THAÍS RODRIGUES MACEDO

Avaliação das concentrações de superóxido dismutase e da fragilidade osmótica eritrocitária em cães com linfoma multicêntrico com e sem anemia.

Dissertação apresentada ao Programa em Clínica Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias**.**

Departamento

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Médica

Orientador:

Profa. Dra. Silvia Regina Ricci Lucas

São Paulo

2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2288 FMVZ

Macedo, Thaís Rodrigues

Avaliação das concentrações de superóxido dismutase e da fragilidade osmótica eritrocitária em cães com linfoma multicêntrico com e sem anemia / Thaís Rodrigues Macedo. -- 2010.

94 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Silvia Regina Ricci Lucas.

1. Estresse oxidativo. 2. Superoxido dismutase. 3. Linfoma. 4. Anemia. 5. Cão. I. Título.

ERRATA

Folha	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Página de rosto	3	Dissertação apresentada ao Programa em Clínica Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias**.** **Área de concentração**: Clínica Médica	Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências **Área de concentração**: Clínica Veterinária
Folha de Avaliação	3	Dissertação apresentada ao Programa em Clínica Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias**.**	Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências
Resumo	1	Anemia]. 2010. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo - 2010.	anemia]. 2010. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010
Abstract	1	anemia. 2010. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo - 2010.	anemia]. 2010. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação do estresse oxidativo eritrocitário em cães com linfoma multicêntrico", protocolado sob o nº1122/2007, utilizando 40 (quarenta) cães, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Silvia Regina Ricci Lucas, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/08/07.

We certify that the Research "Erythrocyte oxidative stress evaluation in dogs with multicentric lymphoma", protocol number 1122/2007, utilizing 40 (forty) dogs, under the responsibility Profa. Dra. Silvia Regina Ricci Lucas, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 08/22/07.

São Paulo, 22 de agosto de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº 87 - 05508-270 - Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira". Fax: (11) 3032-2224 - fones: (11) 309107676/7671 - e-mail: fmvz@edu.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MACEDO, Thais Rodrigues

Título: Avaliação das concentrações de superóxido dismutase e da fragilidade osmótica eritrocitária em cães com linfoma multicêntrico com e sem anemia.

Dissertação apresentada ao Programa em Clínica Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias**.**

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr._____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr._____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICO

A meus pais, **Arnaldo de Vera Lucia**, por tudo, pelo amor, carinho, incentivo, presença constante, mesmo estando longe. Por tudo, sem vocês eu não seria nada.

A minhas irmãs queridas, **Mia, Mile, Thamy**, por estarem sempre ao meu lado e tornarem a minha vida mais feliz.

Ao **Rodrigo**, meu lindo, por me fazer tão feliz

Ao s meus “bebês”, Nala e Chimbica.

À minha orientadora,

Profa. Silvia Regina Ricci Lucas,

Por ter me acolhido e orientado.

Pela amizade, confiança e exemplo

Meu muito obrigada.

Ante o bem fazer
Não digas: “impossível

No ampara aos semelhantes,
Não fales “nada sou”

Estende a mão e serva,
O Céu te escuta e vê.

Lembra a tomada humilde
Comunicando a luz.

Faze o melhor que possas
E o melhor surgirá

Deus é auxilio em ti.
Age e funcionarás

Emmanuel

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela acolhida, tornando-se minha nova “casa”.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da Bolsa de auxilio pesquisa (Processo 07/56859-9) e do Auxílio pesquisa, sem o qual não seria possível a realização deste estudo.

Ao Pro. Dr. Antonio Felipe Paulino de Figueiredo Wouk, pela amizade, orientação e conselhos.

À meu tios Mauricio e Cida por terem me recebido e tratado como filha em sua casa.

À minha amiga querida Thaís, por estar sempre ao meu lado, nas horas alegres e tristes, por toda a ajuda e principalmente pela amizade.

À meu anjo da guarda Diogo, por me ouvir, me aconselhar, me divertir... pela amizade de irmão.

À Clara Satsuki Mori, pela grande ajuda na execussão deste experimento, pela paciência e ensinamentos.

À médica veterinária e mestre Samantha Ive Miyashiro, pela contribuição na leitura das medulas ósseas e todos os ensinamentos.

Às médicas veterinárias do Serviço de Clínica Médica do HOVET – USP, Vera A. B. Fortunato, Bruna Maria Pereira Coelho, Paula Rumy Gonçalves Monteiro, Khadine Kanayama, Denise Maria Nunes Simões, pela acolhida, ensinamentos, pela ajuda e principalmente pela amizade.

Aos pós graduandos e amigos Rodrigo Ubukata, Camila Ferreiro Pinto, Lucas Campos Sá Rodrigues pelo auxilio na realização deste experimento, pela amizade e companheirismo. Tenho em vocês não somente colegas de trabalho, mas sim amigos.

Aos funcionários do Serviço de Clinica Médica Veterinária – HOVET – USP, Toninho, Milton, Carlito, Geraldo e Gilberto, pela ajuda de sempre.

Ao Departamento de Clínica Média por me receber.

À Profa.Marcia Mery Kogika pelo carinho.

Á médica veterinária do Serviço de Laboratório Clínico do HOVET-USP, Maria Luísa Franchini e as técnicas Maria Helena, Marli, Claudia, Creide, Dinha e Carmen pela colaboração na realização dos exames, pela paciência e por estarem sempre prontas a ajudar, mesmo em assuntos não referentes ao experimento.

Às médicas veterinárias do Serviço de Diagnóstico por Imagem do HOVET-USP, Luciane Kanayama e Silvana Unch, por serem sempre solicitas na realização dos exames de imagem, encaixando os pacientes, mesmo nos dias mais cheios.

A todos os proprietário dos cães utilizados neste experimento por confiarem a mim a tarefa de cuidar de seus “bichinhos”.

A todos os cães que participaram deste estudo, meu muito obrigada.

A secretaria de pós graduação do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP, Adelaide Fátima de Jesus Borges pela ajuda durante o curso e pelo carinho.

Ao Serviço de Biblioteca e Documentação da FMVZ-USP, Elza Maria R. B. Faquim, pela ajuda na conclusão desta obra.

A todos os que me auxiliaram na tarefa de realizar este experimento, não só no como profissional, mas principalmente no pessoal.

MACEDO, T. R; **Avaliação das concentrações de superóxido dismutase e da fragilidade osmótica eritrocitária em cães com linfoma multicêntrico com e sem anemia.** [Evaluation of the concentration of superoxide dismutase and erythrocyte osmotic fragility of dogs with multicentric lymphoma with and without anemia]. 2010. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo - 2010.

Linfomas são as neoplasias hematopoiéticas mais comumente relatadas em cães, podendo ocorrer em qualquer idade. A etiologia ainda é desconhecida, porém se aceita que seja multifatorial. São classificadas de acordo com sua localização anatômica, estadio clínico da Organização Mundial de Saúde (OMS), critérios cito-histológicos e imunofenotípicos. A anemia é a anormalidade hematológica mais observada em pacientes com câncer e manifesta-se em cerca dois terços dos cães com linfoma. Os radicais livres de oxigênio produzidos pelas células tumorais aumentam o estresse oxidativo, sendo este demonstrado por mudanças na atividade das enzimas antioxidantes, podendo ocorrer oxidação de proteínas de DNA, aumento da peroxidação de lipídeos e alterações da fragilidade osmótica eritrocitária, acarretando a diminuição da meia vida das hemácias e, sendo essa diminuição um dos fatores que pode levar à anemia nos casos de linfoma. A superoxido dismutase (SOD) é uma enzima antioxidante que catalisa a dismutação do radical superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, protegendo as células dos danos induzidos por estes radicais livres. O objetivo deste estudo foi determinar as concentrações eritrocitárias de superóxido dismutase, além de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (MDA), o estado antioxidante total (TAS) e a fragilidade osmótica eritrocitária, em cães hígidos e com linfoma multicêntrico com e sem anemia, para avaliar a influência desses mecanismos no desenvolvimento das anemias associadas a essa neoplasia. Amostras de sangue foram obtidas de 24 cães com linfoma multicêntrico, sendo 10 sem anemia e 14 com anemia, e 20 cães saudáveis. Foi observada diferença significante no estado antioxidante total entre os grupos controle, grupos experimentais com linfoma multicêntrico com anemia e sem anemia ($p < 0,0001$). Não houve diferença significante quando os cães com linfoma com anemia e sem anemia foram comparados, assim como na avaliação das concentrações plasmáticas do MDA entre o grupo controle, grupo experimental com linfoma multicêntrico com anemia e grupo experimental com linfoma multicêntrico sem anemia ($p = 0,823$). A diferença também não foi significante quando se comparou o grupo controle e o grupo dos animais doentes ($p=0,671$). A diferença não foi significante na avaliação das concentrações eritrocitárias de superoxido dismutase entre o grupo controle, grupo experimental com linfoma multicêntrico com anemia e grupo com linfoma multicêntrico sem anemia ($p=0,0748$.). Entretanto, foi observada diferença significante entre o grupo controle e o grupo experimental com linfoma multicêntrico ($p=0,0168$). Não foi observada diferença na fragilidade osmótica eritrocitária dos cães com linfoma multicêntrico com anemia e sem anemia,

as concentrações de NaCl em que observou-se 50% de hemólise estavam dentro dos valores postulados por Jain, 1963. Os resultados obtidos indicam um aumento do estresse oxidativo em cães com linfoma e que a anemia observada nos pacientes com linfoma não esta relacionada diretamente a diminuição das defesas antioxidantes eritrocitárias ou à alterações nas propriedades de membrana secundarias a peroxidação lipídica, que poderiam interferir na fragilidade do eritrócito.

Palavras-chave: Linfoma multicêntrico, anemia, estresse oxidativo, superoxido dismutase

MACEDO, T. R. **Evaluation of the concentration of superoxide dismutase and erythrocyte osmotic fragility in dogs with multicentric lymphoma with and without anemia.** [Avaliação das concentrações de superóxido dismutase e da fragilidade osmótica eritrocitária dos cães com linfoma multicêntrico com e sem anemia. 2010. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo - 2010.

Lymphoma is hematopoietic malignancies most commonly reported in dogs can occur at any age. The etiology is still unknown, but is accepted to be multifactorial. They are classified according to their anatomic location, clinical stage of the World Health Organization (WHO), cytological and histological criteria and immunophenotype. Anemia is the most commonly observed hematologic abnormalities in patients with cancer and manifests itself in about two thirds of dogs with lymphoma. The oxygen free radicals produced by tumor cells increases oxidative stress, which is demonstrated by changes in antioxidant enzyme activities, protein and DNA oxidation, increased lipid peroxidation and alterations of erythrocyte osmotic fragility, leading to a decrease in half life of red blood cells and this decrease is one factor that can lead to anemia in cases of lymphoma. The superoxide dismutase (SOD) is an antioxidant enzyme that catalyzes the dismutation of superoxide into oxygen and hydrogen peroxide, protecting cells from damage induced by these free radicals. The aim of this study was to determine erythrocyte superoxide dismutase, and thiobarbituric acid reactive substances (MDA), total antioxidant status (TAS) and erythrocyte osmotic fragility, and in healthy dogs with multicentric lymphoma with and without anemia, to evaluate the influence of these mechanisms in the development of anemia associated with this neoplasia. Blood samples were obtained from 24 dogs with multicentric lymphoma, 10 and 14 with anemia without anemia and 20 healthy dogs. Significant difference was observed in total antioxidant status between the control group, experimental groups with multicentric lymphoma with anemia and without anemia ($p < 0.0001$). There was no significant difference when dogs with lymphoma with anemia and without anemia were compared no significant difference in assessment of plasma concentrations of MDA between the control group, experimental group with multicentric lymphoma with anemia and experimental group with multicentric lymphoma without anemia ($p=0.823$). The difference was not significant when comparing the control group and the group of sick animals ($p = 0.671$). The difference was not significant in the evaluation of erythrocyte superoxide dismutase concentrations between the control group, experimental group with multicentric lymphoma with anemia and patients with multicentric lymphoma without anemia ($p = 0.0748$).. However, significant difference was observed between the control and experimental group with multicentric lymphoma ($p = 0.0168$). No difference was observed in erythrocyte osmotic fragility of dogs with multicentric lymphoma with anemia and without anemia, the concentrations of NaCl in which there was 50% hemolysis were within the range

postulated by Jain, 1963. The results indicate an increased oxidative stress in dogs with lymphoma and that the anemia observed in patients with lymphoma is not directly related to the decrease in erythrocyte antioxidant defenses or the changes in properties of secondary membrane lipid peroxidation, which could interfere with the fragility of erythrocyte.

Keywords: Multicentric lymphoma, anemia, oxidative stress, superoxide dismutase

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A- Valores relativos aos hemogramas dos animais do grupo controle -São Paulo – 2008 a 2009..... 75

Apêndice B - Valores relativos aos hemogramas dos animais com linfoma multicêntrico do grupo experimental com anemia - São Paulo – 2008 a 2009..... 77

Apêndice C- Valores relativos aos hemogramas dos animais com linfoma multicêntrico do grupo experimental sem anemia -São Paulo – 2008 a 2009..... 79

Apêndice D- Valores relativos aos exames bioquímicos séricos dos animais do grupo controle - São Paulo – 2008 a 2009.... 80

Apêndice E- Valores relativos aos exames bioquímicos séricos dos animais com linfoma multicêntrico do grupo experimental com anemia - São Paulo – 2008 a 2009.... 82

Apêndice F - Valores relativos aos exames bioquímicos séricos dos animais com linfoma multicêntrico do grupo experimental sem anemia - São Paulo – 2008 a 2009..... 84

Apêndice G - Avaliação dos mielogramas relativos aos animais com linfoma multicêntrico do grupo experimental com anemia - São Paulo – 2008 a 2009..... 85

Apêndice H- Avaliação dos mielogramas relativos aos animais com linfoma multicêntrico do grupo experimental sem anemia - São Paulo – 2008 a 2009..... 91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Hematócrito (Ht), valores individuais, médias e desvios padrão (DP) da superoxido dismutase (SOD), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (MDA) e estado antioxidante total (TAS) de cães do grupo controle – São Paulo – 2008 a 2009..... 47

Tabela 2 – Hematócrito (Ht), valores individuais, médias e desvios padrão (DP) da superoxido dismutase (SOD), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) e estado antioxidante total (TAS) de cães do grupo experimental com linfoma multicêntrico sem anemia – São Paulo – 2008 a 2009..... 48

Tabela 3 – Tabela 3 – Hematócrito (Ht), valores individuais, médias e desvios padrão (DP) da superoxido dismutase (SOD), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) e estado antioxidante total (TAS) de cães do grupo experimental com linfoma multicêntrico e anemia – São Paulo – 2008 a 2009..... 49

Tabela 4 – Valores de significância das concentrações eritrocitárias de superoxido dismurase (SOD), concentrações plasmáticas de malondialdeido (MDA) e estado antioxidante total (TAS) entre os grupos controle, grupo experimental com linfoma multicêntrico com anemia e grupos experimental com linfoma multicêntrico sem anemia – São Paulo – 2008 a 2009..... 50

Tabela 5 – Médias e desvio padrão das concentrações de NaCl onde se observaram 50% e 100% de hemólise dos cães do grupo experimental com linfoma multicêntrico sem anemia (G1) e grupo experimental com linfoma multicêntrico e anemia (G2) – São Paulo – 2008 a 2009..... 50

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Representação dos valores de mediana e percentis de 25 a 75% (delimitação do quadrilátero) da superóxido dismutase (SOD) dos cães pertencentes aos grupos controle, linfoma multicêntrico com anemia e linfoma multicêntrico sem anemia - São Paulo – 2008 a 2009..... 51

Gráfico 2- Representação dos valores de mediana e percentis de 25 a 75% (delimitação do quadrilátero) da superóxido dismutase (SOD) dos cães pertencentes aos grupos controle e linfoma multicêntrico - São Paulo – 2008 a 2009..... 51

Gráfico 3- Representação dos valores de mediana e percentis de 25 a 75% (delimitação do quadrilátero) do malondialdeído (MDA) dos cães pertencentes aos grupos controle, linfoma multicêntrico com anemia e linfoma multicêntrico sem anemia - São Paulo – 2008 a 2009..... 52

Gráfico 4- Representação dos valores de mediana e percentis de 25 a 75% (delimitação do quadrilátero) do malondialdeído (MDA) dos cães pertencentes aos grupos controle e linfoma multicêntrico - São Paulo – 2008 a 2009..... 52

Gráfico 5- Representação dos valores de mediana e percentis de 25 a 75% (delimitação do quadrilátero) do estado antioxidante total (TAS) dos cães pertencentes aos grupos controle, linfoma multicêntrico com anemia e linfoma multicêntrico sem anemia - São Paulo – 2008 a 2009..... 53

Gráfico 6- Representação dos valores de mediana e percentis de 25 a 75% (delimitação do quadrilátero) do estado antioxidante total (TAS) dos cães pertencentes aos grupos controle e linfoma multicêntrico - São Paulo – 2008 a 2009..... 53

Gráfico 7- Curva de regressão dos valores eritrocitários de superóxido dismutase (SOD) e dos valores plasmáticos de malondialdeído (MDA) dos cães sadios com linfoma multicêntrico - São Paulo – 2008 a 2009..... 54

Gráfico 8- Curva de regressão dos valores eritrocitários de superóxido dismutase (SOD) e dos valores séricos do estado antioxidante total (TAS) dos cães sadios com linfoma multicêntrico - São Paulo – 2008 a 200..... 54

Gráfico 9- Curva de regressão dos valores eritrocitários de superóxido dismutase (SOD) e dos valores de hematócrito (Ht %) dos cães sadios e com linfoma multicêntrico - São Paulo – 2008 a 2009.. 55

Gráfico 10- Curva de regressão dos valores plasmáticos de malondialdeído (MDA) e dos valores de hematócrito (Ht %) dos cães sadios com linfoma multicêntrico - São Paulo – 2008 a 2009..... 55

Gráfico 11- Curva de regressão dos valores plasmáticos de malondialdeído (MDA) e dos valores séricos do estado antioxidante total (TAS) dos cães sadios com linfoma multicêntrico - São Paulo – 2008 a 2009. 56

Gráfico 12- Curvas derivativa e cumulativa da fragilidade osmótica eritrocitária em cães com linfoma e anemia e cães com linfoma sem anemia. Derivativa – porcentagem de incremento hemolítico ocorrendo em cada tubo sucessivos a diminuição da concentração de NaCl versus concentração de NaCl. Cumulativa – pocentagem de hemólise versus concentração de NaCl - São Paulo – 2008 a 2009..... 56

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Caracterização dos animais que compuseram o grupo controle – São Paulo – 2008 a 2009.....	43
Quadro 2 –	Caracterização dos cães com linfoma multicêntrico que compuseram o grupo experimental sem anemia – São Paulo – 2008 a 2009.	44
Quadro 3 –	Caracterização dos cães com linfoma multicêntrico que compuseram o grupo experimental com anemia – São Paulo – 2008 a 2009.....	45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO……	19
2	OBJETIVOS……..	34
3	MATERIAL E MÉTODOS…….	35
3.1	ANIMAIS.....	35
3.1.1	Grupo controle.....	35
3.1.2	Grupo experimental.....	35
3.1.2.1	Critérios de exclusão.....	36
3.1.2.1	Definição da anemia.....	36
3.2	EXAMES COMPLEMENTARES.....	36
3.2.1	Hemograma.....	36
3.2.2	Bioquímica sérica.....	39
3.2.3	Mielograma.....	39
3.2.4	Exames de imagem.....	38
3.2.5	Estadiamento do linfoma.....	38
3.3	EXAMES ESPECÍFICOS.....	39
3.3.1	Determinação intraeritrocitária de superóxido dismutase.....	39
3.3.2	Determinação da concentração plasmática das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.....	39
3.3.3	Avaliação do estado antioxidante total (TAS).....	40
3.3.4	Fragilidade Osmótica Eritrocitária (FOE).....	41
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
4	RESULTADOS.....	43
5	DISCUSSÃO.....	57
6	CONCLUSÕES.....	64
	REFERÊNCIAS.....	65
	APÊNDICES.....	74

INTRODUÇÃO

Linfomas compreendem um grupo diverso de neoplasias malignas, de elevada complexidade biológica, que têm em comum a origem a partir da expansão clonal de células linforreticulares contidas em órgãos linfóides primários, como medula óssea e timo ou secundários como os linfonodos, fígado e baço, embora possam se originar em qualquer tecido do corpo (VAIL; YOUNG, 2007).

