

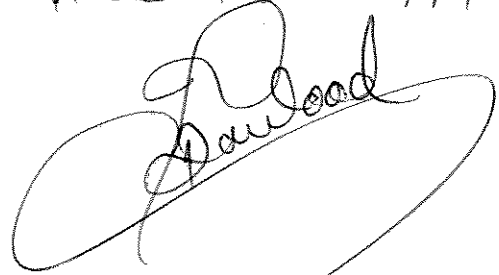
191038M
A 23050

o cat.

LIANA MARIA CARDOSO ^{et}

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida pela Candidata Liana Maria Cardoso e aprovada pela Comissão Julgadora.

11 de Abril 1991



" ESTUDO DA IMUNOGENICIDADE DE UMA VACINA CONTRA CARCINOMA RENAL HUMANO "

TESE APRESENTADA AO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE.

191038M

C179e
13678/BC

CAMPINAS - 1991

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

ORIENTADOR

PROF. Dr. FAWZI AHMED MOUSTAFI DAWOOD

ML

À meus pais

À meu marido

À minha filha

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Fawzi Ahmed Moustafa Dawood pela orientação, amizade e conselhos ao longo destes anos.

Ao Professor Doutor Marcos Garcia Costa pela confiança, ajuda e amizade depositados em mim durante estes anos.

Ao Professor Doutor Carlos Arturo Levi D'Ancona, Professora Doutora Marlene Braide Serafim, Professora Doutora Leonilda M. B. dos Santos e Professor Doutor Paulo M. F. Araújo pela contribuição quando da análise crítica do presente trabalho.

Aos amigos, colegas de pós-graduação, funcionários e docentes do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual de Campinas, que colaboraram direta e/ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Revisão da Literatura.....	4
3. Objetivo.....	18
4. Materiais e Métodos.....	19
4.1. Extração dos antígenos associados ao carcinoma renal ou tecido normal.....	19
4.2. Imunização de coelhos.....	21
4.3. Absorção de imune soros.....	22
4.4. Imunodifusão e Imunoeletroforese.....	23
4.5. Cromatografia em Sephadex.....	24
4.6. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE).....	25
4.7. Linfoproliferação.....	26
4.8. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Elisa).....	27
5. Resultados.....	28
5.1. Purificação das Proteínas associadas ao Tecido Renal normal e ao Adenocarcinoma Renal.....	28

5.2. Análise por imunodifusão e análise imunoeletroforética.....	30
5.3. Análise Eletroforética em gel de poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE).....	36
5.4. Fracionamento das proteínas associadas ao Tecido Tumoral (PATT) em Sephadex G-100.....	38
5.5. Linfoproliferação frente à antígeno tumoral e mitógeno	41
5.6. Dosagem de Fator de Necrose Tumoral (TNF).....	43
6. Discussão	44
7. Conclusão.....	49
8. Resumo.....	50
9. Referências Bibliográficas.....	52

ABREVIATURAS

- BSA - soroalbumina bovina
- PBS - solução salina tamponada com fosfato
- SDS - dodecil sulfato de sódio
- PATT - proteínas associadas ao tecido tumoral
- PATN - proteínas associadas ao tecido normal
- PTP - proteínas polimerizadas do tumor
- F1 a F6 - frações resultantes da cromatografia em Sephadex G-100 realizada com extrato relativo ao fragmento tumoral
- TAA - antígenos associados ao tumor
- ECF - etilcloroformato
- TNF - fator de necrose tumoral
- PHA - fito-hemaglutinina
- ³HT - timidina marcada com trício
- ELISA - enzyme linked immunosorbent assay

1. INTRODUÇÃO

Um grande número de observações, principalmente a infiltração dos tumores sólidos com células linfóides do hospedeiro, evidenciam que o sistema imunológico exerce um papel importante no surgimento e desenvolvimento de um cancer.

A pesquisa imunológica em cancer baseia-se no princípio de que as transformações neoplásicas das células resultam na expressão de muitos antígenos que não são normalmente encontrados nas células progenitoras normais. Esses antígenos presentes nas células tumorais, mas que também podem estar expressos na superfície de células normais sob certas condições, como por exemplo os antígenos carcinoembrionários, são chamados de antígenos associados ao tumor (TAA).

Conceitualmente, a imunidade específica anti-tumoral baseia-se no fato de que as diferenças estruturais existentes entre a célula tumoral e sua contra-parte normal sejam reconhecidas pelo sistema imunológico. Isso traz à tona duas questões distintas, porém relacionadas:

1. Os tumores humanos têm realmente, ou não, antígenos novos (neo-antígenos) que são claramente distinguíveis daqueles presentes em células normais?.
2. O hospedeiro é, ou não é, capaz de produzir uma resposta imunológica específica contra esses antígenos?.

Não se pode concluir que, porque uma célula tumoral difere antigenicamente de sua contra-parte normal, o hospedeiro

responderá aos neo-antígenos. Inversamente, o hospedeiro pode responder à antígenos presentes no tumor e que estão também presentes em células normais mas não são normalmente apresentados ao sistema imunológico de modo à suscitar uma resposta.

Muitos autores têm se ocupado com essa questão e vários antígenos de superfície celular associados à tumores humanos e experimentais têm sido identificados, analisados e classificados.

Embora nem todos esses antígenos possam ser imunogênicos para o hospedeiro original, eles podem ter interesse prático no imunodiagnóstico, acompanhamento dos pacientes e na imunoterapia.

A Imunoterapia Ativa Específica está sob investigação como um método para a erradicação de metástases ocultas, através da exploração da capacidade imunológica do hospedeiro, complementando assim modalidades convencionais de tratamento (cirurgia, radioterapia e quimioterapia).

O Adenocarcinoma Renal é uma doença maligna, relativamente incomum e de etiologia obscura, que têm sido objeto de muitas investigações clínicas e laboratoriais. Em seu meio bem protegido, o Adenocarcinoma não produz sintomas até que já tenha se espalhado regionalmente ou apresente metástases em lugares distantes. A clássica tríade, dor, hemáturia e massa lateral, significam doença avançada. A cirurgia, simples ou radical, ainda é o tratamento primário da doença e alguns autores (TYKKA et alii, 1978; NEIDHART et alii, 1980; TALLBERG et alii, 1985) têm obtido sucesso usando a imunoterapia, após excisão cirúrgica, para regressão das metástases em pacientes portadores de Adenocarcinoma Renal estágio IV.

Para um estudo, à posteriori, da resposta imunológica de pacientes portadores de Adenocarcinoma Renal estágio IV

que estão sob tratamento, recebendo injeções com preparações antigênicas obtidas de seus tumores, originou-se a proposta desse trabalho.

