

**Trabalho premiado em pesquisa clínica ou experimental ou apresentação de casuística
no XIV COMUABC no Prêmio Nylceo Marques de Castro**

— 2.º LUGAR —

“EFEITOS ANTI-TUMORAIS DE DROGAS ANTI-H2” *

“Anti-neoplastic effects of the histamine type-2 receptor antagonists”

ZYNGIER, Szulim B. **
FEDER, David ***
KRYBUS, Jenny ****
SCARPINELLA BUENO, Marco A. ****
SERIKAWA, Milton Jr. ****
PEROBA, Maurício A.B. ****
VICENTE, Vera L. ****

RESUMO: Os autores estudaram a sobrevida de camundongos inoculados com o tumor de Ehrlich e concluíram que a famotidina e a ranitidina aumentam a sobrevivência destes animais. Os autores também descreveram que a cimetidina, famotidina e a ranitidina não alteram a hipersensibilidade tardia ao BCG.

UNITERMOS: tumor de Ehrlich *; sobrevida; hipersensibilidade tardia; drogas anti-H2 *.

1. INTRODUÇÃO

Os bloqueadores histamínicos H2 são amplamente usados em distúrbios clórido-pépticos (17).

Para a cimetidina foram descritos efeitos imunomoduladores (2, 7, 12, 13, 14, 15).

Vários autores relataram efeitos de aumento de sobrevida em animais inoculados com tumores experimentais (7, 11) e na clínica médica em pacientes portadores de melanoma (8, 9), micose fungóide (16) e carcinoma broncogênico (1) após o tratamento com cimetidina.

A droga atuando sobre linfócitos “T” ativados aumentaria a produção de linfocinas que exerceriam o efeito anti-tumoral (12).

Quanto à ranitidina e famotidina, produtos de uso clínico recente (5), não foram relatados efeitos anti-tumorais.

1.1. Objetivos

A. Estudar os efeitos da ranitidina e famotidina sobre a evolução do tumor de Ehrlich.

B. Verificar os efeitos da cimetidina, ranitidina e famotidina sobre a resposta imunológica através do teste de hipersensibilidade tardia ao BCG.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Tanto para a verificação do aumento de sobrevida quanto para o teste de hipersensibilidade tardia foram usados camundongos fêmeas, isogênicas, Balb/c, pesando em média 20 gramas.

2.1. Verificação do aumento de sobrevida:

O tumor de Ehrlich foi mantido na forma ascítica. Após retirar-se assepticamente o líquido peritoneal, preparou-se uma diluição com solução fisiológica que contivesse 500.000 células/0,1 ml. O número de células/ml foi estipulado por leitura na câmara de Neubauer após corar-se uma alíquota do líquido peritoneal com solução de Turk.

Foi utilizado um grupo controle (grupo 1) com 26 camundongos e dois grupos tratados (grupos 2 e 3) com 25 camundongos cada. Em todos os grupos foram inoculados 0,1 ml de diluição do tumor de Ehrlich (500.000 células) por via intra-peritoneal (IP). O grupo controle recebeu 0,1 ml de solução fisiológica por via intra-muscular (IM) três vezes por semana. O grupo 2 recebeu famotidina (50 mg/kg) IM três vezes por semana. O terceiro grupo recebeu ranitidina (62,5 mg/kg) IM três vezes por semana.

Os grupos foram observados diariamente por 31 dias, registrando-se o número de óbitos por dia.

Foram organizadas as tábuas de sobrevida (4), as quais foram analisadas pelo teste do Chi-quadrado (χ^2) (18). O nível de significância adotado foi $P < 0,05$.

2.2. Teste de hipersensibilidade tardia ao BCG

Utilizaram-se 54 camundongos separados em 9 grupos numerados de 1 a 9. Cada grupo contendo 6 animais (Tab. 1).

TABELA I

Estrutura dos grupos e respectivos regimes de aplicação

Grupos	Imunização dia 0	dia 20	Teste dia 21
1	—	—	BCG
2	BCG	—	BCG
3	BCG	Cim	BCG
4	BCG	Ran	BCG
5	BCG	Fam	BCG
6	—	—	Car
7	—	Cim	Car
8	—	Ran	Car
9	—	Fam	Car

Cim = cimetidina
Ran = ranitidina
Fam = famotidina
Car = carragenina

* Trabalho realizado na disciplina de Farmacologia da Faculdade de Medicina da Fundação ABC.

** Professor Titular da Faculdade de Medicina da Fundação ABC.

*** Professor Auxiliar de Ensino da Faculdade de Medicina da Fundação ABC.

**** Acadêmicos da Faculdade de Medicina da Fundação ABC.

A imunização foi feita com onco-BCG oral 500 mg — Instituto Butantã de São Paulo (100 mg/ml). Foram injetados 20 ul na face plantar da pata esquerda posterior dos animais dos grupos 2, 3, 4 e 5 (Tab. 1).

