

# INFLUÊNCIA DO PROCESSO INFLAMATÓRIO INDUZIDO PELO BCG NA EVOLUÇÃO DO TUMOR DE EHRlich<sup>1</sup>

ANA PAULA FREDERICO RODRIGUES LOUREIRO BRACARENSE<sup>2</sup>  
IDÉRCIO LUIZ SINHORINI<sup>3</sup>

BRACARENSE, A.P.F.R.L.; SINHORINI, I.L. Influência do processo inflamatório induzido pelo BCG na evolução do tumor de Ehrlich. *Semina: Ci. Agr.*, Londrina, v.15, n.1, p.8-13, março 1994.

**RESUMO:** *Analisou-se a influência do processo inflamatório induzido experimentalmente pela inoculação do BCG na regressão do tumor de Ehrlich na forma sólida. O modelo experimental estabelecido consistiu na inoculação do BCG por via intralesional em coxim plantar de camundongos. O tumor foi induzido pela inoculação de 0,05ml de suspensão contendo aproximadamente  $2,5 \times 10^6$  células tumorais no coxim plantar direito. Demonstrou-se que nos tempos imediatos à administração do BCG ocorreram alterações no desenvolvimento da massa tumoral detectadas tanto através da mensuração paquimétrica do diâmetro do coxim plantar como através da histopatologia. Contudo, não se observou significância a nível de 5% quando analisados pelo teste T de Student. Com a evolução do processo ocorreu um restabelecimento tumoral, indicando que apesar de interferir com o crescimento e evolução da neoplasia, o tratamento com o BCG intralesional não promoveu a regressão total do tumor.*

**PALAVRAS-CHAVE:** *Inflamação, Neoplasia, Tumor de Ehrlich, BCG.*

## 1. INTRODUÇÃO

Numerosas substâncias têm sido empregadas com o objetivo de estimular inespecificamente o sistema imune e, deste modo, induzir a regressão neoplásica. Microorganismos intactos como *Mycobacterium bovis*, *Corynebacterium parvum*, frações microbianas como o lipopolissacarídeo, polímeros sintéticos e citocinas têm demonstrado capacidade de estimular a imunidade do organismo (KOPPER & LAPIS, 1985; GARACI et al., 1989).

Na década de 60 surgiram diversos relatos demonstrando que a administração do bacilo de Calmette-Guérin suprimia o crescimento neoplásico ou alterava o nível de replicação tumoral em diferentes modelos experimentais (BIOZZI et al., 1959; OLD et al., 1959; NILSSON et al., 1965; HANNA et al., 1972; LIEBERMAN et al., 1974; PIMM & BALDWIN, 1975; 1980; LAMM et al., 1980; FALK et al., 1983; LEONG et al., 1980). A base para esse fenômeno seria a estimulação inespecífica do sistema de defesa do organismo.

Estas observações sugerem que o processo inflamatório tem a capacidade de desestabilizar tumores, levando alguns à regressão e supressão. Assim sendo, questionamos no trabalho que se segue, qual seria a interferência do processo inflamatório crônico, induzido pelo BCG, em alterar a evolução de uma neoplasia.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Animais

Para a realização do presente estudo foram utilizados camundongos albinos Swiss, não isogênicos, fêmeas, pesando entre 25 e 35 gramas. Durante a fase experimental os animais receberam água e ração balanceada "ad libitum".

### 2.2. Bacilo Calmette-Guérin

Utilizou-se o onco-BCG oral (cepa Moreaux) produzido pelo Instituto Butantã, partida 9102032 na concentração de 100mg/ml com aproximadamente  $10^8$  bacilos/ml.

### 2.3. Tumor Experimental

O tumor experimental usado foi o tumor ascítico de Ehrlich proveniente de um adenocarcinoma mamário de camundongo.

### 2.4. Procedimentos Experimentais

Após serem sedados com éter etílico, os camundongos receberam 0,05ml de suspensão celular contendo  $2,5 \times 10^6$  células tumorais no coxim plantar do membro posterior direito. Os animais do grupo controle foram inocula-

<sup>1</sup> — Trabalho desenvolvido na Universidade Estadual de Londrina.

