

ALTERAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E IMUNOLÓGICA EM ANIMAIS PORTADORES DE TUMOR EXPERIMENTAL *

Alteration on inflammatory and immunological response in animals bearing experimental tumor

ZYNGIER, SZULIM **
SCARPINELLA BUENO, MARCO A. ***
KRYBUS, JENNY ***
NOVAK, ALEXANDRE ***
FEDER, DAVID ****
CABRAL, MYRIAN *****
NASSIS, CRISTINA DE ZOTTI *****
ANDRADE JR., ALVARO FRANCO *****
PENNA, SÓCRATES CALVOSO *****

ZYNGIER, S. et al. Alteração da Resposta Inflamatória e Imunológica em Animais Portadores de Tumor Experimental. Arq. med. ABC, 14(1): 24-27, 1991.
Resumo: Os autores estudaram em camundongos portadores de tumor de Walker as alterações de resposta a agente inflamatório e as modificações de reações imunológicas, assim como o período no qual se tornam evidentes. Usaram como agente inflamatório a carragenina e como parâmetro imunológico o teste de hipersensibilidade ao BCG. As conclusões foram que os animais portadores de tumor apresentam diminuição na capacidade de resposta inflamatória inespecífica à carragenina e ao BCG, assim como no teste de hipersensibilidade tardia ao BCG.
Unitermos: resposta inflamatória; reação imunológica; hipersensibilidade tardia; tumor.

INTRODUÇÃO

A interação entre resposta inflamatória e câncer vem sendo estudada há muito, tanto sob o aspecto clínico como o experimental.

Com o advento de novos conhecimentos sobre a imunologia, considera-se atualmente a inflamação como uma parcela da resposta imunológica relacionada a mecanismos de rejeição de estruturas antígenicamente distintas dos antígenos de histocompatibilidade apresentados pelas células do organismo (2).

É sabido que massas tumorais expressam, durante seu desenvolvimento, antígenos estranhos às células do seu hospedeiro (1) e que enquanto existir integridade das células inflamatórias e portanto, da resposta inflamatória pelo organismo portador do câncer, há um "steady-state" entre destruição e desenvolvimento das células tumorais (5,7).

Normann e Cornelius (6) observaram em animais de laboratório portadores de câncer que à medida que ocorre aumento progressivo do tumor, há diminuição do número de células inflamatórias, em particular macrófagos, acompanhada de diminuição da resposta inflamatória.

Estudos utilizando pacientes portadores de diferentes tipos de carcinomas mostraram que enquanto os leucócitos circulantes

possuem forte atividade citotóxica contra as células tumorais do próprio indivíduo, as células inflamatórias pertencentes ao infiltrado peri-tumoral mostram-se totalmente incapazes de lisar as células autólogas tumorais (9).

Com o intuito de trazer novos subsídios no que se refere à imunologia dos tumores, propusemos este estudo cujos objetivos foram:

- 1.1. Verificar alterações de resposta a agente inflamatório em animais portadores de tumor experimental.
- 1.2. Verificar alterações de reações imunológicas em animais portadores de tumor experimental.
- 1.3. Identificar, durante a evolução do tumor, o período no qual essas alterações se tornam evidentes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados camundongos isogênicos, Balb/c, de ambos os sexos para implante do tumor de Ehrlich na forma ascítica (5×10^6 células tumorais por via ip).

Ratos Wistar foram implantados com 1×10^6 células de carcinoma 256 de Walker (fonte das células do tumor de Walker usados no trabalho).

2.1. Resposta inflamatória

Este estudo foi realizado em ratos saudáveis ($n=15$) e em ratos portadores de tumor de Walker ($n=15$).

2.1.1. Edema na pata de ratos

Carragenina foi diluída em solução fisiológica (5 mg/ml) e desta solução 0,1 ml foram injetados na região sub-plantar de uma das patas posteriores.

O volume das patas até a articulação tíbio-társica foi medido antes e a 1,3,5 e 24 horas após a injeção de carragenina, com auxílio de pletismógrafo descrito por Winder et al. (12). O pletismógrafo consiste de uma cuba contendo solução de 1-anil sulfato de sódio, na qual é imersa a pata do rato. O líquido da cuba desloca-se para um tubo de vidro graduado, permitindo a medida

* Trabalho realizado na Disciplina de Farmacologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia da FMABC e no Departamento de Farmacologia do ICB-USP.

