

IMUNOFENOTIPAGEM DE LINFÓCITOS DE UMA CADELA COM LINFOMA SUBMETIDA À QUIMIOTERAPIA E TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE MEDULA ÓSSEA – RELATO DE CASO

Flávia Eiras Dela Coleta¹, Maria Luisa Buffo de Cápuia¹, Mariana Rodrigues Miotto², Luís Gustavo Silva Monnazzi³, Alessandro Galhardo⁴, Sabryna Gouveia Calazans⁵, Aline Vieira de Godoy⁵, Áureo Evangelista Santana⁶, Carlos Roberto Daleck⁶.

RESUMO

No presente estudo foram realizadas análises citométricas de subpopulações linfocitárias do sangue periférico de uma cadela da raça Rottweiler, três anos de idade, pesando 34,3kg, acometida por linfoma e submetida ao protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin pelo período de 11 semanas e subsequente transplante autólogo de medula óssea. Foram avaliadas as sub-populações linfocitárias CD5⁺4⁺, CD5⁺8⁺ e CD45⁺21⁺ antes de cada sessão quimioterápica e nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea. As análises permitiram observar o comportamento das sub-populações linfocitárias frente aos tratamentos, permitindo a observação de períodos de imunossupressão e de recuperação hematopoética e imunológica após o transplante autólogo de medula óssea.

Palavras-chave: Imunofenotipagem, linfoma, transplante autólogo de medula óssea; cão.

INTRODUÇÃO

Linfomas são neoplasias malignas caracterizadas pela proliferação de células originárias do tecido linfóide como linfócitos, histiócitos e seus precursores e derivados (COTRAN et al., 1994).

O diagnóstico definitivo pode ser baseado na citologia aspirativa de linfonodos bem como na

histopatologia dos mesmos. Estas técnicas fornecem informações importantes quanto às diferentes classificações, porém somente a imunofenotipagem de linfócitos permite a classificação do linfoma quanto à origem celular (COSTA et al., 2005).

Este procedimento é uma aplicação comum da citometria de fluxo em imunohematologia de seres humanos, e tem sido utilizada para estudar os efeitos de doenças e modificações do sistema imune nas populações de linfócitos (BYRNE et al., 2000).

Em relação aos anticorpos monoclonais que marcam os antígenos leucocitários caninos, estes foram definidos durante o “Primeiro Workshop Internacional de Antígeno Leucocitário Canino” (FIRST CLAW – First Canine Leukocyte Antigen Workshop), ocorrido em Cambridge U.K., em 1993 (COBBOLD; METCALFE, 1994). No supracitado Workshop, definiu-se o CD5 como principal marcador de superfície para células linfocitárias pan-T caninas, o CD4 como marcador de linfócitos T auxiliares e o CD8 como marcador de linfócitos T citotóxicos (COBBOLD; METCALFE, 1994). De acordo com Byrne et al. (2000), os linfócitos B de cães, diferentemente daqueles de humanos e de roedores, não expressam CD5. Portanto, o CD5 canino deve ser utilizado como marcador para células pan-T. A detecção do CD21 é frequentemente empregada no diagnóstico de linfoma de célula B e leucemia linfocítica de origem B (VERNAU, 2004). O CD45 é utilizado para o diagnóstico diferencial entre linfomas e tumores metastáticos (BRAYLAN, 2002).

¹ Médica Veterinária. Doutoranda. FCAV/UNESP – Jaboticabal-SP. Rua José Ferrari Segundo, 720 – Vila Velosa – Araraquara/SP/ Brasil - Fone: (16) 97079551 - flaviacoleta@uol.com.br.

² Médica Veterinária. Mestranda. FCAV/UNESP – Jaboticabal-SP.

³ Médico Veterinário. Doutor. FCFAR/UNESP – Araraquara-SP.

⁴ Médico Veterinário. Mestre FCAV/UNESP – Jaboticabal-SP.

⁵ Médica Veterinária. Doutoranda. FCAV/UNESP – Jaboticabal-SP.

⁶ Médico Veterinário. Professor Adjunto. Doutor. FCAV/UNESP – Jaboticabal-SP.

