. Dessa forma, o protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin foi reiniciado. Entretanto, nova RC só foi atingida com o uso da lomustina, o que acarrretou, portanto, na modificação do protocolo de quimioterapia. Quanto à sua evolução clínica neste segundo momento, o cão apresentou recidivas freqüentes da doença, permanecendo em RC por períodos muito curtos. Durante o tempo em que esse animal foi acompanhado, ele continuou em tratamento para o linfoma e permaneceu clinicamente bem, sem sinais sistêmicos da doença por cerca de sete meses. Entretanto, a partir do oitavo mês pós-TMO passou a manifestar evolução do linfoma, com o surgimento de múltiplos nódulos cutâneos espalhados pelo corpo, além do envolvimento dos linfonodos axilares, apresentando também sinais clínicos de apatia, hiporexia e perda de peso. O animal foi a óbito no D+180, apresentando, portanto, sobrevida de seis meses após o TMO.

O Animal 5 também apresentou recidiva da doença, no D+40 pós-TMO. Os sinais clínicos manifestados foram os mesmos do que no momento do diagnóstico (Quadro 2). A recidiva do linfoma foi confirmada pela PAAF dos linfonodos. Reiniciou-se o protocolo de Madison-Wisconsin para o referido animal, e nova RC foi alcançada após a primeira sessão de quimioterapia. A segunda RC teve duração de cerca de quatro semanas. Nesse momento, foram realizadas tentativas de reindução da remissão com

os fármacos L-Asparaginase e Lomustina, mas não houve resposta. Com a doença em evolução e sinais clínicos de dispnéia, hiporexia e apatia, além de edema de membros pélvicos, o cão foi eutanasiado 95 dias após o TMO.

Os Animais 6 e 7 foram acompanhados por seis meses após o transplante. O Animal 6 permaneceu em RC durante todo o período. Já o Animal 7 apresentou aumento dos linfonodos faciais, submandibulares e poplíteos, além de sinais clínicos de apatia e hiporexia e teve a recidiva da doença confirmada pela PAAF dos linfonodos no D+87. Nesse momento reiniciou-se o tratamento e o cão atingiu RP após a primeira sessão de quimioterapia e, duas semanas depois, encontrava-se com a doença em evolução. O animal veio a óbito no D+150 pós-TMO.

A principal finalidade dos TMO autólogos consiste em suportar a mielossupressão causada por um ou mais quimioterápicos administrados em doses elevadas (HORNING & NADEMANEE, 1999). O benefício antitumoral restringe-se ao quimioterápico, e, no caso do presente estudo, à ciclofosfamida. Dessa forma, diferentemente dos transplantes alogênicos, o TMO autólogo não induz a chamada doença do enxerto contra o linfoma (FOSTER, 2006), que, diferente da DECH, se refere exatamente ao efeito antitumoral das células transplantadas (BENJAMIN, 1995). Aliado a esse fato, existe a possibilidade de contaminação do enxerto autólogo por células linfomatosas (DEEG et al. 1985; BENJAMIN, 1995; HORNING & NADEMANEE, 1999; FOSTER, 2006). Para nenhum dos cães deste estudo notou-se evidência citológica de envolvimento da medula óssea por ocasião do TMO. E, somente para o Animal 7 esse fato foi observado no momento do diagnóstico da doença (Quadro 2). Entretanto, a não observação de células neoplásicas nos esfregaços de medula óssea não exclui a presença de doença residual mínima, detectada somente por métodos moleculares (AVIVI & GOLDSTONE, 2005).

Os fatores acima descritos contribuem para as elevadas taxas de recidiva do linfoma após os TMOs autólogos em comparação com os alogênicos, resultando no fato da maior causa de óbito após o TMO autólogo ser exatamente a recidiva da doença (BENJAMIN, 1995; HORNING & NADEMANEE, 1999).

Notou-se, neste estudo, a ocorrência de recidiva do linfoma em quatro animais, ou seja, 57% dos cães transplantados. Entretanto, o Animal 3, embora tenha recidivado, atingiu sobrevida livre da doença de seis meses, de modo que, aparentemente, beneficiou-se do procedimento. De acordo com Atinkson (1998) a principal medida para se avaliar a eficácia de um tratamento é o tempo de sobrevida livre da doença, definido por Vail & Young (2007) como o tempo de progressão da doença local ou sistêmica após indução de remissão completa. Dessa forma, para o Animal 4, que apresentou tempo de sobrevida livre da doença após o TMO de 12 dias, é provável que, na verdade, o cão se encontrasse com a doença ativa. Esse fato é suportado pelo histórico de longo tempo de evolução do linfoma (um ano), inclusive sendo submetido à quimioterapia antes de ser inserido neste estudo. Ademais, o cão manifestou recidiva clínica do linfoma no período entre a colheita de medula óssea (D-4) e o condicionamento (D-2).

