

**INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO DE BCG INTRAPERITONEAL
NA ATIVIDADE DE GELATINASES E NA SOBREVIVÊNCIA DE
CAMUNDONGOS COM TUMOR DE EHRLICH**

GUSTAVO GUERRA JACOB

São Paulo

2004

**INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO DE BCG INTRAPERITONEAL
NA ATIVIDADE DE GELATINASES E NA SOBREVIVÊNCIA DE
CAMUNDONGOS COM TUMOR DE EHRlich**

GUSTAVO GUERRA JACOB

Dissertação apresentada à Fundação Antônio Prudente
para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Oncologia

Orientador:

Prof. Dr. Ademar Lopes

Co-orientadores:

Prof. Dr. José Renan Cunha Melo

Dr. Fábio de Oliveira Ferreira

São Paulo

2004

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa

Hospital do Câncer A. C. Camargo

Jacob, Gustavo Guerra

Evolução clínica e atividade de gelatinases após aplicação intraperitoneal de BCG em camundongos com tumor de Ehrlich. /

Gustavo Guerra Jacob - São Paulo, 2004.

87p.

Dissertação (Mestrado)—Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências—Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Ademar Lopes.

Descritores: 1. CARCINOMATOSE/enzimologia/imunologia/terapia. 2. BCG/uso terapêutico. 3. GELATINASES/análise. 4. CARCINOMA DE EHRLICH/enzimologia/imunologia/terapia.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais – **Oto e Zélia** – e meus irmãos – **Daniel e Marcelo** –, núcleo central do sentido da minha vida, pelo amor incondicional que sempre tornou minhas tristezas menos intensas e minhas alegrias mais duradouras nesta grande jornada.

“O real não está na saída nem na chegada: ele se dispõe para a gente é no meio da travessia”.

João Guimarães Rosa

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ademar Lopes, meu orientador, exemplo a ser seguido pelo carinho e dedicação com que exerce a docência, que me abriu as portas para investigação e conduziu-me a um universo estimulante e cheio de desafios.

Ao Prof. Dr. José Renan da Cunha Melo, meu co-orientador, por acolher-me no Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da UFMG, onde encontrei o Pesquisador, que me ensinou o método. Agradeço pelo constante incentivo, indicando-me a direção a ser tomada nos momentos de maior dificuldade e, principalmente, pela confiança, depositada, no meu trabalho de dissertação.

Ao Dr. Fábio de Oliveira Ferreira, meu co-orientador que contribuiu sobremaneira para minha formação acadêmica.

Aos meus orientadores e professores da pós-graduação que proporcionaram discussão de questões relevantes e importantes desenvolvidas neste trabalho, merecendo minha admiração, respeito e gratidão.

À Helena Lara Resende pelo amor, carinho, compreensão e apoio incondicional.

Ao Dr. Alberto Wainstein e a Dra. Ana Paula Lage, pelo companheirismo e incentivo nas horas em que precisei.

Aos amigos e colegas do curso de pós-graduação da Fundação Antônio Prudente: que experimentaram comigo as angústias e vitórias de um curso de Pós-Graduação.

Aos amigos Fernando Leão, Dr. Ricardo Cabral e Jaqueline Trevisan pela atenção de sempre.

A todos os meus familiares e amigos, que torcem pelo meu sucesso.

Aos amigos Gustavo Miranda, Thaís Carneiro, Guilherme Castro, Helen Viana, Laís Maroni, André Portugal e Marcus Vinícius Andrade companheiros do laboratório, cuja ajuda foi imprescindível para realização deste trabalho.

Aos funcionários da Biblioteca do Hospital do Câncer AC Camargo: Sra. Suely Francisco, Sra. Rosineia Carneiro, Sra Adriana Bassols, Sra. Francyne Lima e Sr. Alessandro Francisco que sempre se dispuseram a ajudar-me.

Aos Professores Dra. Célia Regina Whitaker Carneiro, Dra. Ivete Bedin Prado, Dr. Roger Chammas, Dr. André Murad, pelas excelentes sugestões por ocasião das Bancas de Qualificação.

À Sra. Ana Maria Rodrigues Kuniari, Coordenadora da Pós-graduação da Fundação Antônio Prudente, e à Sra Márcia Miwa Hiratami pela força e incentivo.

À Faculdade de Ciências Médicas de Minas Gerais e seus professores, a quem devo minha formação intelectual e científica.

À Faculdade de Medicina da UFMG e ao Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG pelo apoio ao desenvolvimento do projeto.

À CAPES, pela bolsa de pesquisa concedida.

**“Todo interesse pela doença e morte trata-se apenas de
outra expressão do interesse pela vida”.**

(THOMAS MANN 1929)

RESUMO

Jacob GG. **Evolução clínica e atividade de gelatinases após aplicação intraperitoneal de BCG em camundongos com tumor de Ehrlich.** São Paulo; 2004. [Dissertação de Mestrado – Fundação Antônio Prudente]

INTRODUÇÃO: A disseminação peritoneal do câncer depende da proliferação celular, da degradação da matriz extracelular, da adesão celular, da angiogênese e da resposta imune. As metaloproteinases (MMPs) são capazes de degradar a matriz extracelular e estão relacionadas aos processos de invasão, metastatização e angiogênese das neoplasias. A carcinomatose peritoneal e a ascite neoplásica caracterizam-se pela resposta precária ao tratamento oncológico. A aplicação de BCG intraperitoneal (IP) constitui uma tentativa de estimular o sistema imunitário no local do tumor. Este método foi investigado em relação à evolução clínica e à expressão e atividade de metaloproteinases em camundongos com tumor de Ehrlich.

MATERIAIS E MÉTODOS: Foram realizados dois experimentos distintos. 1) Inoculação IP de 3×10^5 células do tumor de Ehrlich (n=105) para estudar a evolução clínica dos animais e a expressão de MMP-9 nos implantes neoplásicos peritoneais. 2) Inoculação IP de 1×10^7 células do tumor de Ehrlich (n=12) para análise da atividade gelatinolítica (MMP-2 e MMP-9) na ascite neoplásica por zimograma em gel de SDS/PAGE co-polimerizado com

gelatina. O período de acompanhamento foi de 50 dias no primeiro experimento e 10 dias no segundo experimento.

RESULTADOS: Todos os animais apresentaram implantes peritoneais neoplásicos ou ascite. Os animais dos grupos controle (PBS) e tratamento (BCG) apresentaram evolução semelhante com relação ao peso e à sobrevida. Entretanto, a sobrevida dos animais que receberam doses repetidas de BCG foi menor do que a dos animais tratados com dose única de BCG ($p=0,0343$). Os camundongos que desenvolveram ascite apresentaram menor sobrevida ($p<0,05$). A expressão de MMP-9 correlacionou-se com pior evolução nos animais do subgrupo tratado com dose única de BCG ($p=0,0361$). A atividade gelatinolítica de MMPs no líquido ascítico foi maior na ascite dos animais que receberam aplicações de BCG ($p<0,05$).

CONCLUSÃO: Os animais tratados com doses repetidas de BCG apresentaram menor sobrevida quando comparados àqueles tratados com dose única de BCG. Os resultados deste estudo indicam que os camundongos com tumor de Ehrlich tratados com BCG apresentam maior expressão de MMP-2 e MMP-9 nos espécimes tumorais e maior atividade gelatinolítica dessas duas enzimas no líquido ascítico, com pior evolução.

SUMMARY

Jacob GG. Interplay between *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) and metalloproteinases (MMPs 2 and 9) on survival of Ehrlich ascites carcinoma in mice. São Paulo, 2004. [Master Degree Thesis – Fundação Antônio Prudente].

INTRODUCTION: The dissemination of cancer on the peritoneal surfaces involves cellular proliferation, destruction of extracellular matrix, cell adhesion, neovascularization and local immunity. The matrix metalloproteinases (MMPs) are able to degrade components of the extracellular matrix and basement membrane, its believed to be essential in the invasion of malignant tumors and angiogenesis. Various treatments have been advocated for the relief of peritoneal carcinomatosis and malignant ascites, but no single regimen has been shown to yield superior results. The peritoneal nonspecific immunotherapy with BCG could strive to generate an antitumor immune response at the site of the tumor. This study investigated the functional interplay between local treatment with BCG and metalloproteinases expression in Ehrlich ascites carcinoma to elucidate possible mechanisms associated with the lack of treatment response.

MATERIALS AND METHODS: Two distinct sets of experiments were conducted. 1) A suspension of 3×10^5 Ehrlich ascites tumor cells was injected in the peritoneal cavity of Swiss mice ($n=105$) in order to study the treatment clinical outcome and immunohistochemical MMP-9 expression. 2) A

suspension of 1×10^7 Ehrlich ascites tumor cells was inoculated in the peritoneal cavity of Swiss mice (n=12) to evaluate the gelatinolytic activity present in the neoplastic ascites by gelatin zimography.

RESULTS: The animals developed neoplastic peritoneal implants and/or malignant ascites. The control group (PBS) and treatment group (BCG) mice showed the same weight evolution and survival. However, it was observed a significant rise in mortality rate, mainly those mice located at BCG repeated doses treatment subgroups ($p=0,0343$). The mortality was also associated to neoplastic ascites accumulation in both control and treatment groups ($p<0,05$). Positive reactivity to MMP-9 correlated with unfavorable prognosis mainly with dose unique BCG treatment group ($p=0,0361$). Gelatinolytic activity was higher in BCG treatment group than that of control group (PBS) ($p<0,05$).

CONCLUSION: Repeated intraperitoneal BCG doses decrease the survival rate of the Ehrlich ascites inoculated mice, related those with unique dose treatment. MMP-9 expression and gelatinolytic activity correlate with worst outcome. These results provide evidence to the MMPs contribution to ascites formation and influence to BCG local immunotherapy resistance.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Diagrama demonstrando o protocolo de aplicações do Experimento I. _____ 29
- Figura 2** – Diagrama demonstrando o protocolo de aplicações do Experimento II. _____ 36
- Figura 3** – Comparação linear do peso evolutivo médio nos animais dos grupos controle (PBS) (n=44) e tratamento (BCG) (n=60) após inoculação IP de células do tumor de Ehrlich. _____ 41
- Figura 4** – Sobrevida cumulativa do grupo controle (PBS) após inoculação (IP) de células do tumor de Ehrlich, de acordo com respectivos subgrupos. _____ 42
- Figura 5** – Sobrevida cumulativa do grupo tratamento (BCG) após inoculação (IP) de células do tumor de Ehrlich, de acordo com respectivos subgrupos. _____ 43
- Figura 6** – Sobrevida cumulativa comparativa entre os grupos Controle (PBS) e Tratamento (BCG) e seus respectivos subgrupos após inoculação (IP) de 3×10^5 células do tumor de Ehrlich. _____ 44
- Figura 7** – Fotografia de animais do grupo de experimentação. _____ 45
- Figura 8** – Média do volume ascítico identificado nos subgrupos controle (PBS) e tratamento (BCG). _____ 46
- Figura 9** – Volume médio dos implantes peritoneais neoplásicos identificados nos subgrupos controle (PBS) e tratamento (BCG). _____ 47

- Figura 10** – Imuno-histoquímica para MMP-9 em cortes histológicos de implantes neoplásicos presentes na parede abdominal de camundongos inoculados (IP) com 3×10^5 células do tumor de Ehrlich submetidos ao protocolo de experimentação. _____ 49
- Figura 11** – Média da intensidade de marcação da MMP-9 pela técnica de IHQ nos grupos controle (PBS) e tratamento (BCG). _____ 50
- Figura 12** – Sobrevida cumulativa dos animais do grupo tratamento após inoculação (IP) de 3×10^5 células do tumor de Ehrlich, em relação ao número de doses de BCG. _____ 54
- Figura 13** – Determinação da atividade gelatinolítica mediante zimograma de líquido ascítico em gel de SDS-PAGE (10%) com gelatina (2 mg/ml). _____ 56
- Figura 14** – Medida global de densidade óptica máxima (DO Max) das bandas evidenciadas no zimograma em gel de SDS-PAGE (10%) com gelatina (2 mg/ml) do grupo Controle' (PBS) e Tratamento' (BCG). _____ 57

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Tipos de adjuvantes da resposta imunológica. _____ 07
- Tabela 2** – Apresentações de BCG disponíveis. _____ 08
- Tabela 3** – Cronograma de procedimentos nos grupos de experimentação de animais do grupo controle (PBS) e tratamento (BCG). ____ 30
- Tabela 4** – Médias ponderais de animais com carcinomatose experimental por tumor de Ehrlich. _____ 40
- Tabela 5** – Resultado das análises atuariais do volume médio dos implantes peritoneais neoplásicos relacionado ao desenvolvimento de ascite. _____ 51
- Tabela 6** – Resultado das análises atuariais da sobrevida global relacionada à presença de ascite, volume médio dos implantes peritoneais neoplásicos e positividade da expressão de MMP-9 por IHQ. _____ 53
- Tabela 7** – Resultado das análises atuariais da sobrevida global relacionada à presença de ascite, volume médio dos implantes peritoneais neoplásicos e positividade da expressão de MMP-9 por IHQ. _____ 55
- Tabela 8** – Valores médios de densidade óptica máxima (DO Max) evidenciados nos zimogramas em gel de SDS-PAGE (10%) com gelatina (2 mg/ml). _____ 57

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

APC	célula apresentadora de antígenos
ATP	trifosfato de adenosina
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
bFGF	fator básico de crescimento de fibroblastos
CD1	molécula de superfície glicoprotéica CD1
CD44	molécula de superfície glicoprotéica CD44
CDC	Centro de Controle de Doenças
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DO max	densidade óptica máxima
EMEM	<i>Eagle's minimal essential medium</i>
GM-CSF	fator de crescimento de colônias de granulócitos e macrófagos
IFN- α	interferon alfa
IFN- β	interferon beta
IFN- γ	interferon gama
IHQ	Imuno-histoquímica
IL-1	interleucina 1
IL-2	interleucina 2
IL-4	interleucina 4
IL-5	interleucina 5
IL-6	interleucina 6
IL-8	interleucina 8
IL-10	interleucina 10
IL-12	interleucina 12
IL-18	interleucina 18
IP	intraperitoneal
kDa	quilodáltons
MF59	adjuvante imunológico MF59

MHC	complexo maior de histocompatibilidade
MMP	metaloproteinase de matriz
MMP-2	metaloproteinase de matriz - 2
MMP-9	metaloproteinase de matriz – 9
MT-MMP	metaloproteinase de matriz associada à membrana
NIH	Instituto Nacional de Saúde
NK	célula “ <i>Natural Killer</i> ”
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	tampão fosfato-salina
PPD	tuberculina
PVPI	polivinil pirrolidona-iodo
RJ	Rio de Janeiro
RNA-m	ácido ribonucléico - mensageiro
SDS-PAGE	gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio
SIDA	síndrome da imunodeficiência humana adquirida
T CD3 ⁺	linfócito T CD3 ativado
T CD4 ⁺	linfócito T CD4 ativado
T CD8 ⁺	linfócito T CD8 ativado
TGF- β	fator de transformação do crescimento - beta
Th1	resposta T <i>helper</i> 1
Th2	resposta T <i>helper</i> 2
TIMP	inibidor tissular da metaloproteinase
TNF- α	fator de necrose tumoral - alfa
UFC	unidades formadoras de colônias
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VEGF	fator de crescimento derivado do endotélio vascular

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	01
2.	REVISÃO DA LITERATURA	03
2.1.	Carcinomatose experimental	03
2.2.	Imunoterapia do câncer	04
2.2.1.	Biologia da resposta imunitária	05
2.2.1.1.	Substâncias adjuvantes da resposta imunitária	05
2.2.1.1.1.	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i> – BCG	07
2.2.1.1.1.1.	Resposta imunitária celular ao BCG	08
2.2.2.	Aplicação de BCG intraperitoneal em roedores	11
2.2.3.	BCG no tratamento do câncer	12
2.2.3.1.	Mecanismo de ação antitumoral do BCG	13
2.3.	Metaloproteinases	15
2.3.1.	MMP-2 (Gelatinase A)	16
2.3.2.	MMP-9 (Gelatinase B)	17
2.3.3.	Gelatinases e resposta imune celular	18
2.3.4.	Gelatinases e BCG	19
3.	OBJETIVOS	20
4.	RELEVÂNCIA	21
5.	MATERIAIS E MÉTODOS	22
5.1.	Animais	22
5.2.	Carcinomatose experimental	23
5.2.1.	Indução da carcinomatose pelo Tumor de Ehrlich	23
5.3.	Grupos de experimentação	27
5.3.1.	Experimento I.	27
5.3.1.1.	Esquema de aplicações – Experimento I.	29
5.3.1.2.	Cronograma de intervenções – Experimento I.	30
5.3.1.3.	Acompanhamento e necropsia	31
5.3.1.4.	Avaliação da Expressão tecidual de MMP-9	32
5.3.2.	Experimento II.	34
5.3.2.1.	Esquema de aplicações – Experimento II.	36

5.3.2.2.	Avaliação da atividade gelatinolítica	37
6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
7.	RESULTADOS	40
7.1.	Análise da evolução ponderal	40
7.2.	Análise da sobrevida	42
7.3.	Análise do volume ascítico	45
7.4.	Avaliação dos implantes peritoneais neoplásicos	47
7.5.	Avaliação imuno-histoquímica	48
7.6.	Análise das variáveis relacionadas à evolução clínica e à sobrevida	51
7.7.	Avaliação da atividade gelatinolítica	56
8.	DISCUSSÃO	58
8.1.	Acompanhamento evolutivo da carcinomatose experimental	58
8.2.	Imunoterapia intraperitoneal	61
8.3.	Influência das gelatinases: MMP-2 e MMP-9	66
9.	CONCLUSÕES	70
10.	REFERÊNCIAS	71

1. INTRODUÇÃO

A carcinomatose peritoneal está associada à evolução natural dos tumores abdominais primários avançados ou às lesões metastáticas que invadem as membranas serosas dos órgãos abdominais. Os implantes neoplásicos, descontínuos em relação ao tumor primário – chamados metástases -, constituem característica exclusiva dos tumores malignos. Caso não houvesse essa peculiaridade, a maior parte das neoplasias malignas seria curada. Uma maneira de disseminação das neoplasias extra-abdominais para o peritônio pode ser decorrente da via hematogênica ou da invasão direta dos tecidos contíguos (SUGARBAKER 1996; WEISS 1996).

