

ESTUDOS PRELIMINARES DA IMUNIDADE CELULAR NO TUMOR DE EHRLICH

TOMOKO HIGUCHI
Professor Livre-Docente
Instituto de Química da USP

HIGUCHI, T. Estudos preliminares da imunidade celular no tumor de Ehrlich. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 25(2):237-241, 1988.

RESUMO: O sistema imune dos animais é constituído por linfócitos, macrófagos, células relacionadas e seus produtos solúveis, encontrados em diferentes tecidos e órgãos. No tumor de Ehrlich em camundongos, o fenômeno da citotoxicidade dependente de anticorpo foi demonstrada ser eficiente. O critério empregado para avaliar a influência dos mediadores foi a medida da síntese do DNA da célula, pela quantidade de ³H-timidina incorporada após um pulso de 2 horas, pela subsequente contagem da radioatividade precipitada pelo ácido tricloroacético 10%. A atividade supressora do lipopolissacarídeo bacteriano foi estudada tanto pelos fatores solúveis liberados pelos macrófagos, como também nos macrófagos tratados em contato com as células tumorais. Os fatores envolvidos no tumor de Ehrlich aparentemente são múltiplos, agindo isolada e conjuntamente, havendo necessidade de estudos posteriores para o entendimento do complexo fenômeno da imunidade celular.

UNITERMOS: Neoplasias, tumor de Ehrlich; Imunidade celular

INTRODUÇÃO

O sistema imunocompetente de um organismo animal é constituído por um conjunto de células do tipo linfócitos, macrófagos, células dendríticas do baço, células de Langerhans e células epiteliais especializadas. Tais células se localizam no sangue, linfa, baço, nódulos linfáticos, placas de Peyer, timo e medula óssea ou seja, nos órgãos linfóides primários e secundários.

Os linfócitos, que representam papel relevante, têm a sua atividade dependente da presença de receptores na superfície da membrana; assim PAUL, B (1984) estimou a presença de mais do que 10^6 receptores por célula. Os linfócitos B são ativados na presença de um imunógeno diferenciando-se em plasmócitos, que secretam as imunoglobulinas correspondentes. Por outro lado, há uma variedade de tipos de linfócitos T, alguns dos quais participam em funções regulatórias como auxiliares na produção de imunoglobulinas. Outros linfócitos T são envolvidos em funções efetoras, pela liberação de fatores que iniciam respostas inflamatórias, destruição de células etc. Assim, distinguem-se os linfócitos auxiliares, supressores, "natural and induced killers" (FUGIMOTO et alii, 1, 1976 e TADA, 9, 1984). Dentre as funções citotóxicas, além dos chamados NK ("natural killer cells") que destroem certas células tumorais, tem papel preponderante na defesa orgânica, o fenômeno representado pela sigla ADCC (citotoxicidade celular dependente de anticorpos), no qual as células que apresentam antígenos de superfície recobertos pelos anticorpos correspondentes tornam-se susceptíveis à atividade dos linfócitos e seus produtos liberados, que são dotados de atividade farmacológica.

Neste trabalho, apresentamos os resultados preliminares envolvendo a imunidade celular no tumor de Ehrlich.

MATERIAIS E METODOS

Separação dos linfócitos. O baço de camundongo BALB/c (8 semanas de idade) foi rápida e cuidadosamente picotado na placa de Petri contendo meio de Eagle. A suspensão celular em 20 ml de Ficoll - Conway foi centrifugada a 2.500 Xg/10 min/ 4° C, o sedimento de linfócito foi suspenso em meio de Eagle contendo 10% de soro fetal bovino (FCS). (HENNEY & GILLIS, 2, 1984). Uma amostra foi retirada para contagem do número de células.

Separação de macrófagos. A indução da migração de macrófagos se faz pela injeção de óleo de parafina (TANAKA, 10,

1980) no peritônio de BALB/c (idade = 9 semanas), sacrificando-se o animal após 3 dias. As células aderidas à membrana do peritônio foram cuidadosamente retiradas por sucessivas lavagens com meio de Eagle. A suspensão foi centrifugada várias vezes para eliminação do óleo de parafina e o resíduo celular ressuspensão em meio de Eagle contendo 10% de FCS. Uma alíquota foi retirada para avaliação do número de células.