Entretanto, por se dispor apenas de informações à respeito da evolução clínica dos pacientes, julgou-se necessário uma análise da preparação antigênica, obtida do tumor, utilizada no tratamento e sua confrontação com outra preparação obtida de tecido normal.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A teoria da vigilância imunológica, proposta por ERLICH (1909), atesta que uma função normal do sistema imunológico é reconhecer e destruir células tumorais. Entusiasticamente aceita logo após sua formulação, essa teoria foi depois questionada.

O fato de vários modelos experimentais terem mostrado que a imunização de animais com tumor ou extratos tumorais pode ser profilático (PELLIS et alii, 1980), terapêutico, no caso de ressecções incompletas (KAHAN et alii, 1980), ou pode conferir vários graus de imunidade contra um desafio com células tumorais após ressecção completa (INABA et alii, 1983) e que a incidência de câncer em indivíduos imunossuprimidos é muito maior do que no resto da população (GOREBICK, 1983), suportam fortemente a validade da teoria.

Entretanto, muitas dúvidas ainda persistem à respeito da existência ou não de uma resposta imune efetiva contra o crescimento neoplásico. A identificação de moléculas ou de uma molécula, que confira à célula cancerosa diferenças quantitativas ou qualitativas de sua contra parte normal e que seja reconhecida pelo hospedeiro autólogo ou singeneico, é ainda o tema central da imunologia de tumores.

A transformação maligna de um tecido pode ser acompanhada de mudanças fenotípicas celulares, que incluem perda de componentes normais ou ganho de outros não expressos na célula normal.

Mudanças quantitativas na expressão de componentes normais têm sido demonstradas para várias substâncias oncofetais (MOTTA e BRULEY, 1973).

Mudanças qualitativas no citoesqueleto e na superfície celular (NICOLSON, 1976), também têm sido demonstradas em tumores animais experimentais e em tumores humanos.

Os componentes da superfície celular parecem ter um papel importante na interação das células tumorais com seu meio. Muitos investigadores têm sugerido que mudanças nas glicoproteínas de superfície celular são importantes nas metástases (YAMADA et alii, 1978). Recentes achados na inibição das metástases tumorais por anticorpos monoclonais contra moléculas de superfície também dão evidências claras da importância das propriedades da superfície das células. NICOLSON, 1982, mostrou que a expressão de um antígeno na célula tumoral, o qual foi identificado através de anticorpo monoclonal, se correlaciona com o aumento da colonização das células tumorais. Outros anticorpos monoclonais, dirigidos para antígenos de células tumorais, que interferem com a adesão dessas células na matriz extra-celular e inibem a colonização do Melanoma B16, também foram descritos (VOLLMERS e BIRCHMEIR, 1983; VOLLMERS e BIRCHMEIR, 1983).

Todavia, não se pode afirmar que as diferenças apresentadas pelas células neoplásicas levem à um reconhecimento imunológico, sendo necessário um estudo mais detalhado dos antígenos de superfície dessas células.

OLD (1981), têm-se ocupado da análise sorológica dos antígenos de superfície celular de tumores experimentais e humanos. Este estudo sorológico, através de método rigoroso, está voltado para a especificidade. Tal método, referido como tipagem autóloga, é baseado no estudo das reações entre o soro e células tumorais de um mesmo paciente e o controle da especificidade é feito através da absorção do soro com células normais, autólogas

e alogeneicas. De acordo com esse estudo os antígenos associados com tumores sólidos são sorologicamente classificados em três grupos. Os antígenos de classe I mostram uma absoluta restrição à um único tumor e não são encontrados em qualquer outra célula normal ou maligna; os antígenos de classe II são antígenos tumorais compartilhados e são encontrados em células tumorais de diferentes indivíduos. Recentes referências têm mostrado que esses antígenos são encontrados de maneira restrita em células normais e portanto deveriam ser classificados como de diferenciação auto-antigenica. Já os antígenos de classe III são difusos e expressos em uma ampla maioria de células normais e malignas, de origem humana e animal. Quando se observa, experimentalmente, a resposta imune para tumores autólogos, os antígenos de classe III são encontrados com mais frequência que os antígenos de classe I e II.

A tipagem autóloga trouxe uma contribuição muito grande à análise da especificidade já que os resultados de testes realizados com soro ou células linfóides de um indivíduo e células tumorais de outro, são de difícil interpretação devido à participação de aloantígenos (SHIKU et alii, 1976).

Células tumorais cultivadas "IN VITRO" têm sido amplamente utilizadas como alvos nos estudos das reações imunes celulares (HELLSTROM et alii, 1971; FOSSATI et alii, 1971; DEVRIES et alii, 1974) e humorais (CORNAIN et alii, 1975; VIZA et alii, 1975). Seu uso está baseado na suposição de que as células tumorais mantidas em cultura expressam antígenos de superfície de uma maneira uniforme e constante. Embora muitos autores obtenham sucesso no estudo imunológico de tumores sólidos trabalhando com células provenientes de cultura, outros alegam que a integridade celular nestes sistemas é alterada.

Alguns estudos demonstraram que a expressão dos antígenos de histocompatibilidade (HL-A), permanecem constantes em células linfoblastóides humanas (PELLEGRINO et alii, 1972; FER-

RONI et alii, 1973) e em fibroblastos humanos (BRAUTBAR et alii, 1973), mesmo por período prolongado de cultura. GOLDSTEIN e SINGAL, 1972, entretanto, acharam que a expressão de antígenos HL-A em fibroblastos humanos tendia à desaparecer com o avanço da cultura.

Enquanto que a expressão dos antígenos de histocompatibilidade, os quais não pertencem à classe dos chamados antígenos de diferenciação, parece permanecer constante durante a cultura, os antígenos que estão associados com o estado neoplásico parecem estar sujeitos à grandes flutuações (SEIBERT et alii, 1977; SORG et alii, 1978).

Células cultivadas "IN VITRO" estão expostas às influências variáveis do meio e, portanto, estão sob constante pressão seletiva. Embora muitos avanços tenham sido feitos na área de técnicas de culturas, os requisitos nutricionais precisos para diferentes tipos de células ainda são desconhecidos, e muitos trabalhos são realizados empiricamente. KERBEL e BLAKSLLEE, 1977, demonstraram o aparecimento de novos antígenos de superfície depois da incubação de células alvo com meio contendo soro fetal bovino, sugerindo que proteínas desse soro podem se tornar incorporadas ou adsorvidas às membranas das células, obtidas de diversos pacientes com diferentes formas de câncer. Além disso, a cultura de células por longo período representa um trabalho difícil, caro e lento, o que dificulta sua execução em laboratórios não especializados.

Uma alternativa para se resolver esse problema é a utilização de extratos brutos, ou seja, preparações enriquecidas em proteínas associadas à tumores. Muitas glicoproteínas associadas à tumores têm sido isoladas do fluido ascítico (CHU et alii, 1977; PASTERNAK et alii, 1978) e também do soro (KOPROWSKI et alii, 1981; PAPSIDERO et alii, 1984; PINTO et alii, 1986) obtido de pacientes com diferentes formas de câncer.