A carcinomatose peritoneal está associada a uma resposta precária a várias modalidades de tratamento, e muitas vezes vincula-se a uma condição terminal. Entretanto, numa pequena parte de pacientes, o peritônio constitui único sítio de recidiva tumoral (HAGIWARA 1996; SUGARBAKER 1996).

Os implantes peritoneais desenvolvem-se em mais de 50% dos pacientes que apresentam recidiva de carcinomas (GUNDERSON 1985; SUGARBAKER 1985; SUGARBAKER 1996). No câncer gástrico com invasão de serosa, células neoplásicas livres na cavidade peritoneal podem ser evidenciadas em 31% dos casos antes da manipulação cirúrgica (IITSUKA 1979).

O acometimento metastático difuso do peritônio pode provocar ascite de difícil controle. A ascite associada a carcinomatose peritoneal deve-se à obstrução venosa e linfática e a exudação oriunda dos implantes tumorais. As células neoplásicas encontradas no líquido ascítico apresentam um tempo prolongado de replicação, decorrente de fatores locais relacionados à má nutrição. Concentrações adequadas de oxigênio e nutrientes, somente são encontradas nas proximidades da superfície peritoneal. A retirada do líquido ascítico causa aumento na proliferação das células neoplásicas residuais, pela melhoria das condições locais de oxigenação (WEISS 1996). Outros fatores, também, podem estimular a proliferação sendo um deles, a movimentação do líquido ascítico devido ao peristaltismo intestinal (STEEL 1977).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Carcinomatose experimental

Os mecanismos de disseminação tumoral têm sido estudados por meio de observações em autopsias de pacientes que sucumbem pelo câncer (KETCHAM 1966). A partir dos estudos em modelos experimentais da carcinomatose peritoneal, maiores esclarecimentos desses mecanismos tornaram-se disponíveis (EHRlich 1906; GUERRA 1983; WAINSTEIN 1999).

O tumor de Ehrlich constitui uma neoplasia espontânea derivada da glândula mamária de camundongo fêmea (EHRlich 1906). Esse tumor foi posteriormente convertido para a forma ascítica, mediante a passagem seriada de líquido ascítico de animais inoculados com células tumorais. Trata-se de um tumor de comportamento clínico agressivo, que apresenta disseminação de células pelas vias sangüínea e linfática e constitui um modelo experimental de neoplasia amplamente utilizado na pesquisa biomédica (GUERRA 1983). O tumor de Ehrlich tem a vantagem de ser facilmente manipulado em laboratório, e sua cultura *in vivo* faz-se pela inoculação de células tumorais em outros camundongos, desenvolvendo-se em quase todos animais (LALA 1990). O comportamento biológico do tumor modificou-se após implantes sucessivos, adquirindo um padrão de

crescimento uniformizado e agressivo, com desenvolvimento de metástases precoces (MEDINA 1999).

Quando células do tumor de Ehrlich são inoculadas na cavidade peritoneal, múltiplos implantes neoplásicos desenvolvem-se na superfície do peritônio, com conseqüente formação de ascite a partir do 6º ao 7º dias após sua inoculação (PARSONS 1982; WAINSTEIN 1999). Inicialmente, o aspecto do líquido ascítico é claro tornando-se progressivamente sanguinolento, similar a carcinomatose peritoneal em humanos. O abaulamento do abdome do camundongo pode ser identificado a partir da segunda semana após inoculação intraperitoneal das células tumorais e, nos dias subseqüentes, nota-se descoramento das conjuntivas, diminuição da movimentação dos animais e óbito (LALA 1990; WAINSTEIN 1999).

2.2. Imunoterapia do câncer

Ao final do século XIX, médicos franceses e alemães observaram que alguns pacientes portadores de câncer após sofrerem infecção grave, apresentavam, ocasionalmente, regressão de seus tumores. Durante o século XIX, um grupo de portadores de câncer foi submetido a uma infecção bacteriana com intuito de obter regressão tumoral (DIDOT 1852). Os ensaios clínicos consistiam no tratamento de pacientes com câncer através da aplicação de bactérias gram negativas e gram positivas como *Serratia marcescens* e estreptococos isolados de erisipelas (NAUTS 1989). A

resposta ou eficácia do tratamento não foi descrita e os estudos apresentaram inadequações metodológicas. No entanto, algumas observações puderam ser obtidas dessas pesquisas:

- A ocorrência de febre alta correlacionava-se a um resultado positivo no tratamento oncológico. Hoje esse resultado pode ser explicado por uma provável ação do $\text{TNF-}\alpha$;
- Bons resultados foram também obtidos após aplicação das bactérias na proximidade dos tumores. (FIERS 1995):

Essa estratégia de tratamento do câncer foi substituída por modalidades de tratamento, como a cirurgia e a radioterapia que tiveram grande progresso naquela época (FIERS 1995).

2.2.1. Biologia da resposta imunitária

2.2.1.1. Substâncias adjuvantes da resposta imunitária

As substâncias adjuvantes são responsáveis pela promoção, execução e extensão da resposta imunitária após aplicação de vacinas. O desenvolvimento de vacinas contra o câncer tem sido facilitado pelo progresso na área dos adjuvantes permitindo o aumento da reatividade contra tumores. Este fato ocorre em adição a imunogenicidade do próprio tumor (SALGALLER 2000) (Tabela 1).

A utilização de células tumorais intactas associadas a estimuladores imunogênicos é capaz de promover imunidade protetora contra novas inoculações de tumores em camundongos (SALGALLER 2000). A utilização de estímulo imunitário adicional também é necessária nos tumores que possuem baixa imunogenicidade (BERD 1998). O aumento da resposta imunitária não constitui a única razão de utilizar adjuvantes. Outros efeitos foram descritos (VOGEL 1998):

- Aumentar a eficácia da vacina mesmo em sujeitos com comprometimento do sistema imunológico;
- Sustentar a imunidade mediada por células T CD8+ sem diminuir a resposta humoral;
- Possibilitar redução na titulação da vacina;
- Diminuir a necessidade de doses de reforço da vacina.

A imunização pela aplicação de uma vacina associada a um adjuvante aumenta a sua durabilidade, a concentração no local da aplicação e a estabilidade do antígeno. O adjuvante aumenta a captação de antígenos pelas células apresentadoras de antígenos – APCs - como os macrófagos ou células dendríticas. Os adjuvantes podem estimular, tanto uma resposta celular T ou B, dependendo de sua natureza, quanto mediar efeitos em muitas etapas da resposta imunitária (SALGALLER 2000).

Tabela 1 – Tipos de adjuvantes da resposta imunológica.

Categoria	Exemplos
Tipo gel	Hidróxido de alumínio Fosfato de cálcio
Sintéticos	Blocos de copolímeros não iônicos Peptídeos <u>Muramyl</u> e peptídeos análogos
Emulsificados em óleo	Saponinas Adjuvante incompleto de Freund MF59
Partículas	Complexos imuno-estimulatórios Liposoma e complexo lipossomal
Bactérias	Bacillus Calmette-Guérin (BCG) <i>C. parvum</i>
Proteínas e peptídeos imunogênicos	Epítomos Pan-DR
Citocinas e fatores de crescimento	IL-2, IL-4, IL-12 IFN- α , IFN- γ GM-CSF
Haptenos	Dinitrofenil Trinitrofenil

Fonte: Adaptado de Salgaller ML. Cancer vaccines: basic principles – immune adjuvants. In: Rosenberg SA. **Principles and practice of the biologic therapy of cancer**. 3a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2000; p.585.

2.2.1.1.1. *Bacillus Calmette Guérin* – BCG

O BCG é constituído por microorganismos vivos atenuados de *Mycobacterium bovis*, isolados em 1920 no Instituto Pasteur, em Paris. A maior parte das cepas apresenta de 5×10^6 a 5×10^9 UFC por frasco (HERR 1995). A tabela 2 mostra as preparações disponíveis para utilização clínica e experimental.

A cepa Mureau-Rio de Janeiro constitui um liofilizado que pesa 40 mg e apresenta 2×10^8 bacilos vivos-atenuados de *Mycobacterium bovis*. Trata-se de um produto produzido pela Fundação Ataulpho de Paiva – RJ - cultivada em meio líquido, no qual a suspensão bacilar é mantida em solução contendo glutamato de sódio. A sua eficácia no tratamento oncológico já foi testada pela sua utilização em pesquisas clínicas (FONSECA 1993; FONSECA 1994).

Tabela 2 – Apresentações de BCG disponíveis para utilização clínica e experimental.

Cepa	Peso (mg)	UFC
Pasteur (Paris)	75	5×10^8
Frappier (Montreal)	120	1×10^7
Connaught (Toronto)	40	$8-32 \times 10^8$
Tice (Chicago)	50	$1-8 \times 10^8$
Glaxo / Evans (Londres)	75	$8-26 \times 10^6$
Mureau (Rio de Janeiro)	110	2×10^8
RIVM (Holanda)	-	5×10^8
Tóquio 172 (Japão)	80	1×10^8
D 331 (Dinamarca)	-	$4-14 \times 10^8$

Fonte: Adaptado de Herr HW. Instillation therapy for bladder cancer. In: DeVita Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA. **Biologic therapy of cancer**. 2a ed. Philadelphia: JB Lippincott Company 1995; p. 708.

2.2.1.1.2. Resposta imunitária celular ao BCG

Após a inoculação das micobactérias, o primeiro contato com o sistema imunitário faz-se pelos macrófagos, que são responsáveis pela destruição das micobactérias (DANNENBERG 1994; YOUNG 1999).

A capacidade de restringir o crescimento das micobactérias pelos macrófagos depende diretamente da ativação dos linfócitos T que, por sua vez, necessita da apresentação de peptídeos micobacterianos para sua estimulação, podendo ser expressos em moléculas de classe I e II do MHC (PANCHOLI 1993; BECKMAN 1994; YOUNG 1999).

Em resposta à ativação dos receptores específicos de antígenos, os linfócitos T produzem uma série de citocinas distintas categorizadas como:

- Tipo 1 - estimuladoras da ativação de macrófagos: IFN- γ ;
- Tipo 2 – promotoras da diferenciação de linfócitos B: IL-4 e IL-5.

Os linfócitos T podem ser divididos em dois subtipos Th1 e Th2, dependendo do padrão de citocinas liberadas. As citocinas produzidas por cada subtipo de linfócito T tende a inibir o desenvolvimento do subtipo alternativo, forçando a uma polarização da resposta de um subtipo. As micobactérias, como outros patógenos intracelulares, estimulam, predominantemente, uma resposta imunológica do subtipo Th1 (HSIEH 1993). O mecanismo molecular ainda necessita ser definido, no entanto, especula-se que os componentes da membrana celular das micobactérias estimulam a produção de citocinas como a IL-12 capazes de promover a diferenciação de linfócitos T num fenótipo Th1 (FULSON 1996).

A maior contribuição dos linfócitos T CD8⁺ na imunidade antimicobacteriana deve-se à sua atividade citotóxica (SILVA 1994; TURNER 1996). Quando o

macrófago falha na destruição de uma micobactéria fagocitada, pode ser vantajoso para o hospedeiro que esta célula seja prontamente eliminada, disponibilizando a micobactéria a outros fagócitos ativados (YOUNG 1999). A imunidade contra as micobactérias, portanto, envolve uma série de interações coordenadas entre diversas células, num processo que necessita do recrutamento e da ativação dos macrófagos, que fagocitam as micobactérias e são posteriormente destruídos pelos linfócitos T CD8+ e T CD4+, culminando com a destruição das células infectadas. A infecção pelas micobactérias também é capaz de ativar outros subtipos de linfócitos T. As células NK podem ser uma importante fonte de IFN- γ , necessário para ativação de macrófagos nas fases iniciais de infecção por micobactérias (YOUNG 1999).

Células dendríticas também são capazes de internalizar micobactérias, tanto vivas quanto inativadas pelo calor. A fagocitose pode ser amplificada por interações específicas entre as micobactérias e as moléculas de superfície da própria célula dendrítica (HENDERSON 1997). As interações entre o BCG e as células dendríticas propiciam a maturação e a ativação celular, permitindo a expressão de moléculas do MHC e aumentando a capacidade de estimular as células T contra antígenos micobacterianos. A interação entre o BCG e a célula dendrítica resulta em aumento na produção de citocinas reguladoras, como a IL-12, além de citocinas inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- α (THURNHER 1997; HENDERSON 1997; DEMANGEL 1999; DEMANGEL 2000).

A produção de IL-12 favorece a proliferação de células T produtoras de substâncias ativadoras de macrófagos como o IFN- γ e TNF- α (COOPER 1997). A liberação de IL-1, IL-6 e TNF- α contribui para o desenvolvimento do processo inflamatório agudo, resultando no recrutamento de leucócitos e conseqüente desencadeamento da inflamação crônica, com formação de granulomas e interrupção da disseminação micobacteriana (HERNANDEZ-PANDO 1997; LADEL 1997; BEAN 1999).

2.2.2. Aplicação de BCG intraperitoneal em roedores

A aplicação de BCG intraperitoneal em camundongos constitui um modelo clássico para o estudo da ativação dos macrófagos (MEANS 1999). A primeira interação do BCG com o sistema imunológico é desencadeada pelos macrófagos peritoneais após o processo de fagocitose das micobactérias, segue-se o extravasamento de monócitos, de células NK e de linfócitos T no tecido lesado, e interação dos macrófagos ativados com seus produtos (INOUE 1991; ADEREM 2000). No local da infecção por micobactérias, os linfócitos T e células NK liberam citocinas, como o IFN- γ , que são críticas para a ativação dos macrófagos (DALTON 1993; TRINCHIERI 1997).

2.2.3. BCG no tratamento do câncer

Os *Bacillus Calmette-Guérin* exercem efeito terapêutico adjuvante no tratamento do câncer em murinos (KELLER 1972; PIMM 1975; PIMM 1980; PANG 1982; WAINSTEIN 1999; RATLIFF 2000). A eficácia do tratamento depende da dose, da frequência, da via de administração e também da associação a outros antígenos (HANNA 1991). Aplicação de BCG intratumoral ou intralesional constitui a via de administração mais eficaz em modelos experimentais, pois, observa-se maior tempo de sobrevivência e, até mesmo, a regressão de tumores no local ou a distância (HANNA 1991). A associação do BCG com células tumorais constitui a abordagem de maior sucesso, envolvendo aplicação de BCG, no tratamento do câncer (AKPORIAYE 1995, WAINSTEIN 1999).

Esses resultados podem ser explicados pela amplificação da resposta imunitária, com ativação direta de macrófagos, pela produção de IFN- γ e TNF- α e pelo recrutamento de células efectoras. A presença dos antígenos tumorais propicia o processamento e a apresentação de antígenos pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), permitindo o desenvolvimento de uma resposta de rejeição eficaz. A resposta sistêmica ainda é pouco conhecida, no entanto, envolve a geração e a migração de linfócitos T específicos ao tumor (AKPORIAYE 1995).

A eficácia da aplicação de BCG, em ensaios clínicos, depende do tipo de tumor. A aplicação de BCG em lesões metastáticas de melanomas pode causar regressão tumoral nos nódulos injetados e nos não injetados (MORTON 1970). A inoculação de BCG associado a células tumorais autólogas inativas foi capaz de aumentar a sobrevida de portadores de melanoma (MORTON 1982).

Diversos estudos clínicos controlados e aleatórios indicaram que a administração de BCG constitui uma das formas mais eficazes no tratamento complementar do câncer superficial de bexiga (MALKOWICZ 2000; SHELLEY 2000; LAMM 2002; BOHLE 2003). Pacientes submetidos somente à ressecção transuretral apresentam taxa de recidiva de 40 a 80%, enquanto que a aplicação de BCG após ressecção transuretral garante um aumento significativo no intervalo livre de doença (TORTI 1984; LUM 1991).

2.2.3.1. Mecanismo de ação antitumoral do BCG

Fatores imunitários locais constituem os principais mecanismos da ação antitumoral do BCG. A aplicação local de BCG permite o contato direto entre micobactérias viáveis e células tumorais, possibilitando o desenvolvimento de uma resposta imunitária contra ambos (RATLIFF 2000). Os macrófagos estimulados pelo BCG, além de atuarem como APC, são capazes de promover destruição celular específica e inespecífica (SALGALLER 2000). Essa interação pode induzir uma resposta antígeno específica pelos

linfócitos T e B no local da administração. A proliferação e migração dessas células efectoras resulta na resposta sistêmica. Os linfócitos T CD4+, de memória, estimulados após aplicação de BCG podem conferir proteção a longo prazo contra o desenvolvimento de novos tumores no local (HERR 1995). Torna-se cada vez mais evidente que uma resposta imunitária orquestrada, envolvendo linfócitos T ativados, macrófagos e suas citocinas, interage para impedir o desenvolvimento local de novos tumores. Os mecanismos imunitários específicos e inespecíficos, associados ao reconhecimento do BCG e dos antígenos relacionados ao tumor, contribuem para a ação antitumoral da aplicação local de BCG. As interações com o estroma, fatores de crescimento ou agentes de diferenciação celular também possuem papel crucial na resposta imunológica (HERR 1995).

2.3. Metaloproteínases

O processo de invasão tumoral e de metástase está associado à perda da capacidade de adesão celular, bem como, a degradação da matriz extracelular e da membrana basal.

As metaloproteínases (MMPs) são enzimas capazes de degradar a matriz extracelular e compartilham uma semelhança na sua estrutura molecular, pois dependem de um átomo de zinco para sua atividade catalítica. As MMPs são essenciais para a colagenólise presente em determinados processos biológicos como: implantação do blastocisto, desenvolvimento do embrião, crescimento neural, ciclos endometriais, morfogênese mamária, remodelamento ósseo, reparo tecidual, angiogênese e apoptose. Já foram identificadas, até o momento, 24 proteínas dessa família que participam no processo de lesão tecidual causada por doenças, tais como, artrite reumatóide, miocardiopatia dilatada, aneurismas de aorta, fibrose pulmonar, câncer e suas metástases (HÖYHTYÄ 1990; TURPEENNIEMI-HUJANEN 1992; DUNSMORE 1998; NAGASE 1999).

