

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**MAYARA CAROLINA ELOY MACHADO**

**AVALIAÇÃO “IN VITRO” DO POTENCIAL FAGOCITÁRIO DE CÉLULAS  
GIGANTES TUMORAIS DO HISTIOCITOMA FIBROSO MALIGNO CANINO**

“In vitro” evaluation of phagocytic potential of tumor giant cells of canine malignant  
fibrous histiocytoma

**CURITIBA**

**2019**

**MAYARA CAROLINA ELOY MACHADO**

**AVALIAÇÃO “IN VITRO” DO POTENCIAL FAGOCITÁRIO DE CÉLULAS  
GIGANTES TUMORAIS DO HISTIOCITOMA FIBROSO MALIGNO CANINO**

“In vitro” evaluation of phagocytic potential of tumor giant cells of canine malignant  
fibrous histiocytoma

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Clínica e Cirurgia Veterinária, da Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal em Saúde, Tecnologia e Produção Animal Integrada.

Orientador: Gervásio Henrique Bechara

**CURITIBA**

**2019**

Dados da Catalogação na Publicação  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR  
Biblioteca Central  
Luci Eduarda Wielganczuk – CRB 9/1118

M149a Machado, Mayara Carolina Eloy  
2019 Avaliação "in vitro" do potencial fagocitário de células gigantes tumorais do histiocitoma fibroso maligno canino = *"In vitro" evaluation of phagocytic potential of tumor giant cells of canine malignant fibrous histiocytoma* / Mayara Carolina Eloy Machado . orientador: Gervásio Henrique Behcara. – 2019.  
49 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,  
Curitiba, 2019

Inclui bibliografias

1. Veterinária. 2. Cão – Doenças. 3. Histicitoma fibroso maligno. 4. Células gigantes. I. Bechara, Gervário Henrique. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título..

CDD 20. ed. – 636.089

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>vi</b>
<b>RESUMO GERAL</b> .....	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>viii</b>
<b>CAPITULO 1</b> .....	<b>1</b>
1 INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO .....	1
1.1. OBJETIVOS.....	4
1.2. HIPÓTESES .....	5
<b>CAPITULO 2</b> .....	<b>6</b>
Avaliação “ <i>In Vitro</i> ” do Potencial Fagocitário de Células Gigantes Tumorais do Histiocitoma Fibroso Maligno Canino .....	6
<b>CAPITULO 3</b> .....	<b>32</b>
Avaliação de hemogramas de cães submetidos a quatro diferentes protocolos quimioterápicos .....	32
<b>CAPITULO 4</b> .....	<b>46</b>
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>47</b>
<b>ANEXO (S)</b> .....	<b>49</b>

Dedico este trabalho a Deus,  
que sempre esteve ao meu  
lado, e que com certeza, sem  
Ele, nada disso seria possível.

## AGRADECIMENTOS

À minha família tão amada, por todo o suporte, apoio emocional e confiança no meu potencial.

Ao orientador Prof. Dr. Médico Veterinário Gervásio Henrique Bechara, profissional excepcional, dedicado e atencioso, por toda confiança, apoio e participação de destaque na minha formação profissional.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Alexandra Cristina Senegaglia e a bióloga Dra. Lidiane Maria Boldrini Leite, pela oportunidade de poder executar o presente trabalho dentro do Núcleo de Tecnologia Celular da PUCPR e por todo o suporte na execução desse projeto.

Ao Médico Veterinário Prof. Dr. Marcelo B. Labruna da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), pela oportunidade de aprender o cultivo celular das DH82 e por nos ceder uma alíquota das células para execução do trabalho.

Ao Médico Veterinário Prof. Dr. Felipe Krawczak, por todo o período de aprendizagem do cultivo das células DH82 e por toda ajuda ao longo do mestrado.

Ao Prof. Dr. Saulo Henrique Weber por toda ajuda com a análise estatística do projeto.

Ao Prof. Dr. José Ademar Villanova Junior e a Prof<sup>a</sup> Dra. Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto, por toda ajuda na ingressão do projeto no Núcleo de Tecnologia Celular da PUCPR.

Às bolsistas PIBIC Nathália Ruy Batista da Silva, Ingrid Navarro de Souza e Jacqueline Lima de Oliveira por todo acompanhamento e apoio durante o trabalho.

Aos companheiros do Núcleo de Tecnologia Celular por toda colaboração durante a execução do trabalho.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para com o meu mestrado.

*Meus sinceros agradecimentos*

## RESUMO GERAL

O Histiocitoma Fibroso Maligno é uma neoplasia incomum em cães, mas que pode surgir em vários tipos de tecidos do organismo e possui um prognóstico desfavorável, o que faz com que estudos avançados a seu respeito se tornem relevantes. O objetivo do presente trabalho foi investigar o potencial fagocítico de células do histiocitoma fibroso maligno canino e compará-lo com o de macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico. Como ferramentas de estudo, foram utilizadas células DH82 originadas de um histiocitoma canino, na forma mononucleada e que receberam interleucina 4 (IL-4) adicionada ao meio de cultivo para formação de sua forma gigante multinucleada. Com o intuito de avaliar o potencial fagocítico desse tipo celular neoplásico, essas células foram expostas a partículas de Zymosan conjugadas a molécula fluorescente FITC, e adquiridas em citômetro de fluxo. A citometria permitiu determinar a porcentagem de células que internalizaram ou não as partículas. Como resultado do experimento foram obtidos uma média de 69,2% de células mononucleares que fagocitaram as partículas de Zymosan e de 76,6% de células gigantes com esse mesmo potencial, não havendo diferença significativa entre as duas formas da célula. Com essa pesquisa foi possível determinar que o potencial fagocítico de suas células originárias, os monócitos, está presente nas células DH82 e DH82 gigantes, potencial este que provavelmente seja responsável, pelo menos em parte, pelo prognóstico desfavorável dessa doença.

**Palavras-chave:** DH82, DH82 gigante, monócitos, neoplasia

## ABSTRACT

Malignant Fibrous Histiocytoma is an uncommon neoplasm in dogs, but it can appear in many types of tissues in the body and has an unfavorable prognosis, making advanced studies of it relevant. As study tools, DH82 cells from an original dog histiocytoma in their mononuclear form and received inoculation of interleukin 4 (IL 4) in the culture medium, to become multinucleate giant DH82 cells. In addition, normal monocytes were collected from the peripheral whole blood of a healthy dog, also cultured in both forms, for comparison with the neoplastic cells. In order to evaluate the phagocytic potential of this neoplastic cell type, these cells were exposed to Zymosan particles conjugated to fluorescent molecule FITC and acquired on a flow cytometer. Cytometry allowed determining the percentage of cells that internalized or not the particles. As a result of the experiment, a mean of 69,2% of mononuclear cells that phagocytosed and 76,6% of giant cells with this same potential were obtained, since there was no difference between the two types of cells. With this research, it was possible to determine that the phagocytic potential of its original cells, monocytes, is present in DH82 and multinucleate giant DH82 cells, which showed that this potential is probably responsible, at least in part for the unfavorable prognosis of this disease.

**Keywords:** DH82, giant DH82, monocytes, neoplasia



## CAPITULO 1

### 1 INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO

Histiócito foi um termo muito empregado para designar apenas um tipo de macrófago situado na pele. O aparato celular abrangido por esse termo evoluiu e agora este serve para designar células dendríticas (*dendritic cells* - DCs na sigla em inglês) e linhagens de macrófagos (MOORE, 2014). Estas células são sentinelas da resposta imune inata, fagocitando e eliminando antígenos, bem como são de grande importância para a resposta imune adaptativa, capturando antígenos para serem quebrados em peptídeos menores e apresentados para os linfócitos T (TIZARD, 2014). A diferença entre elas é com relação à maior especificidade de suas funções, sendo o macrófago mais especializado na fagocitose durante a defesa ativa e a remoção de restos de tecidos (SAMUELSON, 2007), enquanto as células dendríticas são mais voltadas à apresentação de antígenos, sendo as únicas capazes de sensibilizar linfócitos T virgens (TIZARD, 2014). Essa capacidade única se deve ao fato das DCs apresentarem uma degradação endossomal mais lenta, o que permite uma melhor apresentação de antígenos (DEN HAAN et al., 2014).

Os histiócitos se formam a partir da células-tronco CD34+ conforme o estímulo que essas células recebem, formando macrófagos e linhagens de DCs, que englobam as células de Langerhans e células dendríticas intersticiais. O desenvolvimento de macrófagos ocorre com o estímulo do fator estimulador de colônia granulocítica monocítica (GM-CSF) e de macrófagos (M-CSF). As linhagens DCs se formam com o estímulo GM-CSF mais o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). A formação das células dendríticas de Langerhans é estritamente ligada ao estímulo do fator de transformação do crescimento (TGF- $\beta$ 1), além dos citados anteriormente. Esse último fator é liberado pelos queratinócitos presentes na epiderme. Os monócitos sanguíneos podem também se diferenciar em DCs sob a influência de GM-CSF mais interleucina 4 (IL-4) (MOORE, 2014).

As células dendríticas estão localizadas em quase todos os tecidos, exceto no cérebro, mas podem ser encontradas em tecidos adjacentes a este, como nas meninges e no plexo coróide (MOORE, 2014). Da mesma forma, os macrófagos estão localizados em diversas partes do corpo recebendo denominações especiais:

células de Kupffer no fígado, clasmatócitos no baço, células mesangiais glomerulares nos rins, células da micróglia no sistema nervoso central, macrófagos alveolares nos pulmões e células A nas sinóvias articulares (MALE et al., 2014). Quando o organismo fica exposto a corpos estranhos indigeríveis e a patógenos intracelulares persistentes, como micobactéria, ou em algumas doenças, como artrites, neoplasias e enfermidades granulomatosas, os macrófagos ativados se fundem formando uma célula com dois ou mais núcleos, a célula gigante multinucleada (*macrophages giant cells* - MGCs na sigla em inglês) (KONDO et al., 2009; MILDE et al., 2015).

As MGCs foram primeiramente descritas por Langhans (1868), que visualizou sua presença em granulomas de tuberculose (HELMING & GORDON, 2008). Sua formação “in vitro” foi descrita pela primeira vez por Black (1976). Estas células possuem de 2 a 200 núcleos, podendo ser de dois tipos: Langhans, com núcleos concentrados na periferia da célula, e tipo corpo estranho, com núcleos dispersos pelo citoplasma (MARIANO & SPECTOR, 1974). Estes últimos autores pesquisaram o potencial fagocítico *in vivo* dessas células e comprovaram que as células polinucleadas ou policariontes de macrófagos possuem essa característica contra o *Mycobacterium tuberculosis hominis*, mas de forma menos acentuada do que as suas células geradoras, os macrófagos. Fortes (2011) encontrou células gigantes multinucleadas dos tipos Langhans e corpo estranho, contendo fungos dentro de granulomas da Paracoccidioidomicose, micose sistêmica cujo agente etiológico é o *Paracoccidioides brasiliensis*. Já Milde et al. (2015) realizaram uma comparação da atividade fagocítica das MGCs e dos macrófagos “in vitro”, constatando que as MGCs, formadas pela indução com IL-4, fagocitaram “beads” (termo em inglês utilizado em laboratório para esférulas) de poliestireno de diversos diâmetros (0,5, 2, 4,5, 10, 20 e 45 µm), mais efetivamente que seus precursores macrófagos não fundidos. Nesse trabalho, as MGCs apresentaram a capacidade de fagocitar partículas de 45 µm, que os macrófagos precursores não conseguiram, mostrando que a fagocitose de alvos grandes é uma característica inerente às MGCs. Apesar de várias pesquisas virem gradualmente elucidando os mecanismos moleculares da formação das células gigantes, suas ações fisiopatológicas e papéis exatos nas respostas imunes ainda estão mal compreendidas (KONDO et al., 2009).

Além do seu envolvimento fisiológico, macrófagos, células dendríticas e células gigantes multinucleadas, podem estar presentes em sua própria neoformação,

denominada sarcoma histiocítico, histiocitoma fibroso maligno, ou sarcoma pleomórfico indiferenciado (MCGAVIN & ZACHARY, 2009). Trata-se de uma neoplasia maligna, frequente em humanos mas incomum em animais domésticos, correspondendo a apenas 0,34% de todos os tumores caninos e 3% dos tumores de pele em gatos (RASKIN & MEYER, 2011).

Essa neoplasia apresenta-se de duas formas distintas, de acordo com sua apresentação clínica e comportamento biológico: localizada e disseminada. A forma localizada apresenta lesões primárias (tumores únicos ou múltiplos), infiltrativas, com índice metastático de moderado a alto. Essas lesões podem aparecer no baço, linfonodo, pulmão, medula óssea, sistema nervoso central, pele, subcutâneo, tecidos periarticulares e articulares dos membros. Mas estas lesões podem ser drenadas por via linfática e se disseminarem para órgãos secundários (AFFOLTER & MOORE, 2002) como fígado e pulmões (com sítio primário esplênico), e linfonodos hilares (com sítio primário pulmonar), ou até mesmo atingir o organismo como um todo, caracterizando o segundo tipo da neoplasia (MOORE, 2014). Essa forma disseminada também tem sido chamada de histiocitose maligna (MCGAVIN & ZACHARY, 2009). Devido a esse mecanismo de ação do tumor, estudos afirmam que as formas localizada e disseminada na verdade representam estágios diferentes da mesma doença (FULMER & MAULDIN, 2007).

Experimentos recentes empregando técnica imunohistoquímica demonstraram que a maioria dos sarcomas histiocíticos tem origem nas células dendríticas e, devido à ampla distribuição dessas células no organismo, o sarcoma histiocítico pode surgir em praticamente todos os tecidos (MOORE, 2014). A forma menos comum originada de macrófagos, o sarcoma histiocítico hemofagocítico, normalmente surge do baço ou na medula óssea, mostrando características clínicas similares às da forma comum localizada, mas com progressão mais rápida (KENNEDY et al., 2016).

O desenvolvimento do sarcoma histiocítico disseminado é rápido, e na maioria das vezes fatal, enquanto que sua forma localizada tem melhor resposta ao tratamento. Poucos trabalhos relatam a sobrevivência do animal após excisão cirúrgica da forma localizada do tumor. Um estudo mostrou que em 18 casos em que a doença foi de origem sinovial, a sobrevivência dos pacientes foi de 3 a 6 meses para cães não tratados, e de 6 meses para os tratados com amputação - com ou sem quimioterapia -, nos quais a taxa metastática foi de 91% (CRAIG et al., 2002). Outro

estudo mostrou que mesmo sob tratamento da associação de dois quimioterápicos, a lomustina e a doxorubicina, o tempo médio de sobrevivência foi de 185 dias, o que mais uma vez mostra ser uma média de 6 meses (CANNON et al, 2015).

Os histiocitomas malignos caninos representam, portanto, um conjunto de neoplasias agressivas que, apesar de relativamente rara em cães, acarretam elevadas taxas de mortalidade (KENNEDY et al., 2016).

A partir da extração de células desse tumor, foi possível produzir laboratorialmente uma linhagem de cultivo, primeiramente descrita por Wellman et al. (1988), autores que nomearam a cultura como *Dog histiocitic 82 - DH82*.

Através do cultivo de células DH82 originadas do sarcoma histiocítico canino, o presente trabalho vem propor um amplo estudo a respeito de uma função específica dos histiócitos na resposta imune: seu potencial fagocítico. Esse estudo pretende trazer mais conhecimento aos pesquisadores e profissionais da área, e possibilitar uma maior compreensão da progressão clínica da doença e do seu prognóstico desfavorável. Uma vez comprovado o potencial fagocítico das células DH82, assim como das células gigantes multinucleadas produzidas a partir da mesma, podemos verificar se mesmo sendo neoplásicas, essas células mantem essa propriedade, que certamente causaria grandes prejuízos para os tecidos que abrigam essa neoplasia. Além disso, as células gigantes neoplásicas podem servir como um reflexo da funcionalidade das células gigantes não neoplásicas, presentes no organismo animal em quadros inflamatórios granulomatosos de difícil resolução.

Outro aspecto é o reflexo que estudos em modelos caninos neoplásicos tem trazido para a medicina humana. Segundo Pinho et al. (2012), o modelo canino é uma ferramenta ímpar, por ser semelhante na parte clínica e molecular com os cânceres humanos, difíceis de reproduzir em outros sistemas modelo. E, sendo o histiocitoma fibroso maligno o terceiro mais prevalente sarcoma em humanos adultos (ROUHANI et al., 2008), pesquisas sobre essa neoplasia em cães, como modelo experimental da mesma em humanos, será de grande valia para a Medicina.

