

INFLUÊNCIA DO BCG NO CONTROLE DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMORAL INDUZIDA PELO MASTOCITOMA P-815

H.M. BRÄSCHER, J.R. VARGENS, L.C.S. MAIA & A. OLIVEIRA LIMA

O BCG, em solução lipídica, injetado por via intravenosa, foi capaz de reverter a imunossupressão humoral provocada pelo mastocitoma P-815, em camundongos singênicos DBA/2, aumentando tanto o número de células formadoras de placas hemolíticas quanto os títulos de anticorpos hemaglutinantes do soro. Não foram encontradas diferenças significativas nos títulos de anticorpos hemaglutinantes da classe IgG. Nenhum efeito bloqueador pôde ser notado na progressão normal do tumor.

Palavras-chave: BCG – mastocitoma – P-815 – imunodeficiência

O P-815 é um mastocitoma do camundongo DBA/2, originariamente induzido pelo metilcolantreno e susceptível de ser transplantado e cultivado "in vitro". Quando por via subcutânea, ou intraperitoneal, apresenta alta malignidade e evolui acarretando profundo estado de depressão da resposta imune, humoral e celular (Kamo et al., 1975; Delustro & Argyris, 1976; Takei, Levy & Kilburn, 1977 e Dye & North, 1981).

A inoculação de bacilos viáveis de BCG, em doses e vias adequadas, se acompanha de melhoria das condições imunitárias do animal, constituindo um potente estímulo das células imunologicamente competentes e hoje amplamente empregado na imunoterapia dos tumores experimentais (Old, Benacerraf & Clarke, 1961; Piessens et al., 1971; Miller, Mackaness & Lagrange, 1973; Pimm & Baldwin, 1975 e Murahata & Mitchell, 1982).

Nosso objetivo neste trabalho foi o de estudar a capacidade do BCG, injetado por via intravenosa em mistura lipídica, de reverter o estado de imunossupressão da resposta imune humoral induzida pelo mastocitoma P-815 em camundongos DBA/2. Procurou-se, determinar, também, a influência do BCG sobre a evolução da massa neoplásica e a sobrevida dos animais com tumores transplantados por via subcutânea.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais: camundongos DBA/2, isogênicos (H-2^d), fêmeas, com peso em torno de 20 ± 2g, obtidos do Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense e do Centro de Pesquisas Arlindo de Assis (F.A. Paiva).

Mastocitoma P-815: mantido por passagens intraperitoneais semanais em animais DBA/2 a partir de inoculações intraperitoneais de 2 x 10⁶ células viáveis. Eventualmente, também, obtidos de células mantidas em nitrogênio líquido suspensas em meio 199 (Difco), com 10% de Dimetil Sulfoxido (DMSO, Sigma) e 5% de soro de vitela.

Inoculação das células tumorais: as células tumorais depois de três lavagens em meio 199 foram inoculadas (5 x 10⁴) por via subcutânea em um dos flancos de camundongos DBA/2 fêmeas. As células revelaram 95% de vitalidade nos testes com azul de tripan (Tennant, 1964).

Imunização com hemácias de carneiro: os animais inoculados há 20 dias com o mastocitoma receberam, por via intraperitoneal, 0,5ml de uma suspensão a 10% de hemácias de carneiro; quatro dias depois foram sangrados e sacrificados para remoção dos baços.

Tratamento com BCG: *Micobacterium bovis*, variedade BCG, estirpe Moreau (F.A. Paiva), mantido liofilizado em ampola, contendo 5 x 10⁷ bacilos viáveis. Cerca de 10⁵ bacilos foram suspensos em 0,2ml de emulsão lipídica (10% de óleo de soja, 1,2% de fosfolípide de gema de ovo e 2,25% de glicerol) e injetados por via intravenosa.

