

Ação do BCG na imunoterapia ativa de ratos "nude" recém-nascidos heterotransplantados com linhagem tumoral humana (KB)

LEONOR DENARO-MACHADO¹, JESUS CARLOS MACHADO², TEREZINHA REGINA PRUPERE OGATA³, SUELY APARECIDA KFOURI⁴, SELMA M.C.N. PETRELLA³, BRUNO SOERENSEN CARDOZO⁵, CLOVIS DE ARAUJO PERES⁶, MÔNICA RIBEIRO DE BARROS⁴

Unitermos: Imunoterapia — BCG. Ratos "nude".

Key words: BCG — Immunotherapy. Nude rats.

RESUMO — O efeito antitumoral do BCG já foi atribuído à ativação de células T, macrófagos, células NK, resposta do SRE e respostas inespecíficas. Neste trabalho, foi utilizado um modelo experimental (rato *nude* atímico), congenitamente desprovido de células T e em faixa etária que ainda não tenha tido maturação de células NK. O tumor inoculado e desenvolvido nesses ratos foi o KB (carcinoma epidermóide de boca, humano) em suas passagens 6 a 14; o modificador de resposta biológica (MRB) foi o onco BCG (cepa Moreau-São Paulo), produzido pelo Instituto Butantã. Os resultados demonstraram que, quando o BCG era administrado oito dias antes da inoculação do tumor, desenvolvia-se uma proteção, que se traduzia pela diminuição da percentagem de pega tumoral e da incidência de metástases, bem como pelo aumento da sobrevivência dos animais portadores de tumor. Ao que tudo indica, tais efeitos são independentes da presença de células T e NK.

INTRODUÇÃO

Foi a partir de 1956, cerca de 50 anos após sua descoberta, que o BCG começou a ser investigado como um potenciador não específico do sistema imune com efeito protetor contra neoplasias humanas e experimentais^(2-4,8,18).

Sendo os fatores que afetam o desenvolvimento tumoral, até certo ponto dependentes da imunidade do hospedeiro, qualquer agente que estimule ou deprima o siste-

ma imune seria também, indiretamente, capaz de afetar esse desenvolvimento.

O BCG, não fugindo a essa regra, poderia agir sobre todo um espectro de fenômenos imunes específicos e não específicos dos mamíferos, afetando diferentes tipos celulares ou um tipo celular como denominador comum. Há autores que acreditam ser o efeito antitumoral do BCG devido à ativação de células T⁽³⁾, macrófagos⁽¹³⁾, células NK^(20,22,24), resposta do-SRE com estímulo de sua capacidade fagocítica⁽⁸⁾, ou mesmo uma resposta inespecífica através de um processo inflamatório^(1,26).

O modelo experimental utilizado no presente trabalho, sendo congenitamente desprovido de células T e numa faixa etária em que as células NK ainda não se fazem presentes, anula algumas das variáveis que afetam o complexo tumor/hospedeiro/modificador de resposta biológica (MRB).

Outras variáveis, concernentes à utilização do BCG, que também são discutidas na literatura como promotoras de resultados diversos, tais como diferentes vias de

Trabalho realizado com auxílio da FAPESP, CNPq, FEDIB e FUNDAP. Aprovado para publicação em 14/6/88.

1. Chefe da Seção de Anatomia Patológica — Instituto Butantã.
2. Diretor da Divisão de Patologia — Instituto Butantã.
3. Assistente da Seção de Anatomia Patológica — Instituto Butantã.
4. Bolsista da Seção de Anatomia Patológica — Instituto Butantã.
5. Diretor da Divisão de Microbiologia — Instituto Butantã.
6. Professor Adjunto do Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo.

inoculação do MRB^(9,19,25), dosagem^(5,6) e diferentes cepas utilizadas^(11,12), foram mantidas constantes em nossos experimentos.

MATERIAL E MÉTODOS

Constituição dos grupos experimentais — Ninhadas de ratos *nude* atímicos, com idade não superior a dois dias, foram subdivididas em cinco grupos experimentais, conforme mostra a tabela 1.