Vinte dias após a imunização foram administradas as drogas anti-H₂. Aos grupos 3 e 7, foram administrados 100 mg/kg de cimetidina (IP); aos grupos 4 e 8, 62,5 mg/kg de ranitidina (IP) e aos grupos 5 e 9, 50 mg/kg de famotidina (IP).

Vinte e um dias após a imunização a espessura do coxim plantar da pata posterior direita de todos os camundongos foi medida com o auxílio de um paquímetro de precisão (centésimos de milésimos). Em seguida foram injetadas as doses testes de BCG nos grupos 2, 3, 4 e 5 e o BCG do grupo 1 (Tab. 1). Estas injeções foram feitas com o BCG diluído a 1:10 (20 ul) na face plantar da pata posterior direita. Os grupos 6, 7, 8 e 9 (Tab. 1) receberam 300 ug de carragenina (20 ul) na face plantar da pata posterior direita. Esta droga foi utilizada como

agente inflamatório inespecífico para ser controle da inflamação por BCG.

A espessura do coxim plantar da pata direita foi medido nos intervalos de 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas da injeção teste. As medidas obtidas em cada animal foram subtraídas da medida controle.

As medidas assim obtidas foram analisadas por análise de variância a um critério (3). As medidas das diferenças foram comparadas pelo teste de Schéffe (3). O nível de significância foi $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Sobrevida

A evolução dos camundongos portadores de tumor de Ehrlich dos grupos controle e tratados estão nas tabelas 2 e 3.

TABELA II

Tábua de sobrevida dos camundongos do grupo controle e do grupo famotidina

Dias	SORO FISIOLÓGICO					FAMOTIDINA				
	N.º de Camundongos	N.º de óbitos	Probabil. de óbito	Probabil. de sobrevida	Sobrevida até o período	N.º de camundongos	N.º de óbitos	Probabil. de óbito	Probabil. de sobrevida	Sobrevida até o período
21	26	0	0,000	1,000	1,000	25	1	0,040	0,960	1,000
22	26	0	0,000	1,000	1,000	24	0	0,000	1,000	0,960
23	26	0	0,000	1,000	1,000	24	0	0,000	1,000	0,960
24	26	0	0,000	1,000	1,000	24	0	0,000	1,000	0,960
25	26	0	0,000	1,000	1,000	24	0	0,000	1,000	0,960
26	26	0	0,000	1,000	1,000	24	1	0,042	0,958	0,960
27	26	1	0,038	0,961	1,000	23	6	0,261	0,739	0,920
28	25	12	0,480	0,520	0,961	17	4	0,235	0,765	0,680
29	13	12	0,923	0,077	0,500	13	7	0,538	0,461	0,520
30	1	1	1,000	0,000	0,038	6	2	0,333	0,667	0,240
31	0	0	0,000	0,000	0,000	4	0	0,000	1,000	0,160

TABELA III

Tábua de sobrevida dos camundongos do grupo controle e do grupo ranitidina

Dias	SORO FISIOLÓGICO					RANITIDINA				
	N.º de camundongos	N.º de óbitos	Probabil. de óbito	Probabil. de sobrevida	Sobrevida até o período	N.º de camundongos	N.º de óbitos	Probabil. de óbito	Probabil. de sobrevida	Sobrevida até o período
21	26	0	0,000	1,000	1,000	25	0	0,000	1,000	1,000
22	26	0	0,000	1,000	1,000	25	0	0,000	1,000	1,000
23	26	0	0,000	1,000	1,000	25	0	0,000	1,000	1,000
24	26	0	0,000	1,000	1,000	25	0	0,000	1,000	1,000
25	26	0	0,000	1,000	1,000	25	1	0,040	0,960	1,000
26	26	0	0,000	1,000	1,000	24	2	0,083	0,917	0,960
27	26	1	0,038	0,961	1,000	22	2	0,091	0,909	0,880
28	25	12	0,480	0,520	0,961	20	3	0,150	0,850	0,800
29	13	12	0,923	0,077	0,500	17	6	0,353	0,647	0,680
30	1	1	1,000	0,000	0,038	11	0	0,000	1,000	0,440
31	0	0	0,000	0,000	0,000	11	0	0,000	1,000	0,440

Até o vigésimo dia após a inoculação todos os animais estavam vivos. No trigésimo primeiro dia todos os animais do grupo controle haviam morrido enquanto que no grupo onde foi administrada a famotidina 4 (16%) continuavam vivos e no grupo que recebeu ranitidina 11 (44%) estavam vivos.

