



Avaliação plaquetária de cães com linfoma submetidos à quimioterapia, transplante de medula óssea e fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF)

Platelet evaluation of dogs with lymphoma submitted to chemotherapy, bone marrow transplantation and G-CSF

Ana Livia Motta Silva^[a], Ana Paula Massae Nakage Canesin^[b], Maria Luísa Buffo de Cápuá^[c],
Aline Vieira Godoy^[c], Mariana Rodrigues Miotto^[c], Aureo Evangelista Santana^[d]

^[a] Médica veterinária, Mestranda da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/ UNESP), Jaboticabal, SP - Brasil, e-mail: anamedvet@hotmail.com

^[b] Médica Veterinária, docente do Centro Universitário Barão de Mauá, Ribeirão Preto, SP - Brasil, e-mail: apnkg@hotmail.com

^[c] Médica veterinária e Doutoranda da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária (FCAV/ UNESP), Jaboticabal, SP - Brasil, e-mail: marialuisa_capua@yahoo.com.br; alinevgodoy@gmail.com; marianamiotto@hotmail.com

^[d] Médico veterinário, docente da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária (FCAV/ UNESP), Jaboticabal, SP - Brasil, e-mail: santana@fcav.unesp.br

Resumo

O tratamento indicado para cães com linfoma é a quimioterapia, cujo fator limitante é a mielotoxicidade, que pode ser revertida pelo transplante de medula óssea (TMO). Antes do TMO, o animal deve ser submetido à terapia imunossupressora para evitar a rejeição. Para recuperação da imunossupressão recomenda-se a administração da citocina G-CSF, que estimula a proliferação e a maturação neutrofílica. Porém, há relatos de que a aplicação de G-CSF promove redução na contagem plaquetária. O objetivo deste ensaio foi avaliar o efeito do G-CSF sobre o número de plaquetas e megacariócitos em cães com linfoma submetidos à quimioterapia e TMO. Os cinco cães saudáveis do grupo 1 receberam 5 µg/kg/dia de G-CSF por quatro dias; o grupo 2, constituído por cinco cães com linfoma submetidos ao protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin, TMO autólogo e G-CSF. A contagem plaquetária e megacariocítica foi feita antes do TMO, antes e após o G-CSF. A administração do G-CSF humano pôde reduzir os valores dos megacariócitos e plaquetas de cães. A maior porcentagem de cães trombocitopenicos com linfoma foi, provavelmente, graças à quimioterapia mielossupressiva, à toxicidade hematológica da ciclofosfamida

e à administração de G-CSF. A recuperação megacariocítica e plaquetária mais expressiva nos cães com linfoma pode ter ocorrido em virtude do TMO, que estimulou a megacariocitopoese.

Palavras-chave: Plaquetas. G-CSF. Linfoma. Transplante de medula óssea. Cães.

Abstract

The chemotherapy is the indicated treatment for dogs with lymphoma, whose limitant factor is mielotoxicity, can be reverted to bone marrow transplantation (BMT). Before BMT, the dog was submitted to immunosuppressive therapy to avoid rejection. Immunossuppression can be reverted to admininstrate a granulocyte colonystimulating factor (G-CSF) that stimulates the neutrophilic proliferation and maturation. However, there are reports that the application of G-CSF promotes reduction in platelet count. The objective of this study was to evaluate the G-CSF effects on platelets and megakaryocytes numbers in dogs with lymphoma submitted to a chemotherapy and BMT. The five healthy dogs in group 1 received 5 µg/kg/day G-CSF during four days; the group 2 was constituted by five dogs with lymphoma submitted to a Madison-Wisconsin chemotherapy protocol, autologous bone marrow transplantation and G-CSF. Megakaryocyte and platelet count carried out before BMT, before and after G-CSF. The human G-CSF administration can reduce canine megakaryocytes and platelets values. The bigger percent of thrombocytopenic dogs with lymphoma was probably by myelossuppressive chemotherapy, hematological toxicity of cyclophosphamide and G-CSF administration. The megakaryocytic and platelet recuperation more expressive in dogs with lymphoma can be occurred by BMT stimulated by megakaryocitopoiesis.

Keywords: Platelets. G-CSF. Lymphoma. Bone marrow transplant. Dogs.

Introdução

O linfoma é o tumor maligno hematopoiético de rápida evolução que mais comumente afeta cães (MOULTON; HARVEY, 1990) e representa de 5% a 10% de todas as neoplasias que acometem essa espécie (CURIEL et al., 1998). É uma neoplasia linfóide que afeta primariamente os linfonodos ou outros órgãos linfóides sólidos como fígado e baço (VAIL; OGILVIE, 1998), podendo haver expansão do componente linfomatoso e envolver, como consequência, o sangue periférico (BONNER, 1994) e a medula óssea (SOMLO, 2006).