<sup>2</sup> — Departamento de Medicina Veterinária Preventiva / Centro de Ciências Agrárias / Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, CEP 86051-970, Londrina-PR. Telefone: (043) 321-2000, ramal 4485.

<sup>3</sup> — Departamento de Patologia Animal / Universidade de São Paulo. São Paulo - SP.

dos com o mesmo volume de suspensão celular no coxim plantar do membro posterior esquerdo.

Os grupos de animais eram constituídos por 36 animais teste e 12 controle. Neste trabalho foram utilizados dois grupos de animais.

Três ou sete dias após a inoculação das células tumorais no coxim plantar, 6 animais de cada grupo teste receberam intralesionalmente um volume de 0,025ml correspondente a  $25 \times 10^{11}$  formas viáveis de onco-BCG oral. Os animais controle em número de 2 para cada grupo receberam pela mesma via 0,025ml de solução salina tamponada.

Feita a inoculação do BCG ou salina os animais foram sacrificados em cuba com éter nos tempos de 6, 12, 24, 72, 168 e 336 horas. O coxim plantar de cada camundongo foi seccionado e mensurado com o auxílio de um paquímetro. Procedeu-se, então, à fixação do coxim plantar em líquido de Bouin, desidratação em soluções crescentes de álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina. Cortes com 5 um de espessura foram corados pelo método de hematoxilina-eosina (H.E.).

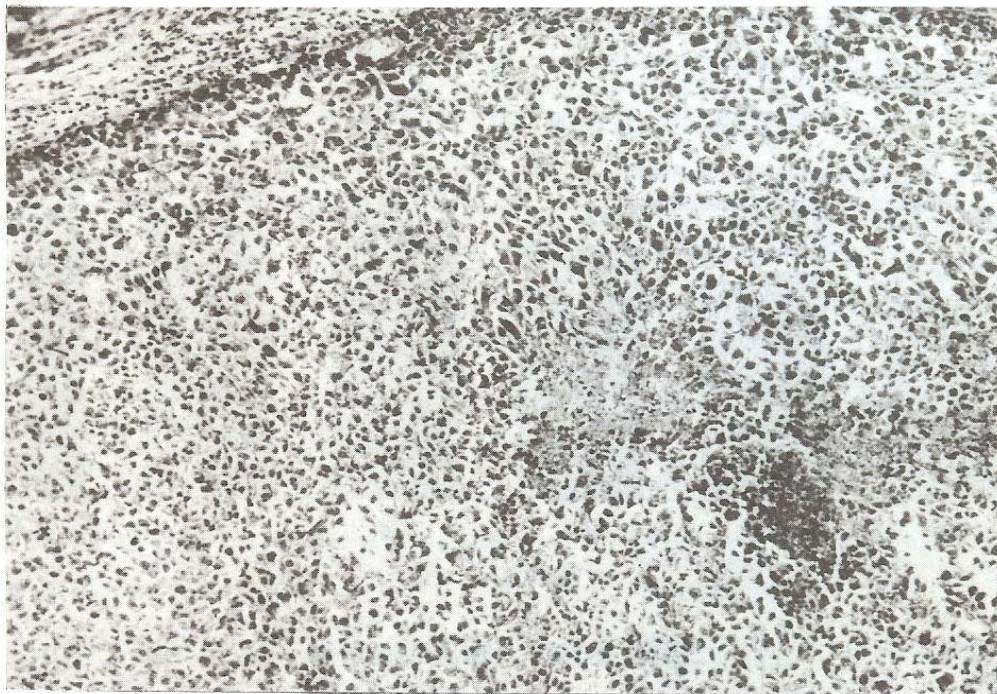
## 2.5 - Análise Estatística

Utilizou-se para as comparações o teste "t" de Student para amostras pareadas (COSTA NETO, 1977).