Com o emprego da citometria de fluxo é possível classificar a origem do linfoma em B, T, misto (B e T) e não B/não T. Porém, diagnosticar linfomas T por citometria de fluxo é mais desafiador, já que não há um marcador sensível de monoclonalidade (COSTA et al., 2005). Esta classificação tem sido de fundamental importância para designar o tratamento a ser instituído na medicina humana e agora na medicina veterinária, já que os cães com linfossarcomas de células T, têm se revelado com um tempo de remissão e sobrevivência mais curto que os de células B (MACEWEN; YOUNG, 1996).

Com a poliquimioterapia o tempo de sobrevivência estimado para os linfomas de origem B é de nove a 12 meses, contra seis meses para os de células T (FAN; KITCHELL, 2002).

O protocolo de Madison-Wisconsin tornou-se popular no tratamento do linfoma canino. Este protocolo é uma combinação das drogas L-asparaginase, vincristina, prednisona, ciclofosfamida e doxorrubicina e há relatos de que o referido protocolo é capaz de promover a mais longa remissão e tempo de sobrevivência para cães com linfoma (MORRISON, 2005).

Porém, muitos dos fármacos utilizados na quimioterapia do linfoma, afetam a distribuição, proliferação, diferenciação e função de células imunologicamente importantes como neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos (MILLER, 1997; BARNES, 1998). Embora a quimioterapia seja imunossupressora, os efeitos da mesma sobre o sistema imune dos cães com neoplasia não tem sido estudado de maneira detalhada (WALTER et al., 2006). Desta forma, torna-se muito importante a monitorização das células leucocitárias durante o tratamento quimioterápico.

Na medicina humana, o transplante autólogo de células tronco tem sido amplamente utilizado como coadjuvante no tratamento de neoplasias de origem hematopoiética. Atualmente, esta técnica está sendo empregada na medicina veterinária com o objetivo de aumentar a sobrevivência do animal (FRIMBERGER et al., 2000). A análise das subpopulações linfocitárias através da citometria de fluxo é fundamental para o monitoramento do paciente após o transplante (ROCHA et al., 2001), pois situações como pós-transplante de medula óssea e infecções virais, podem estar associadas respectivamente, com predomínio de linfócitos CD4 e CD8. (COSTA et al., 2005)

Diante disso, objetivou-se quantificar as subpopulações linfocitárias CD5+CD4+, CD5+CD8+ e CD45+CD21+ no sangue periférico e na medula óssea de uma cadela com linfoma submetido à

quimioterapia e subsequente transplante autólogo de medula óssea para avaliar a eficácia dos tratamentos e, conseqüentemente, as alterações imunológicas promovidas por estes.

RELATO DE CASO

Uma cadela da raça Rottweiler, pesando 34,3kg, de três anos de idade foi atendida, no Serviço de Clínica Médica Veterinária, do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, Jaboticabal-SP, com queixa de emagrecimento progressivo apatia, hiporexia e presença de um nódulo de pele na região cervical. A citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) do referido nódulo revelou um padrão citoscópico monótono e heteromorfo de células linfóides primitivas, citoplasma indiferenciado, padrão de cromatina rugoso e de diferentes tamanhos, constituindo um linfoma em evolução. Sendo assim, o animal apresentava linfoma cutâneo, e foi classificado de acordo com a Organização Mundial de Saúde, em estágio V e, como apresentava sinais clínicos da doença, em sub-estágio b. O protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin (L-asparaginase, vincristina, prednisona, ciclofosfamida e doxorrubicina) foi instituído por 11 semanas com o emprego de nove sessões quimioterápicas. Após este período, o animal, que estava em remissão clínico-hematológica completa, submeteu-se a um transplante autólogo de medula óssea, que consistiu em colheita e criopreservação da medula óssea, considerado o dia menos quatro (D-4), condicionamento do paciente com alta dose de ciclofosfamida, dia menos dois (D-2), infusão da medula óssea, dia zero (D0) e aplicação de fator estimulador de colônia (filgrastim) como coadjuvante para reconstituição hematopoiética, do dia mais três ao dia mais seis. (D+3 a D+6).