As MMP-2 e MMP-9, também conhecidas como gelatinases, são capazes de degradar colágeno do tipo IV e gelatina e apresentam papel importante na evolução do câncer. Colágeno tipo IV constitui um componente da membrana basal e sua degradação constitui etapa fundamental no processo de invasão e metástase (BERGERS 2000).

2.3.1. MMP-2 (Gelatinase A)

A expressão de MMP-2, conhecida como Gelatinase A, em tumores sólidos está associada ao desenvolvimento de um fenótipo mais agressivo e de pior prognóstico devido ao aumento da degradação da matriz extracelular. Na maioria das vezes, o RNA-m da MMP-2 é mais bem identificado nas células do estroma tumoral do que nas células neoplásicas (HÖYHTYÄ 1994). O tumor parece ser capaz de induzir as células normais do estroma a produzirem MMP-2, e as enzimas secretadas são recrutadas para a superfície da célula neoplásica. Da mesma maneira, as células normais podem induzir a síntese de MMP-2 pelas células tumorais, indicando um mecanismo complexo de interação do tumor com o estroma e com a matriz extracelular (KOSSAKOWSKA 1999).

A MMP-2 e seus produtos de degradação apresentam funções regulatórias capazes de diminuir a adesão celular, aumentar a migração celular pela clivagem do receptor de integrina, aumentar a motilidade celular, e propiciar quimiotaxia (CALOF 1994). A MMP-2 é capaz de regular o estímulo inflamatório pela indução ou inibição do desenvolvimento de fenótipo inflamatório pelas células mesangiais (McQUIBBAN 2001).

A MMP-2 também atua no início do processo de angiogênese, auxiliando na lise da matriz extracelular ao redor das células endoteliais e permitindo o crescimento de novos capilares no tecido (TARABOLETTI 2000).

2.3.2. MMP-9 (Gelatinase B)

Ao contrário da MMP-2, a MMP-9 é somente expressa fisiologicamente no trofoblasto, nos osteoclastos e nos leucócitos (WITTY 1996). A MMP-9 participa do processo de invasão das células mediante barreiras constituídas por matriz e promove a colagenólise durante as etapas de invasão e progressão tumoral (BERGERS 2000). A MMP-9 cliva os colágenos do tipo IV, V e XI, agrecan e elastina, mas não é ativa contra o colágeno do tipo I (FOSANG 1992; POURMOTABBED 1994).

O efeito da MMP-9 no processo inflamatório permite que células inflamatórias sejam capazes de invadir o foco da inflamação para participar da regulação local (SHEU 2001). Poucas células normais expressam a MMP-9, mas, aumento da sua expressão pode ser observado em neoplasias sólidas, tanto pelas células tumorais quanto pelas células normais do estroma adjacente (IWATA 1996).

2.3.3. Gelatinases e resposta imune celular

Após estimulação por mediadores inflamatórios, como a IL-8, os neutrófilos são ativados, mobilizando as vesículas secretórias e desenvolvendo forte adesão ao endotélio vascular. A secreção de MMP-9 possibilita a degradação da membrana basal e facilita a migração do leucócito para o tecido adjacente (OPDENAKKER 2001).

Os monócitos podem expressar pequenas quantidades de MMP-2 e MMP-9. A expressão de MMP-9, nessas células, pode ser induzida por TNF- α e sua interação com o colágeno pode ser inibida pelo TGF- β e IL-10 (GALT 2001; VADAY 2001). A expressão de MMP-9 aumenta cerca de 15 vezes após a indução para diferenciação em macrófagos. Nessa etapa de diferenciação, os macrófagos também expressam pequenas quantidades de MMP-2 (XIE 1998). Esta expressão permite ao macrófago migrar através dos tecidos em direção ao foco do estímulo inflamatório, o que pode resultar em aumento da degradação tecidual durante a inflamação. Os macrófagos presentes no estroma tumoral podem constituir fontes de MMPs quando as células neoplásicas não são capazes de produzi-las (BARTHOLOME 2001; POLLARD 2004).

Na ausência de estímulo inflamatório, os linfócitos T CD4+, e, em menor proporção os linfócitos T CD8+ e T CD3+, expressam pequenas quantidades de MMP-9 e TIMP-1. As citocinas liberadas pelos macrófagos são capazes de aumentar a secreção de pró-MMP-9 nos linfócitos T CD4+, T CD8+ e T CD3+. O TNF- α e a IL-1 aumentam a expressão de pró-MMP-9 nos linfócitos T CD3+ e T CD4+ (SHEU 2001). O aumento da secreção de MMPs permite a migração dos linfócitos T através da membrana basal. No entanto, a MMP-9 também pode afetar negativamente a função linfocitária, pois a clivagem do receptor de IL-2, encontrado nos linfócitos que infiltram o tumor, favorece imunossupressão local relacionada ao câncer (SHEU 2001). Células dendríticas imaturas e maduras também expressam MMP-2 e MMP-9

(KOUWENHOVEN 2002). A expressão de MMP-9 por essas células pode ser inibida por INF- β (BARTHOLOME 2001).

2.3.4. Gelatinases e BCG

A infecção micobacteriana constitui um forte estímulo para a produção de MMP-2 e MMP-9 pelos macrófagos, pela secreção de TNF- α e IL-18 (QUINDING-JÄRBRINK 2001). O aumento da secreção de MMPs pode ser encontrado em vários tecidos durante as etapas de infecção por micobactérias, porém a implicação desse fenômeno ainda merece maior investigação. A degradação da matriz extracelular parece ser necessária para o recrutamento de células inflamatórias e formação de granulomas. Apesar de serem importantes na resposta imune contra micobactérias, a expressão de MMPs, pode contribuir para o aumento da destruição da integridade tecidual, pois nas fases avançadas da infecção pode-se observar uma desregulação na liberação de MMPs. A degradação da membrana extracelular pelas MMPs é capaz de liberar fragmentos quimiotáticos recrutando mais células inflamatórias intensificando a resposta local (QUINDING-JÄRBRINK 2001).

3. OBJETIVOS

Avaliar o efeito da aplicação intraperitoneal de bacilos Calmette-Guérin (BCG), em diferentes esquemas terapêuticos na evolução e na sobrevivência de camundongos com carcinomatose peritoneal induzida por tumor de Ehrlich.

Verificar por imuno-histoquímica a expressão da MMP-9 (Gelatinase B) nos implantes peritoneais neoplásicos dos camundongos submetidos a carcinomatose peritoneal por tumor de Ehrlich tratados com PBS ou BCG.

Avaliar a atividade gelatinolítica (MMP-2 e MMP-9) presente no líquido ascítico de camundongos com carcinomatose peritoneal induzida por tumor de Ehrlich, após tratamento local com BCG e PBS.

4. RELEVÂNCIA

A eficácia da aplicação de BCG no câncer superficial de bexiga vem sendo mostrada desde a década de 1970 (MORALES 1976). O emprego terapêutico do BCG em outros tipos de tumores apresenta resultados variáveis, mas encontra suporte científico devido aos bons resultados nas neoplasias de bexiga. Relatos da utilização de BCG liofilizado, em diferentes doses, cepas, esquemas terapêuticos e vias de administração para outras neoplasias foram publicados (FONSECA 1993; FONSECA 1994). Pesquisas experimentais identificaram a influência da resposta imune no desenvolvimento de neoplasias em animais tratados com BCG e aumento da sobrevida de pacientes que desenvolveram empiema pleural após ressecção de câncer pulmonar quando tratados com BCG (BALDWIN 1975; PIMM 1975; BALDWIN 1976; BALDWIN 1978; ROSENHEIN 1978; PIMM 1980).

Os efeitos benéficos na evolução de neoplasias obtidos pela aplicação intravesical e intrapleural justificaram a criação de um protocolo experimental para estudar o efeito do BCG na evolução clínica de tumores intraperitoneais induzidos pela inoculação de tumor de Ehrlich e na participação de metaloproteinases neste processo. O avanço do conhecimento nesta área pode contribuir para ampliar o conhecimento da carcinomatose peritoneal experimental (VAN RAVENSWAAY CLAASEN 1996).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Animais

A pesquisa utilizou 117 camundongos fêmeas, da linhagem Suíça, com peso médio de 28,79 g (+/- 4,90 g), provenientes de Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), credenciado pelo Conselho Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os animais foram avaliados para assegurar as condições de saúde e, em seguida, passaram por período de adaptação de sete dias. Os animais foram alojados em gaiolas de policarbonato com maravalha lavada, em ambiente climatizado com ciclo claro/escuro de 12/12h, alimentados com ração balanceada peletizada padronizada e oferta de água filtrada "*ad libitum*".

O protocolo de experimentação foi aprovado pelo Comitê de Ética para a Utilização de Animais da Faculdade de Medicina da UFMG e foi desenvolvido de acordo com as normas de utilização de animais em pesquisa experimental do COBEA.

5.2. Carcinomatose experimental

As células de tumor de Ehrlich foram cedidas pelo Laboratório de Fisiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. O tumor de Ehrlich foi mantido pela inoculação intraperitoneal seriada em camundongos Suíços. O líquido ascítico foi aspirado e colocado num frasco tipo béquer, em banho de gelo, sob agitação contínua a fim de evitar a degradação precoce das células, obtendo suspensão de células tumorais. A partir dessa suspensão foi iniciada cultura das células diluídas em EMEM (Sigma, St. Louis, EUA) com adição de 10% de soro fetal bovino (Laborclin, Paraná, Brasil), mantida em estufa de CO₂ (5%) climatizada a 37°C. Alíquotas do tumor de Ehrlich foram armazenadas, de acordo com protocolo de congelamento de células de tumor ascítico (BARKER 1998).

5.2.1. Indução da carcinomatose pelo Tumor de Ehrlich

O modelo experimental de neoplasia adotado, neste estudo, constituiu da aplicação intraperitoneal de células do tumor de Ehrlich, já empregado como modelo de carcinomatose experimental (WAINSTEIN 1999). No primeiro experimento, visando a simular o desenvolvimento de carcinomatose peritoneal pós-operatória, uma suspensão de 3×10^5 células do tumor de Ehrlich foram aplicadas na cavidade peritoneal, após laparotomia mediana, em camundongos fêmeas da linhagem Suíça (n=105). A aplicação foi realizada sob técnica asséptica pela seguinte rotina:

- A) Tricotomia da pele da parede abdominal;
- B) Anti-sepsia da parede abdominal com PVPI degermante e álcool a 70%;
- C) Anestesia peritoneal utilizando-se 20 mg/ kg de pentobarbitúrico sódico;
- D) Laparotomia mediana de cerca de 1,0 cm;
- E) Injeção intraperitoneal de 3×10^5 células viáveis do tumor de Ehrlich (0,1 ml da suspensão de 3×10^6 células/ml);
- F) Síntese da parede abdominal e da pele por planos utilizando-se fio cirúrgico Mononáilon 0,30 mm (Caiçara, São Paulo, Brasil);
- G) Os animais foram mantidos em gaiolas separadas para recuperação anestésica e pós-operatória.

No segundo experimento, realizado para avaliar a atividade de gelatinases presente na ascite neoplásica, uma suspensão de 1×10^7 células do tumor de Ehrlich foi aplicada na cavidade peritoneal em camundongos fêmeas da linhagem Suíça (n=12). A aplicação foi realizada sob técnica asséptica pela seguinte rotina:

- A) Anti-sepsia da parede abdominal com PVPI degermante e álcool a 70%;
- B) Injeção intraperitoneal de 1×10^7 células viáveis do tumor de Ehrlich (0,2 ml da suspensão de 5×10^7 células/ml);

A contagem e determinação da viabilidade celular foram obtidas pela aplicação do corante Azul de Trypan (Sigma, St. Louis, EUA). A ação específica desse corante está baseada no fato de que suas partículas são negativamente carregadas e somente penetraram nas células que apresentam dano na membrana celular (PHILLIPS 1957).

A coloração das células pelo Azul de Trypan auxiliou na avaliação morfológica, pois as células viáveis não são coradas e as células não-viáveis captam muito bem o corante. A contagem do número de células viáveis foi realizada em câmara de Neubauer (PHILLIPS 1957).

PROCEDIMENTO:

A cepa de BCG empregada foi a Mureau-Rio de Janeiro, devido à facilidade de sua obtenção e eficácia testada pela sua utilização em pesquisas previamente publicadas (FONSECA 1993; FONSECA 1994). Trata-se de liofilizado pesando 40 mg, contendo 2×10^8 bacilos vivos-atenuados de *Mycobacterium bovis*, produzido pela Fundação Ataulpho de Paiva (RJ) e cultivada em meio líquido, cuja suspensão bacilar é mantida em solução contendo glutamato de sódio. A injeção intraperitoneal de BCG foi feita em diferentes dias associada ou não a doses de reforço, de acordo com o grupo de estudo. O BCG Mureau-Rio de Janeiro vem acondicionado em ampolas, sob forma concentrada, e no preparo da solução a ser aplicada, o conteúdo da ampola foi diluída em 20 ml de PBS para a aplicação per-operatória e para as doses de reforço.

A aplicação intraperitoneal do BCG foi realizada de acordo com a técnica a seguir (TJU 1996; WORKMAN 1998):

- Contenção manual do animal;
- Anti-sepsia da parede abdominal com álcool a 70%;
- Aplicação intraperitoneal de BCG na dose de 1×10^6 UFC com seringa de 1,0 ml e agulha 10 x 5;

ESQUEMA DE VACINAÇÃO:

Reconhece-se que a supressão do crescimento tumoral ocorre, principalmente, após aplicação de BCG em íntimo contato às células tumorais (CHABALGOITY 2002). Neste projeto a imunoterapia foi promovida pela inoculação intraperitoneal de BCG em camundongos de acordo com três diferentes esquemas de tratamento:

- **DOSE ÚNICA:** Aplicação de uma única dose de BCG intraperitoneal;
- **SEQÜENCIAL:** Aplicação intraperitoneal de BCG a cada 3 dias;
- **REFORÇO:** Aplicação intraperitoneal de BCG a cada 7 dias;

5.3. Grupos de experimentação

5.3.1. Experimento I

Cento e cinco animais foram utilizados para avaliar a evolução clínica e a sobrevivência dos camundongos após inoculação IP de células do tumor de Ehrlich e aplicação de PBS ou BCG IP, em diferentes esquemas terapêuticos. Os animais foram distribuídos, de maneira aleatória, nos grupos descritos a seguir:

- **Grupo Controle (C, n=45):** Receberam aplicações IP de PBS.
 - **Subgrupo C1 – CONTROLE DOSE ÚNICA (PBS, n=15):**
Inoculação IP de PBS no dia do implante de células do tumor de Ehrlich (D0).
 - **Subgrupo C2 – CONTROLE SEQUÊNCIAL (PBS, n=15):**
Inoculação IP de PBS no dia do implante de células do tumor de Ehrlich (D0) e injeções IP de doses subsequentes de PBS, a cada 3 dias (D3 a D48).
 - **Subgrupo C3 – CONTROLE REFORÇO (PBS, n=15):**
Inoculação IP de PBS no dia do implante de células do tumor de Ehrlich (D0) e injeções IP de doses de reforço de PBS, a cada 7 dias (D7 a D49).

- **Grupo Tratamento (T, n=60):** Receberam aplicações IP de BCG.
 - **Subgrupo T1 – TRATAMENTO DOSE ÚNICA (BCG, n=20):**
Inoculação IP de BCG no dia do implante de células do tumor de Ehrlich (D0).
 - **Subgrupo T2 – TRATAMENTO SEQÜENCIAL (BCG, n=20):**
Inoculação IP de BCG no dia do implante de células do tumor de Ehrlich (D0) e injeções IP de doses subseqüentes de BCG, a cada 3 dias (D3 a D48).
 - **Subgrupo T3 – TRATAMENTO REFORÇO (BCG, n=20):**
Inoculação IP de BCG no dia do implante de células do tumor de Ehrlich (D0) e injeções IP de doses de reforço de BCG, a cada 7 dias (D7 a D49).

5.3.1.2. Cronograma de intervenções – Experimento I

Tabela 3 – Cronograma de procedimentos nos grupos de experimentação de animais do grupo controle (PBS) e tratamento (BCG).

D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6
Ehrlich						
C1, C2, C3			C2			C2
T1, T2, T3			T2			T2
D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13
C3		C2			C2	
T3		T2			T2	
D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20
C3	C2			C2		
T3	T2			T2		
D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27
C2, C3			C2			C2
T2, T3			T2			T2
D28	D29	D30	D31	D32	D33	D34
C3	C2			C2		
T3	T2			T2		
D35	D36	D37	D38	D39	D40	D41
C2, C3			C2			C2
T2, T3			T2			T2
D42	D43	D44	D45	D46	D47	D48
C3		C2			C2	
T3		T2			T2	
D49	D50					
C3	C†					
T3	T†					

Nota: - Camundongos fêmeas da linhagem Suíça (n=105) foram inoculados com 3×10^5 células do tumor de Ehrlich na cavidade peritoneal após realização de laparotomia mediana no D0 (dia zero). A seguir, os animais foram divididos aleatoriamente nos grupos controle (PBS) e tratamento (BCG). Os animais foram acompanhados por 50 dias após a inoculação. O protocolo de aplicações foi adotado a partir da inoculação do tumor.

- † = Prazo máximo de acompanhamento (eutanásia); D1, D2, D3.....D50 = dias; C1, C2,T3 = grupos de experimentação.

5.3.1.3. Acompanhamento e necropsia

Os animais foram avaliados evolutivamente quanto ao comportamento e funções vitais, além da mensuração do peso evolutivo a cada 7 dias. Durante períodos críticos, como pós-operatório ou após aplicação da imunoterapia, foram avaliados de duas a três vezes ao dia (MONTGOMERY 1990; CCAC 1989; CCAC 1998).

Os animais foram acompanhados por um período máximo de 50 dias. Os camundongos que sobreviveram até esse período, ou que apresentaram sinais clínicos de morte iminente, foram submetidos a eutanásia de acordo com os critérios de eutanásia do Relatório da Associação Americana de Medicina Veterinária (CCAC 1989; CCAC 1998; MONTGOMERY 1990; AVMA 2001).