## **1.1.OBJETIVOS**

### **1.1.1. Geral:**

Avaliar o potencial fagocítico “*in vitro*” de células DH82 e das células gigantes multinucleadas tumorais delas derivadas.

### 1.1.2. Específicos:

- Estabelecer um cultivo de células DH82 originadas de um histiocitoma maligno canino.
- Avaliar “*in vitro*” o potencial fagocítico de células DH82 sobre partículas de Zymosan.
- Avaliar a formação “*in vitro*” de células gigantes tumorais derivadas das células DH82.
- Avaliar “*in vitro*” o potencial fagocítico de células gigantes tumorais sobre as partículas de Zymosan, na citometria de fluxo.
- Comparar esse potencial fagocítico neoplásico com o de células não neoplásicas obtidas a partir de monócitos do sangue periférico.

## 1.2. HIPÓTESES

Uma vez demonstrado por Mariano & Spector (1974) que a célula gigante multinucleada apresenta um potencial fagocítico para *Mycobacterium tuberculosis hominis*, o presente trabalho objetiva comprovar se esse potencial se estende a essas células na sua forma neoplásica (linhagem DH82), a partir da exposição dessas a partículas de Zymosan avaliado pela citometria de fluxo.

Ademais, sendo a célula gigante multinucleada um constituinte do histiocitoma fibroso maligno (MOORE, 2014), pode-se supor que ao se tornar neoplásica ela mantenha esse potencial fagocítico, o que justificaria o grau de malignidade do tumor, devido ao risco desse potencial se voltar contra as próprias células do tecido adjacente.

## CAPITULO 2

### **Avaliação “*In Vitro*” do Potencial Fagocitário de Células Gigantes Tumorais do Histiocitoma Fibroso Maligno Canino**

**(“*In vitro*” evaluation of phagocytic potential of tumor giant cells of canine malignant fibrous histiocytoma)**

**Mayara Carolina Eloy Machado<sup>I</sup>, Alexandra Senegaglia<sup>II</sup>, Lidiane Maria Boldrini Leite<sup>II</sup>, Nathália Ruy Batista da Silva<sup>I</sup>, Gervásio Henrique Bechara<sup>I</sup>.**

<sup>I</sup> Escola de Ciências da Vida, Curso de Medicina Veterinária, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR).

<sup>II</sup> Escola de Medicina, Núcleo de Tecnologia Celular, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR).

Gervásio Henrique Bechara, Professor Titular de Patologia Animal, Escola de Ciências da Vida, Curso de Medicina Veterinária, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Rua Imaculada Conceição 1155, Bairro Prado Velho, Curitiba, Paraná, 80215-901, Brasil.

Email: gervasio.bechara@pucpr.br

### **Resumo**

O Histiocitoma Fibroso Maligno é uma neoplasia incomum em cães, mas que pode surgir em vários tipos de tecidos do organismo e possui um prognóstico desfavorável, o que faz com que estudos avançados a seu respeito se tornem relevantes. O objetivo do presente trabalho foi investigar o potencial fagocítico de células do histiocitoma fibroso maligno canino e compará-lo com o de monócitos do sangue periférico. Como ferramentas de estudo, foram utilizadas células DH82 originadas dessa neoplasia, cultivadas na sua forma mononucleada e que receberam IL-4 adicionada ao meio de cultivo para formação de sua forma gigante multinucleada. Além disso, foi realizada a separação de monócitos normais,

coletados do sangue total periférico de um cão saudável, cultivados também nas duas formas, para comparação com as células neoplásicas. Para avaliar o potencial fagocítico, essas células foram expostas a partículas de Zymosan conjugadas a molécula fluorescente de isotiocianato de fluoresceína (FITC), e adquiridas em citômetro de fluxo. A citometria permitiu determinar a porcentagem de células que internalizaram ou não as partículas. Como resultado do experimento foram obtidos uma média de 69,2% de células mononucleares que fagocitaram e 76,6% de células gigantes que mantiveram o potencial fagocítico, já que não houve diferença entre as duas formas da célula. Com essa pesquisa foi possível determinar que o potencial fagocítico das suas células originárias, os macrófagos, está presente nas células DH82 e DH82 gigantes, o que nos mostrou que provavelmente esse potencial seja responsável pelo menos em parte pelo prognóstico desfavorável dessa doença.

### **Palavras-Chave**

DH82, DH82 gigante, macrófago, neoplasia.

### **Introdução**

Histiócitos é um termo abrangente que designa linhagem de células dendríticas (*dendritic cells* - DCs na sigla em inglês) e de macrófagos.<sup>36</sup> Estas células são sentinelas da resposta imune inata, fagocitando e eliminando antígenos, bem como são de grande importância para a resposta imune adaptativa, capturando antígenos para serem quebrados em peptídeos menores e apresentados para os linfócitos T.<sup>47</sup>

Quando o organismo fica exposto a corpos estranhos indigeríveis, patógenos intracelulares persistentes, como a micobactéria, ou em algumas doenças, como artrites, neoplasias e enfermidades granulomatosas, os macrófagos ativados se fundem formando uma célula com dois ou mais núcleos, a célula gigante multinucleada (*macrophages giant cells* - MGCs na sigla em inglês).<sup>25,32</sup> As MGCs foram primeiramente descritas por Langhans (1868), que visualizou sua presença em granulomas de tuberculose.<sup>18</sup> Sua formação “in vitro” foi descrita pela primeira vez por Black (1976). Estas células possuem de 2 a 200 núcleos, podendo ser de dois tipos: Langhans, com núcleos concentrados na periferia da célula, e tipo corpo

estranho, com núcleos dispersos pelo citoplasma.<sup>29</sup> Estudos mais recentes demonstram a interleucina 4 (IL-4) como indutora da formação de células gigantes.  
18,5,31

Mariano & Spector (1974) comprovaram que as MGCs possuem potencial fagocítico *in vivo* para *Mycobacterium tuberculosis hominis*, mas de forma menos acentuada que as suas células geradoras, os macrófagos. Milde et al. (2015) realizaram uma comparação da atividade fagocítica das MGCs e dos macrófagos *in vitro*, constatando que as MGCs têm potencial fagocítico tanto maior quanto maior as “beads” de poliestireno a que são expostos. Nesse trabalho, as MGCs apresentaram a capacidade de fagocitar partículas de 45 µm, que os macrófagos precursores não conseguiram, mostrando que a fagocitose de alvos grandes é uma característica inerente às MGCs.

Além do envolvimento fisiológico, os macrófagos, as células dendríticas e as células gigantes multinucleadas, podem vir a gerar sua própria neoformação, denominada sarcoma histiocítico, histiocitoma fibroso maligno, ou sarcoma pleomórfico indiferenciado.<sup>30</sup> Trata-se de uma neoplasia maligna frequente em humanos, mas incomum nos animais domésticos, correspondendo a apenas 0,34% de todos os tumores caninos e a 3% dos tumores de pele em gatos.<sup>40</sup>

Essa neoplasia pode se apresentar nas formas localizada e disseminada, de acordo com sua apresentação clínica e comportamento biológico. A forma localizada apresenta lesões primárias (tumores únicos ou múltiplos), infiltrativas, com índice metastático de moderado a alto. Devido à abrangente localização de suas células precursoras não neoplásicas, essas lesões podem aparecer em diversos órgãos, tais como: baço, linfonodo, pulmão, medula óssea, sistema nervoso central, pele, subcutâneo, tecidos periarticulares e articulares dos membros. Metástases ocorrem por via linfática, sendo levada para órgãos secundários,<sup>51,1</sup> como fígado, pulmões e linfonodos hilares ou até mesmo atingir o organismo como um todo, caracterizando o segundo tipo da neoplasia.<sup>36</sup> Essa forma disseminada também tem sido chamada de histiocitose maligna.<sup>30</sup>

O desenvolvimento do sarcoma histiocítico disseminado é rápido e na maioria das vezes fatal, enquanto que sua forma localizada tem melhor resposta ao tratamento. Poucos trabalhos relatam a sobrevivência do animal após excisão cirúrgica da forma localizada do tumor. Um estudo mostrou que em 18 casos em que a doença foi de origem sinovial, a sobrevivência dos pacientes foi de 3 a 6 meses para cães não



tratados, e de 6 meses para os tratados com amputação (com ou sem quimioterapia), nos quais a taxa metastática foi de 91%.<sup>9</sup> Outro trabalho com 17 cães tratados com quimioterapia associada de dois fármacos (Lomustina e Doxorrubicina), no qual 15 deles (88%) apresentavam doença disseminada ou metastática, o tempo médio de sobrevivência foi de 185 (18 a 402) dias (Cannon et al, 2015). Os histiocitomas malignos caninos representam, portanto, um conjunto de neoplasias agressivas que, apesar de relativamente rara em cães, acarretam elevadas taxas de mortalidade.<sup>23</sup>

A partir da extração de células desse tumor, foi possível produzir laboratorialmente uma linhagem de cultivo, primeiramente descrita por Wellman et al. (1988), autor que nomeou a cultura como *Dog histiocytic 82 - DH82*.

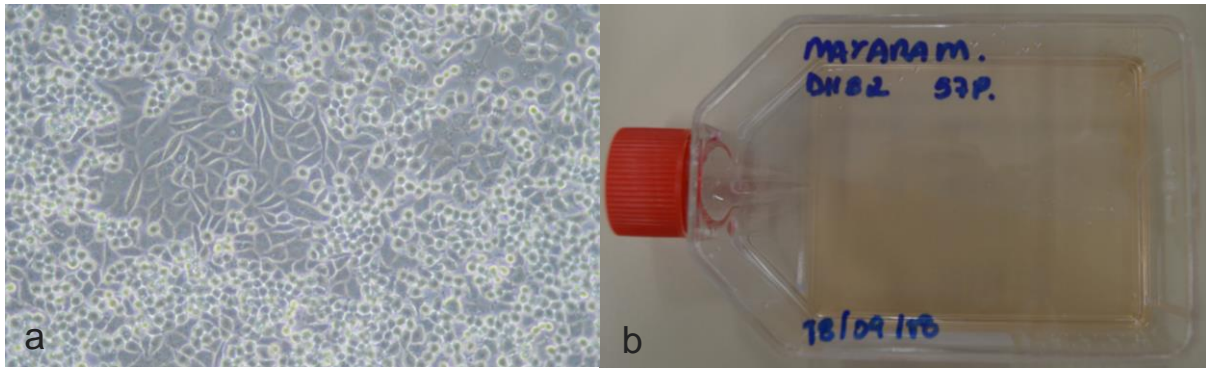
Através do cultivo de células DH82 originadas do sarcoma histiocítico canino, o presente trabalho vem propor um estudo a respeito do potencial fagocítico dessas células, ampliando o conhecimento sobre a progressão clínica da doença e do seu prognóstico desfavorável.

## **Material e Métodos**

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais da PUC-PR, registro 01215 – 1ª versão.

### *Cultivo de células DH82*

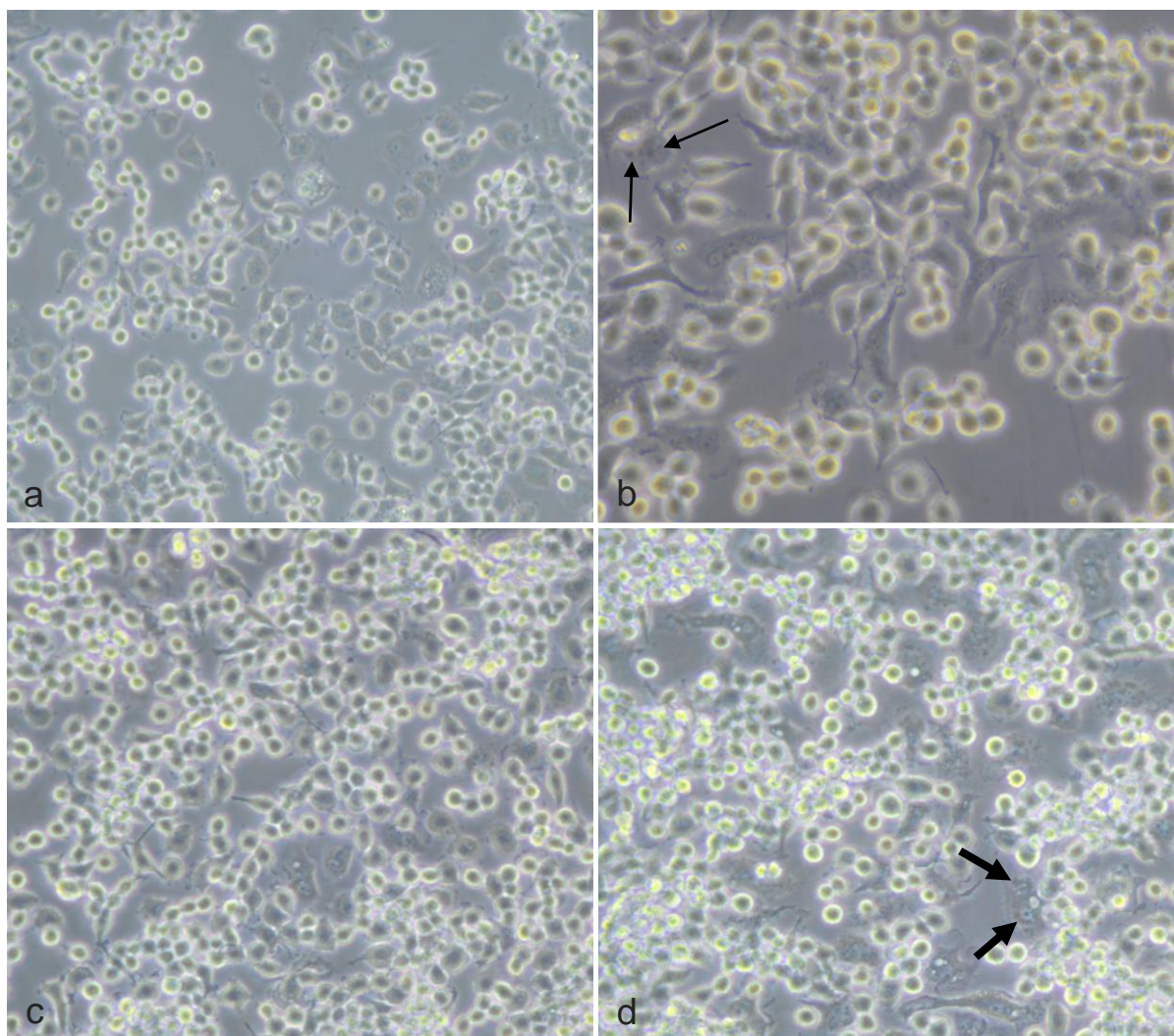
Uma amostra de células da linhagem DH82 (passagem 54 (54P) foi gentilmente cedida pelo Dr. Marcelo B. Labruna da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), e mantida em cultura celular em meio apropriado com o emprego de técnicas descritas anteriormente.<sup>49,10,3</sup> Em resumo, as células DH82 (Figura 1a) foram plaqueadas em garrafas de poliestireno descartáveis de 75 cm<sup>2</sup> (Figura 1b) e mantidas em meio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) com 10% de soro fetal bovino. A cultura foi mantida em incubadora umidificada, a 37°C com 5% de tensão de CO<sub>2</sub>. O meio foi trocado três vezes por semana, descartando-se o sobrenadante e adicionando-se 10 mL de meio fresco.



**Figura 1. Fotomicrografia em microscópio invertido da monocamada de células DH82 (a). A garrafa de 75cm<sup>2</sup> do cultivo das células DH82 (57P) (b). Mantidas em meio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) com 10% de soro fetal bovino.**

#### *Obtenção de células gigantes tumorais*

Após o cultivo e expansão das células DH82, as mesmas foram expostas à interleucina 4 (IL-4) recombinante humana (PeproTech, Inc.) empregada para formação de células gigantes por outros autores.<sup>18,31,5</sup> As células DH82 foram incubadas em garrafas de poliestireno descartáveis de 75 cm<sup>2</sup> contendo  $0,5 \times 10^6$  células/mL durante 20 horas. Após esse período as células foram tratadas com IL-4 (25 ng/mL), incubadas por mais sete dias, com uma troca de meio mais IL-4 no segundo dia de cultivo, quando se realizou uma análise das células no microscópio invertido (Figuras 2a e b). Ao final dos sete dias foi verificado que ainda haviam poucas células gigantes e optou-se por cultivar as células por mais três dias com o dobro da concentração de interleucina (50 ng/mL). No décimo dia as células foram novamente analisadas em microscópio invertido (Olympus CK40) (Figuras 2 c e d).