Fragmentos tumorais obtidos cirurgicamente também podem ser utilizados como fonte de proteínas, intracelulares e de superfície de membrana, para análises imunológicas dos tumores (PELLIS et alii, 1980; SLANETZ et alii, 1982; HOLLINSHEAD et alii, 1985; SHEER et alii, 1988)

As metodologias empregadas para a obtenção e/ou caracterização dessas proteínas "específicas" das células tumorais são muito variadas e envolvem diferentes processos físico-químicos.

Em geral, o isolamento de antígenos tumorais baseia-se em procedimentos desenvolvidos para o isolamento de antígenos de histocompatibilidade (REISFELD et alii, 1971).

A solubilização de antígenos tumorais através de soluções salinas hipertônicas, butanol, enzimas hidrolíticas, energia sonora ou ainda através de detergentes, têm sido objeto de estudo de muitos investigadores (PELLIS et alii, 1974; CHANG et alii, 1977; LEGRUE et alii, 1981). Em geral, isso têm sido considerado ser o primeiro passo no isolamento e caracterização de antígenos associados aos tumores e também no mecanismo da resposta imune, "IN VITRO" e "IN VIVO", à esses antígenos.

PELLIS et alii, 1974, estudando antígenos de transplantação associados à sarcomas induzidos quimicamente, propõem a solubilização de tais antígenos com KCL 3M. O extrato foi então utilizado na inoculação de camundongos singênicos e alogênicos. Entretanto, os extratos eram fracamente imunogênicos e efetivos apenas em estreitas séries de doses. Achados de PASTERNAK et alii, 1978 e de BUBENIK et alii, 1978, são semelhantes.

NATORI et alii, 1977, estudando os mesmos antígenos de transplantação associados à sarcomas induzidos pelo Metilcolantreno, propõem que as células neoplásicas sejam submetidas à

energia sônica durante trinta minutos, o que garante a ruptura de 90% ou mais dessas células.

Os mesmos autores também fazem uso do detergente Triton X-100, numa concentração final de 0,5% e de uma digestão enzimática com papaína para a extração dos antígenos associados às membranas de células neoplásicas. Entretanto, o material antigênico obtido com a digestão enzimática não rendeu bons resultados, uma vez que demonstrou imunogenicidade muito fraca.

Para um estudo das propriedades imunogênicas de antígenos de superfície de membranas das células neoplásicas, LEGRUE et alii, 1981, propõem que a extração seja feita com butanol. Assim, células obtidas de fragmentos tumorais são incubadas durante cinco minutos, numa solução de butanol à 2,5% em PBS (sem Ca e Mg), em pH 7,4. Após diálise de vinte quatro horas contra 100ml de PBS e ultra-centrifugação à 115.000 x g por uma hora, o extrato é concentrado e a atividade do antígeno pode ser estudada em ensaios "IN VITRO" e "IN VIVO".

HOLMES et alii, 1970, descreveram um método para a liberação de antígenos de transplantação de sarcomas induzidos pelo Metilcolantreno em cobaias, através de ultra-som de baixa intensidade. As células neoplásicas, obtidas por digestão enzimática, de um fragmento tumoral, foram suspensas em meio 199 com 20% de soro fetal bovino, penicilina (100U/ml) e estreptomicina (100U/ml). Cada suspensão contendo 30-40 x 10⁶ células/ml foi exposta à energia sônica (10 Kc/seg.) durante cinco a sete minutos. As membranas foram então removidas por ultra-centrifugação à 130.000 x g por quarenta e cinco minutos e o sobrenadante, contendo os antígenos extraídos, concentrado cinquenta vezes através de diálise e utilizado, com sucesso, para imunizar cobaias síngeneicas.

Para a separação e identificação de antígenos associados às membranas de células de Melanoma maligno, HOLLINSHEAD et alii, 1974, também propõem o uso do ultra-som. As membranas, já separadas das células através do uso de soluções salinas isotônicas e hipotônicas, são expostas à sonicacão de baixa frequência por quatro períodos sequenciais de um minuto e meio, com centrifugações à $100.000 \times g$ por uma hora após cada exposição. Após cromatografia em Sephadex G-200 para separação das frações solúveis, estas podem ser analisadas através de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS).

A atividade tumor específica de todos esses materiais solubilizados têm sido demonstrada através de dois tipos de ensaios imunológicos:

1. Indução da imunogenicidade "IN VIVO", com a capacidade do hospedeiro singeneico se proteger contra um subseqüente desafio com material tumoral.
2. Investigação de uma resposta imunológica específica através de células sensibilizadas, como as reações de hipersensibilidade tardia, proliferação "IN VITRO" de linfócitos antígeno-específico e também pela inibição da migração espontânea dos macrófagos de hospedeiros sensibilizados.

O Adenocarcinoma Renal é um tipo de tumor particularmente útil para a obtenção dessas preparações antigenicas, uma vez que a lesão primária no rim é consistente e grande, o que providencia grandes quantidades de tecido tumoral autólogo.

No caso específico desse tumor o isolamento de suas proteínas ou antígenos têm despertado interesse no preparo de uma vacina que possa ser utilizada na Imunoterapia Ativa Específica.

À despeito dos procedimentos cirúrgicos, de técnicas radioterápicas inovadoras e muitas tentativas quimioterápicas novas, os cânceres sólidos comuns permanecem mortais. A causa da morte, usualmente, é a doença recorrente resultante das micrometástases que se disseminam antes ou como consequência da cirurgia. Infelizmente, os tratamentos utilizados até agora apresentam resultados em termos de remissão mas não de cura.

Após a irrefutável demonstração de antígenos específicos do tumor (FOLEY, 1953; PREHN and MAIN, 1957), o papel do sistema imunológico no controle e eliminação de doenças malignas têm sido investigado extensivamente em animais experimentais e em humanos. O maior uso para imunoterapia, atualmente, é como um adjuvante na quimioterapia e na cirurgia do tumor primário quando existe doença residual mínima.

Para aumentar a reatividade imune geral contra cancer residual disseminado, imunestimulação não específica tem sido feita com BCG, Corynebacterium parvum, muitos polinucleotídeos, levamisole, e recentemente interferon. Os resultados desapontadores ou equivocados desses protocolos clínicos (SALMON, 1977; POWLES, 1979) poderiam ser atribuído parcialmente à baixa imunogenicidade das células cancerosas, à quantidade da massa tumoral, ou à uma capacidade imunológica deficiente do hospedeiro em apresentar o tumor.