## 3- RESULTADOS

### 3.1- Histopatologia dos Coxins Plantares Inoculados com Suspensão Celular de Tumor de Ehrlich há três dias e Posterior Administração Intralesional de 0,025ml de Onco-BCG.

Conforme demonstrado na Fig. 1 em seus aspectos mais marcantes, verificou-se que, nos tempos de 6 e 12 horas, os animais testes apresentaram congestão e edema, sendo este caracterizado por acentuada dissociação do tecido conjuntivo. Observou-se intenso infiltrado inflamatório subepitelial com predomínio de células polimorfonucleares e uma área linear de necrose acompanhando a epiderme delimitada por infiltrado polimorfonuclear abundante. Nos animais sacrificados até 72 horas após a inoculação do BCG observou-se a presença de material amorfo eosinofílico na derme, correspondente ao inóculo circundado por intensa reação inflamatória. Ocorreu uma redução na intensidade da congestão e do edema nas 24 horas, enquanto que a reação inflamatória tornou-se mais acentuada, ocorrendo uma diminuição do número de células tumorais íntegras. As reações vasculares persistiram nas 72 horas, observando-se, ainda, infiltrado polimorfonuclear com necrose das células tumorais. Nos tempos finais (168 e 336 horas) as reações vasculares desapareceram e houve uma acentuada redução no infiltrado inflamatório. A massa tumoral apresentou-se compacta, com poucas áreas de necrose. Observou-se presença de tecido conjuntivo na periferia do tumor juntamente com infiltrado inflamatório focal de células mononucleares.



**FIGURA 1** — Corte histológico de coxim plantar de camundongo inoculado com tumor de Ehrlich há 3 dias e tratado intralesionalmente com BCG. Notar a presença de massa tumoral compacta com poucas áreas de necrose. Hematoxilina-Eosina. 165x.

Os animais controle apresentaram congestão e edema discretos nos tempos de 6, 12 e 24 horas, desaparecendo após este período. O infiltrado inflamatório na região subepitelial permaneceu pouco acentuado ao longo do processo e era constituído por células polimorfonucleares e mononucleares. A presença de necrose no parênquima tumoral só foi observada em casos esporádicos, a partir das 24 horas sendo circundada por células polimorfonucleares.

As médias dos diâmetros dos coxins plantares verificadas para cada tempo foram submetidas à análise estatística não demonstrando significância para o nível de 5% (Fig. 2).

### 3.2.- Histopatologia dos Coxins Plantares Inoculados com Suspensão Celular de Tumor de Ehrlich há 7 dias e posterior administração intralesional de 0,02 5ml de Onco-BCG.

O exame histológico demonstrou que os animais teste apresentaram congestão e edema moderados no tempo de 6 horas, tornando-se mais acentuados nos tempos subsequentes até as 168 horas, quando estas alterações desapareceram. O infiltrado inflamatório subepitelial apresentou-se com predomínio de células polimorfonucleares nos diversos tempos do experimento. A intensidade dessa

reação diminuiu com a evolução do processo. Observou-se, na derme, focos de células polimorfonucleares circundando material eosinofílico amorfo, correspondente presença de inóculo nos tempos de 6, 12 e 24 horas. A necrose apresentava-se como uma área linear que margeava a epiderme até o grupo de 24 horas. A partir desse tempo tornou-se cada vez mais difusa e o infiltrado inflamatório polimorfonuclear que envolvia a área necrótica diminuiu de intensidade com a evolução do processo. Observou-se, ainda, esboço de cápsula conjuntiva na periferia da neoplasia bem como infiltrado inflamatório mononuclear nos tempos de 168 a 336 horas (Fig. 3).

Nos animais controle não se observou congestão ou edema em nenhum dos tempos estudados. O processo inflamatório, limitado à região subepitelial, era constituído por células polimorfonucleares e mononucleares, sendo pouco acentuado em todos os tempos observados. As áreas de necrose apresentavam-se pouco significantes no início do processo, tornando-se mais extensas a partir das 72 horas. O infiltrado inflamatório polimorfonuclear que envolvia essas áreas era pouco acentuado em todos os tempos observados. No grupo de 168 horas verificou-se a presença de êmbolos constituídos por células tumorais.

