

Efeito imediato da radioterapia sobre as populações de linfócitos T e B em pacientes com câncer de mama

Immediate effect of radiotherapy on T and B lymphocyte population in breast cancer patients

JURANDYR MOREIRA DE ANDRADE¹, SERGIO BIGHETTI²,
RICARDO RIBEIRO DOS SANTOS³

Unitermos: Linfócitos B - Radioterapia - Linfócitos T - Radioterapia

Mama - Neoplasma - Mama - Radioterapia

Key Words: T Lymphocytes - Radiotherapy - B - Lymphocytes - Radiotherapy
Breast - Neoplasms - Breast - Radiotherapy

Resumo: A radioterapia para o câncer da mama como para os de outros órgãos induz uma linfopenia significativa. Em estudos anteriores de outros autores, há uma grande controvérsia sobre as proporções de diminuição das populações T e B. Quantificando os linfócitos T por rosetas E e os linfócitos B por imunofluorescência direta, observamos diminuição semelhante das duas populações. Pacientes com ou sem cirurgia prévia responderam do mesmo modo à radioterapia. Pacientes com linfopenia (<1500 mm³) prévia à radioterapia sofrem redução significativamente menor de ambas as populações. Seis a oito semanas após a radioterapia já há recuperação significativa dos números de linfócitos T somente nas pacientes com mais de 60 anos.

Introdução

A radioterapia pode afetar a resistência do hospedeiro ao tumor, pela diminuição do número de linfócitos e se a capacidade do hospedeiro para destruir células tumorais residuais, após cirurgia, é mediada pelos linfócitos a diminuição do número destes pode determinar uma imunodepressão, favorecendo assim o aparecimento de metástases^{4,9}.

Se por um lado os autores são unânimes em atribuir à radioterapia mesmo em pequena área^{8,12,16} efeitos importantes sobre o número de linfócitos totais, o efeito da radiação sobre as populações T e B é controverso devido a diferentes técnicas de contagem das popula-

ções e mesmo a diferentes formas de análise dos dados.

A irradiação levaria à diminuição semelhante das duas populações^{2,8,11,12,17}. McCredie e col.⁸ encontram diminuição somente dos linfócitos B. Stjernsward e col.¹⁶ e Rotstein e col.¹³ observaram linfopenia às custas de células T e aumento no número de células B e Blomgren e cols. (1974) descrevem diminuição de células T e manutenção do número de células B.

Em vista das contradições da literatura exposta acima, nos propusemos determinar as alterações nas proporções relativas das populações de linfócitos T e B em pacientes com câncer de mama, antes e após serem submetidos à radioterapia e observar diferenças entre grupos com e sem linfopenia prévia, cirurgia anterior ou não e várias idades.

Trabalho apresentado na V Jornada de Oncologia de São José do Rio Preto, em agosto de 1988 e realizado com apoio financeiro da CAPES.

- 1 - Médico Assistente do Depto. de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.
- 2 - Professor Livre-Docente do Depto. de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.
- 3 - Professor Titular do Depto. de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

Material e métodos

Foram incluídos neste trabalho 28 pacientes com carcinoma ductal da mama, 7 no estágio II e 21 no estágio III, sendo que 15 delas haviam sido submetidas à cirurgia ablativa da mama (mastectomia radical: Pathey ou Halsted) e encaminhadas para radioterapia pós-

operatória, e 13 foram submetidas à radioterapia pré-operatória ou radioterapia exclusiva. Em todas foi utilizado o mesmo esquema radioterápico com os campos convencionais e dose de 5000 rads por campo. Nenhuma paciente havia sido submetida à quimioterapia anterior ou feito uso de medicação imunossupressora.

Foram feitas contagens das populações de linfócitos no sangue periférico antes da radioterapia, (A) de 1 a 7 dias após o fim da radioterapia, (B) e de 6 a 8 semanas após o término do tratamento (C). As duas primeiras amostras foram colhidas nas 28 pacientes e a 3.^a em 14 destas.