Grandes esforços têm sido feitos para se imunizar ativamente o hospedeiro singeneico ou autóctone com células tumorais irradiadas ou quimicamente modificadas, no sentido de se obter uma imunoterapia ativa específica. Esta tentativa traz inerente a hipótese de que células tumorais primárias, bem como metástases, expressam antígenos de transplantação tumor-específicos. O tratamento de células tumorais com radiação, mitomicina C, neuraminidases, vírus ou misturas de células com adjuvantes bacterianos têm levado à preparações não tumorigênicas e que são imunogênicas quando injetadas em hospedeiro singeneico (BE-

KESI et alii, 1971; MARTIN et alii, 1971; BARTLETT et alii, 1972; PRAGER et alii, 1973; RAY et alii, 1975). Basicamente, esses resultados suportam a hipótese de que antígenos não expressos em células normais são expressos em células tumorais e que a imunogenicidade dessas células tumorais pode ser expressa ou mesmo aumentada em hospedeiros com tumor ou hospedeiros normais. Esses resultados experimentais têm reforçado a validade da imunoterapia ativa específica para as neoplasias.

Após os estudos pioneiros de MATHÉ, que tratou leucemia linfática aguda com BCG, com células blasticas leucemicas alogeneicas irradiadas, ou com ambos, muitos autores seguiram protocolos semelhantes e obtiveram resultados encorajadores em termos de períodos sem doença relativamente longos (MATHÉ et alii, 1973; POWLES et alii, 1973; RAY et alii, 1975; MORTON et alii, 1976).

Embora muitos métodos possam ser descritos no preparo de soluções enriquecidas com proteínas associadas à tumores, a literatura mostra pouca ou nenhuma diversidade para a obtenção desses antígenos no preparo das vacinas, no caso do Adenocarcinoma Renal.

TALLBERG, 1974, propõe que o tumor, após remoção cirurgica e confirmação histológica das células tumorais, seja cortado em pedaços pequenos e mergulhado em água destilada, numa quantidade equivalente ao seu peso, para que se alcance hipotonicidade suficiente para a ruptura das células. Essa suspensão é então mecanicamente homogeneizada à 4°C durante quinze minutos e congelada à -20°C por uma hora ou mais. Após o descongelamento, o homogeinato é submetido à um aparelho de ultra-som, duas vezes por cinco minutos, e centrifugado à 4°C por dez minutos (G = 12.000). O sobrenadante, que contém as proteínas isoladas do tecido tumoral, é coletado e pode então ser polimerizado fazendo-se uso de método descrito por AVRAMEAS e TERNYNCK, 1967.

Outros autores (TYKKA et alii, 1978; NEIDHART et alii, 1980), também fazem uso do mesmo método descrito acima para obtenção das preparações antigenicas utilizadas posteriormente no tratamento de pacientes que apresentavam metástases pulmonares.

MORI et alii, 1988, trabalhando com Adenocarcinoma Renal em camundongos, obtêm bons resultados com a extração das proteínas tumorais através do butanol. Entretanto, em trabalho publicado a seguir (1989), propõem que uma quantidade de água equivalente ao peso do tumor seja adicionada e o tumor homogeneizado por dez minutos à 4°C. A suspensão de células é então congelada por uma hora ou mais à -70°C. Após descongelamento à temperatura ambiente, a suspensão é re-homogeneizada por dez minutos à 4°C e centrifugada (10.000 x g) por trinta minutos. O sobrenadante é então coletado e estocado à -70°C para futura polimerização.

As diferentes abordagens aqui citadas e que são empregadas na tentativa de se isolar um marcador ou marcadores específicos para um determinado tumor, nos dão conta da grande variedade de metodologias descritas na literatura.

A introdução da tecnologia dos anticorpos monoclonais (KOHLEER e MILSTEIN, 1975) revolucionou as análises sorológicas e bioquímicas do câncer humano. Atualmente esses anticorpos têm sido amplamente utilizados no estudo dos antígenos tumorais (HERLYN et alii, 1980; KOPROWSKI et alii, 1981; MOSHAKIS et alii, 1981; BAST et alii, 1981; ANDREWS et alii, 1982; DAWOOD et alii, 1986) devido à sua especificidade mais restrita podendo detectar um único epítipo em uma molécula complexa. Esses anticorpos monoclonais têm servido como excelentes reagentes para o isolamento de antígenos tumorais. Além disso, têm um potencial grande para uso em diagnóstico, prognóstico, detecção de metástases e em imunoterapia.

Entretanto, a heterogeneidade dos antígenos associados aos tumores, não se expressa somente entre tumores de diferentes pacientes como também entre tumores de um mesmo indivíduo. Este fato têm sido documentado por HOCKEY et alii (1984) e NOWELL, (1986). A identificação do grau dessa heterogeneidade têm sido de grande importância na avaliação da utilidade de um dado anticorpo monoclonal na radioimunodeteccção do antígeno em processos de imunoterapia.

A investigação de um antígeno ou antígenos presentes em células tumorais, ausentes em células normais, e a sua correlação com doença maligna tem sido realizada em muitos laboratórios. Assim, muitos autores têm abordado suas pesquisas através da metodologia da fusão celular.

Quando células malignas são fusionadas com células normais da mesma espécie, as células híbridas formadas, usualmente, mostram supressão da malignidade sendo incapazes de crescer progressivamente em hospedeiros imunossuprimidos e geneticamente compatíveis. Entretanto, quando esses híbridos são mantidos em cultura "IN VITRO", ocorre segregação de componentes genéticos, normalmente na forma de perdas cromossômicas, e células malignas tornam a aparecer na população. Assim, tomando-se um par de células híbridas, uma apresentando a condição maligna e outra onde essa condição tenha sido suprimida, pode-se identificar marcadores que estão ligados com a malignidade e eliminar aqueles que não estão.

Com base nesses dados ASHALL et alii, 1982, descreveram um antígeno, denominado Antígeno Ca, encontrado em muitas linhagens de células malignas inclusive carcinomas renais (McGEE et alii, 1982).

Esse antígeno pôde ser detectado, através de estudos imunquímicos utilizando-se cortes de tecidos, malignos e normais, congelados e embebidos em parafina e um anticorpo monoclo-

nal, o anticorpo Ca1. O anticorpo Ca1 foi obtido através da imunização de camundongos com antígenos extraídos de células derivadas de um carcinoma de laringe humano .

Como o antígeno Ca não foi detectado em tumores benígnos ou em células normais, a não ser no epitélio de transição do trato urinário e no epitélio das trompas de Falópio, os autores sugerem um papel prognóstico para sua presença no soro de alguns pacientes.

Um outro antígeno associado à tumores, o Ca 19-9, detectado através de um anticorpo monoclonal produzido por um hibridoma preparado à partir de células esplênicas de um camundongo imunizado com uma linhagem de células obtidas de carcinoma coloretal, também têm sido exaustivamente estudado (KOPROWSKI et alii, 1981). Os níveis de Ca 19-9 são frequentemente elevados no soro de pacientes com carcinomas gastrointestinais, especialmente em pacientes com carcinoma pancreático (RITTS et alii, 1984).

