

DANIEL DIOLA BENTO

**TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA PARA
SUPORTE DE CÉLULAS TRONCO
HEMATOPOIÉTICAS EM CÃES ACOMETIDOS POR
LINFOMA**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP, para obtenção do grau de médico veterinário.

Preceptor: *Prof. Ass. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado*

Botucatu
2010

DANIEL DIOLA BENTO

**TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA PARA
SUPORTE DE CÉLULAS TRONCO
HEMATOPOIÉTICAS EM CÃES ACOMETIDOS POR
LINFOMA**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP, para obtenção do grau de médico veterinário.

Área de Concentração: Clínica Médica de Pequenos Animais

Preceptor: *Prof. Ass. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado*

Coordenador de Estágios: *Profa. Ass. Dra. Vania Maria de Vasconcelos Machado*

Botucatu
2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Bento, Daniel Diola.

Transplante de medula óssea para suporte de células tronco hematopoiéticas em cães acometidos por linfoma / Daniel Diola Bento. - Botucatu, 2010

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Luiz Henrique de Araújo Machado

Capes: 50501003

1. Cão - Doenças. 2. Células-tronco. 3. Transplante de medula óssea.
4. Linfoma.

Palavras-chave: Cão; Células tronco; Linfoma; Transplante de medula óssea.

DEDICATÓRIA

Acima de tudo, aos meus pais, Roberto e Marisa, por todo carinho, apoio, sacrifício e dedicação; por fazerem da minha, uma jornada mais fácil e compreensiva; pela demonstração fiel de integridade e amor incondicionais. Vocês, com toda certeza do mundo, são meus heróis e minha essência.

Ao Rafa e a Bia, não só irmãos genéticos, mas companheiros de coração, por todo afeto, experiências e brincadeiras compartilhadas; por me mostrarem o verdadeiro sentido de lealdade. Sem a existência de vocês, eu perderia minha identidade.

Aos meus queridos avós, pelos mimos e agrados, pelos conselhos acertados, pela sabedoria dos anos e pelo calor das minhas recepções. Vocês vão ser meus guias para todo o sempre. Pena que, no fundo, eu os conheça tão pouco...

Aos meus companheiros de república, primos e amigos fiéis, por cada palavra, risada e confissão trocadas; pelos momentos divididos; por me ajudarem a descobrir soluções claras para os meus anseios; por amenizarem meus defeitos; por me demonstrarem como a vida é mais fácil convivendo com pessoas boas.

Ao meu preceptor, prof. Henrique, por toda atenção, disponibilidade, confiança e auxílio. Espero que nossa convivência profissional ainda dure muito tempo.

Aos meus professores e mestres, atuais e passados, escolares, acadêmicos ou da vida, por despertarem em mim o senso crítico, a vontade de crescer, de questionar e de buscar respostas cada vez mais simples para questionamentos cada vez mais complexos.

A todos os que cruzaram, mesmo que apenas por um momento, o meu caminho e o modificaram, talvez mesmo sem saber, de alguma maneira.

A Zefinha, Pérola, Ringo, Buddy, Tuca, Querida, Chico, Pupu, Jack e Mily, por me fazerem acreditar na importância e beleza da veterinária.

E a Vida, Luz, Deus, Energia, Natureza, ou qualquer nome que dêem, por me dar humanidade, pelo mundo de possibilidades, pelas manifestações enfáticas de que a nossa existência seja um milagre diário.

BENTO, DANIEL DIOLA. Transplante de medula óssea para suporte de células tronco hematopoiéticas em cães acometidos por linfoma. Botucatu, 2010. Trabalho de conclusão de curso de graduação (Medicina Veterinária, Área de Concentração: Clínica Médica de Pequenos animais) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

O linfoma representa a doença hematopoiética de maior prevalência na clínica médica de pequenos animais. São altamente responsivos à quimioterapia e, portanto, vários protocolos quimioterápicos são empregados como ferramenta terapêutica. Com esse intuito, o transplante de medula óssea, consagrado em medicina humana através de experimentação inicial em pacientes caninos, tem cada vez mais se tornado alvo de estudos com o intuito de torná-lo uma realidade também em medicina veterinária. Primeiro, realiza-se o tratamento com o protocolo quimioterápico escolhido. Quanto a remissão completa do linfoma é observada, inicia-se a colheita da medula óssea. O material obtido é submetido aos processos de depleção de hemácia, depleção de plasma, adição de crioprotetores, contagem total de células nucleadas, quantificação de progenitores hematopoiéticos, análise da viabilidade celular e congelamento. A seguir, com radioterapia ou aplicação de ciclofosfamida, é realizada a etapa de condicionamento do paciente a receber o transplante. As bolsas contendo as células tronco hematopoiéticas são, então, descongeladas e transplantadas no receptor. O suporte com células tronco hematopoiéticas permite a utilização de doses letais de quimioterapia ou radioterapia e tem demonstrado elevar consideravelmente o tempo de remissão da doença e a taxa de sobrevivência dos pacientes caninos.