As médias dos diâmetros dos coxins plantares verificadas para cada tempo foram submetidas à análise estatística, não demonstrando significância para o nível de 5% (Fig. 4).

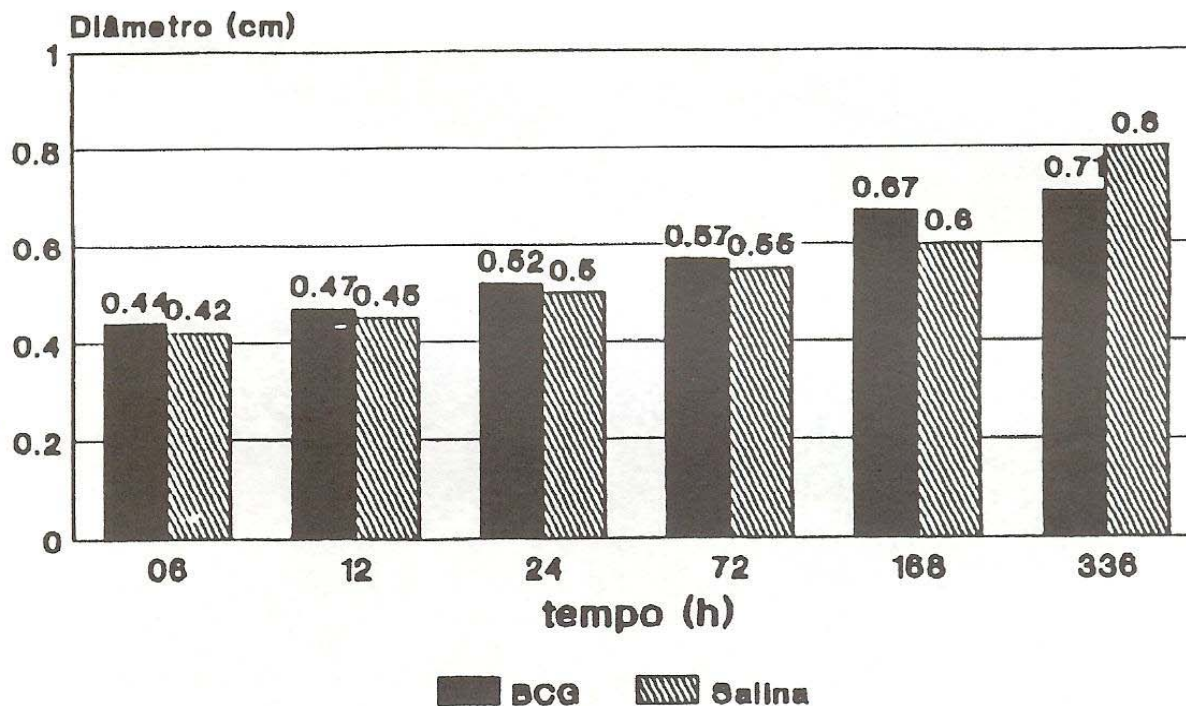


FIGURA 2 - Comparação entre os tratamentos intralesionais com BCG e salina em tumores de 3 dias.