O protocolo quimioterápico padrão para o tratamento de linfoma canino é a associação de ciclofosfamida, vincristina e prednisona (COP) (KITCHELL; DHALIWAL, 2000; RODASKI; DE NARDI, 2003). Aproximadamente 90% dos casos de linfoma multicêntrico respondem favoravelmente a este protocolo e, embora exista variação individual considerável, o tempo médio de sobrevivência é de nove meses (DOBSON; GORMAN, 2004) e o de remissão é de seis meses (KITCHELL; DHALIWAL, 2000). Outro protocolo que se tornou popular no tratamento do linfoma canino é o de Madison-Wisconsin, uma combinação das drogas L-asparaginase, vincristina, prednisona, ciclofosfamida e doxorubicina. Há relatos de que o referido protocolo é capaz de promover a mais longa remissão e tempo de sobrevivência para cães com linfoma (MORRISON, 2005). A mielotoxicidade é o fator limitante mais frequente e mais grave da quimioterapia, pois compromete o tratamento quimioterápico, transitória ou definitivamente, ao obrigar a diminuir doses dos fármacos e espaçar os ciclos quimioterápicos, prejudicando a eficácia do tratamento e aumentando as possibilidades de metastase (HERNANDEZ, 1994); além disso, pode levar o animal à morte em virtude da neutropenia séptica (LANORE; DELPRAT, 2004).

A mielossupressão causada pelo tratamento quimioterápico em pacientes com linfoma pode ser revertida com o transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (TACTH), obtidas na medula óssea, sendo utilizado de forma crescente como terapia auxiliar contra neoplasias malignas, com o propósito de diminuir os riscos de imunossupressão (HERNANDEZ, 1994) e estimular reconstituição da hematopoiese (NAKAGE; SANTANA, 2006). O transplante de células-tronco (TCT) autólogo consiste na remoção de

células-tronco hematopoéticas (CTH) do próprio paciente, seguida de mielossupressão, e reinfusão das CTH (GASPER; THRALL, 2000). Graças à capacidade de reconstituição hematopoética e da plasticidade das células-tronco de cães, permitiu-se o emprego do modelo canino em várias propostas científicas e terapêuticas, as quais fornecem informações pré-clínicas ao homem (NAKAGE; SANTANA, 2006). Cães com linfoma foram submetidos à quimioterapia em doses elevadas, ciclofosfamida (500 mg/m²), Mesna e TMO autólogo (FRIMBERGER et al., 2000; FRIMBERGER et al., 2006).

Com o intuito de reduzir os efeitos deletérios da imunossupressão pré-transplante, como nas infecções severas, emprega-se o fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF), que é uma citocina indutora de granulopoiese capaz de atenuar a neutropenia induzida por quimioterápicos, ao estimular a multiplicação e diferenciação dos progenitores granulocíticos e aumentar a liberação de neutrófilos maduros do compartimento de reserva para o sangue periférico e a funcionalidade dos neutrófilos (HERNANDEZ, 1994; HENRY et al., 1998; FELDMAN et al., 2000). Diante do tempo de vida médio dos componentes sanguíneos, a linhagem granulocítica é a primeira a ser afetada nos casos de mielossupressão, pois os neutrófilos permanecem viáveis na circulação cerca de quatro a oito horas no gato e no cão (COUTO, 2003). O uso do G-CSF recombinante humano (rhG-CSF) foi referido pela primeira vez em medicina veterinária em 1988, no tratamento da hematopoiese cíclica em cão Collie cinza (LOTHROP et al., 1988). A administração de rhG-CSF em cães promoveu a neutrofilia, demonstrando o grande potencial na redução da duração e intensidade da neutropenia associada às condições de mielotoxicidade e mielossupressão (HAMMOND et al., 1990; HENRY et al., 1998; FELDMAN et al., 2000).

Apesar da recuperação neutrofílica, há relatos de que a aplicação de G-CSF promoveu o rápido decréscimo na contagem de plaquetas de cães submetidos à irradiação (NOTHDURFT et al., 1997). A trombocitopenia também foi descrita em pacientes humanos sob circunstâncias severas e tratados com G-CSF (LIESCHKE; BURGESS, 1992; SCHWAB; HECHT, 1994). Tem sido relatada uma possível relação entre a administração de G-CSF e a ocorrência de trombozes em humanos. Um estudo *in vitro* demonstrou que a administração de G-CSF induz a hiperagregação plaquetária quando se adiciona ao sangue de voluntários sadios G-CSF e fatores de agregação plaquetária, tais como colágeno e ADP (KAPTAN et al., 2007). Em pacientes humanos portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (Aids) observou-se severa trombocitopenia após seis dias de tratamento com G-CSF (HOLTZER et al., 1997), bem como a recuperação de plaquetas se torna deficiente após aplicação de G-CSF em pacientes que receberam transplante alogênico de CTH (PRZEPIORKA et al., 2001). A administração de G-CSF em ratos esplenectomizados durante sete dias induziu significativa trombocitopenia, descartando que a causa da redução na contagem plaquetária seria motivada pelo sequestro de plaquetas no baço (TAKAMATSU et al., 2007). Entretanto, Fujita et al. (2001) demonstraram que a longa exposição ao G-CSF não induziu trombocitopenia em ratos.