Palavras chave: cão; células tronco; linfoma; transplante de medula óssea.

BENTO, DANIEL DIOLA. Bone marrow transplantation for hematopoietic stem cells support in dogs with lymphoma. Botucatu, 2010. Trabalho de conclusão de curso de graduação (Medicina Veterinária, Área de Concentração: Clínica Médica de Pequenos animais) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

Lymphoma represents the most prevalent hematopoietic malignancy in small animal medicine. It is highly responsive to chemotherapy and therefore several protocols are used as therapeutic tools. For that reason, the bone marrow transplantation, enshrined in human medicine through initial trial in canine patients, has increasingly become the focus of studies in order to make it a reality also in veterinary medicine. First, the treatment with the chosen chemotherapy protocol is made. As complete remission of lymphoma is observed, it must be initiated the bone marrow harvesting. The obtained material is subjected to the processes of erythrocyte depletion, plasma depletion, cryoprotectants addition, total nuclear cells counting, hematopoietic progenitor quantification, analysis of cell viability and freezing. Following that, with radiotherapy or application of cyclophosphamide, the conditioning phase of the patient who is receiving the transplantation is carried out. The bags containing hematopoietic stem cells are then thawed and transplanted into the receptor organism. Support with hematopoietic stem cells allows the use of lethal doses of chemotherapy or radiotherapy and has been shown to considerably raise the disease remission time and survival rate of the canine patients.

Key words: bone marrow transplantation; dog; lymphoma; stem cells.

SUMÁRIO

Resumo	4
<i>Abstract</i>	5
1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO DA LITERATURA	7
3. CONCLUSÃO	16
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17

1. INTRODUÇÃO

O linfoma é a mais frequente malignidade que envolve o sistema hematopoiético em cães e é a neoplasia mais responsiva à quimioterapia. Sem tratamento, a progressão do linfoma do diagnóstico a estágios terminais é extremamente rápida (um a dois meses), entretanto, com quimioterapia, pode-se esperar uma melhora considerável na duração e na qualidade de vida do paciente (FRIMBERGER, 2008). Permitindo a administração de doses elevadas de quimioterápicos ou radioterapia com o intuito de reduzir as taxas de recidiva da doença (THOMAS et al., 1998), o linfoma é a neoplasia de maior indicação para recebimento de transplante de células-tronco hematopoiéticas no homem (SCHMITZ et al., 2007), sendo que este parece figurar como a melhor possibilidade de tratamento também em cães (FRIMBERGER, 2008).

Em vista do benefício obtido através do transplante de medula óssea em pacientes com linfoma e de que o cão tenha sido o principal modelo experimental de transplante de células tronco hematopoiéticas em pacientes humanos, os objetivos deste trabalho são discutir o transplante de medula óssea em cães com linfoma e avaliar sua possibilidade de utilização frente à realidade clínica, além revisar os aspectos envolvendo o linfoma canino, células tronco-hematopoiéticas e o cão como modelo experimental em seres humanos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Linfoma canino

O linfoma ou linfossarcoma se constitui em uma proliferação clonal de linfócitos malignos em tecidos hematopoiéticos sólidos, como linfonodos, medula óssea, baço e fígado (ETTINGER, 1992). Responsável por aproximadamente 83% das doenças hematopoiéticas em cães, o linfoma responde por cerca de 7% a 24% de todas as neoplasias nessa espécie (WITHROW & VAIL, 2007). Acomete

principalmente animais de meia-idade ou idosos (média de idade entre 6 a 9 anos), que perfazem 80% dos casos (WITHROW & VAIL, 2007). Gênero ou castração não representam fatores predisponentes para o desenvolvimento de linfoma (FRIMBERGER, 2008), apesar de um menor risco ser relatado em fêmeas não castradas (WITHROW & VAIL, 2007). Quanto à raça, apesar de nenhuma predisposição ter sido relatada, alguns trabalhos apontam elevada incidência em Golden Retriever, boxer Pastor Alemão, Labrador Retriever, Cocker Spaniel, Rottweiler e Shetland Sheepdog (FRIMBERGER, 2008; DHALIWAL et al., 2003).

