

Quantificação de subpopulações linfocitárias no sangue periférico de cães sadios adultos¹

Lucas A.S. Santana^{2*}, Fabiana R. Morais³, André M. Santana⁴, Fabiana A. Voorwald⁴ e Aureo E. Santana⁴

ABSTRACT- Santana L.A.S., Morais F.R., Santana A.M., Voorwald F.A. & Santana A.E. 2017. [Lymphocyte subsets in peripheral blood of adult healthy dogs.] Quantificação de subpopulações linfocitárias no sangue periférico de cães sadios adultos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 37(7):754-758. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP 14884-900, Brazil. E-mail: luckyvet01@hotmail.com

Flow cytometry has established itself as a useful tool in veterinary practice, particularly for small animals practice. Such knowledge has made necessary the establishment of physiological values for different lymphocyte subpopulations, indispensable to understanding the dynamics of lymphoid cellularity in various pathological conditions. In this sense, the objective of this study was to determine, through cytometric technique, lymphocyte subsets of CD5⁺CD4⁺, CD5⁺CD8⁺ and CD21⁺ in four different breeds of domestic dogs, so to add information about the immunological profile of different breeds. A total of 40 adult dogs were used (2-7 years), being males and females of Beagles (G1, n=10), Golden Retrievers (G2, n=10), English Bulldogs (G3, n=10) and crossbreed dogs (G4, n=10). Blood samples were collected by jugular venipuncture, using vacuum flasks system (K2-EDTA). Hemogram and processing of samples for flow cytometry were performed within a maximum of 24 hours after blood collection. Samples were analyzed using FACSCanto device (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). FACSDiva software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) was used to identify and quantify the CD5⁺ CD4⁺, CD5⁺CD8⁺, and CD21⁺, which provided the histogram and the respective table with the number of cells identified by immunophenotyping. The data obtained for T helper lymphocyte count, T cytotoxic/suppressor lymphocyte count and B lymphocytes were tabulated and submitted to analysis of variance by F test. Tukey test at 5% probability was used to compare means between the different breeds of dogs. The average values for CD5⁺CD8⁺ cell count in peripheral blood in G1, G2, G3 and G4 were of 155, 206, 544 and 503 cells/uL, respectively. The average values for CD5⁺CD4⁺ cell count in peripheral blood in G1, G2, G3 and G4 were of 746, 642, 855 and 1101 cells/uL, respectively. The average values for CD21⁺ cell count in peripheral blood for G1, G2, G3 and G4 were of 171, 299, 494 and 403 cells/uL, respectively. Therefore, The average number of cells obtained for the subsets of cytotoxic T lymphocytes was significantly higher (p<0,05) in the British Bulldogs and crossbreed dogs compared to those found in Beagles and Golden Retrievers. Furthermore, it was observed that the average number of cells obtained for the subsets of B lymphocytes was significantly higher (p<0,05) in English Bulldogs compared to that of Beagles.

INDEX TERMS: Dogs, flow cytometry, lymphocytes.

¹ Recebido em 3 de maio de 2016.

Aceito para publicação em 9 de dezembro de 2016.

² Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP 14884-900, Brasil. *Autor para correspondência: luckyvet01@hotmail.com

³ Laboratório de Citometria de Fluxo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP), Av. Bandeirantes 3900, Vila Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP 14040-900, Brasil.

⁴ Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP 14884-900, Brasil.