Amostras de sangue foram obtidas por venipunção cefálica e envasadas em tubos a vácuo, contendo EDTA. As contagens globais eritrocitárias, leucocitárias e plaquetárias conseguiu-se com o auxílio de um contador automático de células ABC Vet (HORIBAABX – São Paulo/Brasil). As contagens leucocitárias diferenciais realizou-as em esfregaços sangüíneos corados com uma mistura de May-Grunwald e Giemsa (MMG). Para as análises citofluorométricas foram utilizados cinco tubos falcon® e adicionou-se 100µL de sangue com EDTA em cada tubo seguido da adição de 2µL de cada marcador da seguinte maneira: 1PE (R104, Caltag) e 2FITC (MCA1212F, Serotec) no tubo 2; anti-CD5+ conjugado com FITC (MCA1037F, Serotec) e anti-CD4+ conjugado com PE (MCA1038PE, Serotec) no tubo 3, anti-CD5+ conjugado com FITC

(MCA1037F, Serotec) e anti-CD8⁺ conjugado com PE (MCA1039PE, Serotec) e anti-CD5⁺ conjugado com FITC (MCA1037F, Serotec) no tubo 4 e, anti-CD21⁺ conjugado com PE (MCA1781PE, Serotec) e anti-CD45⁺ conjugado com FITC (MCA1042F, Serotec) no tubo 5. As amostras foram homogeneizadas e os tubos eram incubados no escuro e em temperatura ambiente, por 20 minutos. Um mililitro de tampão de lise de hemácias (FACS Lysing Solution – Becton Dickinson) foi adicionado em cada tubo e, novamente, as amostras foram homogeneizadas e incubadas por mais dez minutos, à temperatura ambiente, no escuro. Posteriormente, realizou-se a lavagem do material com solução salina tamponada com fosfato 0,01 M pH entre 7,4 e 7,6 (PBS) por três vezes, adicionando dois mililitros de PBS por lavagem. Após as lavagens, adicionou-se 0,5 mL de solução salina tamponada com fosfato 0,01M pH entre 7,4 e 7,6 (PBS) a 1% de formol. As amostras foram analisadas no citômetro FACSCANTO (Becton Dickinson, San Jose, CA) e as análises as obteve com o auxílio do programa FACSDiva (BD).

As análises citométricas do sangue periférico foram realizadas antes de cada sessão

quimioterápica e, nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 dias do transplante autólogo de medula óssea.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O animal apresentou leucopenia após a primeira sessão quimioterápica. De acordo com Lanore; Delprat (2004), a neutropenia é a mais freqüente e mais grave das citopenias decorrentes da quimioterapia e, o nadir de neutrófilos, momento no qual o número de granulócitos é o mais baixo após uma sessão de quimioterapia, é geralmente constatado uma semana após o início do tratamento. Esta neutropenia, fase mais crítica do ciclo, persiste por 3 a 5 dias. Desta forma a protocolo foi suspenso por uma semana, durante a segunda semana e, continuado na terceira semana.

O nódulo cervical diminuiu significativamente após a primeira sessão quimioterápica e desapareceu após a segunda sessão.

Os valores absolutos da quantificação das sub-populações linfocitárias no sangue circulante durante os tratamentos estão demonstrados sob a forma de gráficos (Figura 1).

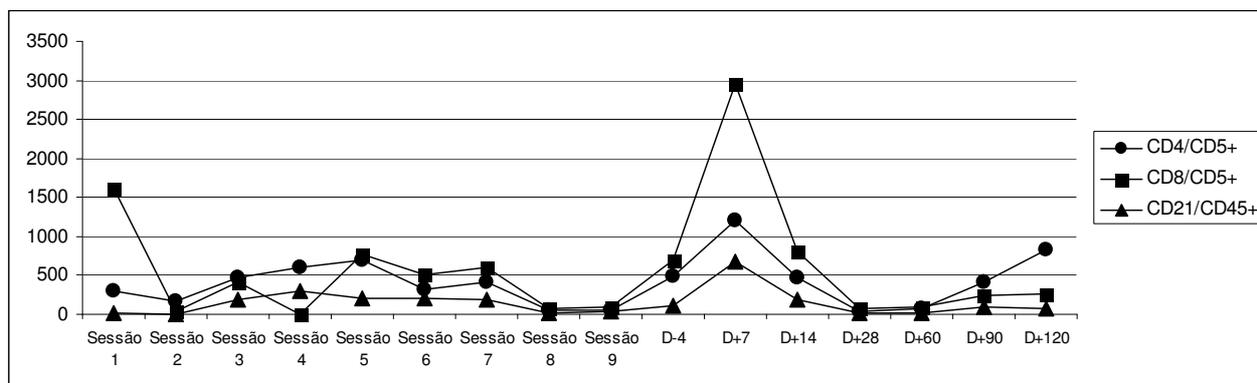


Figura 1: Representação gráfica dos valores absolutos (células/1/4L) das sub-populações linfocitárias CD4/CD5+, CD8/CD5+ e CD21/CD45+, do sangue circulante de uma cadela Rottweiler, antes das sessões quimioterápicas do protocolo de Madison-Wisconsin e nos dias D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 e D+120 do transplante autólogo de medula óssea.