** Professor Titular de Farmacologia da F.M.ABC

*** Acadêmicos da F.M.ABC

**** Professor Assistente de Farmacologia da F.M.ABC

***** Professora Adjunta de Farmacologia da F.M.ABC

***** Professora Auxiliar de Ensino de Farmacologia da F.M.ABC

***** Técnico de Laboratório de Farmacologia da F.M.ABC

***** Estagiário de Farmacologia do ICB-USP

do volume da pata.

O resultado final foi obtido subtraindo-se o valor de cada leitura do valor controle lido antes da injeção de carragenina.

2.2. Resposta imunológica

O estudo foi realizado em camundongos saudáveis (n=6) e em portadores do tumor de Ehrlich (n=6). As células tumorais foram implantadas 24 horas antes da imunização dos animais.

2.2.1. Hipersensibilidade tardia ao BCG (10)

O BCG utilizado foi o onco-BCG oral do Instituto Butantã de São Paulo.

Os camundongos foram previamente imunizados por injeção intradérmica de 20 µl de BCG, na face plantar da pata posterior esquerda.

Decorridos quinze dias da imunização, a espessura do coxim plantar posterior direito foi medida com o auxílio de relógio comparador. A seguir, injetou-se por via intradérmica o volume de 20 µl de BCG (na diluição de 1:10) na face plantar da pata posterior direita. A espessura do coxim plantar posterior direito foi medida 4,8,12,24,48 e 72 horas após a injeção de BCG.

Foram calculadas as diferenças na espessura da pata pela subtração de cada leitura do valor controle lido antes da injeção de BCG.

2.3. Identificação do período em que aparecem alterações na resposta inflamatória

Os ratos portadores de tumor de Walker utilizados no estudo de edema da pata foram observados até a morte. Pode-se, assim, determinar quantas horas antes do êxito letal os ratos

apresentaram diferença na resposta ao agente inflamatório.

2.4. Métodos estatísticos

Os resultados do estudo da hipersensibilidade foram analisados pelo teste "t" de Student (4).

Os resultados da resposta inflamatória à carragenina foram submetidos à análise de variância a um critério e as médias comparadas pelo método de Scheffé (4).

O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

RESULTADOS

3.1. Resposta inflamatória

Nos ratos portadores de tumor de Walker, o edema induzido pela injeção de carragenina é menor do que no grupo controle. Este resultado é significativo nos animais testados 24 e 48 horas antes do óbito, sendo válido ressaltar que nestes períodos, o resultado foi significativo nas medidas realizadas 3 e 5 horas após a aplicação da carragenina. A diferença não foi significativa nos ratos testados 72 horas ou mais antes do óbito (tab. I).

3.2. Hipersensibilidade tardia

Decorridos 16 dias do implante da forma ascítica do tumor de Ehrlich e 15 dias da imunização, os camundongos apresentam resposta de hipersensibilidade tardia ao BCG diminuída em relação ao grupo controle. A redução da resposta é significativa nos intervalos de 4,12,24 e 48 horas após a injeção da dose teste de BCG (tab. II).

**TABELA I - Resposta inflamatória à carragenina :
Diferença de volume (em ml) da pata de ratos antes e após a injeção de 0,5 mg de carragenina no coxim plantar.**

tempo (hs) após inj. de carrag.	controle			tumor de Walker								
	1	3	5	24hs antes do óbito			48hs antes do óbito			72 antes do óbito		
	1	3	5	1	3	5	1	3	5	1	3	5
1	.09	.47	.45	.12	-.03	.20	.19	.06	.12	.30	.51	.49
2	.21	.47	.49	.29	.18	.26	.13	.04	.17	.43	.49	.48
3	.25	.29	.43	.03	.03	.13	.20	.20	.33	.33	.47	.37
4	.05	.13	.13				.23	.34	.06	.23	.67	.50
5	.33	.42	.49							.25	.57	.40
6	.36	.52	.52									
7	.21	.39	.38									
8	.17	.24	.23									
9	.25	.32	.31									
10	.43	.63	.93									
11	.27	.46	.51									
12	.28	.70	.70									
13	.27	.65	.59									
14	.36	.56	.49									
15	.28	.42	.42									
média	.25	.44	.47	.15	.06	.20	.19	.16	.17	.30	.54	.45

Análise de variância e Scheffé $p < 0,05$ — Médias comparadas com as do grupo de controle