Hemaglutinação passiva: a pesquisa de anticorpos hemaglutinantes (IgM) foi realizada em soros obtidos do plexo orbital quatro dias após a inoculação das hemácias. Os anticorpos da classe IgG, foram estudados em soros colhidos no 7º dia, após seu tratamento com solução de mercapto-etanol a 0,2M durante 30 minutos a 37°C.

Hemólise em placa: o número de placas hemolíticas diretas IgM formadas por linfócitos esplênicos dos animais de experiência sensibilizados com hemácias de carneiro, foi avaliado pelo método de Cunningham & Szenbeg, 1968.

Influência do BCG sobre a massa tumoral: a massa tumoral foi determinada após dissecação cuidadosa do tumor, logo depois da morte dos animais e pesada em balança de precisão.

Sobrevida dos animais: determinou-se até o 30º dia de experiência, período de sobrevida dos animais inoculados com o P-815 por via subcutânea, e vacinados com três doses de BCG por via intravenosa.

Análise estatística: a análise estatística dos resultados foi realizada usando-se o teste "t" de Student na comparação entre dois grupos experimentais e a análise de variância simples em experiências envolvendo um número maior de grupos. As amostras que não obedeciam a distribuição normal foram normalizadas por meio da conversão logarítmica.

Modelo experimental: as experiências preliminares mostrando que o período de máxima imunossupressão ocorria em torno do 20º dia da inoculação do tumor, possibilitaram a execução do seguinte modelo experimental: 1) inoculação dos animais, por via subcutânea com 5×10^4 células viáveis de P-815; 2) inoculação de 10^5 bacilos viáveis de BCG, em 0,2ml de emulsão lipídica por via intravenosa, de 5/5 dias, a partir do 5º dia da inoculação do P-815; 3) inoculação por via intraperitoneal das hemácias de carneiro no 16º dia de inoculação do P-815; 4) sacrifício de parte dos animais quatro dias após para pesquisa de anticorpos hemaglutinantes e determinação do número de placas hemolíticas pelos linfócitos do baço; 5) colheita de sangue, de parte dos animais, no 4º e 7º dias para titulação de anticorpos hemaglutinantes; 6) determinação da massa tumoral no dia da morte dos animais; 7) determinação do tempo de sobrevida dos camundongos inoculados.

RESULTADOS

A época de supressão máxima da resposta imune humoral induzida pelo mastocitoma P-815, ocorreu em torno do 20º dia da inoculação do tumor, como mostra a Tabela I, período em que os leucócitos do baço apresentaram formação de placas hemolíticas em níveis significativamente mais baixos do que os animais de controle ($p < 0,01$). Também os títulos de anticorpos hemaglutinantes da classe IgM mostraram-se diminuídos.

TABELA I

Supressão da hemólise em placas de dois grupos de camundongos inoculados com mastocitoma P-815

Animais (Grupo) ^a	Dias	Hemólise em Placas (10^6 Células do Baço) ^b	Significância
I	10º	2660 ± 396^c	$p < 0,025$
II		4453 ± 638	
I	20º	4264 ± 1110	$p < 0,001$
II		8830 ± 2020	

^a – Grupo I. P-815 5×10^4 células por via subcutânea.
II. Solução salina 0,85% (controle).

^b – Camundongos DBA/2 inoculados com 5×10^4 células de P-815. Nos 10º e 20º dias após, os animais foram inoculados com 0,5ml de hemácias de carneiro a 10% por via intraperitoneal.

^c – Média e desvio padrão.

A influência imunoestimuladora do BCG sobre esse estado supressivo induzido pelo mastocitoma P-815 pôde ser apreciado tanto pelo aumento do número de placas hemolíticas formadas pelos leucócitos do baço (Tabela II), como pelos níveis de anticorpos hemaglutinantes da classe IgM determinados no 4º dia após a imunização por via intraperitoneal com 0,5 ml de uma suspensão de 10% de hemácias de carneiro (Tabela III).