RESUMO. A citometria de fluxo vem se firmando como uma ferramenta útil na prática médico-veterinária, particularmente na clínica de pequenos animais. Tal conhecimento tem ensejado o estabelecimento de valores fisiológicos para diferentes subpopulações linfocitárias, indispensáveis à compreensão da dinâmica da celularidade linfóide, em diversas situações patológicas. Assim sendo, o presente ensaio teve como objetivo imunomarcá-las, por intermédio da técnica citométrica, as subpopulações linfocitárias CD5⁺CD4⁺, CD5⁺CD8⁺ e CD21⁺, em quatro diferentes raças de cães domésticos e saudáveis, de tal forma a agregar informações sobre o perfil imunológico das diferentes raças. Foram utilizados 40 cães adultos (2-7 anos), machos e fêmeas, das raças Beagle (G1, n=10), Golden Retriever (G2, n=10), Bulldog Inglês (G3, n=10) e sem raça definida (SRD) (G4, n=10). As colheitas de sangue foram realizadas por venipunção jugular, utilizando-se sistema de frascos a vácuo (K₂-EDTA). O hemograma e o processamento das amostras para citometria de fluxo foram realizados num prazo máximo de 24 horas após a colheita do sangue. As amostras foram analisadas no citofluorômetro FACSCANTO (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Utilizou-se o programa FACS-Diva (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), para identificar e quantificar as células CD5⁺CD4⁺, CD5⁺CD8⁺ e CD21⁺, que forneceu o histograma e respectiva tabela com a quantidade de células detectadas pela imunofenotipagem. Os dados obtidos para contagem de linfócitos T auxiliares, T citotóxicos/supressores e linfócitos B foram tabulados e submetidos a Análise de Variância pelo teste F. O teste de Tukey a 5% de probabilidade foi utilizado para comparação das médias entre as diferentes raças de cães. Os valores médios de contagens de células CD5⁺CD8⁺ no sangue periférico do G1, G2, G3 e G4 foram de 155, 206, 544 e 503 células/μL, respectivamente. Os valores médios de contagens de células CD5⁺CD4⁺ no sangue periférico do G1, G2, G3 e G4 foram de 746, 642, 1101 e 855 células/μL, respectivamente. Os valores médios de contagens de células CD21⁺ no sangue periférico do G1, G2, G3 e G4 foram de 171, 299, 494 e 403 células/μL, respectivamente. Assim sendo, o número médio de células obtido para a subpopulação de linfócitos T citotóxicos foi significativamente maior (p<0,05) nos Bulldogs Ingleses e cães SRD, comparativamente aqueles encontrados nos grupos de Beagles e Golden Retrievers. Ademais, observou-se que o número médio de células obtido para a subpopulação de linfócitos B foi significativamente maior (p<0,05) nos Bulldogs Ingleses, quando comparado àquele dos Beagles.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Cães, citometria de fluxo, linfócitos.

INTRODUÇÃO

A citometria de fluxo vem se firmando como uma ferramenta útil na prática médico-veterinária, particularmente na clínica de pequenos animais. Tal conhecimento tem ensejado o estabelecimento de valores fisiológicos para diferentes subpopulações linfocitárias, indispensáveis à compreensão da dinâmica da celularidade linfóide, em diversas situações patológicas (Faldyna et al. 2001, Rout & Avery 2016).

A fenotipagem de linfócitos, obtida por intermédio da citometria de fluxo, tem sido empregada no estudo de subpopulações linfocitárias na vigência de alguns estados patológicos e/ou nas alterações do sistema imune (Aniolek et al. 2014, Avery et al. 2014, Fogle et al. 2015). Na prática médico-veterinária essa técnica tem sido utilizada para avaliar a progressão das infecções pelos vírus da Imunodeficiência Felina e da Leucemia Felina, na resposta de transplantes de órgãos, em modelos experimentais caninos, bem como na resposta imune a infecções (Byrne et al. 2000, Dias 2003, Nakage & Santana 2006, Nakage et al. 2009). Anticorpos monoclonais que reconhecem linfócitos têm sido úteis no diagnóstico e avaliação da imunodeficiência, na terapia imunossupressora em transplantes de órgãos e doenças imunes, e na quimioterapia de leucemias e linfomas (Rivas et al. 1996, Coleta 2009, Miotto 2009).

Os anticorpos monoclonais são os marcadores de escolha para a citometria de fluxo devido a sua especificidade, reação cruzada mínima e reprodutibilidade (Keren 1994). De outra parte, anticorpos monoclonais não são totalmente sensíveis ou específicos, portanto é recomendado o uso de dois ou mais marcadores para a determinação de linhagem celular (Carey & Hanson 1994).

Neste sentido, e na expectativa de contribuir com os estudos precedentes, idealizou-se este ensaio com o escopo de quantificar as subpopulações linfocitárias CD5⁺CD4⁺, CD5⁺CD8⁺ e CD21⁺, por intermédio da técnica citométrica, utilizando-se de anticorpos monoclonais, em cães domésticos e saudáveis, de tal forma a agregar informações sobre o perfil imunológico das diferentes raças.

MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, *Campus* de Jaboticabal, sob o protocolo número 027747/11, estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Foram utilizados 40 cães adultos, com idades que variavam de dois a sete anos, machos ou fêmeas, das raças Beagle, Golden Retriever, Bulldog Inglês e SRD, distribuídos em quatro grupos, sendo dez cães por grupo experimental. O estado de saúde foi confirmado previamente ao início do experimento por meio de exames físicos, hematológicos e coproparasitológicos.

As colheitas de sangue foram realizadas por venipunção jugular, utilizando-se sistema de frascos a vácuo, contendo ácido etilenodiaminotetracético dipotássico (K₂-EDTA). O hemograma e o processamento das amostras para citometria de fluxo foram realizados imediatamente após a colheita das mesmas. Os anticorpos monoclonais selecionados para a presente pesquisa encontram-se caracterizados no Quadro 1.

A fim de avaliar a melhor concentração de anticorpo para utilização na citometria de fluxo, concentrações crescentes de cada anticorpo utilizado foram acrescidas a um volume fixo de sangue, proveniente de um cão em boas condições de saúde. Para tal finalidade foram empregadas concentrações crescentes de anticorpo (2, 5 e 10 μL) em um volume de 100 μL de sangue.

As amostras foram processadas utilizando-se de cinco tubos falcon, preparados como descrito no Quadro 2. Os estudos citofluorométricos foram realizados num prazo máximo de 24 horas após a colheita do sangue. As amostras eram homogêneas e

Quadro 1. Características dos anticorpos monoclonais utilizados para imunofenotipagem de linfócitos por citometria de fluxo

Molécula	Fluorescência	Nome do anticorpo	Tipo Celular	Fabricante
Rat anti dog CD5 IgG2a	Alexa Fluor®647	MCA1037A647	Linfócitos T	Serotec
Rat anti dog CD4 IgG2a	Alexa Fluor®647	MCA1212A647	Isotipo controle	Serotec
Rat anti dog CD8 IgG1	PE	MCA1038PE	Linfócitos T helper	Serotec
Mouse anti dog CD21 IgG1	PE	MCA1124PE	Isotipo controle	Serotec
	FITC	MCA1039F	Linfócitos T citotóxicos	Serotec
	FITC	MCA1123F	Isotipo controle	Serotec
	PE	MCA1781PE	Linfócitos B	Serotec
	PE	MCA928PE	Isotipo controle	Serotec

Quadro 2. Preparação das amostras para análise citométrica

Tubo	Amostra	Volume	Anticorpos	Fluorescência
1	100µL	-	-	-
2	100µL	2µL	IgG2a	Alexa Fluor®647
		2µL	IgG2a	PE
		2µL	IgG1	FITC
3	100µL	2µL	Anti-CD5	Alexa Fluor®A647
		2µL	Anti-CD4	PE
		2µL	Anti-CD8	FITC
4	100µL	2µL	IgG1	PE
5	100µL	2µL	Anti-CD21	PE

Quadro 3. Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para contagens de células CD5+CD8+, CD5+CD4+ e CD21+, por meio da citometria de fluxo, no sangue periférico de Beagles (G1), Golden Retrievers (G2), Bulldogs Ingleses (G3) e cães sem raça definida (SRD) (G4)

Grupos	CD5+CD8+ (células/µL)		CD5+CD4+ (células/µL)		CD21+ (células/µL)	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
G1	155,00 ^B	74,33	746,00 ^A	253,8	171,00 ^B	65,4
G2	206,00 ^B	103,58	642,00 ^A	150,63	299,00 ^{AB}	149,22
G3	544,00 ^A	184,84	1101,00 ^A	433,48	494,00 ^A	386,23
G4	503,00 ^A	311,29	855,00 ^A	559,46	403,00 ^{AB}	342,21

Médias de uma mesma coluna seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) e estabelecem a comparação entre grupos.

os tubos incubados no escuro, em temperatura ambiente, por 20 minutos. Um mililitro de tampão de lise de hemácias (FACS - Lysing Solution - Becton Dickinson) era adicionado em cada tubo e, novamente, as amostras eram homogeneizadas e incubadas por dez minutos, à temperatura ambiente, no escuro. Posteriormente era realizada a lavagem do material com solução salina tamponada com fosfato 0,01M pH entre 7,4 e 7,6 (PBS) por três vezes, adicionando-se dois mililitros de PBS por lavagem. Após as lavagens, eram adicionados 0,2 mL de solução de formol a 1% em salina tamponada com fosfato 0,01M pH entre 7,4 e 7,6 (PBS).