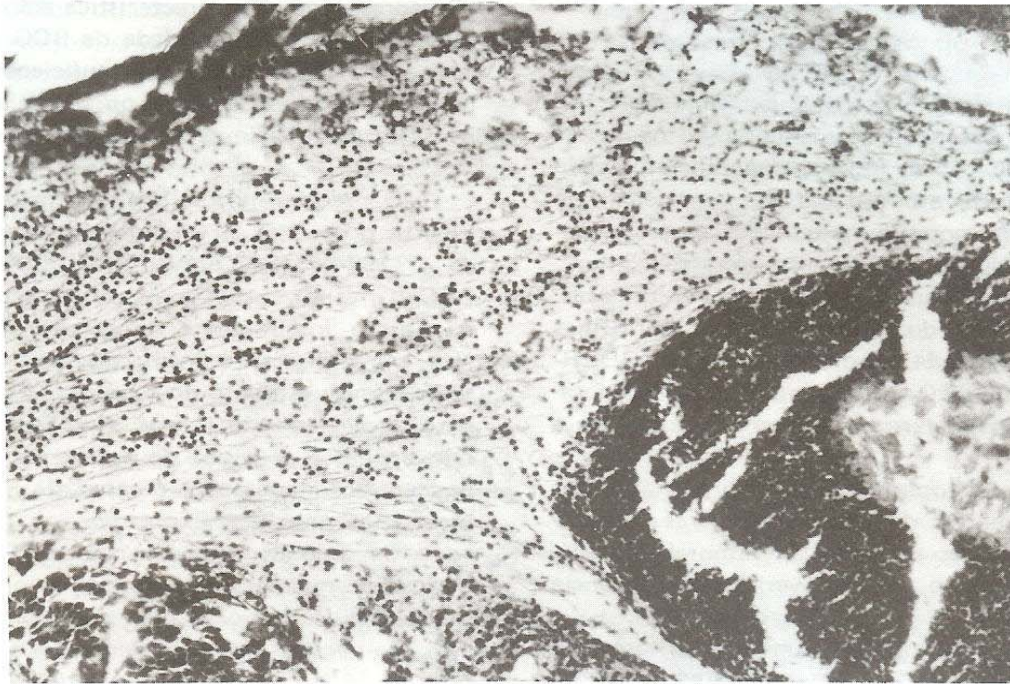


FIGURA 3 – Corte histológico de coxim plantar de camundongo inculado com tumor de Ehrlich há 7 dias e tratado intralesionalmente com BCG. Notar o edema, o infiltrado inflamatório, ampla área necrótica e a presença do inóculo no centro necrótico. Hematoxilina-Eosina. 165x.