A condição de RC por ocasião do TMO não é imperativa, porém é considerada um fator prognóstico para seres humanos com linfoma (VOSE et al., 2004; AVIVI & GOLDSTONE, 2005; FOSTER, 2006). Frimberger et al. (2006) relataram a ocorrência de recidiva em quatro dos 28 cães com linfoma submetidos ao TMO autólogo, no período entre a colheita de medula óssea e o condicionamento. Dois animais atingiram nova RC de longa duração, de cerca de seis meses, diferentemente do que ocorreu neste estudo.

O Animal 5, cuja recidiva foi notada 40 dias após o TMO, desenvolveu resistência à quimioterapia observada por meio da ausência de resposta às terapias de resgate (HELFAND, 1990) com os fármacos L-Asparaginase e lomustina. O fenômeno de resistência à quimioterapia está diretamente relacionado com o fato de que, para os linfomas caninos, é difícil obter uma segunda RC que seja duradoura (OURZUMI et al., 2005), o que foi observado neste estudo para o animal supracitado e também para o Animal 7. Este último apresentou tempo de sobrevida livre da doença de 87 dias, e após reinício do protocolo de Madison-Wisconsin foi capaz de atingir RP, porém não completa, o que denota prognóstico desfavorável (OURZUMI et al., 2005).

Dessa forma, para os Animais 4, 5 e 7 sugere-se que a dose utilizada da ciclofosfamida não tenha sido capaz de conter a evolução do linfoma. Há, ainda, a possibilidade de a recidiva estar relacionada com a presença de células linfomatosas na medula óssea desses animais. Independentemente da causa, pode-se observar, no presente ensaio, que o transplante autólogo de medula óssea suportou a mielossupressão causada pela administração da ciclofosfamida em doses elevadas. Sugere-se, portanto, que novos estudos sejam conduzidos no sentido de aumentar a dose da ciclofosfamida em benefício de um maior efeito anti-tumoral.

4. Conclusões

Tendo em vista o reduzido número de animais inseridos neste trabalho, e considerando as variações com relação à classificação do linfoma, estágios e sub-estágios clínicos dos mesmos, são incertos os benefícios terapêuticos do TMO autólogo em cães com linfoma. Entretanto, pode-se afirmar que o procedimento do transplante foi tecnicamente manejável e minimamente tóxico para os cães.

As etapas de processamento e congelamento das bolsas de medula óssea, no que diz respeito aos agentes crioprotetores utilizados, temperatura e tempo de congelamento, assim como ao descongelamento das bolsas não acarretaram na perda significativa de células nucleadas/kg, células $CD34^+$/kg e células viáveis.

REFERÊNCIAS[2]

ABBO, A.H. & LUCROY, M.D. Assessement of anemia as an independent predictor of response to chemotherapy and survival in dogs with lymphoma: 96 cases (1993-2006). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 231, n. 12, p. 1836 - 1842, 2007.

ALLAN, D.S. Number of viable $CD34^+$ cells reinfused predicts engraftment in autologous hematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v. 29, p. 967 - 972, 2002.

ANTHONY, R.S. et al. Flow cytometry using annexin V can detect early apoptosis in peripheral blood stem cell harvests from patients with leukaemia and lymphoma. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v. 21, p. 441 - 446, 1998.

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.

AVIVI. I. & GOLDSTONE, A.H. Conventional allograft and autograft in low grade lymphoma. **Best Practice & Research Clinical Hematology**, v. 18, n. 1, p.113 - 128, 2005.

BARGER, A.M. & GRINDEM, C.B. Hematologic Abnormalities Associated with Caner Therapy. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm`s Veterinary**

[2]ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS. NRB6023: informação e documentação, referência e elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

Hematology. 5.ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. cap. 101, p. 676 - 681.

BAUER, T. R. et al. Very low levels of donor $CD18^{+}$ neutrophils following allogenic henatopoietic ítem cell transplantation reverse the disease phenotype in canine leukocyte adhesion deficiency. **Blood**, New York, v. 103, p. 3582 - 3589, 2004

BENBOUBKER, L. et al. Long-term marrow reconstitutive ability of autologous grafts in lymphoma patients using peripheral blood mobilized with granulocyte colony-stimulating factor or granulocyte-machophage colony-stimulating factor compared to bone marrow. **Experimental Hematology**, Amsterdan, v. 31, p. 89 - 97, 2003.

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.

BERGMAN, P.J. Paraneoplastic syndromes. In: WITHROW, S.J. & VAIL, D.M. **Withrow & MacEwen´s Small Animal Clinical Oncology**. 4. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. p. 77 - 94.

BOER, F. et al. Extensive early apoptosis in frozen-thawed CD34-positive stem cells decreases threshold doses for haematological recovery after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v. 29, p. 249 - 255, 2002.

BROWN, N.O. et al. Cutaneos lymphosarcoma in the dog : a disease with variable clinical and histological manifestations. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakewood, v. 16, p. 565 - 572, 1980.

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.

BUKHOLDER, T. H. et al. Reproductive capability in dogs with canine leukocyte adhesion deficiency treated with nonmyeloablative conditioning prior to allogenic hematopoietic stem cell transplantation. **Blood**, New York, v. 108, p. 1767 - 1769, 2006.