BCG — O onco BCG utilizado foi produzido no próprio Instituto Butantã através da cepa Moreau-São Paulo contendo, segundo as normas de standardização da OMS, pelo menos três milhões de partículas/mg⁽²¹⁾. A cada partida de onco BCG utilizada era realizado o teste de consumo de O₂, não devendo este ser menor que 0,500 µl/mg/h.

A via de inoculação selecionada para esses experimentos foi a subcutânea, na região axilar direita do animal.

A dosagem utilizada foi 1mg de BCG, num volume final de 0,1ml em meio de Souton.

Tumor KB — Originalmente, a linhagem celular KB (carcinoma epidermóide de boca, humano) foi adquirida do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo) e transplantada seriadamente em ratos *nude*.

No presente estudo, foram utilizadas as passagens 6 a 14 nesses animais. Para tanto, fragmentos da massa tumoral, de cerca de 1mm⁽³⁾, foram implantados subcutaneamente, na região axilar esquerda do animal.

Seguimento dos animais inoculados — Os animais eram examinados a cada dois dias, para se determinar a evolução macroscópica do tumor transplantado.

O sacrifício dos animais em cada grupo foi programado aos 30, 45 e 60 dias após a inoculação. Os demais

componentes do grupo foram preservados para se determinar o tempo de sobrevivência.

Procederam-se às necrópsias dos animais e ao exame histopatológico de pele do local da inoculação do tumor, pele do local da inoculação do BCG, pulmões, coração, fígado, baço, rins, linfonodos e massa tumoral, quando existente. A coleta das biópsias foi feita em formol 10% tamponado, tendo sido aplicados os processos histológicos rotineiros de preparo e coloração das lâminas por H.E. e outros, quando necessários. Os dados referentes aos exames histopatológicos serão motivo de publicação à parte.

RESULTADOS

Incidência de crescimento tumoral — A tabela 2 retrata a percentagem de incidência de crescimento tumoral nos diferentes grupos experimentais.

O grupo G5 não estará representado nas tabelas, pois só recebeu inoculação do BCG. Dos 43 animais inoculados nesse grupo, nenhum desenvolveu qualquer tumor ou qualquer estado de morbidade ou mortalidade que pudesse ser atribuível à infecção pelo BCG.

Os testes estatísticos de homogeneidade em tabelas de contingência revelaram que os valores da incidência tumoral para os grupos G1, G2 e G3 (84%, 76% e 77% respectivamente) são estatisticamente iguais entre si ($p = 0,6781$), mas diferem estatisticamente do valor do grupo G4 ($p = 0,0134$).

Presença de metástases — A presença de metástases, independente do grupo experimental em questão, se deu no tempo mínimo de 45 dias; a grande maioria deles só se evidenciou aos 60 e 90 dias após a inoculação do fragmento tumoral. Nos órgãos, suas principais localizações foram nos pulmões.

TABELA 1

Representação dos diferentes grupos experimentais de ratos "nude" inoculados com tumor e/ou BCG

Grupos experimentais	Nº de animais inoculados	Tipos de inoculações
G1	37	somente tumor
G2	51	tumor + BCG concomitantes
G3	44	tumor e após 8 dias BCG
G4	43	BCG e após 8 dias tumor
G5	43	somente BCG

TABELA 2

Incidência de desenvolvimento tumoral nos diferentes grupos experimentais, inoculados com o tumor e o BCG

Grupos experimentais	Nº de animais inoculados	Animais que desenvolveram tumor
G1	37	31 (84%)
G2	51	39 (76%)
G3	44	34 (77%)
G4	43	25 (53%)*

* Estatisticamente significante

Como mostra a tabela 3, a incidência de metástases no grupo G4 foi mais baixa (3%) que nos demais grupos (9%, 9% e 11% respectivamente), porém o teste de homogeneidade dos quatro grupos não mostrou diferença significativa ($p = 0,7711$).

Sobrevida — A tabela 4 mostra os valores mínimo, máximo e médio (em dias) da sobrevida dos animais representantes de cada grupo experimental.

No gráfico 1 visualizamos o deslocamento favorável ao aumento desse tempo de sobrevida nos animais imunizados pelo BCG, em particular aqueles do grupo G4.