Células do tumor de Ehrlich. As células tumorais (mantidas permanentemente em cultura) foram injetadas intraperitonealmente. Usualmente, utilizamos 3 animais injetados com 1×10^5 ; 2×10^5 e 5×10^5 células respectivamente. Os animais foram sacrificados 3 a 4 dias após a inoculação. As células tumorais foram separadas do fluido ascítico por centrifugação diferencial (1ª - 500 Xg/5 min/4°C; sobrenadante a 2000 Xg/15 min/4°C). O resíduo foi ressuspensão em meio de Eagle contendo 10% de FCS e uma alíquota utilizada para contagem do número de células.

ADCC (Citotoxicidade celular dependente de anticorpos). A suspensão de linfócitos mais células tumorais foi incubada na presença dos anticorpos (soro de coelho anti-células tumorais) à temperatura de 37°C, por 2 horas e filtrada em Millipore. O fluido foi incubado juntamente com novas células tumorais a 37°C por aproximadamente 15 horas. O grau de citotoxicidade foi medido pela síntese de DNA pelas células remanescentes, dando um pulso de duas horas com ^3H -timidina ($10 \mu\text{l} - 9 \mu\text{Ci}/\text{m mol}$), seguida de precipitação com ácido tricloroacético 10%. A radioatividade do material precipitado foi medida num contador ("Automatic Computerized Packard Machine/82") - (MIZOGUCHI et alii, 3, 1982).

Atividade do lipopolissacarídeo (LPS). A suspensão de macrófagos mais LPS de *Salmonella typhi* foi incubada a 37°C por aproximadamente 15 horas, o fluido foi decantado e as células remanescentes no tubo foram lavadas com o meio de Eagle e então incubadas na presença de novas células tumorais. A síntese do DNA celular foi medida pela quantidade de ^3H -timidina incorporada (MIZOGUCHI et alii, 4,5, 1980, 1981).

As incubações das células em todos os experimentos foram à temperatura de 37°C, na presença de 5% de CO_2 em estufa umidificada.

se observa uma diferença na incorporação de ^3H -timidina pelas células na presença de anticorpo em relação ao controle. Verificam-se diferenças na citotoxicidade, dependendo da raça do animal empregado para ativação dos linfócitos (resultados não apresentados).

NAGAO et alii, 6,7 (1984, 1985) estudaram a ação de imunomoduladores e concluíram que o LPS bacteriano apresentava atividade inibitória na viabilidade de macrófagos de camundongos Hartley. Quando empregamos fluido de células ativadas, observamos decréscimo na incorporação de ^3H -timidina na presença do LPS (Tab. 2). Por outro lado, quando utilizamos células residuais, a atividade do LPS sobre macrófagos foi bem mais pronunciada (Tab. 3). Os dados experimentais de NAGAO et alii, 6,7 (1984, 1985) enfatizam a importância do tempo de incubação na presença do lipopolissacarídeo; nas fases iniciais os autores admitem a atividade do LPS por si só, enquanto que após 24 horas soma-se o efeito dos mediadores liberados pelos macrófagos estimulados.

Foram efetuados experimentos com o fito de verificar a influência da interleucina-2 (IL-2), também denominada TCGF ("T cell grow factor"). Quando utilizamos células de tumor ascítico bem evoluído, em que o animal apresentava baço necrótico, a proporção de 1 nanograma para 5×10^6 células tumorais não surtiu efeito algum. Experimentos estão sendo conduzidos pelo grupo de MIZOGUCHI et alii (1987)* empregando linfócitos separados do sangue de pacientes humanos, em diferentes graus de evolução de câncer gástrico para a medida do grau protetor de IL-2 usando os linfócitos dos pesquisadores como valores controles.