Recentemente, a concentração sérica de um novo antígeno, o Ca 50, pôde ser detectado por métodos imunológicos (HOLMGREN et alii, 1984). A identificação desse antígeno está baseada em um anticorpo monoclonal dirigido contra células de carcinoma coloretal. Grandes anormalidades nos níveis séricos de Ca 50 foram encontrados numa alta proporção de pacientes com carcinomas gastrointestinais (HOLMGREN et alii, 1984). Resultados preliminares sugerem que a expressão de Ca 50 é semelhante à expressão do antígeno Ca 19-9 (RITTS et alii, 1984; KUUSELA et alii, 1984; HAGLUND et alii, 1986b). Entretanto, o nível de Ca 50 está elevado em alguns pacientes com carcinomas mamários, renais, prostáticos, pulmonares e ovarianos (HOLMGREN et alii, 1984), enquanto que a concentração de Ca 19-9 raramente está aumentada em pacientes com patologias fora do trato gastrointestinal (RITTS et alii, 1984).

BAST et alii, 1983, descreveram um ensaio para detecção do antígeno Ca 125 associado à carcinomas ovarianos epiteliais. Esse ensaio está baseado em um anticorpo monoclonal, OC 125, obtido através da hibridização de células somáticas de camundongo imunizado com células de carcinoma (OVCA 433)(BAST et alii, 1981).

Em seus primeiros estudos clínicos, 82% das pacientes com carcinoma ovariano, histologicamente comprovado, apresentavam elevados níveis de Ca 125 (35U/ml), enquanto que somente 1% das pessoas aparentemente saudáveis e 6% das pacientes com doenças não malignas mostravam níveis elevados. Por isso, o ensaio com Ca 125 têm sido sugerido pelos autores na detecção e acompanhamento de carcinomas ovarianos.

STACKER et alii, 1985, obtiveram um anticorpo monoclonal murino, denominado 3E1.2, produzido por um hibridoma derivado de células esplênicas de camundongo imunizado com carcinoma mamário humano. Esse anticorpo monoclonal demonstrou seletiva reatividade com mais de 90% de tecido mamário maligno e limitada reatividade com outros epitélios secretores normais.

O antígeno definido pelo 3E1.2 (chamado de antígeno de soro mamário ou MSA) também foi detectado no soro, com elevados níveis, numa alta proporção de pacientes com cancer mamário localizado (75%) ou disseminado (90%) (TJANDRA et alii, 1988). Estudos têm mostrado que os níveis de MSA são úteis no monitoramento de pacientes com cancer mamário; o anticorpo têm sido utilizado para localizar metástases em linfonodos axilares em pacientes com cancer mamário, através de imunocintilografia (THOMPSON et alii, 1984).

Com relação ao carcinoma renal, existem poucos marcadores úteis para o diagnóstico e monitoramento de pacientes portadores dessa malignidade (TAKASHI et alii, 1989). Muitas proteínas têm sido investigadas (SUFRIN et alii, 1978; RICHARDS et

alii, 1982; SELLI et alii, 1984) porém os resultados obtidos apresentam pouca utilidade para uso clínico em pacientes com carcinoma renal.

É geralmente aceito que a glicólise anaeróbica está aumentada em tumores malignos e que enzimas com atividade glicolítica (enolases) acompanham esse aumento (TAKASHI et alii, 1989).

HAIMOTO et alii, 1986, determinaram as concentrações no tecido e a localização imunohistoquímica de enolases em carcinomas renais. Os resultados preliminares também indicam que os níveis de enolases no soro de pacientes com carcinoma renal estão elevados.

Obviamente, este não pode ser considerado um marcador específico para carcinomas renais mas os autores concluem que pode ser um marcador útil, pois raramente apresenta-se elevado em doenças benígnas e o seu nível correlacionou-se bem com o curso clínico dos pacientes portadores de carcinomas renais.

Atualmente, muitos investigadores têm voltado sua atenção para os oncogenes, cuja expressão parece estar intimamente associada com a conversão de células normais em células neoplásicas. Muitos estudos suportam a hipótese de que a ativação de um ou mais desses genes podem levar ao desenvolvimento de cânceres em animais e em humanos. Futuros avanços nessa área contribuirão para um melhor entendimento e novas propostas para o diagnóstico e tratamento de cânceres humanos (GARRET, 1986).

OBJETIVO

À proposta deste trabalho foi a busca de uma estrutura no tecido tumoral, ausente no tecido normal, e que pudesse eventualmente, ser responsável pela imunogenicidade desse tumor.

Os parâmetros de análise utilizados foram:

1. Análise imunoquímica, através de imunodifusão dupla e imunoelectroforese frente à soro hiperimune de coelhos, produzido contra preparações antigênicas de tecido tumoral e de tecido normal.
2. Análise eletroforética em Gel de Poliacrilamida, na presença de Dodecíl Sulfato de Sódio (SDS).
3. Análise de linfoproliferação frente à antígeno extraído de tecido tumoral e frente à mitógeno.
4. Dosagem de TNF (Fator de Necrose tumoral).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Extração dos Antígenos associados ao Carcinoma Renal e tecido Normal.

Os antígenos associados aos tecidos, normal e tumoral, foram separados conforme descrito por TALLBERG (1974).

A amostra utilizada em nosso trabalho foi originada de um fragmento proveniente da massa tumoral do paciente F.B.S., submetido à nefrectomia por ser portador de Adenocarcinoma Renal estágio IV. O material foi lavado e colocado em água estéril no momento da cirurgia. Para obtenção de uma preparação homogênea, o tecido tumoral foi separado do tecido adiposo e, em seguida seccionado em pequenos fragmentos, usando-se técnica estéril. O tecido tumoral assim preparado foi então homogeneizado com igual volume de água estéril por agitação mecânica constante à 4°C durante quinze minutos. Esta preparação foi então congelada à -70°C durante uma hora ou mais. Após descongelamento, à temperatura ambiente, o material foi novamente homogeneizado em liquidificador à 4°C durante dez minutos e depois centrifugado à 4°C durante trinta minutos à 20.000xG (SORVAL RC 2-B). O precipitado foi descartado e o sobrenadante estocado a -70°C.

Uma amostra de tecido renal, do mesmo paciente e considerado normal após biópsia, foi manipulada de maneira análoga ao fragmento tumoral. (Fig.1).

Aliquotas desses produtos, obtidos à partir do fragmento tumoral e do fragmento normal, foram submetidas à dosagem proteica pelo método descrito por LOWRY et alii, 1951, modificado por GARVEY et alii, 1977.