As amostras foram analisadas no citofluorômetro FACSCAN-TO (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Utilizou-se o programa FACSDiva (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), para identificar e quantificar as células CD5+CD4+, CD5+CD8+ e CD21+, que forneceu o histograma e respectiva tabela com a quantidade de células detectadas pela imunofenotipagem.

As contagens de CD5+CD4+/µL, CD5+CD8+/µL e CD21+/µL, foram estabelecidas pela seguinte fórmula: Subpopulação linfocitária = n° de eventos (%) x contagem absoluta de linfócitos/100. Sendo: Número de eventos = contagens de células positivas para CD5+CD8+, CD5+CD4+ ou CD21+.

Os dados obtidos para contagem de linfócitos T auxiliares, T citotóxicos/suppressores e linfócitos B foram tabulados e subme-

tidos a Análise de Variância pelo teste F. O teste de Tukey a 5% de probabilidade foi utilizado para comparação das médias entre as diferentes raças de cães. As análises foram realizadas no programa estatístico Statistical Analysis System (SAS/STAT® User's Guide, 2009).

RESULTADOS

Os valores médios das contagens de células CD5+CD8+, no sangue periférico, de Beagles, Golden Retrievers, Bulldogs Ingleses e cães sem raça definida (SRD) foram de 155, 206, 544 e 503 células/µL, respectivamente. As contagens médias de células CD5+CD4+, no sangue periférico, dos cães das respectivas raças foram de 746, 642, 1101 e 855 células/µL. Já as contagens médias de células CD21+, no sangue periférico, de Beagles, Golden Retrievers, Bulldogs Ingleses e cães sem raça definida (SRD) foram de 171, 299, 494 e 403 células/µL. Os valores e os desvios-padrão obtidos para as contagens de células CD5+CD4+, CD5+CD8+ e CD21+, por intermédio da citometria de fluxo, nos quatro grupos de cães avaliados, estão apresentados no Quadro 3. Observou-se que o número médio de células obtido para a subpopulação de linfócitos T citotóxicos foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos Bulldogs Ingleses e cães SRD, comparativamente aqueles encontrados nos Beagles e Golden Retrievers. Ademais, observou-se que o número médio de células obtido para a subpopulação de linfócitos B foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos Bulldogs Ingleses, quando comparado àquele dos Beagles.

DISCUSSÃO

Como definido em 1993, no "First Canine Leukocyte Antigen Workshop", para a identificação das células pant-T deve-se utilizar como marcador de superfície o CD5; para os linfócitos T auxiliares, o CD4; para os linfócitos T citotóxicos, o CD8; e, finalmente, para os linfócitos B, o CD21 (Cobbold & Metcalfe 1994). Tais recomendações foram acatadas para a escolha dos anticorpos monoclonais utilizados neste experimento. O protocolo de dupla marcação e os fluorocromos utilizados no presente ensaio mostraram-se eficientes para que houvesse uma seleção específica das diferentes subpopulações linfocitárias analisadas.

A preparação das amostras para posterior análise no citômetro de fluxo foi feita através da lise do sangue total. Esse é o método de escolha, particularmente em medicina de pequenos animais, onde a quantidade de sangue disponível para análise é limitado ao tamanho do animal e seu estado de saúde (Faldyna et al. 2001).

No presente estudo, as amostras de sangue foram processadas para análise citofluorométrica em até duas horas após a colheita. Faldyna et al. (2001) avaliaram a influência do tempo de armazenamento na distribuição das subpopulações linfocitárias e não encontraram efeitos significativos quando as amostras foram armazenadas a 4°C por 12 a 16 horas antes do processamento. Resultados similares foram obtidos por Shield et al. (1983) e Nicholson et al. (1984). Por outro lado, muitos autores relataram mudanças resultantes do armazenamento das amostras de sangue (Weiblen et al. 1984, Ekong et al. 1992). Muitas dessas mudanças podem ser explicadas, pelo menos em parte, pela contaminação do "gate" de linfócitos por neutrófilos (Van Lambalgen & Van Meurs 1985). Lloyd et al. (1995) não detectaram mudanças em amostras de sangue ovino armazenado em temperatura ambiente por 48 horas.