Apesar do elenco de causas pressupostas versarem infecção viral (TOMLEY, 1983), contato com agentes herbicidas (HAYES, 1991), aberrações cromossômicas (HAHN et al., 1994), predisposição genética (ONIONS, 1984), além de exposição à radiação eletromagnética (REIF, 1995), a etiologia exata do linfoma ainda permanece obscura (FOURNEL-FLEURY, 2002).

Existem muitas formas de classificação, a mais antiga caracteriza o linfoma pelo sítio anatômico; nesse sistema, é classificado como multicêntrico (80% a 85% dos casos), alimentar (7%), cutâneo (6%), mediastinal ou tímico (3%) e extranodal (sistema nervoso, espinhal e raramente ósseo) (WITHROW & VAIL, 2007). Em humanos, histologicamente, o primeiro passo da classificação está em diferenciar o linfoma entre Hodgkin e não-Hodgkin. Caracterizado pela presença de células de Reed-Stenberg ou células de Hodgkin (células linfóides com nucléolos eosinofílicos exuberantes) inseridas num contexto inflamatório particular (MACHADO, 2004), o linfoma de Hodgkin (LH) foi relatado, de maneira isolada, em apenas um cão no Japão (MAEDA, 1993). Dessa forma, é estabelecido que o linfoma canino seja similar ao linfoma não-Hodgkin (NHL) em seres humanos (DHALIWAL et al., 2003). Entre as classificações histológicas do linfoma não-Hodgkin canino, destacam-se as de RAPPAPORT (1966) e a de LUKES-COLLINS et al. (1997). De acordo com CARDOSO et al. (2003), quanto ao aspecto de morfologia celular, os linfomas podem ser classificados em linfocíticos (bem diferenciados), mistos (diferenciação intermediária) e linfoblásticos (pouco diferenciados).

A classificação imunomorfológica, que tem por base a origem das células tumorais (linfócitos T ou B), é realizada por técnicas de imuno-histoquímica, utilizando anticorpos monoclonais ou policlonais, que demonstram a presença de antígenos marcadores de tipo celular (MILNER et al., 1996). Assim, o linfoma pode ser classificado em não-epiteliotrópico, originário de linfócitos B, ou epiteliotrópico, originário de linfócitos T (MORRISON, 2004).

O estadiamento clínico dos linfomas de animais domésticos, estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS), é 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 subestágios são “a” (ausência de manifestações clínicas da doença) e “b” (com manifestações clínicas de linfoma) (OWEN, 1980).

O prognóstico para cães com linfoma se relaciona principalmente à imunofenotipagem e subestágios estabelecidos pela OMS. Cães com tumores derivados de células T ou que apresentem sinais clínicos de linfoma (subestágio “b”) tem prognóstico reservado (CÁPUA, 2009).

Quanto ao tratamento do linfoma, é consensual que a principal ferramenta terapêutica seja a quimioterapia antineoplásica. WITHROW & VAIL (2007) citam a associação de ciclofosfamida, vincristina e prednisona (COP) como protocolo padrão para o tratamento do linfoma em cães. Porém, de todos os protocolos mais comumente utilizados na prática clínica, o de Madison-Wisconsin, poliquimioterapia com L-asparaginase, vincristina, doxorrubicina, ciclofosfamida e prednisona, tornou-se popular no tratamento do linfoma canino por promover tempos de sobrevida mais longos quando comparado aos demais (MORRISON, 2004). A mielotoxicidade dos agentes antineoplásicos é um efeito adverso inespecífico, frequente e grave. É um fator limitante da terapia, podendo comprometê-la de maneira transitória ou definitiva, uma vez que a redução da dose pode prejudicar a eficiência do tratamento (CÁPUA, 2009). A neutropenia é a mais frequente e mais grave das citopenias decorrentes da quimioterapia, sendo

a ciclofosfamida o antineoplásico de maior mielotoxicidade utilizado no tratamento do linfoma (LANORE & DELPRAT, 2004).