As plaquetas dos mamíferos são fragmentos citoplasmáticos de megacariócitos que têm como importante função participar de forma ativa na cascata de coagulação, compondo o tampão hemostático, e manter constantemente a integridade do endotélio vascular. Dois terços a três quartos das plaquetas de cães estão presentes na circulação sistêmica e o restante fica armazenado no baço. No entanto, há dinâmica entre esse dois compartimentos nos quais as plaquetas transitam livremente (REBAR et al., 2003). A contagem normal de plaquetas em cães sadios varia entre 180 a 400 × 10³/μL (KERR, 2003). A trombocitopenia pode ser ocasionada pela ausência de produção na medula óssea, consumo ou destruição imunomediada (MEYER; COLES; RICH, 1995).

A contagem de megacariócitos em esfregaços de medula óssea não é descrita de forma precisa na literatura, sendo realizada uma estimativa do número de megacariócitos. Para estimar a quantidade de megacariócitos presente em um esfregaço de medula óssea, utiliza-se uma objetiva de pequeno aumento (10X). A interpretação depende da contagem de plaquetas do sangue periférico. Áreas com alta celularidade normalmente contêm alguns megacariócitos; no entanto, se a amostra estiver hemodiluída deverá haver pelo menos de cinco a dez megacariócitos no esfregaço. Quando os animais apresentarem trombocitopenia, seja por coagulação intravascular disseminada ou destruição plaquetária imunomediada, a quantidade de megacariócitos estará aumentada. A trombocitopenia pode também ser causada por hipoplasia global da medula óssea, sendo que neste caso tanto a contagem periférica de plaquetas quanto a contagem de megacariócitos no esfregaço estarão

diminuídas. A hipoplasia megacariocítica dificilmente ocorre isolada, sendo mais comum vir acompanhada de hipoplasia eritroide ou mielóide. Os animais que apresentam hiperplasia megacariocítica podem ter 50 ou mais megacariócitos no campo celular do esfregaço (MEYER; COLES; RICH, 1995; MYLONAKIS et al., 2005; THRALL et al., 2007).

Portanto, a administração de G-CSF é recomendada para acelerar a reconstituição hematopoética de pacientes com mielossupressão graças à quimioterapia, apesar de relatos de cães que apresentaram trombocitopenia após a aplicação de G-CSF (NOTHDURFT et al., 1997). Assim, pretende-se investigar a ação do G-CSF sobre o número de plaquetas e de megacariócitos em cães com linfoma submetidos à quimioterapia mielossupressora e ao transplante autólogo de medula óssea.

Material e métodos

As parcelas experimentais foram divididas em dois grupos, sendo que o grupo controle (G1) foi composto por cinco cães saudáveis sem raça definida e com peso entre 11 kg e 15 kg, três machos e duas fêmeas, pertencentes ao canil do Hospital Veterinário do “Centro Universitário Barão de Mauá”. O grupo tratado (G2) foi formado por cinco animais acometidos por linfoma tratados com protocolo quimioterápico de Madison Wisconsin, seguido de transplante de medula óssea. O protocolo de Madison-Wisconsin é constituído por sulfato de vincristina (0,75 mg/m², IV), L-asparaginase (400 UI/kg, IM), ciclofosfamida (250 mg/m², VO), doxorubicina (30 mg/m², perfusão) e prednisona. As parcelas experimentais, que apresentaram remissão completa do linfoma graças ao tratamento quimioterápico, receberam antibioticoterapia (sulfa-trimetoprim, 20 mg/kg, BID, P.O.) e foram submetidas ao transplante de medula óssea, obedecendo ao seguinte esquema: colheita de medula óssea (10 mL/kg) no dia -4 (D-4), condicionamento com ciclofosfamida IV no dia -2 (D-2) e infusão da bolsa de medula óssea por via intravenosa no dia zero (D0).

A colheita de medula óssea dos cães foi realizada como procedimento cirúrgico no D-4, sendo que os animais receberam medicação pré-anestésica com levomepromazina e meperidina, anestesia local nas cristas ilíacas com lidocaína, e anestesia inalatória com isoflurano. A colheita da medula óssea foi realizada, simultaneamente, por dois operadores que procederam às aspirações nas cristas ilíacas com agulhas de Rosenthal e seringas de 20 mL. Foi colhido um volume final de 10 mL/kg de peso do animal. À medida que as amostras de medula óssea foram depositadas em uma proveta de vidro de 500 mL, um assistente realizou a adição do meio contendo RPMI 1640 (SIGMA), heparina sódica Parinex[®] (Hipolabor) e solução fisiológica (NaCl a 0,9% - Glicolabor), além da homogeneização periódica do conteúdo. Uma vez colhido o volume desejado de medula óssea, o conteúdo foi filtrado por gravidade em peneira de malha quadrada (0,15 mm) e retirou-se o anticoagulante CPDA-1 da bolsa de sangue (bolsa para coleta de sangue 500 mL, CPDA-1, JP Indústria Farmacêutica S.A.). Após a colheita, a bolsa contendo a medula foi processada em três etapas: depleção de hemácias com o hidroxietilstarch (Plasmin[®] hidroxietilamido 450/0, 7-6%, Halexstar) e transferências das células vermelhas para uma bolsa de transferência; depleção de plasma após centrifugação da bolsa de medula óssea; e congelamento manual da medula óssea na bolsa de congelamento (Cryocyte bolsa para congelamento dos componentes do sangue 500 mL, Baxter[®]) com 40% de plasma autólogo, 40% de RPMI (Meio RPMI 1640 - SIGMA) e 20% de DMSO (Dimesol[®] Marcolab).