**Figura 2. Fotomicrografia de células DH82. Células DH82 com dois dias de cultivo, aparecendo as primeiras células gigantes com multinucleação apontada pelas setas finas (a e b). Células DH82 gigantes ao fundo da lâmina com dez dias de cultivo e multinucleação apontada pelas setas grossas (c e d) (40X).**

#### *Separação dos monócitos do sangue total*

Foram coletados 200 mL de sangue de um cão, fêmea, 3 anos de idade, saudável, com os resultados de hemograma dentro dos padrões de referências normais (Figura 3a) (Aprovado pelo Comitê de Ética no uso Animal, Registro do Projeto: 01245 – Emenda - Método de obtenção de células, através do sangue de animais saudáveis). Esse sangue foi armazenado em uma bolsa para coleta de sangue, com anticoagulante CPDA-1 no volume compatível com a quantidade de sangue coletada. Para isso foi necessário a retirada da metade do volume inicial de anticoagulante da bolsa.

O sangue coletado foi levado ao laboratório de cultivo celular da PUCPR, onde foi distribuído em 5 tubos Falcon de 50 mL em volumes de 40 mL de sangue por tubo.

Esse sangue total inicial foi centrifugado por 20 minutos a 900 g, sem aceleração e sem freio, para obtenção do anel leucocitário (Figura 3b). O anel de cada tubo foi então extraído com o auxílio de uma pipeta descartável estéril de 5 mL.

Os anéis leucocitários extraídos foram depositados, cautelosamente, em 4 tubos Falcon de 50 mL, os quais já continham 10 mL de cada tipo de Ficoll, com diferentes densidades: Ficoll Histopaque®-1119 (utilizado para separar monócitos) e Ficoll Histopaque®-1077 (utilizado para separar células mononucleares), sendo o de maior densidade colocado primeiro, ou seja, abaixo do de menor densidade. Para depositar o anel, a pipeta foi encostada na parede do tubo, e o conteúdo extravasado lentamente para que ficasse sobre os dois tipos de Ficoll, sem se misturar a eles (Figura 3c). Esse tubo foi então centrifugado a 400 g sem aceleração e sem freio, por 30 minutos (Figura 3d).

Após centrifugação foi possível observar a presença de dois anéis leucocitários, um acima, onde estavam contidas as células mononucleares em geral, e outro abaixo (entre um Ficoll e o outro) onde estavam apenas os monócitos (Figura 3e). O sobrenadante foi retirado, deixando apenas um pequeno volume próximo ao anel leucocitário. Esse volume foi extraído juntamente com o primeiro anel e depositado em outro tubo Falcon de 50 mL (nomeado de Mononucleares). Depois da retirada do primeiro anel, um pouco de Ficoll que estava entre os anéis, foi desprezado. O restante de Ficoll que sobrou junto com o segundo anel leucocitário, foi aspirado com o anel e depositado em um tubo Falcon 50 mL (nomeado de Monócitos) (Figura 3f). Os tubos foram centrifugados a 400 g, com aceleração e freio por 10 minutos.

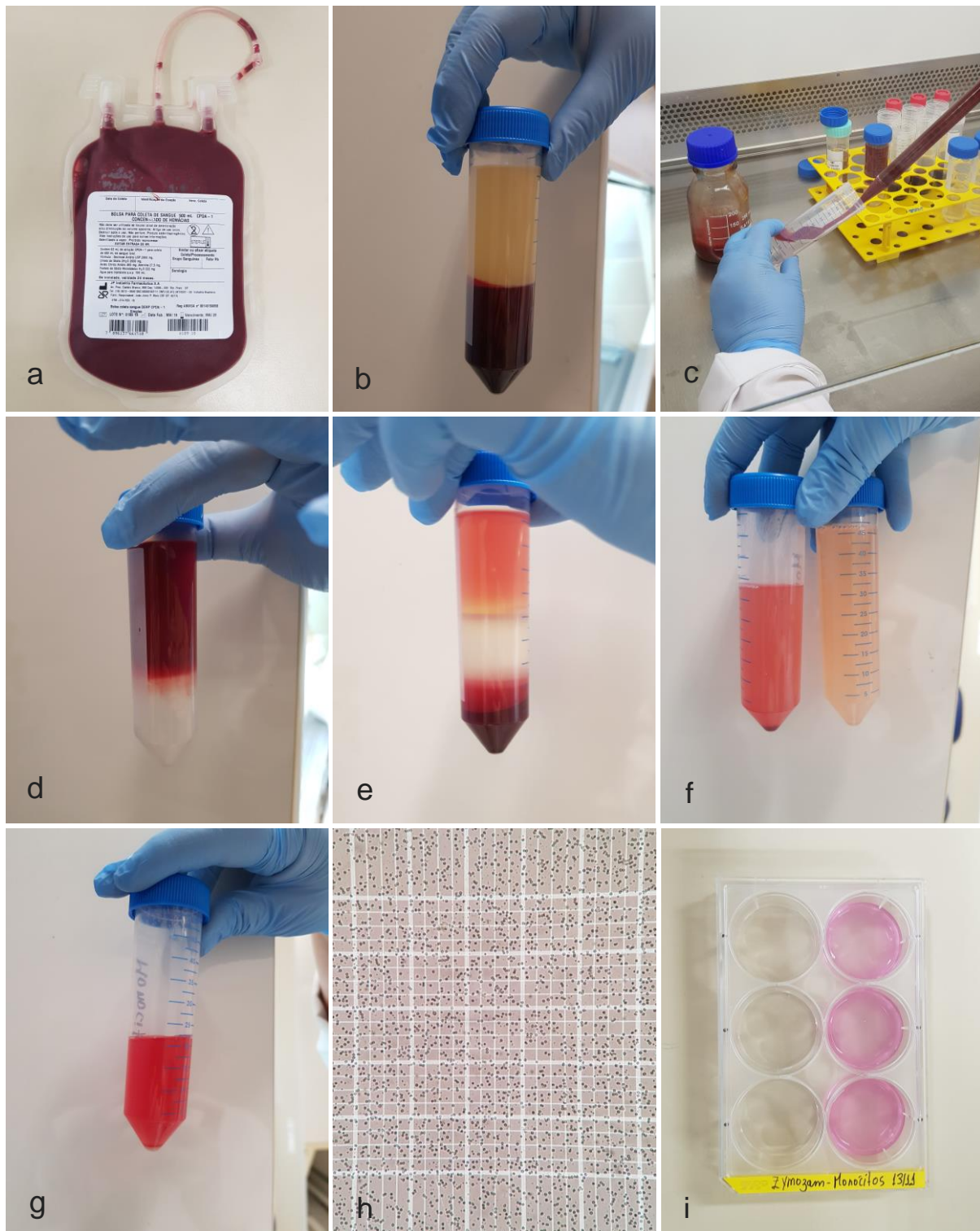
O tubo de mononucleares teve o seu sobrenadante desprezado com a inversão total do tubo sobre um descarte de meio. Restou no fundo do tubo apenas um botão de leucócitos. Esse pellet foi então homogeneizado delicadamente manualmente, e então adicionado 1 mL de Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) e homogeneizando novamente. Com auxílio de uma pipeta de 10 µL, desse volume foi retirado da suspensão de células, e depositado em uma câmara de Neubauer, para contagem em microscópio (Olympus CX31).

O mesmo procedimento de descarte do sobrenadante, homogeneização do botão de células e adição de 1 mL foi realizado com o tubo de Monócitos para contagem em câmara de Neubauer (figura 3h), mas antes esses tiveram que passar por uma etapa de lise das hemácias, com o uso de tampão hemolítico. O tampão foi adicionado sobre o botão de células, num volume de 20 mL, sendo

homogeneizado, e aguardou-se 10 minutos para que ocorresse a ação de lise. Após esse tempo, o tubo foi colocado na centrífuga a 400 g por 10 min com aceleração e freio (Figura 3g).

De acordo com a contagem realizada, foi determinado o volume a ser retirado da suspensão celular, a fim de se ter a quantidade para plaqueamento de  $10^6$  células/mL/poço em uma placa de cultivo de seis poços.





**Figura 3.** Bolsa de sangue (a). Tubo Falcon com sangue total, que passou pela primeira centrifugação, para obtenção do anel leucocitário (b). Deposição do anel leucocitário cautelosamente sobre os dois tipos de Ficoll (c). Tubo pronto para a centrifugação após deposição do anel leucocitário sobre o Ficoll (d). Duplo anel leucocitário, o primeiro formado na parte de cima, entre o plasma e o Ficoll (mononucleares) e o segundo formado abaixo, entre o Ficoll e o concentrado de hemácias (monócitos) (e). Tubo de monócitos (lado esquerdo da imagem) e tubo de mononucleares (lado direito da imagem) após centrifugação (f). Tubo de monócitos após centrifugação da lise de hemácias (g). Contagem de monócitos em câmara de Neubauer (aumento de 10x) (h). Placa de cultivo com monócitos que posteriormente foram expostos ao Zymosan (i).

### *Separação de células mononucleadas do sangue total (Controle Negativo)*

Foi procedida também a separação das células mononucleares do sangue total periférico do mesmo cão saudável, seguindo o mesmo passo a passo anterior, com apenas uma diferença: para a separação só das mononucleadas, foi utilizado apenas um tipo de Ficoll, o de menor densidade (Ficoll Histopaque® - 1077). Formou-se, portanto, apenas uma camada de células, que foram separadas, centrifugadas, e contadas da mesma maneira.

Essas células foram utilizadas como controle negativo para que fosse excluída qualquer possibilidade de que as partículas de Zymosan apresentassem reação inespecífica, sem necessariamente serem fagocitadas. O objetivo dessa separação foi expor os linfócitos, que fazem parte da maior parcela das mononucleares em cães, às partículas de Zymosan, para comprovar que esse tipo celular não apresenta potencial fagocítico.

### *Ensaio de fagocitose com o Zymosan*

O Zymosan, composto de partículas derivadas da parede de *Saccharomyces cerevisiae*, foi empregado no presente trabalho de acordo com a técnica apresentada nas instruções do fabricante (Bio Particles® Fluorescent Particles and Oponizing Reagents). Em resumo, o Zymosan (Molecular Probes) foi ressuspensão em 20 mg/mL de tampão fosfato salina (PBS) estéril. A solução foi então homogeneizada em vortex, por três vezes de 15 segundos cada e então sonicada três vezes durante 20 segundos cada. As partículas de Zymosan obtidas para esse trabalho já estavam associadas a molécula fluorescente de isotiocianato de fluoresceína (FITC). Depois da ressuspensão, essas partículas foram expostas às células gigantes tumorais e às células DH82 mononucleadas para avaliar seu potencial fagocítico.

As células DH82, DH82 gigantes, monócitos e células gigantes saudáveis, foram colocadas em placas com meio de cultivo, na concentração de  $10^6$  células/mL e mantidas em incubadora a 37°C, com 5% de tensão de CO<sub>2</sub> por 30 minutos. Após isso, foram adicionados 100µL de Zymosan na concentração final de 10 mg/mL sobre as células, sendo então as DH82 e as células gigantes incubadas novamente por mais 1 hora, após o que foram retiradas da estufa e lavadas com PBS. O mesmo

procedimento foi repetido com os outros tipos celulares expostos a citometria: DH82 gigantes, monócitos e células gigantes não neoplásicas.

A aquisição das células por citometria de fluxo foi realizada em triplicata, através de um FACS Calibur (BD Biosciences) e a análise pelo software FlowJo (FlowJo, Ashland, OR, USA). Para isso foram desempenhadas 3 etapas: a primeira com a aquisição de uma alíquota pura de células, para calibrar o citômetro. Na segunda etapa, foi adquirido uma porção das células com adição de 7AAD e CD14, para detectar a viabilidade celular e constatar que elas realmente são derivadas de monócitos/macrófagos. A última etapa foi a detecção do potencial fagocítico das células, com aquisição de três alíquotas das células expostas ao Zymosan associado ao FITC.

#### *Caracterização e Viabilidade Celular*

Uma alíquota com  $10^6$  células/mL (DH82, DH82 gigante, monócitos, células gigantes e mononucleares) foi separada em tubos próprios para citometria de fluxo, para adição dos marcadores CD14 e 7AAD (BD Pharmingen™). Primeiro, essas células passaram por uma lavagem, para retirada do meio onde elas estavam diluídas, com 500  $\mu$ L de PBS. Foram centrifugadas a 400 g por 5 minutos. Foram adicionados 5  $\mu$ L de 7AAD e 20  $\mu$ L de CD14, e mantidas a temperatura ambiente, protegidas da luz, por 30 minutos. Após esse tempo as células foram lavadas e centrifugadas como descrito anteriormente, para então serem suspensas em 500  $\mu$ L de PBS. Para verificar a viabilidade das células foi utilizado o corante 7-AAD e o CD14 foi utilizado para reconhecer a origem das células, como derivadas de monócitos. Anticorpos isotípicos idênticos (BD Pharmingen) foram utilizados como controle. A aquisição das células por citometria de fluxo foi realizada através de um FACS Calibur (BD Biosciences) e a análise quantitativa pelo software FlowJo (FlowJo, Ashland, OR, USA).

#### *Análise Estatística*

Na avaliação estatística foi utilizado delineamento inteiramente casualizado. Como meio de avaliação, foram usadas uma amostra controle e uma exposta ao Zymosan que foram analisadas em triplicata. Valores padronizados de células e quantidades



de partículas de Zymosan foram utilizados. A amostra de células que foi exposta estava com  $10^6$  células/mL e a quantidade de Zymosan foi de 20mg/mL.

O número de amostras para comparação da porcentagem de células que foram capazes de fagocitar partículas, foi determinado por meio do cálculo de intensidade amostral para comparação de médias por meio do teste t, com um alfa de 0,05, pressupondo um desvio padrão de 2,5 % e uma margem de erro de 3%.

Foi utilizado o teste de Qui-quadrado de Pearson <sup>37</sup> para comparar o número de células, percentual de fagocitose, CD+14 e 7AAD entre DH82 e DH82 gigante (P = 0,05).

## **Resultados**

### *Formação das células gigantes*

Com a inoculação de 25mg/mL de IL-4 nos poços de cultivo foi possível verificar o aparecimento de células multinucleadas já com dois dias pós inoculação, tanto nos cultivos de células DH82 gigantes, quanto nos cultivos de células gigantes saudáveis. Essas células se apresentaram plenamente formadas com sete dias de cultivo, quando foi possível visualizar, com o auxílio do microscópio invertido, células multinucleadas com numerosos núcleos.