São os tumores malignos de maior ocorrência em cães, sendo a neoplasia hematopoiética mais comum nesta espécie, com incidência anual de 13 a 24/100.000 cães. Representam 7 a 24% de todos os processos neoplásicos e 83% dos tumores de origem hematopoiética que acometem a espécie canina (VONDERHAAR; MORRISON, 1998; VAIL; YOUNG, 2007).

As informações quanto à predisposição sexual são contraditórias, Jain (1993) e Vail e Young (2007) sugerem não haver predisposição sexual, enquanto Dobson e Gorman (1993) relatam marcante predisposição com a incidência de machos superando a de fêmeas em relação 2:1. A idade média dos animais acometidos é de seis a nove anos, embora o linfoma já tenha sido relatado em todas as idades (DOBSON; GORMAN, 1993; VAIL; YOUNG, 2007).

Em relação às raças, parece existir uma predisposição genética, já que alguns estudos apontam para uma ocorrência familiar nas raças Bull Mastiff e Rottweiler. Estudos recentes demonstraram um risco de desenvolvimento de linfoma de um em cada oito animais da raça Rottweiler (ONIONS, 1984; TESKE, 1994; MODIANO et al. 2005). Além disso, a doença parece ser mais freqüente em determinadas raças como Boxer, Basset Hound, São Bernardo, Airedales e Bulldog, enquanto Dachshund, Cocker Spaniel e Pomerânia são raças de baixo risco (TESKE, 1994; VONDERHAAR; MORRISON, 1998; VAIL; YOUNG, 2007).

A etiologia do linfoma canino não é bem definida, mas acredita-se que seja multifatorial. Fatores como processos infecciosos, alterações genéticas, contaminantes ambientais e disfunções imunes podem estar envolvidos na gênese desta neoplasia (2003; VAIL; YOUNG, 2007).

O envolvimento viral na oncogênese do linfoma canino não foi comprovado, embora partículas virais com propriedades similares às dos retrovírus tenham sido identificadas em culturas de tecido linfóide neoplásico de cães. O envolvimento viral no desenvolvimento do linfoma é observado em felinos, onde esta neoplasia está fortemente associada à infecção pelo vírus da leucemia felina, em bovinos, roedores, aves, alguns primatas e o homem (TESKE, 1994; VAIL; YOUNG, 2007). Quanto ás infecções bacteriana, em seres humanos observa-se uma forte correlação entre a infecção por *Helicobarter* spp e o linfoma gástrico; em cães esta associação não foi comprovada (ROSSI et. al. 1999).

Cães com linfoma podem apresentar alterações cromossômicas que resultam em amplificação gênica, promovendo o desenvolvimento de malignidade. Esse erro primário não tem relação com a classificação da neoplasia, mas com a duração da remissão do tumor e a sobrevida do animal. Modiano et al. (2005) observou em seu estudo, a trissomia dos cromossomos 13 e 31 e a perda do cromossomo 14, como sendo as aberrações cromossômicas mais comuns. No linfoma do tipo não Hodgkin, em humanos, são observadas aberrações cromossômicas estruturais, que se relacionam a graus histológicos e alterações imunológicas específicos e, quando associados, são fatores prognósticos para tempo da primeira remissão e sobrevida (VONDERHAAR; MORRISON; 1998; 2003; VAIL; YOUNG, 2007).

Fatores ambientais como exposição crônica a substâncias químicas são citados como predisponentes ao desenvolvimento de linfoma nos cães. Uma associação entre o desenvolvimento do linfoma e a exposição ao ácido 2,4 diclorofenoxiacético foi relatada, mas não foi comprovada (VONDERHAAR; MORRISON, 1998; DHALIWAL; KITCHELL, 2003; VAIL; YOUNG, 2007).

Disfunções do sistema imune, independente da raça, idade e sexo, têm sido associadas a uma maior predisposição ao desenvolvimento de linfomas em cães. Keler. (1992) em seu estudo, demonstrou que animais com trombocitopenia imunomediada apresentavam um maior risco de desenvolver linfoma que os animais sem esta enfermidade.

O linfoma canino é classificado segundo sua localização anatômica, critérios histopatológicos e características imunofenotípicas (OWEN, 1980; VAIL; YOUNG, 2007). Quanto à localização anatômica os linfomas classificam-se em multicêntrico,

mediastínico ou tímico, gastrintestinal (alimentar) e cutâneo (MOULTON; HARVEY, 1990; TESKE, 1994; JACOB; MESSICK; VALLI, 2002; VAIL; YOUNG, 2007). Tumores cuja origem encontra-se fora do tecido linfóide, recebem a denominação de extranodal (TESKE, 1994).

A forma mediastínica ou timica envolve o timo e/ou os linfonodos mediastinais anteriores e posteriores, caracterizando-se pelo aparecimento agudo de dispnéia, taquipnéia, tosse, regurgitação, anorexia, caquexia e letargia. Esta forma representa aproximadamente 5% dos casos de linfoma (DHALIWAL; KITCHELL, 2003; VAIL; YOUNG, 2007).

O linfoma gastrintestinal (alimentar) caracteriza-se pela presença da neoplasia no trato gastrintestinal e/ou linfonodos mesentéricos, fígado e baço. Quando primário do trato gastrintestinal apresenta-se de formal multifocal ou disseminado pela lâmina própria e submucosa do intestino delgado, podendo levar a ulcerações e infiltração transmural da mucosa (VAIL; YOUNG, 2007). Esta forma é responsável por 5 a 7% dos linfomas caninos e manifesta-se clinicamente com perda de peso, vômitos diarréia, hipoproteinemia e sinais de mal absorção (VONDERHAAR; MORRISON, 1998; DHALIWAL; KITCHELL, 2003; VAIL; YOUNG, 2007).

O linfoma cutâneo pode apresentar-se na forma generalizada ou multifocal. As lesões caracterizam-se por nódulos, placas, eritema generalizado, dermatite esfoliativa e alopecia; a cavidade oral pode estar envolvida, assim como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (VONDERHAAR; MORRISON, 1998; DHALIWAL; KITCHELL, 2003). Esta forma do linfoma é também classificada em epiteliotrópica, geralmente originária dos linfócitos T, e não epiteliotrópica (VAIL; YOUNG, 2007).

Outras formas menos comuns do linfoma são a hepatoesplênica e a intravascular ou angiotrópica. A primeira caracteriza-se por comprometimento de fígado e baço e infiltração medular, na ausência de linfonodomegalia periférica. Esta forma apresenta uma natureza bastante agressiva e pouco responsiva ao tratamento (VAIL; YOUNG, 2007). O linfoma angiotrópico é caracterizado pela proliferação de células linfóides no lúmen dos pequenos vasos, sem infiltração dos tecidos adjacentes ou presenças de lesões primarias ou leucemia, sendo os sintomas

normalmente associados ao sistema nervoso central (MANDAL et al. 2007; VAIL; YOUNG, 2007).

A forma multicêntrica é a mais prevalente nos cães, respondendo por 80 a 85% dos casos de linfoma nesta espécie (TESKE, 1994; DHALIWAL; KITCHELL, 2003; VAIL; YOUNG, 2007). Caracteriza-se pelo aumento dos linfonodos superficiais e profundos, podendo envolver ainda, fígado, baço, pulmão e medula óssea. Os linfonodos aumentados normalmente são indolores, macios e não aderidos às estruturas adjacentes (VAIL; YOUNG, 2007).

A classificação histológica do linfoma canino é realizada, geralmente, com base em um de três esquemas: de Rappaport, do National Cancer Institute - Working Formulation (NCI-WF) e a classificação de Kiel (TESKE, 1994; VONDERHAAR; MORRISON, 1998; JACOB; MESSICK; VALLI, 2002; VAIL; YOUNG, 2007). O primeiro baseia-se em critérios morfológicos, grau de diferenciação e padrão histológico. O esquema de Kiel classifica os linfomas em baixo e alto grau e baseia-se em critérios histológicos e imunofenotípicos. A classificação NCI-WF, uma atualização do esquema de Kiel, tem sido a mais usada na medicina veterinária. Os critérios adotados neste esquema, além dos já usados no de Kiel, são o índice mitótico e achados clínicos, classificando os tumores em baixo, intermediário e alto grau de malignidade (CARTER; VALLI; LUMSDEN, 1986; VONDERHAAR, 1998; DHALIWAL; KITCHELL, 2003; VAIL; YOUNG, 2007).

Os linfomas caninos também são classificados quanto aos aspectos citológicos, em linfocítico, misto e linfoblástico, e aspectos imunofenotípicos (MOULTON; HARVEY, 1990). A classificação imunofenotípica é realizada por meio da identificação da linhagem celular que deu origem à neoplasia, podendo ser realizada por várias técnicas, como a citometria de fluxo e a reação em cadeia de polimerase, embora as técnicas mais utilizadas sejam a imunocitoquímica e a imunoistoquímica, onde linfomas de origem B apresentam imunorreatividade positiva para CD79a e negativa para CD3, enquanto os linfomas de origem T são reativos ao CD3. Esta imunorreatividade pode ser mista, quando a reação ocorre com os dois anticorpos marcadores ou nula, quando a não existe reatividade tanto para CD3 quanto para CD79a (JACOB; MESSICK; VALLI, 2002; VAIL; YOUNG, 2007; DALECK; CALAZANS; DE NARDI, 2009).

Os sintomas observados nos pacientes com linfoma são bastante variáveis, dependendo do local de desenvolvimento do tumor (TESKE; 1994, VAIL, 2003; DALECK; CALAZANS; DE NARDI, 2009). Os pacientes com linfoma multicêntrico em estágio inicial podem ser assintomáticos, apresentando somente linfonodomegalia periférica e esta pode estar associada ou não a hepatoesplenomegalia e ao envolvimento da medula óssea. Em estágios mais avançados os animais podem apresentar edema generalizado ou restrito aos membros, secundário a drenagem linfática comprometida, e sintomas inespecíficos como vômitos, diarréia, caquexia, disorexia e anorexia, poliuria e polidipsia, associadas à hipercalcemia, apatia e febre. Animais com aumento dos linfonodos mediastinais ou infiltração pulmonar podem apresentar taquipnéia e distrição respiratória grave (VAIL; YOUNG, 2007; DALECK; CALAZANS; DE NARDI, 2009).

A estratégia diagnóstica para o linfoma multicêntrico deve incluir não somente os exames citológico e/ou histopatológico dos linfonodos envolvidos, como também hemograma, contagem de plaquetas, avaliação laboratorial de rins e fígado, exame de urina e mielograma. A avaliação radiográfica do tórax, assim como a ultra-sonografia abdominal, também devem ser realizadas. Estes exames auxiliam na determinação da extensão da doença e permitem o estadiamento clinico do paciente (TESKE, 1994; VONDERHAAR; MORRISON, 1998; VAIL; YOUNG, 2007; DALECK, CALAZANS; DE NARDI, 2009).

A anemia é a alteração hematológica mais observada nos pacientes com linfoma e geralmente é de grau leve a moderado, normocitica e normocrômica, caracterizando a anemia de doença crônica. A trombocitopenia pode estar presente em 30 a 50% dos pacientes, mas alterações hemostáticas e hemorragias não costumam ser observadas. Outras alterações como leucocitose por neutrofilia, linfocitose e presença de células linfóides atípicas na circulação também podem estar presentes no hemograma de pacientes com linfoma (TESKE, 1994; VONDERHAAR, 1998; VAIL; YOUNG, 2007).

O estadiamento clínico dos pacientes com linfoma é determinado levando-se em conta a extensão da doença e a presença ou não sintomas sistêmicos. O estadiamento clínico obedece a critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (Quadro 1) e é de fundamental importância para se estabelecer o prognóstico

e determinar a melhor conduta terapêutica (DALECK; CALAZANS; DE NARDI, 2009).

ESTAGIO	DESCRIÇÃO
I	Envolvimento limitado a um único linfonodo ou tecido linfóide em um único órgão (excluindo a medula óssea).
II	Envolvimento de vários linfonodos em uma única região
III	Envolvimento generalizado dos linfonodos.
IV	Envolvimento do fígado ou baço (com ou sem envolvimento de vários linfonodos)
V	Manifestação no sangue periférico e envolvimento da medula óssea e/ou outros órgãos.
	SUBESTÁGIOS
	Subestadio *a* : animal assintomático.
	Subestadio *b* . animal sintomático

Quadro 1 - Estadiamento clínico para linfomas em animais domésticos segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS).

O linfoma, assim como outros tipos de cânceres, promove nos pacientes além dos efeitos relacionados diretamente ao tumor, outras alterações indiretas denominadas síndromes paraneoplásicas (SPN), que compreendem um grupo diverso de alterações na estrutura ou função do organismo, associadas à ação não invasiva de determinadas neoplasias. Acontecem em locais distantes do tumor primário e independem do seu tamanho, localização, presença de doença metastática e atividade fisiológica do tecido de origem (VONDERHAAR; MORRISON, 1998; OGILVIE, 2000; VAIL; YOUNG, 2007).

A enfermidade paraneoplásica pode acompanhar o desenvolvimento do tumor e, nestes casos, com o tratamento e resolução da neoplasia, os sintomas associados à síndrome desaparecem mas, em muitas situações, a SPN é diagnosticada antes do tumor primário, indicando assim a sua presença ou ainda a sua recorrência. Deste modo, estas alterações podem servir de marcador da presença de determinados tipos de câncer (VAIL, 2003).

As síndromes paraneoplásicas mais comumente relacionadas ao linfoma canino são a hipercalcemia, gamopatia monoclonal, trombocitopenia, neuropatia, miastenia gravis, caquexia e anemia (VONDERHAAR; MORRISON, 1998; DHALIWAL; KITCHELL, 2003; VAIL; YOUNG, 2007).

A presença de síndromes paraneoplásicas, assim como o sub-estágio da doença (a ou b) e o estado geral do paciente, influenciam o tipo de tratamento a ser

instituído, assim como a sua resposta (DHALIWAL; KITCHELL, 2003; VAIL; YOUNG, 2007). O linfoma multicêntrico caracteriza-se por ser uma doença sistêmica e por essa razão o tratamento escolhido deve ter essa mesma característica. Por este motivo, a quimioterapia antineoplásica é a modalidade terapêutica de escolha para o tratamento desta neoplasia. Existem vários protocolos de tratamento e, em geral, os esquemas com múltiplos fármacos têm resultados superiores aos que utilizam um único antineoplásico, promovendo uma maior taxa de resposta e tempo de sobrevida (VAIL, 2003; VAIL; YOUNG, 2007).

O prognóstico para o linfoma canino é variável e dependente de vários fatores como estágio e sub-estágio clinico conforme a OMS, grau histológico, imunofenótipo, tratamento quimioterápico prévio ou uso de corticosteroides, índice de proliferação celular (Ki-67), índice mitótico, presença de co-morbidades e síndromes paraneoplásicas, como a hipercalcemia e a anemia (TESKE et al., 1994; KIUPEL; TESKE; BOSTOCK, 1999; OGILVIE; MOORE, 2000; DHALIWAL; KITCHELL, 2003; VAIL; YOUNG, 2007).

Em humanos a presença de anemia paraneoplásica é um fator prognóstico negativo para a grande maioria das malignidades (CARO et al.; 2001; CLARKE; PALLISTER, 2005), aumentando o risco de morte para 65%. Nos pacientes com linfoma não Hodgkin, a anemia é um fator prognóstico negativo independente para tempo de sobrevida e tempo livre de doença, além de ser um fator preditivo negativo para resposta ao tratamento (MOULLET et al. 1998; BLOHMER et al., 2005; CLARKE; PALLISTER, 2005).

Em cães esta relação ainda não está bem definida, entretanto, Abbo e Lucroy (2007) em seu estudo, demonstraram a presença de uma relação prognóstica negativa entre a presença de anemia no momento do diagnóstico e o tempo de sobrevida em cães com linfoma multicêntrico. Esta relação foi confirmada por Miller et al. (2009).

A anemia está presente em aproximadamente 30% dos pacientes com alguma malignidade. Nos pacientes com linfoma de Hodgkin, pode ser observada em até 40% dos casos (DICATO, 2003; HOHAUS et al., 2010). Em cães com linfoma, a anemia está presente em dois terços dos pacientes no momento do diagnóstico (MADEWELL, FELDMAN; 1980).

Diversos mecanismos, atuando isoladamente ou em conjunto, podem contribuir para a anemia associada às neoplasias. Alterações no metabolismo do ferro, redução do numero de células progenitoras eritróides, infiltração medular, hiperesplenismo, aumento nos níveis de citocinas inflamatórias, deficiência relativa de eritropoietina (Epo), diminuição do tempo de vida das hemácias, estado catabólico observado em pacientes com câncer e deficiência nutricional, podem resultar em uma redução no número de eritrócitos circulantes, assim como das plaquetas e leucócitos (CARO et al., 2001; DICATO, 2003; HENRY, 2007; ADAMSON, 2008). Uma diminuição desproporcional apenas no número de células vermelhas sugere fortemente uma outra causa, por exemplo, mecanismos imunomediados. A interpretação correta desses mecanismos permite tratamento apropriado e influencia fortemente o curso e prognóstico da doença (MADEWELL; FELDMAN; 1980).

Em cães com linfoma, a anemia pode ser de origem hemolítica, secundária a infiltração medular ou associada à doença inflamatória, que leva a alterações no metabolismo do ferro, diminuição do tempo de vida das hemácias e redução da resposta eritropoietica (MADEWELL; FELDMAN; 1980, TESKE et al., 1994; LUCROY et al., 1998; VAIL; YOUNG, 2007; MILLER et al. 2009).

A anemia da doença inflamatória crônica, assim como em outras neoplasias é o mecanismo mais comum na etiopatogenia da anemia no linfoma. Esta se caracteriza por ser pouco ou não regenerativa, normocitica e normocrômica. O seu mecanismo envolve a diminuição da resposta da medula óssea à Epo, assim como diminuição da sua produção, liberação inadequada do ferro estocado no sistema reticuloendotelial, gerando um quadro de hipoferremia relativa. Finalmente, como acontece com praticamente todos as anemias hipoproliferativas, há uma redução no tempo de sobrevivência de células vermelhas na circulação (MADEWELL, FELDMAN; 1980; LUCROY et al 1998; ADAMSON, 2008; HOHAUS et al, 2010).

Citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF-α), interleucinas (IL)-1 e IL-6, interferon γ, liberadas pelas células tumorais e/ou pelo sistema imune em resposta ao quadro inflamatório, são os principais fatores envolvidos no mecanismo acima descrito (DICATO, 2003; CLARKE; PALLISTER, 2005) Este grupo de citocinas, em seres humanos, aumenta a expressão de hepcidina, um peptideo de fase aguda

liberado pelo fígado, levando a diminuição da absorção de ferro pelo intestino e bloqueio da sua liberação do sistema reticuloendotelial e do fígado; além disso, o TNF-α pode anular ou diminuir os efeitos da Epo (DICATO, 2003; ADAMSON, 2008; HOHAUS et al., 2010), parte do efeito inibitório das citocinas sobre a hematopoiese, se dá por intermédio de radicais livres, um exemplo são as ceramidas, que servem de mediadores dos efeitos inibitórios do TNF-α e interferon γ sobre os progenitores hematopoiéticos, exercem parte da sua ação por meio de espécies reativas do oxigênio. Assim, a redução nas defesas antioxidantes também pode estar envolvida no desenvolvimento deste tipo de anemia (DALLALIO; MEANS, 2003).

Estudos recentes referem que o estresse oxidativo é um mecanismo comum em diversas doenças e que pode levar à morte celular (SCANDALIOS, 2005). Nos eritrócitos, pode resultar em hemólise, que é um dos mecanismos patogênicos da anemia no paciente com câncer (MADEWELL; FELDMAN; 1980; ZIMA et al., 1996; JOZWIK et al, 1997; CAVDAR et al., 2003; DARIYERLI et al., 2004). As substâncias promotoras do estresse oxidativo são capazes de diminuir o tempo de vida das hemácias circulantes, pela desnaturação das proteínas e peroxidação de lipídios da membrana eritrocitária (CAVDAR et al., 2003; LUSTOZA, M. D, 2004).