2.2. Transplante de células-tronco hematopoiéticas

As células-tronco hematopoiéticas, caracterizadas por expressarem como marcador de superfície celular uma glicoproteína com peso molecular de 110 kDa denominada CD34 (CÁPUA, 2009), apresentam capacidade de reconstituição hematopoiética e, principalmente, de diferenciação em células de diversos tecidos, tais como, fígado, sistema nervoso central, rins, pâncreas, pulmões, pele, trato gastrointestinal, coração e músculo esquelético. Estão presentes no embrião, sangue periférico, medula óssea e sangue de cordão umbilical (NAKAGE & SANTANA, 2006). Tais células tem origem mesenquimal e se localizam, durante o período intrauterino, no saco embrionário, deslocando-se, posteriormente, para o fígado, baço, linfonodos e timo fetais. No final da gestação até a vida adulta, a medula óssea se torna o principal sítio de hematopoiese do organismo (NAKAGE & SANTANA, 2006).

Em humanos, as células-tronco hematopoiéticas embrionárias, seguidas pelas do cordão umbilical, medula óssea e sangue periférico apresentam maior potencial proliferativo frente ao transplante. McSWEENEY et al. (1998) referem que, em cães, a presença de células tronco hematopoiéticas é observada na medula óssea e no sangue do cordão umbilical.

Os transplantes de células-tronco hematopoiéticas diferem de transplantes de órgão sólidos principalmente por não haver necessidade de procedimentos cirúrgicos; o que ocorre é a injeção intravenosa de células, que vão se desenvolver em ambientes especializados, nos quais se diferenciam, proliferam e amadurecem (FELDMAN et al., 2000).

Existem três tipos de transplante: alogênico, singênico e autólogo. O primeiro se refere ao transplante de medula óssea ou sangue periférico para um receptor da mesma espécie, porém geneticamente diferente do doador. No caso de

gêmeos univitelinos, o transplante se denomina singênico (BENJAMIN, 1995). O transplante autólogo envolve a remoção temporária de células tronco do próprio receptor seguida pela mielossupressão, induzida quimicamente ou radiologicamente, e reinfusão dos precursores hematopoiéticos (FELDMAN et al., 2000).

Nos transplantes alogênicos, as células transplantadas carregam antígenos que, uma vez não reconhecidos pelo receptor, poderão ilicitar a chamada “doença do enxerto contra o hospedeiro” (FELDMAN et al., 2000). Nos casos de transplantes autólogos, o material transplantado deriva do próprio receptor. Sendo assim, não carrega antígenos e não provoca tal fenômeno.

O potencial terapêutico do transplante de células-tronco hematopoiéticas é atualmente estudado na espécie canina em doenças genéticas, linfoma, doenças do tecido ósseo, vasculopatias, (NAKAGE & SANTANA, 2006), além de doenças do miocárdio (SAMOTO, 2006) e doenças oftálmicas (TOGNOLI et al., 2009).

2.3. Modelo experimental de transplante de medula óssea em humanos

Em 1945, em decorrência do fim da 2^a. Guerra Mundial e a partir das explosões da bomba atômica, o mundo conheceu os efeitos letais da radiação sobre os organismos vivos, iniciando, assim, o histórico do transplante de células hematopoiéticas (LUPU & STORB, 2007). De acordo com THOMAS (2000), em estudo histórico, o transplante de células hematopoiéticas (de medula óssea, de sangue periférico e cordão umbilical) envolveu um período de mais de 50 anos de pesquisas, tornando-se hoje o tratamento de escolha para uma variedade grande de doenças hematológicas, genéticas e autoimunes em seres humanos.

Na década de 60, após utilização de camundongos em experimentos, seguiram-se os estudos com cães, que permitiam melhor avaliação clínica, assim como maior facilidade na colheita e transfusão sanguíneas (THOMAS, 2000). LUPU & STORB (2007) referem que, durante duas décadas, os animais recebiam

doses mieloablativas de quimioterápicos (principalmente ciclofosfamida) ou irradiação corporal total, seguidas da infusão da medula de doadores aparentados. Segundo EPSTEIN et al. (1969), esses estudos se baseavam na premissa de que a função hematopoiética poderia ser restaurada em pacientes com depressão ou aplasia medular, seja induzida por malignidades ou por doses quimioterápicas terapêuticas, caso o organismo fosse submetido ao transplante de células com elevada capacidade de diferenciação. Tais experimentos foram bem sucedidos e revelaram o cão como o principal modelo para o desenvolvimento do transplante de medula óssea em seres humanos. Graças a esses estudos, atualmente, quimioterapia em altas doses com suporte de células de origem hematopoiética se tornou um componente terapêutico importante para o linfoma em humanos.