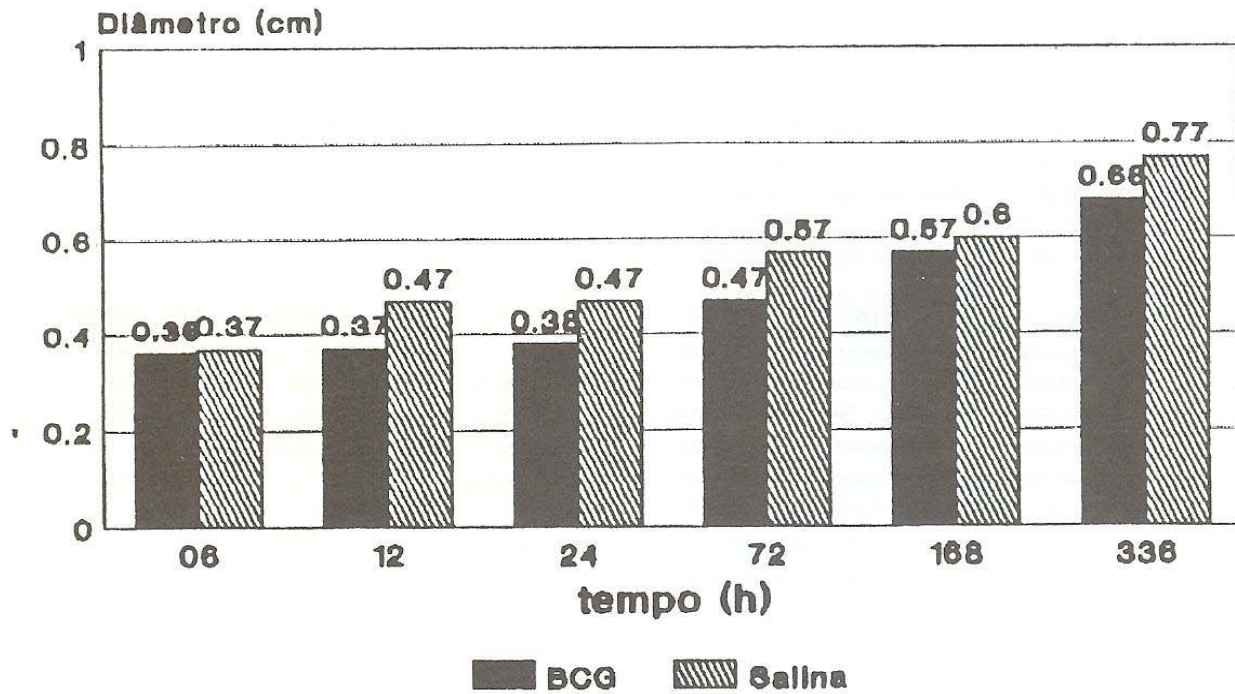


FIGURA 4 – Comparação entre os tratamentos intralesionais com BCG e salina em tumores de 7 dias.

#### 4- DISCUSSÃO

É sabido que o sistema imune é extremamente importante no controle das neoplasias. Apesar de não estar esclarecido se a diminuição da imunocompetência precede ou é resultado do câncer avançado, a alta prevalência de neoplasias, em pacientes com imunodeficiência e em receptores de transplantes imunodeprimidos sugere que imunidade atenuada contribui para a progressão dos tumores. Também a interferência do processo inflamatório nas neoplasias tem sido relatada em diversos estudos (GUERRA, 1983; DAGLI, 1989). O tipo e a intensidade da interação entre os processos determinará o crescimento ou a supressão do tumor.

Tanto o exame histopatológico como a análise das mensurações dos diâmetros dos coxins plantares demonstra que existem alterações na evolução tumoral. Na análise estatística, no entanto, não se verifica significância para o nível de 5%.

Os animais teste apresentaram aumento da vascularização regional, caracterizado por congestão e edema intersticial, sendo que essas alterações mostraram-se mais evidentes nos períodos mais próximos à inoculação da bactéria. HANNA et al. (1972) e LEONG et al. (1990) também observaram edema intersticial nas fases que se seguiam à administração do BCG via intralesional.

O infiltrado inflamatório subepitelial presente nos animais inoculados com BCG foi predominantemente polimorfonuclear e bastante acentuado em comparação com o grupo controle. A intensidade do processo inflamatório deve-se provavelmente à presença do agente no local da lesão.

A presença de inóculo no tumor induziu um acentuado infiltrado inflamatório focal polimorfonuclear ao seu redor tanto no tumor de 3 dias como no de 7 dias de evolução até o tempo máximo de 72 horas de experimentação. Após esse tempo o inóculo deve difundir-se no local, o que implicaria na diminuição de intensidade dos infiltrados inflamatórios focais.

HANNA et al. (1973); RIBI et al. (1973) e LIEBERMAN et al. (1974) também descrevem a ocorrência de um intenso infiltrado inflamatório polimorfonuclear nas primeiras 24 horas após inoculação do BCG. Segue-se a esta reação a infiltração de células mononucleares que depois organizam-se como granulomas não caseosos (HANNA et al., 1972; LIEBERMAN et al., 1974; LEONG et al., 1990). Nosso estudo, apesar de abranger os tempos experimentais em que ocorre o processo de formação do granuloma,

não apresentou esta característica em nenhum dos grupos. É possível que a quantidade de BCG inoculada (0,025ml) nos animais não tenha sido suficiente para o desenvolvimento deste tipo de reação ou, ainda, que o microambiente neoplásico tenha impedido a formação de lesão característica.

O predomínio de infiltrado inflamatório monoclear a partir do tempo de 24 horas é relatado por LIEBERMAN et al. (1974); HESS et al. (1977); SVEJDA et al. (1979) e LEONG et al. (1990). Nesse aspecto nossos resultados não estão inteiramente de acordo com os da literatura. Nos animais teste o infiltrado inflamatório mononuclear só se tornou evidente no tempo de 168 horas, ficando restrito à periferia do tumor. A análise destes dados sugere que apenas a presença do agente no local da lesão numa concentração adequada é capaz de induzir resposta inflamatória mononuclear expressiva.