Além da anemia da doença crônica, a anemia hemolítica imunomediada também pode estar presente nos animais com linfoma, assim como a diminuição dos eritrócitos secundária a infiltração medular. No último caso, a anemia é acompanhada de trombocitopenia e leucopenia (MADEWELL; FELDMAN; 1980; VAIL; YOUNG, 2007). O quadro hemolítico observado em alguns destes pacientes pode se dar devido a alterações na morfologia ou ainda fragmentação da membrana do eritrócito durante a passagem por um vaso sanguíneo anormal (DALECK; CALAZANS; DE NARDI, 2009).

Os eritrócitos são altamente suscetíveis à ação dos agentes oxidantes, uma vez que sua membrana plasmática é rica em lipídios insaturados, contém grande número de grupos sulfidrila (SH), as concentrações de oxigênio são elevadas e o ferro, um potente catalisador da peroxidação, está presente em quantidades elevadas nestas células (JOZWIK et al; 1997; DEVASENA; PADMA, 2001).

Alterações nas propriedades da membrana eritrocitária secundarias ao dano oxidativo, interferem na permeabilidade, flexibilidade, antigenicidade e fragilidade da

célula e, conseqüentemente, diminuição do seu tempo de vida, especialmente pelo aumento da suscetibilidade à hemólise e seqüestro esplênico precoce (DEVASENA; PADMA, 2001; CAVDAR et al., 2003; FIBACH; RACHMILEWITZ, 2008). A fragilidade osmótica eritrocitária tem sido utilizada para avaliação de alterações na permeabilidade da membrana eritrocitária, encontrando-se aumentada em doenças onde se observa aumento da peroxidação lipídica (DARIYERLI et al., 2004).

Muitos fatores intrínsecos e extrínsecos influenciam a fragilidade osmótica dos eritrócitos, ocorrendo diminuição ou aumento em condições diversas (JAIN, 1986). Segundo Perk et al. (1964), a fragilidade osmótica é influenciada por fatores como a forma, o volume e o tamanho do eritrócito, o tipo e a quantidade de hemoglobina, diferenças na viscoelasticidade das membranas celulares bem como na composição química e estrutural das mesmas.

Estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) e as defesa antioxidantes do organismo (FETTMAN, 1991). Pode ocorrer por aumento na produção de EROs e/ou diminuição da capacidade antioxidante da célula, secundária à diminuição nos níveis de antioxidantes não enzimáticos (vitamina E, vitamina C, glutationa) e/ou enzimáticos (superóxido dismutase, glutationa peroxidase e catalase). Esta diminuição pode ser conseqüência da modificação da expressão genética destes antioxidantes, maior demanda do organismo ou diminuição da ingestão pela dieta (KLAUNIG et al., 1997; GÜVEN et al., 2000; KARIHTALA; SOINI, 2007).

As EROs compreendem um grupo variável de metabólitos ativos formados a partir do metabolismo do oxigênio, que possuem em sua estrutura química um elétron livre, o que lhes confere uma alta instabilidade e uma grande capacidade de reagir com diferentes moléculas presentes nas estruturas celulares (GARCEZ et al., 2004; KARIHTALA; SOINI, 2007). Em condições fisiológicas, o oxigênio (O_2) sofre redução resultando na formação de água (H_2O). Durante este processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido (O_2^-), hidroperoxila (HO_2), hidroxila (OH) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Os produtos do metabolismo do oxigênio podem ter origem endógena, exógenas ou ambas. A produção endógena é resultado do metabolismo celular para produção

de energia, através da cadeia respiratória mitocondrial, da ativação das células fagocitárias e da detoxificação de xenobióticos. Mecanismos exógenos incluem radiações ionizantes e componentes químicos como alguns quimioterápicos antineoplásicos, que geram reações de redução-oxidação (redox) (ABBA; LICHTMAN; POBER, 2003; KARIHTALA; SOINI, 2007; VALDIVIA et al., 2009).

Espécies reativas do oxigênio e outros radicais livres são conhecidos por serem mediadores de mudanças fenotípicas e genotípicas que levam à mutação que, em última análise pode gerar uma neoplasia. Em condições patológicas certas alterações metabólicas geram uma quantidade excessiva de EROs que danificam lipídios, proteínas e DNA. Estas alterações têm sido associadas à iniciação, promoção e progressão da carcinogênese (TOYOKUNI et al., 1995; GARCEZ et al., 2004; KARIHTALA; SOINI, 2007; BATTIST, et al., 2008). Em medicina veterinária, o dano oxidativo tem sido associado a doenças cardíacas, síndrome da reperfusão, linfoma e neoplasias mamárias (WINTER et al., 2009).

Abou-Seif; Rabia; Nasr (2000) e Devi et al. (2000) observaram que os radicais livres do oxigênio produzidos pelas células tumorais dos pacientes com linfoma são responsáveis por aumentar o estresse oxidativo e dano celular, sendo este fato demonstrado pelo aumento da peroxidação de lipídios, fragilidade osmótica eritrocitária e mudanças na atividade das enzimas antioxidantes.

A peroxidação dos componentes da membrana plasmática induzida pelo estresse oxidativo é prejudicial, uma vez que leva a alterações nas propriedades biológicas da membrana, como citado anteriormente. Esta ação nociva dos radicais livres leva ainda à inativação de receptores de membrana e/ou enzimas, prejudicando a função celular normal e aumentando a permeabilidade do tecido (ABOU-SEIF; RABIA; NASR, 2000; DALLE-DONNE et al., 2006), além disso, a peroxidação lipídica pode amplificar o dano celular através da geração de produtos oxidados, alguns dos quais são quimicamente reativos, podendo reagir com macromoléculas como proteínas, DNA e fosfolipídios, modificando suas propriedades, além de gerar compostos estáveis que estão envolvidos na patogenia de várias doenças (DALLE-DONNE et al., 2006).

As EROs possuem uma meia vida muito curta, em torno de nanosegundos, o que torna impraticável a sua mensuração (LOCATELLI et al., 2003), por isso, os

produtos da peroxidação lipídica, por serem relativamente estáveis, são utilizados como biomarcadores de estresse oxidativo. Estas substâncias são aldeídos, sendo o principal deles o malondialdeído, que pode ser medido no plasma e na urina como um indicador indireto de estresse oxidativo. Assim, a presença aumentada de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (malondialdeído) é um parâmetro indicativo de estresse oxidativo, pois representa a peroxidação de ácidos graxos da membrana celular pelas EROs. (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990; DALLE-DONNE et al., 2006).

As EROs de maior destaque são o ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2003). O radical superóxido (O_2^-) é o radical mais abundante nas células, sendo o primeiro a ser formado após a redução do O_2 e é gerado, principalmente, por meio da cadeia de transporte de elétrons no interior das mitocôndrias; neste caso a sua produção envolve enzimas como o NADPH redutase e a citocromo C redutase. Pode ser gerado também na membrana de células fagocitárias, como neutrófilos, monócitos e macrófagos, para defesa antibacteriana; neste caso a sua produção se dá devido a ativação da enzima NADPH oxidase, presente na membrana destas células (GARCEZ et al., 2004; KARIHTALA; SOINI, 2007; MANDELKER, 2008; VALDIVIA et al., 2009).

O radical superóxido é um radical livre de baixa reatividade, atuando na maioria das reações como um agente redutor, seu efeito tóxico está relacionado ao seu potencial de gerar o radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que após reação com o íon ferro forma o radical hidroxila (OH^-), altamente reativo, que reage de maneira rápida e inespecífica com qualquer estrutura próxima ao seu sitio de formação podendo lesar DNA, lipídios, proteínas e carboidratos (GARCEZ et al., 2004; MANDELKER, 2008). A toxicidade do radical superoxido também é conseqüência da sua capacidade em inativar enzimas que contenham ferro ou enxofre e iniciar a peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares, ou ainda devido à reação com compostos carbonílicos e carbonos halogenados, formando radicais mais reativos e nocivos ao organismo. (TISDALE; MAHMOUD, 1983; GARCEZ et al., 2004; VALDIVIA et al., 2009).

A produção do radical superóxido ocorre em diferentes compartimentos dentro da célula e devido a inabilidade de cruzar as membranas celulares observam-se

concentrações distintas deste radical na matriz extracelular, no citosol e no interior das mitocondrias, como conseqüência desta distribuição, o dano gerado pode se dar por diferentes vias (VALDIVIA et al., 2009).

As defesas celulares contra EROs incluem enzimas como a superóxido dismutase, catalase e glutationa peroxidase, assim como substâncias não enzimáticas como glutationa, ácido ascórbico e carotenóides (HORL, 2002; NEUMANN et al., 2003).

A superóxido dismutase (SOD), uma metaloenzima descrita por McCORD e Fridivich em 1969, corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. É considerada a primeira barreira antioxidante dos sistemas eucariotos, sendo responsável pela dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio, que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas. São descritas quatro isoenzimas da SOD, presentes em diferentes compartimentos celulares (espaço extracelular, citosol e mitocôndrias) seguindo a distribuição de produção do O_2^-, conforme citado anteriormente. Estas isoenzimas diferem entre si pelo metal ligado ao seu sitio ativo, que pode ser o cobre, o zinco, o manganês e o ferro (VALKO et al., 2006; BORELLA; VARELA, 2004; VALDIVIA et al., 2009).

A primeira isoenzima a ser caracterizada foi a SOD-CuZn, também chamada de SOD 1, que está presente no citoplasma, núcleo e plasma e é a forma mais abundante no organismo. A SOD 2 caracteriza-se por ter o manganês no seu grupo prostético, encontra-se no interior das mitocôndrias, local de maior consumo de oxigênio e conseqüentemente maior liberação de radicais livres, por este motivo esta isoforma é considerada a principal defesa antioxidante celular (BORELLA; VARELA, 2004; KARIHTALA; SOINI, 2007).

A SOD-Fe é encontrada somente em bactérias, algas e vegetais superiores (BORELLA; VARELA, 2004) e a última isoforma a ser caracterizada foi a SOD extracelular (EC-SOD ou SOD 3), que contém o cobre e o zinco e possui ainda, um peptídeo sinalizador, que a direciona exclusivamente para o espaço extracelular Diferente das isoformas 1 e 2, esta encontra-se restrita a alguns tecidos, como o endotélio vascular do músculo liso, células alveolares tipo III, córnea e esclerótica (BORELLA; VARELA, 2004; VALDIVIA et al., 2009).

A SOD-Mn é uma das mais importantes enzimas antioxidantes com atividade antitumoral em mamíferos e em humanos e está relacionada a tumores de comportamento mais agressivo, como no caso das neoplasias gastrintestinais, onde o aumento da expressão da SOD 2 está relacionada a um pior prognóstico, estágios mais avançados da doença e fenótipo para desenvolvimento de metástases, sugerindo que níveis aumentados desta enzima inibem o crescimento tumoral por um curto espaço de tempo, selecionando células com fenótipo mais agressivo, mas esta informação é contraditória, uma vez que alguns estudos demonstram que o aumento da sua expressão está relacionado à inibição do crescimento tumoral. (VALKO et al, 2006; KARIHTALA; SOINI, 2007; VALDIVIA et al, 2009).

A avaliação do estado antioxidante, dos níveis de enzimas antioxidantes, como a SOD e de substancias provenientes da peroxidação lipídica servem de marcadores biológicos do estresse oxidativo e que em muitos casos de neoplasias encontram-se alterados em relação aos animais normais. Estudos têm demonstrado alterações destes biomarcadores em cães com linfoma, estes animais quando tratados restabelecem parcialmente o seu balanço redox, mas este não retorna totalmente à normalidade, quando comparado com os animais saudáveis (WINTER et al., 2009).

Segundo Vajdovich et al. (2005), neoplasias linfóides proliferativas, mas pouco diferenciadas estão sob forte estresse oxidativo *in vivo*, que não afeta apenas o tecido tumoral, mas também a atividade da superóxido dismutase. Em seu estudo, em cães, ao se comparar os níveis de SOD no tecido linfático doente e sadio observou-se diminuição da concentração desta enzima no tecido tumoral, sugerindo a presença de estresse oxidativo e disfunção parcial dos mecanismos antioxidantes no linfoma. Como conseqüência os linfócitos tumorais liberam grande quantidade de ânion superóxido, que pode se difundir para o interior de glóbulos vermelhos, podendo reagir com o ferro ou o peróxido de hidrogênio iniciando o dano oxidativo. Como conseqüência as reservas antioxidantes são estimuladas na tentativa de proteção contra o dano oxidativo (OBERLEY e BUEFTNER, 1979; DEVI et al., 2000).

Alterações nos níveis de SOD têm sido observadas em diferentes neoplasias, com resultados variados quando relacionadas aos tumores hematopoiéticos. Gonzales et al., 1984 demonstraram um aumento marcante da SOD eritrocitária nos

pacientes com linfoma não Hodgkin, quanto comparados com o grupo controle e pessoas acometidas por tumores viscerais, já Saito et al., 1984 e BEWICK; Coutie; Tudhop (1987), observaram uma diminuição dos niveis de SOD nestes pacientes. Resultado semelhante foi observado por Vajdovich et al. (2005), em seu estudo com cães.

2. OBJETIVOS

Tendo em vista os mecanismos de estresse oxidativo envolvidos na diminuição da meia vida das hemácias e, sendo essa diminuição um dos fatores que pode levar à anemia nos casos de linfoma, foram objetivos deste estudo determinar a presença de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e o estado antioxidante total, além das concentrações eritrocitárias de superóxido dismutase e a fragilidade osmótica eritrocitária, em cães hígidos e com linfoma multicêntrico com e sem anemia, para avaliar a influência desses mecanismos no desenvolvimento das anemias associadas a essa neoplasia.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 ANIMAIS

3.1.1 Grupo controle

Constituiu este grupo 20 cães hígidos adultos de ambos os sexos, domiciliados ou provenientes do Canil do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, com ou sem definição racial, cuja anamnese, exame clínicos, parâmetros hematológicos e bioquímicos atestaram a higidez. As amostras de sangue foram submetidas aos mesmos procedimentos realizados para o grupo experimental.

3.1.2 Grupo experimental

Fizeram parte deste grupo 24 cães, de ambos os sexos e idades variadas, com ou sem definição racial e com diagnóstico de linfoma multicêntrico, provenientes do atendimento do Serviço de Clínica Médica e de Pronto Atendimento Médico de Pequenos Animais, do Departamento de Clínica Médica / Hospital Veterinário da FMVZ-USP, Serviço de Oncologia Veterinária do "PROVET" de São Paulo-SP e do Serviço de Oncologia Veterinária do "SCAN – Saúde e Ciência Animal" de Campinas-SP. Os animais foram subdivididos em dois subgrupos:

- G1: composto por 10 animais com diagnóstico de linfoma e sem anemia (Ht > 38%).
- G2: composto por 14 animais com diagnóstico de linfoma e com anemia (Ht < 38%).

Para diagnóstico do linfoma foram realizados anamnese e exame físico de acordo com protocolo do Departamento de Clínica Médica e biopsia aspirativa com agulha fina, e posterior analise citológica do material coletado, dos linfonodos alterados, dando-se sempre a preferência aos linfonodos cervicais superficiais e poplíteos, quando alterados.

3.1.2.1 Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão utilizados para formação do grupo experimental foram:

- Presença de cardiopatia sintomática, hepatopatia ou doença renal.
- Presença de outras neoplasias concomitantes ou já tratadas.
- Inicio da terapia com corticosteróide prévia ao diagnóstico.
- Tratamentos quimioterápicos prévios.
- Alterações no hemograma compatíveis com anemia hemolítica imuno-mediada.

3.1.2.2 Definição da anemia

A determinação da anemia foi realizada com base nos valores utilizados por ....., onde pacientes com valores de Ht ≥ 37% foram considerados não anêmicos e os animais com valores inferiores ao referido acima foram direcionados ao grupo doa pacientes anêmicos.

3.2 EXAMES COMPLEMENTARES

3.2.1 Hemograma

A contagem das células sangüíneas e plaquetas foi determinada em contador automático ABC Vet® (Horiba ABX – São Paulo – Brasil) de uso veterinário. A contagem diferencial dos leucócitos e a avaliação morfológica de hemácias e leucócitos foram realizadas em esfregaço sangüíneo corado pelo corante de Rosenfeld (BIRGEL, 1982). O hemograma foi realizado após o diagnóstico e antes do início do tratamento quimioterápico.

3.2.2 Bioquímica sérica

As análises bioquímicas foram realizadas em analisador automático (Lyasis-Roche®), de acordo com os padrões do Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, utilizando-se, quando necessário, kits comerciais. Essas análises envolveram a avaliação da função renal através das dosagens de uréia e creatinina e da função hepática através das dosagens séricas de proteínas totais, albumina, alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA).

- Alanina aminotransferase (ALT): Biosystems – método cinético ultravioleta.
- Fosfatase Alcalina (FA): Biosystems – método cinético colorimétrico.
- Albumina: método colorimétrico do Verde de Bromocresol.
- Proteínas séricas totais: método colorimétrico do Biureto.
- Creatinina: método colorimétrico de Jaffé modificado (picrato alcalino).
- Uréia: método enzimático da Urease / GLDH, em ultravioleta: Diasys.

3.2.3 Mielograma

O mielograma foi realizado em todos os animais pertencentes ao grupo experimental. Para colheita do material estes foram submetidos à anestesia geral, recebendo como medicação pré-anestésica a acepromazina a 0,2% (na dose de 0,05 mg/Kg) e anestesiados com propofol (na dose de 5,0 mg/Kg). As amostras foram obtidas por punção rotacional e aspiração, com auxilio de uma seringa, da medula óssea, realizada na crista ilíaca ou manúbrio do esterno, utilizando-se agulhas comerciais descartáveis ou específicas para esse procedimento. O esfregaço do material foi confeccionado no momento da coleta e submetido à coloração pela técnica de Rosenfeld para leitura posterior.

3.2.4 Exames de imagem

Os animais pertencentes ao grupo experimental foram avaliados, ainda através de RX de tórax nas projeções latero-lateral direita, latero-lateral esquerda e ventro-dorsal, de acordo com os métodos utilizados na rotina do Serviço de Diagnóstico por Imagem do Hospital Veterinário da FMVZ-USP e ultra-sonografia abdominal, utilizando-se trandutores de 5,0 e 7,5 MHz, de acorde com o porte e peso do animal, para observações do comprometimento dos órgãos internos e posterior estadiamento clinico.

3.2.5 Estadiamento do linfoma

Foi realizado com base no estadiamento clínico para linfomas em animais domésticos da Organização Mundial de Saúde (OMS).

I. Envolvimento limitado a um único linfonodo ou tecido linfóide em um único órgão (excluindo a medula óssea).
II. Envolvimento de vários linfonodos em uma única região
III. Envolvimento generalizado dos linfonodos.
IV. Envolvimento do fígado ou baço (com ou sem envolvimento de vários linfonodos).
V. Manifestação no sangue periférico e envolvimento da medula óssea e/ou outros órgãos.

Todos os estádios podem ser subdividios em

Subestadio *a*: animal assintomático.

Subestadio *b*. animal sintomático.

3.3 EXAMES ESPECÍFICOS

3.3.1 Determinação intraeritrocitária de superóxido dismutase

A determinação da atividade da superóxido dismutase foi realizada utilizando-se kits comerciais (SD 125 – RANDOX Laboratories, Crumlin/UK) adaptados para uso em analisador bioquímico automático (Liasys® AMS, Rome, Italy ou Labmax 240® Tokyo Boeki Ltd., Tokyo, Japan). O método é baseado na inibição da reação entre o composto 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio cloreto e o radical superóxido que originam um composto de coloração avermelhada. Nesse método utiliza-se xantina e xantina oxidase como geradores de radicais superóxido. A atividade da enzima foi mensurada pelo grau de inibição da reação em comprimento de onda de 505 ηm (WOOLLIAMS; WIENER, 1983).

Para a determinação da superóxido dismutase, a papa de hemácia previamente armazenada em microtubos foscos foi descongelada em banho de água a 30 °C. Em seguida foi adicionado cerca de 400 µL de água ultrapura a 4 °C. O material foi mantido em geladeira durante 10 minutos e centrifugado em centrífuga para microtubos a 11200 G durante 2 minutos. O sobrenadante foi diluído 200 vezes em tampão fosfato 0,01 molares; pH 7,0 antes da análise. Foi determinada a concentração de hemoglobina do hemolisado, com o resultado final expresso em unidades de enzima por grama de hemoglobina.