2.4. Transplante de medula óssea em cães com linfoma

Segundo FRIMBERGER (2008), o transplante de medula óssea permitiria submeter os pacientes caninos a doses intensificadas de quimioterapia ou radioterapia, sem aumentar, no entanto, sua toxicidade, representando, assim, um impacto positivo no tempo de remissão da doença e na taxa de sobrevida.

Na década de 80, ao mesmo tempo que experimentalmente eram dados enxertos autólogos em cães com linfoma, leucemia e tumores sólidos (LUPU & STORB, 2007), a utilização de transplantes alogênicos de medula óssea foi primeiramente relatada em medicina veterinária como método de intervenção terapêutica (HAHN et al., 1994). Somente em 2008, foi relatado, no Brasil, o primeiro transplante de medula óssea canino. No estudo, o paciente, diagnosticado com linfoma cutâneo, foi submetido ao transplante autólogo de medula óssea e, na ocasião da publicação, se encontrava no dia +360 pós-transplante em remissão completa da doença (CÁPUA et al., 2008).

O protocolo de transplante constitui na colheita de medula óssea seguida do condicionamento do cão receptor com altas doses de ciclofosfamida ou radioterapia e infusão da medula óssea por via intravenosa. As bolsas contendo a

medula óssea são processadas em etapas de depleção eritrocitária e plasmática, adição de crioprotetores, contagem total de células nucleadas, quantificação de progenitores hematopoiéticos, análise da viabilidade celular e estocagem por congelamento.

Após realizado o diagnóstico e iniciado o protocolo quimioterápico, DHALIWAL et al. (2003) recomendam a avaliação clínica dos pacientes e, conforme a resposta ao tratamento, a classificação em tratamento com remissão completa (desaparecimento da doença clínica), remissão parcial (diminuição maior ou igual a 50% do tumor), doença estável (diminuição ou aumento menor que 50% do tumor) e doença progressiva (aumento de pelo menos 50% do tamanho do tumor ou aparecimento de novos focos).

Ao ser constatada doença em remissão e optado pelo transplante, os animais são submetidos à colheita, sob anestesia geral, da medula óssea. Segundo NAKAGE & SANTANA (2006), a proporção de células CD34+ na medula óssea da tíbia em cães é relatada como sendo maior ($3,7\pm 0,2\%$) que no úmero ($2,8\pm 0,2\%$), crista ilíaca ($1,7\pm 0,3\%$) e fêmur ($0,26\pm 0,03\%$). Portanto, a tíbia constitui o sítio preferencial de colheita de medula óssea em cães. Através de seringas heparinizadas, deve-se colher um total de 10 mL/Kg de medula óssea, sendo que, para cada 10 ml do material removido, deve-se acrescentar, em recipiente adequado, 1 mL de meio heparinizado (CÁPUA, 2009). Tal meio é preparado com adição de heparina sódica à solução fisiológica (NaCl a 0,9%) na proporção de 1:10.

Segundo CÁPUA et al. (2008), após a colheita, o material deve ser processado. Realiza-se, inicialmente, a depleção eritrocitária do aspirado através da adição de hidroxietilamida, que acelera a sedimentação das hemácias. O segundo passo consiste na centrifugação da medula óssea a 300rpm e 20°C para promover a depleção do plasma. Sob condições acépticas, uma mistura contendo 40% do plasma extraído e 60% de crioprotetores deve ser preparada e transferida para uma bolsa de sangue ideal para congelamento. Retira-se uma alíquota da mistura para a contagem de células nucleadas totais.

As células tronco hematopoiéticas são, então, identificadas e quantificadas pela técnica de citometria de fluxo, mecanismo pelo qual as células são separadas por imunofluorescência, com base em seu tamanho, granularidade e intensidade de fluorescência. Anticorpos monoclonais específicos, conjugados com cromógenos, isotiocianato de fluoresceína ou ficoeritrina, reagem com o CD34, promovendo, assim, a identificação e quantificação das células tronco hematopoiéticas (McSWEENEY et al., 1998). Além disso, anticorpos monoclonais CD45+ são utilizados com a finalidade de marcação de todas as células nucleadas. NAKAGE & SANTANA (2006) citam que o cálculo da contagem absoluta de células CD34+ é realizado através da multiplicação da porcentagem de células CD34+ pelo número total de células nucleadas (contagem total de CD45+) e o volume do sangue colhido. Este número é dividido pelo peso do paciente, resultando no número total de células CD34+/kg. Segundo HAHN et al. (1994), a quantidade recomendada para a reconstituição hematopoiética em cães é de 1,2 a 3,4 x 10⁶/kg.