Fonte: ZYNGIER, S. et al. 1991

TABELA II - Hipersensibilidade tardia: camundongos previamente imunizados com BCG. Diferença (em mm) da espessura da pata antes e após os assumidos intervalos de tempo após injeção de BCG./

horas	4	8	12	48	72		
tumor de Ehrlich							
	1	.35	.12	.15	.10	.04	-.12
	2	.14	.14	.13	-.04	-.08	
	3	.27	.20	.21	.09	0	.05
	4	.39	.34	.19	.19	.01	.04
	5	.10	.11	.12	.20	.03	.04
	6	.40	.27	.25	.06	.02	-.02
	7	.23	.28	.22	.09	.06	-.06
média		.27	.21	.18	.09	.01	-.06
controle							
	1	.60	.36	.41	.74	.51	.08
	2	.69	.37	.33	.45	.20	.15
	3	.39	.28	.25	.20	.14	-.20
	4	.48	.45	.47	.32	.07	.05
	5	.56	.58	.28	.42	.19	.23
	6	.76	.20	.42	.61	.07	.10
média		.58	.37	.36	.45	.20	.07

Teste "t" de Student entre as médias dos grupos de controle e de tumor nos respectivos intervalos de tempo $\wedge p < 0,05$

Fonte: ZYNGIER, S. et al. 1991.

DISCUSSÃO

A prática tem nos mostrado que após o implante de 1×10^6 células de tumor de Walker na cavidade peritoneal de ratos, o estado clínico dos animais permanece bom e estável por aproximadamente 7 dias. Ao redor de 8 horas antes do óbito, subitamente o rato apresenta apatia, sonolência e freqüentemente icterícia. Talvez diminuição da capacidade de resposta aos agentes inflamatórios seja nestes animais um dos primeiros sinais do colapso vital colapso vital eminente.

Durante a evolução dos tumores experimentais utilizados houve diminuição na capacidade da resposta dos hospedeiros aos agentes inflamatórios. No caso de ratos portadores do tumor de Walker esta característica se evidenciou no período de 24 e de 48 horas antes do óbito.

Normann e Cornelius (6) e Normann et al. (7) observaram em camundongos portadores de câncer, sejam espontâneos ou transplantados, um comprometimento das funções monocíticas não acompanhado pelos neutrófilos polimorfonucleares. Desde que o macrófago é uma célula fundamental dos processos inflamatório e imunológico, uma diminuição de sua atividade poderia comprometer o hospedeiro por levar a interferências na resposta imunológica e criar situações favoráveis para o aparecimento de metástases e infecções (7).

Ao se injetar BCG na pata de camundongos observa-se uma resposta inflamatória inespecífica nas primeiras 4 horas. Neste trabalho, esta resposta inflamatória inespecífica foi significativamente menor no grupo portador de tumor do que no grupo

controle. Como os animais estavam imunizados, após 12 horas da injeção do BCG aparece a resposta inflamatória tardia. Também esta hipersensibilidade tardia esteve diminuída nos animais portadores de tumor, como se observa na análise dos resultados de 12, 24 e 48 horas após a administração do BCG, fato este que pode ser explicado por uma diminuição da atividade dos linfócitos T efetores mediada por uma série de substâncias sintetizadas pela célula tumoral, ainda não muito bem definidas na literatura.

Os dados da literatura sobre a relação entre BCG e tumor mostram-se bastante controversos. Enquanto nossa experiência mostra que tanto a resposta inflamatória inespecífica quanto a hipersensibilidade tardia ao BCG em animais portadores de tumor é significativamente menor em comparação a um grupo controle, Parr et al. (8) descreveram uma ação anti-tumoral em animais exercida por um tratamento prévio com BCG e correlacionam tal fato a um recrutamento específico de células T aos sítios crônicos da inflamação. Key e Hanna (5) demonstraram em animais o aparecimento de imunidade sistêmica tumoral com o uso de vacinas de BCG e células de hepatocarcinoma L10; para estes autores, quanto maior o processo inflamatório pós-aplicação vacinal, maior a aquisição de resistência ao tumor. Estudos realizados no Instituto Butantã de São Paulo (3) utilizando ratos "nude" tratados com linhagem tumoral humana e que receberam BCG oito dias antes da inoculação do tumor, apresentaram diminuição da pega tumoral, de incidência de metástases e aumento da sobrevivência dos animais portadores de tumor.

Na evolução clínica do animal portador de tumor, quando

a capacidade de resposta do hospedeiro está suficientemente reduzida, há o colapso das defesas do animal e as células tumorais se multiplicam rapidamente explicando a súbita deterioração do quadro clínico, o que é muito evidente na evolução do tumor de Walker.