Observando os valores encontrados no sangue para as sub-populações linfocitárias no momento do diagnóstico, pode-se verificar que a as células CD5⁺CD8⁺ se encontravam aumentadas, e assim trata-se de um linfoma T CD8⁺, corroborando com o fato de que a maioria dos linfomas cutâneos é de origem T (MACEWEN; YOUNG, 1996).

Notou-se, que na segunda sessão, além da diminuição significativa visual do nódulo cutâneo, houve uma redução significativa de todas as sub-populações linfocitárias em relação às demais sessões. De acordo com Gauthier et al. (2005), os cães com

linfoma que foram tratados tiveram mais de 50% de redução na concentração de linfócitos sangüíneos e um absoluto decréscimo de subtipos de linfócitos. Estes achados foram interpretados como uma representável supressão pela quimioterapia da regeneração linfocitária. Além disso, a vincristina quando associada com a L-asparaginase tem uma maior toxicidade hematológica. (RODASK; DE NARDI, 2008). No entanto, as mudanças no perfil dos linfócitos de cães com linfoma tratados com quimioterapia podem ser relevantes com relação à imunocompetência desses animais (GAUTHIER et al., 2005).

Observou-se uma nova diminuição de todas as sub-populações linfocitárias antes da quinta sessão quimioterápica, que pode ser decorrente da imunossupressão causada pelo uso prolongado de corticosteroide (POUNTAIN et al., 1993). O aumento de células CD5⁺CD4⁺ aos sete dias pós-transplantes está relacionado com a recuperação imuno e hematológica após a toxicidade causada pela ciclofosfamida, que segundo Lanore; Delprat (2004) ocorre ao redor de dez dias após a aplicação deste quimioterápico. Porém acredita-se que tal recuperação foi auxiliada pelo emprego do fator estimulador de granulócitos, já que este animal apresentou uma leucocitose de 20000 células/ $\frac{1}{4}$ L aos cinco dias da administração deste fármaco. É importante ressaltar que o conteúdo maior de linfócitos CD8⁺ observado neste período foi concomitante com recuperação mais rápida dos neutrófilos após transplante (BITTENCOURT; ROCHA, 2006). Mas vale lembrar, que também pode haver influência do transplante autólogo de medula óssea neste momento, já que a “pega” do transplante ocorre por volta dos 12 a 15 dias após a infusão da medula óssea. Porém, a recuperação das células linfocitárias só pode ser visualizada após 90 dias do transplante, que pode ser interpretado como recuperação da imunocompetência do animal.

CONCLUSÃO

As alterações imunofenotípicas que ocorreram durante o tratamento, corroboraram com as alterações clínicas observadas e com as alterações imunológicas esperadas em decorrência do emprego dos quimioterápicos. Além disso, pode-se observar um aumento das células linfocitárias após sete dias do transplante autólogo de medula óssea decorrente do emprego do fator estimulador de colônia e, a recuperação imunológica só pode ser notada após 90 dias do transplante autólogo de medula óssea.

Immunofenotypic analysis of lymphocytes in dog with lymphoma submitted to a quimioterapic treatment and subsequent autologous bone marrow transplantation – Case report.

ABSTRACT

In the present study flow cytometric analyses of lymphocytes subpopulations of a dog's peripheral blood with lymphoma had been cared out. It was a 3 years old female Rottweiler, weighing 34,3 kg. It had

been submitted to Madison-Wisconsin's quimioterapic protocol for 11 weeks and subsequent autologous bone marrow transplantation. Lymphocytes subpopulations CD5⁺4⁺, CD5⁺8⁺, e CD45⁺21⁺ had been evaluated before each chemotherapy session and in the days D-4, D+7, D+14, D+28, D+60, D+90 and D+120 of the autologous bone marrow transplantation. The analyses had allowed to observe the behavior of the lymphocytes subpopulations front to the treatments, making possible the comment of periods of immunosuppression and, hematopoetic and immunological recovery after the autologous bone marrow transplantation.