Todos animais que morreram naturalmente ou sacrificados, foram pesados e submetidos à necropsia, que constituiu dos seguintes procedimentos:

- A) Determinação do peso;
- B) Aspiração do líquido ascítico presente na cavidade abdominal;
- C) Retirada da parede anterior do abdome levando em consideração os rebordos costais e as cristas ilíacas como limites;
- D) Mensuração dos implantes neoplásicos localizados na parede anterior do abdome utilizando-se paquímetro graduado.

5.3.1.4. Avaliação da expressão tecidual da MMP-9

Os espécimes biológicos destinados à avaliação anatomopatológica foram fixados em formol tamponado a 10% por 24 horas. Após esse período, foram incluídos em blocos de parafina e submetidos a cortes transversais de 5 µm de espessura colocando-os em lâminas preparadas previamente com poli-L-Lisina (Sigma, St. Louis, EUA). As lâminas foram coradas por Hematoxilina e Eosina e por imuno-histoquímica (IHQ), para detecção de MMP-9, como descrito a seguir.

O preparo das amostras para avaliação IHQ obedeceu ao seguinte protocolo: Os espécimes, previamente incluídos em parafina, foram cortados em micrótomo eletrônico na espessura de 5 µm, montados em lâmina de vidro e incubados por 12 horas em estufa a 37°C. As lâminas foram desparafinizadas com dois banhos de xilol (10') e a seguir realizada a hidratação com banhos de álcool absoluto (2 x 3'), álcool 70% (3'), álcool 80% (3'), água destilada (10') e PBS (5'). Logo, procedeu-se à reativação antigênica incubando as lâminas em forno de microondas caseiro por 12 minutos (100W) em solução tampão de Citrato de Sódio a 10 mM (pH 6,0) (Sigma, St. Louis, EUA). Após o resfriamento das lâminas, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com a utilização de solução H₂O₂ (30 vol) a 3%. Os sítios de possível ligação inespecífica dos anticorpos foram inibidos pela incubação com soro normal de coelho diluído a 1:900 (25') e com leite desnatado 210 mg/ml (15'). A seguir, os cortes foram incubados

com o anticorpo monoclonal MMP-9, Clone C-20 (sc-6840) (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA), diluído a 1:500 por pelo menos 12 horas durante a noite, à temperatura aproximada de 4°C. Os cortes foram lavados com PBS e incubados com anticorpo secundário – coelho anticabra – conjugado à peroxidase (DAKO, Dinamarca) numa diluição de 1:400 durante 90 minutos. Para visibilização da reação, as lâminas foram tratadas com solução de 3,3,diaminobenzidina (DAB), na concentração de 1 mg/ml em solução de H₂O₂ (40 vol) a 0,1%. Os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Harris diluída a 1% por aproximadamente 3 minutos. Com exceção da incubação em forno de microondas e da incubação do anticorpo primário as demais incubações e banhos foram realizados à temperatura ambiente.

A reação de IHQ para MMP-9 cora de castanho o citoplasma das células tornando fácil sua identificação microscópica. A avaliação da intensidade de coloração obedeceu ao seguinte escore:

- 1) 0 - Ausência de células coradas pela IHQ;
- 2) 1 – Células fracamente coradas pela IHQ;
- 3) 2 – Células moderadamente coradas pela IHQ;
- 4) 3 – Células fortemente coradas pela IHQ.

5.3.2. Experimento II

O segundo experimento foi realizado para investigar a atividade de gelatinases (MMP-2 e MMP-9) presentes no líquido ascítico de camundongos com tumor de ehrlich e sua relação com a aplicação intraperitoneal de (BCG). Doze camundongos fêmeas da linhagem Suíça foram inoculadas com células do tumor de Ehrlich na cavidade peritoneal. Os camundongos foram separados nos seguintes grupos:

- **Grupo Controle' (C', n=6):** Receberam aplicações IP de PBS.
 - **Subgrupo C1' – CONTROLE DOSE ÚNICA (PBS, n=2):**
Inoculação IP de PBS no dia do implante de células do tumor de Ehrlich (D0).
 - **Subgrupo C2' – CONTROLE SEQUÊNCIAL (PBS, n=2):**
Inoculação IP de PBS no dia do implante de células do de Ehrlich (D0) e injeções IP de doses subseqüentes de PBS, a cada 3 dias.
 - **Subgrupo C3' – CONTROLE REFORÇO (PBS, n=2):**
Inoculação intraperitoneal de PBS no dia do implante de células do tumor de Ehrlich (D0) e uma dose de reforço IP de PBS após 7 dias.

- **Grupo Tratamento' (T', n=6):** Receberam aplicações IP de BCG.
 - **Subgrupo T1' – TRATAMENTO DOSE ÚNICA (BCG, n=2):**
Inoculação IP de BCG no dia do implante de células do tumor de Ehrlich (D0).
 - **Subgrupo T2' – TRATAMENTO SEQÜENCIAL (BCG, n=2):**
Inoculação IP de BCG no dia do implante de células do tumor de Ehrlich (D0) e aplicações IP de doses subseqüentes de BCG, a cada 3 dias.
 - **Subgrupo T3' – TRATAMENTO REFORÇO (BCG, n=2):**
Inoculação IP de BCG no dia do implante de células do tumor de Ehrlich (D0) e uma dose de reforço IP de BCG após 7 dias.

Os animais foram submetidos ao esquema de vacinação proposto e acompanhados por 10 dias, quando foram sacrificados e o líquido ascítico foi coletado, centrifugado e armazenado congelado a – 80° C até sua utilização.

5.3.2.1. Esquema de aplicações – Experimento II

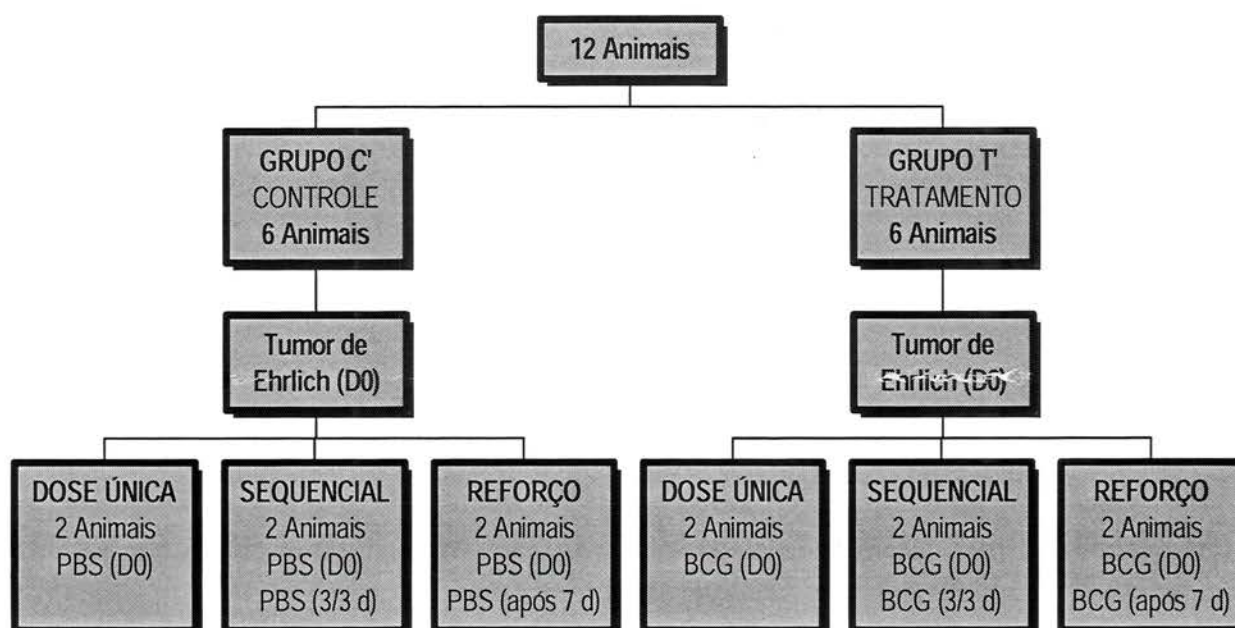


Figura 2 – Diagrama do protocolo de aplicações do Experimento II.

Camundongos fêmeas da linhagem Suíça ($n=12$) foram inoculados com 1×10^7 células do tumor de Ehrlich na cavidade peritoneal. A seguir, os animais foram divididos aleatoriamente nos grupos controle (PBS) e tratamento (BCG). Os grupos foram separados de acordo com número de doses e esquema de aplicação: Controle - C1' – Dose única ($n= 2$), C2' – Sequencial 3/3 dias ($n= 2$), C3' – Reforço após 7 dias ($n= 2$); Tratamento - T1' – Dose única ($n= 2$), T2' – Sequencial 3/3 dias ($n= 2$), T3' – Reforço após 7 dias ($n= 2$). Os animais foram acompanhados por 10 dias após a inoculação, sendo sacrificados e o líquido ascítico foi colhido para avaliação de atividade de gelatinases.

5.3.2.2. Avaliação da atividade gelatinolítica da ascite neoplásica

A atividade gelatinolítica foi avaliada pela utilização de zimograma em gel contendo 10% de acrilamida (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) co-polimerizado com 20 mg/ml de gelatina (Sigma, St. Louis, EUA) (HEUSSEN 1980). As amostras de líquido ascítico foram homogeneizadas, ajustadas de acordo com a concentração protéica total de 100 µg, verificada pelo ensaio de Bradford (Bio-Rad, Califórnia, EUA). As diferentes amostras foram diluídas, em condições não redutoras, ao tampão de amostra (10 ml ddH₂O, 2,5 ml 0,5M Tris HCl pH 6.8, 4,0 ml 10% SDS, 2,0 ml glicerol e 500 µl azul de bromofenol a 0,2%), na proporção de 1:1 (vol:vol). As colunas do mini-gel foram preenchidas com 15 µl desta suspensão.

A seguir, o gel foi submetido à eletroforese com voltagem constante (120V) em tampão de corria a 4°C (125mM Tris-HCl, pH 8.3, 1.23M glicina, 0.5% SDS), até que as bandas atingissem o fundo do gel. Após a eletroforese o gel foi enxaguado com ddH₂O e lavado duas vezes (15'), sob agitação, com solução de Triton-X 100 a 0,25% (Sigma, St. Louis, EUA). Logo, o gel foi novamente enxaguado com ddH₂O e colocado numa cuba contendo o tampão de incubação (50mM Tris-HCl, pH 7.6, 10mM CaCl₂, 50mM NaCl). A incubação foi realizada em estufa a 37°C durante 24 horas. Ao final da incubação o gel foi enxaguado com ddH₂O e corado, durante uma hora, com a solução de azul de Comassie (0,25% azul de Comassie brilhante, 40% Metanol, 10% ácido acético). Prosseguindo, o gel foi descorado por 30

minutos (40% Metanol, 10% ácido acético). O gel foi novamente enxaguado com ddH₂O e fotografado. A atividade enzimática foi avaliada de acordo com o padrão de migração das bandas em software apropriado - GelPro Analyser 3.1 (Media Cybernetics, Califórnia, EUA).

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Variáveis coletadas e analisadas:

- ✓ Tempo de sobrevida;
- ✓ Peso evolutivo a cada 7 dias;
- ✓ Volume do líquido ascítico imediatamente após morte ou eutanásia;
- ✓ Volume médio dos implantes peritoneais neoplásicos localizados na superfície anterior do abdome;
- ✓ Expressão de MMP-9 presente nos implantes neoplásicos determinados pela técnica de IHQ;
- ✓ Atividade gelatinolítica presente na ascite neoplásica através de zimograma de gelatina;

Foi realizada estatística descritiva dos dados. As medidas foram comparadas pelo teste exato de Fisher, teste t de Student e pelo teste comparativo de grupos Mann Whitney. A análise de sobrevida foi avaliada pelo método de Kaplan-Meier e a comparação entre as curvas foi realizada pela aplicação do teste de Logrank. A sobrevida global foi comparada empregando-se a análise de variância. Foram considerados como estatisticamente significativos os valores de $P < 0,05$. Os dados são apresentados com fotografias e desenhos representativos.

7. RESULTADOS

7.1. Análise da evolução ponderal

Os animais do grupo controle e tratamento apresentaram evolução uniforme quanto ao peso evolutivo, sem diferenças entre si ou entre seus respectivos subgrupos (Tabela 4).

Tabela 4 – Médias ponderais de animais com carcinomatose experimental por tumor de Ehrlich.

Grupo		Média do peso evolutivo (g)								p *
		D0	D7	D14	D21	D28	D35	D42	D49	
Dose única	C 1 (PBS)	29,01	30,99	33,70	32,65	32,67	32,33	33,52	33,47	1,0
	T 1 (BCG)	30,68	33,05	31,57	33,39	33,46	33,24	33,61	32,13	
Sequencial (3/3 dias)	C 2 (PBS)	28,65	29,84	31,45	28,98	29,35	30,27	29,41	29,59	0,3282
	T 2 (BCG)	27,75	29,84	28,96	29,39	31,74	32,53	32,32	33,63	
Reforço (7/7 dias)	C 3 (PBS)	29,15	32,19	33,95	36,10	35,70	35,69	36,69	35,10	0,2345
	T 3 (BCG)	27,63	30,02	30,83	32,36	32,59	34,24	34,59	36,83	

Nota: - Camundongos Suíços foram inoculados (IP) com 3×10^5 células do tumor de Ehrlich e distribuídos aleatoriamente nos subgrupos de experimentação. O tratamento constituiu da aplicação de 1×10^6 UFC BGC (IP). Os animais foram acompanhados por 50 dias após a inoculação. A mensuração do peso foi obtida a cada 7 dias em balança digital.

- IP = intraperitoneal; UFC = unidades formadoras de colônia; D0,D7,D14...D49 = data da pesagem; PBS = tampão fosfato-salina; BCG = *Bacillus Calmette-Guérin*.

- * Teste de Mann Whitney.

Os animais do grupo controle apresentaram aumento progressivo do peso evolutivo nas duas primeiras semanas de acompanhamento, atingindo um platô até o final do experimento. O grupo tratado com aplicação intraperitoneal de BCG apresentou uma diminuição do peso evolutivo na segunda semana de acompanhamento voltando a um padrão linear de ganho de peso nas semanas seguintes (Figura 3).

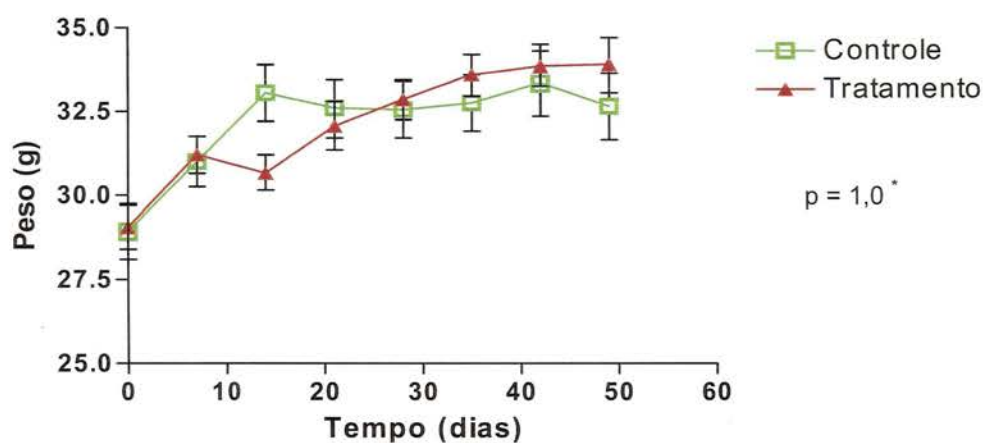


Figura 3 – Comparação linear do peso evolutivo médio nos animais dos grupos controle (PBS) (n= 44) e tratamento (BCG) (n=60) após inoculação IP de células do tumor de Ehrlich. A mensuração do peso foi obtida a cada 7 dias em balança digital. Os animais foram acompanhados por 50 dias após a inoculação. (* Teste de Mann Whitney).

7.2. Análise de sobrevida

Os animais do grupo controle apresentaram evolução uniforme quanto à sobrevida cumulativa ($p= 0,4944$) (Figura 4). Ao final do experimento 26 animais do grupo controle estavam vivos (59,09%). Dezoito animais (40,91%) morreram em decorrência da evolução do tumor de Ehrlich. O animal C1/15 foi excluído da análise, pois seu seguimento foi perdido em virtude de fuga da gaiola. Os animais C1/12, C2/07, C2/11 e C3/04 foram submetidos à eutanásia durante o acompanhamento evolutivo.

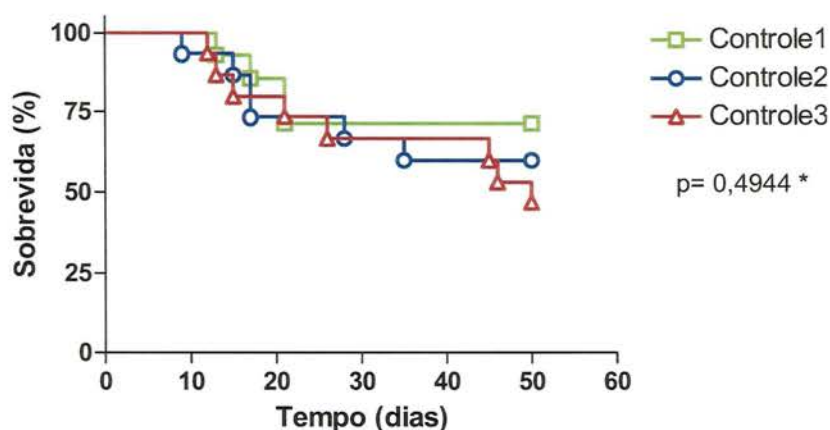


Figura 4 – Sobrevida cumulativa do grupo controle (PBS) após inoculação (IP) de células do tumor de Ehrlich, de acordo com respectivos subgrupos. □ Dose única (n=14), ○ Sequencial (3/3 dias) (n=15) e △ Reforço (7/7 dias) (n=15). Os animais foram acompanhados por 50 dias após a inoculação. (* Teste Logrank).