### *Separação de monócitos*

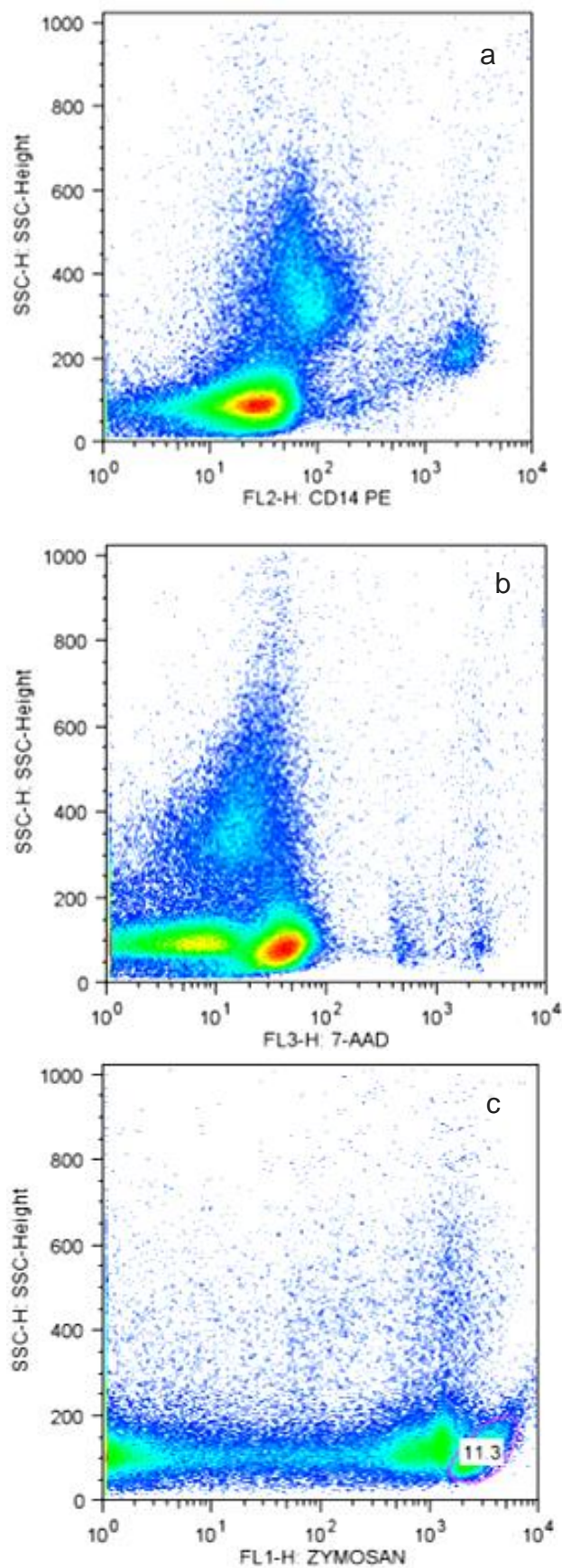
Após a separação com Ficoll, as células mononucleares e os monócitos foram contados separadamente. Foram contadas  $116,25 \times 10^6$  células mononucleares e  $40 \times 10^6$  monócitos.

### *Citometria de Fluxo do controle negativo*

Na avaliação das mononucleares ao CD14, foi possível observar que apenas uma população à direita do gráfico, apresentou marcação com o CD14, totalizando 8,41% (Figura 4a). Essa população possivelmente é composta por monócitos. Na marcação por 7-AAD, foi possível avaliar que a maior parte da população apresentou viabilidade, apenas uma pequena parte, situada à direita do gráfico estavam mortas (Figura 4b). A aquisição de mononucleares expostas ao Zymosan apresentou apenas uma pequena parte da população fagocitando essa partícula, que correspondeu a 11,3% (Figura 4c), valor muito próximo ao que foi positivo para

CD14, mostrando que a maior parte da população que apresentou fagocitose, era integrada por monócitos. A porcentagem restante pode ser justificada pela presença não esperada de uma pequena população de polimorfonucleares, representada no gráfico CD14, situada acima das demais, na parte central do gráfico, com maior granulosidade.

O fato de a menor parte das células terem potencial fagocítico, mostra que como esperado a maior população é constituída por linfócitos que não apresentaram potencial fagocítico das partículas de Zymosan.



**Figura 4 - Análises obtidas no citômetro de fluxo das células mononucleares. Marcação das células por CD14 (8,41%) (a). Marcação dos monócitos ao 7AAD (2,08%) (b). Porcentagem de fagocitose as partículas de Zymosan (11,3%) (c).**

### *Citometria de Fluxo das células DH82*

A fagocitose do Zymosan pelas células DH82 e DH82 gigantes foi investigada em triplicata com utilização de citometria de fluxo. Na primeira etapa, foram adquiridas  $52 \times 10^3$  células, para calibrar o citômetro; na segunda etapa, em torno de 90 mil células DH82 com adição de 7AAD e CD14 (Figura 5a e b). Na última etapa de detecção do potencial fagocítico dessas células, foram avaliadas no citômetro três amostras de  $1 \times 10^5$  células DH82 com partículas de Zymosan, conjugadas por FITC, fagocitadas (Figura 5c). A tabela 1 mostra a porcentagem de cada triplicata de células DH82 (mononucleada e multinucleada) que foram capazes de fagocitar essas partículas. As mesmas etapas foram realizadas com as células DH82 gigantes (Figuras 5d, e e f).

**Tabela 1 - Análise em triplicata das células DH82 (57P) e DH82 Gigante Multinucleada (58P), realizada na Citometria de Fluxo.**

Tipo de célula	Amostra	Porcentagem de fagocitose (%)	Média de fagocitose	CD14 (%)	7AAD+ (%)	Viabilidade
DH82	1	85,1	69,2	99	13,4	86,6%
DH82	2	66,1				
DH82	3	56,5				
DH82 gigante	1	88,1	76,6	98,8	22,1	77,9%
DH82 gigante	2	86,1				
DH82 gigante	3	55,7				

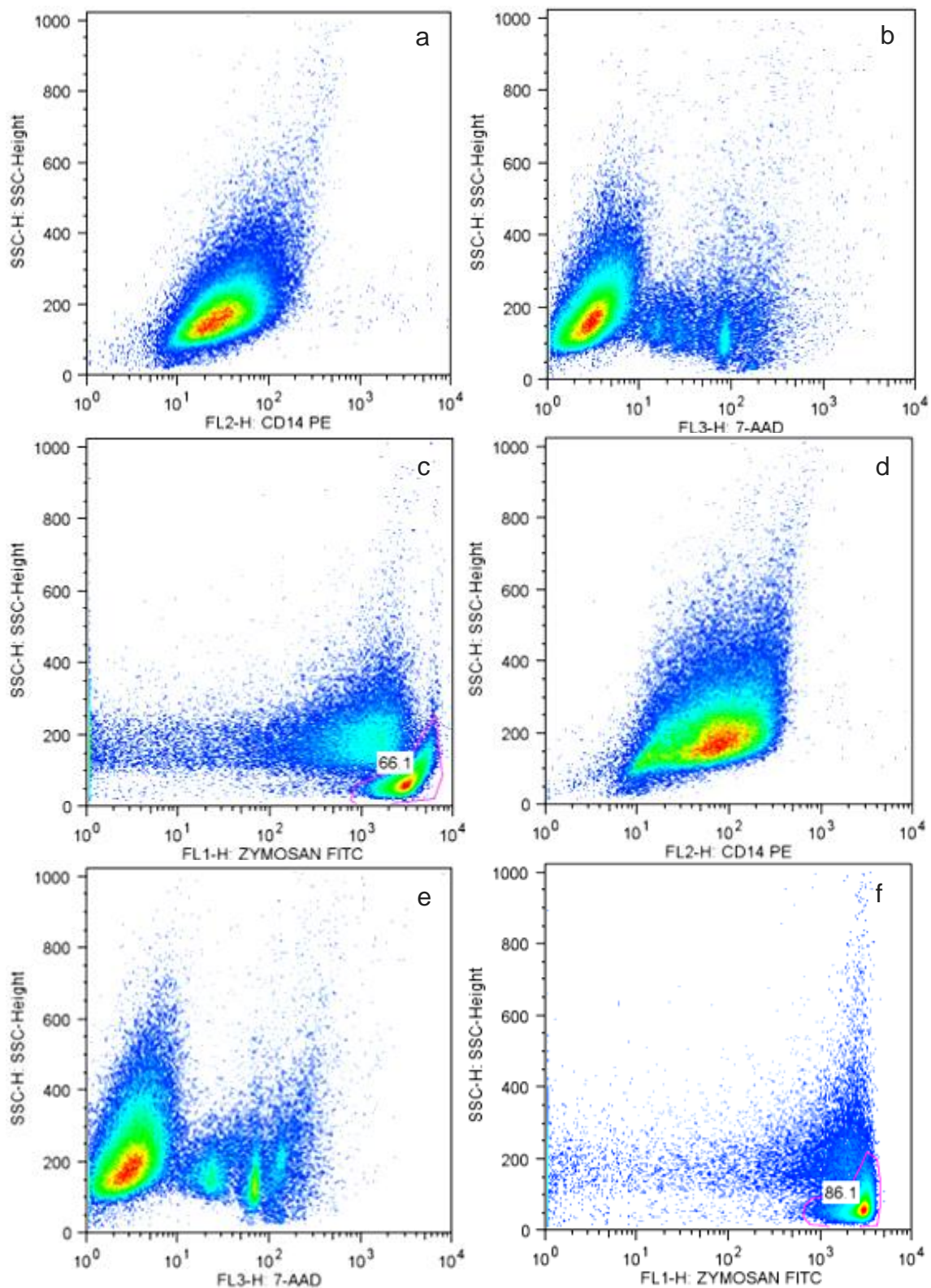


Figura 5 – Gráficos representativos das análises obtidas no citômetro de fluxo das células DH82 e DH82 gigante. Marcação das células DH82 mononucleadas para CD14 (99%) (a). Marcação das células DH82 mononucleadas ao 7AAD (13,4%) (b). Porcentagem de fagocitose as partículas de Zymosan da segunda amostra de DH82 mononucleada (66,1%) (c). Marcação das células DH82 multinucleadas para CD14 (98,8%) (d). Marcação das células DH82 multinucleadas ao 7AAD (22,1%) (e). Porcentagem de fagocitose as partículas de Zymosan da segunda amostra de DH82 multinucleadas (86,1%) (f).

Através da análise estatística, pode-se constatar que não houve diferença significativa entre nenhuma das variáveis avaliadas na citometria de fluxo. Essa análise demonstra que: a) as células DH82 mononucleadas e multinucleadas apresentaram viabilidade análoga (determinada pelas células mortas coradas com o 7 AAD), b) são derivadas de macrófagos (determinado pela positividade das células ao CD14), e c) apresentam potencial fagocítico similar (tabela 2).

**Tabela 2 - Análise estatística dos parâmetros avaliados na citometria de fluxo, para as células DH82 mononucleada (57P) e gigante (58P).**

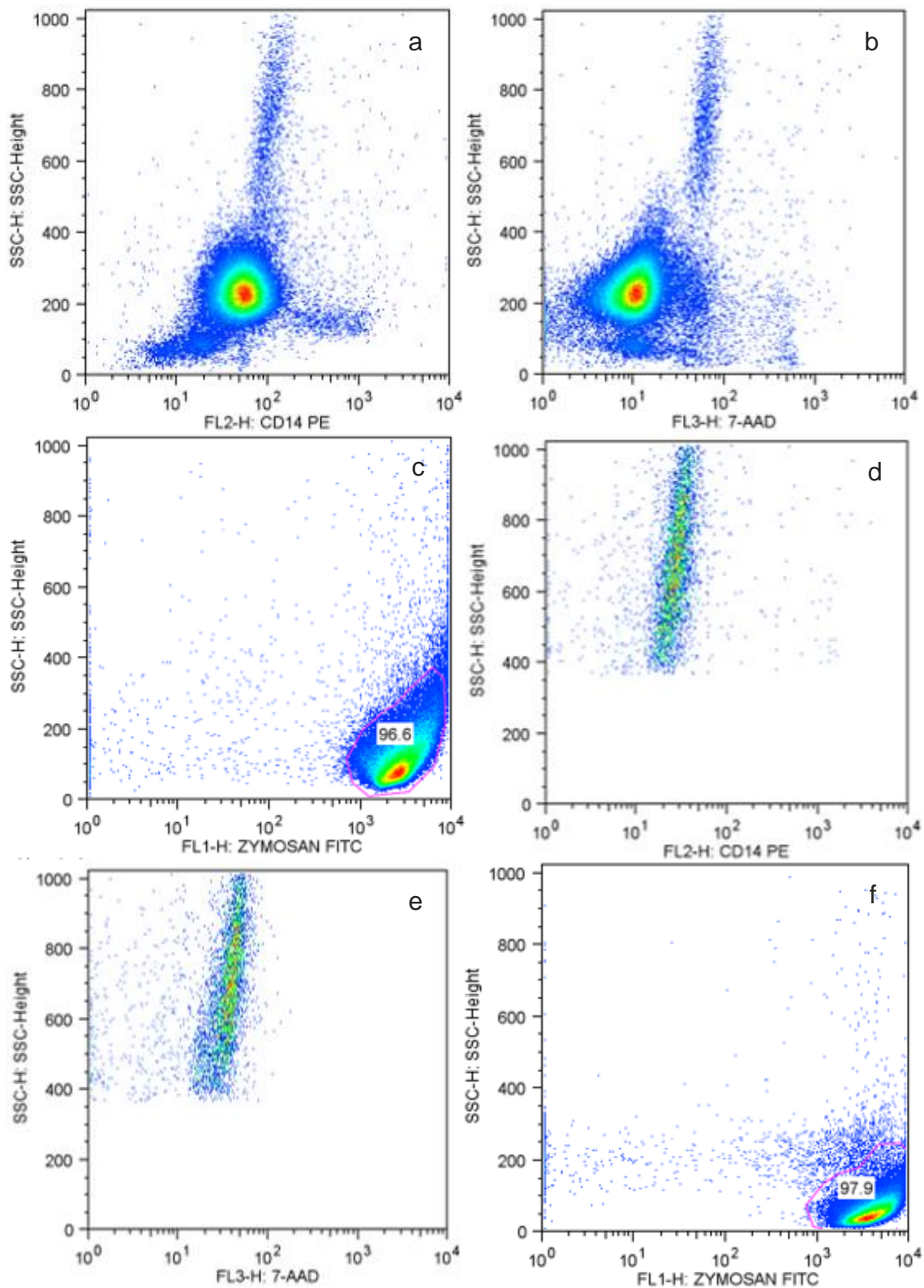
<b>Variáveis</b>	<b>DH82</b>	<b>DH82 Gigante</b>	<b>Valor de P</b>
<b>% de Fagocitose</b>	69,2	76,6	0,5400
<b>+ CD14 (%)</b>	99,0	98,8	0,9886
<b>+ 7 AAD (%)</b>	13,4	22,1	0,1442

#### *Citometria de Fluxo dos Monócitos e Células gigantes não neoplásicas*

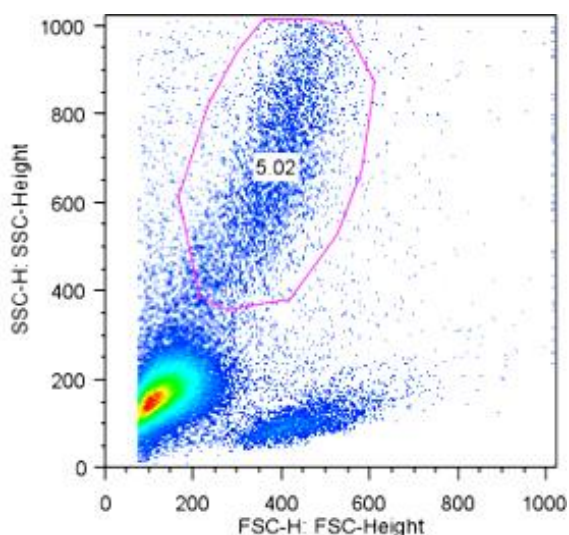
Análises em triplicata da fagocitose foram realizadas com cada tipo celular não neoplásico (monócitos e células gigantes multinucleadas), separados do sangue periférico de cão. Primeiramente foi realizada a aquisição de uma alíquota pura de 100 mil células, para calibrar o citômetro de fluxo. Na segunda etapa, 100 mil células com adição de 7AAD e CD14 (Figura 6a, b, d e e). Na última etapa de avaliação do potencial fagocítico dessas células, foram adquiridas três amostras de  $1 \times 10^5$ , previamente expostas às partículas de Zymosan, conjugadas por FITC (Figura 6c e f). As etapas foram realizadas separadamente para cada um dos tipos celulares.

Com o gráfico formado pela segunda etapa da citometria de fluxo das células gigantes, foi possível separar essas células das demais, sendo elas correspondentes a 5,02% da população (Figura 7). Isso porque ao induzir a sua formação com interleucina, nem todas as células tornaram-se multinucleadas.





**Figura 6 - Análises obtidas no citômetro de fluxo dos monócitos e células gigantes saudáveis. Marcação dos monócitos ao CD14 (97%) (a). Marcação dos monócitos ao 7AAD (4,6%) (b). Porcentagem de fagocitose as partículas de Zymosan da primeira amostra de monócitos (96,6%) (c). Marcação das células gigantes ao CD14 (95,2%) (d). Marcação das células gigantes ao 7AAD (0,3%) (e). Porcentagem de fagocitose as partículas de Zymosan da primeira amostra das células gigantes (97,9%) (f).**



**Figura 7 - Separação da população correspondente às células gigantes multinucleadas, de acordo com o seu tamanho e granulidade (5,02% da população total).**

Através da análise estatística, pode-se constatar que não houve diferença significativa entre nenhuma das variáveis avaliadas na citometria de fluxo. Essa análise demonstra que os monócitos e as células gigantes multinucleadas saudáveis apresentaram viabilidade análoga (determinada pela marcação das células com o 7-AAD), são derivadas de monócitos/macrófagos (determinado pela positividade das células ao CD14) e apresentam potencial fagocítico similar (tabela 3).