Correlacionando as observações clínicas e os resultados experimentais, pode-se pensar que as células tumorais desencadeiam algum mecanismo no animal que impede as reações do hospedeiro a agentes agressivos. Entre estes mecanismos podemos inicialmente supor a liberação de corticóides pela supra-renal do animal, observação que ainda necessita de maiores investigações.

Outra possibilidade seria a secreção de algum fator pela célula tumoral que inibisse macrófagos ou impedisse a produção de linfocinas (11).

CONCLUSÕES

5.1. Ratos portadores de tumor de Walker ascítico, no período de 48 horas antes do óbito, apresentam diminuição na capacidade de resposta inflamatória a agentes agressivos.

5.2. Camundongos portadores de tumor de Ehrlich ascítico, apresentam diminuição na capacidade de resposta inflamatória inespecífica ao BCG.

5.3. Camundongos portadores de tumor de Ehrlich ascítico, têm resposta diminuída no teste de hipersensibilidade ao BCG.

ZYNGIER, S. et al. Alteration on Inflammatory and Immunological Response in Animals Bearing Experimental Tumor. *Arq. med. ABC*, 14(1): 24-27, 1991.

Abstract: The authors have studied in mice bearing Ehrlich's tumor and in rats bearing Walker's tumor the alterations of the response to an inflammatory agent and the modifications of the immunological response, in the same way that in what period it became evident. They have used carrageenan as an inflammatory agent and the delayed hipersensibility BCG-test as immunological parameter. They have concluded that animals bearing tumor decrease their capacity to response inespecifically to carrageenan and to BCG and in specifically way to BCG.

Key words: inflammatory response; immunological response; delayed hipersensibility; tumor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALEXANDER, P. On the nature of tumor-specific transplantation type antigens. *Exp. Cell. Biol.*, 44:184, 1976.
2. BUREAU, J.P.; SENELAR, R. & CUPISSOL, D. Plasma transferable inhibition of BCG induced subcutaneous inflammatory in humam cancer. *J. Pathol.*, 133:215-7, 1981.
3. DENAROMACHADO, L.; MACHADO, J.C.; OGATA, T.R.P.; KFOURI, S.A.; PETRELLA, S.M.C.N.; CARDOZO, B.S.; PERES, C.A. & BARROS, M.R. Ação do BCG na imunoterapia ativa de ratos "nude" recém-nascidos heterotransplantados com linhagem tumoral humana (KB). *Acta Oncol. Bras.*, 8:90-4, 1988.
4. GOLDSTEIN, A. *Biostatistics - an introductory text* The Macmillan Company, New York, 1967.
5. KEY, M.E. & HANNA, M.G. Jr. Mechanisms of action of BCG-tumor cell vaccines in the generation of systemic inflammatory response on immune reactivity. *JNCL*, 67(4):683-9, 1981.
6. NORMANN, S.J. & CORNELIUS, J. Concurrent depression of tumor macrophages infiltration and systemic inflammation by progressive cancer growth. *Cancer Res.*, 38:3453-9, 1978.
7. NORMANN, S.J.; SCHARDT, M. & SORKIN, E. Anti-inflammatory effect of spotaneous lymphoma in SJL/J mice. *JNCL*, 63 (3):825-32, 1979.
8. PARR, I.B.; WHEELER, E. & ALEXANDER, P. Selective mobilization of specifically cytotoxic T-lymphocytes of sites of inflammation in relation to BCG-induced resistance to implants of syngeneic sarcoma in mice. *JNCL*, 59 (6):1659-66, 1977.
9. TOTTERMAN, T.; HAYRY, P.; SAKSELA, E.; TIMONEM, T. & EKLUND, E. Cytological and functional analysis of inflammatory infiltrates in humam malignant tumor II. Functional investigations of the infiltrating inflammatory cells. *Eur. J. Immunol.*, 8:872-5, 1978.
10. TURK, J.L. *Delayed hipersensibility* Elsevier, Amsterdam 1980.
11. WAITZBERG, D.L.; GONÇALVES, E.L.; DUARTE, A.J.S.; FAINTUCH, J.; ROCHA, C.L. & BEVILACQUA, L.R. Modificação da resposta cutânea ao teste de hipersensibilidade tardia em desnutrição e câncer: Estudo experimental. *Acta Oncol. Bras.*, 9:54-62, 1989.
12. WINDER, C.V.; WAX, J. & BEEN, M.A. Rapid foot volume measurement of unanesthetised rats and the question of the phenylbutazone effect and anaphylatoid edema. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 112:144-85, 1957.

Endereço para correspondência:

Marco A. Scarpinella Bueno
Rua Bela Cintra, 1714 ap.102 01415 São Paulo SP