A Tabela III mostra os títulos de IgM obtidos nos animais do grupo IV inoculados com o P-815 e que receberam o BCG intravenoso e os do grupo III que só receberam o P-815. Não se registrou nenhuma diferença significativa nos títulos dos anticorpos hemaglutinantes da classe IgG em nenhum dos animais dos grupos de experiência.

TABELA II

Efeito do BCG no aparecimento de células formadoras de placas de hemólise em camundongos suprimidos com mastocitoma P-815

(Grupos) ^a	Nº	(10 ⁶ Células do Baço) ^b	Significância
I	4	1792 ± 670 ^c	p < 0,005
II	2	398 ± 225	
III	5	1294 ± 475	p = NS ^d
IV	5	1128 ± 470	

a – Grupo I. Mastocitoma P-815 (5 x 10⁴ + 10⁵ bacilos BCG)
 II. Mastocitoma P-815 (5 x 10⁴)
 III. Solução salina 0,85%
 IV. Solução salina (0,85% + 10⁵ bacilos BCG)

b – Camundongos DBA/2 inoculados com 0,5ml de hemácias de carneiro a 10% por via intraperitoneal.

c – Média e desvio padrão.

d – Não significante.

TABELA III

Títulos de hemaglutininas (IgM e IgG) no soro dos animais de experimentação

Animais (Grupos) ^a	IgM ^b	Significância	IgG ^c	Significância ^e
I	1,3 ± 0,3	p = NS ^d	1,5 ± 0,2	p = NS
II	1,4 ± 0,4		1,7 ± 0,2	
III	0,5 ± 0,5	p < 0,005	1,3 ± 0,0	p = NS
IV	1,1 ± 0,3	p = NS	1,6 ± 0,3	p = NS

a – Grupo I. Solução salina 0,85%
 II. Solução salina 0,85% + 10⁵ bacilos BCG
 III. Mastocitoma P-815 (5 x 10⁴)
 IV. Mastocitoma P-815 (5 x 10⁴ + 10⁵ bacilos BCG/0,2ml)

b – Soro colhido no 4º dia após inoculação de 0,5ml de hemácias de carneiro a 10%, via intraperitoneal.

c – Soro colhido no 7º dia após inoculação de 0,5ml de hemácias de carneiro a 10%, via intraperitoneal.

d – Não significante.

e – Significância em relação ao Grupo I.

TABELA IV

Peso da massa tumoral de dois grupos de camundongos inoculados com mastocitoma P-815

Animais (Grupos) ^a	Nº	Peso Tumor	Significância
I	15	0,19 ± 0,01 ^b	p = NS ^c
II	15	0,21 ± 0,09	

a – Grupo I. P-815 (5 x 10⁴ células/0,1ml, subcutânea).
 II. P-815 (5 x 10⁴ células/0,1ml + 10⁵ bacilos BCG, intravenosa).

b – Média e desvio padrão.

c – Não significante.

Os camundongos suprimidos pelo P-815 não apresentaram diferenças significativas no crescimento da massa tumoral após o tratamento com o BCG, como mostra a Tabela IV. Mesmo após três injeções intravenosa de 10^5 bacilos viáveis de BCG, em mistura lipídica, não se conseguiu impedir a progressão normal do tumor.

A Fig. 1 mostra a sobrevivência dos quatro grupos de animais de experiência. Como se poderá ver, todos os camundongos do grupo II, que só receberam P-815, morreram até o 25º dia da experiência. Os do grupo IV, inoculados com a mastocitoma e BCG, tiveram uma sobrevivência mais prolongada. Todos os animais dos grupos I e III sobreviveram ao período da prova.