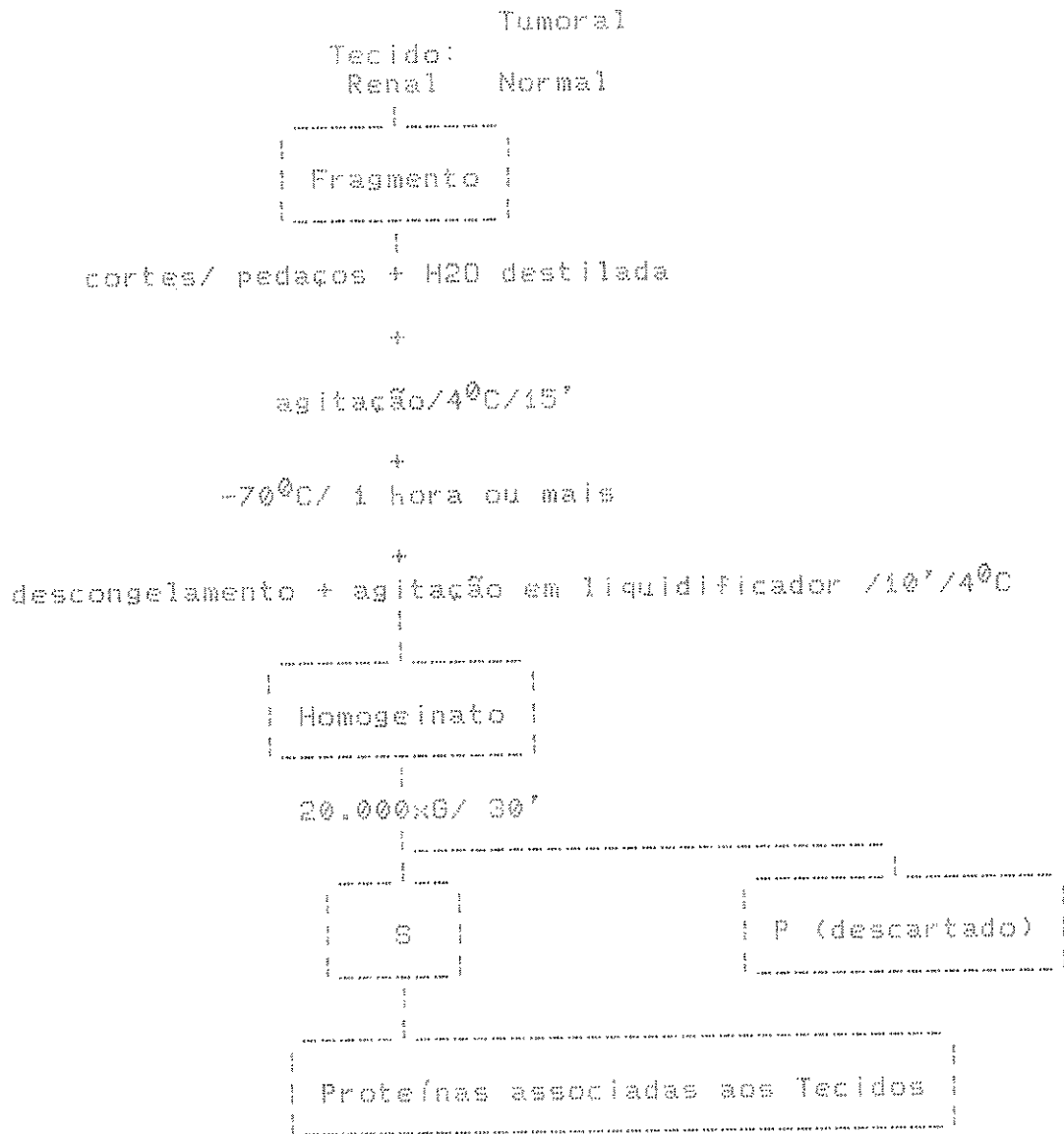


Fig.1. Representação esquemática do método utilizado para purificação das proteínas associadas ao Adenocarcinoma Renal e ao tecido normal. S = sobrenadante P = precipitado

4.2. Imunização de Coelhos

Os soros hiperimunes anti-tecido renal tumoral e anti-tecido renal normal foram obtidos, pela imunização, de dois coelhos. As preparações antigênicas, proteínas associadas aos tecidos tumoral e normal, foram injetadas num volume de 0,5 ml, por via subcutânea, no dorso dos animais, na concentração proteica final de 2mg/ml. Essas inoculações se repetiram a cada três dias, durante quatro semanas. A sangria total dos animais foi realizada uma semana após a última dose. Após a separação do soro, este foi aliqüotado e armazenado à -70°C . O título dos anticorpos anti-tecido renal tumoral e anti-tecido renal normal foi determinado através de imunodifusão dupla, segundo DUCHTERLONY (1949).

4.3. Absorção de imunesoros

Os imunesoros anti-tecido tumoral e anti-tecido normal preparados em coelhos, conforme anteriormente descrito, foram absorvidos com diferentes concentrações de tecidos tumoral ou normal como segue. Aliquotas de 0.4ml de imunesoros foram misturadas com 0.4ml de concentrações proteicas crescentes de tecido normal ou tumoral de 1 a 10mg/ml. As misturas assim preparadas foram incubadas durante 60 minutos a 37°C e 24 horas a 4°C. Após centrifugação a 1000xg durante cinco minutos, o sobrenadante foi submetido a imunodifusão.

4.4. Imunodifusão e Imunoeletroforese

As reações de imunodifusão foram realizadas segundo o método de DUCHTERLONY (1949), modificado por GARVEY et alii, 1977. Essas reações foram realizadas em lâminas de vidro 3x7,5cm com agarose a 1% em solução salina 0,15M. Um molde de cobre foi utilizado para fazer perfurações na agarose, uma central e seis periféricas, de modo a obter distâncias constantes entre si. Imunesoros anti-carcinoma renal e anti-tecido renal normal absorvidos e não absorvidos foram testados contra antígenos extraídos de tumor ou de tecido renal normal. Após aplicação das diferentes amostras no gel, as lâminas foram incubadas em câmara úmida durante 24-48 horas, lavadas, secas e coradas.

As reações de imunoeletroforese foram realizadas seguindo-se a metodologia descrita por GARVEY et alii, 1977, com uso de agarose a 1% em tampão barbital 0,025M, pH 8,6. Um molde de cobre foi utilizado para fazer as perfurações, uma canaleta central e dois poços periféricos. Nos poços aplicou-se as proteínas extraídas dos tecidos tumoral e normal e nas canaletas os imunesoros preparados em coelhos. A corrida eletroforética foi realizada com tampão barbital 0,025M, pH 8,6 e sob voltagem constante (120V). Após a realização da imunoeletroforese as lâminas foram lavadas, secas e coradas pelo "Coomassie Blue" à 0,5% em metanol:ácido acético:água destilada (45:10:45) durante quinze minutos e descoradas através de duas incubações sucessivas de quinze minutos cada uma, com uma solução de metanol:ácido acético:água destilada (45:10:45).