A etapa de condicionamento dos animais foi realizada no D-2 e seguiu o seguinte esquema: fluidoterapia intravenosa com solução NaCl a 0,9% (Glicolabor) por 30 minutos; infusão de Mesna (Mitetan[®] 100 mg/mL Baxter Oncology) IV – sendo que a dose utilizada foi a mesma da ciclofosfamida $\times 0,4$ –; infusão da ciclofosfamida (Cycram[®] Meizler) e administração de furosemida (Teuto), na dose de 2 mg/kg.

A infusão da medula óssea foi realizada no D0. Para tanto, as bolsas de medula óssea foram retiradas do freezer (-80 °C) e colocadas imediatamente em banho-maria a 37 °C. Os animais receberam fluidoterapia intravenosa à base de NaCl a 0,9% (Glicolabor) por 30 minutos. Após o TMO, os animais foram monitorados e receberam fluidoterapia pelo tempo mínimo de duas horas.

A administração de 5 µg/kg/dia do G-CSF (Filgrastine[®]) por via subcutânea foi realizada nos cães dos grupos 1 (G1) e 2 (G2) nos dias D+5, D+6, D+7 e D+8.

As amostras de sangue destinadas à contagem plaquetária foram obtidas por punção da veia cefálica e envasadas em tubos a vácuo, contendo EDTA. As contagens globais de plaquetas foram obtidas com o auxílio de um contador automático de células ABC Vet (Horiba Abx, São Paulo, Brasil). A contagem de plaquetas dos cães do G1 e G2 foi realizada antes do TMO (D-4), antes e após a administração de G-CSF (D0, D+5, D+6 e D+7). A mensuração do número de megacariócitos foi feita a partir de esfregaços de medula óssea corados com Rosenfeld modificado. A quantidade foi determinada ao contar megacariócitos em dez campos aleatórios em baixo aumento (10X), e o resultado foi a média entre os valores encontrados em cada campo e a unidade descrita em células/ campo em baixo aumento (CBA). A contagem de megacariócitos dos cinco cães do G1 e G2 foi realizada antes do TMO (D-4) e após a administração de G-CSF (D+7, D+14 e D+28). Por ser um método invasivo, optou-se pela coleta de megacariócitos em dias espaçados, a fim de evitar estresse dos animais.

A análise estatística será estabelecida por meio da análise descritiva básica das plaquetas e dos megacariócitos dos cães dos grupos 1 e 2.

Resultados

Os valores de megacariócitos dos cães dos grupos controle (G1) e tratados (G2) podem ser verificados na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores individuais médios e desvios-padrão da contagem de megacariócitos por campo em baixo aumento (CBA) dos cães do grupo controle (G1) e tratado (G2) nos diferentes momentos de avaliação. Ribeirão Preto, SP, 2009

Grupo controle (G1)	Parcelas experimentais					Valores médios (megac./CBA)	Desvios-padrão
	C1	C2	C3	C4	C5		
D - 4	0,5	2,2	0,7	**	1,3	1,17	0,763
D + 7	0,2	0,6	1,1	2,5	0,1	0,90	0,977
D + 14	0,1	0,4	1,0	**	0,1	0,40	0,424
D + 28	**	0	**	1,6	0,8	0,80	0,800
Grupo Tratado (G2)	Parcelas experimentais					Valores médios (megac./CBA)	Desvios-padrão
	T1	T2	T3	T4	T5		
D - 4	0,1	0,2	**	1,5	0,4	0,55	0,645
D + 7	0,7	0,1	4,5	0,3	1,5	1,42	1,803
D + 14	0,6	0,3	0,1	1,6	0,2	0,56	0,611
D + 28	0	0,9	2,7	0	0	0,72	0,509

** parcela perdida

Ao comparar os valores médios megacariocíticos dos cães controles e tratados em cada momento de avaliação, verificou-se que, no momento D-4, os valores médios de megacariócitos dos cães com linfoma

submetidos à quimioterapia mielossupressora ($0,55 \pm 0,645$) foram inferiores àqueles dos cães do grupo controle ($1,17 \pm 0,763$). Sete e 14 dias após o transplante de células-tronco (D+7 e D+14), os valores médios dos megacariócitos dos animais tratados ($1,42 \pm 1,083$ e $0,56 \pm 0,611$, respectivamente) foram discretamente superiores àqueles dos controles ($0,90 \pm 0,977$ e $0,40 \pm 0,424$, respectivamente). Nos animais controles e tratados, os valores médios de megacariócitos durante a aplicação de G-CSF no D+7 ($0,90 \pm 0,977$ e $1,42 \pm 1,803$, respectivamente) foi reduzido ($0,4 \pm 0,424$ e $0,56 \pm 0,611$ megacariócitos/CBA, respectivamente), após sete dias do término do tratamento (D+14). No D+28, os valores médios de megacariócitos foram semelhantes nos cães do grupo controle ($0,80 \pm 0,80$) e do tratado ($0,72 \pm 0,509$). Ao avaliar os valores megacariocíticos de cada grupo nos diferentes momentos, nos cães do G1 houve redução do D-4 para D+7 e D+14, e posterior elevação no D+28. Nos cães do G2 houve elevação do número de megacariócitos do D-4 para D+7, redução no D+14 e recuperação no D+28.