A defesa do hospedeiro contra células tumorais, à semelhança de outros processos infecciosos, depende não só do sistema humoral, como também dos fenômenos celulares. Há uma gama extensa de produtos liberados pelas células do sistema imune de estrutura molecular ainda desconhecida, relação de estrutura e função a ser determinada, regulação na liberação dos fatores, interação entre receptores celulares e componentes ativos, o que torna a matéria controversa, exigindo, ainda, consideráveis esforços para a compreensão dos fenômenos principais envolvidos na resposta imune.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A eficiência do fenômeno da citotoxicidade dependente de anticorpos é claramente demonstrada na Tab. 1, em que

CONCLUSÕES

O sistema imune dos animais é constituído por linfócitos, macrófagos, células relacionadas e seus produtos so-

* MIZOGUCHI, Y. et alii (The First Department of Biochemistry - Medical School - Osaka City Univ. Japan) Study of IL-2 on lymphocytes of gastric cancer patients. s.l., 1987. /In preparation/

Estudos preliminares da imunidade celular no tumor de Ehrlich

lúveis, encontrados em diferentes tecidos e órgãos. No tumor de Ehrlich em camundongos, o fenômeno da citotoxicidade dependente de anticorpo foi demonstrada ser eficiente. O critério empregado para avaliar a influência dos mediadores foi a medida da síntese do DNA da célula, pela quantidade de ^3H -timidina incorporada após um pulso de 2 horas, pela subsequente contagem da radioatividade precipitada pelo ácido tricloroacético 10%. A atividade supressora do lipopolissacarídeo bacteriano foi estudada tanto pelos fatores solúveis liberados pelos macrófagos, como também nos macrófagos tratados em contato com as células tumorais.

Os fatores envolvidos no tumor de Ehrlich aparentemente são múltiplos, agindo isolada e conjuntamente, havendo necessidade de estudos posteriores para o entendimento do complexo fenômeno da imunidade celular.

TABELA 1 - Citotoxicidade dependente de anticorpo (ADCC)

SISTEMA (N=5)	VOLUME	(ML)
Linfócitos	0,50	0,50
Células tumorais	0,50	0,50
Anticorpo	0,01	-
Fluido	0,50	0,50
Células tumorais	0,50	0,50
CPM	1685	3021

Linfócitos (1×10^7 cels/ml); células tumorais (1×10^5 cels/ml); anticorpo; 2 horas - 37°C ; filtração em Millipore; fluido + novas células tumorais (1×10^6 cels/ml); incubação por 12 horas - 37°C ; pulso 2 horas $10 \mu\text{l}$ ^3H -timidina ($9 \mu\text{Ci}/\text{mmol}$); precipitação com ácido tricloroacético 10% e medida de radioatividade, expresso em CPM (contagens por minuto).

TABELA 2 - Inibição de macrófagos por LPS: produtos solúveis

SISTEMA (N=3)	VOLUME	(ML)
Macrófagos	0,50	0,50
LPS	-	0,01
Sobrenadante	0,50	0,50
Células tumorais	0,50	0,50
CPM	4568	2613

Macrófagos (2×10^6 cels/ml); LPS - 0,1 mg/ml; 48 horas incubação a 37°C ; filtração em Millipore; sobrenadante + células tumorais (2×10^6 cels/ml); pulso 2 horas ^3H -timidina ($10 \mu\text{l}$; $9 \mu\text{Ci}/\text{mmol}$); determinação de contagens precipitáveis pelo ácido tricloroacético 10%, expressos em CPM (contagens por minuto).

TABELA 3 - Inibição dos macrófagos pelo LPS: "Célula-Célula"

SISTEMA (N=3)	VOLUME	(ML)
Macrófagos	0,50	0,50
LPS	-	0,01
Células tumorais	0,50	0,50
CPM	2198	1391

Macrófagos (2×10^6 cels/ml); LPS - 0,1 mg/ml; 24 horas a 37°C ; desprezar o sobrenadante; lavar células com meio de Eagle; adicionar novas suspensões de células tumorais (2×10^5 cels/ml); incubação 12 horas - 37°C ; pulso de 2 horas ^3H -timidina; contagem do material insolúvel em ácido tricloroacético, expressos em CPM (contagens por minuto).