A medula óssea a ser utilizada para a recuperação hematopoiética pode ser criopreservada antes da quimioterapia, uma vez que as células presentes na bolsa só permanecem viáveis por cerca de três dias em temperaturas acima do congelamento. Dessa maneira, a estocagem das bolsas à temperatura de -80°C é aceitável para curtos períodos de tempo, enquanto que, para longos prazos de estocagem, o uso de nitrogênio líquido, que mantém viabilidade celular por cerca de três anos, é indicado (TRELEAVEN & WIERNIK, 1995).

É sabido que a criopreservação reduz o número de células viáveis para reinfusão (ALLAN et al., 2002), além disso, o número de células CD34+ é diretamente proporcional a velocidade de enxertamento hematopoiético. Assim, ATKINSON et al. (1998) referem que a dose mínima de células CD34+ viáveis antes da criopreservação deve ser maior que 2x10⁶ células CD34+/kg de peso.

CÁPUA et al. (2008), para o congelamento das bolsas processadas, recomendam submeter por uma hora à temperatura de refrigeração (4°C), depois por duas horas em freezer a -4°C e, finalmente, a -80°C até o descongelamento e infusão da medula óssea.

Dois dias após a colheita e o processamento do material é realizado o preparo ou condicionamento do paciente receptor. Dois métodos podem ser utilizados nessa etapa: irradiação corpórea total ou aplicação de ciclofosfamida em alta dosagem (THOMAS et al., 1998). Foi demonstrado que a aplicação de elevadas doses de ciclofosfamida pode substituir a irradiação corpórea total durante o preparo dos cães para os transplantes alogênicos ou autólogos de medula óssea (THOMAS et al., 1998). Segundo FRIMBERGER et al. (2008), a dose máxima tolerada de ciclofosfamida em cães é de 500 mg/m². Doses inferiores (300 a 400 mg/m²) também podem ser utilizadas de acordo com o estadiamento clínico da enfermidade.

Os estudos conduzidos por CÁPUA et al. (2008) preconizam que a infusão da medula óssea, afim de evitar a destruição das células infundidas pela atividade residual da ciclofosfamida ou da radioterapia (EPSTEIN et al., 1969), seja realizada dois dias após o condicionamento do cão receptor. A medula óssea deve ser removida do congelador (-80°C) e imediatamente imersa em água a 37°C. Uma amostra deve ser separada e submetida, novamente, à contagem das células totais.

Em cerca de 10 dias pós transplante, podem ser observada contagens normais de leucócitos no animais receptores, sendo que aplicações subcutâneas de fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) parecem acelerar a reconstituição hematopoiética (CÁPUA et al., 2008).

Uma vez que o envolvimento da medula óssea em cães com linfoma seja comum, uma objeção teórica em relação ao transplante autólogo, particularmente em malignidades envolvendo a medula óssea, seria a capacidade de células tumorais aspiradas com a medula, e portanto não expostas à quimioterapia ou radioterapia subsequente, resultarem na recorrência do tumor após a infusão autóloga. WEINDEN et al. (1979) concluíram que a invasão da medula por células tumorais não impede que a sobrevida livre de doença seja longa após a infusão autóloga de medula óssea, porém questionam se falhas no tratamento seriam relacionadas ao condicionamento inadequado do paciente pré-transplante ou se estariam ligadas à infusão de células neoplásicas na ocasião do transplante.

Mediante tratamento em cães com linfoma com transplante de medula óssea, o tempo médio de remissão é 10% maior quando comparado com controle de cães tratados apenas com quimioterapia convencional (FRIMBERGER et al., 2006)

3. CONCLUSÃO

Visando tornar o transplante de medula óssea no combate ao linfoma aplicável à rotina médica veterinária, alguns pontos permanecem carentes de estudos e elucidações. O procedimento do transplante apresenta um manejo tecnicamente estabelecido e minimamente tóxicos para os pacientes, porém representa uma ferramenta terapêutica muito onerosa e, portanto, ainda restrita ao âmbito experimental.

Além disso, considerando o reduzido número de animais inseridos nos trabalhos publicados e as diversas variações com relação à classificação do linfoma e subestágios clínicos, são incipientes os resultados a cerca de quais pacientes com linfoma seriam mais indicados e se beneficiariam com tal método.

Outro ponto está relacionado à utilização praticamente restrita de transplantes autólogos, que, apesar de ser o mais aplicável à realidade veterinária de falta de doadores, reserva a possibilidade da presença de células neoplásicas infiltradas na medula óssea provocar recidivas da doença, tornando inefetivo todo o esforço psicológico, técnico e financeiro.