CARDOSO, M. J. L. et al. Linfoma canino: revisão de cinqüenta e quatro casos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 19, n. 3, p. 131 -142, 2003.

CARDOSO, M.J.L. et al. Sinais clínicos do linfoma canino. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 9, n. 2, p.19 -24, 2004a.

CARDOSO, M.J.L. et al. Linfoma canino – Achados clínicos-patológicos. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 25-29, 2004b.

CHAU, I. et al. Outcome of follicular lymphoma grade 3: is anthracycline necessary as front-line therapy? **British Journal of Cancer**, Edinburgh, v. 89, p. 36 - 42, 2003.

CHUN, R. et al. Evaluation of a high-dose chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 14, p. 120 - 124, 2000.

CHUN, R. et al. Cancer chemotherapy. In: WITHROW, S.J. & VAIL, D.M. **Withrow & MacEwen´s Small Animal Clinical Oncology**. 4. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. p. 16 3- 192.

COBBOLD, S. METCALF, S. Monoclonal antibodies that define caine homologues of human CD antigens: summary of the First International Canine Leukocyte Workshop. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 43, p. 137 - 143, 1994.

COFFEY , J. et al. Therapy of non-Hodgkin´s lymphoma. **European Journal Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, Berlin, v. 30, s. 1, p. 28 - 36, 2003.

COTTER, S.M. & GOLDSTEIN, M.A. Treatment of lymphoma and leukemia with cyclophosphamide, vincristine and prednisone. I. Treatment of the dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakewood, v. 19, p. 159 - 165, 1983.

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

DAMIANI, D. et al. Autologous bone marrow transplantation in non-Hodgkin's lymphoma patients: effect of a brief course of G-CSF on harvest and recovery. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v. 24, p. 757 - 761, 1999.

DARZYNKIEWICZ, Z. et al. Flow Cytometry in Analysis of Cell Cycle and Apoptosis. **Seminars in Hematology**, Orlando, v. 38, n. 2, p. 179 – 193, 2001.

DAVIS, J.M. & ROWLEY, S.D. Autologous Bone Marrow Graft Processing. In: SACHER, R.A.; McCARTHY, L.J.; SIBINGA, C. **Processing of Bone Marrow for Transplantation**. Virginia: American Association of Blood Banks,1990. cap. 3. p. 41 – 62.

DEEG, H.J. et al. Autologous marrow transplantation as consolidation therapy for canine lymphoma: Efficacy and toxicity of various regimens of total body irradiation. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 46, n. 9, p. 2016 - 2018, 1985.

DELILIERS, G. L. et al. G-CSF After Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Malignant Lymphoma. **Prostaglandins & others Lipid Mediators**, New York, v. 56, p. 33 - 42, 1998.

DHALIWAL, R.S. et al. Canine lymphosarcoma: clinical features. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, Princeton, v. 25, n. 8, p. 573-581, 2003.

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

EPSTEIN, R.B. et al. Autologous bone marrow grafts in dogs treated with letal doses of cyclophosphamide. **Cancer Research**, Chicago, v. 29, p. 1072 - 1075, 1969.

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

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

FOSTER, I. The role of stem cell transplantation in the management of Non-Hodgkin´s lymphoma. **Radiography**, London, v. 12, p. 203 - 208, 2006.

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.

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.

GALMES, A. et al. Long-term storage at -80°C of hematopoietic progenitor cells with 5-percent dimethil sulfoxid as the sole cryoprotectant. Transfusion, Malden, v. 39, p. 70 - 73, 1999.

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

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.

GHISLENI, G. et al. Correlation between fine-needle aspiration cytology and histopathology in the evaluation of cutaneos and subcutaneous masses from dogs and cats. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 35, n. 1, p. 24 - 30, 2006.

GIRALT, S. et al. Nonablative stem cell transplantation for older patients with acute leukemias and myelodysplasic syndromes. **Seminars in Hematology**, New York, v. 39, p. 57 - 62, 2002.

GLUCKMAN, E. et al. Hematopoietic recostitution 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.

GOLDMAN, R. D. et al. Lactic dehidrogenase in human neoplastic tissues. **Cancer Research**, Baltimore, v. 24, p. 389 - 399, 1964.

GOULD, S. Paraneoplastic syndromes. In: DOBSON, J.M.; LASCELLES, B.D. BSAVA **Manual of Canine and Feline Oncology**. 2 ed. Gloucester: BSAVA, 2003. cap. 6, p.61-67.

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

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.

HELFAND, S.C. Principles and applications of chemotherapy. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 4, p. 987 - 1013, 1990.

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.

HOSOYA, K. et al. Comparison of COAP and UW-19 protocols for dogs with multicentric lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 21, p. 1355 - 1363, 2007.

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.

IWAI, K. et al. Diferencial expression of bcl-2 and susceptibility to anti-Fas-mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes and neutrophils. **Blood**, New York, v.89, p.1201-1208, 1994.

JAGIELSKI, D. et al. A retrospective study of the incidence and prognostic factors of multicentric lymphoma in dogs. **Journal of Veterinary Medicine. Physiology, pathology, clinical medicine. Series A**, Berlin, v. 49, p. 419 - 424, 2002.