4.5. Cromatografia em Sephadex

A fração resultante da purificação do tecido tumoral foi submetida à uma gel filtração, seguindo-se metodologia descrita por HUDSON e HAY (1980). Uma amostra de 5ml foi aplicada à uma coluna de 100cm x 2,5cm, preparada com Sephadex G-100. Dessa cromatografia resultaram seis frações (F1 a F6) que foram dializadas contra Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS) durante dezesseis horas, aliquotadas em frascos de vidro, liofilizadas e estocadas sob refrigeração.

4.6. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE).

As amostras à serem analisadas foram fervidas durante três minutos em tampão SDS contendo Tris-HCL 0,06M, pH 8,6, SDS 1% e 10% de glicerina. Esse material em condições de redução foi analisado pela técnica de "SDS-PAGE" de acordo com o método de LAEMMLI (1970) modificada por TACKACS (1979). As amostras diluídas em Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS) foram aplicadas no volume de 20ul, numa concentração proteica de 40mg. As análises foram realizadas em gel de separação à 10%. Como marcadores foram utilizados Soro Albumina Bovina (BSA) que apresenta peso molecular de 68.000 e uma mistura de proteínas cujo peso molecular variava entre 70.000 e 12.000. O tempo das corridas foi de uma hora e trinta minutos, realizadas sob voltagem constante de 100V e 20mA. A coloração das proteínas foi feita com "Coomassie Blue" à 0,5% em metanol:ácido acético: água destilada (45:10:45) durante três horas. O gel foi em seguida descorado através de várias incubações sucessivas de quinze minutos cada uma e uma incubação durante a noite com uma solução de metanol:ácido acético: água destilada (45:10:45). No dia seguinte, o gel foi seco seguindo-se método descrito por JUANG et alii, 1984.

4.7. Linfoproliferação

A estimulação específica de células T foi testada num ensaio de proliferação frente à antígeno e mitógeno (PHA) segundo técnica descrita por WALDRON et alii (1973), com pequenas modificações.

Células mononucleadas de indivíduo normal e da paciente portadora de Adenocarcinoma Renal estágio IV, foram separadas através de Ficoll-Hypaque. Após repetidas lavagens as células foram suspensas em RPMI, com 10% de soro fetal bovino (FCS) e antibióticos, numa concentração de 1×10^6 células/ml. As culturas foram feitas em placas de microtitulação e em triplicata. A proliferação dos linfócitos foi determinada pela incorporação de ^3HT (timidina triciada) ao DNA recém-formado. Numa das placas as culturas foram estimuladas com antígeno extraído de tecido tumoral da paciente, em concentrações de 100pg, 50pg, 10pg e 5pg. Noutra placa as culturas foram estimuladas com PHA (fito-hemaglutinina) nas diluições de 1:4 e 1:8. Após cinco e três dias de cultivo, respectivamente, ^3HT (^3H , SuCi) foi adicionada à todas as culturas e 12 horas depois as células foram colhidas, o material precipitado coletado em filtro e a radioatividade medida.

4.8. Elisa

Para dosagem dos níveis de Fator de Necrose Tumoral (TNF) no sangue da paciente portadora de Adenocarcinoma Renal estágio IV foi utilizada a técnica de Elisa introduzida por AVRAMEAS e GUILBERT (1972), com modificações.

Uma amostra de sangue da paciente foi coletada e deixada à temperatura ambiente para formação do coágulo. Imediatamente após a coagulação (aproximadamente 20 minutos), o soro foi coletado, centrifugado a 400xg durante 10 minutos e estocado a -70°C para futura dosagem de TNF (Fator de Necrose Tumoral). A detecção e quantificação foi feita através de Kit Endogen TNF Elisa e realizada no Hospital do Câncer em São Paulo.

5. RESULTADOS

5.1. Purificação das Proteínas associadas ao Tecido Renal Normal e ao Adenocarcinoma Renal.

Os fragmentos provenientes da massa tumoral e do tecido renal normal da paciente A.R.J., foram manipulados de acordo com método descrito por TALLBERG (1974).

Essa técnica envolve uma série de quatorze passos, conforme mencionado em materiais e métodos, cujo resultado final é a agregação das proteínas associadas aos tumores, conseguida através da precipitação com Etilcloroformato (ECF) e que tem por objetivo a preparação de uma vacina, visando aumentar a resistência do hospedeiro. Os parâmetros empregados para a verificação desse aumento da resistência são o tempo prolongado de sobrevivência do paciente e a diminuição ou até desaparecimento das metástases pulmonares, frequentes nos indivíduos portadores de Adenocarcinoma Renal estágio IV. Apesar de a técnica ter sido descrita para o tecido tumoral, o fragmento de tecido renal normal recebeu o mesmo tratamento. No sentido de se manter as proteínas sob forma solúvel, para obtenção de melhores resultados nos testes empregados, a técnica foi utilizada apenas até o passo número sete, ou seja, imediatamente antes da precipitação com ECF. A manipulação do fragmento proveniente da massa tumoral resultou numa fração denominada Proteínas associadas ao Tecido Tumoral (PATT), de cor avermelhada, de aspecto límpido e com um conteúdo proteico de 4,3mg/ml. A manipulação do fragmento de tecido renal normal resultou uma fração denominada de Proteínas associadas ao Tecido Normal (PATN) que apresentava cor amarela clara, com aspecto límpido e conteúdo proteico de 0,45mg/ml.

Tabela 1. Resultado da dosagem proteica dos dois fragmentos, tumoral e normal, através de método descrito por LOWRY et alii, 1951, modificado.

	Fragmento Tumoral	Fragmento Normal
Volume total (ml)	67	45
Total de Proteínas (mg)	288,1	20,25
Proteínas mg/ml	4,3	0,45

5.2. Análise por Imunodifusão e Análise Imunoeletroforética.

5.2.1. Análise por Imunodifusão

Segundo metodologia descrita por DUCHTERLONY, 1949, a imunodifusão revelou a presença de anticorpos produzidos contra a fração PATT e contra a fração PATN (Fig.1).

Como era de interesse investigar os componentes reconhecidos pelo anti-soro produzido contra o tecido tumoral, foi realizada uma outra análise por imunodifusão, mas agora com a fração PATT absorvida com anti-soro produzido contra a fração PATN. Nesta absorção pretendia-se eliminar os componentes normais, também presentes na fração PATT, e obtermos, após centrifugação, um sobrenadante contendo apenas proteínas exclusivas do tecido tumoral. Entretanto, essa imunodifusão realizada com soro anti-tecido normal e o sobrenadante após a absorção revelou linhas de precipitação, ainda que bem fracas (Fig.2). Isso trouxe-nos a seguinte questão: Estariam os anticorpos produzidos contra a fração contendo Proteínas associadas ao Tecido Normal reconhecendo componentes normais que ainda estariam no sobrenadante após a absorção ou reconheceriam componentes da fração contendo Proteínas associadas ao Tecido Tumoral de maneira cruzada?