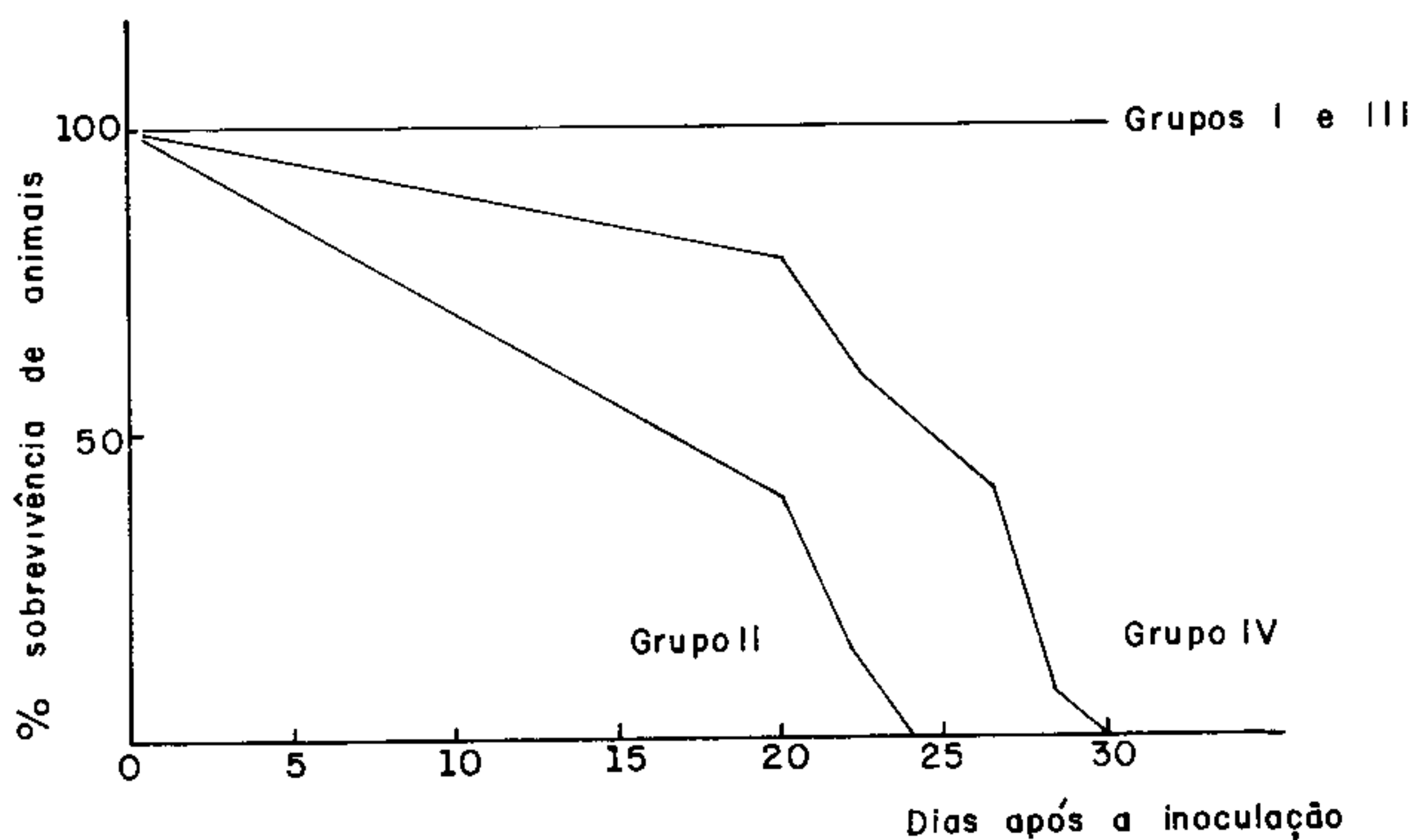


Fig. 1 – Sobrevivência dos animais nos diferentes grupos de camundongos de experiência.
 Grupos: I. Solução salina 0,85%.
 II. Mastocitoma P-815 a 5×10^4 células.
 III. Solução salina 0,85% + BCG $10^5/0,2\text{ml}$.
 IV. Mastocitoma P-815 a 5×10^4 + BCG $10^5/0,2\text{ml}$.