KELLER, E. T. et al. Evaluation of prognostic factors ans sequential combination chemotherapy with doxorrubicin for canine lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 7, n. 5, p. 289 - 295, 1993.

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

KRUTH, S.A.; CARTER, R.F. Laboratory abnormalities in patients with cancer. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, Philadelphia, v.20, n.4, p.897-917, 1990.

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

LAING, E.J. & CARTER, R.F. Acute lysis syndrome following treatment of canine lymphoma. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakewood, v. 24, p. 691 - 696, 1988.

LANA, S.E. Chemotherapy. In: DOBSON, J.M.; LASCELLES, B.D. BSAVA **Manual of canine and feline oncology**. 2 ed. Gloucester: BSAVA, 2003. p. 86 - 103.

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

LARKIN, H.A. Veterinary cytology – differentiation of malignant lymphoma and others tumors of animals. **Irish Veterinary Journal**, Dublin, v.47, p.161-167, 1994.

LATIMER, K.S. Leucócitos na saúde e na moléstia. In: ETTINGER, S.J. & FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 4.ed. São Paulo: Manole, 1997. p. 2616 - 2666.

LEMOLI, R.M. et al. Autologous transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-primed bone marrow is effective in supporting myeloablative chemotherapy in patients with hematological malignancies and poor peripheral blood stem cell mobilization. **Blood**, New York, v. 102, n. 5, p. 1595 - 1600, 2003.

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.

MADEWELL, B. R. Tumors markers. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. San Diego: Academic Press, 1997. p. 761 - 784.

MADEWELL, B.R. & FELDMAN, B.F. Characterization of anemias associated with neoplasia in small animals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 176, n. 5, p. 419 - 425, 1980.

MANDELL, C. P. Essential thrombocytemia and reactive thrombocytosis. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm`s Veterinary Hematology**. 5.ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 501 - 508.

MASSUMOTO, C.M. et al. Criopreservação de medula óssea e células pluripotentes periféricas utilizando um congelador programável: experiência em 86 congelamentos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 93 - 98, 1997

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.

MEDLEAU, L. et al. Immunosupressive efects of cyclophosphamide, vincristine and L-asparaginase in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 44, p. 176 - 180, 1983.

MEINKOTH, J.H. & CLINKENBEARD, K.D. Normal hematology of the dog. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm`s Veterinary Hematology**. 5.ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 1057 - 1063.

MEINKOTH, J.H. & COWELL, R.L. Sample collection and preparation in cytology: increasing diagnostic yield. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 32, p. 1187 - 1207, 2002.

MENARD, M. et al. Fine needle aspiration biopsy of malignant tumors in dogs and cats: a report of 102 cases. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 27, n. 12, p. 504 - 510, 1986.

MILLER, A.G. et al. Anemia is associated with decreased survival time in dogs with lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 23, p. 116 - 122, 2009.

MORENO, K. & BRACARENSE, A. P. F. R. L. Estudo retrospectivo de linfoma canino no período de 1990 – 2004 na região norte do Paraná. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 44, p. 46 - 52, 2007.

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

MYLONAKIS M.E. et al. Acute tumor lysis syndrome in a dog with B-cell multicentric lymphoma. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 85, n. 5, p. 2016 - 208, 2007.

NAKAGE, A.P.M. et al. Quantificação de células $CD34^{+}$ do sangue do cordão umbilical de cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, *ephud ahead of print*, 2008.

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

O´KEEFE, D.A. & HARRIS, C.L. Toxicology of oncologic drugs. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, p. 483 - 503, 1990.

OSBORNE, C. A et al. Renal lymphoma in the dog and cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 158, n. 12, p. 2058 - 2070, 1971.

OSBORNE, C. A. & POLZIN, D. J. Azotemia: A review of what/s old and what's new. Part II. Localization. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, Princeton, v. 5, n. 7, p. 561 - 574, 1983.

OURZUMI, K. et al. Development of multidrug resistance in a canine lymphoma cell line. **Research in Veterinary Science**, London, v. 78, p. 217 - 224, 2005.

OWEN, L.N. In: _____ **TNM Classifications of Tumors in Domestic Animals**. Geneva, p.47, 1980.

PATTERSON, K. Bone Marrow Harvesting. In: TRELEAVEN, J.; WIERNIK, P. **Color Atlas and Text of Bone Marrow Transplantation**. London: MOSBY-WOLFE, 1995a. cap. 3. p. 101-107.

PATTERSON, K. Bone Marrow Processing. In: TRELEAVEN, J. & WIERNIK, P. **Color Atlas and Text of Bone Marrow Transplantation**. London: MOSBY-WOLFE, 1995b. cap. 4. p. 109-116.

PERMAN, V. et al. Laboratory evaluation of abnormal fluids. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 4, n. 2, p. 255 - 268, 1974.

PONCE, F. et al. Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. **The Veterinary Journal**, London, v. 167, p. 158 - 166, 2004.

REECE, W. O. & SWENSON, M. J. Composição e funções do sangue. In: REECE, W. O. **Dukes/ Fisiologia dos Animais Domésticos**. 12ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 24 - 48.