Os animais do grupo tratamento apresentaram diferença significativa quanto à comparação das curvas de sobrevida cumulativa através do teste de Logrank, observando-se maior sobrevida no subgrupo tratado com dose única de BCG ($p= 0,0426$) (Figura 5). Ao final do experimento cerca de 21 animais estavam vivos (46,67%). Foi possível a identificação de implantes neoplásicos ou o desenvolvimento de ascite nos grupos controle e tratamento. Vinte e quatro animais (53,33%) morreram em decorrência da evolução do tumor de Ehrlich, exceto o animal T3/12 que foi submetido à eutanásia no 20º dia após o implante de células tumorais.

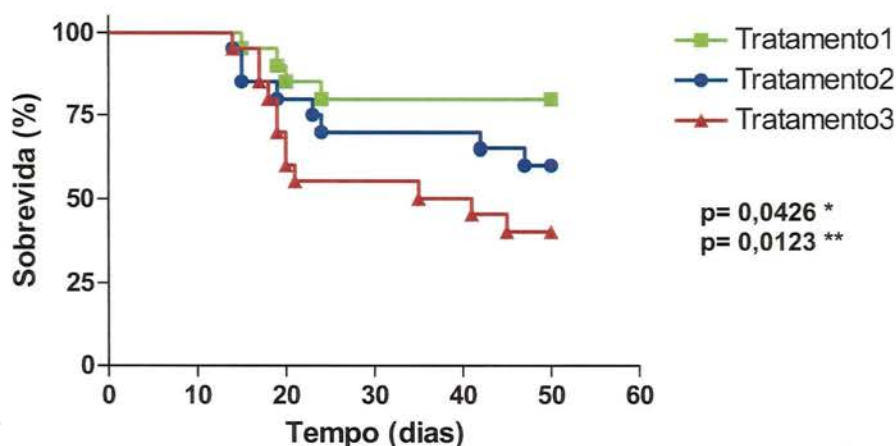


Figura 5 – Sobrevida cumulativa do grupo Tratamento (BCG) após inoculação (IP) de células do tumor de Ehrlich, de acordo com respectivos subgrupos. ■ Dose única (n=20), ● Sequencial (3/3 dias) (n=20) e ▲ Reforço (7/7 dias) (n=20). Os animais foram acompanhados por 50 dias após a inoculação. (* Teste Logrank / ** Teste Logrank para tendência).

A avaliação comparativa entre as curvas de sobrevida dos subgrupos controle (PBS) e tratamento (BCG) não mostrou diferença significativa ($p > 0,05$) (Figura 6).

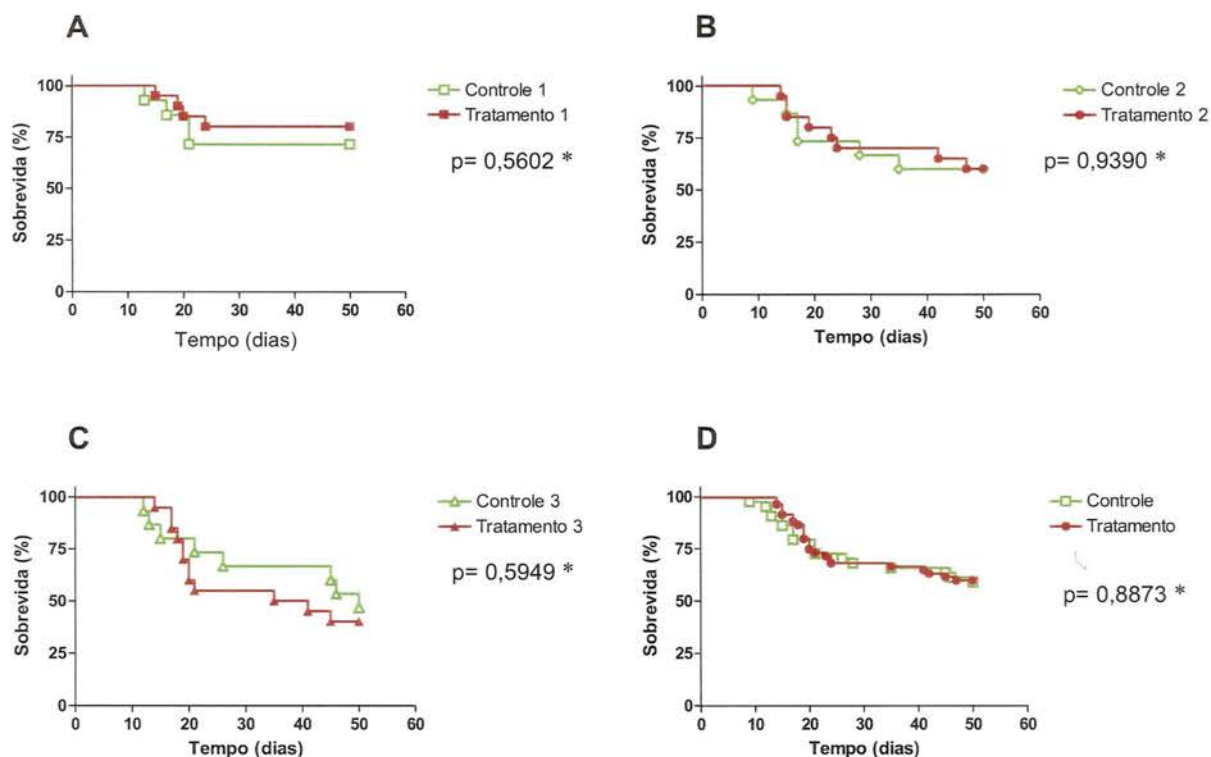


Figura 6 - Sobrevida cumulativa comparativa entre os grupos Controle (PBS) e Tratamento (BCG) e seus respectivos subgrupos após inoculação (IP) de 3×10^5 células do tumor de Ehrlich. Os animais foram acompanhados por 50 dias após a inoculação. A) □ Dose única de PBS (n=14) e ■ Dose única de BCG (n=20); **B)** ○ Dose Sequencial de PBS (3/3 dias) (n=15) e ● Dose Sequencial de BCG (3/3 dias) (n=20); **C)** △ Dose de Reforço PBS (7/7 dias) (n=15) e ▲ Dose de Reforço (7/7 dias) (n=20); **D)** □ Controle PBS (n=44) e ■ Tratamento BCG (n=60). (* Teste Logrank).

7.3. Análise do volume ascítico

Os animais do grupo controle apresentaram evolução uniforme quanto ao desenvolvimento e à quantidade de líquido ascítico ($p= 0,9439$) (Figuras 7 e 8).

Os animais T1/15, T2/04 e T3/16 foram excluídos da análise, pois apresentavam sinais de decomposição não sendo possível coleta de líquido ascítico ou espécime tumoral.

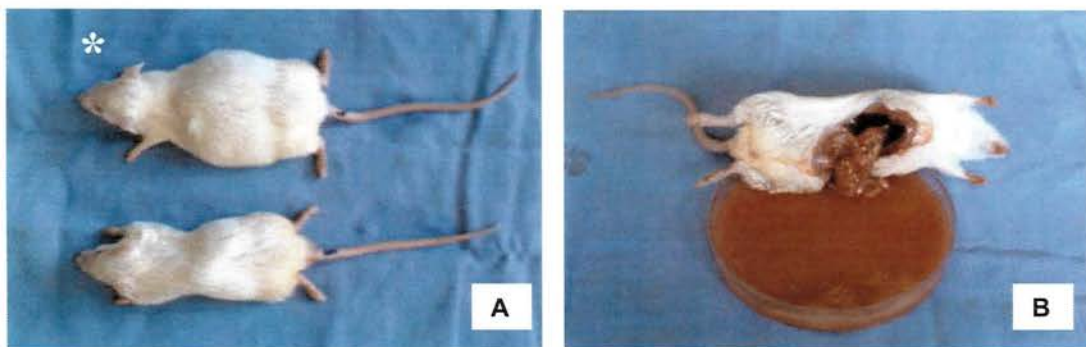


Figura 7 – Fotografia de animais do grupo de experimentação. A) Aspecto macroscópico comparativo entre um camundongo que desenvolveu ascite (*) e outro animal após inoculação (IP) de 3×10^5 células do tumor de Ehrlich. Os animais foram acompanhados evolutivamente por 50 dias após a inoculação quando foram submetidos a eutanásia em câmara de CO_2 . **B)** Método de coleta do líquido ascítico imediatamente após a morte ou eutanásia dos animais.

Ao final do experimento, 25 (56,82%) animais do grupo controle haviam desenvolvido ascite neoplásica com volume médio de 4,562 ml (+/- 4,835) enquanto 32 (56,14%) animais do grupo tratamento desenvolveram ascite com volume médio de 4,89 ml (+/- 3,863) (Figura 8).

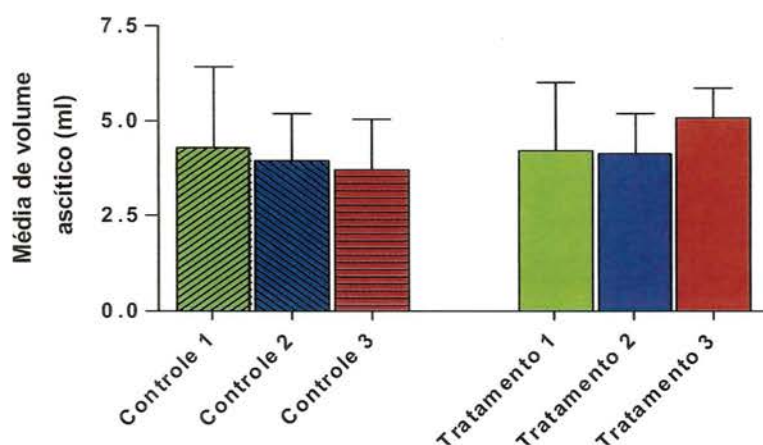


Figura 8 – Média do volume ascítico identificado nos subgrupos controle (PBS) e tratamento (BCG). Controle 1 (n=14), Controle 2 (n=15), Controle 3 (n=15), Tratamento 1 (n=19), Tratamento 2 (n=19), Tratamento 3 (n=19). Os valores identificados não apresentaram diferença entre os grupos ou subgrupos de experimentação ($p>0,05$). (Teste de Mann Whitney / Teste de ANOVA).

7.4. Análise dos implantes peritoneais neoplásicos

Foi possível identificar a presença de implantes peritoneais ou ascite neoplásica em todos os animais avaliados. No grupo Controle, 12 animais (27,27%) apresentavam implantes neoplásicos microscópicos e camundongos 32 (72,73%) possuíam implantes macroscópicos do tumor de Ehrlich no peritônio. No grupo tratado com aplicações intraperitoneais de BCG, 12 camundongos (21,05%) desenvolveram implantes tumorais microscópicos e 45 animais (78,95%) apresentaram implantes neoplásicos macroscópicos. Os animais dos subgrupos Controle (PBS) e Tratamento (BCG) não apresentaram diferença significativa quanto ao volume médio dos implantes neoplásicos detectados ($p > 0,05$) (Figura 9).

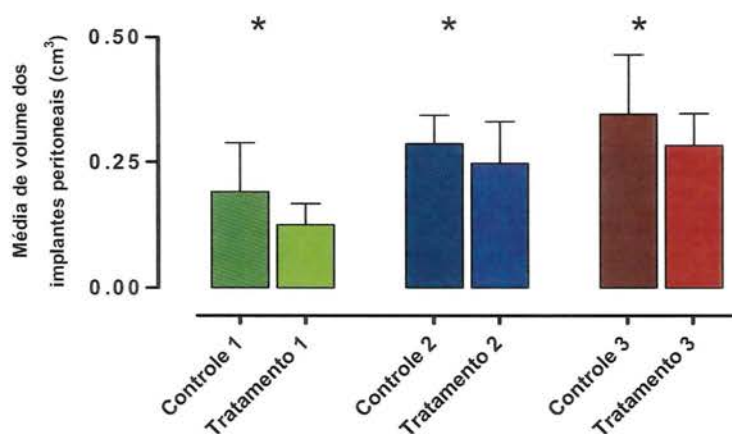


Figura 9 – Volume médio dos implantes peritoneais neoplásicos identificados nos subgrupos controle (PBS) e tratamento (BCG). Controle 1 (n=14), Controle 2 (n=15), Controle 3 (n=15), Tratamento 1 (n=19), Tratamento 2 (n=19), Tratamento 3 (n=19). Os valores identificados não apresentaram diferença significativa entre os grupos ou subgrupos de experimentação ($p > 0,05$). (* Teste t de Student).

7.5. Avaliação Imuno-histoquímica

Amostras de implantes neoplásicos, localizados na parede abdominal dos animais, foram estudadas pela reação de imuno-histoquímica. A intensidade da expressão de MMP-9 foi avaliada no escore, descrito previamente, que variou de 0 a 3. Dos 101 espécimes avaliados, 44 (43,56%) correspondiam ao grupo controle e 57 (56,44%) pertenciam ao grupo tratamento. As células do tumor de Ehrlich não apresentaram expressão da MMP-9 por imuno-histoquímica. Em 7 amostras do grupo tratado com BCG, foi possível identificar uma marcação granular de forte intensidade no citoplasma das células encontradas na periferia da neoplasia, seis amostras pertenciam aos subgrupos tratados com doses repetidas de BCG (Figura 10).

No grupo controle foi possível identificar ausência de marcação pela reação de IHQ em 29 espécimes (65,91%), marcação de fraca intensidade em 11 espécimes (25%), marcação de intensidade moderada em 4 espécimes (9,09%), principalmente, no subgrupo C1.

No grupo tratamento observou-se ausência de marcação pela reação de IHQ em 29 espécimes (50,88%), marcação de fraca intensidade em 15 espécimes (26,32%), marcação de intensidade moderada em 5 espécimes (8,77%), e marcação de forte intensidade em 8 (14,04%) espécimes, principalmente, nos subgrupos T2 e T3.

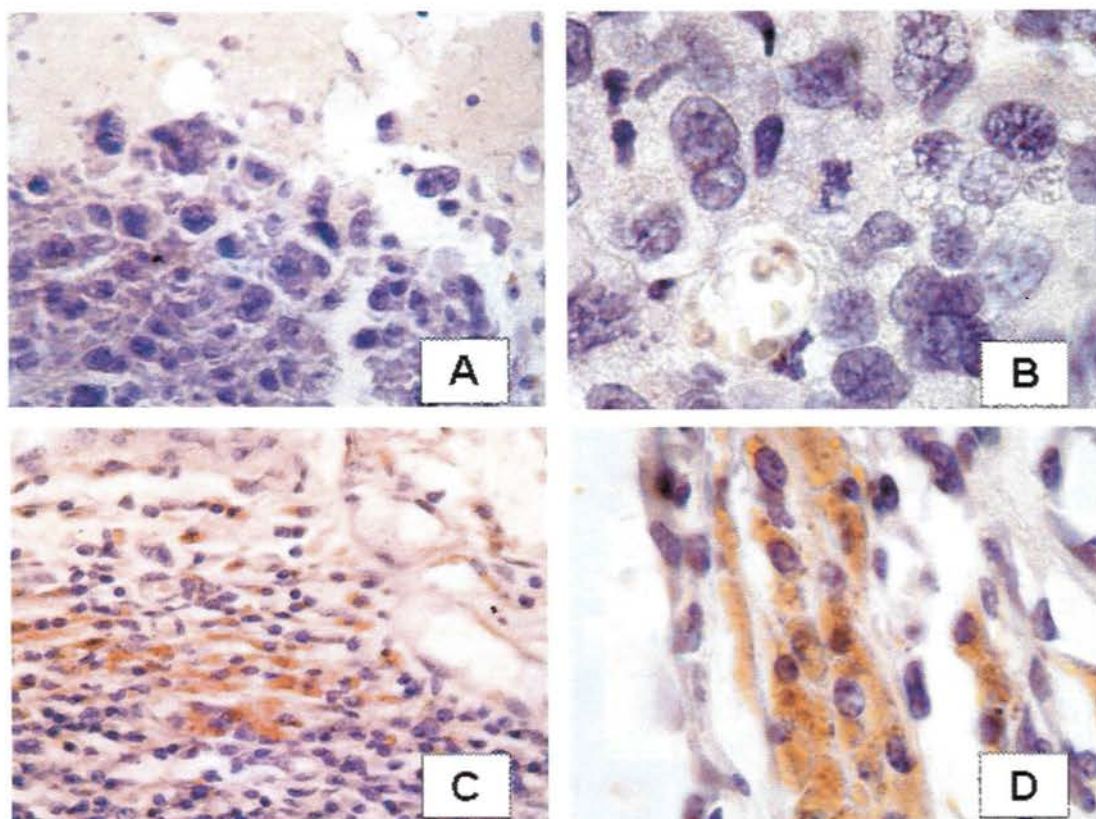


Figura 10 – Imuno-histoquímica para MMP-9 em cortes histológicos de implantes neoplásicos presentes na parede abdominal de camundongos inoculados (IP) com 3×10^5 células do Tumor de Ehrlich submetidos ao protocolo de experimentação. A expressão de MMP-9 foi identificada pela intensidade da coloração castanha intracitoplasmática. As células do tumor de Ehrlich não apresentaram positividade para MMP-9. **A) e B) Fotomicrografia de espécime do grupo controle (PBS) mostra células tumorais com núcleos aumentados, citoplasma abundante e estroma peritumoral com ausência de marcação para MMP-9 (40x e 100x). **C) e D)** Fotomicrografia de espécime do grupo tratamento (BCG) revelando neoplasia maligna com a presença de infiltrado inflamatório associado a forte marcação para MMP-9 (40x e 100x).**

Não houve diferença da média de expressão da MMP-9 entre os subgrupos Controle 1 e Tratamento 1 ($p= 0,8375$) e entre os subgrupos Controle 3 e Tratamento 3 ($p= 0,0915$), apesar da maior marcação da MMP-9 no subgrupo Tratamento 3 (BCG 7/7 dias). O Subgrupo Tratamento 2 (BCG 3/3 dias) apresentou diferença da expressão de MMP-9 por IHQ em relação ao Controle 2 ($p= 0,0497$) (Figura 11).

