

ESTRÓGENO EM TUMOR DE EHRLICH: ESTUDO DA SOBREVIDA E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA

Estrogen in Ehrlich's Tumor: Survival Study and Immune Response Evaluation

Eduardo Baiocchi *
Jandey da Glória Bigonha *
Roberto Ezequiel Heymann *
David Feder **
Myrian Cabral ***
Szulim Ber Zyngier ****

RESUMO: Os autores estudaram a sobrevivência de camundongos inoculados com tumor de Ehrlich na vigência de tratamento estrogênico, e concomitantemente fizeram uma avaliação da atividade imunológica em um grupo paralelo. Os autores concluíram que os estrógenos aceleraram a mortalidade de camundongos machos portadores de tumor de Ehrlich e não provocavam alterações no número de macrófagos e atividade fagocitária em resposta à inflamação. Os camundongos que receberam tumor de Ehrlich também não apresentaram diferenças em relação ao grupo de camundongos normais.

UNITERMOS: Tumor de Ehrlich, Estrógeno, Resposta Imunológica, Macrófago.

SUMMARY: The authors have studied the survival of mice under estrogen treatment and inoculated with Ehrlich's tumor. Concomitantly they evaluated in a collateral group the immunological activity. The authors have concluded that estrogen accelerated the male mice mortality with Ehrlich's tumor, but did not demonstrate in macrophage number and phagocytosis activity. The group of mice that received Ehrlich's tumor did not show differences with the normal mice group.

KEY WORDS: Ehrlich's tumor, Estrogen, Immune response, Macrophage.

INTRODUÇÃO

1.1.— Considerações Gerais

1.1.1. — Tumor e Defesa Imunológica

O aparecimento e a evolução de tumores tem sido relacionados por diversos autores^{5,10} com alterações do estado imunológico do hospedeiro. Assim, a depressão de defesas imunológicas facilitaria a multiplicação de células neoplásicas que em condições híidas seriam destruídas, levando ao desenvolvimento do tumor. Quanto mais deprimidas as respostas imunes, mais facilmente as células neoplásicas prevaleceriam levando mais depressa o hospedeiro ao êxito fatal. A explicação para a evolução de tumores transplantáveis baseia-se em raciocínio semelhante. Assim, se o tumor transplantado tiver grande velocidade de crescimento, vencerá a corrida contra a capacidade de resposta linfóide⁴ ou ainda poderão surgir anticorpos "protetores" das células tumorais ensejando finalmente um "colapso" das defesas do organismo^{4,5,10}.

1.1.2. — Estrógeno: Relação com o Sistema Imunológico e Importância na Evolução dos Tumores

O estudo da ação de drogas sobre o sistema imunológico tem evidenciado o aumento dessas defesas pelo uso de estrógenos.

Esses hormônios provocariam aumento do número total de macrófagos e induziriam maior porcentagem dessas células à fagocitose⁷ e aumentariam ainda a capacidade fagocitária de cada macrófago^{6,7}. Berstad³ preconiza o emprego de

estrógenos no tratamento de qualquer tumor quando o portador apresenta exames indicativos de queda na atividade fagocitária de seus macrófagos. O mesmo autor sugere que os benefícios obtidos pelo uso desses hormônios no câncer de próstata são devidos ao aumento da resistência imunológica.

A prática clínica, no entanto, reconhece que outros tumores ditos hormônios dependentes, como os carcinomas de mama e de endométrio podem se desenvolver melhor na presença de estrógenos. Assim os oncologistas recomendam que após exérese de um câncer mamário, a peça seja submetida a uma dosagem de receptores de estrógenos. Quanto maior o número de receptores encontrados, mais enérgicas deverão ser as medidas para inibir os estrógenos. Entre essas medidas destacam-se a castração e o uso de drogas anti-estrogênicas.

Chega-se assim a uma aparente contradição. Os estrógenos por um lado aumentariam as defesas imunológicas e por outro lado facilitaríamos o desenvolvimento do tumor de mama hormônio-dependente, rico em receptores de estrógenos. Diversas hipóteses poderiam explicar esse fato dos quais destacam-se:

- a) As células tumorais em contacto com o hormônio aumentariam o seu desenvolvimento sobrepujando as defesas do sistema imunitário.
- b) Os estrógenos facilitaríamos o aparecimento de anticorpos protetores do tumor.