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.

RODASKI, S. & DE NARDI, A.B. Classificação dos quimioterápicos. In: **Quimioterapia Antineoplásica em Cães e Gatos.** Curitiba: Maio, 2003. cap. 2. p. 31 - 160.

ROGERS, K. L-asparaginase for treatment of lymphoid neoplasia in dogs. 1989. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 194, n. 11, p. 162 6- 1630, 1989.

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

ROSENTHAL, R.C. The treatment of multicentric canine lymphoma. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, n. 4, p. 1093 - 1104, 1990.

SANDERS, J.E. et al. Pregnancies following high-dose cyclophosphamide with or without high-dose busulfan or total-body irradiation and bone marrow transplantation. **Blood**, New York, v. 87, p. 3045 - 3052, 1996.

SCHIMT, I. et al. A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunoflourescence by single laser flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 170, p. 145 - 57, 1994.

SCHMITZ, N. et al. Autologous stem cell transplantation in lymphoma. **Seminars in Hematology**, New York, v. 44, p. 234 - 245, 2007.

SCHNEIDER, R. J. et al. Prognostic significance of serum lactate dehydrogenase in malignant lymphoma. **Cancer**, Philadelphia, v. 46, p. 139 - 146, 1980.

SCHULTZE, A. E. Interpretation of canine leukocyte responses. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm`s Veterinary Hematology**. 5.ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 366 - 381.

SCOTT, M. Immune-mediated thrombocytopenia. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm`s Veterinary Hematology**. 5.ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 478 - 486.

SEQUEIRA, J.L. et al. Características anatomoclínicas dos linfomas caninos na região de Botucatu, São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 51, n. 3, p. 245 - 250, 1999.

SIMS, C. S. et al. Pericardial effusion due to primary cardiac lymphosarcoma in a dog. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 17, p. 923 - 927, 2003.

STORB, R. et al. Brief Report: Transplantaion of Allogenic Canine Bone Marrow Stored at -80 C in Dimethyl Sulfoxide. **Blood**, New York, v. 33, p. 918 - 923, 1969.

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.

TENNANT, B. C. Hepatic function. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. San Diego: Academic Press, 1997. p. 327 - 352.

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.

TSUMAGARI, S. et al. Characterization of $CD34^{+}$ cells from canine umbilical cord blood, bone marrow leukocytes, and peripheral blood by flow cytometric analyses. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 69, n. 11, p. 1207 - 1209, 2007.

TURK, J. R. & CASTEEL, S. W. Clinical biochemistry in toxicology. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. San Diego: Academic Press, 1997. p. 829 - 843.

TVEDTEN, H. & WEISS, D.J. Classification and laboratory evaluation of anemia. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm`s Veterinary Hematology**. 5.ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 143 - 150.

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.

VOSE, J. M. et al. Autologous Transplantation for Diffuse Agressive Non-Hodgkin Lymphoma in First Relapse or Second Remission. **Biology of Blood and Bone Marrow Transplantation**, v. 10, p. 116 - 127, 2004.

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

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

YANG, H. et al. Effects of incubation temperature and time after thawing on viability assesment of peripheral hematopoietic progenitor cells cryopreserved for transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v. 32, p. 1021 - 1026, 2003.

ZANATTA, R. et al. Diagnostic and prognostic value of serum lactate dehydrogenase (LDH) and LDH isoenzymes in canine lymphoma. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 27, s. 1, p. 449 - 452, 2003.

APÊNDICES

Tabela 1A: Protoloco Quimioterápico de Madison-Wisconsin (adaptado de RODASKI & DE NARDI, 2006).

Semanas	Vincristina	L-asparaginase	Ciclofosfamida	Doxorrubicina	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	-

*Intervalos: 5ª e 10ª semanas.

Tabela 1B: Valores da contagem global de hemácias (He), da concentração de Hemoglobina (Hb), do Hematócrito (Ht), do Volume Corpuscular Médio (VCM), da Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), da contagem global de plaquetas, da contagem global de leucócitos (Leu), e das contagens absolutas de basófilos (Bas), eosinófilos (Eos), neutrófilos bastonetes (Bast), neutrófilos segmentados (Seg), linfócitos (Linf) e monócitos (Mon) do Animal 1 nos dias 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 16, 18, 24 e 28 pós transplante autólogo de medula óssea. Administração do Filgrastin®: D+3 a D+7.