CONCLUSÕES

Os resultados acima expostos parecem indicar que o BCG inoculado antes do tumor (G4) confere ao animal proteção capaz de diminuir tanto a percentagem de pega tumoral, quanto o desenvolvimento de metástases. Resultados semelhantes foram relatados por Old *et al.* (15), postulando esses autores, ainda, ação protetora do BCG que durava até dois meses.

A inoculação da massa tumoral e do BCG a qualquer tempo confere aos animais portadores de tumor maior longevidade, especialmente àqueles do G4, quando comparada com o grupo no qual foi somente inoculado tumor sem BCG, conforme mostra o gráfico 1.

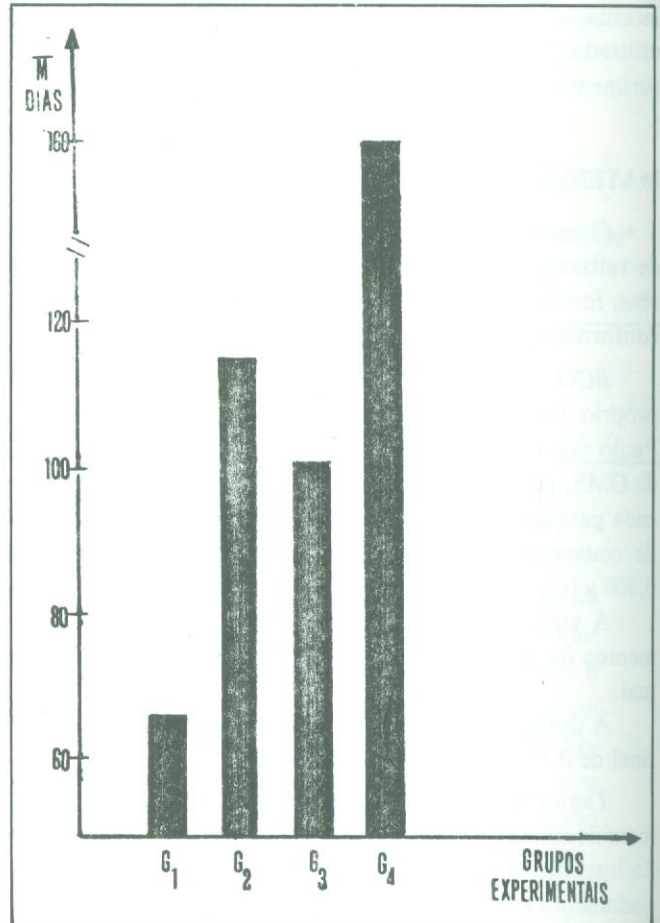


Gráfico 1 — Visão gráfica da variação de sobrevida média dos animais portadores de massa tumoral, nos diferentes grupos experimentais

TABELA 3

Incidência de metástases tumorais nos diferentes grupos experimentais, inoculados com o tumor e o BCG

Grupos experimentais	Animais que desenvolveram tumor	Animais que desenvolveram metástases
G1	31	3 (9%)
G2	39	4 (9%)
G3	34	4 (11%)
G4	25	1 (3%)

TABELA 4

Valores de sobrevida (mínimo, máximo e médio), para cada grupo

Grupos experimentais	Sobrevida (em dias)		
	Mín.	Máx.	Média
G1	60	75	66
G2	86	138	115
G3	80	193	105
G4	88	261	145

O estado de caquexia dos animais portadores de tumor também foi retardado nos animais pertencentes aos grupos G2, G3 e G4.

Embora alguns autores (16) sugiram que a proteção conferida pelo BCG contra tumor se faça pelo recrutamento de linfócitos T sensibilizados, no local da inoculação do tumor, nosso modelo experimental, congenitamente desprovido de células T, parece mostrar o contrário, concordando, portanto, com os achados de Moore *et al.* (14) em animais T deficientes, e Pimm e Baldwin (17) em camundongos *nude* atímicos que mostraram que um tumor de rato crescia progressivamente se inoculado sozinho, mas seu crescimento era suprimido quando BCG era também administrado.