Sangue venoso (12-20 ml) heparinizado era mantido na seringa usada na coleta para decantação das hemácias por duas horas. Células de interface, ressuspensas em 4ml de PBS eram passadas rapidamente em coluna de nylon frouxa, e o eluente depositado sobre uma coluna de Fycoll-Hypaque e centrifugado a 300g por 30 minutos. Células da interface Fycoll-PBS eram lavadas três vezes em HBSS com tampão Hepes (Sigma chemical) 20 mm. A concentração das células era ajustada para $4.10^6/ml$ e a viabilidade testada por EOSINA Y, sendo sempre maior que 90%.

Os eritrócitos de carneiro eram colhidos quinzenalmente, sempre do mesmo animal e conservados em solução de Alsewer (pH 6,1). Em cada experimento os eritrócitos eram lavados 3 vezes em solução salina e ressuspensos em HBSS na concentração de $2 \times 10^8/ml$. A mistura da suspensão de linfócitos (0,2 ml) com suspensão de eritrócitos (0,2 ml) era incubado por 15 min. a $37^\circ C$, centrifugada a 130 g por minuto e incubada a $4^\circ C$ por 18 horas. Para leitura o sedimento era ressuspenso suavemente e uma gota da suspensão era colocada entre lâmina e lamínula para leitura em microscópio de contraste de fase com aumento de 400 vezes. Eram contados pelo menos 300 linfócitos, considerando-se como formadores de rosetas, o que tivesse pelo menos três eritrócitos aderidos.

Para contagem dos linfócitos B, duas gotas da suspensão de linfócitos eram colocadas em um quadrado de $1,5 \times 1,5$ cm em lâmina. As células sedimentadas em 5 minutos eram fixadas em metanol (Carlo Erba) a $-20^\circ C$ por 5 minutos e lavadas em PBS (0,15 M; pH 7,2) por 3 vezes. Distribuíam-se sobre o esfregaço 0,5 ml de soro de coelho anti y globulina humana conjugado com isotiocianato de fluoresceína (BBL), diluído a 1: 50 em PBS, contendo 0,01% de Azul de Evans (Merck).

As lâminas eram postas em câmara úmida por 30 minutos em temperatura ambiente, lavados 3 vezes em PBS, secas e montadas com glicerina tamponada de pH 8,6 e examinadas em microscópio alternadamente com luz de lâmpada de halogênio para contagem do total de linfócitos (pelo menos 300) e com luz ultravioleta para contagem das células que apresentavam fluorescência na membrana. O resultado era expresso em porcentagem de linfócitos fluorescentes em relação ao número total de linfócitos dos campos observados.

Para análise dos resultados, calculamos a diferença percentual de redução (ou aumento) dos valores absolutos e relativos dos leucócitos, linfócitos, linfócitos T e B para cada paciente. Foram obtidas então duas séries de diferenciais para cada parâmetro estudado: a primeira comparando-se os valores ao término da radioterapia (B) em relação aos valores iniciais (A) e a segunda comparando-se os valores daqueles parâmetros obtidos nos ensaios efetuados de 6 a 8 semanas após o término da radioterapia (C) em relação aos obtidos previamente à radioterapia. A fórmula utilizada para o cálculo de diferencial foi:

$$\Delta = 100 - (B \text{ ou } C \times 100/A), \text{ onde:}$$

Δ = percentual de redução (ou aumento) de A em relação a B ou A em relação a C.

A = número absoluto ou relativo de leucócitos, linfócitos totais, linfócitos T e B antes da radioterapia, considerando como 100% para cada paciente.

B = número absoluto ou relativo dos mesmos parâmetros ao término da série de radioterapia.

C = número absoluto ou relativo dos parâmetros de 6 a 8 semanas após o término da radioterapia.

Para cada série foi calculada a média (X) e o erro padrão da média (SE). Estes resultados foram submetidos à análise pelo teste T de Student.