1.1.3. — O Tumor de Ehrlich

Os registros históricos referem que Ehrlich obteve essas

*Acadêmicos do 4º Ano da Faculdade de Medicina da Fundação do ABC.

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

***Professor Assistente da Faculdade de Medicina da Fundação do ABC.

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

células neoplásicas, a partir de um carcinoma espontâneo de mama de camundongo⁹. Nos sucessivos transplantes em mais de 8 décadas, a neoplasia perdeu a morfologia de adenocarcinoma, sendo atualmente classificado como tumor indiferenciado, isto é, a morfologia de suas células é primitiva não se adaptando às características de carcinoma ou sarcoma⁹.

Uma especulação que se impõe refere-se ao comportamento desse tumor diante de estrógenos. Seria a atual neoplasia hormônio dependente como provavelmente o fora o tumor de mama do qual se originou?

1.2. – Objetivos

1.2.1. – Avaliar a Evolução do Tumor de Eherlich na Presença de Estrógenos. O estudo poderia fornecer uma idéia sobre possíveis características estrógeno-dependentes desse tumor.

1.2.2. – Avaliar as Alterações da Resposta Imunológica do Hospedeiro na Presença do Par: Tumor de Ehrlich-Estrógeno

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado usando-se camundongos machos, raça Suiça, pesando entre 20 e 30g.

O tumor de Ehrlich foi mantido por transplantes na forma ascítica. Para a experiência, o líquido ascítico foi retirado assepticamente. Uma alíquota foi corada pelo líquido de Türk e o número de células/ml determinado por leitura na câmara Neubauer. Preparou-se uma diluição com solução fisiológica, que contivesse 5×10^5 células/0,1 ml.

A forma sólida do tumor, usado nesse trabalho, foi obtida pela injeção de 0,1ml da diluição de células, no subcutâneo da coxa dos camundongos.

O estrógeno usado foi hexahidrobenzoato de estradiol na dose de 2mg/kg. O hormônio foi administrado em volume de 0,1 ml por via subcutânea na coxa livre de tumor, a intervalos de 7 dias, por ser essa substância de excreção lenta. A dose de 2 mg/kg foi escolhida após experiências prévias nas quais se constatou que esse regime de aplicação a camundongos hígidos durante 50 dias ensejava uma proporção de mortos praticamente igual à de um lote de camundongos que recebia injeção semanal de solução fisiológica.

Como o hexahidrobenzoato de estradiol não é solúvel em água, o seu solvente (gentilmente fornecido pelo Laboratório fabricante) foi utilizado em estudos prévios, não se observando alterações significativas quando comparado com animais que recebiam solução fisiológica.

Em todos os testes estatísticos utilizados, o nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

2.1. – Influência do estrógeno na evolução da mortalidade de camundongos portadores de tumor de Ehrlich

Dois grupos de 55 camundongos cada foram inoculados com tumor de Ehrlich.

Ao primeiro grupo aplicou-se 0,1ml subcutâneo de solução fisiológica semanalmente. O segundo grupo recebeu 0,1 ml subcutâneo de hexahidrobenzoato de estradiol em injeções semanais.

Os animais foram observados durante 50 dias. As proporções de mortos de cada grupo foram analisadas pelo teste de Kohmogorov-Smirnov para duas amostras independentes⁸.

2.2. – Avaliação da resposta imunológica

Foi realizada a partir da injeção intraperitoneal em camundongos de um agente inflamatório, o tioglicolato de sódio. Estudou-se a resposta dos animais quanto ao número de células no exsudato, número de macrófagos, número de macrófagos que fagocitaram e intensidade da fagocitose. Detalhes da técnica podem ser encontrados em Baehner¹.