Os valores da contagem de plaquetas dos cães dos grupos controle (G1) e tratados (G2) podem ser verificados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores individuais médios e desvios-padrão da contagem de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos cães do grupo controle (G1) e tratado (G2) nos diferentes momentos de avaliação. Ribeirão Preto (SP), 2009

Grupo controle (G1)	Parcelas experimentais					Valores médios ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Desvio- padrão
	C1	C2	C3	C4	C5		
D - 4	239	445	181	231	269	273,00	101,22
D0	249	258	218	222	264	242,20	21,00
D + 5	179	299	66	173	253	194,00	88,82
D + 6	368	247	144	195	262	243,20	83,83
D + 7	303	395	251	256	273	295,60	59,17
D + 14	178	297	138	205	478	259,20	135,58
D + 28	290	310	230	300	220	270,00	41,83
Grupo tratado (G2)	Parcelas experimentais					Valores médios ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Desvio- padrão
	T1	T2	T3	T4	T5		
D - 4	234	216	322	288	151	242,20	58,69
D0	428	417	313	136	266	312,00	114,55
D + 5	410	149	153	120	87	183,80	228,40
D + 6	400	156	149	95	97	179,40	214,25
D + 7	407	386	176	91	138	239,60	190,21
D + 14	377	367	335	304	161	308,80	152,74
D + 28	361	504	475	239	444	404,60	58,69

Ao comparar os valores de plaquetas dos cães controles e tratados em cada momento de avaliação, verificou-se que no D-4 os animais do tratamento controle (G1) e tratado (G2) apresentaram número de

plaquetas dentro dos valores de referência ($180-400 \times 10^3/\mu\text{L}$). Entretanto, o valor médio da contagem de plaquetas do G1 foi sutilmente mais elevado ($273,00 \times 10^3/\mu\text{L}$) em relação ao do G2 ($242,20 \times 10^3/\mu\text{L}$). As parcelas experimentais do G2, que apresentaram remissão completa do linfoma por causa da quimioterapia mielossupressiva, foram submetidas à colheita de medula óssea no D-4, condicionamento com ciclofosfamida no D-2 e TMO no D0. Verificou-se que o número médio de plaquetas dos cães do G1 e G2 manteve-se dentro dos valores de referência no D0. No período de aplicação do G-CSF (D+5, D+6 e D+7), observou-se que os valores médios de plaquetas dos cães tratados ($183,80$; $179,49$ e $239,60 \times 10^3/\mu\text{L}$, respectivamente) foram inferiores àqueles dos controles ($194,00$; $243,20$ e $295,60 \times 10^3/\mu\text{L}$, respectivamente). No D+14 e D+28 a contagem plaquetária dos cães controles e tratados mantiveram-se semelhantes aos valores de referência. No estudo dos valores individuais do número de plaquetas de cada grupo, nos diferentes momentos de avaliação, observou-se que 40% dos cães controles exibiram trombocitopenia no D+5 e 20% no D+6, além do D+14. Com relação ao grupo tratado (G2), 20% dos cães apresentaram contagem plaquetária inferior àquela de referência nos dias D-4 e D0, 80% no D+5 e D+6, e 60% no D+7. Os valores médios de plaquetas dos cães tratados se recuperaram nos momentos D+14 ($308,80 \pm 152,74 \times 10^3/\mu\text{L}$) e D+28 ($404,60 \pm 58,69 \times 10^3/\mu\text{L}$).

Discussão

Em virtude da escassez de valores de referência para contagem de megacariócitos em cães na literatura, a interpretação deste parâmetro foi realizada comparando-se os valores megacariocíticos dos cães controles (G1) e tratados (G2). No momento D-4, os valores médios de megacariócitos dos cães com linfoma submetidos à quimioterapia mielossupressora com Madison-Wisconsin foram inferiores àqueles dos cães controles, podendo ter ocorrido em função da toxicidade medular da ciclofosfamida, que atinge a linhagem megacariocítica (CHUN et al., 2007). A contagem superior de megacariócitos dos animais tratados quando comparada àquela dos cães controles no D+7 e D+14 pode ter sido causada pelo transplante autólogo de medula óssea que ocorreu no D0. Provavelmente, o TMO estimulou a recuperação da megacariocitopoese, corroborando dados de Chen et al. (2004), ao observarem a reconstituição da medula óssea após o transplante de células-tronco em pacientes humanos. Segundo Lemoli et al. (2003), o transplante autólogo de medula óssea e a utilização de G-CSF em humanos induzem a efetiva hematopoiese após quimioterapia mieloblástica, atingindo inclusive a linhagem megacariocítica. Nos cães controles e tratados houve redução nos valores médios de megacariócitos sete dias após o tratamento com $5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ de G-CSF durante três dias (D+14), sendo que houve nadir de megacariócitos no D+14, como relatado por Takamatsu et al. (2007), em que ratos tratados com $250 \mu\text{g}/\text{Kg}$ de G-CSF apresentaram diminuição na contagem de megacariócitos na medula óssea após sete dias de tratamento, momento no qual ocorreu nadir dessas células. Em contraste, Fujita et al. (2001) observaram aumento da megacariocitopoese em microambiente, no qual foi adicionado G-CSF sintetizado a partir de ratos transgênicos. No D+28 ocorreu a recuperação da contagem megacariocítica nos animais controles e tratados.

