

Diferentes doses de ciclofosfamida no sistema imune de ovinos

Different dosis of cyclophosphamide on the ovine immune system

Maurício Garcia¹ Sabrina Caruso Chate² Ana Carolina Rusca Porto³
Yara Ferreira Figueira³ André Dias Diegues³ Flávia Corbari Feres³
Maria de Fátima Martins²

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes doses de ciclofosfamida como indutor de imunossupressão experimental em ovinos. Foram empregados 30 animais, divididos em quatro grupos experimentais. Os animais dos grupos I, II e III foram submetidos, respectivamente, às doses de 10, 25 e 40mg kg⁻¹ e os do grupo IV não receberam a droga, permanecendo como controle. Todos os animais foram imunizados com vacina contra a brucelose e, seis dias após a vacinação, foi feita a titulação através da soroaglutinação rápida em placa. Foi feita também a contagem de linfócitos sanguíneos e a dosagem de gamaglobulinas séricas, diariamente, durante uma semana, após a aplicação da ciclofosfamida. Houve óbitos apenas em alguns animais do grupo III (40mg kg⁻¹). Assim, a droga mostrou-se segura com doses inferiores a 25mg kg⁻¹. Quanto à imunossupressão, a mesma pôde ser demonstrada tanto nos animais que receberam 25mg kg⁻¹, quanto aqueles que receberam 40mg/kg, através da análise dos resultados das contagens de linfócitos e dos títulos pós-vacinais anti-brucela. A dose de 25mg kg⁻¹ de ciclofosfamida mostrou-se, assim, a mais adequada para ser usada em modelos de imunodepressão em ovinos, considerando sua ação imunossupressora e sua segurança e toxicidade.

Palavras-chave: ciclofosfamida, imunossupressão, ovinos.

ABSTRACT

The purpose of the present work was to evaluate different dosis effect of cyclophosphamide (CY) as an immunosuppressor in ovine. Thirty animals were grouped into four categories: groups I, II and III received 10, 25 e 40mg kg⁻¹ of CY and group IV remained as control. All animals were immunized with brucellosis vaccine and six days after that, serum

agglutination test was performed. During one week, blood lymphocyte count and gammaglobulin serum concentration were also daily evaluated. Deaths occurred only in group III (40mgkg⁻¹), so the drug seems to be safe in dosis under 25mg kg⁻¹. Immunosuppression was found both in groups II (25mg/kg) and III (40mg kg⁻¹), as it could be found in blood lymphocyte count and serum agglutination test. Authors concluded that 25mg kg⁻¹ is the most adequate dosis to use CY for experimental immunosuppression models in ovine, considering the immunosuppression effect, safety and toxicity.

Key words: cyclophosphamide, immunosuppression, ovine.

INTRODUÇÃO

A ciclofosfamida é uma mostarda nitrogenada usada no tratamento de diversos tipos de câncer. A droga é um potente imunodepressor, atuando em células com alta atividade mitótica, inibindo tanto a resposta imune humoral quanto celular (BACH & STROM, 1986). Em ovinos, esse efeito também foi relatado por alguns autores, tal como JUN & JOHNSON (1979), PRASAD et al. (1986) e GARCIA et al. (2002). Diversos protocolos para o uso da ciclofosfamida em ovinos têm sido propostos, com diferentes propósitos, com doses variando de 10 a 50mg kg⁻¹, tanto via oral quanto intravenosa (DOLNICK et al., 1969, 10 a 30mg kg⁻¹; MCINTOSH et al., 1971, 30mg kg⁻¹; BAKKE et al., 1972, 30mg kg⁻¹; JACKSON et al., 1975, 10 a 30mg kg⁻¹;

¹Médico Veterinário, professor do curso de Medicina Veterinária da Universidade Paulista, Atualmente Vice-Reitor da Universidade Anhembí Morumbi. E-mail: mgarcia@anhembí.br

²Médico Veterinário do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Paulista.