Há autores (20,22-24) que assinalam em animais e na espécie humana rápido aumento da atividade celular NK após inoculação de agentes como o BCG, o que poderia promover uma regressão tumoral.

Em roedores, no entanto, a atividade celular NK não está presente ao nascimento, mas se desenvolve após a 4.^a semana e alcança seu pico após oito semanas de vida^(7,10).

Em nosso modelo experimental, as inoculações, tanto do tumor quanto ao BCG, foram realizadas com no máximo dez dias de vida do animal, portanto quando as células NK ainda não estariam presentes, segundo Herberman *et al.*⁽¹⁰⁾ e Glimcher *et al.*⁽⁷⁾. Restar-nos-ia comprovar se tais células seriam prematuramente ativadas com a inoculação desse MRB, como postulado por Santoli *et al.*⁽²⁰⁾, Welsh *et al.*⁽²²⁾ e Wolfe *et al.*⁽²⁴⁾, ou se outros tipos celulares, entre os quais os macrófagos seriam fortes candidatos, estariam sendo ativados pelo BCG, agindo, portanto, como inibidores do crescimento tumoral, como proposto por Meltzer *et al.*⁽¹³⁾.

Finalizando, resta-nos comentar que, diante das respostas que obtivemos com tal metodologia, o contato direto entre as micobactérias e o tumor, preconizado por alguns autores⁽¹⁹⁾ como imprescindível para que haja o efeito inibidor do MRB sobre o tumor, parece não ser condição *sine qua non* para essa resposta inibitória. Em nossos animais, mesmo inoculados BCG e tumor em pontos opostos, esse efeito se fez presente.

SUMMARY

The antitumoral effect of BCG has been attributed to the activation of T cells, macrophages, NK cells, responses of RES and inespecific responses.

An experimental model (athymic nude rat), congenitally depleted of T cells and in an age range where the maturation of NK cells was still absent, was utilized in the present work.

The tumor inoculated and developed in these rats was the KB (human epidermoid carcinoma of the mouth) in the passages 6 to 14; the modifier of the biological response (MBR) was the onco BCG (Moreau-São Paulo strain), produced by the Instituto Butantan.

The results demonstrated that, when the BCG was administered 8 days before the inoculation of the tumor, it develops a kind of protection of the animal, that was shown by the decrease of the percentage of tumoral takes and metastase incidence, as well as by the increase on survival of animals carrying tumor masses.

It seems that these effects are independent of the presence of T and NK cells.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARTLETT, GL; ZBAR, B; RAPP, HJ Suppression of murine tumor growth by imune reaction to the bacillus Calmette-Guèrin strain of mycobacterium bovis. J. Natl. Cancer Inst. 48: 245-257, 1972.
2. BAST, RC et al BCG and cancer (first of two parts) BCG and cancer (second of two parts). N. Engl. J. Med. 290: 1.413-1.419; 1.458-1.468, 1974.
3. BLUMING, AZ BCG: a note of caution. N. Engl. J. Med. 289: 860, 1973.
4. BORNSTEIN, RS; YARBRO, JW; PREHN, RT Immunotherapy: the need for critical studies. Ann. Intern. Med. 76: 499-501, 1972.
5. DAVIES, M & SABBADINI, E Effects of different doses of BCG on an allogenic cell-mediated antitumor response in mice: brief communication. J. Natl. Cancer Inst. 59: 263-265, 1977.
6. ——— Dose-dependent adjuvant effects of bacillus Calmette-Guèrin on tumor immunity in Lewis rats. Cancer Res. 39: 959-965, 1979.
7. GLIMCHER, L; SHEN, FW; CANTOR, H Identification of a cell-surface antigen selectively expressed on the NK cell. J. Exp. Med. 145: 1-9, 1977.
8. HALPERN, BN et al Effect de la stimulation du système réticuloendothélial par l'inoculation du bacille de Calmette-Guèrin sur le développement de l'épitheliome atypique T-S de Guèrin chez le rat. C.R. Soc. Biol. 153: 919-923, 1959.
9. HANNA, MG et al Histopathology of tumor regression after intralesional injection of mycobacterium bovis: IV-development of immunity to tumor cells and BCG. J. Natl. Cancer Inst. 51: 1.897-1.908, 1973.
10. HERBERMAN, RB; NUNN, ME; LAVRIN, DH Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogenic tumors: I distribution of reactivity and specificity. Int. J. Cancer, 16: 216-229, 1985.
11. MACKANESS, GB; AUCLAIR, DJ; LAGRANGE, PH Immunopotential with BCG: I-immune response to different strains and preparations. J. Natl. Cancer Inst. 51: 1.655-1.667, 1973.
12. MATHÉ, G et al An experimental screening for systemic adjuvants of immunity applicable in cancer immunotherapy. Cancer Res. 33: 1.987-1.997, 1973.
13. MELTZER, MS; JONES, EE; BOETCHEF, DA Increased chemotactic responses of macrophages from BCG infected mice. Cell Immunol. 17: 268-276, 1985.
14. MOORE, M; LAWRENCE, N; NISBET, NW Tumor inhibition mediated by BCG in immunosuppressed rats. Int. J. Cancer, 15: 897-911, 1975.
15. OLD, LJ; CLARKE, DA; BENACERRAF, B Effect of bacillus Calmette-Guèrin infection on transplanted tumours in the mouse. Nature, 184: 291-292, 1959.