Todas as determinações de superóxido dismutase foram realizadas num período máximo de 30 dias após a colheita da amostra.

3.3.2 Determinação da concentração plasmática das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

A determinação das concentrações plasmáticas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi realizada pelo método do ácido tiobarbitúrico conforme

descrito por Esterbauer e Cheeseman (1990), em que se promove a reação do malondialdeído e outros aldeídos com o ácido tiobarbitúrico em meio aquecido, submetendo-se, após, ao resfriamento rápido e a mensuração da absorbância, realizada em comprimento de onda de 535 ηm.

Primeiramente, acrescentou-se 500 µL de plasma da amostra ou padrão a 1000 µL de ácido trilcloroacético a 10%; em seguida a amostra foi homogeneizada no vórtex e centrifugada a 1900 G durante 15 minutos. Após a centrifugação foram pipetados 750 µL do sobrenadante que foram adicionados a 750 µL de ácido tiobarbitúrico 1% dissolvido em solução de hidróxido de sódio a 0,05 M. O mesmo procedimento foi realizado para os padrões e para o branco de reação que utiliza água purificada. Em seguida, todos os tubos foram colocados em banho de água fervente (100 °C) durante 10 minutos e resfriados em água gelada durante 5 minutos. A leitura da densidade óptica foi realizada em comprimento de onda de 532 ηm.

Os padrões de malondialdeído bisdimetil utilizados para confecção da curva de calibração apresentarão concentrações de 1, 5 e 10 µmolar.

A concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico das amostras foi calculada com base na equação de reta obtida da curva das soluções padrão e das leituras de densidade óptica das mesmas.

3.3.3 Avaliação do estado antioxidante total (TAS)

A avaliação do TAS foi realizada no soro sanguíneo dos animais, utilizando-se o kit comercial Randox -Total antioxidante status-NX2332. O ácido sulfônico 2.2’azino dietil-benzotiazolínico (ABTS) foi incubado com a peroxidase (metamioglobina) e peróxido de hidrogênio para produzir o cátion ABTS reduzido. Este é relativamente estável e apresenta coloração azul-esverdeado, o qual é medido a 600nm. As substâncias antioxidantes presentes na amostra impedem a reação, gerando uma redução na intensidade de cor proporcional à concentração de antioxidantes totais.

As determinações foram realizadas em um período máximo de 6 meses.

3.3.4 Fragilidade Osmótica Eritrocitária (FOE)

FOE: Foram pipetados 20 µL de sangue em 16 tubos contendo concentrações variadas de NaCl, de 0,85 a 0,1%. Esta técnica permite definir três parâmetros:

- a resistência eritrocitária mínima: que representa a concentração em que se inicia a hemólise;

- a resistência máxima: a concentração de NaCl correspondente à hemólise total (hemólise 100%)'

- a fragilidade corpuscular média: correspondente à concentração de NaCl em que se observa 50% de hemólise.

A análise do probito foi utilizada para calcular a fragilidade osmótica eritrocitária média. A curva cumulativa representa a porcentagem de hemólise obtida em cada tubo enquanto a curva derivativa é obtida pela aplicação do princípio do "incremento hemolítico", no qual a quantidade adicional de hemólise que ocorre em cada tubo, seguindo o decréscimo da concentração de solução salina, é colocada contra a respectiva concentração dessa solução.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio de programa estatístico computadorizado GraphPad Instat versão 3.01 (1998) e GraphPad Prism, versão 5.03, segundo Petrie e Watson (1999).

Os dados foram, inicialmente, testados quanto à distribuição normal, utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para se verificar a existência ou não de diferença significante entre os cães hígidos e aqueles com linfoma multicêntrico, foram utilizados testes estatísticos paramétricos ou não, de acordo com a distribuição apresentada pelos resultados.

O teste de análise de variância (ANOVA) foi utilizado na análise dos resultados do estado antioxidante total. O teste ANOVA não paramétrico (Kruskal-Wallis) foi utilizado para análise dos valores das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e superoxido redutase. Quando comparados os grupos controle e de cães doentes (linfoma com e sem anemia) foi utilizado o teste t de Student não pareado para oestado antioxidante total. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e superoxido redutase.

Foram aceitos como estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

O grupo controle foi composto por animais com idade média de seis anos e meio (mínimo de um ano e máximo de 12 anos), sendo 10 fêmeas e 10 machos, com ou sem definição racial. O quadro 1 apresenta a caracterização dos animais pertencentes a este grupo.

Número	Nome do Animal	Idade (anos)	Raça	Sexo
1	Koda	1	Não definida	Macho
2	Mery	8	Não definida	Fêmea
3	Mel	6	Cocker Spaniel	Fêmea
4	Odie	1	Fox Terrier	Macho
5	Pandora	5	Pit Bull	Fêmea
6	Vicky	5	Poodle	Fêmea
7	Bob	9	Teckel	Macho
8	Amy	1	Não definida	Fêmea
9	Gaya	6	Não definida	Fêmea
10	Bóris	5	Labrador	Macho
11	Fly	3	Pastor de Shetland	Fêmea
12	Preta	8	Não definida	Fêmea
13	Logan	1	Bulldog Francês	Macho
14	Bambam	12	Lhasa Apso	Macho
15	Caramelo		Não definida	Fêmea
16	Bóris	2	Não definida	Macho
17	Bili	2	Não definida	Macho
18	Degas	4	Golden Retriever	Macho
19	Meg	1	Golden Retriever	Fêmea
20	Ralph	4	Teckel	Macho

Quadro 1 – Caracterização dos animais que compuseram o grupo controle - São Paulo -2008 a 2009

A caracterização dos animais que compuseram os grupos experimentais com linfoma com e sem anemia, encontra-se descrita nos quadros 2 e 3. Considerou-se raça, idade, o sexo e o estadiamento clinico do linfoma.

A média de idade dos animais com linfoma multicêntrico foi de nove anos e meio (mínimo de três anos e máximo de 16 anos). Este grupo foi formado por 24 animais, que foram subdivididos em dois subgrupos:

- G1: constituído por 10 cães não anêmicos, sendo três fêmeas e sete machos, com média de idade de oito anos (mínimo de quatro anos e máximo de 12 anos) com e sem definição racial.
- G2: constituído por 14 cães anêmicos, sendo seis fêmeas e oito machos, com idade média de nove anos e meio (mínimo de três anos e máximos de 16 anos) com e sem definição racial.

Número	Nome do Animal	Idade (anos)	Raça	Sexo	Estadiamento Clínico
1	Hulk	6	Pit Bull	Macho	IVb
2	Spock	5	Pastor Alemão	Macho	IVb
3	Faísca	4	Pit Bull	Macho	IVa
4	Tico	6	Cocker Spaniel	Macho	IVa
5	Pirata	12	Não definida	Macho	Vb
6	Bóris	8	Labrador	Macho	IVa
7	Filet	6	Fox Terrier	Macho	IVa
8	Jade	10	Pastor Alemão	Fêmea	IVa
9	Nina	10	Labrador	Fêmea	Va
10	Natasha	7	Boxer	Fêmea	IVa

Quadro 2 – Caracterização dos cães com linfoma multicêntrico que compuseram o grupo experimental sem anemia - São Paulo – 2008 a 2009.

Número	Nome do Animal	Idade (anos)	Raça	Sexo	Estadiamento Clínico
1	Laika	10	Fila Brasileiro	Fêmea	IVb
2	Fred	14	Poodle	Macho	Vb
3	Fred	7	Teckel	Macho	Vb
4	Otto	7	Bernese	Macho	IVb
5	Hooligan	8	Bull Terrier	Macho	Va
6	Medilaio	16	Pastor Alemão	Macho	IVb
7	Leão	12	Não definida	Macho	Vb
8	Maisa	10	Setter Inglês	Fêmea	Vb
9	Chitara	12	Não definida	Fêmea	Vb
10	Romeu	4	Não definida	Macho	Vb
11	Boni	7	Cocker Spaniel	Fêmea	Va
12	Lion	3	Rottweiller	Macho	IVb
13	Úrsula	7	Rottweiller	Fêmea	Vb
14	Sussa	8	Shar-Pei	Fêmea	Va

Quadro 3 – Caracterização dos cães com linfoma multicêntrico que compuseram o grupo experimental com anemia - São Paulo – 2008 a 2009.

Dos animais pertencentes ao subgrupo G1 seis cães foram classificados clinicamente com linfoma estagio IV a (60%), dois no estagio IV b (20%), um no estagio V a (10%) e um no estagio V b (10%). Dos animais pertencentes ao subgrupo G2 quatro encontravam-se no estagio VI b (28,57%), três no estagio V a (21,43%) e sete no estagio V b (50%).

Os valores obtidos no hemograma dos animais do grupo controle e dos grupos experimentais com anemia e sem anemia encontram-se nos Apêndices A, B e C respectivamente, enquanto os dados referentes ao perfil bioquímico séricos estão dispostos nos Apêndices D, E F. Os valores considerados como referência para o hemograma foram aqueles descritos por JAIN (1993), e para a avaliação bioquímica sérica, os descritos por KANEKO et al. (1997). Os resultados do mielograma dos pacientes pertencentes ao grupo experimental com anemia e sem anemia encontram–se descritos no Apêndice G e H respectivamente

Os valores individuais, a média e o desvio padrão das concentrações eritrocitárias de superoxido dismutase, das concentrações plasmáticas de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e do estado antioxidante total dos cães do grupo controle, cães com linfoma multicêntrico sem anemia e cães com linfoma multicêntrico com anemia; estão demonstrados nas Tabelas 1, 2 e 3 respectivamente.

Foram aceitos como estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$ (Tabela 4)

Não houve diferença significante na avaliação das concentrações eritrocitárias de superoxido dismutase entre o grupo controle, grupo experimental com linfoma multicêntrico com anemia e grupo com linfoma multicêntrico sem anemia ($p=0,0748$.). Entretanto, foi observada diferença significante entre o grupo controle e o grupo experimental com linfoma multicêntrico ($p=0,0168$). Quando comparados os grupos dos animais com linfoma sem anemia e linfoma com anemia a diferença também não foi significante. ($p= 0,884$), embora a media dos animais seja menor que a dos animais sem anemia

Não houve diferença significante na avaliação das concentrações plasmáticas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico entre o grupo controle, grupo experimental com linfoma multicêntrico com anemia e grupo experimental com linfoma multicêntrico sem anemia ($p = 0,823$). A diferença também não foi significante quando se comparou o grupo controle e o grupo dos animais doentes ($p=0,671$)

Foi observada diferença significante no estado antioxidante total entre o grupo controle e grupo experimental com linfoma multicêntrico e anemia, assim como entre o grupo controle e grupo experimental com linfoma multicêntrico e sem anemia ($p < 0,0001$ e $p < 0,0001$ respectivamente). Não houve diferença significante quando comparados o grupo experimental com linfoma multicêntrico sem anemia e o grupo experimental com linfoma multicêntrico com anemia.

Tabela 1 – Hematócrito (Ht), valores individuais, médias e desvios padrão (DP) da superoxido dismutase (SOD), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (MDA) e estado antioxidante total (TAS) de cães do grupo controle - São Paulo – 2008 a 2009.

Animal	Ht %	SOD(U/g Hb)	MDA(µmol/L)	TAS(µmol/L)
1	53	1920,03	0,625	0,86
2	55	1683,52	0,341	0,77
3	63	2062,93	0,341	0,97
4	46	1839,53	0,667	0,86
5	43	2209,43	0,615	0,9
6	48	2732,98	1,026	0,92
7	52	2564,16	1,128	0,93
8	49	1566,51	1,179	0,88
9	57	2260,56	1,133	0,93
10	56	2870,34	1,026	1,09
11	40	2533,83	0,821	1,02
12	47	2214,13	0,872	0,86
13	40	3399,12	0,718	0,91
14	48	1562,31	0,564	0,93
15	50	3000,00	0,667	0,85
16	56	2007,76	0,923	0,84
17	49	2468,67	1,026	1,02
18	45	2317,10	1,186	0,78
19	42	2820,60	0,791	0,56
20	47	1955,96	0,565	0,69
Média	-	2299,47	0,810	0,88
Mediana	-	2237,30	0,80	0,89
DP	-	498,99	0,263	0,118
Mínimo-máximo	-	1562,31-3399,12	0,341-1,186	0,56 - 1,09

Tabela 2 – Hematócrito (Ht), valores individuais, médias e desvios padrão (DP) da superoxido dismutase (SOD), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) e estado antioxidante total (TAS) de cães do grupo experimental com linfoma multicêntrico sem anemia - São Paulo – 2008 a 2009.

Animal	**Ht %** **(> 37%)**	**SOD** **(U/g Hb)**	**MDA** **(µmol/L)**	**TAS** **(µmol/L)**
1	53	2318,71	0,909	0,75
2	45	1790,13	0,966	0,64
3	39	3263,16	0,553	0,48
4	46	1571,60	0,323	0,67
5	39	2485,10	1,235	0,51
6	49	1707,80	0,309	0,48
7	45	783,67	0,185	0,6
8	52	566,36	0,309	0,53
9	39	1898,08	1,231	0,73
10	40	1389,43	1,179	0,89
Média	-	1777,40	0,712	0,63
Mediana	-	1749,00		0,62
DP	-	793,58	0,427	0,135
Mínimo-máximo	-	566,36- 3263,16	0,185-1,235	0,48 - 0,89

Tabela 3 – Hematócrito (Ht), valores individuais, médias e desvios padrão (DP) da superoxido dismutase (SOD), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) e estado antioxidante total (TAS) de cães do grupo experimental com linfoma multicêntrico e anemia - São Paulo – 2008 a 2009.

Animal	**Ht %** **(< 37%)**	**SOD** **(U/g Hb)**	**SRATB** **(µmol/L)**	**TAS** **(µmol/L)**
1	31	2050,18	0,795	0,68
2	28	1408,28	1,023	0,72
3	35	1740,77	0,852	0,68
4	27	3650,58	1,932	0,64
5	30	1442,04	0,966	0,85
6	28	1371,17	0,184	0,43
7	34	916,37	0,415	0,43
8	24	2403,48	0,415	0,57
9	25	2313,29	0,323	0,53
10	22	2554,65	2,469	0,61
11	27	653,88	0,741	0,64
12	28	1762,35	0,062	0,42
13	31	1414,73	1,975	0,57
14	28	2466,66	1,049	0,67
Média	-	1867,74	0,943	0,603
Mediana		1751,60		0,625
DP	-	773,49	0,72	0,122
Mínimo - máximo	-	653,88-3650,58	0,062 - 2,469	0,42-0,85

Tabela 4 – Valores de significância das concentrações eritrocitárias de superoxido dismurase (SOD), concentrações plasmáticas de malondialdeido (MDA) e estado antioxidante total (TAS) entre os grupos controle, grupo experimental com linfoma multicêntrico com anemia e grupos experimental com linfoma multicêntrico sem anemia – São Paulo – 2008 a 2009.

Parâmetros	Controle x Não Anêmico	Controle x Anêmico	Anêmico x Não Anêmico	Controle x Doente
SOD	NS	NS	NS	P = 0,0168
TAS	P < 0,001	P < 0,001	P > 0,05	P < 0,0001
MDA	NS	NS	NS	NS

As médias e desvio padrão das concentrações de NaCl onde foram observados 50% e 100% de hemólise nos animais do grupo experimental com anemia e grupos experimental sem anemia estão descritos na tabela 4.

Tabela 5 – Médias e desvio padrão das concentrações de NaCl onde se observaram 50% e 100% de hemólise dos cães do grupo experimental com linfoma multicêntrico sem anemia (G1) e grupo experimental com linfoma multicêntrico e anemia (G2). São Paulo - 2008 a 2009.

	G1	G2
Média e desvio padrão em 50% hemólise	0,35±0,07	0,35±0,13
Média e desvio padrão em 100% de hemólise	0,35±0,06	0,52±0,05

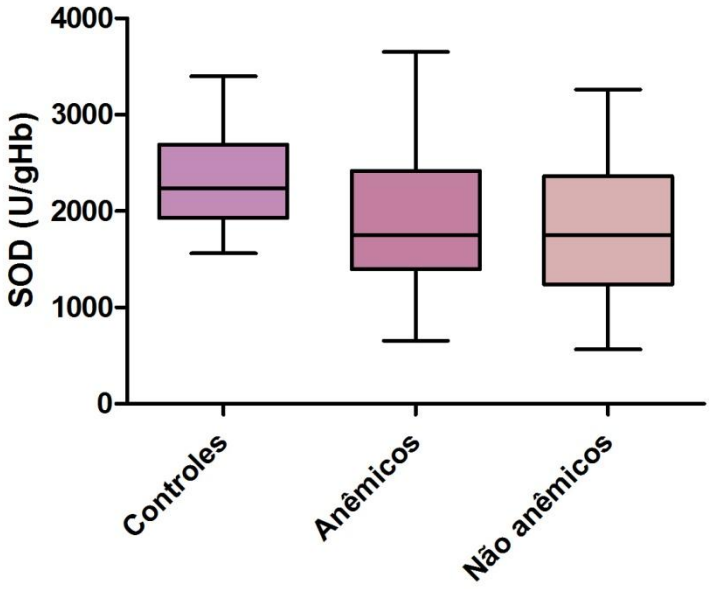

Gráfico 1 - Representação dos valores de mediana e percentis de 25 a 75% (delimitação do quadrilátero) da superóxido dismutase (SOD) dos cães pertencentes aos grupos controle, linfoma multicêntrico com anemia e linfoma multicêntrico sem anemia - São Paulo – 2008 a 2009.

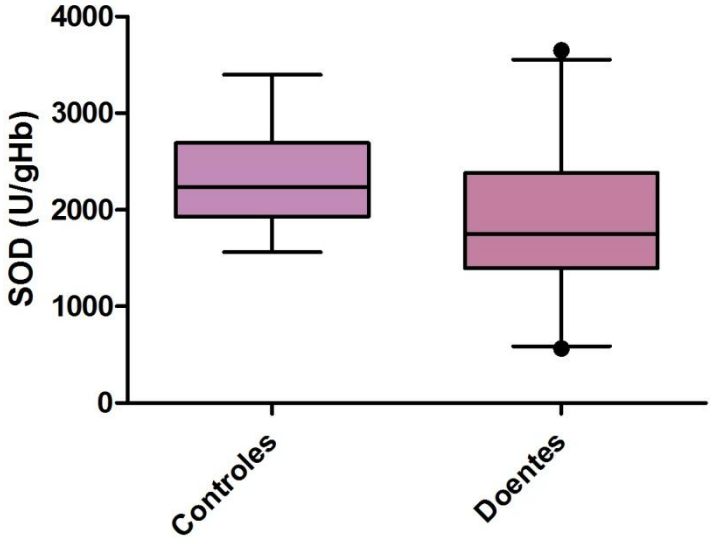

Gráfico 2 - Representação dos valores de mediana e percentis de 25 a 75% (delimitação do quadrilátero) da superóxido dismutase (SOD) dos cães pertencentes aos grupos controle e linfoma multicêntrico – São Paulo – 2008 a 2009.

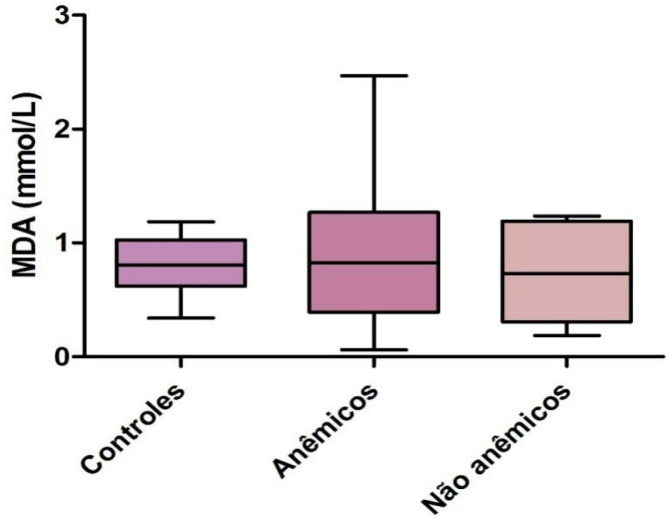

Gráfico 3 - Representação dos valores de mediana e percentis de 25 a 75% (delimitação do quadrilátero) do malondialdeído (MDA) dos cães pertencentes aos grupos controle, linfoma multicêntrico com anemia e linfoma multicêntrico sem anemia. - São Paulo – 2008 a 2009.