Neste ensaio, foram utilizados cães adultos com idades que variavam de 2 a 7 anos. Faldyna et al. (2001) asseveraram que a porcentagem de linfócitos B no sangue periférico de cães neonatos é alta e tende a diminuir com a idade. Os mesmos autores não encontraram relação entre a porcentagem de linfócitos T CD4⁺ com a idade de cães.

Em nosso estudo, observou-se que o número médio de células obtido para a subpopulação de linfócitos T citotóxicos foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos Bulldogs Ingleses e em cães SRD, comparativamente aqueles encontrados nos Beagles e Golden Retrievers. Ademais, observou-se que o número médio de células obtido para a subpopulação de linfócitos B foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos Bulldogs, quando comparado àquele dos Beagles. A Federação Cinológica Internacional reconhece 330 raças de cães e muitas delas apresentam uma predisposição racial ou uma maior prevalência de doenças nas quais o sistema imune está envolvido (Day 2000). É possível que existam diferenças entre as raças na atividade do sistema imune.

Chabanne et al. (1995) e Denerolle et al. (1998) ressaltam que a piodermite em Pastores Alemães pode levar a uma redistribuição das subpopulações linfocitárias nesses animais. Os citados autores asseveraram que a baixa contagem combinada com a reduzida atividade de linfócitos circulantes, nesses cães, pode levar à maior susceptibilidade dos mesmos à enfermidade.

Muitos cães braquicefálicos são afetados por vários tipos de obstrução, no entanto, os sinais clínicos dependem da intensidade da oclusão do fluxo aéreo nas vias aéreas superiores, podendo variar de suaves a severos, incluindo respiração ruidosa, estridores e estertores, tosse, alteração vocal, tentativas de vômito, engasgos, espirros reversos, intolerância ao exercício, dispnéia, mucosas pálidas ou cianóticas, agonia respiratória e síncope. Esses animais, em sua maioria, não conseguem regular sua temperatura corporal podendo haver hipertermia, e cuja sintomatologia pode se agravar em temperaturas ambientais elevadas (Vadillo 2007).

Diante das considerações pode-se inferir que a maior susceptibilidade dos Bulldogs Ingleses, assim como a maior exposição dos cães SRD, aos antígenos presentes no meio ambiente, contribuiu para as diferenças observadas entre as subpopulações linfocitárias dos cães presentes no ensaio.

Considerando-se os resultados obtidos no presente trabalho, bem como as condições de desenvolvimento de suas etapas experimentais, concluiu-se que cães SRD e Bulldogs Ingleses apresentam maiores contagens de linfócitos T CD5⁺CD8⁺ (citotóxicos) quando comparados com Beagles e Golden Retrievers e que Bulldogs Ingleses apresentam maiores contagens de linfócitos B quando comparados com Beagles.