**Tabela 3 - Análise estatística dos parâmetros avaliados na citometria de fluxo para Monócitos e Células Gigantes não neoplásicas.**

<b>Variáveis</b>	<b>Monócitos</b>	<b>Células Gigantes</b>	<b>Valor de P</b>
<b>% de Fagocitose média</b>	99,6	97,4	0,9561
<b>+ CD14 (%)</b>	97,0	95,2	0,8966
<b>+ 7 AAD (%)</b>	4,6	0,3	0,0520

*Comparação entre as células DH82 neoplásicas e os monócitos e células gigantes saudáveis*

A obtenção de células saudáveis de cães permitiu a comparação entre a ação fagocítica dessas com relação as células neoplásicas. Para isso foram comparadas separadamente as células mononucleares (monócitos e DH82 mononucleada) e as multinucleadas (gigante multinucleada saudável e DH82 gigante). Na primeira comparação foi possível observar que houve diferença entre os parâmetros 7-AAD e porcentagem de fagocitose, mostrando que os monócitos possuem viabilidade e



fagocitose maior que as DH82 (tabela 4). Na segunda comparação, foi possível constatar diferença apenas entre a variável 7-AAD, mostrando que a viabilidade das células gigantes saudáveis foi maior que a das DH82 gigantes.

**Tabela 4 - Comparação entre monócitos e DH82 mononucleada, nas variáveis analisadas em citometria de fluxo.**

<b>Variáveis</b>	<b>Monócitos</b>	<b>DH82</b>	<b>Valor de P</b>
<b>% de Fagocitose média</b>	99,6	69,3	0,0335
<b>+ CD14 (%)</b>	97,0	99	0,8864
<b>+ 7 AAD (%)</b>	4,6	13,4	0,0380

**Tabela 5 - Comparação entre células gigantes saudáveis e DH82 gigante, nas variáveis analisadas em citometria de fluxo.**

<b>Variáveis</b>	<b>Cél. Gigante</b>	<b>DH82 Gigante</b>	<b>Valor de P</b>
<b>% de Fagocitose média</b>	97,4	76,6	0,1159
<b>+ CD14 (%)</b>	95,2	98,8	0,7960
<b>+ 7 AAD (%)</b>	0,3	22,1	<0,001

## **Discussão**

Na análise por citometria de fluxo foi possível comprovar a origem das células DH82, porquanto através da marcação por CD14 ambas as células, mononucleadas e gigantes, foram reconhecidas como monócitos. Isso porque CD14 é um importante marcador de superfície desse tipo celular.<sup>15</sup> Essa confirmação de origem foi atestada mais uma vez quando comparadas com as células saudáveis, em que não houve diferença na positividade para CD14. Assim como foi possível verificar que a viabilidade celular das DH82 em ambas as formas, estava acima de 77%, com a utilização do 7-AAD. O 7AAD é um corante fluorescente que se liga ao DNA, entre as bases de citosina e guanina, e através dessa propriedade, tem sido utilizado para definir populações de células mortas.<sup>38</sup>

Quando comparadas as células neoplásicas e não neoplásicas, foi possível observar que as saudáveis possuíam menor marcação para 7-AAD, determinando uma maior viabilidade. A baixa viabilidade das células neoplásicas pode estar relacionada com a falta de adequação dessas células aos cinco fundamentos da multicelularidade (cooperação em nível celular): inibição da proliferação celular,

regulação da morte celular, divisão do trabalho, transporte de recursos e criação e manutenção do ambiente extracelular. A burla dessas propriedades de cooperação, leva a um colapso da manutenção do ambiente multicelular. A intensa proliferação e falta de controle da morte celular causam alta densidade, que juntamente com a falta de recursos, de divisão de trabalho e conservação do ambiente externo, ocasionam seleção celular, por levar a formação de ambientes degradados. Esses ambientes podem ser gerados pelo efeito Warburg, pois o metabolismo glicolítico eleva a captação de glicose e os subprodutos, produzidos a partir dele, intoxicam o meio onde estão as células.<sup>2</sup> Esses efeitos se potencializam em ambientes *in vitro*, como nas condições de cultivo das células empregadas nesse trabalho.

O outro tipo celular derivado da DH82, que foi possível cultivar no presente trabalho após o estímulo por meio da IL-4 no meio de cultivo, foram as células DH82 gigantes. Sabe-se que esse tipo celular está presente em análises citológicas e histológicas dos sarcomas histiocíticos.<sup>44,22,20,28</sup> O que esse trabalho veio especular é se essas células, as DH82 gigantes, mantêm potencial fagocítico da célula de origem. Isso foi verificado e comprovado pela análise por citometria de fluxo de amostras de células DH82 gigantes, que foram capazes de fagocitar partículas de Zymosan, sem diferença estatisticamente significativa com as células gigantes multinucleadas saudáveis. O potencial fagocítico foi em média de 76,6%, sendo este mantido mesmo com o fato de a viabilidade celular das DH82 gigantes ter sido menor.

Mariano & Spector (1974) demonstraram a formação de células gigantes multinucleadas na sua forma não neoplásica a partir do 4º dia do implante subcutâneo de lamínulas de vidros em camundongos. No presente trabalho foi possível obter a formação inicial de células DH82 binucleadas já a partir do segundo dia de cultivo com inoculação de IL-4 no meio. A diferença no tempo de formação das células pode ter ocorrido pelo fato de DH82 serem células neoplásicas, que tem um potencial de multiplicação e metabolização mais rápido.<sup>17</sup> Outra hipótese é a de que a adição direta de IL-4 no meio deve ter rapidamente estimulado a fusão celular das DH82, e por conseguinte a formação das células DH82 gigantes. “*In vivo*” o processo se torna mais demorado, porque quando essas células estão no organismo tem que primeiramente ser reconhecido o estímulo da presença do corpo estranho, para depois ser sintetizado e liberado a IL-4 no meio. Como por exemplo no experimento em que foi injetada quitina na cavidade peritoneal, para simular a

reação a corpo estranho. A presença desse polissacarídeo induziu uma peritonite, que desencadeou uma sinalização imune inata, levando a uma rápida infiltração de leucócitos produtores de IL-4, como eosinófilos e basófilos, e posteriormente a liberação de IL-4 realizada por eles induziu a polarização de macrófagos.<sup>5</sup> A segunda hipótese passa então a ser mais favorecida, quando levamos em conta o fato de que no cultivo e indução da formação de células gigantes não neoplásicas, a formação de multinucleadas também ocorreu com dois dias.

As células gigantes estão presentes não só no sarcoma histiocítico, como também em diversas outras neoplasias que acometem animais e humanos. Essas neoplasias com células gigantes podem acometer diversos sistemas do organismo, tais como sistema nervoso central,<sup>13,26</sup> respiratório,<sup>48</sup> digestivo,<sup>36</sup> reprodutivo,<sup>46</sup> urinário<sup>45</sup> e tegumentar.<sup>8</sup> Essa presença é tão evidente, que um dos critérios de avaliação de malignidade em citologia é baseado na presença ou não dessas células em tumores.<sup>24</sup> Pesquisadores há 41 anos atrás já relataram a presença delas em linfoma de Hodgkin como derivadas de macrófagos ou células intimamente relacionadas ao sistema mononuclear fagocítico.<sup>21</sup> Na mesma época, outros autores buscaram descobrir relações entre as células gigantes derivadas de macrófagos e a célula gigante presente nesse linfoma, chamada célula de Reed-Sternberg. Através de análises morfológicas com microscopia eletrônica de transmissão e imunofluorescência, foi levantada a hipótese de que a heterogeneidade entre as células de Reed-Sternberg em todos os tipos de doença de Hodgkin é paralela à diversidade do sistema monócito-macrófago.<sup>19,27</sup>

Com essa pesquisa foi possível determinar que mesmo sendo reduzido, o potencial fagocítico está presente nas células DH82 e DH82 gigantes derivadas do Histiocitoma Fibroso Maligno, o que nos mostrou que provavelmente esse potencial seja responsável pelo menos em parte pelo prognóstico desfavorável dessa doença. Além disso, ao se verificar a grande diversidade de neoplasias que possuem células gigantes em seu leito, é de grande valia dar continuidade a esta pesquisa, procurando avaliar se essas células gigantes são realmente de origem neoplásica, ou se são uma defesa do organismo contra a própria neoplasia, já que o corpo utiliza da mesma em casos de difícil resolução para o sistema imune. Caso elas não sejam de origem neoplásica, podemos estar diante de uma ferramenta de combate ao câncer do próprio organismo.

## Referências

1. Affolter VK, Moore PF. Localized and Disseminated Histiocytic Sarcoma of Dendritic Cell Origin in Dogs. *Veterinary Pathology* 2002; 39:74–83.
2. Aktipis CA, Boddy AM, Jansen G, Hibner U, Hochberg ME, Maley CC, Wilkinson GS. Cancer across the tree of life: cooperation and cheating in multicellularity. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2015; 370: 1-21.
3. Aguiar DM, Saito TB, Hagiwara MK, Machado RZ, Labruna MB. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. *Titulo da Revista ?* 2007; 37 (3): 796-802.
4. Back DZ, Kostova EB, Kraaij M, Bergand TK, Bruggen R. Of macrophages and red blood cells; a complex love story. *Front Physiology* 2014; 5 (9): 1-11.
5. Binder F, Hayakawa M, Choo M.; Sano Y, Park, JM. Interleukin-4-induced  $\beta$ -catenin regulates the conversion of macrophages to multinucleated giant cells. *Molecular Immunology.* 2013; 54: 157-163.
6. Cannon C, Borgatti A, Henson M, Husbands B. Evaluation of a combination chemotherapy protocol including lomustine and doxorubicin in canine histiocytic sarcoma. *Journal of Small Animal Practice.* 2015; 56: 425–429.
7. Chakravarthi BVSK., Nepal S, Varambally S. Genomic and Epigenomic Alterations in Cancer. *American Journal of Pathology.* 2016; 186 (7): 1724 - 1835.
8. Chung HJ, Wolpowitz D, Scott G, Gilmore E, Bhawan J. Squamous cell carcinoma with osteoclast-like giant cells: a morphologically heterologous group including carcinosarcoma and squamous cell carcinoma with stromal changes. *Journal of Cutaneous Pathology.* 2016; 43:148-157.
9. Craig LE, Julian E, Ferracone D. The Diagnosis and Prognosis of Synovial Tumors in Dogs: 35 Cases. *Veterinary Pathology.* 2002; 39 (1):66-73.
10. Dawson JE, Anderson BE, Fishbein DB, Sanchez JL, Goldsmith CS, Wilson KH, Wayne Duntley C. Isolation and Characterization of an *Ehrlichia* sp. from a Patient Diagnosed with Human Ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology.* 1991; 29 (12): 2741-2745.
11. Dervisis NG, Kiupel M, Qin Q, Cesario L. Clinical prognostic factors in canine histiocytic sarcoma. *Veterinary and Comparative Oncology.* 2016; 15 (4): 1171-1180.
12. Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity.* 2014; (41): 21-35.
13. Erson-Omay EZ, Çağlayan AO, Schultz N, Weinhold N, Omay SB, Özduman K, Köksal Y, Li J, Serin Harmancı A, Clark V, Carrión-Grant G, Baranoski J, Çağlar C, Barak T, Coşkun S, Baran B, Köse D, Sun J, Bakırcioğlu M, Moliterno Günel J, Pamir MN, Mishra-Gorur K, Bilguvar K, Yasuno K, Vortmeyer A, Huttner AJ, Sander C, Günel M. Somatic POLE mutations cause an ultramutated giant cell high-grade glioma subtype with better prognosis. *Neuro Oncology.* 2015;17(10):1356-1364.

14. Fortes MRP, Kurokawa CS, Marques SA, Miot HA, Marques MEA. Imunologia da paracoccidiodomicose. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2011; 86 (3): 516-525.
15. Gibbons N, Goulart MR, Chang Y, Efstathiou K, Purcell R, Wua Y, Peterse LM, Turmaine M, Szladovits B, Garden OA. Phenotypic heterogeneity of peripheral monocytes in healthy dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2017; 190: 26-30.
16. Gordonn S, Plüddemann A. Macrophage Clearance of Apoptotic Cells: A Critical Assessment. *Frontiers in Immunology*. 2018; 9 (127): 1-9.
17. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. 2011; 144: 646-674.
18. Helming L, Gordon S. Molecular mediators of macrophage fusion. *Trends in Cell Biology*. 2009; 19 (10): 514-522.
19. Kadin ME, Stites DP, Levy R, Warnke R. Imunoglobulina Exógena e a Origem dos Macrófagos das Células de Reed-Sternberg na Doença de Hodgkin. *New England Journal of Medicine*. 1978; 299: 1208-1214.
20. Kagawa Y, Nakano Y, Kobayashi T, Asano K, Takagi S. Localized pulmonary histiocytic sarcomas in Pembroke Welsh Corgi. *Journal of Veterinary Medicine Science*. 2015; 77(12): 1659-1661.
21. Kaplan H, Gartner S. 'Sternberg-Reed' giant cells of Hodgkin's disease: cultivation in vitro, heterotransplantation, and characterization as neoplastic macrophages. *International Journal of Cancer*. 1977;19:511-525.
22. Kato Y, Funato R, Hirata A, Murakami M, Mori T, Maruo K, Yanai T, Sakai H. Immunocytochemical detection of the class A macrophage scavenger receptor CD204 using air-dried cytologic smears of canine histiocytic sarcoma. *Veterinary Clinic Pathology*. 2014; 43 (4): 589-593.
23. Kennedy K, Thomas R, Breen M. Canine Histiocytic Malignancies-Challenges. *Veterinary Sciences*. 2016; 3:1-10.
24. Kiupel M, Webster JD, Bailey KL, Best S, DeLay J, Detrisac DJ, Fitzgerald SD, Gamble D, Ginn PE, Goldschmidt MH, Hendrick MJ, Howerth EW, Janovitz EB, Langohr I, Lenz SD, Lipscomb TP, Miller MA, Misdrop W, Moroff S, Mullaney TP, Neyens I, O'Toole D, Ramos-Vara J, Scase TJ, Schulman FY, Sledge D, Smedley RC, Smith K, Snyder PW, Southorn E, Stedman NL, Steficek BA, Stromberg PC, Valli VE, Weisbrode SE, Yager J, Heller J, Miller R. Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Veterinary Pathology*. 2011; 48: 147-155.
25. Kondo Y, Yasui K, Yashiro M, Tsuge M, Kotani N, Morishima T. Multi-nucleated giant cell formation from human cord blood monocytes in vitro, in comparison with adult peripheral blood monocytes. *Journal of Translational Immunology*. 2009; 158: 84-90.
26. Louis DN, Perry A, Reifemberger G, Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health

- Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*. 2016; 131 (6): 803-820.
27. Maksem JA, Hassan MO, Carter JR. Hypothesis: The Ultrastructural Heterogeneity of the Reed-Sternberg Cell and Its Resemblance to Monocyte-Macrophage Differentiation In Vivo. *Journal of Ultrastructural Pathology*. 1983; 4(4): 379-389.
28. Mariani CL, Jennings MK, Olby NJ, Borst LB, Brown Jr JC, Robertson ID, Seiler GS, MacKillop E. Histiocytic Sarcoma with Central Nervous System Involvement in Dogs: 19 Cases (2006–2012). *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2015; 29:607-613.
29. Mariano M, Spector WG. The Formation and properties of macrophage polykaryons (Inflammatory Giant Cells). *Journal of Pathology*. 1974; 113 (1): 1-19.
30. Mcgavin MD, Zachary JF. *Bases da patologia em veterinária*. 4.ed. Rio de Janeiro: Mosby Elsevier, 2009.
31. McNally AK, Anderson JM. Foreign body-type multinucleated giant cells induced by interleukin-4 express select lymphocyte co-stimulatory molecules and are phenotypically distinct from osteoclasts and dendritic cells. *Exp. Mol. Pathol*. 2011; 91(3): 673–681.
32. Milde R, Ritter J, Tennent GA, Pepys MB, Verschoor A, Helming L. Multinucleated Giant Cells Are Specialized for Complement-Mediated Phagocytosis and Large Target Destruction. *Cell Reports*. 2015; 13: 1937-1948.
33. Mills CD, Ley K. M1 and M2 Macrophages: The Chicken and the Egg of Immunity. *Journal of Innate Immunity*. 2014; 6(6): 716–726.
34. Moore PF, Affolter VK, Vernau W. Canine Hemophagocytic Histiocytic Sarcoma: A Proliferative Disorder of CD11d+ Macrophages. *Veterinary Pathology*. 2006; 43:632–645.
35. Moore PF. A review of histiocytic diseases of dogs and cats. *Veterinary Pathology*. 2014; 51 (1): 167-184.
36. Muraki T, Reid MD, Basturk O, Jang K, Bedolla G, Bagci P, Mittal P, Memis , Katabi N, Bandyopadhyay S, Sarmiento JM, Krasinskas A, Klimstra DS, Adsay V. Undifferentiated Carcinoma with Osteoclastic Giant Cells of the Pancreas: Clinicopathological Analysis of 38 Cases Highlights A More Protracted Clinical Course than Currently Appreciated. *American Journal of Surgical Pathology*. 2016; 40(9): 1203-1216.
37. Petrie A, Watson P. *Estatística em Ciência Animal e Veterinária*. 2º Ed. Editora Roca. SP. 2009.
38. Philpott NJ, Turner AJC, Scopes J, Westby M, Marsh JCW, Gordon-Smith EC, Dalgleish AG, Gibson FM . The Use of 7-Amino Actinomycin D in Identifying Apoptosis: Simplicity of Use and Broad Spectrum of Application Compared With Other Techniques. *Blood*. 1996; 87(6): 2244-2251.
39. Pinho SS, Carvalho S, Cabral J, Reis CA, Gartner F. Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. *Translational Research*. 2012; 159 (3): 165-172.