Resultados

Grupo Completo das Pacientes

São apresentados os resultados obtidos no grupo de 28 pacientes, antes da radioterapia (A), após a radioterapia (B) e 14 pacientes das quais foi feita a avaliação 6 a 8 semanas após o término do tratamento radioterápico (C). Na tabela 1 temos as médias e desvios padrão do número de leucócitos, porcentagens e números absolutos de linfócitos T e B. Na tabela 2 apresentamos as médias e o erro padrão das médias (SE) de gradientes de redução do número absoluto de linfócitos totais e linfócitos T e B. Comparando-se o número absoluto das células antes da radioterapia (A) com os resultados obtidos ao término desta (B) vemos que o número de linfócitos totais sofreu uma redução de 63,7% (SE 3,3) enquanto os linfócitos T sofreram redução de 69,9% (SE 2,9) e os linfócitos B, de 65,3% (SE 5,4). Comparando-se o número absoluto dos linfócitos totais T e B antes da radioterapia (A) com os obtidos 6 a 8 semanas após o término (C). Vemos que persiste redução de 36,0% (SE 4,9); 39,3% (SE 7,2) e 58,4% (SE 6,7), respectivamente. Os mesmos resultados são apresentados na Fig. 1.

Tabela 1.

Número de Leucócitos por mm^3 , porcentagem e número absoluto de linfócitos, porcentagem e número absoluto de linfócitos T e B. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (SE)

	A	B	C
Leucócitos	5246.4 (± 1360.0)	3879.6 (± 1103.6)	4424.4 (± 1535.4)
Linfócitos %	31.8 (± 6.3)	14.9 (± 4.8)	19.8 (± 6.2)
Número absoluto de Linfócitos	1669.6 (± 523.2)	558.7 (± 198.2)	909.4 (± 380.6)
Linfócitos T %	67.8 (± 8.7)	53.6 (± 9.4)	57.9 (± 18.2)
Número absoluto de Linfócitos T	1122.7 (± 394.8)	298.8 (± 115.5)	575.6 (± 286.9)
Linfócitos B	14.6 (± 5.7)	11.8 (± 5.1)	10.2 (± 3.5)
Número absoluto de Linfócitos B	223.7 (± 104.9)	65.9 (± 37.7)	88.1 (± 32.1)

A = antes da radioterapia (n = 28); B = ao fim da radioterapia (n = 28); C = 6 a 8 semanas após o fim da radioterapia.

Tabela 2

Porcentagem de redução (X) do total de linfócitos e dos linfócitos T e B

	A/B n = 28 X % (SE)	A/C n = 14 X % (SE)
Linfócitos Totais	63.7 (3.3)	36.0 (4.9)
Linfócitos T	69.9 (2.9)	39.3 (7.2)
Linfócitos B	65.3 (5.4)	58.4 (6.7)

A/B = Resultados obtidos ao fim da radioerapia em relação aos encontrados antes da radioterapia.

A/C = Resultados obtidos 6 a 8 semanas após o fim da radioterapia em relação aos encontrados antes da radioterapia.

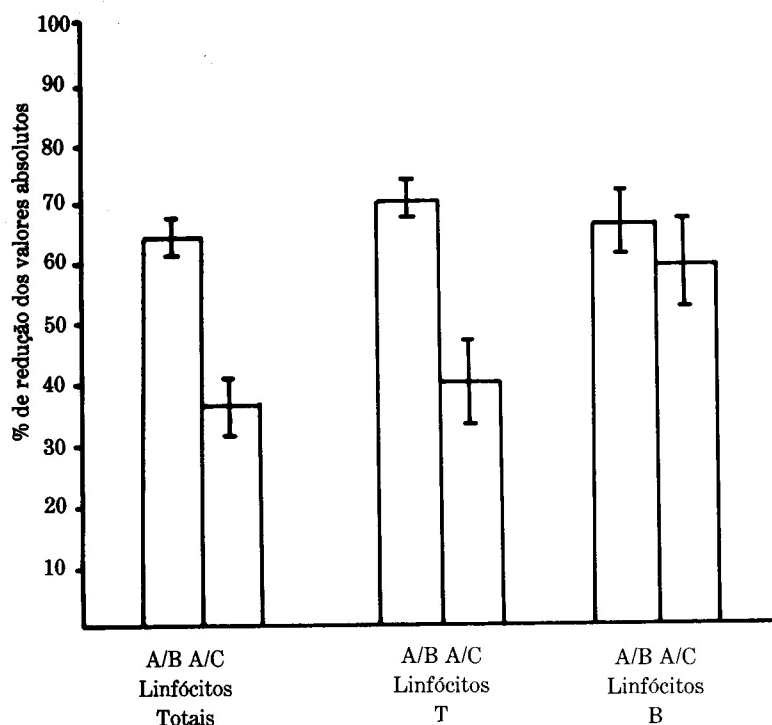


Fig. 1 - Análise dos gradientes de redução dos valores absolutos de linfócitos totais, linfócitos T e B. A/B = antes da radioterapia em relação ao término; A/C = antes da radioterapia em relação aos valores de 6-8 semanas após o término; □ = médias; I = erro padrão das médias.