³Estudante do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Paulista.

BOGDANOV & KUSNEDELICHEVA, 1977, 25mg kg⁻¹; GORDON, 1982, 10mg kg⁻¹; PRASAD et al., 1986, 50mg kg⁻¹). O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes doses de ciclofosfamida como indutor de imunossupressão experimental em ovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Trinta ovinos adultos, machos, castrados, com peso ao redor de 30kg, isentos de vermes, mantidos estabulados em baias e alimentados com feno de coast-cross e feno de alfafa foram empregados. Os animais foram alocados em quatro grupos experimentais. Os animais dos grupos I, II e III (seis animais por grupo) foram submetidos a diferentes doses de ciclofosfamida (Genuxal, Asta Médica), aplicada via intravenosa, em dose única, no dia zero (10, 25 e 40mg kg⁻¹ respectivamente). Os do grupo IV (12 animais) não receberam a droga, permanecendo como controle. No dia zero, todos os animais foram imunizados com 2mL de vacina contra a brucelose, amostra B19 (Aborvac, Fort Dodge), por via subcutânea. Seis dias após a vacinação, foi feita a titulação de anticorpos anti-brucela, através da soroaglutinação rápida em placa, segundo padronização feita por GARCIA et al. (2000b).

A contagem de linfócitos sanguíneos e a dosagem de gamaglobulinas séricas foram realizadas diariamente, durante uma semana, após a aplicação da ciclofosfamida. A contagem de linfócitos foi calculada multiplicando-se o valor da contagem total de leucócitos, determinada em contador eletrônico, pela contagem diferencial, obtida em extensão sanguínea corada (HEWITT, 1984). A dosagem total de gamaglobulinas séricas foi calculada multiplicando-se o seu valor percentual pela dosagem de proteínas totais, obtida pelo método do biureto (WEICHSELBAUM, 1946). O valor percentual de gamaglobulinas foi determinado por eletroforese em gel de agarose, sendo o filme lido em densitômetro (DS 50, Celm) a 520mm. (BARTA & POURCIAU, 1984).

Foram registrados os óbitos decorrentes da aplicação da droga, sendo calculada a taxa de mortalidade em cada grupo experimental. Os dados foram analisados estatisticamente por análise de variância, seguida do teste t "student". As taxas de mortalidade foram analisadas pelo teste do qui-quadrado (ZAR, 1996). Foi considerado um valor de p=5%. Foi empregada planilha eletrônica comercial (Excel 97, Microsoft) de acordo com as recomendações de DRETZKE & HEILMAN (1998).

RESULTADOS

Na dose de 40mg kg⁻¹, a ciclofosfamida mostrou-se bastante tóxica, causando a mortalidade de 50% dos animais tratados. Não houve mortalidade nos demais grupos. No que se refere à capacidade de bloquear a síntese de anticorpos pós-vacinais, notou-se o efeito da ciclofosfamida nos animais tratados com 25 e com 40mg kg⁻¹, os quais apresentaram títulos vacinais estatisticamente menores que os demais grupos (Tabela 1).

Quanto à variação diária das contagens linfocitárias, notou-se que os animais tratados com 25 e 40mg kg⁻¹ apresentaram quedas expressivas em suas contagens, atingindo os menores valores ao redor do 5º dia após a aplicação da droga. Já os animais tratados com 10mg kg⁻¹ não apresentaram variações estatisticamente significantes quando comparados com os animais do grupo controle (Tabela 2). No que se refere à dosagem de gamaglobulinas, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estudados (Tabela 3).