40. Raskin RE, Meyer DJ. *Citologia de Cães e Gatos: Atlas Colorido e Guia de Interpretação*. 2 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p. 59.
41. Rassnick KM, Moore AS, Russell DS, Northrup NC, Kristal O, Bailey DB, Flory AB, Kiselow MA, Intile JL. Phase II, Open-Label Trial of Single-Agent CCNU in Dogs with Previously Untreated Histiocytic Sarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2010; 24:1528–1531.
42. Black MM, Fukuyama K, Epstein WL. The induction of human multinucleated monocytes in culture. *Journal of Investigative Dermatology*. 1976; 66 (2):90-92.
43. Rouhani P, Fletcher CDM, Devesa SS, Toro JR. Cutaneous Soft Tissue Sarcoma Incidence Patterns in the U.S. *American Cancer Society*. 2008; 113 (3):616-627.
44. Sakai H, Nakano H, Yamaguchi R, Yonemaru K, Yanai T, Masegi T. Establishment of a new canine cell line (CCT) originated from a Cutaneous Malignant Histiocytosis. *Journal of Veterinary Medicine Science*. 2003; 65 (6): 731-735.
45. Samaratunga H, Delahunt B, Egevad L, Adamson M, Hussey D, Malone G, Hoyle K, Nathan T, Kerle D, Ferguson P, Nacey JN. Pleomorphic giant cell carcinoma of the urinary bladder: an extreme form of tumour de-differentiation. *Histopathology*. 2016; 68: 533-540.
46. Terasaki M, Terasaki Y, Yoneyama K, Naomi Kuwahara MT MT KW, Nagahama K, Takeshita KS, Toshiyuki, Shimizu A. Uterine leiomyosarcoma with osteoclast-like giant cells associated with high expression of receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand. *Human Pathology*. 2015; 46 (11):1679-1684.
47. Tizard IR. *Imunologia Veterinária*. 9 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. p.42.
48. Weissferdt A, Moran CA. Primary giant cell carcinomas of the lung: a clinicopathological and immunohistochemical analysis of seven cases. *Histopathology*. 2016; 68: 680-685.
49. Welmann ML, Krakowka S, Jacobs RM, Kociba AJ. A macrophage-monocyte cell line from a dog with malignant histiocytosis. *Titulo da Revista ?* 1988; 24 (3):223-229.
50. Winyard PG, Willoughby DA. *Inflammation Protocols*. New Jersey: Springer Science & Business Media. 2003.
51. Withrow S, Vail D. *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 4ed. St. Louis: Elsevier, 2007. p.120.

## CAPITULO 3

### **Avaliação de hemogramas de cães submetidos a quatro diferentes protocolos quimioterápicos**

#### **Complete blood count evaluation of dogs treated with four different chemotherapy protocols**

L.C. Kluthcovsky<sup>1\*</sup>, M.C.E. Machado<sup>1</sup>, N.R.B. Silva, J.L.C. Castro<sup>1</sup>, J.R. Engracia Filho<sup>1</sup>, R.M.V.M. Rocha<sup>1</sup>, S.L. Weber<sup>1</sup>, G.H. Bechara<sup>1</sup>

1. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR).

\* Autor para correspondência

E-mail: lucaskluth@gmail.com

#### **Resumo**

O objetivo deste trabalho foi avaliar possíveis alterações hematológicas em cães submetidos a quatro protocolos antineoplásicos diferentes. Foi um estudo retrospectivo, com seleção de 69 cães que passaram por pelo menos quatro sessões de quimioterapia, divididos em quatro grupos: vimblastina (VBL) (n=30), doxorubicina (DOXO) (n=15), protocolo combinado CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona) (n=11) e grupo vincristina (VNC) (n=13). Parâmetros hematológicos foram registrados a partir de hemogramas coletados em cinco períodos: T0 (antes do início do tratamento), T1, T2, T3 e T4 (antes da quarta sessão). No grupo VBL foi observada redução significativa nos valores de eritrócitos ( $p<0,01$ ), hematócrito ( $p<0,01$ ) e hemoglobina ( $p=0,02$ ), apesar disso, os valores médios se mantiveram no intervalo de referência. Não foram observadas alterações significativas nos parâmetros do grupo DOXO. Cães com linfoma do grupo CHOP apresentaram valores indicativos de anemia em T0 (36,8% de hematócrito médio e hemoglobina de 12,3 g/dL), com redução ao longo do tratamento. Apesar de não apresentarem neutropenia nas médias, houve uma redução significativa nos neutrófilos do grupo VNC ( $p=0,03$ ). O presente trabalho revelou efeitos hematológicos adversos relacionados ao uso de agentes citotóxicos.

**Palavras-chave:** alcaloides da vinca, doxorubicina, neoplasia, quimioterapia.



## **Abstract**

The aim of this retrospective study was to evaluate possible hematological alterations in dogs treated with four different antineoplastic protocols. We selected 69 dogs that received at least four chemotherapy sessions divided into four groups: vinblastine (VBL) (n=30), doxorubicin (DOXO) (n=15), combined CHOP protocol (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone) (n=11), and vincristine group (VNC) (n=13). Hematological parameters were recorded from blood counts collected in five periods: T0 (before the start of treatment), T1, T2, T3 and T4 (before each session). The VBL group revealed a significant reduction in erythrocyte ( $p<0.01$ ), hematocrit ( $p<0.01$ ) and hemoglobin ( $p=0.02$ ) values, although mean values remained within the reference range. Data related to the DOXO group did not reveal any significant changes during treatment. Dogs with lymphoma in the CHOP group presented values indicative of anemia at T0 (36.8% of mean hematocrit and hemoglobin of 12.3 g/dL), with reduction throughout the treatment. There was a significant reduction in the neutrophils of the VNC group ( $p=0.03$ ), although the mean values were not compatible with neutropenia. This study revealed adverse hematological effects related to the use of cytotoxic agents.

**Keywords:** vinca alkaloid, doxorubicin, neoplasia, chemotherapy.

## **Introdução**

A oncologia veterinária é uma área em constante evolução no setor de pequenos animais, assim como em medicina humana. Alguns estudos vêm mostrando que a neoplasia é uma das doenças que mais causa morte em cães, com 16,5% (841) das mortes em 5095 cães de todas as idades e raças (O'Neili *et al.*, 2013), e 27% (4282) das mortes de 15881 cães de 165 raças puras (Adams *et al.*, 2010).

Na década de 1960, um trabalho realizado nos Estados Unidos estimou, durante três anos, a prevalência geral de neoplasias malignas em cães de 381,2 para cada 100.000 animais (Dorn *et al.*, 1968). Outro levantamento, realizado 10 anos depois, relatou que a prevalência anual para neoplasias malignas foi de 507 para 100.000 cães (MacVean *et al.*, 1978). Um trabalho italiano reuniu informações de 1172 casos durante 90 meses, dos quais 618 foram diagnósticos benignos e 554 malignos. Neste estudo, a incidência de tumores malignos foi de 804 em 100.000 cães ao ano (Baioni *et al.*, 2017). Pode-se observar que a prevalência de tumores em pequenos animais varia grandemente conforme o local, época e tipo de estudo. Avanços em técnicas diagnósticas e de tratamento podem ser alguns dos fatores que

contribuíram para o aumento de diagnóstico de neoplasias em cães nos últimos anos (Baioni *et al.*, 2017).

De maneira geral, alguns diagnósticos estão comumente presentes na maioria dos levantamentos, e incluem principalmente neoplasias de pele e subcutâneo, tumores em glândula mamária, órgão genitais e neoplasias hematopoiéticas. (Šoštarić-Zuckermann *et al.*, 2013). No Brasil, a elevada prevalência de neoplasias mamárias é amplamente descrita, seguido de tumores cutâneos como mastocitoma e carcinoma de células escamosas (Kimura *et al.*, 2012). Das neoplasias hematopoiéticas, o linfoma multicêntrico é o diagnóstico mais encontrado na espécie canina (Cápua *et al.*, 2011).

O uso de quimioterapia antineoplásica é uma das modalidades de tratamento empregada para cães com diagnósticos neoplásicos; pode constituir a base principal do tratamento, como nos casos de linfoma, ou utilizada de maneira adjuvante, no período pré ou pós-operatório. Os agentes citotóxicos usados nas quimioterapias atuam contra células que estão em constante crescimento e são mais sensíveis a danos no DNA, que podem levar ao bloqueio da replicação celular, indução da apoptose ou ambos (Gustafson e Page, 2013).

A quimioterapia convencional é baseada na máxima dose quimioterápica tolerada pelo paciente. Como as drogas citotóxicas não são seletivas, recomenda-se um período de pausa entre as administrações para a recuperação de células não neoplásicas sensíveis, como as da medula óssea e do trato gastrointestinal. Considerando o potencial de mielossupressão, recomenda-se avaliação periódica com hemogramas e avaliação clínica em pacientes submetidos a quimioterapia (Biller *et al.*, 2016). Alguns dos agentes quimioterápicos mais utilizados em medicina veterinária incluem alcaloides da vinca (vimblastina e vincristina), antibióticos antitumorais (doxorubicina e mitoxantrona), agentes alquilantes (ciclofosfamida, clorambucil e lomustina), anti-inflamatórios esteroides como a prednisona, entre outros. Cada classe de quimioterápico pode agir em uma ou mais fases do ciclo celular (Gustafson e Page, 2013).

Considerando o potencial de mielossupressão das drogas citotóxicas, o objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar efeitos adversos causado por quatro diferentes protocolos quimioterápicos em cães, a partir da análise de hemogramas seriados durante o período de tratamento.

## **Material e Métodos**

O estudo foi realizado na Clínica Veterinária Escola da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (CVE-PUCPR). Trata-se de um estudo retrospectivo, observacional e comparativo. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA-PUCPR), sob o parecer 01289/2018. Inicialmente, todos os prontuários de cães que passaram por quimioterapia antineoplásica no período de maio de 2016 a julho de 2018 foram avaliados, a partir da casuística da CVE-PUCPR, totalizando 107 animais. Desse total, 69 cães foram selecionados seguindo os seguintes critérios de inclusão: tratamento quimioterápico pelo período mínimo de quatro sessões, presença de informações completas nos prontuários e diagnóstico histopatológico definitivo. Desta forma, 38 casos foram excluídos da seleção, por apresentarem dados incompletos nos prontuários e/ou não terem completado o período mínimo de tratamento estabelecido.

Os 69 cães foram divididos em quatro grupos, conforme o protocolo utilizado: 30 cães no grupo de vimblastina (VBL); 15 cães no grupo de doxorrubicina (DOXO); 11 cães no grupo que recebeu um protocolo combinado de ciclofosfamida, vincristina, doxorrubicina e prednisona (CHOP); e 13 cães no grupo que recebeu protocolo quimioterápico composto por vincristina (VNC). Os registros nos prontuários clínicos foram utilizados para coleta de informações referentes aos resultados dos hemogramas, exame histopatológico e dados do animal (idade, raça, peso, sexo e histórico de recidiva).

Antes do início do tratamento quimioterápico, todos os animais passaram por avaliação clínica e hematológica por meio do hemograma. Após o início do tratamento, os cães retornaram semanalmente (grupos VBL, CHOP e VNC) ou a cada três semanas (grupo DOXO), para reavaliação e coleta de sangue para hemograma. As avaliações dos pacientes do experimento foram registradas como períodos T0 (avaliação inicial, refletindo as informações clínicas e laboratoriais antes do início da quimioterapia antineoplásica), T1 (imediatamente antes da primeira sessão de quimioterapia), T2 (antes da segunda sessão), T3 (antes da terceira sessão) e T4 (antes da quarta sessão).

A escolha do protocolo utilizado foi realizada a partir do diagnóstico histopatológico de cada paciente. Cães do grupo VBL tiveram diagnóstico de mastocitoma cutâneo e receberam quatro sessões de vimblastina na dose de 3,0 mg/m<sup>2</sup>, via intravenosa, associado a administração diária de prednisona foi administrada diariamente ao longo de todo tratamento, por via oral, na dose inicial de 2,0 mg/kg, seguindo recomendações anteriormente descritas (*Blackwood et al.*, 2012). O protocolo utilizado no grupo DOXO consistiu em administrações de doxorrubicina, via intravenosa, na dose de 30,0 mg/m<sup>2</sup>, com intervalo de 21 dias entre cada aplicação. O grupo CHOP foi composto por cães diagnosticados com linfoma multicêntrico

que receberam uma combinação de vincristina (0,75 mg/m<sup>2</sup>), ciclofosfamida (200 mg/m<sup>2</sup>), doxorrubicina (30 mg/m<sup>2</sup>) e prednisona na dose inicial de 2,0 mg/kg. Com exceção da prednisona, que foi administrada diariamente por via oral, os outros fármacos do grupo CHOP foram administrados individualmente, por via intravenosa, em intervalos semanais, completando um ciclo. Desta forma, o tratamento dos cães desse grupo iniciou com administração de vincristina, seguido de ciclofosfamida na semana seguinte e doxorrubicina na terceira semana; na quarta semana a vincristina era aplicada novamente. O grupo VNC foi composto por cães com diagnóstico de tumor venéreo transmissível (TVT) que receberam quatro sessões semanais de vincristina na dose de 0,75 mg/m<sup>2</sup>.

A cada retorno, os tutores eram questionados sobre a ocorrência de possíveis alterações clínicas ao longo dos sete dias após a última sessão. Nos casos em que foram observados efeitos adversos significativos, a quimioterapia não era administrada e o cão era reavaliado após sete dias. A toxicidade decorrente do protocolo de tratamento foi avaliada e classificada conforme um documento de consenso para efeitos adversos decorrentes de quimioterapia em cães (VCOG-CTCAE, 2011). O período de avaliação de toxicidade dos pacientes desse trabalho compreendeu as quatro primeiras sessões, embora alguns animais tenham realizado mais de quatro sessões ao longo do tempo.

Medidas estatísticas descritivas foram utilizadas para as análises das variáveis clínicas e do tratamento. As comparações das variáveis hematológicas ao longo do período de tratamento (T0, T1, T2, T3 e T4) foram realizadas por meio dos testes ANOVA com correção de Bonferroni e teste *t* de Student, ambos para medidas repetidas e pelos testes de Friedman e Wilcoxon. A gaussianidade dos dados foi verificada utilizando-se histogramas e o teste de Shapiro-Wilk. O teste *t* de Student também foi utilizado para comparar as variáveis hematológicas entre os grupos VBL e VNC e entre os grupos DOXO e CHOP, nos períodos T0 e T4. Os dados foram processados no banco de dados Excel 2010. A análise estatística foi obtida com auxílio do programa *Statistical Package for Social Science* (SPSS), versão 15.0 e o nível de significância utilizado foi de 5%.