Linfopenia Prévia à Radioterapia

Da amostra estudada, 15 pacientes apresentavam linfopenia prévia à radioterapia e 13 não apresentavam. Usou-se como critério número maior ou menor que 1.500 linfócitos por mm^3 calculados com dados obtidos do hemograma. Os resultados estão na Tabela 3, onde se apresenta as médias dos gradientes de redução, baseadas nos números absolutos, de linfócitos totais T e B. Na Fig. 2 compara-se os valores dos gradientes de redução das pacientes com e sem linfopenia, para cada parâmetro estudado.

Idade

Dentro do grupo de 28 pacientes, 11 tinham 60 anos ou mais e 17 não haviam atingido esta idade. A influência da idade na perda e recuperação dos linfócitos com a radioterapia, pode ser observada na fig. 3, comparando-se os valores dos números absolutos de linfócitos totais, linfócitos T e B nas pacientes com menos de 60 anos e nas pacientes com 60 anos ou mais.

Tabela 3

Porcentagem de redução (X) do total de linfócitos e dos linfócitos T e B em pacientes com e sem linfopenia antes da radioterapia, os dados são apresentados com média \pm desvio padrão (SE).

	Com linfopenia		Sem linfopenia	
	A/B n = 15 X % (SE)	A/C n = 11 X % (SE)	A/B n = 13 X % (SE)	A/C n = 3 X % (SE)
Total de Linfócitos	55.0(3.8)*	30.6(6.5)	73.0(3.8)*	41.3(6.9)
Linfócitos T	58.7(3.9)*	38.1(9.2)	80.0(3.0)*	49.0(12.0)
Linfócitos B	57.0(10.3)	58.0(7.9)	65.4(9.7)	62.3(8.3)

A/B = Resultados obtidos ao fim da radioterapia em relação aos encontrados antes da radioterapia.

A/C = Resultados obtidos 6 a 8 semanas após o fim da radioterapia em relação aos encontrados antes da radioterapia.

* = Diferença significativa ao nível de 0,5% quando total de linfócitos e linfócitos T são comparados em pacientes com e sem linfopenia (A/B x A/C).