Acknowledgments.- Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

- Aniolek O., Gajewski Z. & Gizinski S. 2014. Application of flow cytometry in diagnosing lymphomas in dogs and cats. *Cent. Eur. J. Immunol.* 39(3):327-330.
- Avery P.R., Burton J., Bromberek J.L., Seelig D.M., Elmslie R., Correa S., Ehrhart E.J., Morley P.S. & Avery A.C. 2014. Flow Cytometric Characterization and Clinical Outcome of CD4⁺ T-Cell Lymphoma in Dogs: 67 Cases. *J. Vet. Intern. Med.* 28(2):538-546.
- Byrne K.M., Kim H.W., Chew B. & Hayek M.G. 2000. A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline bloodlymphocytes. *Vet. Immunol. Immunop.* 73(2):167-182.
- Carey J.L. & Hanson C.A. 1994. Flow cytometry analysis of leukemia and lymphoma. In: Keren D.F., Hanson C.A. & Hurtubise P.E. Flow cytometry and clinical diagnosis. American Society of Clinical Pathologists, Chicago, p.197-308.
- Chabanne L., Marchal T., Denerolle P., Magnol J.P., Fournel C., Monier J.C. & Rigal D. 1995. Lymphocyte subset abnormalities in German shepherd dog pyoderma (GSP). *Vet. Immunol. Immunop.* 49(3):189-198.
- Cobbold S. & Metcalfe S. 1994. Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: summary of the first canine antigen workshop (CLAW). *Tissue Antigens* 43(3):137-154.
- Coleta F.E.D. 2009. Avaliação hematológica e imunofenotípica de cães com linfoma. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 97p.
- Day M.J. 2000. Biology of lymphocytes and plasma cells, p.240-246. In: Feldman B.F., Zinkl J.G. & Jain N.C. (Eds), Schalm's Veterinary Hematology. Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Denerolle P., Bourdoiseau G., Magnol J.P., Ulpat C. & Chabanne L. 1998. German Shepherd dog pyoderma: a prospective study of 23 cases. *Vet. Dermatol.* 9(4):243-248.
- Dias M.A. 2003. Hemograma, citofluorometria de subpopulações linfocitárias e histologia de baço e linfonodos de cães hípidos tratados com doxorubicina. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 85p.
- Ekong T., Hill A.M., Gompels M., Brown A. & Pinching A.J. 1992. The effect of the temperature and duration of sample storage on the measurement of lymphocyte subpopulations from HIV-1-positive and control subjects. *J. Immunol. Methods* 151(1/2):217-225.
- Faldyna M., Levá, L., Knötigová P. & Toman M. 2001. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs: a flow cytometric study. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 82(1/2):23-37.
- Fogle J.E., Tarigo J.L., Thalheim L., Williams L.E., English L.B. & Suter S.E. 2015. CD45⁺ and CD45⁻ lymphocyte populations identified by flow cytometry from dogs with lymphoma exhibit similar morphology and the same clonal (B cell or T cell) lineage. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 168(3/4):242-248.
- Keren D.F. 1994. History and evolution of surface marker assays. In: Keren D.F., Hanson C.A. & Hurtubise P.E. (Eds), Flow cytometry and clinical diagnosis. American Society of Clinical Pathologists, Chicago, 362p.
- Lloyd J.B., Gill H.S. & Husband A.J. 1995. The effect of storage on immunophenotyping of sheep peripheral blood lymphocytes by flow cytometry. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 47(1/2):135-142.

- Miotto M.R. 2009. Expressão de CD45⁺ na medula óssea e sangue periférico de cães com linfoma tratados com alta dose de ciclofosfamida suportada por transplante autólogo de medula óssea. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 69p.
- Nakage A.P.M, Santana A.E., Cápua M.L.B. & Godoy A.V. 2009. Quantificação de células CD34⁺ do sangue do cordão umbilical de cães. *Ciência Rural* 39(2):434-441.
- Nakage A.P.M. & Santana A.E. 2006. Células-tronco hematopoéticas em cães. *Ciência Rural* 36(1):325-329.
- Nicholson J.K.A., Jones B.M., Cross J.D. & McDougal J.S. 1984. Comparison of T and B cell analysis on fresh and aged blood. *J. Immunol. Methods* 73(1):29-40.
- Rivas A.L., Letwin B., Greenlee P., López J., Fadden M. & Quimby F. 1996. Characterization of monoclonal antibodies directed to canine T lymphocyte markers expressed during development. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 51(1/2):1-11.
- Rout E.D. & Avery P.R. 2016. Lymphoid neoplasia: correlations between morphology and flow cytometry. *Vet. Clin. N. Am. Small Anim. Pract.* DOI: 10.1016/j.cvsm.2016.07.004.
- SAS Institute Inc. 2009. SAS/STAT® 9.2 User's Guide. 2nd ed. SAS Institute Inc., Cary, NC:
- Shield 3rd C.F., Marlett P, Smith A., Gunter L. & Goldstein G. 1983. Stability of human lymphocyte differentiation antigens when stored at room temperature. *J. Immunol. Methods* 62(3):347-352.
- Vadillo A.C. 2007. Síndrome braquicefálica e paralisia laríngea em cães, p.93-98. In: Alonso J.A.M. (Ed.), *Enfermidades Respiratórias em Pequenos Animais*. Interbook, São Caetano do Sul, SP.
- Van Lambalgen R. & Van Meurs G.J. 1985. Lymphocytes subpopulations do not alter during blood storage at 4°C. *J. Immunol. Methods* 80(1):39-43.
- Weiblen B.J., Debell K., Giorgio A. & Valeri C.R. 1984. Monoclonal antibody testing of lymphocytes after overnight storage. *J. Immunol. Methods* 70(2):179-183.