Ao se avaliar a influência do linfoma na contagem plaquetária, verificou-se que o valor médio de plaquetas dos cães tratados foi discretamente inferior àquele dos controles no D-4. A redução na contagem plaquetária pode estar associada ao linfoma. Ao invadirem a medula óssea, células neoplásicas ocasionam déficit na produção de plaquetas; além disso, pode ocorrer diminuição no número de plaquetas por sequestro esplênico graças ao elevado consumo ou destruição imunomediada em cães com linfoma (ETTINGER, 2003). A associação de mecanismos imunológicos e trombocitopenia em pacientes com linfoma foi confirmada em estudo com humanos, pois conforme a doença entrava em remissão graças ao tratamento quimioterápico os níveis de imunoglobulinas G associadas às plaquetas decresciam (BERKMAN et al., 1984).

O valor discretamente menor de plaquetas nos cães com linfoma no D-4 pode estar associado à quimioterapia de Madison-Wisconsin. Pacientes humanos com linfoma nodular submetidos a um protocolo semelhante a este apresentaram trombocitopenia, por conta da mielossupressão promovida por estes medicamentos (FREEDMAN et al., 1997).

A principal indicação da administração do G-CSF é no estímulo da granulopoiese (HENRY et al., 1998; REWERTS; HENRY, 1998; FELDMAN et al., 2000). Entretanto, neste ensaio avaliamos a influência do G-CSF nos

valores plaquetários e verificamos uma redução na contagem de plaquetas nos cães tratados após a administração de 5 µg/kg/dia no D+5, D+6 e D+7, corroborando com os achados de Nothdurft et al. (1997), nos quais cães irradiados tratados com 30 µg/kg/dia de G-CSF por sete dias apresentaram trombocitopenia quatro dias após o início da administração de G-CSF. Entretanto, não houve alteração na contagem de plaquetas após administração de 10 µg/kg/dia de rhG-CSF em cães saudáveis por via subcutânea durante 30 dias (HAMMOND et al., 1991).

Ao se avaliar os valores individuais do número de plaquetas de cada grupo, observou-se que a trombocitopenia pode ser graças à administração do G-CSF realizada no D+5, D+6, D+7 e D+8 nos animais controles (NOTHDURFT et al., 1997; TAKAMATSU et al., 2007) e nos tratados; além da administração do G-CSF, a mielotoxicidade da ciclofosfamida aplicada na fase de indução do TMO (D-2) atinge a linhagem megacariocítica (VAIL; YOUNG, 2007). A redução na contagem de plaquetas do G2 foi verificada cinco a sete dias após o TMO (D0). Frimberger et al. (2006) também encontraram valores reduzidos na contagem de plaquetas cinco a dez dias após o TMO de cães com linfoma. Os cães foram tratados com um protocolo denominado Velcap (prednisona, vincristina, ciclofosfamida, doxorrubicina, L-asparaginase) por 12 semanas, e receberam G-CSF por sete dias pré-TMO. A trombocitopenia foi comumente observada sem episódios de hemorragia. Apenas dois cães apresentaram trombocitopenia persistente, que foi associada a mecanismos imunomediados, visto que o tratamento com prednisona restabeleceu a contagem de plaquetas, sendo que um desses cães com trombocitopenia persistente apresentou leve hipoplasia de medula.

Embora ocorra queda nos valores plaquetários associada ao tratamento com G-CSF, esta redução é recuperada espontaneamente após o término do tratamento, podendo estar acompanhada de episódios hemorrágicos (HOLTZER et al., 1997) ou não (FREEDMAN et al., 1997; NOTHDURFT et al., 1997; TAKAMATSU et al., 2007). Os cães controles apresentaram queda nos valores de plaquetas nos dois primeiros dias de administração de G-CSF e retorno aos valores de referência no terceiro dia. Os cães tratados do G2 apresentaram decréscimo no número de plaquetas no início do tratamento com G-CSF e recuperação a partir de sete dias após o término do tratamento (D+14 e D+28). Cães com linfoma tratados com protocolo quimioterápico Velcap apresentaram recuperação da trombocitopenia 14 dias após o TMO (FRIMBERGER et al., 2006). Entretanto, Freedman et al. (1997) encontraram atraso na recuperação da contagem de plaquetas em pacientes humanos com LNH tratados com protocolo quimioterápico semelhante ao de Madison-Wisconsin, G-CSF e TMO autólogo, sendo que a recuperação do número de plaquetas ocorreu 56 dias após o término da aplicação de G-CSF.