	Pré-TMO	**D+3**	**D+4**	**D+5**	**D+6**	**D+7**	**D+8**	**D+10**	**D+13**	**D+14**	**D+16**	**D+18**	**D+24**	**D+28**
He **(x10^6/µL)**	4,37	2,96	Nd	3,80	2,92	4,81	3,90	3,96	4,30	3,98	3,78	3,24	4,68	4,62
Hb **(g/dL)**	10,7	7,0	Nd	9,2	7,2	11,7	9,9	10,0	10,7	9,7	8,9	7,7	11,1	10,9
Ht **(%)**	32,2	21,1	Nd	27,3	20,9	34,5	28,3	28,7	31,0	28,5	27,2	22,5	33,4	32,8
VCM **(fL)**	74	71	Nd	72	72	72	72,6	73	72	72	72	70	71	71
CHCM **(g/dL)**	33,3	33,1	Nd	33,7	34,7	43,0	35,0	34,7	34,6	34,0	32,6	34,3	33,3	33,2
Plaq.**(x10^3/µL)**	374	136	Nd	120	95	91	48	105	315	304	268	150	230	239
Leu (x10^3/µL)	8,4	2,7	7,5	5,9	6,1	20,9	17,8	12,1	10,2	8,80	7,40	9,1	8,9	7,6
Bas (céls/µL)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eos (céls/µL)	84	216	225	590	427	627	178	1210	306	528	1258	273	356	532
Bast (céls/µL)	420	0	225	0	0	209	534	0	306	176	0	0	178	0
Seg (céls/µL)	6384	432	5475	2301	2379	14212	12994	7381	7038	6072	3404	3822	5518	3344
Linf (céls/µL)	924	2052	1350	2832	2806	5016	3916	3267	2142	1672	2590	4914	2759	3572
Mon (céls/µL)	504	0	225	177	488	836	178	242	408	352	148	91	89	152

*Nd: não determinado.

Tabela 2B: Valores da contagem global de hemácias (He), da concentração de Hemoglobina (Hb), do Hematócrito (Ht), do Volume Corpuscular Médio (VCM), da Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), da contagem global de plaquetas, da contagem global de leucócitos (Leu), e das contagens absolutas de basófilos (Bas), eosinófilos (Eos), neutrófilos bastonetes (Bast), neutrófilos segmentados (Seg), linfócitos (Linf) e monócitos (Mon) do Animal 2 nos dias 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ,11, 14, 16 e 28 pós transplante autólogo de medula óssea. Administração do Filgrastin®: D+4 a D+8.

	Pré-TMO	**D+1**	**D+2**	**D+3**	**D+4**	**D+5**	**D+6**	**D+7**	**D+8**	**D+9**	**D+11**	**D+14**	**D+16**	**D+28**
He **(x10^6/µL)**	5,10	4,76	4,11	3,94	4,50	4,28	4,25	5,37	5,63	5,37	7,10	5,68	4,93	6,12
Hb **(g/dL)**	11,8	10,8	9,1	9,2	9,9	10,0	9,6	12,1	13,0	12,2	11,0	12,9	11,7	15,4
Ht **(%)**	36,4	33,8	28,9	27,7	31,8	30,3	29,9	37,9	40,1	38,1	33,9	40,5	35,1	44,7
VCM **(fL)**	71	71	70	70	71	71	70	71	71	71	71	71	71	73
CHCM **(g/dL)**	32,1	32,0	31,4	33,4	31,2	33,0	32,1	31,9	32,3	32,0	32,4	31,8	33,3	34,5
Plaq.**(x10^3/µL)**	322	266	222	208	241	153	149	176	184	191	231	335	308	475
Leu (x10^3/µL)	8,2	3,5	3,4	1,8	2,3	3,2	2,5	9,9	23,4	11,6	4,76	7,8	10,9	15,8
Bas (céls/µL)	0	0	34	0	0	0	25	190	0	116	0	0	0	0
Eos (céls/µL)	738	385	204	612	690	928	775	490	702	1044	666	1170	654	2686
Bast (céls/µL)	0	35	34	0	0	32	0	390	0	232	0	0	218	0
Seg (céls/µL)	6560	2555	2652	432	1010	1248	800	6630	20124	8120	2903	5538	8720	11692
Linf (céls/µL)	738	350	340	576	500	896	675	1680	2106	1508	904	702	872	1106
Mon (céls/µL)	164	175	136	180	100	96	225	490	468	580	285	390	436	316

Tabela 3B: Valores da contagem global de hemácias (He), da concentração de Hemoglobina (Hb), do Hematócrito (Ht), do Volume Corpuscular Médio (VCM), da Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), da contagem global de plaquetas, da contagem global de leucócitos (Leu), e das contagens absolutas de basófilos (Bas), eosinófilos (Eos), neutrófilos bastonetes (Bast), neutrófilos segmentados (Seg), linfócitos (Linf) e monócitos (Mon) do Animal 3 nos dias 2, 5, 6, 7, 9, 11, 13, 14, 15 e 28 pós transplante autólogo de medula óssea. Não foi administrado Filgrastin®.