Cada camundongo recebeu, 96 horas antes do experimento, uma injeção intraperitoneal de 0,5 ml de tioglicolato de sódio a 3%. Sabe-se que após o 4º dia da injeção do agente inflamatório, a parte celular do exsudato com capacidade fagocitária consiste quase exclusivamente de macrófagos. Decorridas 96 horas da injeção do agente inflamatório, administrou-se por via intraperitoneal 0,2ml de NBT 0,1% (Nitro blue tetrazolium), uma substância de cor amarela que exposta à luz ou quando fagocitada, se reduz adquirindo cor azul escura. Decorridos 40 minutos dessa injeção o animal foi anestesiado com éter e esgorgitado. A seguir injetou-se na cavidade peritoneal 2,5 ml de solução fisiológica e após 30 segundos recolheu-se da cavidade todo o líquido disponível com material de plástico. Anotou-se o volume total obtido.

O líquido recolhido foi distribuído em três frascos, devidamente protegidos da luz. Um frasco continha cristal violeta e serviu para contagem global de células e contagem diferencial (macrófagos, polimorfonucleares, linfócitos e mastócitos). Outro frasco sem corante, foi usado para a determinação da porcentagem de macrófagos que apresentavam o corante no seu interior, isto é, que fagocitaram. O conteúdo do terceiro frasco foi submetido a extração e dosagem do corante fagocitado de acordo com o seguinte procedimento: centrifugação a 1000 rpm por 5 minutos, e desprezado o sobrenadante. O concentrado de células obtido foi submetido a ação da piridina (2 ml) por 20 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, foi submetido a leitura em espectrofômetro em 560 nm. Conhecida a quantidade de corante extraído, isto é, fagocitado, obteve-se um índice, que foi chamado de "índice fagocitário", pela relação $\frac{\text{quantidade fagocitada de NBT}}{\text{número de macrófagos que fagocitaram}}$.

A avaliação das respostas imunológicas foi realizada em quatro grupos de animais, entre os dias 20 e 25 do início da experiência, isto é, da inoculação do tumor.

2.2.1. – Grupo "controle": 7 animais sem tumor, tratados semanalmente com injeção subcutânea de 0,1 ml de solução fisiológica.

2.2.2. – Grupo "estrógeno": 8 camundongos receberam a cada 7 dias uma injeção subcutânea de 0,1 ml hexahidrobenzoato de estradiol (2,5 mg/kg).

2.2.3. – Grupo "tumor + solução fisiológica": 7 camundongos foram inoculados com tumor de Ehrlich e tratados semanalmente com injeção subcutânea de 0,1 ml de solução fisiológica.

2.2.4. – Grupo "tumor + estrógeno": 5 camundongos foram inoculados com tumor de Ehrlich e tratados semanalmente com injeção subcutânea de 0,1 ml de hexahidrobenzoato de estradiol (2,5 mg/kg).

Os resultados foram estudados por análise de variância a um critério seguido de comparações pelo método de Scheffé²

no que se refere ao número total de células, número total de macrófagos e número de macrófagos que fagocitaram o corante. Os resultados do "índice fagocitário" foram submetidos ao método não paramétrico de Kruskal-Wallis⁸.

RESULTADOS

3.1. — Influência do Estrógeno na Evolução da Morta-

lidade de Camundongos portadores de Tumor de Ehrlich

A TABELA I apresenta a evolução da proporcionalidade de mortos no grupo controle (tratado com solução fisiológica) e no grupo tratado com hexahidrobenzoato de estradiol. O teste de Kohmogorov-Smirnov para duas amostras revela diferença significativa entre os grupos. Pode-se concluir que o tratamento com o estrógeno acelera o óbito entre os camundongos portadores de tumor de Ehrlich.

TABELA I

Proporção de mortos nos grupos inoculados com Tumor de Ehrlich e tratados respectivamente com solução fisiológica e estrógeno. Os grupos foram comparados pelo teste de Kohmogorov-Smirnov para duas amostras.