DISCUSSÃO

Vários mecanismos têm sido invocados para explicar o papel estimulador do BCG sobre a resposta imune. Na dependência da dose e viabilidade dos bacilos, da via de administração e das características genéticas do animal, a inoculação de BCG poderá acarretar ativação da imunidade humoral e celular (Old, Benacerraf & Clarke, 1961; Piessens et al., 1971; Miller, Mackaness & Lagrange, 1973; Pimm & Baldwin, 1975 e Murahata & Mitchell, 1982).

É particularmente importante a capacidade do BCG de aumentar a resistência contra tumores através da ativação do sistema reticuloendotelial (Old, Benacerraf & Clarke, 1961), da estimulação inespecífica e proliferação das células dos linfonodos e do baço (Miller, Mackaness & Lagrange, 1973) e da estimulação específica da resposta imune através dos linfócitos T "helper" e macrófagos (Mokyr & Mitchell, 1975). A administração sistêmica de BCG tem resultado na produção de macrófagos, células "Killer" e "Natural Killer" (Murahata & Mitchell, 1982) com propriedades citotóxicas exaltadas.

A inoculação de bacilos viáveis de BCG, por via intravenosa, em doses superiores a 10^6 , em geral, acarreta imunossupressão da resposta imune ao PPD (Collins & Watson, 1979 e Orme & Collins, 1984). Essa imunossupressão tem sido atribuída a uma atividade exagerada dos linfócitos T supressores ou dos macrófagos (Collins & Watson, 1979 e Orme & Collins, 1984). Mais recentemente, aventou-se a hipótese de que essa supressão possa decorrer da fuga das células imunocompetentes da periferia para órgãos (baço, etc.) (Orme & Collins, 1984). Sabe-se que a inoculação intravenosa de BCG em doses inferiores a 10^6 , em geral, acarreta imunoestimulação (Collins & Watson, 1979) e que a incorporação aos bacilos de agentes lipídicos reforça essa ação imunoestimuladora (Yarkoni & Rapp, 1979 e Yarkoni & Rapp, 1980). As propriedades fisicoquímicas

do agente lipídico incorporado exercem grande influência na resposta imune a ser obtida com a inoculação dos bacilos (Yarkoni & Rapp, 1980). Camundongos DBA/2 injetados por via subcutânea com a mastocitoma P-815 desenvolvem, em geral, pronunciada depressão da resposta imune humoral e celular, que perdura até a morte do animal. Essa depressão tem sido atribuída, em outros, aos seguintes mecanismos: 1) fatores inespecíficos do soro (Nimberg et al., 1975 e Whitney & Levy, 1985), fatores bloqueadores do soro (Baldwin & Embleton, 1971; Sjögren et al., 1971; Baldwin, Price & Robins, 1972; Hellström & Hellström, 1974), imunocomplexos (Sjögren et al., 1971; Baldwin, Price & Robins, 1972 e Gorcznsky et al., 1975), substâncias elaboradas pelo próprio tumor (Kamo et al., 1975 e Delustro & Argyris, 1976), modulação antigênica da célula neoplásica (Biddison & Palmer, 1977 e Delustro & Argyris, 1976), modulação antigênica da linfócito T supressores (Takei, Levy & Kilburn, 1977 e Dye & North, 1981 e Tilkin et al., 1981), ação supressora de macrófagos (Pope et al., 1976). Essa ação supressora do P-815 parece ser devida a um fator solúvel, termolábil a 56°C, elaborado pela própria célula (Kamo et al., 1975; Delustro & Argyris, 1976 e Takei, Levy & Kilburn, 1977) e capaz de atuar "in vitro" sobre os linfócitos do baço, na ausência de células neoplásicas, bloqueando a elaboração de anticorpos.