As proporções de sobreviventes analisadas pelo teste do Chi-quadrado (Tab. 4) foram significativamente maiores nos grupos tratados, mostrando que as drogas alteram significativamente a sobrevivência dos animais em comparação com o grupo não tratado.

TABELA IV

Relação entre o número de animais vivos e mortos nos grupos controle (soro fisiológico) e teste.

Período	Soro fisiológico		Ranitidina		Famotidina	
	Vivos	Mortos	Vivos	Mortos	Vivos	Mortos
27	25	1	20	5	17	8
28	13	13	17	8	13	12
29	1	25	11	14	6	19
30	0	26	11	11	4	21
			X ² = 12,44 (3gl)		X ² = 22,62 (3gl)	
			P < 0,01		P < 0,01	

3.2. Imunização

Na tabela 5 são apresentadas as médias das diferenças de espessura dos coxins plantares em relação à medida controle.

A análise de variância mostrou que não houve diferença significativa nos resultados obtidos.

4. DISCUSSÃO

O aumento de sobrevivência de animais e pacientes portadores de tumores foi descrito (1, 7, 8, 9, 16) para cimetidina. Este efeito foi relacionado por diversos autores à presença de receptores H₂ em linfócitos (6, 20).

Os receptores H₂ dos linfócitos na presença de histamina diminuiriam a produção de linfocinas, inibiriam as ações dos linfócitos "T" citotóxicos e estimulariam a ação de linfócitos "T" supressores (8,20).

Sob este aspecto é de se supor que outras drogas com atividade anti-H₂, como a cimetidina, exerceriam os mesmos efeitos desta, isto é, proliferação linfocitária, aumento na produção de linfocinas, inibição dos linfócitos "T" supressores e estimulação dos linfócitos "T" citotóxicos e conseqüente proteção do animal portador de tumor.

Neste trabalho confirmamos o aumento de sobrevivência de animais portadores de tumor de Ehrlich quando tratados por drogas anti-H₂ de uso mais recente como a ranitidina e a famotidina.

Tentamos comprovar a hipótese do aumento de linfocinas pela administração dos agentes anti-H₂. Para

TABELA V

Média das diferenças de espessura dos coxins plantares em relação à medida inicial (em centésimos de milímetros)

Grupos	X e regime de aplicação	horas	4	8	12	24	48	72
1	— / — /BCG		71,0	70,0	63,6	83,6	59,0	51,3
2	BCG/ — /BCG		79,0	59,3	95,0	123,3	85,6	46,3
3	BCG/Cim/BCG		78,0	104,6	134,6	157,3	94,6	43,3
4	BCG/Ran/BCG		69,6	98,3	83,0	105,6	66,6	46,3
5	BCG/Fam/BCG		110,6	112,3	95,6	107,3	72,3	63,0
6	— / — /Car		95,0	87,0	74,6	92,3	68,3	48,3
7	— /Cim/Car		82,6	88,3	71,0	92,0	62,0	40,0
8	— /Ran/Car		73,1	69,5	65,8	62,8	59,5	48,8
9	— /Fam/Car		76,3	65,6	67,0	67,3	76,3	46,6
	dia: 0	20	21					

X = média
Cim = cimetidina
Ran = ranitidina
Fam = famotidina
Car = carragenina

isto escolhemos um teste de hipersensibilidade tardia (19). Esta prova baseia-se na imunização de camundongos por BCG e no estudo da resposta a uma segunda administração de BCG vinte e um dias após a imunização. Esperava-se que a presença aumentada de linfócitos aumentaria ainda mais a espessura da pata do animal após a injeção do BCG-teste. Comparando-se os resultados verificou-se que tanto o BCG quanto a carragenina provocaram, como esperado, uma inflamação no lugar injetado. O grupo que recebeu apenas o BCG-teste, a inflamação regrediu após 12 horas. No grupo imunizado previamente com BCG a evolução do edema ocorreu até as 24 horas, regredindo paulatinamente após. Nos grupos imunizados com BCG e que receberam cimetidina, famotidina e ranitidina o comportamento foi idêntico ao do grupo apenas imunizado com BCG, isto é, a análise de variância não demonstrou qualquer diferença na evolução do edema no grupo apenas imunizado com BCG e os grupos tratados. Estas drogas também não alteraram a evolução do edema provocado pela carragenina.

Pelos resultados obtidos não podemos relacionar o aumento de sobrevida dos animais portadores do tumor de Ehrlich tratados com agentes anti-H₂ com alterações imunológicas que estas drogas provocariam.

5. CONCLUSÕES

1. A famotidina e ranitidina aumentam a sobrevida dos animais portadores de tumor de Ehrlich.

2. A famotidina, ranitidina e cimetidina não alteram a evolução do edema provocado pela injeção local de BCG em animais previamente imunizados. Também não alteram a evolução da inflamação inespecífica por carragenina.