DIAS	TUMOR + SOLUÇÃO FISIOLÓGICA			TUMOR + ESTRÓGENO			KOHMOGOROV-SMIRNOV GRANDE AMOSTRA
	NÚMERO DE ANIMAIS SOBREVIVENTES	ÓBITOS	PROPORÇÃO DE ÓBITOS	NÚMERO DE ANIMAIS SOBREVIVENTES	ÓBITOS	PROPORÇÃO DE ÓBITOS	
1	55	0	0/55	55	5	5/55	0,09
3	55	0	0/55	50	0	5/55	0,09
5	55	0	0/55	50	0	5/55	0,09
7	55	0	0/55	50	0	5/55	0,09
9	55	0	0/55	50	0	5/55	0,09
11	55	0	0/55	50	1	6/55	0,11
13	55	0	0/55	49	2	8/55	0,14
15	55	0	0/55	47	0	8/55	0,14
17	55	0	0/55	47	7	15/55	0,27
19	55	0	0/55	40	7	22/55	0,40
21	55	0	0/55	33	3	25/55	0,45
23	55	2	2/55	30	3	28/55	0,47
25	53	2	4/55	27	1	29/55	0,45
27	51	1	5/55	26	3	32/55	0,49
29	50	0	5/55	23	1	33/55	0,51
31	50	3	8/55	22	3	36/55	0,51
33	47	1	9/55	19	5	41/55	0,58
35	46	1	10/55	14	1	42/55	0,58 < 0,05
37	45	1	11/55	13	1	43/55	0,58
39	44	5	16/55	12	4	47/55	0,56
41	39	4	20/55	8	4	51/55	0,56
43	35	0	20/55	4	0	51/55	0,56
45	35	6	26/55	4	1	52/55	0,47
47	29	10	36/55	3	1	53/55	0,31
49	19	2	38/55	2	2	55/55	0,31
51	17			0			

$$\alpha \text{ crítico } 0,05 \text{ bicaudal: } 1,36 \sqrt{\frac{n1+n2}{n1 \cdot n2}} = 1,36 \sqrt{\frac{110}{55 \times 55}} = 0,26$$

3.2. – Avaliação da Resposta Imunológica

3.2.1. – Grupo “Controle” (Sem Tumor e Tratado com S.F.)

Os resultados da avaliação da resposta imunológica neste grupo estão na TABELA 2 abaixo:

CAMUNDONGOS	NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS NO EXSUDATO ($\times 10^6$)	NÚMERO DE MACRÓFAGOS ($\times 10^6$)	NÚMERO DE MACRÓFAGOS QUE FAGOCITARAM ($\times 10^6$)	ÍNDICE FAGOCITÁRIO ($\times 10^{-6}$)	
1	9,20	7,36	2,06	0,25	ÍNDICE FAGOCITÁRIO
2	3,80	2,70	1,50	0,35	
3	9,00	7,20	3,70	0,50	= <u>QTDE. FAGOCITADA</u>
4	10,40	8,50	3,58	0,13	Nº DE MACRÓFAGOS
5	2,30	1,79	0,64	1,50	QUE FAGOCITARAM
6	4,00	3,44	1,00	5,00	
7	1,50	1,14	0,33	39,00	
MÉDIA \pm SEM	5,74 \pm 1,39	4,59 \pm 1,14	1,83 \pm 0,51	6,67 \pm 5,43	

TABELA 2 – AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA NO GRUPO “CONTROLE”

3.2.2. – Grupo “Estrógeno”

Na TABELA 3, abaixo, encontra-se a avaliação da resposta imunológica neste grupo.

CAMUNDONGOS	NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS NO EXSUDATO ($\times 10^6$)	NÚMERO DE MACRÓFAGOS ($\times 10^6$)	NÚMERO DE MACRÓFAGOS QUE FAGOCITARAM ($\times 10^6$)	ÍNDICE FAGOCITÁRIO ($\times 10^{-6}$)	
1	17,50	11,00	2,70	5,00	ÍNDICE FAGOCITÁRIO
2	7,80	5,00	1,70	1,10	
3	20,00	14,40	3,30	0,90	= <u>QTDE. FAGOCITADA</u>
4	20,70	18,00	3,20	0,50	Nº DE MACRÓFA-
5	5,10	3,90	1,35	0,37	GOS QUE FAGOCI-
6	8,20	3,20	1,44	9,70	TARAM
7	7,10	5,18	2,74	0,72	
8	8,00	5,92	1,70	0,29	
MÉDIA \pm SEM	11,80 \pm 2,27	8,32 \pm 1,94	2,27 \pm 0,28	2,32 \pm 1,19	

TABELA 3 – Avaliação da Resposta Imunológica no Grupo “Estrógeno”.