## **Resultados**

O levantamento envolveu a seleção de 69 cães, sendo 46 fêmeas (66,7%) e 23 machos (33,3%). Houve maior número de cães sem raça definida (n=33) seguidos de Labrador Retriever (n=5), Pit bull (n=5), Boxer (n=4), Poodle (n=4), Golden Retriever (n=3), Dachshund (n=3), Rottweiler (n=2), Pinscher (n=2), e um representante de cada uma das

seguintes raças: Beagle, Bulldog Inglês, Chihuahua, Lhasa Apso, Pastor Alemão, Spitz, Schnauzer e Shar-pei.

O grupo vimblastina (VBL) foi composto por 30 cães. Todos os pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico com vimblastina tiveram diagnóstico histopatológico de mastocitoma cutâneo. Baseado no sistema de graduação Patnaik *et al.* (1984), as amostras avaliadas consistiram de um tumor grau I (3,3%), 21 com grau II (70,0%) e oito com grau III (26,7%). Utilizando o sistema de dupla classificação (Kiupel *et al.*, 2011), 18 amostras (60,0%) foram consideradas de baixo grau e 12 amostras (40,0%) com alto grau. Do total de cães tratados, 22 (73,3%) cães eram fêmeas e 8 (26,7%) eram machos. A média de idade no momento do diagnóstico foi de 9,6 anos (3-15, DP=2,5).

O grupo DOXO foi composto por 15 cães, sendo 11 fêmeas (73,3%) e 4 machos (26,7%). A média de idade foi de 9,7 anos (5-14, DP=2,8). Todos os cães desse grupo foram tratados com pelo menos 4 sessões de doxorrubicina no período pós-operatório. Dez animais tiveram diagnóstico de neoplasia mamária, dois com hemangiossarcoma esplênico, dois com carcinoma espinocelular e um fibrossarcoma oral.

O grupo que recebeu protocolo quimioterápico CHOP envolveu 11 animais com diagnóstico de linfoma multicêntrico. Desse total, cinco eram fêmeas (45,4%) e seis eram machos (54,6%), com média de idade de 8,0 anos (5-13, DP=2,5).

O grupo VNC foi composto por 13 animais, todos com diagnóstico de tumor venéreo transmissível (TVT), que receberam pelo menos quatro sessões de quimioterapia composta por vincristina. Do grupo VNC, oito cães eram fêmeas (61,5%) e cinco eram machos (38,5%), a média de idade foi de 4,8 anos (2-11, DP=2,8).

A distribuição dos parâmetros hematológicos foi realizada separadamente para cada um dos grupos em tabelas: grupo VBL (Tab. 1), grupo DOXO (Tab. 2), grupo CHOP (Tab. 3) e grupo VNC (Tab. 4).

A Tab. 1 apresenta a distribuição dos parâmetros hematológicos e peso do grupo VBL no início do tratamento e durante as quatro sessões seguintes. Houve uma redução significativa nos valores de eritrócitos ao longo do tratamento, com redução significativa na média total de eritrócitos e no valor médio de hematócrito entre T0 e T3 e entre T0 e T4 em ambos parâmetros. Os valores hemoglobina também reduziram significativamente ao longo das quatro sessões de quimioterapia ( $p=0,02$ ), com redução no período entre T0 e T4. Apesar das variações para os parâmetros hematológicos citados acima, as medianas permaneceram no

intervalo de referência para espécie. As demais variáveis não apresentaram diferenças significativas.

**Tabela 6. Distribuição dos resultados dos parâmetros hematológicos de cães tratados com vimblastina (grupo VBL) antes do início do tratamento quimioterápico (T0) e durante as 4 sessões de quimioterapias seguintes (T1 a T4) (n=30).**

Variáveis	Início	1ªsemana	2ªsemana	3ªsemana	4ªsemana	p	T0 x Tn	p
	(T0)	(T1)	(T2)	(T3)	(T4)			
	M(dp)	M(dp)	M(dp)	M(dp)	M(dp)			
	Med <sup>#</sup>	Med <sup>#</sup>	Med <sup>#</sup>	Med <sup>#</sup>	Med <sup>#</sup>			
<b>Eritrócitos(10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	6.3(0.9) 6.3	6.0(1.1) 6.1	5.7(1.0) 5.7	5.7(1.0) 5.8	5.5(1.0) 5.5	<b>&lt;0.01*</b>	T0>T1	0.40***
							T0>T2	0,05***
							T0>T3	<b>0.04***</b>
							T0>T4	<b>&lt;0.01***</b>
<b>Hemoglobina(g/dL)</b>	15.0(2.3) 14.9	14.4(2.7) 14.7	13.9(2.5) 13.9	13.8(2.7) 14.0	13.4(2.6) 13.1	<b>0.03*</b>	T0>T1	0,75***
							T0>T2	0,17***
							T0>T3	0,07***
							T0>T4	<b>0.02***</b>
<b>Hematócrito(%)</b>	44.1(5.9) 44.0	42.4(6.8) 42.5	40.9(6.6) 40.5	40.3(5.7) 41.5	39.2(6.8) 38.0	<b>&lt;0.01*</b>	T0>T1	0.85***
							T0>T2	0,20***
							T0>T3	<b>&lt;0.01***</b>
							T0>T4	<b>&lt;0.01***</b>
<b>Plaquetas(10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	375.2 (114.7) 359.0	370.0 (112.0) 378.5	348.7 (143.6) 363.0	460.9 (54.4) 357.0	336.6 (110.1) 329.5	0.75**		
<b>Leucócitos(10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	12.6(7.6) 10.2	13.0(9.9) 9.8	11.7(14.2) 8.2	17.8(24.4) 10.2	12.3(9.6) 9.7	0.35**		
<b>Linfócitos(/mm<sup>3</sup>)</b>	1626.4 (1060.5) 1431.0	1868.8 (2135.1) 1248.5	1837.4 (1214.0) 1484.0	1603.0 (1144.0) 1388.0	1464.7 (917.5) 1071.0	0.48**		
<b>Neutrófilos(/mm<sup>3</sup>)</b>	9810.4 (6928.3) 7414.5	9993.8 (8995.1) 7327.5	8659.7 (13486.3) 5722.0	11518.7 (15149.8) 7843.0	9222.8 (7348.4) 6323.5	0.28**		

# M=Média. Med=Mediana.

\*ANOVA para medidas repetidas com correção de Bonferroni. \*\*Teste de Friedman

\*\*\*Teste *t* de Student para medidas repetidas.

\*\*\*\*Teste de Wilcoxon

A Tab. 2 apresenta a distribuição dos parâmetros hematológicos nos cães tratados com doxorrubicina. As sessões com doxorrubicina foram realizadas com intervalo de 21 dias entre cada aplicação. Não foram observadas diferenças significativas nos valores médios de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, leucócitos totais, linfócitos e neutrófilos. Foi observada diferença significativa para plaquetas (aumento) entre os períodos de tempo ao longo das sessões, mas sem diferença significativa na comparação entre T0 e T1, T2, T3 e T4.

**Tabela 7. Distribuição dos resultados dos parâmetros hematológicos de cães do grupo DOXO antes do início do tratamento quimioterápico (T0) e durante as 4 sessões de quimioterapias seguintes (T1 a T4) (n=15).**

Variáveis	Início	1ªsemana	2ªsemana	3ªsemana	4ªsemana	p	T0 x	p
-----------	--------	----------	----------	----------	----------	---	------	---

	(T0)	(T1)	(T2)	(T3)	(T4)	Tn
	M(dp)	M(dp)	M(dp)	M(dp)	M(dp)	
	Med <sup>#</sup>	Med <sup>#</sup>	Med <sup>#</sup>	Med <sup>#</sup>	Med <sup>#</sup>	
<b>Eritrócitos(10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	6.6(1.3) 6.7	6.6(0.9) 6.7	6.7(1.1) 6.7	6.5(1.5) 6.8	6.2(1.4) 6.6	0.87**
<b>Hemoglobina(g/dL)</b>	15.2(3.5) 15.7	15.5(2.9) 15.2	15.7(3.0) 16.2	15.2(3.7) 16.0	14.6(3.2) 15.7	0.61*
<b>Hematócrito(%)</b>	45.5(8.8) 46.0	47.1(6.5) 50.0	47.1(7.9) 48.0	45.6(9.7) 48.0	43.7(8.3) 46.0	0.74**
<b>Plaquetas(10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	355.0 (109.9) 330.0	353.5 (131.5) 324.0	443.0 (114.7) 375.0	368.1 (141.9) 302.0	406.6 (115.8) 389.5	<b>0.04**</b> T0>T1 0.64*** * T0<T1 0.05*** * T0<T1 0.38*** * T0<T1 0.20*** *
<b>Leucócitos(10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	10.6(4.6) 13.1	9.7(3.9) 9.0	9.9(3.2) 9.6	10.3(4.4) 9.2	10.3(6.6) 8.7	0.97**
<b>Linfócitos(/mm<sup>3</sup>)</b>	1229.5 (545.9) 1292.0	1452.4 (631.4) 1551.0	1198.4 (482.9) 1270.0	1137.6 (614.4) 912.0	1109.1 (601.2) 1133.0	0.40**
<b>Neutrófilos(/mm<sup>3</sup>)</b>	8249.4 (4311.4) 6264.0	7046.7 (3206.1) 5893.0	7545.1 (2829.3) 6912.0	7870.1 (3789.2) 6365.0	8205.9 (6221.2) 6391.0	0.50**

# M=Média. Med=Mediana.

\*ANOVA para medidas repetidas com correção de Bonferroni. \*\*Teste de Friedman

\*\*\*Teste *t* de Student para medidas repetidas. \*\*\*\*Teste de Wilcoxon

Na Tab 3 estão expostos os resultados médios dos parâmetros hematológicos do grupo de cães que recebeu o protocolo CHOP, que consiste em uma combinação de vincristina, ciclofosfamida, doxorubicina e prednisona, com administração semanal. Não foram identificadas diferenças significativas ao longo dos períodos de tratamento em todos os parâmetros avaliados. Apesar disso, é importante ressaltar que a média inicial dos valores de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito resultou em valores abaixo do intervalo de referência para espécie canina, indicando sinais de anemia na população avaliada. Os valores médios desses parâmetros apresentaram redução ao longo das quatro sessões seguintes.

**Tabela 8. Distribuição dos resultados dos parâmetros hematológicos de cães do grupo CHOP antes do início do tratamento quimioterápico (T0) e durante as 4 sessões de quimioterapias seguintes (T1 a T4) (n=11).**

Variáveis	Início (T0)	1ªsemana (T1)	2ªsemana (T2)	3ªsemana (T3)	4ªsemana (T4)	p
	M(dp)	M(dp)	M(dp)	M(dp)	M(dp)	
	Med <sup>#</sup>	Med <sup>#</sup>	Med <sup>#</sup>	Med <sup>#</sup>	Med <sup>#</sup>	
<b>Eritrócitos(10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	5.0(0.9) 5.1	4.7(1.3) 5.0	4.6(1.0) 4.5	4.6(1.4) 4.1	4.8(1.2) 4.3	0.54*
<b>Hemoglobina(g/dL)</b>	12.3(2.3) 12.9	11.3(2.8) 10.8	11.2(2.6) 10.5	11.3(3.1) 11.0	11.2(2.7) 10.8	0.65*
<b>Hematócrito(%)</b>	36.8(6.3) 38.0	34.3(8.6) 36.0	33.5(6.5) 32.0	34.1(8.5) 33.0	34.3(7.6) 33.0	0.55*

<b>Plaquetas(10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	297.1 (156.4) 270.0	390.3 (130.9) 426.0	367.8 (179.7) 295.5	390.3 (326.7) 304.0	355.1 (88.8) 351.0	0.49**
<b>Leucócitos(10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	22.6(17,3) 18.8	18.4(14.5) 13.1	16.2(15.9) 11.5	15.7(12.2) 12.2	15.9(12.2) 12.0	0.65**
<b>Linfócitos(/mm<sup>3</sup>)</b>	6592.2 (12948.9) 2158.0	2768.6 (2434.1) 3024.0	5336.6 (11913.2) 1102.0	4433.4 (9068.3) 1965.0	4407.0 (10248.4) 1320.0	0.18**
<b>Neutrófilos(/mm<sup>3</sup>)</b>	13859.4 (9227.3) 12925.0	13698.0 (11835.4) 8268.0	9359,9 (7984.2) 7130.0	9726.3 (2748.1) 10480.0	10055,4 (5274.5) 8850.0	0.67**

# M=Média. Med=Mediana.

\*ANOVA para medidas repetidas com correção de Bonferroni. \*\*Teste de Friedman

\*\*\*Teste *t* de Student para medidas repetidas. \*\*\*\*Teste de Wilcoxon

Os resultados dos principais parâmetros hematológicos avaliados para o grupo que recebeu vincristina estão expostos na tabela 4. Não foram identificadas alterações significativas na maioria das variáveis avaliadas. Apesar de não ter sido observada diferença significativa no valor médio de neutrófilos no período de tratamento geral (p=0,16), houve redução significativa no valor médio de neutrófilos entre o período anterior ao tratamento (T0) e o período após a quarta sessão de quimioterapia com vincristina (p=0,03).

**Tabela 9. Distribuição dos resultados de parâmetros hematológicos de cães do grupo VNC antes do início do tratamento quimioterápico (T0) e durante as 4 sessões de quimioterapias seguintes (T1 a T4) (n=13).**

Variáveis	Início	1ªsemana	2ªsemana	3ªsemana	4ªsemana	p	T0 x Tn	p
	(T0)	(T1)	(T2)	(T3)	(T4)			
	M(dp) Med <sup>#</sup>	M(dp) Med <sup>#</sup>	M(dp) Med <sup>#</sup>	M(dp) Med <sup>#</sup>	M(dp) Med <sup>#</sup>			
<b>Eritrócitos(10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	6.9(1.0) 7.2	6.8(0.8) 7.1	6.7(1.2) 7.4	6.7(1.4) 6.9	6.5(1.3) 6.9	0.48**		
<b>Hemoglobina(g/dL)</b>	16.1(2.6) 17.1	15.7(2.4) 16.8	15.3(2.8) 16.1	15.1(2.5) 15.2	15.4(2.9) 16.1	0.05*		
<b>Hematócrito(%)</b>	47.9(7.2) 50.0	46.9(6.1) 50.0	45.1(7.6) 49.0	45.4(5.9) 46.0	46.1(6.7) 47.0	0.12*		
<b>Plaquetas(10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	345.9 (100.6) 333.0	368.0 (119.4) 408.0	388.0 (142.7) 363.0	367.7 (121.5) 339.0	343.9 (106.4) 351.0	0.87**		
<b>Leucócitos(10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	12.9(3.7) 12.4	12.0(5.5) 12.1	9.6(5.6) 8.2	11.2(5.6) 9.7	8.3(4.0) 7.0	0,14*		
<b>Linfócitos(/mm<sup>3</sup>)</b>	2064.3 (1027.0) 2324.0	1922.2 (853.8) 1431.0	1875.5 (1194.4) 1890.0	2075.7 (750.2) 2354.0	2031.0 (1022.1) 2178.0	0.66**		
<b>Neutrófilos(/mm<sup>3</sup>)</b>	8679.5 (3154.1) 8712.0	7587.8 (5609.1) 7656.0	5874.9 (4937.0) 5015.0	6452.1 (4619.4) 5723.0	4419.9 (2956.7) 4700.0	0.16*	T0>T1	1.00***
							T0>T2	0,90***
							T0>T3	1.00***
							T0>T4	<b>0.03***</b>

# M=Média. Med=Mediana.

\*ANOVA para medidas repetidas com correção de Bonferroni. \*\*Teste de Friedman

\*\*\*Teste *t* de Student para medidas repetidas. \*\*\*\*Teste de Wilcoxon



Os dois grupos compostos por drogas pertencentes a classe dos alcaloides da vinca foram comparados. Desta maneira, os cães que receberam vimblastina foram comparados com aqueles que receberam vincristina, em relação aos parâmetros hematológicos em cada momento do tratamento (T0 a T4). Os valores médios de eritrócitos foram significativamente menores no grupo VBL em todos os períodos, quando comparado ao grupo VNC ( $p<0,05$ ). O grupo VBL também apresentou valor médio de hemoglobina ( $p=0,03$ ) e hematócrito ( $p<0,01$ ) significativamente menor que VNC no período T4. Outra diferença significativa foi um valor médio de neutrófilos significativamente maior no grupo VNC em comparação a VBL, no período T4 ( $p<0,01$ ).