	Pré-TMO	**D+2**	**D+5**	**D+6**	**D+7**	**D+9**	**D+11**	**D+13**	**D+14**	**D+15**	**D+28**
He **(x10^6/µL)**	5,94	3,96	4,16	5,45	5,19	4,51	4,95	5,09	5,25	6,89	6,73
Hb **(g/dL)**	14,0	8,3	8,8	10,1	9,8	10,5	10,8	11,2	11,4	14,9	14,5
Ht **(%)**	42,3	26,5	27,9	37,4	35,3	30,8	33,6	32,3	36,2	47,3	45,2
VCM **(fL)**	71	67	67	69	68	68	68	63	69	69	67
CHCM **(g/dL)**	33	31,4	31,7	26,9	27,9	34,0	32,1	34,6	32,6	31,6	32,3
Plaq.**(x10^3/µL)**	605	428	288	367	283	326	424	617	523	571	325
Leu (x10^3/µL)	6,8	3,8	3,2	3,8	2,9	5,3	6,9	7,0	6,7	8,0	7,2
Bas (céls/µL)	0	0	0	0	0	0	69	0	0	160	0
Eos (céls/µL)	272	418	192	646	580	636	552	210	402	1120	288
Bast (céls/µL)	0	0	0	0	0	318	69	0	0	0	0
Seg (céls/µL)	5712	1634	1536	912	812	1190	4347	5180	4288	4480	5688
Linf (céls/µL)	476	1634	1184	1862	1218	1330	1173	1050	1675	1920	936
Mon (céls/µL)	340	114	288	380	290	350	690	560	335	320	288

Tabela 4B: Valores da contagem global de hemácias (He), da concentração de Hemoglobina (Hb), do Hematócrito (Ht), do Volume Corpuscular Médio (VCM), da Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), da contagem global de plaquetas, da contagem global de leucócitos (Leu), e das contagens absolutas de basófilos (Bas), eosinófilos (Eos), neutrófilos bastonetes (Bast), neutrófilos segmentados (Seg), linfócitos (Linf) e monócitos (Mon) do Animal 4 nos dias 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 23 e 28 pós transplante autólogo de medula óssea. Administração do Filgrastin®: D+5 a D+9.

	Pré-TMO	**D+1**	**D+3**	**D+5**	**D+6**	**D+7**	**D+8**	**D+9**	**D+10**	**D+13**	**D+14**	**D+23**	**D+28**
He **($x10^6/\mu L$)**	5,79	6,28	5,80	6,30	5,55	6,18	6,90	5,56	6,02	5,76	5,13	5,32	5,33
Hb **(g/dL)**	12,8	14,3	13,1	14,6	12,9	14,3	12,5	12,5	13,3	12,6	11,5	Nd	7,7
Ht **(%)**	40,4	43,6	40,5	44,0	39,3	43,0	39,4	38,6	41,7	40,0	35,0	36,6	37,1
VCM **(fL)**	70	69	70	70	71	70	69	69	69	69	68	69	70
CHCM **(g/dL)**	31,8	32,8	32,2	33,1	32,7	33,3	31,8	32,5	32,0	31,4	32,9	Nd	20,9
Plaq**.($x10^3/\mu L$)**	174	114	89	87	97	138	107	112	172	142	161	402	444
Leu ($x10^3/\mu L$)	4,7	5,8	3,7	1,6	1,2	1,6	5,68	11,1	13,7	7,2	9,7	5,9	7,1
Bas (céls/µL)	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0
Eos (céls/µL)	282	290	222	192	204	224	113	333	137	0	194	59	0
Bast (céls/µL)	94	58	37	0	0	192	0	0	0	0	0	0	0
Seg (céls/µL)	3572	4350	2220	560	324	800	5225	9102	11508	6624	8536	4543	6532
Linf (céls/µL)	752	986	1184	640	588	320	341	888	1781	576	873	826	213
Mon (céls/µL)	0	116	37	208	72	64	0	777	274	0	97	472	355

*Nd: não determinado.

Tabela 5B: Valores da contagem global de hemácias (He), da concentração de Hemoglobina (Hb), do Hematócrito (Ht), do Volume Corpuscular Médio (VCM), da Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), da contagem global de plaquetas, da contagem global de leucócitos (Leu), e das contagens absolutas de basófilos (Bas), eosinófilos (Eos), neutrófilos bastonetes (Bast), neutrófilos segmentados (Seg), linfócitos (Linf) e monócitos (Mon) do Animal 5 nos dias 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16 e 28 pós transplante autólogo de medula óssea. Administração do Filgrastin®: D+5 a D+9.

	Pré-TMO	**D+2**	**D+4**	**D+5**	**D+6**	**D+7**	**D+8**	**D+9**	**D+10**	**D+13**	**D+14**	**D+15**	**D+16**	**D+28**
He **(x10^6/µL)**	5,43	4,14	3,89	3,66	3,80	5,01	4,77	4,49	5,22	4,86	5,07	5,12	5,11	6,27
Hb **(g/dL)**	13,4	10,6	8,9	9,2	9,7	11,7	11,4	10,9	12,1	12,6	12,8	12,4	12,2	14,1
Ht **(%)**	36,0	28,1	25,0	24,2	25,0	32,8	32,7	30,2	33,9	34,6	35,2	34,5	33,7	41,7
VCM **(fL)**	67	68	64	66	66	65	69	67	65	71	70	67	66	66
CHCM **(g/dL)**	37,2	37,8	35,7	38,1	38,9	35,8	34,8	36,2	35,9	36,4	36,4	36,1	36,1	33,7
Plaq.**(x10^3/µL)**	469	403	288	149	156	386	199	246	187	334	360	419	501	504
Leu (x10^3/µL)	9,0	1,6	1,4	1,4	4,0	13,3	14,1	20,1	13,4	13,2	13,6	15,0	17,8	15,1
Bas (céls/µL)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eos (céls/µL)	90	0	112	112	80	133	564	0	402	528	272	300	178	604
Bast (céls/µL)	0	0	0	0	40	399	282	402	0	528	136	0	178	0
Seg (céls/µL)	7110	160	84	504	1720	9975	8037	15276	9112	8184	9972	10500	13706	11023
Linf (céls/µL)	1800	1408	1176	756	2040	2261	4512	3417	3216	2640	2448	3600	3026	2718
Mon (céls/µL)	0	32	28	28	120	532	705	1005	670	1320	952	600	712	755