De acordo com Takei, Levy & Kilburn (1977), a atividade do mastocitoma P-815 pode ser completamente abolida pelo tratamento das células do baço com soro anti-teta em presença do complemento. O soro anti-IgG + Complemento, ou o tratamento com "carbonil iron", não exercem qualquer efeito sobre a supressão. Esses resultados indicam ser os linfócitos T supressores os principais responsáveis pela supressão induzida pelo P-815 (Takei, Levy & Kilburn, 1977).

A inoculação de três doses de 10^5 bacilos viáveis de BCG por via intravenosa de 5/5 dias, mistura lipídica, foi capaz de reverter a ação imunossupressora do P-815 sobre a imunidade humoral de camundongos DBA/2 inoculados com hemácias de carneiro. Esse efeito estimulador pode ser notado tanto sobre o número de células formadoras de placas, quanto sobre os títulos de anticorpos hemaglutinantes da classe IgM. Não se encontrou, contudo, diferenças significativas nos títulos de anticorpos hemaglutinantes da classe IgG. Apesar do efeito estimulador do BCG sobre a resposta imune humoral, nenhum efeito bloqueador pôde ser notado à progressão normal do tumor. Registrou-se (Fig. 1), todavia, maior período de sobrevida dos animais que receberam o BCG. Os mecanismos atuantes nesse prolongamento da sobrevida continuam objeto de pesquisas em nosso laboratório.

SUMMARY

Viable BCG bacilli, in a lipid emulsion, inoculated intravenously, were capable of reverting the profound humoral immunosuppression induced in adult DBA/2 mice by the mastocytoma P-815. BCG increased not only the number of hemolytic plaque forming cells, but also the serum titers of hemagglutinating IgM antibodies. However, no blocking effect was detected on normal tumor progression.

Key words: BCG – mastocytoma – P-815 – immunodeficiency

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALDWIN, R.W. & EMBLETON, M.J., 1971. Demonstration by colony inhibition methods of cellular and humoral immune reactions to tumor-specific antigens associated with aminoazo-dye induced rat hepatomas. *Int. J. Cancer*, 7 :17-25.
- BALDWIN, R.W.; PRICE, M.R. & ROBINS, R.A., 1972. Blocking of lymphocyte mediated cytotoxicity for rat hepatoma by tumor-specific antigen-antibody complexes. *Nature*, (New Biol.) 238 :185.
- BIDDISON, W.E. & PALMER, J.C., 1977. Development of tumor resistance to syngeneic cell-mediated cytotoxicity during growth of ascitic mastocytoma P-815-Y. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74 :329-333.
- COLLINS, F.M. & WATSON, S.R., 1979. Suppressor T-cells in BCG-infected mice. *Infect. Immun.*, 25 :491-496.
- CUNNINGHAM, A. & SZENBERG, A., 1968. Further improvements in the plaque technique for detecting antibody-forming-cells. *Immunology*, 14 :599-601.
- DELUSTRO, F. & ARGYRIS, B.F., 1976. Mechanism of mastocytoma-mediated suppression of lymphocyte reactivity. *J. Immunol.*, 17 :2073-2080.
- DYE, E.S. & NORTH, R.J., 1981. T-cell-mediated immunosuppression as an obstacle to adoptive immunotherapy of the P-815 mastocytoma and its metastases. *J. Exp. Med.*, 154 :1033-1052.
- GORCZNSKI, R.M.; KILBURN, D.G.; KNIGHT, R.A.; NORBURY, C.; PARKER, D.C. & SMITH, J.B., 1975. Non-specific and specific immunosuppression in tumor-bearing mice by soluble-immune complexes. *Nature*, 254 :141-143.
- HELLSTRÖM, K.E. & HELLSTRÖM, I., 1974. Lymphocyte mediated cytotoxicity and blocking serum activity to tumor antigens. *Adv. Immunol.*, 18 :209-277.