Com o objetivo de avaliar as diferenças entre os grupos de cães que receberam protocolos contendo doxorrubicina, foram comparados os grupos DOXO e CHOP em relação aos parâmetros hematológicos em cada momento do tratamento (T0 a T4). Os valores médios de eritrócitos foram significativamente menores nos cães do grupo CHOP em relação ao grupo DOXO em todos os períodos avaliados ( $p<0,01$ ); resultados semelhantes foram observados para os valores médios de hemoglobina em T0 ( $p=0,03$ ) e de T1 a T4 ( $p<0,01$ ), e para os valores médios de hematócrito em todos os períodos avaliados ( $p<0,01$ ). Os cães do grupo CHOP iniciaram a quimioterapia no momento T0 com um valor médio de hematócrito de 36,8% (DP=6,3) e tiveram um valor de 34,3% (DP=7,6) no momento T4, logo após a quarta sessão de quimioterapia. Já os cães do grupo DOXO iniciaram o tratamento com valor médio de hematócrito de 45,5% (DP=8,8) e apresentaram hematócrito médio de 43,7% (DP=8,6) no momento T4. Os demais parâmetros avaliados não apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos.

## **Discussão**

O efeito de drogas citotóxicas utilizadas em quimioterapia não é seletivo, isto é, não seleciona apenas células neoplásicas para ação, pode ter efeito citotóxico em células saudáveis também, como o que ocorre em células provenientes da medula óssea, linhagens que sofrem constante replicação (Gustafson e Page, 2013). No presente trabalho, o efeito citotóxico da vimblastina no grupo VBL provocou redução significativa em três parâmetros utilizados para determinar anemia (número de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito). Esse fármaco é um alcaloide da vinca, com efeito de ligação a tubulina intracelular e inibição da formação de microtúbulos, que leva a dissolução dos fusos mitóticos e parada da metáfase nas células em divisão (Kumar, 2016). Essa ação é danosa para células lábeis, como as hematopoiéticas, que são células com tempo de vida curto. Quando morrem, são substituídas por novas células

emergidas da população germinativa, as quais possuem ciclos constantes de mitose (Zachary e McGavin, 2016). O efeito da vimblastina pode causar efeito deletério na replicação de precursores de eritrócitos na medula óssea, o que pode justificar a redução observada no grupo VBL. Apesar disso, os valores médios de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito permaneceram no intervalo de referência para espécie.

Apesar da vincristina também sendo um derivado da vinca, cães do grupo VNC não apresentaram redução significativa dos parâmetros de eritrograma, o que pode estar relacionado ao fato de a vimblastina ter um potencial maior no bloqueio de formação de microtúbulos quando comparada à vincristina (Kumar, 2016). A diferença entre os dois fármacos foi ressaltada quando os grupos VBL e VNC foram comparados entre si, sendo que a vimblastina determinou valores significativamente menores dos três parâmetros do eritrograma e no valor total de neutrófilos ao comparar o início (T0) e término do tratamento (T4). O efeito mielossupressor da vincristina pode estar relacionado a redução significativa nos valores de neutrófilos entre T0 e T4 no grupo VNC, apesar desse achado, os valores médios não são reduzidos o suficiente para serem classificados como neutropenia (VCOG-CTCAE, 2011).

Os grupos tratados com doxorrubicina (DOXO) e a associação de vincristina, doxorrubicina, ciclofosfamida e prednisona (grupo CHOP), não demonstraram alterações significativas nos parâmetros hematológicos ao longo do tempo. Mas quando comparados entre si, foi possível observar que os cães do grupo CHOP apresentaram valores significativamente menores de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito quando comparados ao grupo DOXO. Existe a descrição da possibilidade do protocolo CHOP causar uma toxicidade cumulativa na medula óssea, causando neutropenia (Fournier *et al.*, 2018). Apesar disso, não foi observada redução nos valores de neutrófilos no grupo CHOP ao longo das quatro semanas.

Com relação aos cães que receberam apenas doxorrubicina, a ausência de reduções significativas nos parâmetros ao longo do tempo possivelmente pode ser justificada pelo intervalo maior entre avaliações (21 dias), que seguiu recomendações anteriormente descritas (Cassali *et al.*, 2017). Um maior intervalo entre administrações possibilitou aos pacientes maior período de recuperação e correção de possíveis citopenias que não foram identificadas nos hemogramas.

Apesar de não ter resultado em uma diferença estatística significativa durante o tratamento, a anemia foi um achado importante em pacientes do grupo CHOP antes do início do tratamento. No presente trabalho, os onze cães com linfoma avaliados apresentaram níveis brandos de anemia, com valor médio de hematócrito de 36,8% (37-55%), média de eritrócitos de 5,0 milhões/mm<sup>3</sup> (5,5-8,5 milhões/mm<sup>3</sup>), e hemoglobina 12,3 g/dL (12-18 g/dL). Achados semelhantes foram descritos em estudos envolvendo cães com linfoma, em que o achado de níveis brandos de anemia normocítica e normocrômica é comum (Miller *et al.*, 2009; Cápua *et al.*, 2011). O protocolo CHOP, assim como outras combinações de drogas citotóxicas, é utilizado principalmente para casos de linfoma em cães (Miller *et al.*, 2009). Num estudo realizado sobre causas de anemia que não fossem originadas por perda aguda de sangue, a maior prevalência dessa alteração hematológica foi em cães com câncer, dentro dos quais o linfoma foi o diagnóstico mais comum (Chervier *et al.*, 2012).

A anemia é uma síndrome paraneoplásica comum em pacientes oncológicos e tem sido associada a pior prognóstico e menor tempo de sobrevivência em cães com linfoma (Miller *et al.*, 2009; Chervier *et al.*, 2012). Usualmente essa alteração é vista de forma branda e poucos casos evoluem para um quadro severo. A medida que a doença progride há uma redução na reserva metabólica de ferro, que associada a diminuição da duração dos eritrócitos e a redução da resposta da medula óssea a falta dessas células, coopera para manutenção da anemia (Finora *et al.*, 2003). A deficiência de ferro em cães idosos também é citada como causa de anemia em cães idosos, com mais de oito anos de idade (Radakovich *et al.*, 2017). Portanto, a anemia como manifestação paraneoplásica, associada a elevada média de idade dos cães avaliados, pode ser uma justificativa para a redução nos parâmetros de eritrograma observados no grupo VBL e nos níveis médios de anemia nos cães do grupo CHOP.

## **Conclusão**

O fármaco vimblastina pode apresentar influência na redução de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito ao longo de quatro sessões. A vimblastina foi associada com redução significativa no valor de neutrófilos. Cães com linfoma podem apresentar índices compatíveis com anemia. O fármaco doxorubicina utilizado de maneira isolada não teve correlação significativa com citopenias.

## Referências

- ADAMS, V.J.; EVANS, K.M.; SAMPSON, J.; WOOD, J.L.N. Methods and mortality results of a health survey of purebred dogs in the UK. *J. Small. Anim. Pract.*, v.51, p.512–524, 2010.
- BAIONI, E.; SCANZIANI, E.; VICENTI, M.C.; LESCHIERA, M; *et al.* Estimating canine cancer incidence: findings from a population-based tumour registry in northwestern Italy. *BMC Vet. Res.*, v.13, p.203, 2017.
- BILLER, B.; BERG, J.; GARRET, L.; RUSLANDER, D.; *et al.* 2016 AAHA Oncology Guidelines for Dogs and Cats. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v.52, n.4, p.181-204, 2016.
- BLACKWOOD, L.; MURPHY, S.; BURACCO, P.; DEVOS, J.P. European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. *Vet. Comp. Oncol.*, v.10, n.3, p.e1-e29, 2012.
- CÁPUA, M.L.B.; COLETA, F.E.D.; CANESIN, A.N.M.N.; GODOY, A.V. *et al.* Canine lymphoma: clinical and hematological aspects and treatment with the Madison-Winconsin protocol. *Cienc. Rural.*, v.14, n.7, p.1245-1251, 2011.
- CASSALI, G.D.; DAMASCENO, K.A.; BERTAGNOLLI, A.C.; ESTRELA-LIMA, A.; *et al.* Consensus regarding the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors: benign mixed tumors, carcinomas in mixed tumors and carcinosarcomas. *Braz. J. Vet. Pathol.*, v.10, n.3, p.87-99, 2017.
- CHERVIER, C.; CADORÉ, J.L.; RODRIGUEZ-PIÑEIRO, M.I.; DEPUTTE, B.L.; *et al.* Causes of anemia other than acute blood loss and their clinical significance in dogs. *J. Small. Anim. Pract.*, v.53, p.223–227, 2012.
- DORN, C.R.; TAYLOR, D.O.; SCHNEIDER, R.; HIBBARD, H.H.; *et al.* Survey of animal neoplasms in alameda and contra costa counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *J. Nat. Cancer. Inst.*, v.40, n.2, p.307-318, 1968.
- FINORA, K. Common paraneoplastic syndromes. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.*, V.18, N.2, P.123-126, 2003.
- FOURNIER, Q.; SERRA, J.C.; HANDEL, I.; LAWRENCE, J.; *et al.* Impact of pretreatment neutrophil count on chemotherapy administration and toxicity in dogs with lymphoma treated with CHOP chemotherapy. *J. Vet. Intern. Med.*, v.32, p.384–393, 2018.
- GUSTAFSON, D.L.; PAGE, R.L. Cancer Chemotherapy. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M.; PAGE, R.L. (5Ed). *Small Animal Clinical Oncology*. St. Louis: Elsevier, 2013. p.157-161.
- KIMURA, K.C.; GÁRATE, A.P.; DAGLI, M.L.Z. Retrospective study of neoplasms in domestic animals: a survey between 1993 and 2002 of the service of animal pathology,

Department of Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Sao Paulo, Southeast Brazil. *Braz. J. Vet. Pathol.*, v.5, n.2, p.60-69, 2012.

KIUPEL, M.; WEBSTER, J.D.; BAILEY, K.L.; BEST, S *et al.* Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Vet. Pathol.*, v.48, p.147-155, 2011.

KUMAR, A. Vincristine and vinblastine: a review. *Int. J. Med. Pharmaceut. Sci.*, v.6, n.1, p.23-30, 2016.

MACVEAN, D.W.; MONLUX, A.W.; ANDERSON, P.S.; SILBERG, S.L. *et al.* Frequency of canine and feline tumors in a defined population. *Vet. Pathol.*, v.15, n.6, p.700–15, 1978.

MILLER, A.G.; MORLEY, P.S.; RAO, S.; AVERY, A.C.; *et al.* Anemia is associated with decreased survival time in dogs with lymphoma. *J. Vet. Intern. Med.*, v.23, p.116–122, 2009.

O’NEILL, D.G.; CHURCH, D.B.; MCGREEVY, P.D.; THOMSON, P.C.; *et al.* Longevity and mortality of owned dogs in England. *Vet. J.*, v.198, p.638–643, 2013.

PATNAIK, A.K.; EHLER, W.J.; MACEWEN, E.G. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet. Pathol.*, v.21, p.469-474, 1984.

RADAKOVICH, L.B.; PANNONE, S.C.; TRUELOVE, M.P.; OLVER, C.S.; *et al.* Hematology and biochemistry of aging: evidence of “anemia of the elderly” in old dogs. *Vet. Clin. Pathol.* , v.46, n.1, p.34-45, 2017.

ŠOŠTARIC-ZUCKERMANN, I.; SEVERIN, K.; HOHŠETER, M.; ARTUKOVIC, B.; *et al.* Incidence and types of canine tumours in Croatia. *Vet. Arhiv.*, v.83, n.1, p.31-45, 2013.

VETERINARY COOPERATIVE ONCOLOGY GROUP. Veterinary cooperative oncology group – common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.1. *Vet. Comp. Oncol.*, v.14, n.4, p.417-446, 2016.

ZACHARY, JF, MCGAVIN, MD. Pathologic Basis of Veterinary Disease Expert Consult. (6ed). St. Louis: Elsevier Health Sciences, 2016. p.42.

## CAPITULO 4

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com essa pesquisa foi possível determinar o potencial fagocítico presente nas células DH82 e DH82 gigantes derivadas do Histiocitoma Fibroso Maligno, o que nos mostrou que provavelmente esse potencial seja responsável pelo menos em parte pelo prognóstico desfavorável dessa doença.

A partir dessa pesquisa, também será possível visualizar a comparação do potencial fagocítico das células DH82 gigantes e mononucleares, com os monócitos e células gigantes, de cães saudáveis.

Diante do exposto nesse trabalho e a grande diversidade de neoplasias que apresentam células gigantes, é de suma importância dar continuidade a esta pesquisa, procurando avaliar se essas células gigantes são de origem neoplásica, ou são uma fonte de combate do organismo à própria neoplasia. Caso elas não sejam de origem neoplásica, podemos estar diante de uma ferramenta de combate ao câncer do próprio organismo.

## REFERÊNCIAS

- Affolter VK, Moore PF. Localized and Disseminated Histiocytic Sarcoma of Dendritic Cell Origin in Dogs. *Veterinary Pathology*. 2002; 39:74–83.
- Black MM, Fukuyama K, Epstein WL. The induction of human multinucleated monocytes in culture. *Journal of investigative Dermatology*. 1976; 66 (2):90-92.
- Den Haan JMM, Arens R, Van Zelm MC. The activation of the adaptive immune system: Cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. *Immunology Letters*. 2014; 162:103-112.
- Fortes MRP, Kurokawa CS, Marques SA, Miot HA, Marques MEA. Imunologia da paracoccidioidomicose. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2011; 86 (3): 516-525.
- Fulmer AK, Mauldin GE. Canine Histiocytic Neoplasia: An Overview. *Canadian Veterinary Journal*. 2007;48:1041–1050.
- Helming L, Gordon S. Molecular mediators of macrophage fusion. *Trends in Cell Biology*. 2009; 19 (10): 514-522.
- Kennedy K, Thomas R, Breen M. Canine Histiocytic Malignancies-Challenges. *Veterinary Sciences*. 2016; 3:1-10.
- Kondo Y, Yasui K, Yashiro M, Tsuge M, Kotani N, Morishima T. Multi-nucleated giant cell formation from human cord blood monocytes in vitro, in comparison with adult peripheral blood monocytes. *The Journal of Translational Immunology*. 2009; 158: 84-90.
- Mariano M, Spector WG. The Formation and properties of macrophage polykaryons (Inflammatory Giant Cells). *Journal of Pathology*. 1974; 113 (1): 1-19.
- McGavin MD, Zachary JF. Bases da patologia em veterinária. 4.ed. Rio de Janeiro: Mosby Elsevier, 2009.
- Milde R, Ritter J, Tennent GA, Pepys MB, Verschoor A, Helming L. Multinucleated Giant Cells Are Specialized for Complement-Mediated Phagocytosis and Large Target Destruction. *Cell Reports*. 2015; 13: 1937-1948.
- Moore PF. A review of histiocytic diseases of dogs and cats. *Veterinary Pathology*. 2014; 51 (1): 167-184.
- Pinho SS, Carvalho S, Cabral J, Reis CA, Gartner F. Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. *Translational Research*. 2012; 159 (3): 165-172.
- Raskin RE, Meyer DJ. *Citologia de Cães e Gatos: Atlas Colorido e Guia de Interpretação*. 2 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p. 59.
- Rouhani P, Fletcher CDM, Devesa SS, Toro JR. Cutaneous Soft Tissue Sarcoma Incidence Patterns in the U.S. *American Cancer Society*. 2008; 113 (3):616-627.
- Samuelson DA. *Tratado de Histologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Elsevier. 2007.
- Tizard IR. *Imunologia Veterinária*. 9 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. p.42.
- Welman ML, Krakowka S, Jacobs RM, Kociba AJ. A macrophage-monocyte cell line from a dog with malignant histiocytosis. *In vitro Cellular & Developmental Biology*. 1988; 24 (3):223-229.

Withrow S, Vail D. Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. 4ed. St. Louis: Elsevier, 2007. p.120.



## **ANEXO (S)**

O presente trabalho foi escrito de acordo com as normas da revista Veterinary Pathology, disponível em: <https://us.sagepub.com/en-us/sam/journal/veterinary-pathology#submission-guidelines>