3.2.3. – Grupo “Tumor + Solução Fisiológica”

Os resultados da avaliação da resposta imunológica neste grupo estão na TABELA 4, abaixo:

CAMUNDONGOS	NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS NO EXSUDATO (x 10 ⁶)	NÚMERO DE MACRÓFAGOS (x 10 ⁶)	NÚMERO DE MACRÓFAGOS QUE FAGOCITARAM (x 10 ⁶)	ÍNDICE FAGOCITÁRIO (x 10 ⁻⁶)	
1	2,30	1,50	0,36	100,00	ÍNDICE FAGOCITÁRIO
2	1,00	0,62	0,22	160,00	
3	3,36	2,60	1,00	0,50	= QTDE. FAGOCITADA
4	4,80	3,80	1,39	9,35	Nº DE MACRÓFAGOS
5	7,20	4,30	1,49	2,00	QUE FAGOCITARAM
MÉDIA ± SEM	3,73 ± 1,07	2,56 ± 0,69	0,89 ± 0,26	54,36 ± 32,33	

TABELA 4 – Avaliação da Resposta Imunológica no Grupo “Tumor = Solução Fisiológica”.

3.2.4. – Grupo “Tumor + Estrógeno”

Os resultados da avaliação da resposta imunológica neste grupo estão na TABELA 5:

CAMUNDONGOS	NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS NO EXSUDATO (x 10 ⁶)	NÚMERO DE MACRÓFAGOS (x 10 ⁶)	NÚMERO DE MACRÓFAGOS QUE FAGOCITARAM (x 10 ⁶)	ÍNDICE FAGOCITÁRIO (x 10 ⁻⁶)	
1	5,40	3,88	1,99	4,70	ÍNDICE FAGOCITÁRIO
2	3,00	2,37	1,50	0,66	
3	0,57	0,46	0,30	10,00	= QTDE. FAGOCITADA
4	0,90	0,73	0,50	1,00	Nº DE MACRÓFAGOS
5	6,50	5,90	2,80	0,71	QUE FAGOCITARAM
6	54,00	25,00	12,70	0,86	
7	1,20	0,81	0,37	270,00	
MÉDIA ± SEM	10,22 ± 7,34	5,59 ± 3,32	2,87 ± 1,68	41,13 ± 41,68	

TABELA 5 – Avaliação da Resposta Imunológica no Grupo “Tumor + Estrógeno”.

Os resultados da avaliação da resposta imunológica foram submetidos a análise de variância ou à prova de Kruskal Wallis.

Não houve diferença significativa entre os camundongos

dos grupos “controle”, “estrógeno”, “tumor + S. F.” e “Tumor + Estrógeno” com relação ao número de células no exsudato, número de macrófagos, número de macrófagos que fagocitaram e índice fagocitário.

DISCUSSÃO

4.1. — Influência do Estrógeno na Evolução da Mortalidade de Camundongos portadores de Tumor de Ehrlich

O tratamento com estrógenos de camundongos machos portadores de Tumor de Ehrlich acelerou a mortalidade dos animais em relação ao grupo "controle" tratado com solução fisiológica.

Este fato sugere a possibilidade da neoplasia ser estrógeno-dependente. Esta hipótese é bastante atrativa se for considerado que o tumor de Ehrlich foi originariamente obtido de um carcinoma espontâneo de mama de camundongo⁹.

Outra possibilidade se baseia na hipótese dos estrógenos provocarem um aumento inespecífico da atividade imunitária do animal. Desta forma, haveria formação em maior quantidade de anticorpos protetores de tumor os quais facilitariam o seu desenvolvimento.

4.2. — Influência do Estrógeno na Resposta Imunológica de Camundongos Portadores de Tumor de Ehrlich

A capacidade de resposta imunológica dos camundongos foi avaliada pelos estudos dos macrófagos e sua capacidade fagocitária. A produção de macrófagos era desencadeada por estímulo inflamatório.