- KAMO, I.; PATEL, C.; KATELEY, I. & FRIDEMAN, H., 1975. Immunosuppression induced *in vitro* by mastocytoma. *J. Immunol.*, *114* :1749-1756.
- MILLER, T.E.; MACKANESS, G.B. & LABRANGE, P.H., 1973. Immunopotential with BCG II. Modulation of the response to sheep red blood cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, *51* :1669-1676.
- MOKYR, M.B. & MITCHELL, M.S., 1975. Activation of lymphoid cells by BCG "in vitro" cell. *Immunology*, *15* :264-273.
- MURAHATA, R.I. & MITCHELL, M.S., 1982. Modulation of cell-mediated allo-immunity by BCG. II. Induction of specific, nonadherent, non-T-Killer cells by BCG and alloantigen. *J. Natl. Cancer Inst.*, *69* :613-618.
- NIMBERG, R.B.; GLASGOW, A.H.; MENZOIAN, J.O.; CONSTANIA, M.B.; COOPERBAND, S.R.; MANNICK, J.A. & SCHIMDT, K., 1975. Isolation of an immunosuppressive peptide fraction from the serum of cancer patients. *Cancer Res.*, *35* :1489-1494.
- OLD, L.J.; BENACERRAF, B. & CLARKE, D.A., 1961. The role of the reticulo endothelial system in the host reaction to neoplasia. *Cancer Res.*, *21* :1281-1300.
- ORME, I.M. & COLLINS, F.M., 1984. Passive transfer of tuberculin sensitivity from anergic mice. *Infect. Immun.*, *46* :850-853.
- PIESSENS, W.F.; HERMANN, R.; LEGROS, N. & HENSON, J.C., 1971. Effect of Bacillus Calmette-Guérin on mammary tumor formation and cellular immunity in dimethyl benzanthracene-treated rats. *Cancer Res.*, *31* :1061-1065.
- PIMM, M.V. & BALDWIN, R.W., 1975. BCG therapy of pleural and peritoneal growth of transplanted rat tumors. *Inst. J. Cancer*, *15* :260-269.
- POPE, B.L.; WHITNEY, R.B.; LEVY, J.G. & KILBURN, D.G., 1976. Suppressor cells in the spleens of tumor-bearing mice. Enrichments by centrifugation of hypaque-ficoll and characterization of the suppressor population. *J. Immunol.*, *116* :1342-1346.
- SJÖGREN, H.G.; HELLSTRÖM, I.; BANSEL, S.C. & HELLSTRÖM, K.E., 1971. Suggestive evidence that the "blocking antibodies" of tumor-bearing individuals may be antigen-antibody complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *68* :1372-1375.
- TAKEI, F.; LEVY, J.G. & KILBURN, D.G., 1977. Characterization of suppressor cells in mice bearing syngeneic mastocytoma. *J. Immunol.*, *118* :412-417.
- TENNANT, J.R., 1964. Evaluation of trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation*, *2* :685-689.
- TILKIN, A.; SCHAAF-LAFONTAINE, N.; VAN ACKER, A.; BOCCADORO, M. & URBAIN, J., 1981. Reduce tumor growth after low-dose irradiation or immunization against blastic suppressor T-cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *78* :1809-1812.
- UYTTENHOVE, C.; MARYANSKI, J. & BOON, T., 1983. Escape of mouse mastocytoma P-815 after nearly complete rejection in due to antigen-loss variants rather than immunosuppression. *J. Exp. Med.*, *157* :1040-1052.
- WHITNEY, R.B. & LEVY, J.G., 1975. Effect of sera from tumor bearing mice on mitogen and allogenic cell stimulation of normal lymphoid cell. *J. Natl. Cancer Inst.*, *54* :733-741.
- YARKONI, E. & RAPP, H.J., 1979. Influence of oil concentration on the efficacy of tumor regression by emulsified components of mycobacteria. *Cancer Res.*, *39* :535-537.
- YARKONI, E. & RAPP, H.J., 1980. Influence of type of oil and surfactant concentration of the efficacy of emulsified *Mycobacterium bovis* BCG cell walls to induce tumor regression in guinea pig. *Infect. Immun.*, *28* :881-886.