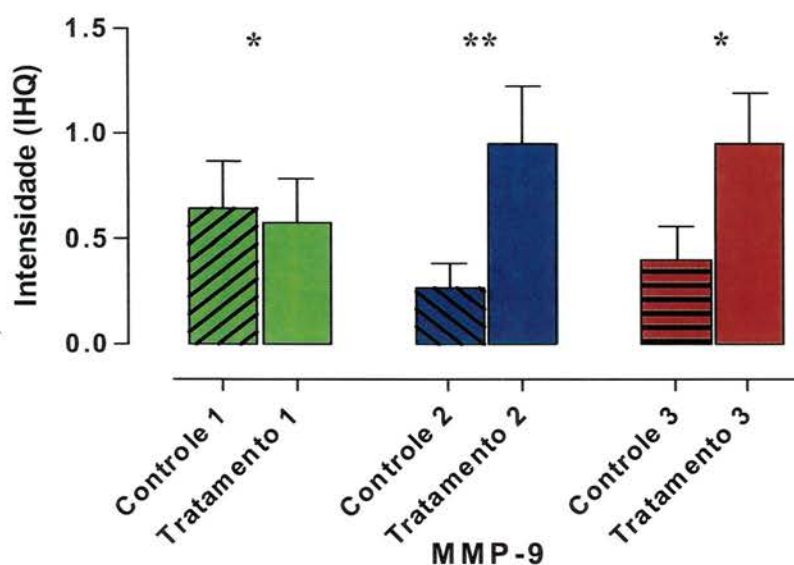


Figura 11 – Média da intensidade de marcação da MMP-9 pela técnica de IHQ nos grupos controle (PBS) e tratamento (BCG). Controle 1 (n=14), Controle 2 (n=15), Controle 3 (n=15), Tratamento 1 (n=19), Tratamento 2 (n=19), Tratamento 3 (n=19). A intensidade da marcação pela reação de IHQ foi obtida pelo seguinte escore: 0 – ausência de marcação; 1– marcação fraca; 2– marcação moderada; 3– marcação forte. A comparação da média de intensidade entre os subgrupos não revelou diferença estatisticamente significativa nos subgrupos Tratamento 1 e Tratamento 3 em relação aos respectivos controles apesar do aumento de expressão de MMP-9 no subgrupo T3 (* $p>0,05$). O subgrupo Tratamento 2 apresentou diferença significativa em relação ao Controle 2 (** $p= 0,0497$). (Teste t de Student).

7.6. Análise das variáveis relacionadas à evolução clínica e à sobrevida

A relação entre as variáveis associadas à evolução clínica estão apresentadas na Tabela 5 e 6. A presença de implantes neoplásicos macroscópicos na superfície peritoneal foi significativamente relacionada ao desenvolvimento de ascite nos animais do subgrupo tratado com dose única de BCG ($p=0,0128$).

Tabela 5 – Resultado das análises atuariais do volume dos implantes peritoneais neoplásicos relacionado ao desenvolvimento de ascite.

Grupo	Variável	Categoria	Implantes (%)		p*
			Microscópicos	Macroscópicos	
C1 n=14	Ascite	Não	33,33	66,67	1,0
		Sim	37,50	62,50	
C2 n=15	Ascite	Não	28,57	71,42	0,2
		Sim	0	100	
C3 n=15	Ascite	Não	20	80	1,0
		Sim	20	80	
T1 n=19	Ascite	Não	63,64	36,36	0,0128
		Sim	0	100	
T2 n=19	Ascite	Não	22,22	77,78	0,5820
		Sim	10	90	
T3 n=19	Ascite	Não	20	80	0,4678
		Sim	7,14	92,86	

Nota: - Camundongos Suíços foram inoculados (IP) com 3×10^5 células do tumor de Ehrlich e distribuídos aleatoriamente nos subgrupos de experimentação. O tratamento constituiu da aplicação de 1×10^6 UFC BGC (IP). Os animais foram acompanhados por 50 dias após a inoculação. A coleta de ascite foi obtida imediatamente após a morte do animal.

- C1, C2, T3 = subgrupos de experimentação; IP = intraperitoneal; UFC = unidades formadoras de colônia;

- * Teste Exato de Fisher.

A expressão de MMP-9 por IHQ apresentou associação significativa com o desenvolvimento de ascite ($p= 0,0002$) e com a ocorrência de implantes peritoneais neoplásicos macroscópicos ($p= 0,0174$) nos animais do grupo tratado com dose única de BCG (Tabela 6). Nos demais subgrupos, não houve associação significativa entre os índices de imunorreatividade de MMP-9 e as variáveis clínicas (ascite e implantes tumorais) como se vê na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultado das análises atuariais da evolução relacionada à presença de ascite, volume médio dos implantes peritoneais neoplásicos e positividade da expressão de MMP-9 por IHQ.

Grupo	Variável	Categoria	IHQ MMP-9 n (%)		p*
			Negativo	Positivo	
C1 n=14	Ascite	Não	66,67	33,33	0,6270
		Sim	50	50	
	Implantes	Microscópico	60	40	1,0
		Macroscópico	55,56	44,44	
C2 n=15	Ascite	Não	71,43	28,57	1,0
		Sim	75	25	
	Implantes	Microscópico	100	0	0,4857
		Macroscópico	53,85	46,15	
C3 n=15	Ascite	Não	80	20	0,6004
		Sim	60	40	
	Implantes	Microscópico	66,67	33,33	1,0
		Macroscópico	66,67	33,33	
T1 n=19	Ascite	Não	100	0	0,0002
		Sim	12,50	87,50	
	Implantes	Microscópico	100	0	0,0174
		Macroscópico	41,67	58,33	
T2 n=19	Ascite	Não	87,50	12,50	0,0587
		Sim	36,36	63,64	
	Implantes	Microscópico	66,67	33,33	1,0
		Macroscópico	50	50	
T3 n=19	Ascite	Não	80	20	0,1108
		Sim	28,57	71,43	
	Implantes	Microscópico	100	0	0,1637
		Macroscópico	35,30	64,70	

Nota: - Camundongos Suíços foram inoculados (IP) com 3×10^5 células do tumor de Ehrlich e distribuídos aleatoriamente nos subgrupos de experimentação. O tratamento constituiu da aplicação de 1×10^6 UFC BGC (IP). Os animais foram acompanhados por 50 dias após a inoculação. A coleta de ascite foi obtida imediatamente após a morte do animal. Os espécimes foram avaliados por imuno-histoquímica para expressão de MMP-9.

- MMP-9 = metaloproteinase-9; IHQ = imuno-histoquímica; C1, C2, T3 = subgrupos de experimentação; IP = intraperitoneal; UFC = unidades formadoras de colônia;

- * Teste Exato de Fisher.

A análise da sobrevida global relacionada revelou correlação significativa entre desenvolvimento de ascite e mortalidade nos subgrupos C1 ($p=0,0066$), C2 ($p=0,007$), C3 ($p=0,007$), T2 ($p=0,0007$) e T3 ($p=0,0018$) (Tabela 7). No subgrupo T1, tratado com dose única de BCG, essa correlação não ocorreu ($p=0,0578$). Neste grupo observou-se menor sobrevida nos animais cujos tumores expressam MMP-9 pela IHQ ($p=0,0361$) (Tabela 7).

A sobrevida dos animais tratados com dose única de BCG foi maior que a dos tratados com doses repetidas de BCG ($p=0,0343$) (Figura 12).

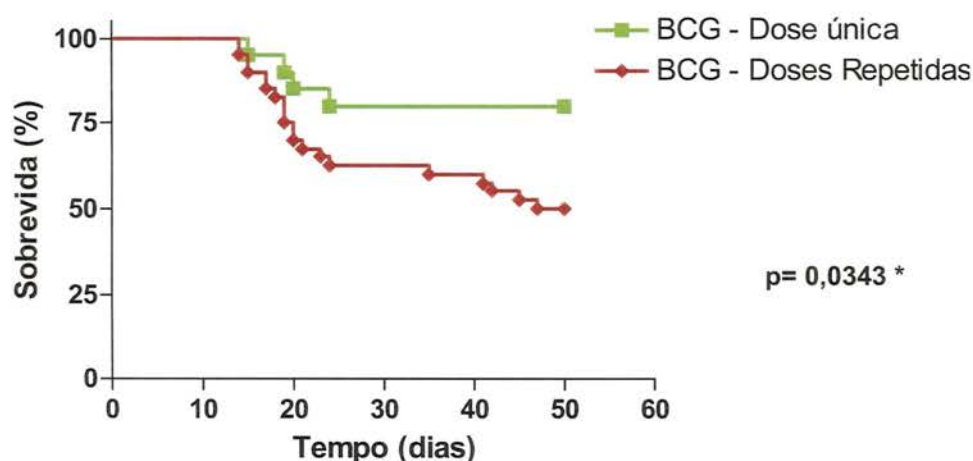


Figura 12 – Sobrevida cumulativa dos animais do grupo tratamento após inoculação (IP) de 3×10^5 células do tumor de Ehrlich, em relação ao número de doses de BCG. O grupo Dose única ($n=15$) recebeu 1×10^6 UFC de BCG no dia da inoculação do tumor de Ehrlich. O grupo Doses Repetidas ($n=30$) recebeu 1×10^6 UFC de BCG de 3/3 dias ou 7/7 dias. Os animais foram acompanhados por 50 dias após a inoculação. (* Teste Logrank).

Tabela 7 – Resultado das análises atuariais da sobrevida global relacionada à presença de ascite, volume médio dos implantes peritoneais neoplásicos e positividade da expressão de MMP-9 por IHQ.

Grupo	Variável	Categoria	n (%)	Sobrevida 50 dias (%)*	p**
C1 n=14	Ascite	Não	42,86	100	0,0066
		Sim	57,14	50	
	Implantes	Microscópico	41,67	80	0,4173
		Macroscópico	58,33	55,56	
	IHQ MMP-9	Negativo	57,14	75	1,0
		Positivo	42,86	66,67	
C2 n=15	Ascite	Não	46,67	100	0,007
		Sim	53,33	25	
	Implantes	Microscópico	13,33	100	0,6146
		Macroscópico	86,67	53,85	
	IHQ MMP-9	Negativo	73,33	54,55	1,0
		Positivo	26,67	50	
C3 n=15	Ascite	Não	33,33	100	0,007
		Sim	66,67	20	
	Implantes	Microscópico	20	33,33	1,0
		Macroscópico	80	50	
	IHQ MMP-9	Negativo	66,67	50	0,5804
		Positivo	33,33	20	
T1 n=19	Ascite	Não	57,89	100	0,0578
		Sim	42,11	62,50	
	Implantes	Microscópico	36,84	100	0,7391
		Macroscópico	63,16	75	
	IHQ MMP-9	Negativo	63,16	100	0,0361
		Positivo	36,84	57,14	
T2 n=19	Ascite	Não	47,37	100	0,0007
		Sim	52,63	20	
	Implantes	Microscópico	15,79	66,67	1,0
		Macroscópico	84,21	62,50	
	IHQ MMP-9	Negativo	52,63	70	0,6499
		Positivo	47,37	55,56	
T3 n=19	Ascite	Não	26,32	100	0,0018
		Sim	73,68	14,29	
	Implantes	Microscópico	10,53	50	1,0
		Macroscópico	89,47	41,18	
	IHQ MMP-9	Negativo	42,11	50	0,6577
		Positivo	57,89	36,36	

Nota: - Camundongos Suíços foram inoculados (IP) com 3×10^5 células do tumor de Ehrlich e distribuídos aleatoriamente nos subgrupos de experimentação. O tratamento constituiu da aplicação de 1×10^6 UFC BGC (IP). Os animais foram acompanhados por 50 dias após a inoculação. A coleta de ascite foi obtida imediatamente após a morte do animal. Os espécimes foram avaliados por imuno-histoquímica para expressão de MMP-9.

- MMP-9 = metaloproteinase-9; IHQ = imuno-histoquímica; C1, C2, T3 = subgrupos de experimentação; IP = intraperitoneal; UFC = unidades formadoras de colônia;

- * Teste de Kaplan Meier.

- ** Teste exato de Fisher.

7.7. Avaliação da atividade gelatinolítica

A avaliação da atividade gelatinolítica foi realizada em amostras de líquido ascítico colhidas (n=12) por zimograma de gelatina (2 mg/ml) em gel de acrilamida a 10%. O resultado da avaliação foi obtido por densidade óptica máxima (DO Max) de cada banda apresentada no gel após leitura e análise pelo programa GelPro Analyser 3.1 (Media Cybernetics, Califórnia, USA). A atividade de MMP-9 e MMP-2, avaliada pelo zimograma, foi identificada nas amostras do grupo controle (PBS) e tratamento (BCG) (Figura 13). A aplicação de BCG intraperitoneal foi capaz de aumentar significativamente a detecção de MMP-9 e MMP-2 no líquido ascítico, principalmente nos subgrupos tratados com doses repetidas ($p=0,0314$ e $p=0,0202$) (Tabela 8) (Figura 14).

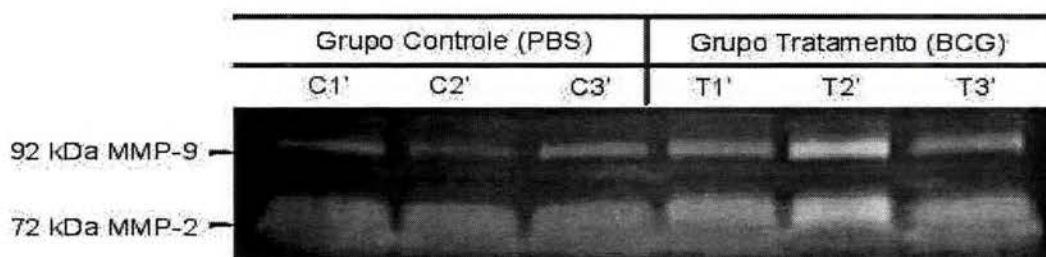


Figura 13 – Determinação da atividade gelatinolítica mediante zimograma de líquido ascítico em gel de SDS-PAGE (10%) com gelatina (2 mg/ml). As linhas correspondem a amostras dos grupos Controle' (PBS) e Tratamento' (BCG) e seus respectivos subgrupos. Amostras de líquido ascítico, de animais inoculados (IP) com 1×10^7 células do Tumor de Ehrlich, foram associadas a tampão não redutor na proporção de 1:1. As colunas do gel foram preenchidas com 15 μ l da suspensão, contendo 100 μ g de proteína total, dosada pelo método de Bradford. As bandas claras correspondem a áreas de atividade gelatinolítica representadas pela MMP-9 (92 kDa) e MMP-2 (72 kDa).

Tabela 8 – Valores médios de densidade óptica máxima (DO Max) evidenciados nos zimogramas em gel de SDS/PAGE (10%) com gelatina (2 mg/ml).

Grupo		Bandas (DO Max)	
		72 kDa MMP-2	92 kDa MMP-9
Dose única	C 1' (PBS)	106,07	77,753
	T 1' (BCG)	189,51 *	161,57 *
Seqüencial (3/3 dias)	C 2' (PBS)	129,36	78,99
	T 2' (BCG)	217,53 *	217,37 *
Reforço (7/7 dias)	C 3' (PBS)	162,49	134,12
	T 3' (BCG)	196,98	164,74

Nota: Valores obtidos após leitura e análise em programa computadorizado GelPro Analyser 3.1 (Media Cybernetics, Califórnia, EUA). (* $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo Controle' que receberam PBS).

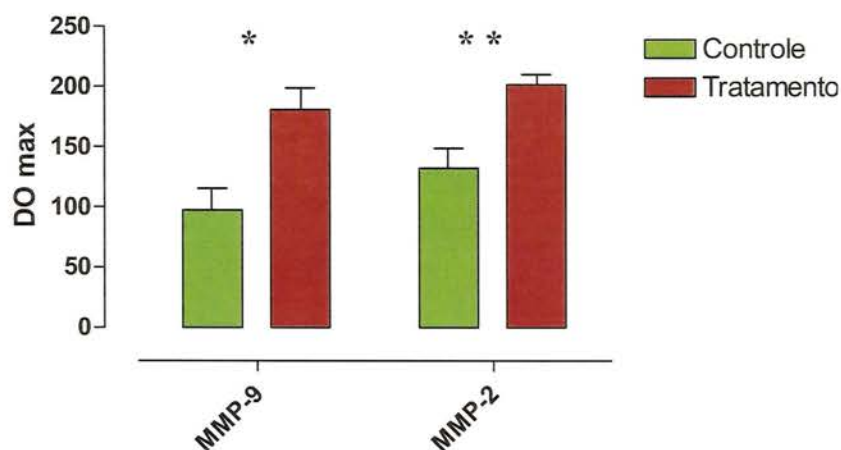


Figura 14 – Medida global de densidade óptica máxima (DO Max) das bandas evidenciadas no zimograma em gel de SDS/PAGE (10%) com gelatina (2 mg/ml) do grupo Controle' (PBS) e Tratamento' (BCG). (* $p = 0,0314$; ** $p = 0,0202$ - Teste t de Student).

8. DISCUSSÃO

8.1. Acompanhamento evolutivo da carcinomatose experimental

Os animais do grupo controle e tratamento apresentaram evolução uniforme quanto ao peso evolutivo ($p= 1,0$) e ao tempo de sobrevida ($p= 0,8873$) (Tabela 4; Figuras 3 e 6). A morte em decorrência da evolução do tumor de Ehrlich foi evidenciada em 40,91% dos animais do grupo controle e 53,33% dos camundongos do grupo tratamento ($p= 0,8873$). Os animais dos subgrupos de tratamento (BCG) que envolveram repetição das doses de BCG grupo obtiveram pior sobrevida quando comparados aos animais tratados com dose única de BCG ($p=0,0426$ e $p=0,0343$) (Figuras 5 e 12).

O desenvolvimento de ascite correlacionou-se significativamente com a sobrevida nos grupos de experimentação ($p < 0,05$), exceto no subgrupo tratado com dose única de BCG ($p=0,7391$) (Tabela 7). Neste grupo (T1) o desenvolvimento de ascite esteve associada à expressão da MMP-9 nos implantes tumorais (0,0002) e a positividade da MMP-9 foi relacionada ao tamanho dos implantes peritoneais neoplásicos ($p= 0,0174$ e $p=0,0128$) (Tabelas 5 e 6). A sobrevida no subgrupo de tratamento com dose única de BCG foi influenciada pela positividade da MMP-9 nos implantes neoplásicos ($p=0,0361$) (Tabela 7). Este achado é semelhante aos resultados da revisão da literatura na qual a formação de ascite está associada à evolução da

carcinomatose peritoneal e correlaciona-se diretamente com o prognóstico dos pacientes (GARRISON 1986).