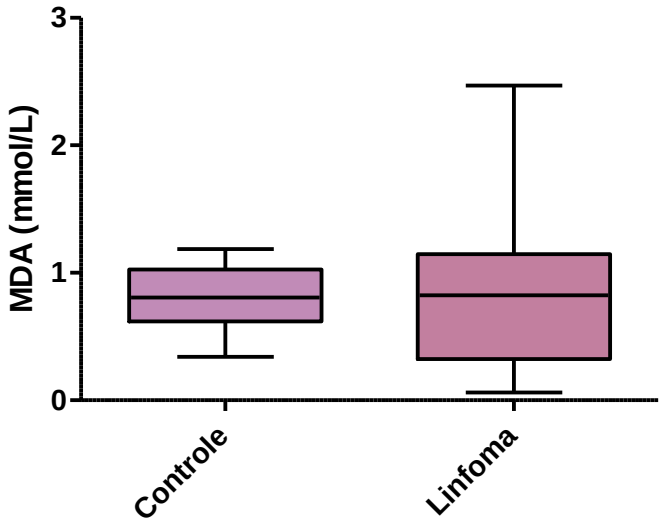

Gráfico 4 - Representação dos valores de mediana e percentis de 25 a 75% (delimitação do quadrilátero) do malondialdeído (MDA) dos cães pertencentes aos grupos controle e linfoma multicêntrico – São - Paulo, 2008 a 2009.

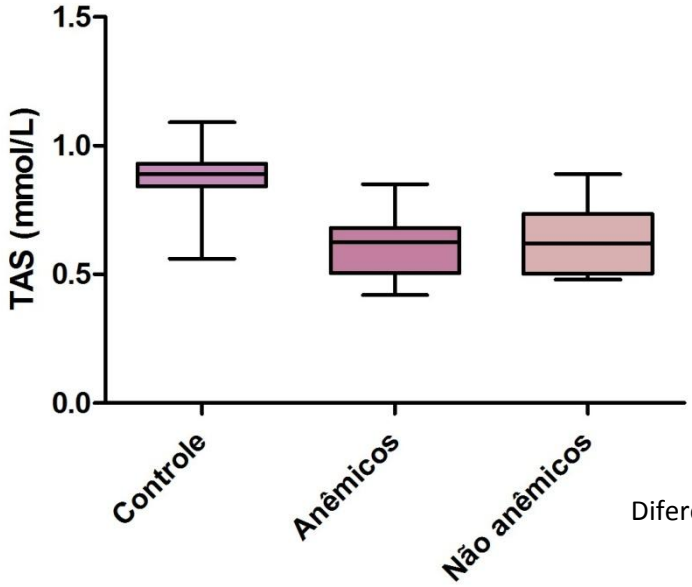

Gráfico 5 - Representação dos valores de mediana e percentis de 25 a 75% (delimitação do quadrilátero) do estado antioxidante total (TAS) dos cães pertencentes aos grupos controle, linfoma multicêntrico com anemia e linfoma multicêntrico sem anemia - São Paulo – 2008 a 2009.

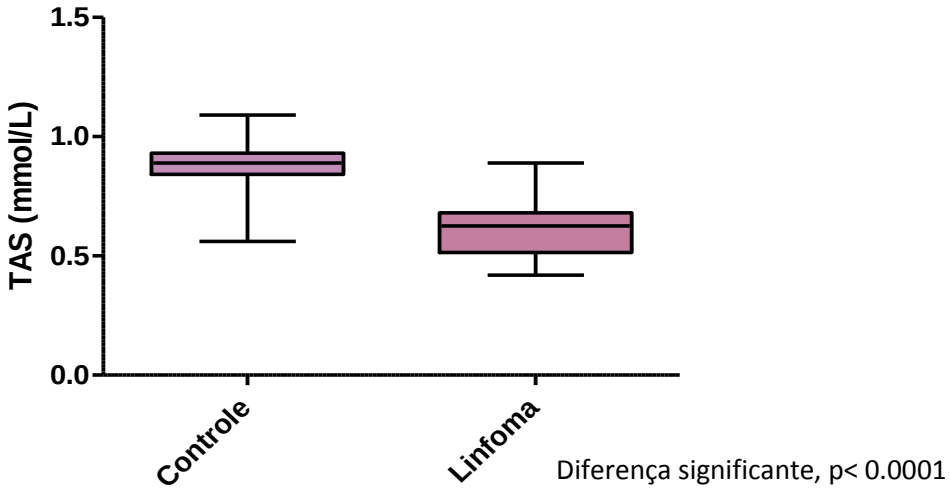

Gráfico 6 - Representação dos valores de mediana e percentis de 25 a 75% (delimitação do quadrilátero) do estado antioxidante total (TAS) dos cães pertencentes aos grupos controle e linfoma multicêntrico - São Paul0 – 2008 a 2009.

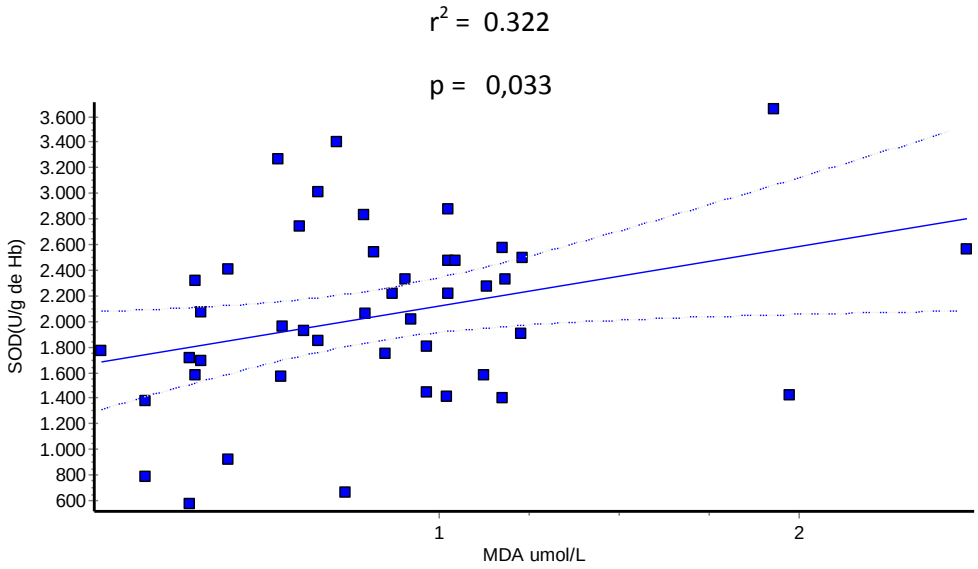

Gráfico 7 - Curva de regressão dos valores eritrocitários de superóxido dismutase (SOD) e dos valores plasmáticos de malondialdeído (MDA) dos cães sadios com linfoma multicêntrico - São Paulo – 2008 a 2009.

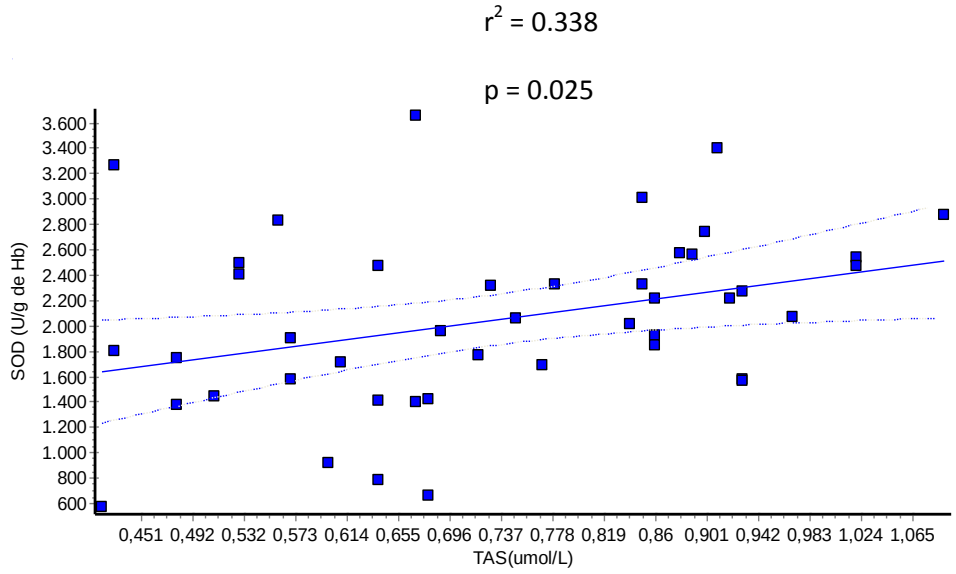

Gráfico 8 - Curva de regressão dos valores eritrocitários de superóxido dismutase (SOD) e dos valores séricos do estado antioxidante total (TAS) dos cães sadios com linfoma multicêntrico - São Paulo – 2008 a 2009.

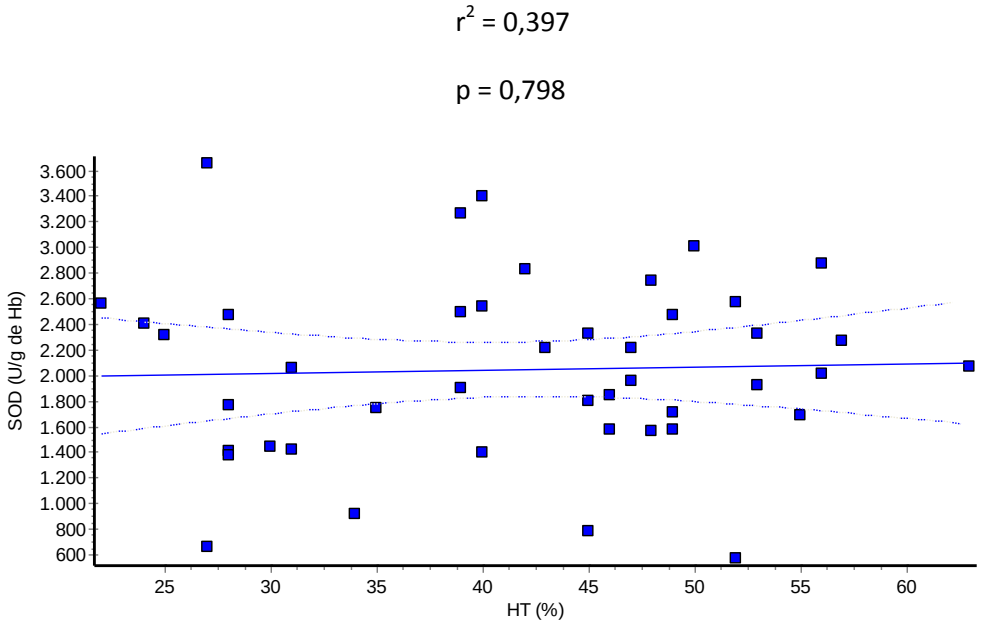

Gráfico 9 - Curva de regressão dos valores eritrocitários de superóxido dismutase (SOD) e dos valores de hematócrito (Ht %) dos cães sadios e com linfoma multicêntrico - São Paulo – 2008 a 2009.

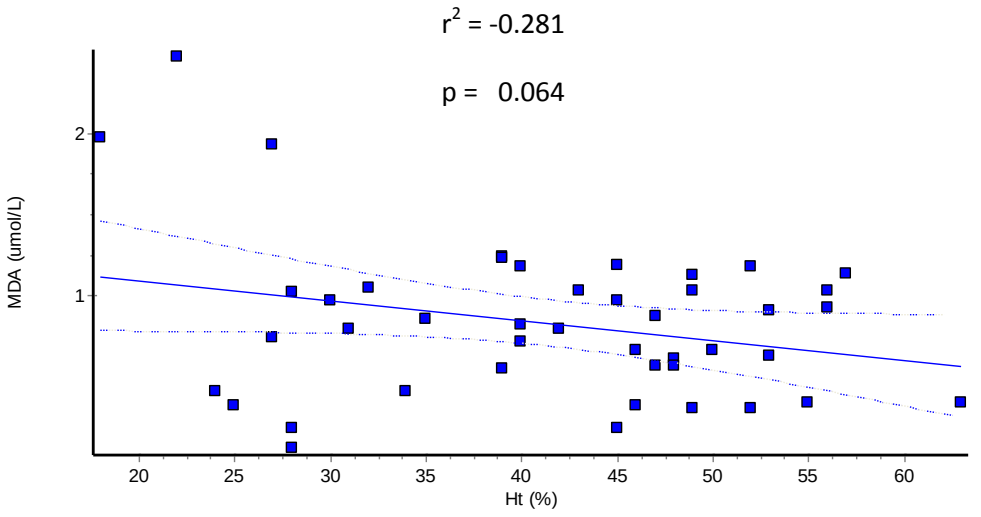

Gráfico 10 - Curva de regressão dos valores plasmáticos de malondialdeído (MDA) e dos valores de hematócrito (Ht %) dos cães sadios com linfoma multicêntrico - São Paulo – 2008 a 2009..

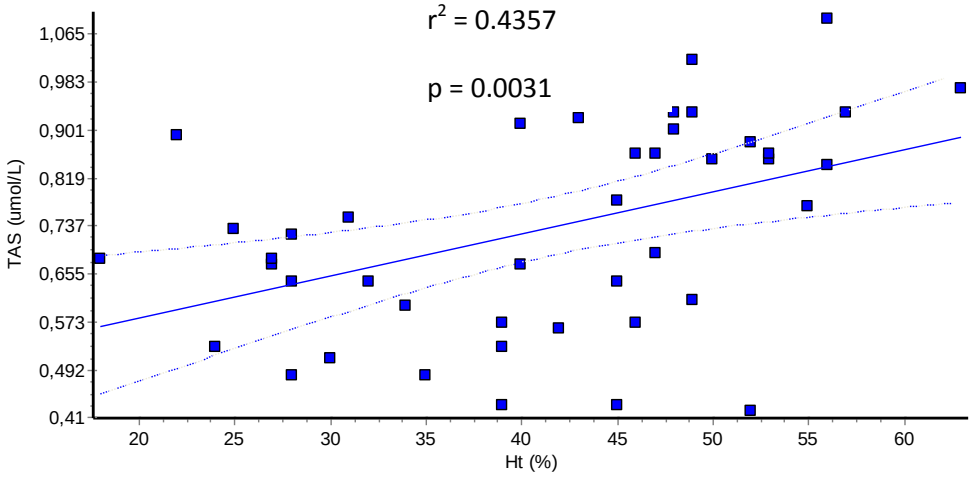

Gráfico 11 - Curva de regressão dos valores plasmáticos de malondialdeído (MDA) e dos valores séricos do estado antioxidante total (TAS) dos cães sadios com linfoma multicêntrico - São Paulo – 2008 a 2009..

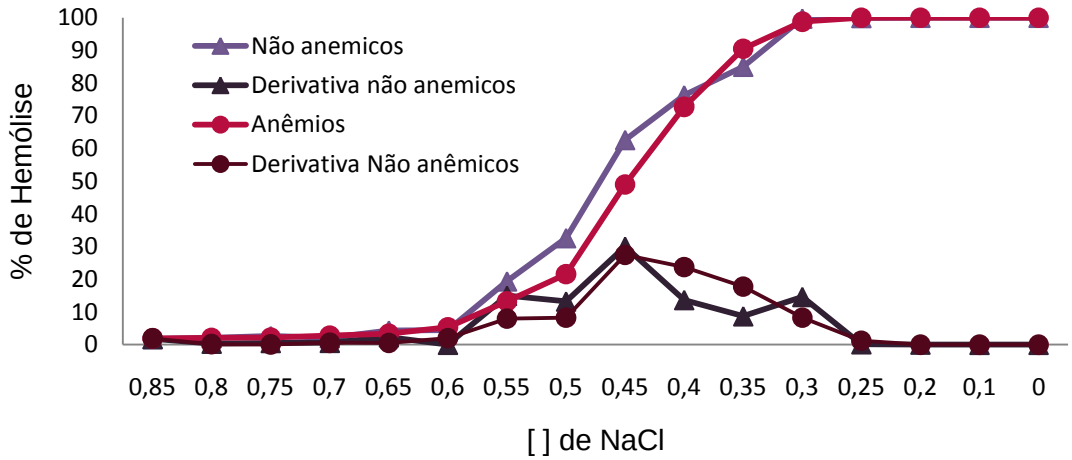

Gráfico 12 - Curvas derivativa e cumulativa da fragilidade osmótica eritrocitária em cães com linfoma e anemia e cães com linfoma sem anemia. Derivativa – porcentagem de incremento hemolítico ocorrendo em cada tubo sucessivos a diminuição da concentração de NaCl versus concentração de NaCl. Cumulativa – pocentagem de hemólise versus concentração de NaCl - São Paulo – 2008 a 2009

.

3. DISCUSSÃO

As espécies reativas do oxigênio (ERO) são geradas em condições fisiológicas, como produto do metabolismo aeróbico. Em tecidos tumorais são observados aumentos na produção destes radicais livres como conseqüência de alterações no metabolismo oxidativo destes tecidos, o que leva a alterações importantes no equilíbrio redox, seja pelo aumento na produção de ERO por estas células ou diminuição da produção de agentes antioxidantes (GÜVEN et al., 2000; BORELLA; VARELA, 2004; BATTISTI et al., 2008). Estudos recentes evidenciaram que cães com linfoma estão sob forte estresse oxidativo (VAJDOVICH et al., 2005).

Os animais com linfoma avaliados neste estudo apresentaram diminuição significante do estado antioxidante total (TAS) em relação aos animais do grupo controle. Este teste avalia de forma geral o sistema antioxidante do organismo, deste modo, pode-se inferir que os animais do grupo experimental estavam em estresse oxidativo, uma vez que a sua capacidade antioxidante mostrou-se diminuída. Este achado pode ser conseqüência de um maior consumo dos agentes antioxidantes ou secundário a diminuição da sua produção. Quando os grupos de animais com linfoma e anemia e linfoma sem anemia foram comparados não foi observada diferença estatística no TAS, mostrando que estes animais estão sob mesmo estresse oxidativo, respondendo de maneira semelhante ao excesso de radicais livres liberados pelas células tumorais, independentemente da presença de anemia. Devi et al. (2000) demonstraram que, na leucemia, os linfócitos neoplásicos liberam grande quantidade de radical superóxido, confirmando os achados de Oberley e Bueftner (1979) e Toyokuni et al. (1995), que avaliaram a liberação de ERO e o estresse oxidativo em diferentes tecidos neoplásicos, confirmando a ocorrência do estresse oxidativo na presença de malignidades.

A diminuição do estado antioxidante total observada neste estudo, por outro lado pode ser relacionada com a redução da capacidade antioxidante relatada em diversos tecidos tumorais, que se dá em parte por redução relativa dos níveis de SOD-Mn (OBERLE; BUEFTNER, 1979). Tisdale e Mahmoud (1983) observam níveis reduzidos de SOD e catalase em linfócitos neoplásicos. Esta falha das defesas antioxidantes poderia resultar em morte celular por danos a membrana

celular, secundária peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados e ao ataque a proteínas e ácidos nucléicos.

Desequilíbrios no metabolismo oxidativo estão presentes em diversas afecções, como a doença cardíaca, doença renal e diabetes, por esse motivo foram excluídos do grupo de estudos os animais que apresentavam comorbidades e alterações nos exames físico e laboratoriais que sabidamente pudessem interferir com as análises aqui realizadas, com isso, procurou-se diminuir as interferências que estas alterações pudessem trazer, tornando o teste mais fidedigno ao estado antioxidante presente nos cães com linfoma. Diante dos resultados apresentados neste estudo, pode-se inferir que a diminuição do estado antioxidante total estaria relacionada à presença do linfoma em si e que a anemia observada nos animais do estudo não estaria relacionada diretamente a diminuição das defesas antioxidantes.