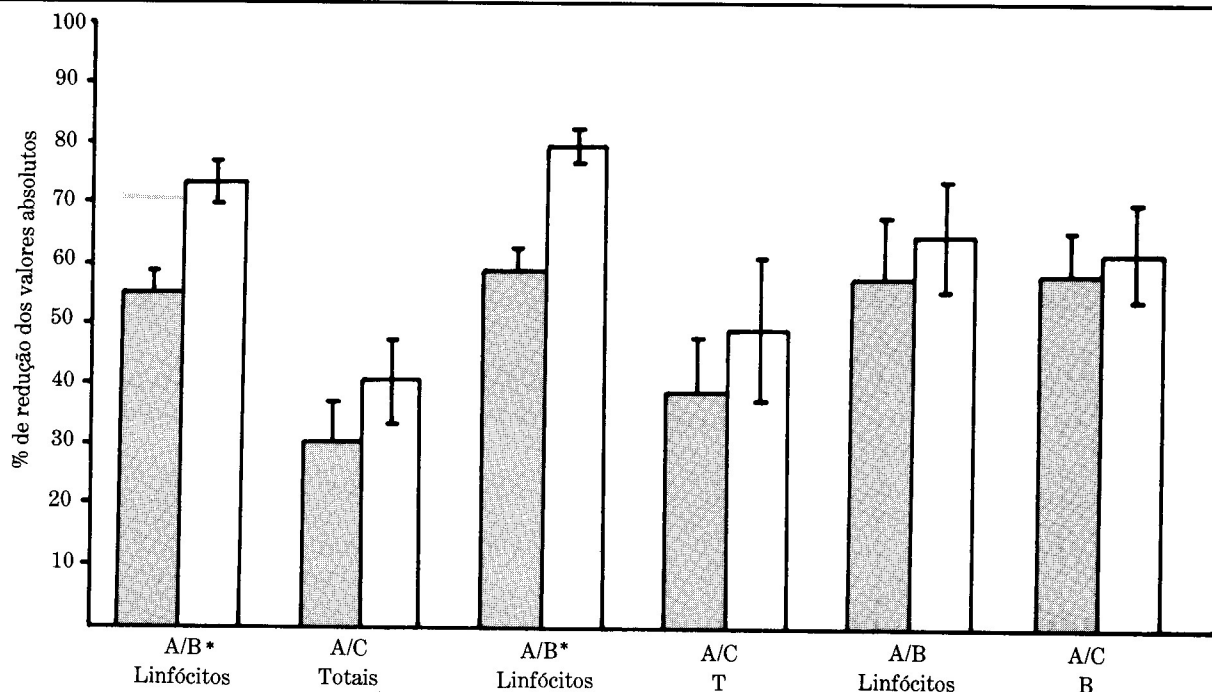


Fig. 2 - Análise dos gradientes de redução dos valores absolutos de linfócitos totais, linfócitos T e B em pacientes com e sem linfopenia. A/B = antes da radioterapia em relação ao término; A/C = antes da radioterapia em rela-

ção aos valores de 6-8 semanas após o término; □ = médias; I = erro padrão das médias; ■ = com linfopenia; □ = sem linfopenia; * = diferença significativa a nível de 0,5%.

Cirurgia Anterior

Na Fig. 4 são apresentadas as médias dos gradientes de redução e os erros padrão referente ao número absoluto de linfócitos totais, T e B, agrupando-se as pacientes conforme tivessem ou não cirurgia antes da radioterapia.

Discussão

Vários trabalhos demonstram um decréscimo de até 30% no número de linfócitos persistentes até 5 anos após o término da radioterapia^{4,9,12} e que seria devido à destruição de linfócitos circulantes que atravessam os campos de radiação no interior de vasos sanguíneos e linfáticos e que seria proporcional ao fluxo de sangue nas áreas irradiadas¹².

São contraditórios os estudos a respeito da radiosensibilidade dos linfócitos T e B, principalmente em decorrência dos métodos empregados¹. Straton e col.¹⁷ relataram uma perda de 85% de células formadoras de rosetas E e também uma alteração da proporção T/B de 3,2 para 1,9 e concluem que os linfócitos T são mais radiosensíveis que os B. Raben e col.¹² referem também uma diminuição da porcentagem de rosetas E. Outros autores porém não encontraram diferenças significativas quando compararam porcentagens de células formadoras de roseta E e EAC antes e após o tratamento¹⁵.

No presente trabalho, a população total de linfócitos em número absoluto é reduzida pela radioterapia em 66,5% a de linfócitos T de 73,4% e a linfócitos B de

70,5%. Logo, as populações de linfócitos T e B são igualmente afetadas pela radioterapia. As divergências dos resultados na literatura devem-se a diferentes técnicas utilizadas para separação e contagem das populações de linfócitos, como também pela análise empregada na apresentação dos resultados. Os linfócitos T que expressam na membrana uma baixa concentração de receptores para eritrócitos de carneiro, podem não formar rosetas se as condições não forem ideais como as empregadas neste estudo, que permitam a contagem de máximo de células T^{7,18}.

A controvérsia existente na literatura com relação aos linfócitos B deve-se ao fato de que os autores incluíram nesta população todas as células capazes de formar rosetas com eritrócitos de carneiro na presença de antígeno e complemento (EAC), sendo incluídas todas as células com receptores para a fração C3b do complemento ativado, que não é específico para células B² e portanto são contadas como B, as células não T e não B (null cells) e monócitos. A técnica de imunofluorescência direta que utilizamos para demonstrar imunoglobulina na superfície de linfócitos é específica para células B, visto que somente estas células apresentam estas moléculas na sua superfície.