SUMMARY: The authors have studied the survival of mice inoculated with Ehrlich's tumor and they have concluded that famotidine and ranitidine increase the survival of these animals. The authors also described that cimetidine, famotidine and ranitidine do not modify the delayed hypersensitivity to BCG.

KEYWORDS: Ehrlich's tumor *; survival; delayed hypersensitivity; histamine type-2 receptor antagonists *.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARMITAGE, J.O.; SIDNER, R.D. Antitumor effect of cimetidine? *Lancet*, 1:882-3, 1979.
2. BARNA, B.P.; HAINES, H.; EDINGER, M.; CHIANG, T. Tumor enhancing effect of cimetidine. *Oncology*, 40:43-5, 1983.
3. BERQUIO et al. Análise de variância. Apostila do Departamento de Estatística Aplicada da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 1963.
4. DRADFOR-HILL, A. *Principles of Medical Statistics*. London, Lancet, 1971.
5. CAMPOLLI-RICHARDS, D.M. et al. Famotidine-Pharmacodynamic and pharmacokinetics properties and a preliminary review of its therapeutics use in peptic ulcer diseases and Zollinger-Ellison syndrome. *Drugs*, 32:196-221, 1986.
6. DIJK, H.V.; RAPIS M.; JACOBSE-GEELS, H.E.; WILLERS J.M.N. Histamine-2 receptor mediated immunomodulation in the mouse. *Clin. Exp. Immunol.*, 35:470-7, 1979.
7. DZIK, A.; FEDER, D.; REIS, E.; REIS, G.C.; ZYNGIER, S.B. Estudo da cimetidina na sobrevida de animais inoculados com tumor de Ehrlich. *Anais do X Congresso Médico Universitário do ABC*, 1985, p. 25.
8. ERSHLER, W.B.; HACKER, M.P.; BURROUGHS, B.J.; MOORE, A.L. MYERS, C.F. In vivo augmentation of nonspecific and specific immune response. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 26:10-7, 1983.
9. FLOGREN, P.; BORGSTROM, S.; JDNSSON, P.E.; LINDSTROM, C. SJOGREN, H.O. Metastatic malignant melanoma: regression induced by combined treatment with interferon and cimetidine. *Int. J. Cancer*, 32:657-65, 1983.
10. GIFFORD, R.R.M.; HATFIELD, S.M. SCHMIDTYKE, J.R. Cimetidine induced augmentation of humman lymphocyte blastogenesis by mitogen bacterial antigen and alloantigen. *Transplantation*, 29:143-8, 1980.
11. GIFFORD, R.R.M.; VOSS, B.B.; FERGUSSON, R.M. Cimetidine protection against lethal tumor challenge in mice. *Surgery*, 90:344-51, 1981.
12. GIFFORD, R.R.M.; TILBERG A.F. Histamine type-2 receptor antagonist immuno-modulation II. Cimetidine and ranitidine increase interleukin-2 production. *Surgery*, 102:242-7, 1987.
13. GIGI, M.R.; AKRIVADIS, E.; AGORASTOS, I. GOULIS, G. Peripheral blood "T" lymphocytes in patients with duodenal ulcers treated with cimetidine. *Clin. Exp. Immunol.*, 48:186-8, 1982.
14. JORIZZO, J.L.; SAMS, W.M.; JEGASOTHY, B.V. OLANSKY, A.J. Cimetidine as an immunomodulation: chronic mucocutaneous candidiasis as a model. *Ann. Intern. Med.*, 92:192-5, 1980.
15. LIPSEMEYER, E.A. Effect of cimetidine on delayed hypersensitivity. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 16:166-72, 1980.
16. MAMUS, S.W.; MLADENOVIC, J.; HORDINSKY, M.K.; DAHL, M.V. & KAY N.E. Cimetidine induced remission of mycosis fungoides. *Lancet*, 2:409, 1984.
17. SAMPAIO, B.C. et al. Cimetidine. *Arq. Med. ABC*, 2(1):17-9, 1979.
18. SIEGEL, S. *Estatística não paramétrica*. São Paulo, McGraw-Hill, 1977.
19. TURK, J.L. *Delayed hypersensitivity*. 3 ed. New York, Elsevier, 1980.
20. WANG, S.R.; ZWEIMAN, B. Histamine supression of human lymphocyte response to mitogens. *Cell Immunol.*, 36:28-36, 1978.

Endereço para correspondência:

"Efeitos anti-tumorais de drogas Anti-H₂"

Szulim Ber Zyngier

Faculdade de Medicina da Fundação do ABC

Av. Príncipe de Gales, 821 — CEP 09000 — Santo André — SP