Ao se avaliar a relação entre os valores plaquetários e megacariocíticos, verificou-se que a diminuição nos valores plaquetários foi acompanhada por redução na contagem de megacariócitos no dia D+14 nos cães do G1. A trombocitopenia e redução no número de megacariócitos verificada nos animais controles podem ter ocorrido em virtude da administração de 5 µg/kg/dia de G-CSF no D+5, D+6 e D+7, corroborando com os achados de Nothdurft et al. (1997), nos quais cães irradiados tratados com G-CSF apresentaram redução nos valores de plaquetas quatro dias após o início da administração de G-CSF. Takamatsu et al. (2007) verificaram nadir de megacariócitos da medula óssea de ratos após sete dias de tratamento com 250 µg/kg de G-CSF. Além disso, a hipoplasia medular, após a administração de G-CSF em humanos, foi relacionada com o atraso na recuperação da contagem plaquetária (FREEDMAN et al., 1997). Entretanto, ao se analisar os cães controles e tratados observou-se que houve elevação na contagem de plaquetas e de megacariócitos no momento D+28. O aumento no número de plaquetas e megacariócitos dos cães do G2 pode ter sido causado pelo transplante autólogo de medula óssea no D0, que, provavelmente, estimulou a recuperação da megacariocitopoese, corroborando relatos de Chen et al. (2004) e Lemoli et al. (2003), ao observarem a reconstituição da medula óssea após o transplante de células-tronco em pacientes humanos, atingindo inclusive a linhagem megacariocítica e, conseqüentemente, a contagem de plaquetas no sangue periférico.

Conclusões

A administração do G-CSF humano pode reduzir os valores dos megacariócitos e plaquetas de cães. A porcentagem de cães com linfoma que apresentaram trombocitopenia foi maior do que aquela dos controles, provavelmente graças à quimioterapia mielossupressiva, toxidez hematológica da ciclofosfamida e administração

de G-CSF. A recuperação da contagem de megacariócitos e plaquetas mais expressivas nos cães com linfoma pode ter ocorrido em virtude do transplante de medula óssea, que estimulou a megacariocitopoese.

Agradecimento

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), pelo apoio financeiro.

Referências

- BERKMAN, A. W.; KICKLER, T.; BRAINE, H. Platelet-associated IgG in patients with lymphoma. **Blood**, v. 63, n. 4, p. 944-948, 1984.
- BONNER, H. The blood and the lymphoid organs. In: RUBIN, E.; FARBER, J. L. **Pathology**. Philadelphia: Lippincott Company, 1994. p. 994-1097.
- COUTO, C. G. Complications of cancer chemotherapy. In: NELSON, R.W.; COUTO, C. G. **Small animal internal medicine**. 3rd ed. St. Louis: Mosby, 2003. cap. 80, p. 1108-1116.
- CHEN, B. J. et al. Hematopoietic stem cell dose correlates with the speed of immune reconstitution after stem cell transplantation. **Blood**, v. 103, n. 11, p. 4344-4352, 2004.
- CHUN, R. et al. Cancer chemotherapy. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Small animal clinical oncology**. 4th ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. p. 163-192.
- CURIEL, J. M. A. S. et al. Multiple mucocutaneous lymphosarcoma in dog. **Canadian Veterinary Journal**, v. 29, n. 12, p. 1001-1002, 1998.
- DOBSON, J.; GORMAN, M. A. Classification of canine lymphoma: a step forward. **The Veterinary Journal**, v. 167, n. 2, p. 125-126, 2004.
- ETTINGER, S. N. Principles of treatment for canine lymphoma. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 18, n. 2, p. 92-97, 2003.
- FELDMAN, B. F. et al. **Schalm's veterinary hematology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
- FREEDMAN, A. et al. Cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone dose intensification with granulocyte colony-stimulating factor markedly depletes stem cell reserve for autologous bone marrow transplantation. **Blood**, v. 90, n. 12, p. 4996-5001, 1997.
- FRIMBERGER, A. E. et al. Autologous bone marrow support for submyeloablative chemotherapy dose intensification in canine lymphoma. **Experimental Hematology**, v. 28, n. 7, s. 1, p. 52, 2000.
- FRIMBERGER, A. E. et al. A combination chemotherapy protocol with dose intensification and autologous bone marrow transplant (VELCAP-HDC) for canine lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 2, p. 355-364, 2006.
- FUJITA, T. et al. Augmentation of megakaryocytopoiesis within the hematopoietic microenvironment of human granulocyte colony-stimulating factor transgenic mice. **Experimental Hematology**, v. 29, n. 8, p. 1010-1018, 2001.
- 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.
- HAMMOND, W. P. et al. A comparison of treatment of canine cyclic hematopoiesis with recombinant human granulocytemacrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), G-CSF, interleukin-3, and canine G-CSF. **Blood**, v. 76, n. 3, p. 523-532, 1990.