Quanto à análise das variações quantitativas das duas populações de linfócitos, alguns autores a fazem baseada nos percentuais^{12,16} e não nos números absolutos como outros^{11,15}. Em nossos resultados observamos que os valores relativos não expressam com fidelidade as alterações quantitativas, podendo não ocorrer variações

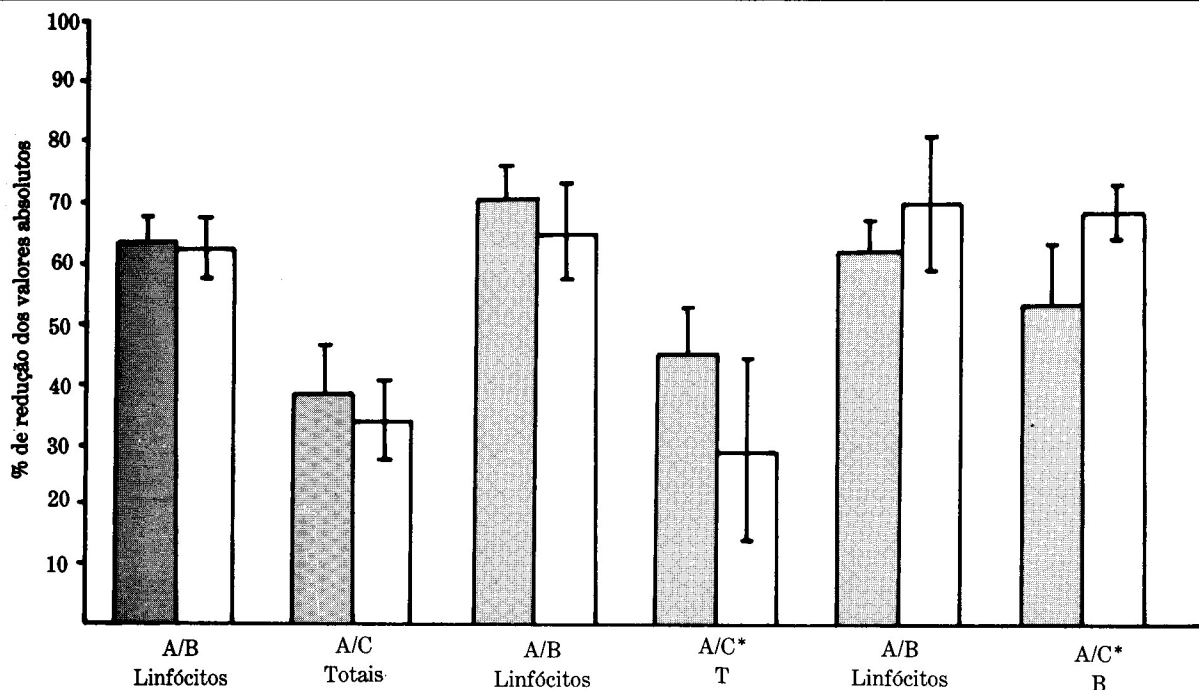


Fig. 3 - Análise dos gradientes de redução dos valores absolutos de linfócitos totais, linfócitos T e B em pacientes com menos de 60 anos e pacientes com 60 anos ou mais. A/B = antes da radioterapia em relação ao término; A/C

= antes da radioterapia em relação aos valores de 6-8 semanas após o término; □ = médias. I = erro padrão das médias; ■ = com linfopenia; □ = sem linfopenia; * = diferença significativa a nível de 0,5%.

quando as populações de linfócitos T ou B, consideradas em número absoluto, encontram-se de fato deprimidas.

Linfopenia Prévia à Radioterapia

Verificamos que as pacientes com linfopenia prévia à radioterapia sofrem depleção significativamente menor dos linfócitos totais (gradiente de redução de 55%) quando comparadas com as que não apresentavam linfopenia (gradiente de redução de 73%), o mesmo ocorrendo com os linfócitos T, cujo gradiente de redução são respectivamente de 58,7% (3,9) e 80% (3,0), não havendo porém diferenças significativas quanto aos linfócitos B. Isto parece sugerir que as pacientes com linfopenia anterior à radioterapia já haviam selecionado populações de linfócitos T mais radioresistentes.

Idade das Pacientes

Quanto à idade, não foram encontradas diferenças entre os dois grupos quanto à depressão do número de linfócitos totais T e B (Fig. 3), imediatamente após o término da radioterapia.