A estimativa da capacidade antioxidante total de um organismo pode ser realizada por meio de vários testes (WINTER et al., 2009), não existindo um consenso entre pesquisadores, deste modo foi observado variações nas provas de avaliação da capacidade antioxidante entre os trabalhos consultados. Winter et al. (2009) ao avaliar cães com linfoma utilizaram o teste de ORAC (capacidade de absorção de radicais oxigênio) para avaliar o estado antioxidante e encontrou valores elevados, quando comparados com os dos animais normais, mostrando um desbalanço no estado redox, resultado semelhante foi observado por Vajdovich et al. (2005), que avaliaram o estado antioxidante total do tecido linfático de cães com linfoma, através do teste de FRAP, que se baseia na capacidade plasmática de redução do ferro. A falta de uma padronização nos testes dificulta a comparação dos resultados.

Apesar de não se ter observado diferença estatística nos níveis de malondialdeido (MDA), esses níveis foram, na média, mais altos nos animais com linfoma e anemia quando comparados com o grupo de animais com linfoma sem anemia e o grupo controle, sugerindo uma maior peroxidação lipídica nos animais com linfoma e anemia. Quando comparados o grupo de animais doentes e o grupo dos animais saudáveis o resultado foi similar, mostrando que pacientes com linfoma apresentam maior tendência a peroxidação lipídica e por conseqüência, ao estresse oxidativo. Os aldeídos gerados no processo de peroxidação, como o MDA, são

relativamente estáveis, difundindo-se no meio intra e extracelular. Assim, não são apenas produtos finais do processo de peroxidação lipídica, mas também podem atuar como "segundos mensageiros citotóxicos". O excesso de MDA produzido como resultado do desbalanço no estado redox observado na presença de tumores pode reagir com os grupos amino livres das proteínas de membrana, produzindo adutos MDA-proteína modificada, interferindo com as propriedades destas proteínas, contribuindo com o dano as propriedades de membrana. (DALLE-DONNE et al., 2006).

Winter et al. (2009) observaram aumento significante no MDA plasmático de cães com linfoma, embora o número de animais utilizado por esses autores não seja muito maior que o utilizado neste estudo. Assim, como foi observada a tendência ao aumento do MDA nos cães doentes, o resultado não significante pode ser conseqüência do pequeno número de animais avaliados. Lucas et al. (2008) ao estudar 15 cães com linfoma encontrou resultado semelhante aos de Winter et al. (2009), corroborando com a hipótese do aumento do estresse oxidativo em cães com linfoma.

O MDA também é utilizado como um marcador de peroxidação em outras afecções como a doença renal. Lustoza (2004) observou aumento de 100% na média da concentração das substâncias reativas ao acido tiobarbitúrico em pacientes com doença renal crônica e anêmicos, quando comparados com animais normais, confirmando um aumento na peroxidação lipídica em cães doentes renais, e que este, pode ser um dos mecanismos, envolvidos no desenvolvimento da anemia nestes pacientes.

A integridade do sistema antioxidante é fundamental para a sobrevivência das células vermelhas contra o dano oxidativo e a SOD é a primeira enzima a entrar em ação nesta defesa. Deficiência na atividade da SOD torna as células mais suscetíveis à ação deletérias dos radicais livres, que em pacientes com câncer estão circulando em maior quantidade como observado por Devi et al. (2000) em pacientes com leucemia. Os linfócitos neoplásicos produzem uma maior quantidade de O_2^-, este radical se difunde através da membrana do leucócito neoplásico e uma vez no meio extracelular pode atravessar a membrana dos eritrócitos através dos seus canais iônicos, podendo reagir com o peróxido de hidrogênio ou o Fe produzindo

radical OH^{-}, extremamente deletério não só à membrana celular, mas também as proteínas e DNA (ABOU-SEIF; RABIA; NASR, 2000; DEVI et al., 2000).

A superoxido dismutase é detectada em um grande número de tecidos do organismo, onde desempenha o papel protetor contra os danos gerados pelo excesso de radical superoxido (FRIDOVICH,1972). Alterações nas suas concentrações foram estudadas em diferentes tecidos tumorais e os resultados observados foram bastante diversificados. No presente estudo os níveis de superoxido dismutase (SOD) eritrocitárias observadas nos pacientes do grupo experimental foram significantemente menores que no grupo controle. Diminuições nos níveis de SOD podem ser explicados por um aumento no consumo da enzima por ação na defesa antioxidante frente ao aumento na produção de ERO observado nas células tumorais, ou ainda secundaria a anormalidades bioquímicas em precursores de células vermelhas, levando a redução na produção e funcionamento desta enzimas (BEWICK; COUTIE; TUDHOP, 1987). A hipótese da existência de substâncias inibitórias produzidas pelas células tumorais foi levantada por Bewick; Coutie; Tudhop (1987), sendo que estas substâncias agiriam sobre o eritrócito ou sobre o seu precursor na medula óssea, inibindo a expressão destas enzimas.

Os resultados obtidos neste estudo vão de acordo com os observados por Vajdovich et al. (2005) ao avaliar um grupo similar, no qual os níveis de SOD foram mensurados no hemolisado e no linfonodo de cães com linfoma multicêntrico e, em ambos os casos, os níveis de SOD estavam reduzidos, mostrando que estes pacientes estão sob estresse oxidativo, que não afeta somente os tecidos acometidos, mas também as células do sangue, por torná-las mais suscetíveis ao dano gerado pelo excesso de radicais livres circulantes.

Saito et al. (1984) e Bewick; Coutie; Tudhop, (1987) ao avaliar os níveis de SOD de pacientes humanos com linfoma observaram resultados similares aos encontrados neste estudo e contrários aos descritos anteriormente por Gonzalez et al. (1984) e posteriormente por Abou-Seif; Rabia; Nasr (2000), que justificaram os aumentos nos níveis de SOD eritrocitária pelas alterações na expressão desta enzima nas células progenitoras hematopoiéticas. Gonzalez et al. (1984) não observaram correlação entre a SOD e parâmetros clínicos como presença de síndrome inflamatória, estágio clinico da doença e infiltração na medula, assim

como também não foi significante a correlação com o hematócrito, hemoglobina e reticulócitos, mostrando que os níveis deste antioxidante eritrocitário, não sofrem influencia de fatores externos (GONZALEZ et al., 1984). No presente estudo a correlação da SOD com o hematócrito também não foi significante, corroborando os achados de Gonzalez et al. (1984). O aumento nos níveis de SOD poderia ser secundário, ainda, à ativação local de formas ativas e inativas destas enzimas pelo excesso de radical superoxido (ABOU-SEIF; RABIA; NASR, 2000). Devi et al. (2000) e Güven et al. (2000), ao avaliar pacientes com leucemia, também encontraram aumentos nos níveis de SOD, este achado foi associados a maior produção de peróxido de hidrogênio pelas células tumorais, contribuindo para aumento da peroxidação lipídica, que foi traduzido no experimento de GÜVEN et al. (2000) pelo aumento do MDA.

Quando os animais pertencentes ao grupo experimental com anemia foram comparados com o grupo sem anemia e os cães saudáveis, estes apresentaram, embora não de forma significativa, valores mais baixos de SOD que os outros dois grupos, este achado pode ser decorrência da diminuição desta forma de defesa antioxidante secundária ao aumento do seu consumo em condições de desequilíbrio oxidativo, o que tornaria as hemácias mais susceptíveis a peroxidação de suas membranas, com conseqüente diminuição do seu tempo de vida, podendo ser este um dos mecanismos responsáveis pela redução da massa eritróide observado neste grupo.

Os eritróctios, por apresentarem altos teores de lipídios insaturados em sua membrana, altas concentrações de oxigênio e grandes quantidades de ferro, considerado um potente catalisador da peroxidação, são consideradas um modelo de suscetibilidade a peroxidação. A atuação dos radicais livres sobre a membrana dos eritrócitos provoca aumento na fragilidade osmótica, tornando estas células mais predispostas à lise celular. Vários estudos demonstraram uma correlação positiva entre o estado antioxidante, peroxidação lipídica e fragilidade osmótica eritrocitária (DEVASENA et al., 2001).

No presente estudo, a fragilidade osmótica eritrocitária (FOE) observada nos animais com linfoma apresentou-de dentro dos valores de normalidade postulados por Jain (1973), não foi observada diferença estatística nas concentrações de NaCl

em que se observou 50% de hemólise nos animais com linfoma e anemia e linfoma sem anemia. Diante deste resultado pode-se concluir que os eritróctios dos pacientes com linfoma não apresentam alterações relacionadas à fragilidade da membrana, quando comparados com os normais e que anemia não pode ser relacionada a um aumento da fragilidade da membrana.

Abou-Seif; Rabia; Nasr (2000) observaram aumentos nas concentrações de SOD, MDA intraeritrocitário e na fragilidade osmótica eritrocitária de pacientes com linfoma. Esse resultado foi associado à produção do radical hidroxila e/ou oxigênio “singlet” pelas células tumorais uma vez que estes dois radicais são associados a dano oxidativo das membranas celulares, além de outros efeitos tóxicos. Neste estudo o aumento do MDA seria traduzido por um maior grau de peroxidação lipídica da membrana dos eritrócitos, o que as tornaria mais frágeis. No presente estudo essa relação não pode ser estabelecida uma vez que o MDA dosado foi o plasmático e não o eritrocitário, mostrando a ocorrência de peroxidação sistêmica. No entanto altos níveis de MDA circulante podem interferir nas propriedades de membrana através da interação deste aldeido com suas proteínas, levando a alterações na capacidade de deformidade do eritrócito, sem interferir na fluidez, permeabilidade, tamanho e relação volume/superfície. Esse fenômeno pode contribuir para uma série complexa de eventos que resulta na remoção precoce destas células da circulação ou ainda as torna expostas a uma variedade de agentes que induzem a peroxidação (PFAFFEROTT; MEISELMAN; HOCHSTEIN, 1982; DALLE-DONNE et al., 2006).

Este mecanismo poderia explicar que os níveis de MDA que, na média, se apresentam mais elevados nos pacientes anêmicos, poderiam gerar um dano celular com alterações nas propriedades de membrana referentes à maleabilidade e antigenicidade da membrana lipídica, sem interferir com a sua permeabilidade, reduzindo, por conseqüência, o tempo de vida destas hemácias e podendo aumentar o seqüestro esplênico. Ao analisar a correlação entre o hematócrito e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, não foi encontrado resultado significante, ou seja, a diminuição do hematócrito independe dos níveis de MDA plasmático, este resultado pode ser associado um número insuficiente de animais utilizados no experimento, ou ainda, a possibilidade de realmente não existir uma correlação entre estes parâmetros.

A anemia associada ao grupo de animais com linfoma, também poderia ser explicada pelo aumento de citocinas inflamatórias observado em pacientes com linfoma. Estudos recentes têm demonstrado que citocinas inflamatórias envolvidas na patogênese da anemia de doença crônica podem exercer parte do seu efeito sobre a eritropoiese por indução da liberação de espécies reativas do oxigênio, além disso, a ação destes oxidantes sobre as unidades formadoras de colônia eritrocitária pode ser facilitada na presença de concentrações elevadas de interferon γ, que contribui com ação das ERO por suprimir as defesas oxidativas ou induzir o estresse oxidativo. (DALLALIO; MEANS., 2003).

Diante dos resultados observados no presente estudo, sugere-se que a anemia observada nos pacientes com linfoma multicêntrico não esta relacionada diretamente a diminuição das defesas antioxidantes eritrocitárias ou à alterações nas propriedades de membrana secundarias a peroxidação lipídica, que poderiam interferir na fragilidade do eritrócito. Entretanto, isso não exclui o envolvimento do desequilíbrio no estado redox, observado nestes animais, da gênese desta alteração, uma vez que citocinas inflamatórias, liberadas pelas células tumorais, podem agir de maneira sinérgica ao excesso de radicais livres na inibição da hematopoiese e os níveis mais altos de MDA podem levar a alterações na maleabilidade e antigenicidade do eritrócito, contribuindo para a diminuição do tempo de vida dessas células.

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos com a metodologia empregada neste estudo, foi possível concluir que:

- Cães com linfoma multicêntrico encontram sob maior estresse oxidativo quando comparados com os cães normais, o que pode ser comprovado pela redução do estado antioxidante total e pelo aumentou, na méida, dos níveis de substancias reativas ao acido tiobarbitúrico.
- Cães com linfoma multicêntrico com anemia e sem anmeia encontram-se sob o mesmo estresse oxidativo, fato este evidenciado pela ausência de diferença estatística nod valores encontrados nos dois grupos, deste modo pode-se afirmar que a diminuição do estado antioxidante total estaria relacionada à presença do linfoma em si e que a anemia não estaria relacionada a diminuição das defesas antioxidantes.
- Diante dos resultados observados na dosagem das substancias reativas ao acido tiobarbitúrico, pode-se sugerir, que cães com linfoma e anemia estão sob maior peroxidação lipídica que os cães normais e com linfoma sem anemia, uma vez que, mesmo não significativa, as concentrações destas substancias neste grupo de animais foi maior.
- Cães com linfoma apresentam uma tendência ao desequilíbrio da defesa antioxidante eritrocitária, isso é demonstrado pela redução das concentrações médias da SOD nestes animais.
- As hemácias dos pacientes com linfoma e anemia, demonstraram maior susceptibilidade ao dano oxidativo, devido a redução média da SOD, mas estas células não apresentam alterações na permeabilidade de membrana, fato este comprovado pela fragilidade osmótica eritrocitária normal neste grupo

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia Celular e Molecular**. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003.

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

ABOU-SEIF, M.; RABIA, A.; NASR, M. Antioxidant status, erythrocyte membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in malignant lymphoma patients. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 38, n. 8, p. 737-742, 2000.

ADAMSON, J. W. The Anemia of Inflammation/Malignancy: mechanisms and management **Hematology American Society of Hematology. Education Program**,z p.159-165, 2008.

BATTISTI, V.; MADERS, L. D. K.; BAGATINI, M. D.; SANTOS, K. F.; SPANEVELLO, R. M.; MALDONADO, P. A.; BRULÉ, A. O.; ARAÚJO, M. C.; SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M. Measurement of oxidative stress and antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients. **Clinical Biochemistry**, v. 41, p. 511–518, 2008.

BEWICK, B.; COUTIE, W.; TUDHOP, G. R. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in the red cells of patients with malignant lymphoma. **British Journal of Haematology**, v. 65, p. 347-350, 1987.

BLOHMER, J. U.; DUNST, J.; HARRISON, L.; JOHNSTON, P.; KHAYAT, D.; LUDWIG, H.; O'BRIEN, M.; VAN BELLE, S.; VAUPEL, P. Cancer-Related Anemia: Biological Findings, Clinical Implications and Impact on Quality of Life. **Oncology**, v. 68, p.12–21, 2005. Supplement 1.

BORELLA, M. L. L.; VARELA, Q. D. Antioxidantes enzimáticos. In: SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo.** Canoas: Ulbra, 2004. p. 14-33.

CARO, J. J.; SALAS, M.; WARD, A.; GOSS, G. Anemia As an Independent Prognostic Factor for Survival in Patients with Cancer. **Cancer**, v. 91, n. 12 ,p. 2214-2221, 2001.

CARTER, R. F.; VALLI, V. E. O.; LUMSDEN, J. H. The Cytology, Histology and Prevalence of Cell Types in Canine Lymphoma Classified According to the National Cancer Institute Working Formulation. **Canadian Journal Of Veterinary Research**, v. 50, p.154-164, 1986.

CAVDAR, C.; TEMIZ, A.; YENICERIOGLU, Y.; CALISKAN, S.; CELIK, A.; SIFIL, A.; ONVURAL, B.; CAMSARI, T. The effects of intravenous iron treatment on oxidant stress and erythrocyte deformability in hemodialysis patients. **Scandinavian Journal of Urology and Nephrology**, v. 37, n. 1, p. 77-82, 2003.

CLARKE, H.; PALLISTER, C. J. The impact of anaemia on outcome in cancer. **Clinical And Laboratory Haematology,** v. 27, p. 1-13, 2005.

DALLALIO, G.; MEANS, R. T. Effects of oxidative stress on human erythroid colony formation: modulation by γ-interferon. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 141, n. 6, p. 395-400, 2003.

DALECK, C. R.; CALAZANS; S. G.; DE NARDI, A. B. Linfomas. In: DALECK, C. R.; RODASKI, S.; DE NARDI, A. B. **Oncologia em cães e gatos.** 1 ed., Roca:São Paulo, 2009, p. 481-505.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; COLOMBO, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 4, p. 601–623, 2006.

DARIYERLI, N.; TOPLAN, S.; AKYOLCU, M. C.; HATEMI, H.; YIGIT, G. Erythrocyte Osmotic Fragility and Oxidative Stress in Experimental Hypothyroidism. **Endocrine**, v. 25, n. 1, p. 1–5, 2004.

DHALIWAL; R. S.; KITCHELL, B. E. Canine Lymphossarcoma; clinical features. **Compendium**, v. 25, n. 8, p. 572-582, 2003.

DEVASENA, T.; LALITHA, L.; PADMA, K. Lipid peroxidation, osmotic fragility and antioxidant status in children with acute post-streptococcal glomerulonephritis. **Clinica Chimica Acta**, v. 308, p. 155–161, 2001.

DEVI, G. S.; PRASAD, M. H.; SARASWATHI, I.; RAGHU, D.; RAO, D. N.; REDDY, P. P. Free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemias. **Clinica Chimica Acta**, v. 293, p. 53–62, 2000.

DICATO, M. Anemia in Cancer: Some Pathophysiological Aspects. **The Oncologist**, v. 8, p. 19-21, 2003. Suplplement 1

DOBSON, J. M.; GORMAN, N. T. Canine multicentric lymphoma: clinicopathological presentation of disease. **Journal of Small Animal Practice**, v. 34, p. 594-598, 1993.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynomenal. **Methods in Enzimology**, v. 186, p. 407-421, 1990.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira,** v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FETTMAN, M. J. Comparative aspects of gluthatione metabolism affecting individual susceptibility to oxidant injury. **Compedium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 13, n. 7, p. 1079-1091, 1991.

FIBACH, E.; RACHMILEWITZ, E. The Role of Oxidative Stress in Hemolytic Anemia. **Current Molecular Medicine**, v. 8, p. 609-619, 2008.

GARCEZ, M.; BORDIN, D.; PERES. W.; SALVADOR, M. Radicais Livres e Espécies Reativas. In: SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo.** Canoas: Ulbra, 2004. p. 14-33.

GÜVEN, M.; ÖZTÜRK, B.; SAYAL, A.; ÖZET, A. Lipid Peroxidation and Antioxidant System in the Blood of Patients with Hodgkin's Disease. **Clinical Biochemistry**, v. 33, n. 3, p. 209-212, 2000

HENRY, D. H. Guidelines and recommendations for the management of anaemia in patients with lymphoid malignancies. **Drugs**, v. 67, n. 2. p. 175-194, 2007.

HOHAUS, S.; MASSINI, G.; GIACHELIA, M.; VANNATA, B.; BOZZOLI, B.; CUCCARO, A.; D'ALO', F.; LAROCCA, L. M.; RAYMAKERS, R. A. P.; SWINKELS, D. W.; VOSO, M. T.; LEONE, G. Anemia in hodgkin's lymphoma: the role of interleukin-6 and hepcidin. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, p. 1-7, 2010.

HORL, W. Non-erythropoietin-based anemia management in chronic kidney disease. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 17, p.35-38, 2002. Supplement 11.

JACOBS, R. M.; MESSICK, J. B.; VALLI, V. E. O. Tumors of the hematopoietic system. In: MEUTEN, D.J. **Tumor in domestic animals**. 4. Ed. Iowa, Iowa State, 2002. Cap.3, p.119-198.

JAIN, N.C. Osmotic fragility of erithrocytes of dogs and cats in health and in certain hematologic disorders. **The Cornell Veterinarian**, v. 63, p 411-423, 1973.

JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**, 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. p.1221

JAIN, C. N. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.417.

KARIHTALA, P.; SOINI, Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. **APMIS.** v. 115, n. 2, p. 81-103, 2007.

KELLER, E. T. Immune-mediated disease as a risk factor for canine lymphoma. **Cancer,** v. 70, p. 2334-2337, 1992.

KIUPEL, M.; TESKE, E.; BOSTOCK, D. Prognostic Factors for Treated Canine Malignant Lymphoma. **Veterinary Pathology**, v. 36, p. 292-300, 1999.