- HAMMOND, W. P. et al. Chronic neutropenia: a new canine model induced by human granulocyte colony-stimulating factor. **Journal of Clinical Investigation**, v. 87, n. 2, p. 704-710, 1991.
- HENRY, C. J. et al. Veterinary uses of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. Part I. Oncology. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 20, n. 6, p. 728-734, 1998.
- HERNANDEZ, J. D. T. Uso clínico de los factores de crecimiento hematopoyético. **Iatreia**, v. 7, p. 173-180, 1994.
- HOLTZER, C. D. et al. Severe reversible thrombocytopenia caused by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in an AIDS patient receiving chronic ganciclovir therapy. **Aids**, v. 11, n. 11, p. 1403-1405, 1997.
- KAPTAN, K. et al. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) promotes in vitro platelet aggregation. **Hematology**, v. 12, n. 5, p. 441-444, 2007.
- KERR, M. G. **Exames laboratoriais em medicina veterinária bioquímica clínica e hematologia**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2003. cap. 2, p. 45-59.
- KITCHELL, B. E.; DHALIWAL, R. S. Hematology, oncology, immunology: CVT update: anticancer drugs and protocols using traditional drugs. In: KIRK, R. W.; BONAGURA, J. D. **Current veterinary therapy XIII – small animal practice**. Philadelphia: Saunders, 2000. p. 465-473.
- LANORE, D.; DELPRAT, C. **Quimioterapia anticancerígena**. São Paulo: Roca, 2004. cap. 4, p. 53-78.
- LEMOLI, R. M. et al. Autologous transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-primed bone marrow is effective in supporting myeloablative chemotherapy in patients with hematologic malignancies and poor peripheral blood stem cell mobilization. **Blood**, v. 102, n. 5, p. 1595-1600, 2003.
- LIESCHKE, G. J.; BURGESS, A. W. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **New England Journal of Medicine**, v. 327, n. 2, p. 28-35, 1992.
- LOTHROP, C. D. J. R. et al. Correction of canine cyclic hematopoiesis with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. **Blood**, v. 72, n. 4, p. 1324-1328, 1988.
- MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L. J. **Medicina de laboratório veterinária**. Roca: São Paulo, 1995. p. 308.
- MORRISON, W. B. **Lymphoma in dogs and cats**. Jackson: Teton NewMedia, 2005.
- MOULTON, J. E.; HARVEY, J. W. Tumors of the lymphoid and hematopoietic tissues. In: MOULTON, J. E. **Tumors in domestic animals**. 3rd ed. Berkeley: University of California Press, 1990. p. 267-270.
- MYLONAKIS, M. E. et al. Type of smear may influence thrombopoietic cell counts in the bone marrow of clinically healthy dogs. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 4, p. 358-361, 2005.
- NAKAGE, A. P. M.; SANTANA, A. E. Células-tronco hematopóéticas em cães. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 325-329, 2006.
- NOTHDURFT, W. et al. Acceleration of hemopoetic recovery in dogs after extended-field partial-body irradiation by treatment with colony-stimulating factors: rhG-CSF and rhGM-CSF. **International Journal Of Radiation Oncology, Biology, Physics**, v. 37, n. 5, p. 1145-1154, 1997.
- PRZEPIORKA, D. et al. Controlled trial of filgrastim for acceleration of neutrophil recovery after allogeneic blood stem cell transplantation from human leukocyte antigen-matched related donors. **Blood**, v. 97, n. 11, p. 3405-3410, 2001.
- REBAR, A. H. et al. **Guia de hematologia para cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2003.
- REWERTS, J. M.; HENRY, C. J. Veterinary uses of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. Part II. infectious diseases. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 20, n. 7, p. 823-827, 1998.
- RODASKI, S.; DENARDI, A. B. Classificação dos quimioterápicos. In: RODASKI, S.; DENARDI, A. B. **Quimioterapia antineoplásica em cães e gatos**. São Paulo: Medvet Livros, 2003.

SCHWAB, G.; HECHT, T. Recombinant methionyl granulocyte-stimulating factor (filgrastim): a new dimension in immunotherapy. **Annals of Hematology**, v. 69, n. 1, p. 1-9, 1994.

SOMLO, G. Linfomas. In: POLLOCK, R. E. et al. **UICC manual de oncologia clínica**. 8. ed. São Paulo: Fundação Oncocentro, 2006. cap. 12, p. 283-296.

TAKAMATSU, Y. et al. Thrombocytopenia in association with splenomegaly during granulocyte-colony-stimulating factor treatment in mice is not caused by hypersplenism and is resolved spontaneously. **Transfusion**, v. 47, n. 1, p. 41-49, 2007.

THRALL, M., A. et al. Avaliação laboratorial da medula óssea In: THRALL, M., A. et al. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. 2007. cap. 13, p. 141-169.

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

VAIL, D. M.; YOUNG, K. M. Canine lymphoma and lymphoid leukemia. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology**. 4th ed. St. Louis: Saunders Isevier, 2007. cap. 31, p. 699-769.

Recebido: 28/09/2009

Received: 09/28/2009

Aprovado: 03/05/2010

Approved: 05/03/2010