Tornou-se possível à identificação de implantes peritoneais ou ascite neoplásica em todos animais avaliados (Tabela 5; Figura 9). Ao final do experimento, 56,82% dos animais do grupo controle (PBS) e 56,14% dos camundongos do grupo tratamento (BCG) desenvolveram ascite neoplásica ($p>0,05$) (Figuras 7 e 8). Entretanto, quando se avaliam os animais de um mesmo subgrupo, considerando a formação de ascite neoplásica, a evolução clínica da carcinomatose apresentou-se heterogênea. As técnicas de inoculação experimental do tumor de Ehrlich são variáveis e, muitas vezes, não são citadas pelos pesquisadores, o que dificulta a análise da sua influência. Uma das possíveis explicações para este achado deve estar relacionada ao pequeno número de células tumorais aplicadas na cavidade peritoneal no primeiro experimento (3×10^5), porém, estudos que avaliam influência de imunoterapia no tratamento de tumores necessitam maior tempo de sobrevivência do animal, significando em redução na quantidade ou agressividade de células tumorais utilizadas (EHRlich 1906; GUERRA 1983; LALA 1990; WAINSTEIN 1999; MEDINA 1999; HÖRIG 2001).

Outra possibilidade estaria relacionada ao método de aplicação das células tumorais no peritônio que envolvia a realização de laparotomia mediana e aplicação das células neoplásicas num volume de 0,1 ml, utilizando-se seringa de 1,0 ml com escala de 0,01 ml. Apesar da existência de evidências

que demonstraram uma ocorrência maior de adesão e crescimento de células tumorais nas feridas operatórias, o implante das células tumorais por de laparotomia fez-se necessário para simular uma situação clínica real, onde após a remoção operatória do tumor restariam apenas células neoplásicas residuais na cavidade abdominal. Qualquer imprecisão no volume inoculado poderia corresponder a uma variação de células tumorais implantadas, influenciando diretamente na evolução e sobrevida dos animais. (BUCK 1973).

Os resultados obtidos em relação ao desenvolvimento de ascite neoplásica e sobrevida não difere aos encontrados na evolução natural de neoplasias abdominais humanas que, após tratamento cirúrgico, a metade dos pacientes pode desenvolver carcinomatose peritoneal (SUGARBAKER 1985; SUGARBAKER 1996).

No segundo experimento, foi necessária a aplicação de uma concentração maior de células do tumor de Ehrlich, pois a análise da atividade gelatinolítica dependia do desenvolvimento homogêneo de maior volume ascite neoplásica. Foram aplicadas 1×10^7 células do tumor de Ehrlich na cavidade peritoneal de 12 camundongos fêmeas da linhagem Suíça, de acordo com protocolo semelhante descrito previamente e modificado, neste projeto, para adequar-se às células do tumor de Ehrlich (BELOTTI 2003).

8.2. Imunoterapia intraperitoneal

O sistema imunitário é capaz de rastrear o corpo, continuamente, contra ameaças e moléculas estranhas ao organismo. Quando o sistema imunitário é confrontado no peritônio, concomitantemente, com células tumorais e BCG uma resposta imunitária é desencadeada contra ambos. A especificidade dessa resposta depende da capacidade de co-estimulação do BCG e do reconhecimento de antígenos tumorais. A habilidade de o BCG interferir na proliferação de certo tipos de tumores é bem documentada, entretanto, o protocolo de aplicação apresenta importância crítica, pois altos e baixos níveis de proteção e até a facilitação do crescimento tumoral têm sido observados em estudos experimentais. Além da variação da dose e dos esquemas empregados, um mesmo fragmento da parede celular do BCG pode apresentar epítomos que podem agir como imunomoduladores estimulantes e outros que causam imunossupressão celular (BEAUDET 1983).

O fato que os animais tratados com BCG não terem apresentado evolução clínica e sobrevida melhor que o grupo controle sugere que a resposta imunitária contra a carcinomatose induzida por tumor de Ehrlich foi ineficaz. A falha da imunoterapia empregada pode estar relacionada a fenômenos imunitários associados aos mecanismos de escape tumoral, como:

- Possível baixa imunogenicidade da linhagem de células do tumor de Ehrlich utilizado no projeto, apesar da sua agressividade, origem e morfologia. O câncer origina-se de uma única célula mas a maior parte das neoplasias é composta de clones celulares distintos, geneticamente instáveis, que proliferam com a evolução do tumor (HEPPNER 1984). Uma diferenciação do fenótipo das células da linhagem do tumor de Ehrlich utilizado poderia desapercibida pelo sistema imunológico atraindo uma resposta menos intensa, apesar de sua agressividade biológica (CHAN 1998; SCHREIBER 2002). Ademais, as células da linhagem do tumor de Ehrlich utilizadas podem carecer de moléculas de adesão a linfócitos prejudicando a apresentação dos antígenos tumorais (DE BOER 1986; LOLLINI 2003).
- Provável efeito específico relacionado à cepa do BCG – Mureau RJ, que deve desencadear uma resposta imunológica mais forte e específica contra o BCG e, possivelmente, menos efetiva contra antígenos inespecíficos como os encontrados nas células da linhagem de tumor de Ehrlich inoculadas. A aplicação de um forte adjuvante imunológico como o BCG intraperitoneal pode ser capaz de estimular o sistema imunológico de maneira inespecífica permitindo a identificação e destruição aleatória de antígenos previamente não identificados, como os presentes nas neoplasias. Contudo, mesmo que um grande estímulo imunológico seja gerado, não existe garantia que será dirigido especificamente para o reconhecimento e destruição

- das células do tumor de Ehrlich aplicadas no peritônio dos camundongos dado a baixa imunogenicidade das células do tumor de Ehrlich (PARDOLL 1999; SHRIKANT 1999; BLAKE 2000; OTA 2002).
- Possível imunossupressão induzida pelas células da linhagem do tumor de Ehrlich utilizadas ou pelas citocinas que podem estar presentes na resposta inflamatória decorrente da aplicação intraperitoneal de BCG. Ao que parece, esta supressão associa-se mais a um aumento na produção de TGF- β pelos macrófagos e diminuição da resposta Th1 refletindo na diminuição da produção de IFN- γ (ZHANG 1995; YOUNG 1999; TOOSI 1995; LIN 1996). Este comportamento pode refletir uma propriedade específica das micobactérias ou simplesmente uma consequência da presença da sobrecarga antigênica (YOUNG 1999). A liberação aumentada de TGF- β após estimulação induzida pelo tumor de Ehrlich ou pelo BCG pode ser capaz de reduzir, localmente, a resposta de linfócitos T e a resposta celular necessária para o controle do crescimento tumoral (MÉNDEZ-SAMPERIO 2000; CHEN 2001).
 - Provável sobrecarga antigênica em virtude das repetidas doses de BCG que poderia proporcionar a redução de linfócitos específicos (ROOK 1975; GILBERTSON 1999). A escolha dos esquemas de tratamento com doses repetidas de BCG baseou-se no fato de que existe um atraso discreto na ativação adequada do sistema imunológico para destruir as células tumorais inoculadas (PIMM 1980). Entre o segundo e o quarto dia após aplicação intraperitoneal

de BCG, os macrófagos apresentam grande capacidade fagocítica, que diminui drasticamente ao redor do 8º ao 12º dia (HAMERMAN 2001). Além disso, aplicação intraperitoneal de BCG estimula resposta imune no local induzindo o surgimento de células NK ao redor do 3º ao 5º dia e de linfócitos efetores no 9º dia após sua aplicação (MELTZER 1975; MELTZER 1977; TRACEY 1977 PANG 1982; APPELBERG 1992; HAMERMAN 2001).

- Provável efeito da aplicação de múltiplas doses de BCG contribuindo para o aumento da atividade de macrófagos ativados no local do tumor. Em determinadas neoplasias, os macrófagos apresentam uma relação de simbiose com o tumor, pois as células neoplásicas são capazes de atrair os macrófagos, que por sua vez podem sustentar o crescimento tumoral pela produção de fatores que promovem o crescimento tumoral e estimulam a angiogênese (POLLARD 2004). Entretanto os macrófagos constituem elemento fundamental na resposta imunológica contra as micobactérias e as células neoplásicas produzindo citocinas com ação antitumoral. Os macrófagos ativados pela aplicação de BCG são responsáveis pela produção e liberação de metaloproteinases como a Gelatinase A (MMP-2), Estromelisina (MMP-3), Matrilisina (MMP-7), Gelatinase B (MMP-9) e elastase macrofágica (MMP-12) (HESLIN 2001; LIU 2001). A expressão das MMPs pelos macrófagos correlaciona-se diretamente com a capacidade invasiva e com o prognóstico de neoplásicas sólidas (DAVIES 1993; NAYLOR 1994; YANG 2001).

8.3. Influência das Gelatinases: MMP-2 e MMP-9

As MMPs constituem endopeptidases capazes de serem identificadas nos tecidos normais e tumorais. O aumento da liberação de MMPs no tecido neoplásico auxilia nas etapas de invasão e metastatização. Muitas das MMPs são expressas pelas células normais presentes no estroma tumoral e não pelas células neoplásicas (HEPPNER 1996). Esse achado sugere que o tumor mantém comunicação com o microambiente adjacente, estimulando a produção de MMPs. O aumento da expressão de MMPs encontrada em tumores correlaciona-se com a agressividade tumoral. O aumento na expressão de MMP-9 pode ser identificado em melanomas avançados enquanto que o aumento na expressão de MMP-2 conferiu pior evolução em portadoras de câncer de mama (DAVIES 1993). No experimento realizado, a expressão de MMP-9, detectada por imuno-histoquímica, apresentou correlação com a sobrevida conferindo uma pior evolução aos animais do subgrupo tratado com dose única de BCG (0,0361) (Tabela 7).

A aplicação de BCG intraperitoneal pode ter estimulado a liberação de MMPs, pois a infecção por micobactérias constitui um potente estímulo para produção de MMP-2 e MMP-9 pelos macrófagos murinos, mediado pela secreção de TNF- α e IL-18 e regulado por citocinas leucocitárias como o INF- γ , IL-4 e IL-10 (QUIDING-JÄRBRINK 2001). Outras citocinas como a IL-1 β e o GM-CSF que são liberadas pelos macrófagos após a fagocitose de BCG também podem estar envolvidas na produção de MMPs (SAREN 1996;

WANG 1999; ZHANG 1998). As gelatinases, MMP-2 e MMP-9 constituem as únicas MMPs cujo aumento pode ser detectado após estimulação de macrófagos *in vitro* por BCG (XIE 1994; QUINDING-JÄRBRINK 2001). O recrutamento de células inflamatórias, capazes de induzir a degradação da matriz extracelular, é essencial durante a resposta imunológica protetora às micobactérias e para a formação adequada do granuloma (QUINDING-JÄRBRINK 2001). A produção de MMPs contribui com processo patológico de destruição tecidual, principalmente nos estágios avançados da infecção por micobactérias.

A liberação de MMPs participa no remodelamento do estroma peritumoral além de favorecer a liberação de fatores de crescimento estimulando o crescimento neoplásico (LYNCH 2002). A MMP-9 é capaz de formar um complexo com CD44 que induz a ativação do TGF- β potencializando a proliferação tumoral (YU 1999). O TGF- β é secretado na sua forma latente e depende da proteólise para sua ativação. A MMP-2 e a MMP-9 são capazes de processar um proteoglicano ubiquitinado, denominado Decorina, que serve como reservatório extracelular de TGF- β . A clivagem da Decorina pelas MMPs permite a liberação de TGF- β ativo (IMAI 1997). Além do estímulo mitogênico o TGF- β também pode influenciar no desenvolvimento de um fenótipo mais migratório e invasivo além de contribuir com imunossupressão no local do tumor (BHOMWICK 2001).

principalmente nos subgrupos que receberam doses repetidas de BCG intraperitoneal ($p < 0,05$) (Tabela 8; Figuras 13 e 14). A atividade apresentou-se maior para a MMP-2 e menor para a MMP-9, provavelmente, devido a diferença de expressão de MMPs pelas células da linhagem de tumor de Ehrlich utilizada, que não expressa MMP-9 por imuno-histoquímica (Figura 10). A origem deste aumento pode estar relacionada às repetidas doses de BCG intraperitoneal que contribui para o aumento da ativação dos macrófagos peritoneais. Os macrófagos ativados associados o tumor constituem uma das principais fontes de MMP-9 após aplicação intraperitoneal de BCG, num contexto dose-dependente, explicando a maior quantidade de atividade gelatinolítica detectada no subgrupo de tratamento que recebeu doses seqüenciais de BCG a cada 3 dias (QUINDING-JÄRBRINK 2001; POLLARD 2004) (Figura 13).

As gelatinases estão associadas à formação de ascite neoplásica, provavelmente, pelos seguintes mecanismos: destruição das barreiras físicas às metástases peritoneais e angiogênese associada às MMPs que aumentam a capilaridade da membrana peritoneal, permitindo o acúmulo de fluido. As MMPs, principalmente a MMP-9, induz a liberação de VEGF ativo na ascite neoplásica de animais submetidos ao implante de células de câncer de ovário na cavidade peritoneal. De outra maneira, a redução no volume ascítico pode ser obtida com a utilização de inibidores da metaloproteinases (BELOTTI 2003).

9. CONCLUSÕES

- A aplicação intraperitoneal de BCG, da cepa Mureau – Rio de Janeiro, não alterou a sobrevida dos camundongos submetidos a carcinomatose por tumor de Ehrlich.
- Doses repetidas de BCG aumentam a mortalidade dos animais com carcinomatose peritoneal por tumor de Ehrlich, em relação à dose única.
- A expressão de MMP9 por IHQ é mais evidente nos tumores dos camundongos tratados com doses seqüenciais BCG do que naqueles que receberam aplicações de PBS.
- A expressão tecidual de MMP-9, nos animais tratados com BCG, está associada ao aumento da mortalidade em relação aos camundongos do mesmo grupo que apresentaram ausência de expressão tecidual de MMP-9.
- A atividade gelatinolítica presente no líquido ascítico de animais portadores de carcinomatose por tumor de Ehrlich tratados com BCG é maior do que a dos camundongos que receberam PBS.

10. REFERÊNCIAS

- Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature** 2000; 406: 782.
- Akporiaye ET, Hersh EM. Immune Adjuvants. *In*: DeVita Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA. **Biological therapy of cancer: cancer vaccines- clinical applications**. 2a ed. Philadelphia: JB Lippincott; 1995. p.635-47.
- Appelberg R. Interferon-gamma (IFN-gamma) and macrophage inflammatory proteins (MIP)-1 and -2 are involved in the regulation of the T cell-dependent chronic peritoneal neutrophilia of mice infected with mycobacteria. **Clin Exp Immunol** 1992; 89 (2): 269-73.
- AVMA – American Veterinary Medical Association. Report of the AVMA panel on euthanasia. **J Am Vet Med Assoc** 2001; 218 (5):669-96.
- Baldwin RW, Hopper DG, Pimm MV. Influence of orally administered BCG on growth of transplanted rat tumors. **Br J Cancer** 1975; 31: 124-8.
- Baldwin RW, Hoojer DG, Pimm MV. Bacillus Calmette-Guérin contact immunotherapy of local metastatic deposits of rat tumors. **Ann NY Acad Sci** 1976; 277: 124.
- Baldwin RW, Pimm MV. BCG in tumor immunotherapy. **Advanc Cancer Res** 1978; 28: 91.
- Barker K. **At the bench: a laboratory navigator**. 1ª ed. Cold Spring Harbor: CSHL Press; 1998. Eukaryotic cell culture. ; p. 205-43.

Bartholome EJ, Van Aelst I, Koyen E, Kiss R, Willems F, et al. Human monocyte-derived dendritic cells produce bioactive gelatinase B: inhibition by IFN-beta. **J Interferon Cytokine Res** 2001; 21 (7): 495-501.

Bean AG, Roach DR, Briscoe H, et al. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. **J Immunol** 1999; 162: 3504-11.

Beaudet R, Frenette M, Portelance V. Stimulation of non-specific anti-tumor resistance in the mouse using cell wall preparations from four BCG substrains. **Ann Immunol** 1983; 134: 215-226.

Beckman EM, Porcelli SA, Morita CT, Behar SM, Furlong ST, Brenner MB. Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells. **Nature** 1994; 372: 691.

Belotti D, Paganoni P, Manenti L, Garofalo A, et al. Matrix metalloproteinases (MMP9 and MMP2) induce the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) by ovarian carcinoma cells: Implications for ascites formation. **Cancer Res**, 2003; 63: 5224-9.

Berd D. Cancer vaccines: reborn or just recycled? **Semin Oncol** 1998; 25: 605-10.

Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. **Nature Cell Biol** 2000; 2: 737-44.

Blake N, Haigh T, Shaka'a G, Croom-Carter D, et al. The importance of exogenous antigen in priming the human CD8_ T cell response: Lessons from the EBV nuclear antigen EBNA I. **J Immunol** 2000; 165: 7078-87.