KLAUNIG, J. E.; XU, Y.; ISENBERG, J. S.; BACHOWSKI, S.; KOLAJA, K. L.; JIANG, J.; STEVENSON, D. E.; WALBORG JR, E. F. The Role of Oxidative Stress in Chemical Carcinogenesis. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, p. 289-295, 1998. Supplement .1.

LOCATELLI, F.; CANAUD, B.; ECKARDT, K. U.; STENVINKEL, P.; WANNER, C.; ZOCCALI, C. Oxidative stress in end-stage renal disease: An emerging threat to patient outcome. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 18, n. 7, p. 1272-1280, 2003.

LUCAS, S. R. R.; GIMENO, M. G.; MORI, C. S.; WIRTHL, V. A. B. F. Evaluation of oxidant/antioxidant status in dogs with multicentric lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 3, p. 772, 2008.

LUCCHI, B.; BERGAMINI, S.; IANNONE, A.; PERRONE, S.; STIPO, L.; OLMEDA, F.; CARUSO, F.; TOMASI, A.; ALBERTAZZI, A. Erythrocyte susceptibility to oxidative stress in chronic renal failure patients under different substitutive treatments. **Artificial Organs**, v. 29, n. 1, p. 67-72, 2005.

LUCROY, M. D.; CHRISTOPHER, M. M.; KRAEGEL, S. A.; SIMONSON, E. R.; M A D E W E L L, B. R. Anaemia Associated with Canine Lymphoma. **Comparative Haematology International,** v. 8, p. 1-6, 1998.

MANDAL, A. K. J.; SAVVIDOU, L.; SLATER, R. M.; COCKETT, W.; WIGGINS, J.; MISSOURIS, C.G. Angiotropic lymphoma: Associated chromosomal abnormalities. **European Journal of Internal Medicine**, v. 18, p. 432– 434, 2007.

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

MANDELKER, M.; Introduction to Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 38, n. 1, p. 1-30, 2008.

McCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. The Utility of Superoxide Dismutase in Studying Free Radical Reactions. **The Journal Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6056-6063, 1969.

MILLER, A. G.; MORLEY, P. S.; RAO, S.; AVERY, A. C.; LANA, S. E.; OLVER, C. E. Anemia Is Associated with Decreased Survival Time in Dogs with Lymphoma. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 23, n. 1, p. 116-22, 2009

MODIANO, F. J.; BREEN, M.; BURNETT, R. C.; PARKER,H. G.; INUSAH, S.; THOMAS,R.; AVERY, P. R.; LINDBLAD-TOH, K.; OSTRANDER, E. A.; CUTTER, G. C.; AVERY, A. C. Distinct B-Cell and T-Cell Lymphoproliferative Disease Prevalence among Dog Breeds Indicates Heritable Risk. **Cancer Researchs**, v. 65, n. 13, p. 5654-5661, 2005.

MOULLET, I.; SALLES, G.; KETTERER, N.; DUMONTET, C.; BOUAFIA, F.; NEIDHART-BERARD, E. M.; THIEBLEMONT, C.; FELMAN, P.; COIFFIER, B. Frequency and significance of anemia in non-Hodgkin's lymphoma patients. **Annals of Oncology**, n. 9, p. 1109-1115, 1998.

MOULTON, J. E.; HARVEY, J. W. Tumors of the lymphoid and hematopoietic tissues. In: MOULTON, J. E. **Tumors in domestic animals.** 3 ed. Califórnia: University of California Press: 1990. p. 231-307.

NEUMANN, C. A.; KRAUSE, D. S.; CARMAN, C. V.; DAS, S.; DUBEY, D. P.; ABRAHAM, J. L.; BRONSON, R. T.; FUJIWARA, Y.; ORKIN, S. H.; VAN ETTEN, R. A. Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erytrhocyte antioxidant defence and tumor suppression. **Nature**, v. 424, n. 6948, p. 561-565, 2003.

OBERLEY, L. W.; BUEFTNER, G. R. Role of Superoxide Dismutase in Cancer: A Review. **Cancer Research**, v. 39, p. 1141-1149l,1979.

OGILVIE, G. K. Paraneoplastic syndromes. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Textbook of Veterinary Internal Medicine.** 5 ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company: 2000, p. 498-506.

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

OWEN, L. WHO Clinical Staging. In: DOCUMENT VPH / CMO / 80, 20. Geneva: World Health Organization, 1980: 47.

PFAFFEROTT, C.; MEISELMAN, H. J.; HOCHSTEIN, P. The Effect of Malonyldialdehyde on Erythrocyte Deformability. **Blood**, v. 59, n. 1, p. 12-15, 1982.

PERK, K.; FREI, Y.F.; HERZ, A. Osmotic fragility of red blood cells of young and mature domestic and laboratory animals. **American Journal Veterinary Research**, v. 25, p. 1241-8, 1964.

ROSSI, G.; ROSSI, M.; VITALI, C. G.; FORTUNA, D.; BURRONI, D.; PANCOTTO, L.; CAPECCHI, S.; SOZZI, S.; RENZONI, G.; BRACA, G.; DEL GIUDICE, G.; RAPPUOLI, R.; GHIARA, P.; TACCINI, P. A Conventional Beagle Dog Model for Acute and Chronic Infection with *Helicobacter pylori*. **Infection and Immunity,** v. 67, n. 6, p. 3112-3120, 1999.

SAITO, T., KURASAKI, H.; KASI, H.; SAITO. K. Deficiency of erythrocyte superoxide dismutase and catalase activities in patients with malignant lymphoma and acute myeloid leukaemia. **Cancer Letters**. v. 24, p. 141-146, 1984. Abstract.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signal triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

TESKE, E. Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma. **Veterinary Quarterly**, v. 16, n. 4, p. 209-219, 1994.

TESKE, E.; VAN HEERDE, P.; RUTTEMAN, G.R.; KURZMAN, I. D.; MOORE, P. F.; MacEWEN, G. Prognostic Factors for Treatment of Malignant Lymphoma in Dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association.**, v. 205, n. 12, p. 1722-1728, 1994.

TISDALE, M. J.; MAHMOUD, M. B. Activities of free radical metabolizing enzymes in tumours. **British Journal of Cancer**, v. 47, p. 809-812, 1983.

TOYOKUNI, S.; OKAMOTO, K.; YODOI, J.; HIAI, H. Persistent oxidative stress in cancer. **FEBS Letters,** v. 358, p. 1-3, 1995

VALDIVIA, A.; PÉREZ-ÁLVAREZ, S.; AROCA-AGUILAR, J. D.; IKUTA, I.; JORDÁN, J. Superoxide dismutases: a physiopharmacological update. **Journal of physiology and biochemistry,** v. 65, n. 2, p. 195-208, 2009.

VAIL, D. M. Lymphoproliferative and myeloproliferative disorders. In: DOBSON, J.; LASCELLES, B. D. X. **BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology**, 2 end, 2003. p. 276-292

VAIL, D. M.; Young, K. M. Hematopoietic tumors. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D.V. **Small Animal Clinical Oncology.** 4 ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2007. p. 699-784.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1–40, 2006.

VAJDOVICH, P.; KRISKA, T.; MÉZES, M.; SZABÓ, P. R.; BALOGH, N.; BÁNFI, A.; ARANY-TÓTH, A.; GAÁL, T.; JAKUS, J. Redox status of dogs with non-hodgkin lymphomas. An ESR study. **Cancer Letters**, v. 224, n. 2, p. 339-346, 2005.

VONDERHAAR, M. A.; MORRISON, W .B. Lymphossarcoma. In: MORRISON, W .B. **Cancer in dogs and cats medical and surgical management.** 1 ed, Philadelphia: Willians & Wilkins, 1998. p. 641-670.

WINTER, J. L.; BARBER, L. G.; FREEMAN, L.; GRIESSMAYR, P. C.; MILBURY, P. E.; BLUMBERG, J. B. Antioxidant status and biomarkers of oxidative stress in dogs with lymphoma. **Jounal Veterinary Internal Medicine**, v. 23, p. 311–316, 2009.

ZIMA, T.; SPICKA, I.; STÍPEK, S.; CRKOVSKÁ, J.; PLÁTENÍK, J.; MERTA, M.; TESAR, V. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in patients with multiple myeloma. **Neoplasma**, v. 43, n. 2, p. 69-73, 1996.

JOZWIK, M.; JOZWIK, M.; JOZWIK, M.; SZCZYPKA, M.; GAJEWSKA, J.; LASKOWSKA-KLITA, T. Antioxidant defence of red blood cells and plasma in stored human blood. **Clinica Chimica Acta**, n. 267, p. 129–142, 1997.

APÊNDICES

Animal	HEMOGRAMA													
	Hemácias ($x10^6/mm^3$)	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/dL)	V.C.M. (fl)	H.C.M. (pg)	C.H.C.M. (%)	Leucócitos ($/mm^3$)	Neutrófilos ($/mm^3$)	Eosinófilos ($/mm^3$)	Basófilos ($/mm^3$)	Linfócitos Típicos ($/mm^3$)	Linfócitos Atípicos ($/mm^3$)	Monócitos ($/mm^3$)	Plaquetas ($/mm^3$)
1	7,9	53	16,9	67,09	21,39	31,89	7.500	4.575	375	0	2.475	0	75	329.000
2	7,9	55	19,9	69,62	25,19	36,18	7.200	5.616	216	0	1.080	0	288	335.000
3	8,6	63	20,7	73,26	24,07	32,86	4.400	3.124	220	0	1.012	0	44	307.000
4	7,2	46	16,1	63,89	22,36	35,00	8.800	4.664	792	0	2.728	0	616	269.000
5	6,0	43	14,2	71,67	23,67	33,02	18.900	14.175	756	0	3.024	0	945	464.000
6	6,9	48	16,6	69,57	24,06	34,58	8.500	6.120	85	0	1.955	0	340	470.000
7	7,2	52	17,4	72,22	24,17	33,46	6.000	4.020	300	0	1.320	0	360	362.000
8	6,4	49	16,1	76,56	25,16	32,86	5.300	2.120	371	0	2.173	0	636	293.000
9	7,9	57	18,0	72,15	22,78	31,58	11.800	9.440	118	0	2.124	0	118	246.000
10	8,1	56	17,8	69,14	21,98	31,79	11.500	9.085	1.150	0	690	0	575	346.000
11	6,0	40	12,9	66,67	21,50	32,25	6.800	3.808	204	0	2.244	0	544	541.000
12	6,7	47	15,1	70,15	22,54	32,13	7.700	3.311	1.540	77	1.925	0	847	415.000
13	5,5	40	12,5	72,73	22,73	31,25	10.300	7.004	206	0	2.884	0	206	581.000
14	6,8	48	15,1	70,59	22,21	31,46	7.400	5.328	222	0	1.332	0	518	612.000

Apêndice A – Valores relativos aos hemogramas dos animais do grupo controle - São Paulo – 2008 A 2009

Animal	HEMOGRAMA													
	Hemácias ($x10^6/mm^3$)	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/dL)	V.C.M. (fl)	H.C.M. (pg)	C.H.C.M. (%)	Leucócitos ($/mm^3$)	Neutrófilos ($/mm^3$)	Eosinófilos ($/mm^3$)	Basófilos ($/mm^3$)	Linfócitos Típicos ($/mm^3$)	Linfócitos Atípicos ($/mm^3$)	Monócitos ($/mm^3$)	Plaquetas ($/mm^3$)
15	6,9	50	16,6	72,46	24,06	33,20	7.900	4.740	474	0	2.291	0	395	261.000
16	7,7	56	18,0	72,73	23,38	32,14	9.600	6.432	576	0	1.248	0	1.344	256.000
17	7,3	49	16,5	67,12	22,60	33,67	13.200	8.448	1.716	0	2.640	0	396	267.000
18	6,5	45	14,0	69,23	21,54	31,11	13.000	10.010	520	0	1.950	0	520	277.000
19	5,8	42	13,6	72,41	23,45	32,38	15.200	9.424	608	0	4.256	0	912	332.000
20	7,4	47	16,2	63,51	21,89	34,47	6.700	4.556	469	0	1.072	0	603	244.000

VCM – Volume Corpuscular Médio; HCM – Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

Apêndice A – Valores relativos aos hemogramas dos animais do grupo controle - São Paulo – 20008 A 2009.

Animal	HEMOGRAMA													
	Hemácias ($x10^6/mm^3$)	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/dL)	V.C.M. (fl)	H.C.M. (pg)	C.H.C.M. (%)	Leucócitos ($/mm^3$)	Neutrófilos ($/mm^3$)	Eosinófilos ($/mm^3$)	Basófilos ($/mm^3$)	Linfócitos Típicos ($/mm^3$)	Linfócitos Atípicos ($/mm^3$)	Monócitos ($/mm^3$)	Plaquetas ($/mm^3$)
1[a]	4,6	31	10,9	67,39	23,70	35,16	16.100	14.490	0	0	966	0	644	275.000
2[b]	4,41	28	9,1	63,72	20,69	32,38	17.800	15.664	0	0	1.246	0	890	243.000
3	5,1	35	11,2	68,63	21,96	32,00	11.100	8.880	0	0	1.554	0	666	126.000
4[c]	3,97	26,80	9,00	67,51	22,67	33,58	7.603	5.398	0	0	1.825	0	380	36.000
5	4,6	30	10,2	65,22	22,17	34,00	19.400	13.774	194	0	4.268	970	194	56.000
6[d]	-	28	-	-	-	-	16.500	-	-	-	-	-	-	294.000
7[e]	5,3	34	11,5	64,15	21,7	33,82	28.200	26.508	282	0	846	0	564	186.000
8[f]	3,4	24	10,5	80,00	33,33	41,67	14.400	1.152	0	0	12.960	288	0	82.000
9[g]	3,9	25	8,1	64,10	20,77	32,40	10.600	8.162	0	0	2.226	0	212	251.000
10[h]	3,4	22	7,6	64,71	22,35	34,55	114.000	23.940	0	0	66.120	0	1.140	100.000
11[i]	4,7	27	9,3	57,45	19,79	34,44	11.000	9.570	0	0	1.320	0	110	299.000
12[j]	4,8	28	9,9	58,33	20,63	35,36	22.200	20.424	0	0	1.332	0	444	638.000

VCM – Volume Corpuscular Médio; HCM – Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média / [a] Anisocitose +; Neutrófilos segmentados pouco segmentados + / [b] Anisocitose +; Policromasia +; Neutrófilos segmentados pouco segmentados + e alguns com granulações tóxicas / [c] 21% Eritroblastos; Anisocitose ++; Policromasia +; Presença de Corpúsculos de Howell-Jolly; Neutrófilos segmentados pouco segmentados +++ e alguns com granulações tóxicas / [d] Hemograma completo indisponível devido atendimento em emergência / [e] Anisocitose ++ / [f] Anisocitose +; Policromasia + / [g] Anisocitose +; Policromasia + / [h] Anisocitose +; Policromasia (+) / [i] Anisocitose +; Macrocitose +; Policromasia + / [j] Anisocitose +; Neutrófilos com hipersegmentação +

Apêndice B – Valores relativos aos hemogramas dos animais com linfoma multicêntrico do grupo experimental com anemia - São Paulo – 2008 a 2009.

Animal	HEMOGRAMA													
	Hemácias ($x10^6/mm^3$)	**Hematócrito (%)**	**Hemoglobina (g/dL)**	**V.C.M. (fl)**	**H.C.M. (pg)**	**C.H.C.M. (%)**	**Leucócitos ($/mm^3$)**	**Neutrófilos ($/mm^3$)**	**Eosinófilos ($/mm^3$)**	**Basófilos ($/mm^3$)**	**Linfócitos Típicos ($/mm^3$)**	**Linfócitos Atípicos ($/mm^3$)**	**Monócitos ($/mm^3$)**	**Plaquetas ($/mm^3$)**
13[k]	3,1	18	7,1	58,06	22,90	39,44	6.400	4.544	0	0	1.536	0	320	111.000
14[l]	5,0	32	10,9	64,00	21,80	34,06	10.100	7.676	0	0	2.020	0	404	225.000

VCM – Volume Corpuscular Médio; HCM – Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média / [k] Anisocitose +; Macrocitose +; Hemácias em rouleaux +; Linfócitos reativos++ / [l] Presença de linfoblastos; Neutrófilos com hipersegmentação +

Apêndice B – Valores relativos aos hemogramas dos animais com linfoma multicêntrico do grupo experimental com anemia - São Paulo – 20008 a 2009.

Animal	HEMOGRAMA													
	Hemácias ($x10^6/mm^3$)	**Hematócrito (%)**	**Hemoglobina (g/dL)**	**V.C.M. (fl)**	**H.C.M. (pg)**	**C.H.C.M. (%)**	**Leucócitos ($/mm^3$)**	**Neutrófilos ($/mm^3$)**	**Eosinófilos ($/mm^3$)**	**Basófilos ($/mm^3$)**	**Linfócitos Típicos ($/mm^3$)**	**Linfócitos Atípicos ($/mm^3$)**	**Monócitos ($/mm^3$)**	**Plaquetas ($/mm^3$)**
1	7,9	53	17,5	67,09	22,15	33,02	6.600	4.554	0	0	1.386	0	660	156.000
2	5,75	45	15,3	78,26	-	34,00	16.200	11.340	324	0	3.078	0	1.458	140.000
3	5,5	39	13,2	70,91	-	33,85	14.300	11.869	143	0	2.002	0	286	280.000
4[a]	6,97	46,20	21,30	66,28	30,56	46,10	9.000	7.380	0	0	1.260	0	360	514.000
5	5,9	39	13,2	66,10	22,37	33,85	22.800	20.064	684	0	912	0	1.140	197.000
6[b]	7,8	49	16,3	62,82	20,90	33,27	9.300	7.533	93	0	1.302	0	372	391.000
7	7,21	45	13,7	62,41	19	30,44	17.200	15.996	172	0	860	0	172	219.000
8	7,7	52	17	67,50	22,1	32,70	8.900	6.675	267	0	1.246	0	712	328.000
9	6,4	39	12,2	60,94	19,06	31,28	16.900	14.196	0	0	2.197	0	507	350.000
10	6,0	40	14,4	66,67	24,0	36,00	12.800	11.520	0	0	256	0	1.024	227.000

VCM – Volume Corpuscular Médio; HCM – Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média / [a] Discreta anisocitose e policromasia / [b] Monócitos reativos +

Apêndice C – Valores relativos aos hemogramas dos animais com linfoma multicêntrico do grupo experimental sem anemia - São Paulo – 2008 a 2009.

Animal	DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS								
	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Proteína Total (g/dL)	Albumina (g/dL)	ALT (U/L)	Fosfatase Alcalina (U/L)	Billirrubina Total (mg/dL)	Bilirrubina Direta (mg/dL)	Billirrubina Indireta (mg/dL)
1	44,1	1,1	6,7	3,6	22,9	18,6	< 0,25	-	-
2	22,9	1,0	6,7	3,6	29,8	43,7	< 0,25	-	-
3	35,6	1,4	6,9	3,6	23,7	19,7	< 0,25	-	-
4	49,9	0,98	6,3	2,7	25,4	32,7	< 0,25	-	-
5	27,3	0,63	7,2	2,9	16,7	17,9	< 0,25	-	-
6	29,5	0,70	7,1	3,2	50,5	9,5	< 0,25	-	-
7	60,4	0,88	7,8	3,1	22,4	29,5	< 0,25	-	-
8	22,8	0,66	7,2	3,2	21,2	27,3	< 0,25	-	-
9	32,7	0,80	7,0	2,8	18,3	35,7	< 0,25	-	-
10	29,0	0,82	7,9	3,2	37,4	22,8	< 0,25	-	-
11	48,0	0,81	6,9	2,7	15,0	16,1	< 0,25	-	-

ALT – Alanina Aminotransferase

Apêndice D – Valores relativos aos exames bioquímicos séricos dos animais do grupo controle - São Paulo – 2008 a 2009.