Cirurgia Prévia à Radioterapia

A cirurgia para remoção da mama afetada pelo tumor não produz efeitos quanto aos níveis de linfócitos totais, T e B¹⁵. No presente trabalho não encontramos diferenças nos números relativos, absolutos e no gradiente de redução da população de linfócitos quando comparamos pacientes já submetidas à cirurgia anterior à radioterapia com as não operadas (Fig. 4).

Recuperação do Número de Linfócitos

Vários autores relatam que a linfopenia conseqüente à radioterapia para tumor da mama é máxima logo após o término desta^{10,15,19}, havendo uma recuperação mais ou menos lenta das populações depletadas relatando-se uma linfopenia persistente de 3 a 5 anos^{8,11}.

Quanto às populações de linfócitos T e B há relatos de uma queda acentuada de ambas com recuperação lenta do número, sem no entanto voltarem aos valores iniciais três anos após o término da radioterapia em pacientes com câncer de mama irradiadas. Outros autores¹⁹ referem uma volta aos valores pré-radioterapia em 48 semanas para os linfócitos B, e 81 semanas para os T ou mesmo uma elevação concomitante dos níveis de linfócitos T e B perceptível já na segunda semana após o término do tratamento¹⁷.

No presente trabalho encontramos recuperação parcial do número de linfócitos totais e de linfócitos T entre o término da radioterapia (B) e de 6 a 8 semanas após o término (C), enquanto que não houve recuperação significativa na quantidade de células B. Em relação à idade das pacientes, observamos que esta pode estar implicada com a recuperação das populações de linfócitos T e B (Tabela 3). As pacientes com menos de 60 anos apresentaram comportamento divergente quando comparadas às do grupo das com 60 anos ou mais. Houve recuperação do número de linfócitos T nas pacientes com mais de 60 anos e recuperação do número de linfócitos B (mas não dos T) nas pacientes com menos de 60 anos.

Não houve diferença na fase tardia pós-radioterapia quando se comparou pacientes operadas com as não operadas e pacientes com ou sem linfopenia prévia.

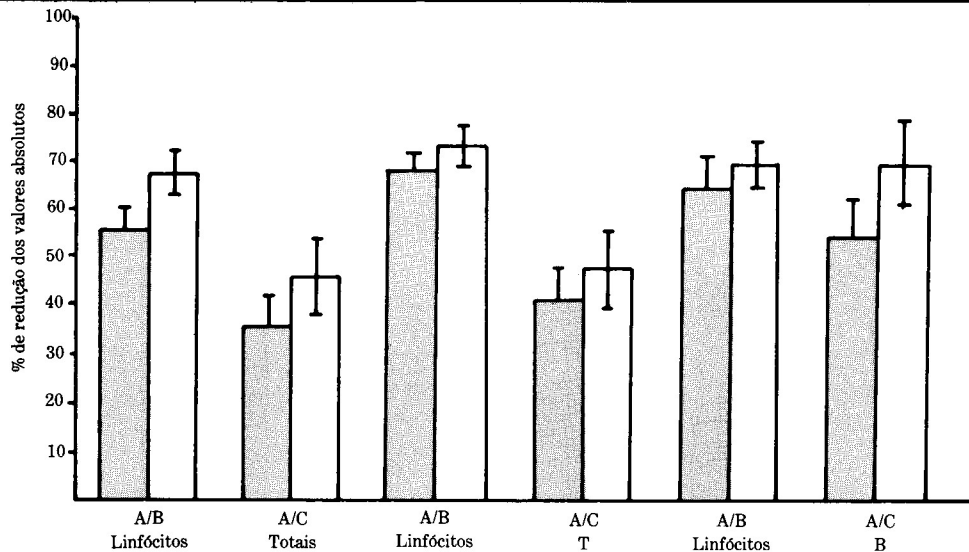


Fig. 4 - Análise dos gradientes de redução dos valores absolutos de linfócitos totais, linfócitos T e B em pacientes com e sem cirurgia anterior à radioterapia; A/B = antes da radioterapia em relação ao término; A/C = antes da

radioterapia em relação aos valores de 6-8 semanas após o término; □ = médias; □ erro padrão das médias; ■ = operada; □ não operada, * = diferença significativa a nível de 0,5%.