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de expressar a apreciação ao Prof. Dr. E. Kimura - Reitor da "Osaka City University" e Prof. Dr. S. Watanabe (USP) pela oportunidade de participar do Programa de Intercâmbio. Os agradecimentos são extensivos aos componentes do "Dept. of Biochemistry - Osaka City University". O estágio foi desenvolvido com os suportes financeiros da "Osaka City University" FAPESP (85/9445-0) e "Fundo Colônia Japonesa - USP"

HIGUCHI, T. Preliminar studies of cellular immunity in the Ehrlich tumour. Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo, 25(2):237-241, 1988.

SUMMARY: The animal immune system may be regarded as composed of lymphocytes, macrophages, a series of related cells and their soluble products found in different tissues and organs. In the Ehrlich tumour, the phenomenon of antibody dependent cellular cytotoxicity was shown to be efficient. The criteria employed to evaluate the activity of mediators was the measurement of cell DNA synthesis by the amount of ³H-thymidine incorporated into acid insoluble material after two hours pulse. The suppression by bacterial lipopolysaccharides into macrophages was studied in two aspects, the reaction with soluble products and cell-to-cell contact. The factors involved in Ehrlich tumours are complex. Each factor may act by itself or in combination, definitively much more studies are needed in order to understand the phenomenon of cellular immunity.

UNITERMS: Neoplasms, Ehrlich tumour; Cellular immunity

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 - FUGIMOTO, S.; GREENE, M.I.; SEHON, A. Regulation of the immune response to tumor antigens. I. Immunossuppressor cells in tumor-bearing hosts. J. Immunol., 116: 791-796, 1976.
 - 2 - HENNEY, C.S. & GILLIS, S. Cell-mediated cytotoxicity. In: Fundamental immunology. New York, Raven Press, 1984. p.669-683.
 - 3 - MIZOGUCHI, Y.; MONNA, T.; YAMAMOTO, S.; MORISAWA, S. Studies on the mechanism of liver injury by antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC): partial purification of cytotoxic factor detected in the culture supernatant of ADCC reaction. Jap. Soc. Gastroent., 17:360-367, 1982.
 - 4 - MIZOGUCHI, Y.; OHNISH, F.; MONNA, T.; YAMAMOTO, S.; MORISAWA, S. Partial purification of the chloestatic factor derived from the lymphocyte of tuberculin - sen sensitized guinea-pigs. Jap. Soc. Gastroent. 16:260-267, 1981.
 - 5 - MIZOGUCHI, Y.; SHIBA, T.; ONISHI, F.; MONNA, T.; YAMAMOTO, S.; OTANI, S.; MORISAWA, S. Immunological studies on drug-induced allergy hepatitis-hepatocellular injury by macrophage-mediated cytotoxicity. Gastroent. Jap., 15:14-19, 1980.
 - 6 - NAGAO, S. Mechanisms of macrophage activation. Int. Arch. Allergy, 76:296-301, 1985.
 - 7 - NAGAO, S.; IKEGAMI, S.; TANAKA, A. Inhibition of macrophage DNA synthesis by immunomodulators. I. Characterization of the suppression by muramyl dipeptide or lipopolysaccharide of ³H-thymidine incorporation into macrophage. Cellular Immunity, 89:247-338, 1984.
 - 8 - PAUL, W.E. The immune system: an
- Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo, 25(2):237-241, 1988.

Estudos preliminares da imunidade celular no tumor de Ehrlich

introduction. In: ----- Fundamental immunology. New York, Raven Press, 1984. p.2-22.

damental immunology. New York, Raven Press, 1984. p.481-517.

9 - TADA, T. Help, suppression and specific factors. In: ----- Fun-

10 - TANAKA, A. Macrophages activity. Microbiol. Immunol., 24:547, 1980.

Recebido para publicação em 06/7/87
Aprovado para publicação em 05/5/88