- Bohle A, Brandau S. Immune mechanisms in bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. **J Urol** 2003; 170 (3): 964-9.
- Buck RC. Walker 256 tumor implantatio in normal and injured peritoneum studied by electron microscopy, scanning electron microscopy, and autoradiography. **Cancer Res** 1973; 33: 3181-8.
- Calof AL, Campanero MR, O'Rear JJ, Yurchenco PD, Lander AD. Domain-specific activation of neuronal migration and neurite outgrowth-promoting activities of laminin. **Neuron** 1994; 13 (1): 117-30.
- CCAC – Canadian Council on Animal Care. **Policy statement: Ethics of animal investigation**. Ottawa; 1989.
- CCAC – Canadian Council on Animal Care. **Guidelines on : Choosing an appropriate endpoints in experiments using animals for research, teaching and testing**. Ottawa; 1998.
- Chabalgoity JA, Dougan G, Mastroeni P, Aspinall RJ. Live bacteria as the basis for immunotherapies against cancer. **Expert Rev Vaccines** 2002; 1 (4): 495-505.
- Chan AD, Morton DL. Active immunotherapy with allogeneic tumor cell vaccines: present status. **Semin Oncol** 1998; 25: 611–622.
- Chen W, Frank ME, Jin W, Wahl SM. TGF- β released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. **Immunity** 2001; 14: 715-25.
- Cooper AM, D'Souza C, Frank AA, Orme IM. The course of *Mycobacterium tuberculosis* infection in the lungs of mice lacking expression of either

- perforin- or granzyme-mediated cytolytic mechanisms. **Infect Immun** 1997; 65: 1317.
- Dalton DK, Pitts M-S, Kreshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon- γ genes. **Science** 1993; 259: 1739.
- Dannenberg AM, Rook GAW. Pathogenesis of pulmonary tuberculosis: an interplay of tissue-damaging and macrophage-activating immune responses-dual mechanisms that control bacillary multiplication. *In*: Bloom BR. **Tuberculosis, pathogenesis, protection, and control**. Washington: AMS Press; 1994. p.459.
- Davies B, Waxman J, Wasan H, et al. Levels of matrix metalloproteases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion. **Cancer Res** 1993; 53: 5365–9.
- Davies B, Miles DW, Happerfield LC, Naylor MS, Bobrow MS, et al. Activity of type IV collagenases in benign and malignant breast disease. **Br J Cancer** 1993; 67: 1126-31.
- de Boer RJ, Hogeweg P. Interactions between macrophages and T-lymphocytes: tumor sneaking through intrinsic to helper T cell dynamics. **J Theor Biol** 1986; 120 (3):331-51.
- Demangel C, Bean AGD, Martin E, et al. Protection against aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection using *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin-infected dendritic cells. **Eur J Immunol** 1999; 29: 1972-9.
- Demangel C, Britton WJ. Interaction of dendritic cells with mycobacteris: where the action starts. **Immunol Cell Biol** 2000; 78: 318-24.

- Didot A. Essai sur la prophylaxie du cancer. **Bull Acad Roy Belge** 1852; 11: 100-72.
- Dunsmore SE, Saarialho-Kere UK, Roby JD, Wilson CL, et al. Matrilysin expression and function in airway epithelium. **J Clin Invest** 1998; 102 (7): 1321-31.
- Ehrlich P. Experimentelle karcinom studien na maüsen. **Arb Inst Exp Therap Frankfurt** 1906; 1: 77-102.
- Fiers W. Biologic therapy with TNF: preclinical studies. *In*: DeVita Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA. **Biologic therapy of cancer**. 2a ed. Philadelphia: JB Lippincott Company; 1995. p. 295-6.
- Fonseca FP, Lopes A, Hidalgo GS. Imunoterapia profilática com bacilo Calmette-Guérin no tratamento do câncer superficial da bexiga. **J Bras Urol** 1993; 19(4): 225-229.
- Fonseca FP, Lopes A, Melarato Jr WA, Bachega Jr W, Lopes MMF, Carvalho LV. Cistectomia parcial e ressecção a céu aberto associadas a imunoterapia profilática com BCG liofilizado no tratamento do câncer da bexiga. **J Bras Urol** 1994; 20(3):124-28.
- Fosang AJ, Neame PJ, Last K, Hardingham TE, et al. The interglobular domain of cartilage aggrecan is cleaved by PUMP, gelatinases, and cathepsin B. **J Biol Chem** 1992; 267 (27): 19470-4.
- Fulson SA, Jonson JM, Wolf SA, Sieburth DS, Boom WH. Interleukin-12 production by human monocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis*: role of phagocytosis. **Infect Immun** 1996; 64: 2523.

- Galt SW, Lindemann S, Medd D, Allen LL, et al. Differential regulation of matrix metalloproteinase-9 by monocytes adherent to collagen and platelets. **Circ Res** 2001; 89 (6): 509-16.
- Garrison RN, Kaelin LD, Heuser LS, Galloway RH. Malignant ascites: Clinical and experimental observations. **Ann Surg** 1986; 203 (6): 644-51.
- Gilbertson B, Zhong J, Cheers C. Anergy, IFN- γ production, and apoptosis in terminal infection of mice with *Mycobacterium avium*. **J Immunol** 1999; 163: 2073-80.
- Guerra JL. **Aspecto do processo inflamatório em camundongos portadores do tumor de Ehrlich**. São Paulo; 1983. [Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP].
- Gunderson LL, Sosin H, Levitt LE. Extrahepatic colon cancer, areas of failure in a reoperation series: Implications for adjuvant therapy. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1985; 11: 731-41.
- Hagiwara A, Takahashi T, Sawai K, Sakakura C, et al. Pharmacological effects of 5-fluorouracil microspheres on peritoneal carcinomatosis in animals. **Br J Cancer** 1996; 74: 1392-6.
- Hamerman JA, Aderem A. Functional transitions in macrophages during in vivo infection with *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin. **J Immun** 2001; 167: 2227-33.
- Hanna MG, Peters LC, Hoover JR HC. Immunotherapy by active specific immunization: basic principles and preclinical studies. In: DeVita Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA. **Biologic therapy of cancer**. 1a ed. Philadelphia: Lippincott Co; 1991. p.613.

- Henderson RA, Watkins SC, Flynn JL. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **J Immunol** 1997; 159: 635-43.
- Heppner GH. Tumor heterogeneity. **Cancer Res** 1984; 44: 2259.
- Heppner KJ, Matrisian LM, Jensen RA, Rodgers WH. Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. **Am J Pathol** 1996; 149 (1): 273-82.
- Hernandez-Pando R, Orozco H, Arriaga K , et al. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1 α , tumor necrosis factor- α and transforming growth factor- β , during the course of experimental pulmonary tuberculosis. **Immunobiology** 1997; 90: 607-17.
- Herr HW. Instillation therapy for bladder cancer. *In*: DeVita Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA. **Biologic therapy of cancer**. 2a ed. Philadelphia: JB Lippincott Company; 1995. p. 708-9.
- Heslin MJ, Yan J, Johnson MR, Weiss H, Diasio RB, Urist MM. Role of matrix metalloproteinases in colorectal carcinogenesis. **Ann Surg** 2001; 233: 786–92.
- Heussen C, Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. **Anal Biochem** 1980; 102 (1): 196-202.
- Hörig H, Wainstein A, Long L, Kahn D, et al. A new mouse model for evaluating the immunotherapy of human colorectal cancer. **Cancer Res** 2001; 61 (23): 8520-6.

- Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. **Science** 1993; 260: 547.
- Iitsuka Y, Kaneshima S, Tanida O, Takeuchi T, Koga S. Intraperitoneal free cancer cells and their viability in gastric cancer. **Cancer** 1979; 44 (4): 1476-80.
- Imai K, Hiramatsu A, Fukushima D, Pierschbacher MD, Okada Y. Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta 1 release. **Biochem** 1997; 322: 809-14.
- Inoue T, Yoshikai Y, Matsuzaki G, Nomoto K. Early appearing γ/δ -bearing T cells during infection with Calmette-Guérin bacillus. **J Immunol** 1991; 146: 2754.
- Iwata H, Kobayashi S, Iwase H, Masaoka A, et al. Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human breast carcinomas. **Jpn J Cancer Res** 1996; 87 (6): 602-11.
- Keller R, Hess MW. Tumor growth and non-specific immunity in rats: the mechanisms involved in inhibition of tumour growth. **Br J Exp Path** 1972; 53: 570-7.
- Ketcham AS, Wexler H, Minton JP. Experimental study of metastases. **JAMA** 1966; 198 (2): 157-64.
- Kossakowska AE, Edwards DR, Prusinkiewicz C, Zhang MC, et al. Interleukin-6 regulation of matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) expression in malignant non-Hodgkin's lymphomas. **Blood** 1999; 94 (6): 2080-9.

- Kouwenhoven M, Ozenci V, Tjernlund A, Pashenkov M, et al. Monocyte-derived dendritic cells express and secrete matrix-degrading metalloproteinases and their inhibitors and are imbalanced in multiple sclerosis. **J Neuroimmunol** 2002; 126 (1-2): 161-71.
- Ladel CH, Blum C, Dreher A, et al. Lethal tuberculosis in interleukin-6-deficient mutant mice. **Infect Immunol** 1997; 65: 4843-9.
- Lala PK, Parhar RS, Sing P, Lala PK. Cure of murine ascites tumors with chronic indomethacin therapy combined with intraperitoneal administration of LAK cells and IL-2. **Cancer Lett** 1990; 51: 27-35.
- Lamm DL. Superficial bladder cancer. **Curr Treat Options Oncol** 2002; 3 (5): 403-11.
- Lin Y, Zhang M, Hofman FM, Gong J, Barnes PF. Absence of a proeminent Th2 cytokine response in human tuberculosis. **Infect Immun** 1996; 64: 1351.
- Liu Z, Ivanoff A, Klominek J. Expression and activity of matrix metalloproteases in human malignant mesothelioma cell lines. **Int J Cancer** 2001; 91: 638-43.
- Lollini PL, Forni G. Cancer immunoprevention: tracking down persistent tumor antigens. **Trends Immunol** 2003; 24 (2): 62-6.
- Lum BL, Torti FM. Adjuvant intravesicular pharmacotherapy of superficial bladder cancer. **JNCI** 1991; 83: 682.

- Lynch CC, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. **Differentiation** 2002; 70: 561-73.
- Malkowicz SB. Intravesical therapy for superficial bladder cancer. **Semin Urol Oncol** 2000;18(4): 280-8.
- McQuibban GA, Butler GS, Gong JH, Bendall L, et al. Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. **J Biol Chem** 2001; 276 (47): 43503-8.
- Means TK, Wang S, Lien E, Yoshimura A, Golenbock DT, Fenton MJ. Human Toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. **J Immunol** 1999; 163: 3920.
- Medina M, Velez D, Asenjo JA, Egea G, et al. Human colon adenocarcinomas express a MUC1-associated novel carbohydrate epitope on core mucin glycans defined by a monoclonal antibody (A10) raised against murine Ehrlich tumor cells. **Cancer Res** 1999; 59: 1061-70.
- Meltzer MS, Tucker RW, Sanford KK, Leonard EJ. Interaction of BCG-activated macrophages with neoplastic and non-neoplastic cell lines *in vitro*: quantitation of the cytotoxic reaction by release of tritiated thymidine from pre-labelled target cells. **J Natl Cancer Inst** 1975; 54: 1177.
- Meltzer MS, Stevenson MM. Macrophages function in tumor-bearing mice: tumoricidal and chemotactic responses of macrophages activated by infection with *Mycobacterium bovis*, strain BCG. **J Immunol** 1977; 188: 2176.
- Méndez-Samperio P, Hernández-Garay M, García-Martínez E. Induction of apoptosis in Bacillus Calmette-Guérin-activated T cells by transforming growth factor - β . **Cell Immunol** 2000; 202: 103-112.

- Ota S, Ono T, Morita A, Uenaka A, et al. Cellular Processing of a Multibranched Lysine Core with Tumor Antigen Peptides and Presentation of Peptide Epitopes Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes on Antigen-presenting Cells. **Cancer Res** 2002; 62: 1471-76.
- Pancholi P, Mirza A, Bhardwaj N, Steinman RM. Sequestration from immune CD4+ T cells of mycobacteria growing in human macrophages. **Science** 1993; 260: 984.
- Pang ASD, Morales A. BCG induced murine peritoneal exudates cells: cytotoxic activity against a syngeneic bladder tumor cell line. **J Urol** 1982; 127: 1225-9.
- Parsons DF, Marko M, Braun SJ, Wansor KJ. Ascites tumor invasion of mouse peritoneum studied by high-voltage electron microscope stereoscopy. **Cancer Research** 1982; 42: 4574-83.
- Pardoll DM. Inducing autoimmune disease to treat cancer. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999; 96: 5340-2.
- Phillips HJ, Terryberry JE. Counting actively metabolizing tissue cultured cells. **Exp Cell Res**. 1957; 13: 341-7.
- Pimm MV, Baldwin RW. BCG therapy of pleural and peritoneal growth of transplanted rat tumors. **Int J Cancer** 1975; 15: 260-9.
- Pimm MV, Baldwin RW. Kinetics of BCG mediated tumor cell destruction in the rat. **Eur J Cancer** 1980; 16: 141-6.
- Pollard JW. Tumor-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. **Nat Rev Cancer** 2004; 4: 71-8.

- Pourmotabbed T. Relation between substrate specificity and domain structure of 92-kDa type IV collagenase. **Ann N Y Acad Sci** 1994; 732: 372-4.
- Quiding-Järbrink M, Smith DA, Bancroft GJ. Production of matrix metalloproteinases in response to mycobacterial infection. **Infect Immunity** 2001; XX: 5661-70.
- Ratliff TL. Role of animal models in understanding intravesical therapy with bacille Calmette-Guerin. **Clin Infect Dis** 2000; 31 (Supl 3): S106-8.
- Rook GA. The immunological consequences of antigen overload in experimental mycobacterial infections of mice. **Clin Exp Immunol** 1975; 19: 167-77.
- Rosenhein N, Blake D, McIntyre PA, Parmley T, Natarajan TK, et al. The effect of volume on the distribution of substances instilled into the peritoneal cavity. **Gynecol Oncol** 1978; 6: 106-10.
- Salgaller ML. Cancer vaccines: basic principles – immune adjuvants. *In*: Rosenberg SA. **Principles and practice of the biologic therapy of cancer**. 3a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000. p.584-5.
- Saren P, Welgus H, Kovanen P. TNF- α and IL-1 β selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. **J Immunol** 1996; 157: 4159-65.
- Schreiber H, Wu TH, Nachman J, Kast WM. Immunodominance and tumor scape. **Semin Cancer Biol** 2002; 12 (1): 25-31.

Shelley MD, Court JB, Kynaston H, Wilt TJ, Fish RG, Mason M. Intravesical Bacillus Calmette-Guerin in Ta and T1 Bladder Cancer. **Cochrane Database Syst Rev** 2000; 4: CD001986.

Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lien HC, et al. A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. **Cancer Res** 2001; 61 (1): 237-42.

Shrikant P, Mescher MF. Control of syngeneic tumor growth by activation of CD8+ T cells: efficacy is limited by migration away from the site and induction of nonresponsiveness. **J Immunology** 1999; 162: 2858-66.

Silletti S, Kessler T, Goldberg J, Boger DL, Cheresch DA. Disruption of matrix metalloproteinase 2 binding to integrin alpha vbeta 3 by an organic molecule inhibits angiogenesis and tumor growth in vivo. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001; 98 (1): 119-24.

Silva CL, Silva RC, Pietro RCLR, Lowriw DB. Protection against tuberculosis by passive transfer with T-cell clones recognizing mycobacterial haet-shock protein 65. **Immunology** 1994; 83: 341.

Steel GG. **Growth kinetics of tumors**. Oxford: Claredon Press; 1977. p 165-9.

Sugarbaker PH, MacDonald JS, Gunderson J. **Cancer principles and practice of oncology**. 2^a ed. Philadelphia: JB Lippincott; 1985. p 643-724.

Sugarbaker PH. Observations concerning cancer spread within the peritoneal cavity and concepts supporting and ordered pathophysiology. **Cancer Treatment Research** 1996; 82: 79-100.

- Taraboletti G, Sonzogni L, Vergani V, Hosseini G, ET AL. Posttranscriptional stimulation of endothelial cell matrix metalloproteinases 2 and 1 by endothelioma cells. **Exp Cell Res** 2000; 258 (2): 384-94.
- Thurnher M, Ramoner R, Gastl G, et al. Bacillus Calmette-Guérin mycobacteria stimulate human blood dendritic cells. **Int J Cancer** 1997; 70: 128-34.
- Toossi Z, Gogate P, Shiratsuchi H, Young T, Ellner JJ. Enhanced production of TGF-beta by blood monocytes from patients with active tuberculosis and presence of TGF-beta in tuberculosis granulomatous lung lesions. **J Immunol** 1995; 154: 465.
- Torti FM, Lum BL. The biology and treatment of superficial bladder cancer. **J Clin Oncol** 1984; 2: 505.
- TJU – Thomas Jefferson University. **TJU Policy: guidelines for the utilization of rodents in experimental neoplasia and ascites production.** 1996; N° 104.09.
- Tracey DE, Wolfe SA, Durdik JM, Henney CS. BCG-induced murine effector cells: I. Cytolytic activity in peritoneal exudates – an early response to BCG. **J Immunol** 1977; 119: 1145.
- Trinchieri G. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN- γ). **Curr Opin Immunol** 1997; 9: 17.
- Turner J, Dockrell H. Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells with live *Mycobacterium bovis* BCG activates cytolytic CD8⁺ T cells in vitro. **Immunology** 1996; 8: 339.

Turpeenniemi-Hujanen T, Ronnberg L, Kauppila A, Puistola U. Laminin in the human embryo implantation: analogy to the invasion by malignant cells. **Fertil Steril** 1992; 58 (1): 105-13.

Vaday GG, Schor H, Rahat MA, Lahat N, Lider O. Transforming growth factor-beta suppresses tumor necrosis factor alpha-induced matrix metalloproteinase-9 expression in monocytes. **J Leukoc Biol** 2001; 69 (4): 613-21.

van Ravenswaay Claasen HH, Eggermont AM. Intraperitoneal immunotherapy of ovarian cancer: A review of options for treatment. **Cancer Treatment Research** 1996; 82:13-40.

Vogel FR. Adjuvants in perspective. **Dev Biol Stand** 1998; 92: 241-8.

Wainstein AJ. **Influência da radiação, Mitomicina-C, solução hipotônica, hipertermia, BCG e interleucina-2 na evolução do tumor de Ehrlich intraperitoneal em camundongos.** Belo Horizonte; 1999. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina da UFMG].

Wang J, Wakeham J, Harkness R, Xing Z. Macrophages are significant source of type 1 cytokines during mycobacterial infection. **J Clin Invest** 1999; 103: 1023-29.

Weiss L. Metastatic inefficiency: intravascular and peritoneal implantation of cancer cells. **Cancer Treatment Research** 1996; 82: 1-12.

Witty JP, Foster SA, Stricklin GP, Matrisian LM, Stern PH. Parathyroid hormone-induced resorption in fetal rat limb bones is associated with production of the metalloproteinases collagenase and gelatinase B. **J Bone Miner Res** 1996; 11 (1): 72-8.

macrophage-CSF, and IL-1 β through prostaglandin-dependent and independent mechanisms. **J Immunol** 1998; 161: 3071-6.