Tabela 6B: Valores da contagem global de hemácias (He), da concentração de Hemoglobina (Hb), do Hematócrito (Ht), do Volume Corpuscular Médio (VCM), da Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), da contagem global de plaquetas, da contagem global de leucócitos (Leu), e das contagens absolutas de basófilos (Bas), eosinófilos (Eos), neutrófilos bastonetes (Bast), neutrófilos segmentados (Seg), linfócitos (Linf) e monócitos (Mon) do Animal 6 nos dias 5, 6, 7, 8, 9, 13, 14, 15, 16 e 28 pós transplante autólogo de medula óssea. Administração do Filgrastin®: D+5 a D+9.

	Pré-TMO	**D+5**	**D+6**	**D+7**	**D+8**	**D+9**	**D+13**	**D+14**	**D+15**	**D+16**	**D+28**
He **(x10^6/µL)**	5,14	5,23	5,00	5,28	5,53	5,44	5,44	5,27	5,12	4,93	6,10
Hb **(g/dL)**	13,0	11,8	11,5	11,5	12,6	12,1	12,2	12,3	12,4	12,7	13,7
Ht **(%)**	34,3	34,9	33,0	35,3	36,5	36,0	35,9	34,4	34,4	32,3	39,9
VCM **(fL)**	67	66	66	66	66	66	66	65	67	66	65
CHCM **(g/dL)**	37,7	33,7	35,0	32,8	34,5	33,5	33,9	35,7	36,0	39,3	34,3
Plaq.**(x10^3/µL)**	234	410	400	407	455	438	424	377	337	396	361
Leu (x10^3/µL)	6,3	2,5	2,3	3,2	14,4	31,6	13,4	10,1	10,0	10,2	7,3
Bas (céls/µL)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eos (céls/µL)	378	700	736	768	144	0	134	202	1000	612	730
Bast (céls/µL)	0	0	0	128	144	2844	402	101	0	0	146
Seg (céls/µL)	5418	925	828	1280	10512	26544	11390	9494	7600	8772	5840
Linf (céls/µL)	315	550	644	384	2448	1580	1072	202	700	612	511
Mon (céls/µL)	189	325	92	640	1152	632	402	101	700	204	73

Tabela 7B: Valores da contagem global de hemácias (He), da concentração de Hemoglobina (Hb), do Hematócrito (Ht), do Volume Corpuscular Médio (VCM), da Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), da contagem global de plaquetas, da contagem global de leucócitos (Leu), e das contagens absolutas de basófilos (Bas), eosinófilos (Eos), neutrófilos bastonetes (Bast), neutrófilos segmentados (Seg), linfócitos (Linf) e monócitos (Mon) do Animal 7 nos dias 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, e 28 pós transplante autólogo de medula óssea. Não foi administrado Filgrastin®.

	Pré-TMO	**D+5**	**D+6**	**D+7**	**D+8**	**D+9**	**D+10**	**D+13**	**D+14**	**D+15**	**D+28**
He **($x10^6/\mu L$)**	5,09	4,73	5,14	5,63	4,91	5,02	5,56	6,46	5,38	6,24	6,93
Hb **(g/dL)**	12,9	11,6	12,2	14,2	13,0	13,9	15,0	15,4	14,7	14,6	16,2
Ht **(%)**	35,5	33,2	36,1	39,7	35,8	36,2	39,6	46,4	38,0	43,8	47,5
VCM **(fL)**	70	70	70	70	73	75	71	71,8	71	70,2	69
CHCM **(g/dL)**	36,2	34,8	33,7	35,7	26,6	38,5	37,8	33,2	38,5	33,3	34,1
Plaq**.($x10^3/\mu L$)**	420	281	267	130	125	175	280	360	404	343	333
Leu ($x10^3/\mu L$)	8,6	4,8	3,8	4,2	5,2	6,2	9,8	10,3	10,6	11,0	13,8
Bas (céls/µL)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eos (céls/µL)	946	288	342	126	104	62	98	618	954	110	828
Bast (céls/µL)	0	48	0	168	52	124	98	412	0	220	276
Seg (céls/µL)	5848	1872	912	630	2600	2852	7644	4017	5936	7370	9798
Linf (céls/µL)	860	2208	2242	2982	2236	2790	1274	4841	2862	2970	2346
Mon (céls/µL)	258	384	304	294	208	372	686	412	848	330	552