Os animais tratados com BCG apresentaram áreas de necrose mais extensas do que os inoculados com solução salina. Células tumorais com sinais de degeneração e amplas áreas de necrose foram evidenciadas em períodos que variaram de 24 horas a 8 dias por HANNA et al. (1972); LIEBERMAN et al. (1974); HESS et al. (1977); SVEJDA et al. (1979) e LEONG et al. (1990). Em nosso trabalho observamos que áreas necróticas focais ocorreram nos tempos iniciais, sendo que a extensão aumentava a partir das 72 horas.

A substituição total da massa neoplásica por tecido cicatricial não foi observada em nenhum dos tempos do experimento, ao contrário do que afirma a maioria dos autores. Verificou-se apenas esboço de cápsula conjuntiva circunscrivendo a área tumoral. Como não houve também a necrose total das células neoplásicas e considerando-se que este seria um evento primordial para o estabelecimento do processo cicatricial, explica-se o porquê deste processo não ter sido importante.

Como nossos resultados nem sempre apresentaram as características descritas por outros autores, temos que considerar que as diferenças entre as metodologias empregadas podem ter tido influência marcante.

LAMM et al. (1980) e KEY e HANNA (1981) afirmam em seus trabalhos que a dose de BCG utilizada é importante nas respostas teciduais. NORMANN e CORNELIUS (1987) verificaram que injeções múltiplas de BCG são necessárias para a manutenção da atividade antitumoral. As observações destes pesquisadores levam-nos a pensar que concentrações maiores e inoculações repetidas de BCG poderiam proporcionar resultados mais efetivos do que os obtidos neste estudo.

BRACARENSE, A.P.R.R.L.; SINHORINI, I.L. Influence of induced inflammation with BCG on the regression of Ehrlich tumour. *Semina: Ci. Agr.*, Londrina, v.15, n.1, p.8-13, march 1994.

**ABSTRACT:** It has been analyzed the influence of experimentally induced inflammation with BCG on the regression of the solid Ehrlich tumour. The experimental model consisted of the administration of BCG intralesionally. The animals received 0,05ml of a suspension containing  $2,5 \times 10^6$  tumor cells in the footpad. Histologic changes have been demonstrated in the development of the tumour at several times after the inoculation of BCG. Alterations in tumour size have also been studied. Estatistic analysis (Student T-test) has not demonstrated significant levels (5%). The growth of the tumour has re-established accompanying the evolution of the process. This fact suggests that although BCG interferes with tumour's growth it was not able to bring about complete destruction of the neoplasia.