Animal	DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS								
	Uréia (mg/dL)	**Creatinina (mg/dL)**	**Proteína Total (g/dL)**	**Albumina (g/dL)**	**ALT (U/L)**	**Fosfatase Alcalina (U/L)**	**Billirrubina Total (mg/dL)**	**Bilirrubina Direta (mg/dL)**	**Billirrubina Indireta (mg/dL)**
12	30,6	0,85	6,3	2,8	21,0	12,4	< 0,25	-	-
13	43,1	0,83	6,4	2,8	23,0	44,4	< 0,25	-	-
14	28,8	0,57	7,3	3,1	12,3	8,9	< 0,25	-	-
15	29,5	0,65	7,5	3,0	37,9	17,5	< 0,25	-	-
16	36,3	0,68	7,2	3,2	32,7	15,3	< 0,25	-	-
17	37,9	0,72	7,7	3,1	33,6	24,9	< 0,25	-	-
18	28,6	0,87	7,5	3,2	20,9	8,8	< 0,25	-	-
19	45,0	0,85	6,8	2,9	13,7	45,8	< 0,25	-	-
20	50,5	0,89	7,2	3,2	28,5	10,7	< 0,25	-	-

ALT – Alanina Aminotransferase

Apêndice D – Valores relativos aos exames bioquímicos séricos dos animais do grupo controle - São Paulo – 2008 a 2009.

Animal	DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS								
	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Proteína Total (g/dL)	Albumina (g/dL)	ALT (U/L)	Fosfatase Alcalina (U/L)	Billirrubina Total (mg/dL)	Bilirrubina Direta (mg/dL)	Billirrubina Indireta (mg/dL)
1	11,4	0,97	5,3	2,9	15,1	131,0	< 0,25	-	-
2	45,1	0,64	6,0	2,7	20,0	157,0	< 0,25	-	-
3	27,5	0,81	6,6	3,2	55,2	200,6	< 0,25	-	-
4	33,0	1,70	4,32	1,90	61,0	1.324,0	0,35	0,26	0,09
5	23,3	1,46	5,8	2,4	103	113,3	< 0,25	-	-
6	30,9	0,42	4,5	2,3	25,9	47,9	< 0,25	-	-
7	33,0	0,79	6,2	3,0	19,0	270,0	< 0,25	-	-
8	27,3	0,76	8,2	2,2	14,1	20,4	< 0,25	-	-
9	7,5	1,0	6,6	2,6	7,7	33,3	< 0,25	-	-
10	27,2	0,67	5,6	2,9	14,1	18,1	< 0,25	-	-

ALT – Alanina Aminotransferase

Apêndice E – Valores relativos aos exames bioquímicos séricos dos animais com linfoma multicêntrico do grupo experimental com anemia - São Paulo – 2008 a 2009.

Animal	DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS								
	Uréia (mg/dL)	**Creatinina (mg/dL)**	**Proteína Total (g/dL)**	**Albumina (g/dL)**	**ALT (U/L)**	**Fosfatase Alcalina (U/L)**	**Billirrubina Total (mg/dL)**	**Bilirrubina Direta (mg/dL)**	**Billirrubina Indireta (mg/dL)**
11	29,0	0,66	7,3	2,6	20,9	74,3	< 0,25	-	-
12	60,4	0,73	6,2	2,4	16,4	23,8	0,60	0,46	0,14
13	36,1	0,84	6,2	1,9	35,0	167,7	< 0,25	-	-
14	24,9	0,81	6,3	2,6	7,7	39,7	< 0,25	-	-

ALT – Alanina Aminotransferase

Apêndice E – Valores relativos aos exames bioquímicos séricos dos animais com linfoma multicêntrico do grupo experimental com anemia- São Paulo – 2008 a 2009.

Animal	DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS								
	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Proteína Total (g/dL)	Albumina (g/dL)	ALT (U/L)	Fosfatase Alcalina (U/L)	Billirrubina Total (mg/dL)	Bilirrubina Direta (mg/dL)	Billirrubina Indireta (mg/dL)
1	41,4	1,2	6,3	3,2	35,8	46,0	< 0,25	-	-
2	19,97	0,58	4,56	2,63	41,9	147,4	< 0,25	-	-
3	11,2	0,95	6,4	2,6	108,1	182,3	< 0,25	-	-
4	30,3	0,45	8,3	3,5	12,7	62,0	< 0,25	-	-
5	12,8	0,72	5,7	2,5	248,7	254,0	< 0,25	-	-
6	29,8	0,86	5,0	2,3	34,0	14,1	< 0,25	-	-
7	23,41	0,81	-	-	315,0	160,0	< 0,25	-	-
8	53,0	2,0	-	-	68,0	107,0	< 0,25	-	-
9	23	0,75	-	-	47	141	< 0,25	-	-
10	50,6	0,91	6,1	2,4	132,6	48,7	< 0,25	-	-

ALT – Alanina Aminotransferase

Apêndice F – Valores relativos aos exames bioquímicos séricos dos animais com linfoma multicêntrico do grupo experimental sem anemia - São Paulo – 2008 a 2009

Animal	Avaliação
1	Impossível obtenção de amostra – aspirado de MO seco
2	Relação Mielóide : Eritróide = 3,9 SE: discreta a moderada diseritropoiese (assincronia de maturação N:C, figuras mitose atípica). Relativa hipoplasia de série SM: discreta a moderada disgranulopoiese (neutrófilos tóxicos ++). Relativa hipoplasia de série SMega: não foram observados elementos da série SLMP: visualizados poucos macrófagos sem alterações dignas de nota. Presença de blastos de provável origem linfóide (5%). Monócitos reativos + Conclusão: ausência de grumos para avaliação de celularidade. Discreta a moderada dishematopoiese. Presença de blastos de provável origem linfóide
3	Relação Mielóide : Eritróide = 9,5 (hemodiluição) SE: intensa hipoplasia. Diseritropoiese (assincronia maturação N:C, tendendo à macrocitose, hipocromia +, policromasia ++, anisocitose ++) SM: moderada a intensa hipoplasia. Moderada disgranulopoiese (assincronia maturação N:C, neutrófilos tóxicos ++) SMega: não foram observados elementos da série SLMP: população linfóide pequena, com predomínio de linfócitos pequenos típicos. Presença de pequena população de blastos não classificáveis Conclusão: celularidade MO sem avaliação devido intensa hemodiluição e ausência de grumos (aparentemente hipocelularidade ou hipercelularidade). Moderada dishematopoiese. População de blastos pequenos não classificáveis (12,5%)

MO – medula óssea; SE – série eritróide; N:C – núcleo:citoplasma; SM – série mielóide; SMega – série megacariocítica; SLMP – série linfóide-monocitóide-plasmocítica

Apêndice G – Avaliação dos mielogramas relativos aos animais com linfoma multicêntrico do grupo experimental com anemia - São Paulo – 2008 a 2009.

(continua)

Animal	Avaliação
4	Impossível obtenção de amostra – paciente com distrição respiratória grave o que impossibilitou procedimento anestésico para colheita
5	Relação Mielóide : Eritróide = 1,5 SE: hipoplasia relativa de série. Moderada diseritropoiese (assincronia maturação N:C, fragmentação nuclear, anisocitose ++, policromasia +) SM: normoplasia a hipoplasia de série. Moderada disgranulopoiese (assincronia maturação N:C, neutrófilos tóxicos ++) SMega: não foram observados elementos da série SLMP: grande quantidade de células linfóides, a maioria apresentando 1-2 grandes nucléolos evidentes (24%) Conclusão: MO normocelular a hipercelular. Hipoplasia a normoplasia de SE e SM
6	Impossível obtenção de amostra – paciente veio a óbito antes da colheita

MO – medula óssea; SE – série eritróide; N:C – núcleo:citoplasma; SM – série mielóide; SMega – série megacariocítica; SLMP – série linfóide-monocitóide-plasmocítica

Apêndice G – Avaliação dos mielogramas relativos aos animais com linfoma multicêntrico do grupo experimental com anemia- São Paulo – 2008 a 2009.

(continua)

Animal	Avaliação
7	Relação Mielóide : Eritróide = 1,4 SE: discreta diseritropoiese (fragmentação nuclear) SM: discreta disgranulopoiese (assincronia maturação N:C, neutrófilos tóxicos ++, retardo escala maturação) SMega: não foram observados elementos da série SLMP: macrófagos com intensa atividade e aumento de depósito de ferro intracitoplasmático. Raros linfócitos atípicos correspondendo a 0,7% das células na amostra (cromatina frouxa, 2-3 nucléolos evidentes, anisonucleólise, citoplasma escasso) Conclusão: intensa hemodiluição. Discreta diseritropoiese e disgranulopoiese. Raras células blásticas
8	Relação Mielóide : Eritróide = 2,2 SE: intensa hipoplasia de série SM: intensa hipoplasia de série SMega: sem alterações SLMP: macrófagos com intensa atividade. Grande população de linfócitos atípicos (60,5%), muitos linfoblastos com pleomorfismo nuclear Conclusão: MO intensamente hipercelular, com aumento dos depósitos de ferro intracelulares. Intensa hipoplasia de SE e SM. Presença de população linfóide atípica importante

MO – medula óssea; SE – série eritróide; N:C – núcleo:citoplasma; SM – série mielóide; SMega – série megacariocítica; SLMP – série linfóide-monocitóide-plasmocítica

Apêndice G – Avaliação dos mielogramas relativos aos animais com linfoma multicêntrico do grupo experimental com anemia- São Paulo – 2008 a 2009.

(continua)

Animal	Avaliação
9	Relação Mielóide : Eritróide = 3,1 SE: discreta diseritropoiese (assincronia maturação N:C) SM: discreta a moderada disgranulopoiese (neutrófilos tóxicos +, bastonetes gigantes) SMega: não foram observados elementos da série SLMP: nada digno de nota População de blastos com intensa basofilia citoplasmática, cromatina condensada, com 2-3 nucléolos evidentes de provável origem linfóide correspondendo a 3,25% das células nucleadas da amostra Conclusão: avaliação de celularidade comprometida. Presença de população blástica linfóide correspondendo a 3,25% das células nucleadas da amostra, além de discreta diseritropoiese e moderada disgranulopoiese
10	Impossível obtenção de amostra – aspirado de MO seco
11	Relação Mielóide : Eritróide = 1,7 SE: normoplasia de série. Discreta diseritropoiese (figuras mitose atípica) SM: normoplasia de série. Discreta a moderada disgranulopoiese (figuras mitose atípica, assincronia maturação N:C) SMega: normoplasia de série SLMP: macrófagos com intensa atividade Presença de raras células mesenquimais e reticulares. Presença de raros blastos de provável origem linfóide (2,25%) com moderada anisocitose, citoplasma intensamente basofílico, cromatina grosseira, 2-4 nucléolos pouco evidentes Conclusão: MO ligeiramente hipercelular em relação à idade. Discreta dishematopoiese. Raros blastos linfóides

MO – medula óssea; SE – série eritróide; N:C – núcleo:citoplasma; SM – série mielóide; SMega – série megacariocítica; SLMP – série linfóide-monocitóide-plasmocítica

Apêndice G – Avaliação dos mielogramas relativos aos animais com linfoma multicêntrico do grupo experimental com anemia- São Paulo – 2008 a 2009.

(continua)

Animal	Avaliação
12	Relação Mielóide : Eritróide = 2,2 SE: normoplasia de série. Discreta diseritropoiese (assincronia maturação N:C, figuras mitose atípica) SM: normoplasia de série. Moderada disgranulopoiese (retardo escala maturação, acúmulo de mielócitos e monoblastos, assincronia de maturação N:C, neutrófilos tóxicos +, figuras mitose atípica) SMega: normoplasia de série. Discreta a moderada dismegapoiese (núcleos dispersos) SLMP: moderada quantidade de macrófagos com intensa atividade Presença de pequena quantidade de células reticulares e mesenquimais. Raros blastos morfologicamente não classificáveis (1,5%) Conclusão: MO hipercelular. Raros blastos (dishematopoiese?)
13	Relação Mielóide : Eritróide = 2,3 SE: normoplasia de série SM: normoplasia de série. Discreta a moderada disgranulopoiese (neutrófilos tóxicos ++) SMega: normoplasia de série. Sem alterações morfológicas ou na escala de maturação SLMP: macrófagos normais. Presença de pequena quantidade de blastos não classificáveis, possivelmente de origem linfóide (3,25%) Conclusão: MO hipercelular em relação à idade. Formação em rouleaux. Disgranulopoiese e blastos de possível origem linfóide

MO – medula óssea; SE – série eritróide; N:C – núcleo:citoplasma; SM – série mielóide; SMega – série megacariocítica; SLMP – série linfóide-monocitóide-plasmocítica

Apêndice G – Avaliação dos mielogramas relativos aos animais com linfoma multicêntrico do grupo experimental com anemia- São Paulo – 2008 a 2009.

(conclusão)

Animal	Avaliação
14	Relação Mielóide : Eritróide = 1,3 SE: normoplasia de série SM: normoplasia de série. Discreta a moderada disgranulopoiese (retardo na escala de maturação na fase mielócito-promielócito, neutrófilos tóxicos +) SMega: discreta hiperplasia de série. Sem alterações na escala de maturação ou morfologia SLMP: discreta a moderada quantidade de macrófagos, com grande quantidade de depósito de ferro intracitoplasmático. Presença de população linfóide, predominantemente blastos, de tamanho médio, com um grande nucléolo ou múltiplos nucléolos, relação N:C variável e citoplasma intensamente basofílico, representando 11% das células nucleadas da amostra Conclusão: MO hipercelular em relação à idade. Discreta disgranulopoiese, com infiltração de população linfóide representando 11% das células nucleadas da amostra

MO – medula óssea; SE – série eritróide; N:C – núcleo:citoplasma; SM – série mielóide; SMega – série megacariocítica; SLMP – série linfóide-monocitóide-plasmocítica

Apêndice G – Avaliação dos mielogramas relativos aos animais com linfoma multicêntrico do grupo experimental com anemia- São Paulo – 2008 a 2009.

Animal	Avaliação
1	Impossível obtenção de amostra – aspirado de MO seco
2	Impossível obtenção de amostra – paciente com distrição respiratória grave o que impossibilitou procedimento anestésico para colheita
3	Relação Mielóide : Eritróide = 2,2 SE: normoplasia. Diseritropoiese (assincronia maturação N:C, mitose atípica) SM: normoplasia. Disgranulopoiese (retardo na escala maturação fase mielócito-metamielócito, neutrófilos tóxicos ++) SMega: normoplasia. Dismegapoiese (assincronia maturação N:C, núcleos dispersos) SLMP: aumento de plasmócitos, células linfóides pequenas com 1 grande nucléolo, presença de blastos não classificáveis Conclusão: MO normocelular. População de blastos de provável origem linfóide correspondendo 7,75%. Moderada mielodisplasia
4	Relação Mielóide : Eritróide = 2,1 SE: hipoplasia relativa de série SM: hiperplasia moderada relativa de série. Discreta disgranulopoiese (assincronia maturação N:C, neutrófilos tóxicos +) SMega: normoplasia. Discreta dismegapoiese (núcleos desnudos, assincronia maturação N:C) SLMP: macrófagos com intensa atividade, aumento de monócitos Conclusão: MO normocelular. Presença de blastos não classificáveis em pequena quantidade. Discreta a moderada mielodisplasia

MO – medula óssea; SE – série eritróide; N:C – núcleo:citoplasma; SM – série mielóide; SMega – série megacariocítica; SLMP – série linfóide-monocitóide-plasmocítica

Apêndice H – Avaliação dos mielogramas relativos aos animais com linfoma multicêntrico do grupo experimental sem anemia. anemia - São Paulo - 2008 a 2009.

(continua)

Animal	Avaliação
5	Relação Mielóide : Eritróide = 1,77 SE: normoplasia de série. Moderada diseritropoiese (assincronia maturação N:C, figuras de mitose atípica) SM: normoplasia de série. Moderada disgranulopoiese (assincronia maturação N:C, neutrófilos tóxicos ++) SMega: hiperplasia de série. Sem alterações na escala de maturação SLMP: macrófagos em quantidade e atividade normal. Presença de população blástica não classificável de provável origem linfóide representando 4% das células nucleadas da amostra Conclusão: MO hipercelular em relação à idade. Depósitos de ferro adequados e compatíveis com a idade. Presença de população blástica de provável origem linfóide representando 4% das células nucleadas da amostra
6	Relação Mielóide : Eritróide = 1,55 SE: normoplasia de série SM: normoplasia de série. Discreta disgranulopoiese (neutrófilos tóxicos ++) SMega: discreta hiperplasia de série. Sem alterações morfológicas ou na escalação de maturação SLMP: aumento da população de macrófagos, com grande aumento dos depósitos de ferro intracitoplasmáticos e figuras de eritrofagocitose. Presença de raros blastos não classificáveis (2%) Conclusão: MO normocelular, com discreta disgranulopoiese / dishematopoiese. Grande quantidade de macrófagos com grande quantidade de depósitos de ferro e 2% de blastos não classificáveis

MO – medula óssea; SE – série eritróide; N:C – núcleo:citoplasma; SM – série mielóide; SMega – série megacariocítica; SLMP – série linfóide-monocitóide-plasmocítica

Apêndice H – Avaliação dos mielogramas relativos aos animais com linfoma multicêntrico do grupo experimental sem anemia - São Paulo - 2008 a 2009.

(continua)

Animal	Avaliação
7	Relação Mielóide : Eritróide = 2,2 SE: relativa hipoplasia de série. Discreta diseritropoiese (assincronia maturação N:C) SM: relativa hipoplasia de série. Moderada a intensa disgranulopoiese (retardo na escala maturação na fase promielócito-mielócito, assincronia maturação N:C, neutrófilos tóxicos ++) SMega: hiperplasia discreta de série. Sem alterações morfológicas SLMP: macrófagos com intensa atividade, inclusive figuras de eritrofagocitose. Presença de raros linfoblastos Conclusão: MO normocelular. Dishematopoiese com moderada a intensa disgranulopoiese
8	Relação Mielóide : Eritróide = 1,7 SE: normoplasia de série SM: normoplasia de série. Discreta disgranulopoiese (neutrófilos tóxicos +) SMega: discreta hiperplasia SLMP: presença de blastos não classificáveis (2,25%). Displasia? Conclusão: Avaliação de celularidade comprometida devido ausência de grumos na amostra. Presença de população de blastos não classificáveis, correspondendo a 2,25% das células nucleadas da amostra, sugestivos de dishematopoiese

MO – medula óssea; SE – série eritróide; N:C – núcleo:citoplasma; SM – série mielóide; SMega – série megacariocítica; SLMP – série linfóide-monocitóide-plasmocítica

Apêndice H – Avaliação dos mielogramas relativos aos animais com linfoma multicêntrico do grupo experimental sem anemia - São Paulo - 2008 a 2009.

(conclusão)

Animal	Avaliação
9	Relação Mielóide : Eritróide = 2,3 SE: hipoplasia relativa de série. Discreta a moderada diseritropoiese (figuras de mitose atípica, assincronia maturação N:C) SM: normoplasia de série. Moderada disgranulopoiese (neutrófilos tóxicos +++, figuras mitose atípica, assincronia maturação N:C) SMega: discreta hiperplasia de série. Dismegapoiese (núcleos dispersos, anisonucleólise) SLMP: moderada quantidade de macrófagos com intensa atividade citoplasmática e grande quantidade de depósitos de ferro intracitoplasmáticos. Presença de população de blastos de provável origem linfóide (2,75%), com relação N:C variável a média, citoplasma intensamente basofílico, cromatina frouxa com 1 grande nucléolo evidente ou 2-3 nucléolos evidentes. Presença de pequena quantidade de células mesenquimais dispersas Conclusão: MO hipercelular com relação à idade. Moderada dishematopoiese. Presença de população de blastos de provável origem linfóide representando 2,75% da população de células nucleadas da amostra
10	Relação Mielóide : Eritróide = 1,3 SE: normoplasia de série. Discreta a moderada diseritropoiese (figuras de mitose atípica) SM: normoplasia de série. Moderada disgranulopoiese (figuras de mitose atípica, retardo na escala de maturação – acúmulo de mieloblastos, promielócitos e monoblastos, neutrófilos tóxicos +, bastonetes gigantes) SMega: discreta hiperplasia de série, sem alterações morfológicas ou na escala de maturação SLMP: presença de população de blastos morfologicamente não classificáveis de origem mielóide e alguns de origem linfóide Conclusão: MO hipercelular. Moderada dishematopoiese, raros blastos de provável origem linfóide

MO – medula óssea; SE – série eritróide; N:C – núcleo:citoplasma; SM – série mielóide; SMega – série megacariocítica; SLMP – série linfóide-monocitóide-plasmocítica

Apêndice H – Avaliação dos mielogramas relativos aos animais com linfoma multicêntrico do grupo experimental sem anemia – São Paulo – 2008 a 2009.