No entanto, o transplante de medula óssea é, de fato, efetivo em proteger o organismo receptor contra os efeitos deletérios do tratamento, uma vez que um dos fatores limitantes da radioterapia ou da utilização de agentes antineoplásicos se constitui na toxicidade hematopoiética. Com o suporte de células tronco hematopoiéticas, o potencial de remissão e a possibilidade de cura são maiores que qualquer outra abordagem terapêutica atual. Espera-se, assim, que, futuramente, os cães com linfoma possam se beneficiar com o transplante de medula óssea tal qual os pacientes humanos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

ATKINSON, K. **Manual for Bone Marrow and Stem Cell Transplantation**. 1ed. New York: Cambridge University Press, 1998.

CÁPUA, M.L.B. Tratamento do linfoma canino com poliquimioterapia seguida ou não por transplante autólogo de medula óssea. 2009. 111p. Tese (Doutorado em Clínica Médica) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

CÁPUA, M.L.B.; COLETA, F.E.D.; MIOTO, M.R.; CALAZANS, S.G.; GODOY, A.V.; NAKAGE, A.P.M.; LISBÃO, C.B.S.; DALECK, C.R.; SANTANA, A.E. Autologous bone marrow transplantation in a dog with lymphoma: a clinical study. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.39, n.3, 2008.

CARDOSO, M.J.L., MACHADO, L.H.A., ROCHA, N.S., MOUTINHO, F.Q., CIAMPOLINI, P. Linfoma canino: revisão de 54 casos. **Bioscience Journal**. Uberlândia, v.19, n.3, p.131-142, 2003.

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

EPSTEIN, R.B.; STORB, R.; CLIFT, R.A.; THOMAS, E.D. Autologous bone marrow grafts in dogs treated with lethal doses of cyclophosphamide. **Cancer Research**. Washington, n.29, p.1072-1075, 1969.

ETTINGER, S.J. **Tratado de medicina interna veterinária**. 3.ed. São Paulo: Manole, 1992. 2557p.

FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 5ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. 1344p.

FOURNEL-FLEURY, C., PONCE, F., FELMAN, P., BLAVIER, A., BONNEFONT, C., CHABANE, L., MARCHAL, T., CADORE, J.L., GOY-

THOLLOT, G., LEDIEU, D., GHERNATI, I., MAGNOL, J.P. Canine T-cell lymphoma: a morphological, immunological and clinical study of 46 new cases. **Veterinary Pathology**, n.39, p.92-109, 2002.

FRIMBERGER, A.E., MOORE, A.S., RASSNICK, K.M., COTTER, S.M., O`SULLIVAN, J.L., QUESENBERRY, P.J. 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.

FRIMBERGER, A.E. New perspectives in canine lymphoma. **ACVSS College Science Week**. Austrália, 2008. <<http://www.vetoncologyconsults.com>>. Acesso em: 20 jun. 2010.

GREENLEE, P.G., FILIPPA, D.A., QUIMBY, F.W., PATNAIK, A.K., CALVANO, S.E., MATUS, R.E., KIMMEL, M., HURVITZ, A.I., LIEBERMAN, P.H. Lymphomas in dogs: a morphologic, immunologic, and clinical study. **Cancer**, Philadelphia, v. 66, n.3, p. 480 - 490, 1990.

HAHN, K.A., RICHARDSON, R.C., HAHN, E.A., CHRISMAN, C.L. Diagnostic and prognostic importance of chromosomal aberrations identified in 61 dogs with lymphosarcoma. **Veterinary Pathology**, v.31, n.5, p.528-540, 1994.

HAYES, H.M., TARONE, R.E., KENNETH, P.C., JESSEN, C.R., McCURNIN, D.M., RICHARDSON, R.C. Case-control study of canine malignant lymphoma: Positive association with dog owner's use of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicides. **Journal of the National Cancer Institute**, v.83, n.17, p.1226-1231, 1991.

KITCHELL, B.E., DHALIWAL, R.S, MESSICK, J.B. Canine lymphosarcoma: clinical features. Agosto, 2003. Disponível em <<http://www.vetlearn.com>>. Acesso em: 12 jun, 2010.

LANORE, D. & DELPRAT, C. **Quimioterapia Anticancerígena**. 1ed. São Paulo: Roca, 2004. 228p.