Keywords: Immunophenotype, lymphoma, autologous bone marrow transplantation and dog.

REFERÊNCIAS

BARNES, P. J. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. **Clinical Science**, n. 94, p. 557-572, 1998.

BITTENCOURT, H.; ROCHA, V. A célula-tronco hematopoética e seu uso clínico. In: ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células-tronco a nova fronteira da medicina**. Ribeirão Preto: Atheneu, 2006. cap. 9. p.115-130.

BRAYLAN, R.C. Lymphomas. In: _____. **Clinical flow cytometry – principles and application**. Baltimore: Library of congress, 2002, cap. 12, p. 203-234.

BYRNE, K. M.; KIM, H. W.; CHEW, B. P.; REINHART, G. A.; HAYEK, M. G. A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.73, n.2, p.167-182, 2000.

COBBOLD, S.; METCALFE, S. Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: summary of the first canine antigen workshop (CLAW). **Tissue Antigens**, v.43, n.3, p.137-154, 1994.

COSTA, F.P.S.; PEREIRA, F.G.; VASSALO, J.; FREITAS, L.L.L.; LORAND-METSE, I. A utilidade da citologia por punção com agulha fina aliada a imunofenotipagem no diagnóstico dos linfomas não-Hodgkin. **Revista Brasileira de hematologia e hemoterapia**, v.27, n.1, p.16-20, 2005.

- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Patologia Estrutural e Funcional**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p. 561-569.
- FAN, T. M.; KITCHELL, B. E. An update on diagnosing and treating canine lymphosarcoma. **Veterinary Medicine**, p.58-67, January. 2002.
- FRIMBERGER, A.E.; MOORE, A.S.; QUESENBERRY, P. Autologous bone marrow support for submyeloablative chemotherapy dose intensification in canine lymphoma. **Experimental Hematology**, v.28, n.7, s.1, p.52, 2000.
- GAUTHIER, M.J.; AUBERT, I.; ABRAMS-OGG, A.; WOODS, J.P.; BIENZLE, D. The immunophenotype of peripheral blood lymphocytes in clinically healthy dogs and dog with lymphoma in remission. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, n.2, p. 193-199, 2005.
- LANORE, D.; DELPRAT, C. **Quimioterapia Anticancerígena**. São Paulo: Roca, 2004. cap. 4. p. 53-78.
- MACEWEN, E. G.; YOUNG, K. M. Canine lymphoma and lymphoid leukemias. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Small Animal Clinical Oncology**, 2 ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1996. cap. 28 B, p. 451-479.
- MILLER, E. Immunosuppression – An Overview. **Seminars of Veterinary Medical Surgery (Small Animal)**, v.12, p. 144-149, 1997.
- MORRISON, W.B. **Lymphoma in Dogs and Cats**. Jackson: Teton NewMedia, 2005. 124p.
- POUNTAIN, G. D. M. T.; KEOGAN, B. L.; HAZLEMAN, D. L. BROWN. Effects of single dose compared with three days' prednisolone treatment of healthy volunteers: contrasting effects on circulating lymphocyte subsets. **J. Clin. Pathol.** 46, 1089-1092, 1993.
- ROCHA, V.; CARMAGNAT, M.V.; CHEVRET, S.; FLINOIS, O.; HENRIQUE BITTENCOURT, H.; ESPEROU, H.; GARNIER, F.; RIBAUD, P.; DEVERGIE, A.; SOCIÉ, G.; DAL'CORTIVO, L.; MAROLLEAU, J.P.; CHARRON, D.; ELUCKMAN, E.; RABIAN, C. Influence of bone marrow graft lymphocyte subsets on outcome after HLA-identical sibling transplants. **Experimental Hematology**, v.29, n.11, p.1347-1352, 2001.
- RODASK, S.; DE NARDI, A.B. **Quimioterapia Antineoplásica em cães e gatos**. São Paulo: MedVet Livros, 2008.
- VERNAU, W. **Flow cytometry assessment of hematopoietic neoplasia in the dog**. 55th Annual Meeting of the American college of veterinary pathologist & 30th Annual meeting of the American society of clinical pathology, 2004.
- WALTER, C.U.; BILLER, B.J.; LANA, S.E.; BACHAND, A.M.; DOW, S.W. Effects of chemotherapy on immune responses in dogs with cancer. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, N. 20, P. 342-347, 2006.