**KEY WORDS:** Inflammation, Neoplasia, Ehrlich, Tumour, BCG.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIOZZI, G.; STIFFEL, C.; HALPERN, B.H.; MORTON, D. Effet de l'inoculation du bacille de Calmette-Guérin sur le développement de la tumeur ascitique d'Ehrlich chez la souris. *C.R. Soc. Biol.*, Paris, v. 153, p. 987-993, 1959.
- COSTA NETO, P.L. *Estatística*. São Paulo: Edgar Blücher, 1977. 264p.
- DAGLI, M.L.Z. **Disseminação linfática do tumor de Ehrlich:** estudo experimental. São Paulo, 1989. 148p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- FALK, R.E.; MAKOWKA, L.; AMBUS, U.; FALK, J.A.; BUGALA, R.; LANDI, S. Nonspecific and selective stimulation of the immune system in the treatment of carcinoma in humans. *Canad. Med. Ass. J.*, v. 128, p. 1385-1388, 1983.
- GARACI, E.; MASTINO, A.; FAVALLI, C. Enhanced immune response and antitumor immunity with combinations of biological response modifiers. *Bull. N.Y. Acad. Med.*, v. 65, p. 111-119, 1989.
- GUERRA, J.L. *Aspectos do processo inflamatório em camundongos portadores do tumor de Ehrlich*. São Paulo, 1983. 79p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1983.
- HANNA, M.G.; ZBAR, B.; RAPP, H.J. Histopathology of tumor regression after intralesional injection of *Mycobacterium bovis*. I. Tumor growth and metastasis. *J. Nat. Cancer Inst.*, v. 48, p. 1441-1455, 1972.
- HANNA, M.G.; SNODGRASS, M.J.; ZBAR, B.; RAPP, H.J. Histologic and ultrastructural studies of tumor regression in inbred quinea pigs after intralesional injection of *Mycobacterium bovis* (BCG). *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, v. 39, p. 71-84, 1973.
- HESS, A.D.; CATCHATOURIAN, R.; ZANDER, A.R.; EPSTEIN, R.B. Intralesional *Bacillus calmette-Guérin* immunotherapy of canine venal tumors. *Cancer Res.*, v. 37., p. 3990-3994, 1977.
- KEY, M.E.; HANNA, M.G. Mechanism of action of BCG – tumor cell vaccines in the generation of systemic tumor immunity. I. Synergism between BXG and line 10 tumor cells in the induction of an inflammatory response. *J. Nat. Cancer Inst.*, v. 67, p. 853-861, 1981.
- KOPPER, L.; LAPIS, K. What's new in macrophage-tumor cell interaction? *Path Res. Pract.*, v. 179, p. 652-655, 1985.
- LAMM, D.L.; THOR, D.E.; HARRIS, S.C.; REYNA, J.A.; STOGDILL, V.D.; RADWIN, H.M. Bacillus Calmette-Guérin immunotherapy of superficial bladder cancer. *J. Urol.*, Paris, v. 124, p. 38-42, 1980.
- LEONG, A.S.Y.; WANNAKRAIROT, P.; JOSE, J.; MILIOS, J. Bacillus Calmette-Guérin-treated superficial bladder cancer: correlation of morphology with immunophenotyping. *J. Path.*, v. 162, p. 35-41, 1990.
- LIEBERMAN, R.; EPSTEIN, W.; FUNDENBERG, H.H. Immunopathologic changes in patients with cutaneous malignant melanoma following intratumoral inoculation of BCG: correlation with cell-mediated immunity. *Int. J. Cancer.*, v. 14, p. 401-416, 1974.
- NILSON, A.; RÉVÉSZ, L.; SRJERNWARD, J. Suppression of strontium Bacillus Calmette-Guérin (BCG). *Radiat. Res.*, v. 26, p. 378-382, 1965.
- NORMANN, S.J.; CORNELIUS, J. Tumor cytogenetics in the presence of normal, alloimmune, or *Bacillus Calmette-Guérin* - activated host cells simultaneously assayed *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Res.*, v. 47, p. 2067-2072, 1987.
- OLD, L.J.; CLARKE, A.; BENACERRAF, B. Effect Bacillus Calmette-Guérin (BCG) infection on transplanted tumours in the mouse. *Nature*, London, v. 184, p. 291-293, 1959.
- PIMM, M.V.; BALDWIN, R.W. BCG immunotherapy of rat tumours in athymic nude mice. *Nature*, London, v. 254, p. 77-78, 1975.
- PIMM, M.V.; BALDWIN, R.W. Kinetics of BCG mediated tumour cell destruction in the rat. *Europ. J. Cancer.*, v. 16, p. 141-146, 1980.
- RIBI, E.E.; MEYER, T.J.; AZUMA, J.; ZBAR, B. Mycobacterial cell wall components in tumor suppression and regression. *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, v. 39, p. 115-119, 1973.
- SVEJDA, J.; MECHL, Z.; SOPKOVÁ, B.; FOUKAL, T. Histologic changes in the human skin melanoma after intratumours treatment with BCG. *Neoplasia*, v. 26, p. 215-221, 1979.

Recebido para publicação em 30/9/1993