LUKES, R.J.; COLLINS, R.D. Immunological characterization of human malignant lymphomas. **Cancer**, v.34, n.4, p.1488-1503, 1974.

LUPU, M., STORB, R. Five decades of progress in hematopoietic cell transplantation based on the preclinical canine mode. **Veterinary and Comparative Oncology**, Oxford, v.05, n.1, p.14-30, 2007.

MACHADO, M., CORREIA, A., MENEZES, F., RAVARA, L.P. Linfoma de Hodgkin: conceitos atuais. **Medicina Interna**. v. 11, n.4, p.207-215, 2004.

MAEDA, H., OZAKI, K., HONAGA, S., NARAMA, I. Hodgkin's-like lymphoma in a dog. **Journal of Veterinary medicine Series A**, Osaka, v.40, p.200–204, 1993.

McSWEENEY, P.A., ROULEAU, K.A., WALLACE, P.M., BRUNO, B., ANDREWS, R.G., KRIZANAC-BENGEZ, L., SANDMAIER, B.M., STORB, R., WAYNER, E., NASH, R.A. Characterization of monoclonal antibodies that recognize canine CD34. **Blood**, Seattle, v.91, n.6, p.1977-1986, 1998.

MILNER, R.J.; PEARSON, J.; NESBTT, J.W.; CLOSE, P. Immunophenotypic classification of canine malignant lymphoma on formalin-fixed paraffin wax-embedded tissue by means of CD3 and CD79a cell markers. Onderstepoort. **Journal Veterinary Research**, Pretoria, v.63, p.309-313, 1996.

MORRISON, W.B. **Lymphoma in dogs and cats**. Jackson Hole, WY: Teton New Media, 2004. 124p.

NAKAGE, A.P.M. & SANTANA, A.E. Células-tronco hematopoiética em cães. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.36, n.1, p.325-329, 2006.

ONIONS, D.E. A prospective survey of familial canine lymphosarcoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v.72, n.4, p.909–912, 1984.

OWEN, L.N. **TNM Classifications of Tumors in Domestic Animals**. Geneva: World Health Organization, 1980, 53p.

RAPPAPORT, H. **Atlas of tumor pathology**. Washington: Saunders, 1966.

REIF, J.S., LOWER, K.S., OGILVIE, G.K. Residential exposure to magnetic fields and risk of canine lymphoma. **American Journal of Epidemiology**, Colorado, v.141, n.4, p.352–359, 1995.

SCHMITZ, N., BUSKE, C., GISSELBRECHT, C. Autologous stem cell transplantation in lymphoma. **Seminars in Hematology**, New York, v. 44, n.4, p. 234 - 245, 2007.

SAMOTO, V.Y. Terapia celular cardíaca: vias de infusão de células mononucleares em cães SRD. 2006. 105p. Tese (Mestrado em Cirurgia e Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

THOMAS, E.D.; BLUME, K.G.; FORMAN, S.J. **Hematopoietic Cell Transplantation**. 2ed. Malden: Blackwell Science, 1998. 1260p.

THOMAS, E.D. Bone marrow transplantation: a historical review. In: Simpósio de transplante de medula óssea. Riberão Preto: USP, 2000, p.209-218.

TOMLEY, F.M., ARMSTRONG, S.J., MAHY, B.W., OWEN, L.N. Reverse transcriptase activity and particles of retroviral density in cultured canine lymphosarcoma supernatants. **British Journal of Cancer**, v.47, n.2, p.277–284, 1983.

TOGNOLI, G.K., OLSSON, D.C., MARTINS, D.B., JÚNIOR, E.B.S., SALBEGO, F.S., OLIVEIRA, G.K., BRAGA, F.V.A., RAISER, A.G., DEZENGRINI, R., CRUZ, F.S.F., CASTRO, M.B., ROSA, M.C., CARREGARO, A.B., PIPPI, N.L. Transplante autólogo de células mononucleares da medula óssea em úlcera de córnea experimental em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.1, p.148-155, 2009.

TRELEAVEN, J.; WIERNIK, P. **Color Atlas and Text of Bone Marrow Transplantation**, 1ed., London: Mosby-Wolfe, 1995. 208p.

WEIDEN, P.L.; STORB, R.; DEEG, J.; GRAHAM, T.C.; THOMAS, E.D. Prolonged disease-free survival in dogs with lymphoma after total-body irradiation and autologous marrow transplantation consolidation of combination-chemotherapy-induced remissions. **Blood**, vol.54, n.5, 1979.

WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. 4. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. 769p.