DISCUSSÃO

Houve óbitos em 50% animais do grupo III (40mg kg⁻¹). A droga mostrou-se segura com doses inferiores a 25mg kg⁻¹. Quanto à imunossupressão, a mesma pôde ser demonstrada tanto nos animais que receberam 25mg kg⁻¹ quanto naqueles que receberam 40mg kg⁻¹, através da análise dos resultados das contagens de linfócitos e dos títulos pós-vacinais anti-brucela. Esses resultados reforçam os achados de JUN & JOHNSON (1979), PRASAD et al. (1986) e GARCIA et al. (2002), os quais relataram o efeito imunossupressor da droga. Entretanto, a dose de 10mg kg⁻¹ não conseguiu

Tabela 1 - Títulos de anticorpos pós-vacinais em ovinos imunizados com vacina contra a brucelose e tratados com diferentes doses de ciclofosfamida via intravenosa, em dose única, no dia da imunização (média e desvio padrão).

Dose de ciclofosfamida	Título
10mg kg ⁻¹	53,3 ^a (±31,1)
25mg kg ⁻¹	7,8 ^b (±1,9)
40mg kg ⁻¹	1,4 ^b (±1,9)
controle	47,1 ^a (±28,9)

^{ab} letras iguais indicam valores estatisticamente iguais

Tabela 2 - Variação percentual diária da contagem de linfócitos sanguíneos em ovinos tratados com diferentes doses de ciclofosfamida via intravenosa, em dose única, no dia zero (média e desvio padrão).

Dose	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
10mg kg ⁻¹	100% ^a (±0%)	75% ^{ac} (±34%)	79% ^a (±24%)	75% ^a (±16%)	71% ^a (±19%)	70% ^a (±20%)	85% ^a (±23%)	89% ^a (±27%)
25mg kg ⁻¹	100% ^a (±0%)	61% ^{ab} (±30%)	45% ^b (±22%)	49% ^{ab} (±31%)	29% ^b (±14%)	24% ^b (±11%)	25% ^b (±9%)	29% ^b (±10%)
40mg kg ⁻¹	100% ^a (±0%)	32% ^b (±21%)	24% ^b (±14%)	19% ^b (±11%)	21% ^b (±13%)	14% ^b (±4%)	23% ^b (±11%)	20% ^b (±11%)
controle	100% ^a (±0%)	99% ^c (±36%)	106% ^a (±48%)	69% ^a (±24%)	71% ^a (±25%)	82% ^a (±33%)	75% ^a (±29%)	70% ^a (±30%)

^{abc} letras iguais indicam valores estatisticamente iguais (na mesma coluna)

Tabela 3 - Variação percentual diária da dosagem de gamaglobulinas séricas em ovinos tratados com diferentes doses de ciclofosfamida via intravenosa, em dose única, no dia zero (média e desvio padrão).

Dose	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
10mg kg ⁻¹	100% ^a (±0%)	89% ^a (±16%)	94% ^a (±19%)	92% ^a (±5%)	90% ^a (±11%)	102% ^a (±11%)	96% ^a (±6%)	97% ^a (±10%)
25mg kg ⁻¹	100% ^a (±0%)	107% ^a (±18%)	77% ^a (±10%)	99% ^{ab} (±17%)	85% ^a (±10%)	87% ^a (±14%)	76% ^b (±9%)	91% ^a (±11%)
40mg kg ⁻¹	100% ^a (±0%)	101% ^a (±21%)	84% ^a (±14%)	85% ^a (±12%)	95% ^a (±12%)	93% ^a (±17%)	84% ^{ab} (±15%)	79% ^a (±12%)
controle	100% ^a (±0%)	104% ^a (±16%)	90% ^a (±28%)	111% ^b (±18%)	103% ^a (±22%)	103% ^a (±15%)	92% ^a (±12%)	100% ^a (±18%)

^{ab} letras iguais indicam valores estatisticamente iguais (na mesma coluna)

reproduzir o quadro de imunossupressão. Esse resultado não confirma, assim, os estudos de DOLNICK et al. (1969), JACKSON et al. (1975) e GORDON (1982).