Summary

Radiotherapy for breast cancer, like radiotherapy for cancer in other organs, induces significant lymphopenia. Previous reports by other investigators have produced widely controversial data with respect to the proportion of decrease in T and B lymphocyte populations. By quantifying T lymphocytes in terms of E rosettes and B lymphocytes by direct immunofluorescence, we observed a similar decrease of both population in a sample of 28 patients submitted to radiotherapy for ductal

breast carcinoma. Patients with or without previous mastectomy responded similarly to radiotherapy. Patients with lymphopenia (<1500/mm³) existing before radiotherapy showed a significantly lower reduction of both populations. Among patients aged more than 60 years, a significant recovery occurred in T lymphocyte numbers six to eight weeks after radiotherapy and a significant recovery of B lymphocyte numbers occurred in patients aged less than 60.

Referências bibliográficas

- ANDERSON, R.E. et al. Radiosensitivity of T and B lymphocytes. IV. effects of whole body irradiation upon various lymphoid tissues and numbers of recirculating lymphocytes. *J. Immunol*, 118: 1191-200, 1974.
- BLOMGREM, H.; GLAS, U.; WASSERMAN, J. Blood lymphocytes after radiationtherapy of mammary carcinoma. *Acta Radiol*. 13: 185-200, 1974.
- BYFIELD, P.E.; SHATTON, J.A.; SMALL, R. Lymphocyte response after radiotherapy. *Lancet*, 13:309, 1974.
- COSIMI, A.B. et al. Cellular immune competence of breast cancer patients receiving radiotherapy. *Arch. Surg.* 107:531-5, 1973.
- DICKLER, H.B.; ADKINSON, N.F.; TERRY, W.D. Evidence for individual blood lymphocytes bearing both B and T cell markers. *Nature*, 247:213, 1974.
- HANCOCK, B.W. et al. The effects of radiotherapy on immunity in patients with localized carcinoma of the cervix uteri. *Câncer*, 31:118-23, 1979.
- McCREIDIE, J.A.; INCH, W.R.; SUTHERLAND, R.M. Effect of post operative radiotherapy on peripheral blood lymphocytes in patients with carcinoma of the breast. *Cancer*, 29:349-56, 1972.
- McCREIDIE, J.A.; INCH, W.R.; SUTHERLAND, R.M. Peripheral blood lymphocytes and breast cancer: effects of operation and radiotherapy. *Arch. Surg.* 107:162-5, 1973.
- MEYER, K.K. & SAYRE, P. Radiation induced lymphocyte immune deficiency. *Arch. Surg.* 101:114-21, 1970.
- PETRINI, B. et al. Blood lymphocyte subpopulations in breast cancer patients following radiotherapy. *Clin. Exp. Immunol.* 29:36-42, 1977.
- RABEN, M. et al. The effect of radiation therapy on lymphocyte. *Cancer*, 37: 1417-21, 1976.
- ROTSTEIN, S. et al. Long term effects on the immune system following local radiation therapy for breast cancer. I - cellular composition of the peripheral blood lymphocyte population. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 11:921-5, 1985.
- SCHEVACH, E.M. et al. Receptors for complement and immunoglobulin on human leukemic cells and human lymphoblastoid cell lines. *J. Clin. Invest.* 51:1933-38, 1972.
- SMIT, B. et al. The lymphocyte: monocyte ratio: B and T cell after radiotherapy and surgery. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 5:1841-47, 1979.
- STJERNESWARD, J. et al. Lymphopenia and change in distribution of human B and T lymphocytes in peripheral blood induced by irradiation for mammary carcinoma.
- STRATON, J.A. et al. A comparison of the acute effects of radiation therapy including or excluding the thymus on the lymphocyte subpopulations of cancer patients. *J. Clin. Invest.* 56:88-97, 1975.
- WEST, W.H. et al. Human T lymphocyte subpopulation: correlation between E rosette - forming affinity and expression of the Fc receptor. *J. Immunol.* 119:548-54, 1977.
- WOOD S.E. et al. Lymphocyte response after radiotherapy. *Lancet*, I: 863, 1974.