Os macrófagos são células auxiliares da resposta imunológica. São de importância fundamental na hipersensibilidade tardia, ou mediada por células⁴. O seu papel pode ser compreendido no seguinte esquema:

linfócito sensibilizado + antígeno $\xrightarrow{\text{liberam}}$ MIF (Macrophage Inhibitor Factor)
 macrófago + MIF \longrightarrow libera enzimas que provocam lesão celular.

Nesse trabalho não foi possível verificar qualquer alteração entre os grupos "controle", "estrógeno", "tumor + so-

lução fisiológica", "tumor + estrógeno" no que se refere a número de macrófagos e sua capacidade fagocitária após estímulo inflamatório.

O estrógeno não protegeu os camundongos portadores de neoplasia, não se demonstrando aumento de capacidade dos macrófagos que viriam a lesar a célula tumoral. Mas não se pode afastar a hipótese do aumento de anticorpos protetores do tumor que facilitariam o desenvolvimento deste e a morte mais rápida para seu hospedeiro.

Em síntese, o aumento na proporção de mortos entre os camundongos portadores de Tumor de Ehrlich tratados com estrógeno podem ter várias explicações especulativas das quais destacam-se:

1) O estrógeno aumenta a produção de anticorpos protetores do tumor.

2) O tumor é estrógeno dependente e teria receptores de estrógenos. Essa hipótese poderá ser melhor estudada pela dosagem de receptores de estrógenos na neoplasia ou pelo tratamento do tumor com drogas anti-estrógenos (tamoxifeno).

3) Um mecanismo desconhecido.

CONCLUSÃO

5.1. — Os estrógenos aceleram a mortalidade de camundongos machos portadores de Tumor de Ehrlich.

5.2. — Não foi demonstrada alteração significativa no número e capacidade fagocitária dos macrófagos em resposta a inflamação de camundongos tratados com estrógenos.

5.3. — Camundongos com Tumor de Ehrlich, tratados com solução fisiológica ou estrógenos, não apresentaram alteração significativa no número e capacidade fagocitária dos macrófagos em resposta a inflamação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — BAEHNER, R. L.; NATHAN, D. G. — *Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease*. *N. Engl. J. Med.*, 278(18): 971-76, 1968.
- 2 — BERQUÓ, E.; MURILLO MARQUES, R. — *Análise de variância* Apostila do Departamento de Estatística Aplicada de Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 1963.
- 3 — BERSTAD, T.; LIAVAG, I.; TAMSFOS, S. — *The effect of operative treatment, chemotherapy and oestrogens on the phagocytic activity of the reticuloendothelial system*. *Acta Chir. Scand*, 138: 557-61, 1972.
- 4 — BIER, O. G.; MOTA, I.; SILVA, D. W. — *Imunologia Básica e Aplicada*, 14 ed., Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1972.
- 5 — BYERS, S. V.; LEVIN, A. — *Tumor Immunology*, in FUNDENBERG, H. H. et al. *Basic and Clinical Immunology*. Chapter 21, Lange Medical Publications — Los Altos, Califórnia, 1976.
- 6 — CORDINGLEY, J. L. — *The mechanism of oestrogen stimulation of reticuloendothelial activity*. *J. Anat.*, 104: 190, 1969.
- 7 — ROBERTS, B. V. — *The effects of steroid hormones on macrophage activity*. *Int. Rev. Cytol.*, 25: 131-59, 1969.
- 8 — SIEGEL, S. — *Estatística não paramétrica*, Editora Mcgraw-Hill do Brasil Ltda., São Paulo, Belo Horizonte, Rio de Janeiro, Porto Alegre, Recife, 1977.
- 9 — STEWART, H. L.; SNELL, K. C.; DUNHAM, L. S.; SCHEYEN, S. M. — *Transmissible and Transplantable tumors in animals in Atlas of tumor pathology*, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, 1959.
- 10 — SÜSS, R.; KINZEL, V.; SCRIBNER, J. D. — *Cancer: experiments and concepts*. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, 1973.