16. PARR, IB; WHEELER, E; ALEXANDER, P Selective mobilization of specifically cytotoxic T lymphocytes at sites of inflammation in relation to BCG: induced resistance to implants of syngeneic sarcoma in mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 59: 1.659-1.666, 1977.
17. PIMM, MV & BALDWIN, RW BCG immunotherapy of rat tumours in athymic nude mice. *Nature*, 254: 77-78, 1975.
18. ROSENTHAL, SR BCG in cancer and leukemia. *Bull L'Inst. Pasteur*, 20: 29-50, 1972.
19. RUMI, L Cancer y BCG. *Acta Physiol. Lat. Am.* 31: 25-34, 1981.
20. SANTOLI, D & KOPROWSKI, H Mechanisms of activation of human natural Killer cells against tumours and virus-infected cells. *Immunol. Rev.* 44: 123-163, 1979.
21. SOERENSEN, B et al Normas para a preparação do BCG oral destinado ao tratamento coadjuvante das neoplasias. *Va. So. ros.* 1: 64-70, 1985.
22. WELSH, RM et al Heterospecific cytotoxic cell activity induced during the first three days of acute lymphocytic choriomeningitis virus infection in mice. *Nature*, 268: 646-648, 1977.
23. WOLFE, SA; TRACEY, DE; HENNEY, CS Induction of NK cells by BCG. *Nature*, 262: 584-586, 1976.
24. _____ BCG induced murine effector cell II: characterization of NK cells in peritoneal exudates. *J. Immunol.* 119: 1.152-1.158, 1977.
25. ZBAR, B et al Tumor immunity produced by the intradermal inoculation of living tumour cells and living mycobacterium bovis (strain BCG). *Science*, 170: 1.217-1.218, 1970.
26. ZBAR, B & TANAKA, T Immunotherapy of cancer: regression of tumors after intralesional injection of living mycobacterium bovis. *Science*, 172: 271-273, 1971.

XXX Reunião Anual de Cancerologia XIV Encontro dos Ex-Residentes do Instituto Central III Jornada de Enfermagem em Oncologia

13 a 15 de outubro de 1988

Local: Hospital A.C. Camargo — Fundação Antônio Prudente
Anfiteatro Senador José Ermírio de Moraes
Rua Prof. Antônio Prudente, 211, São Paulo, SP — CEP 01509

Informações: Tel. (011) 278-8811, ramal 134

Convidados estrangeiros: Jeffrey Eckardt (EUA) — Tumores ósseos
Arlan Fuller (EUA) — Tumores ginecológicos
Reinaldo D. Chacon (Argentina) — Tumores de mama

Inscrição: médicos — 6 OTN's
estudantes e residentes — 4 OTN's
enfermeiras — 2 OTN's