Apesar de os animais que receberam doses igual ou acima de 25mg kg⁻¹ estarem com seu sistema imune comprometido, não foi encontrada uma diminuição nos níveis séricos de gamaglobulinas, conforme havia sido relatado por YEGANA et al. (1983). Esses resultados sugerem que o nível de anticorpos séricos pode não ser um indicador tão bom quanto a contagem de linfócitos, fenômeno também encontrado por SILVA et al. (2001).

CONCLUSÕES

A dose de 25mg kg⁻¹ de ciclofosfamida mostrou-se a mais adequada para ser usada em

modelos de imunodepressão em ovinos, considerando sua ação imunossupressora e sua segurança e toxicidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BACH, J.F.; STROM, T. **The mode of action of immunosuppressive agents**. Amsterdam : Elsevier, 1986.
- BAKKE, J.E. et al. Metabolism of cyclophosphamide by sheep. **J Agr Food Chem**, v.20, n.2, p.384-388, 1972.
- BARTA, O.; POURCIAU, S.S. Electrophoresis. In: BARTA, O. **Laboratory techniques of veterinary clinical immunology**. Illinois : Charles C. Thomas, 1984. p.116-122.
- BOGDANOV, M.; KUSNEDELICHEVA, S. Chemical and hematologic studies of sheep before and after treatment with cyclophosphamide. **Vet Med Nauki**, v.14, n.5, p.87-91, 1977.
- DOLNICK, E.H. et al. Cyclophosphamide as a chemical "defleecing" agent for sheep. **Nature**, v.221, n.179, p.467-468, 1969.

- DRETZKE, B.J.; HEILMAN, K.A. **Statistics with Microsoft® Excel**. New Jersey : Practice Hall, 1998. 164p.
- GARCIA, M. et al. Titulação de anticorpos anti *Brucella abortus* em ovinos experimentalmente imunizados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 27., 2000, Águas de Lindóia. **Anais...** São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 2000. p.70.
- GARCIA, M. et al. Experimental induction and evaluation of immunosuppression in ovine. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 22., 2002, Hanover. **Proceedings...** Hanover: German Buiatrics Association, 2002. p.194.
- GORDON, A.J. Effect of dexamethasone and cyclophosphamide on urinary hydroxyproline to creatinine ratios in sheep. **Australian Journal of Biology Science**, v.35, n.2, p.153-161, 1982.
- HEWITT, S.G. Haematology. In: GRAY, D.E. **Manual of veterinary investigation, laboratory techniques**. 3.ed. London: Her Majesty's Stationery Office, 1984. V.2, p.72-100.
- JACKSON, C.J. et al. Effect of cyclophosphamide on erythrocyte and plasma acetylcholinesterase activity in sheep. **Journal of Animal Science**, v. 41, n. 5, p. 1390-1393, 1975.
- JUN, M.H.; JOHNSON, R.H. Effect of cyclophosphamide on tumour growth and cell-mediated immunity in sheep with ovine squamous cell carcinoma. **Research in Veterinary Science**, v.27, n.2, p.155-160, 1979.
- McINTOSH, G.H. et al. Cyclophosphamide in the treatment of mycotic dermatitis of sheep. **Australian Veterinary Journal**, v.47, p. 542-546, 1971.
- PRASAD, G. et al. Effect of cyclophosphamide on immune response of sheep against attenuated sheep pox virus. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.24, n. 11, p.692-695, 1986.
- SILVA, M.M. et al. Efeito da verminose na resposta imune humoral em caprinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 28., 2001, Salvador. **Anais...** Salvador : Sociedade Baiana de Medicina Veterinária, 2001. p.118-119.
- WEICHSELBAUM, C.T.E. An accurate and rapid method for determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. **American Journal of Clinical Pathology**, v.16, n.3, p.40-49, 1946.
- YEGANA, Y. et al. Changing pattern of the serum proteins in asymptomatic sheep treated with cyclophosphamide for chemical shearing. **British Veterinary Journal**, v.139, p.415-422, 1983.
- ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 3.ed. New Jersey : Practice Hall, 1996. 662p.