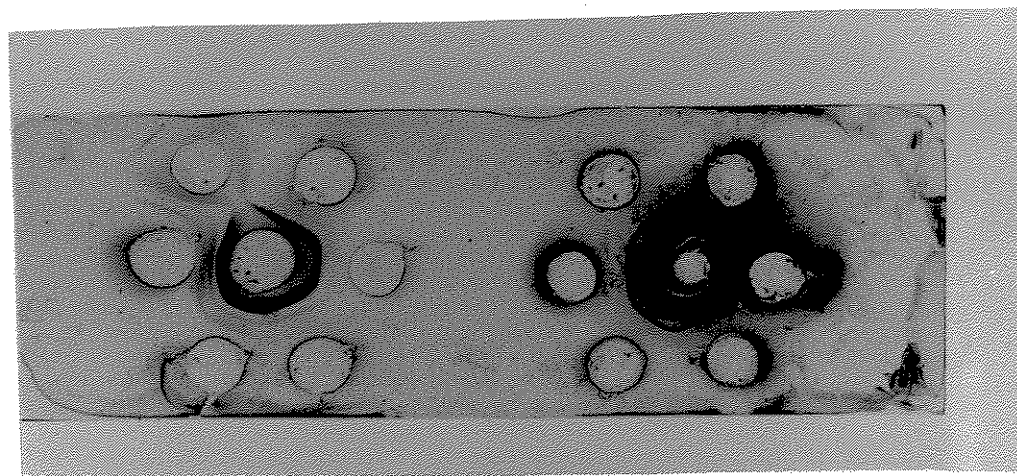
Para se resolver o problema foram preparadas duas lâminas com ágar à 1% e contendo apenas dois orifícios cada uma. Em uma das lâminas foi colocado anticorpos produzidos contra a fração PATN em um dos orifícios e no outro a fração contendo PATT. Na outra lâmina foram colocados os anticorpos produzidos contra a fração PATT em um dos orifícios e no outro a fração contendo PATN. Nas duas lâminas houve formação de linha de precipitação, indicando que os dois anti-soros reconhecem componen-

tes das duas frações, de maneira cruzada (Fig.3). No sentido de se explorar melhor os resultados obtidos na imunodifusão recorreu-se à análise imunoeletroforética.

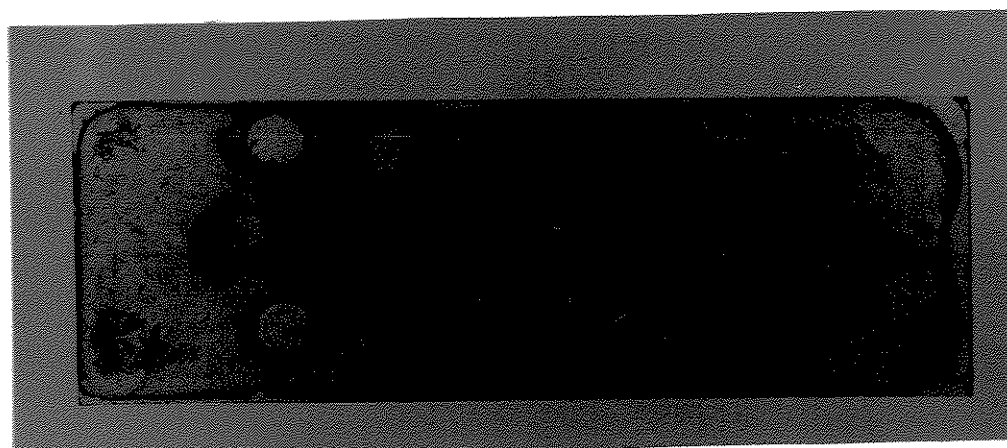
5.2.2. Análise Imunoeletroforética

Os resultados obtidos da análise imunoeletroforética das duas frações, PATT e PATN, frente a seus respectivos anti-soros e também frente a anti-soros aplicados cruzadamente, mostram a formação de quatro linhas de precipitação muito semelhantes entre si e próximas dos poços de aplicação, na região de migração das β globulinas. Isso sugere a identificação de um único componente expresso numa variedade grande de superfícies de células epiteliais, tanto tumorais como normais (Fig.4). Entretanto, a possibilidade de se tratar de moléculas antigênicas próprias do tumor e intimamente relacionadas com moléculas normais não pode ser descartada.

Para se verificar essa possibilidade foi realizada uma análise eletroforética em Gel de Poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-Page).



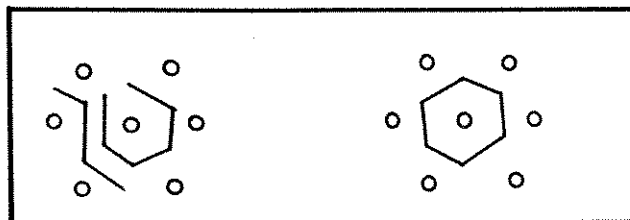
(A)



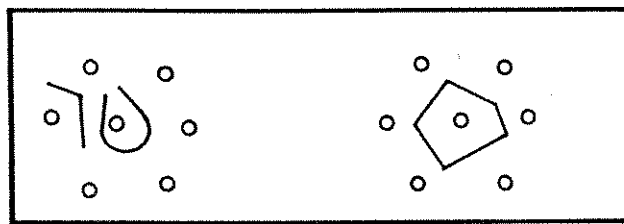
(B)

Fig.1.: Imunodifusão, realizada em agarose 1%, com: (A) Fração resultante da purificação do fragmento tumoral (PATT) nas concentrações de 200ug (esquerda) e 500 (direita), e anticorpos produzidos em coelhos, nas diluições de 1, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16; (B) Fração resultante da purificação do fragmento normal (PATN) nas concentrações de 200ug (esquerda) e 500 (direita), e anticorpos produzidos em coelhos, nas diluições de 1, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16. Coloração: "Coomassie Blue" à 0,5%.

Esquema obtido à partir de observação das lâminas.

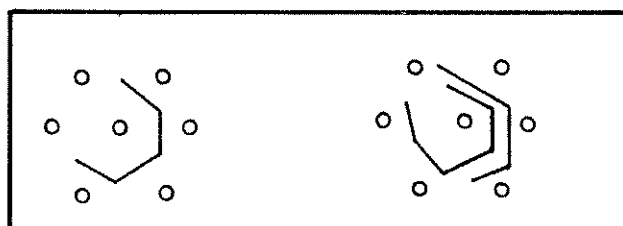


(A)

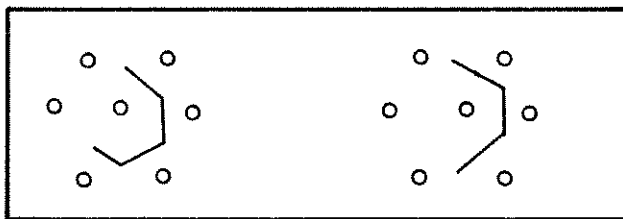


(B)

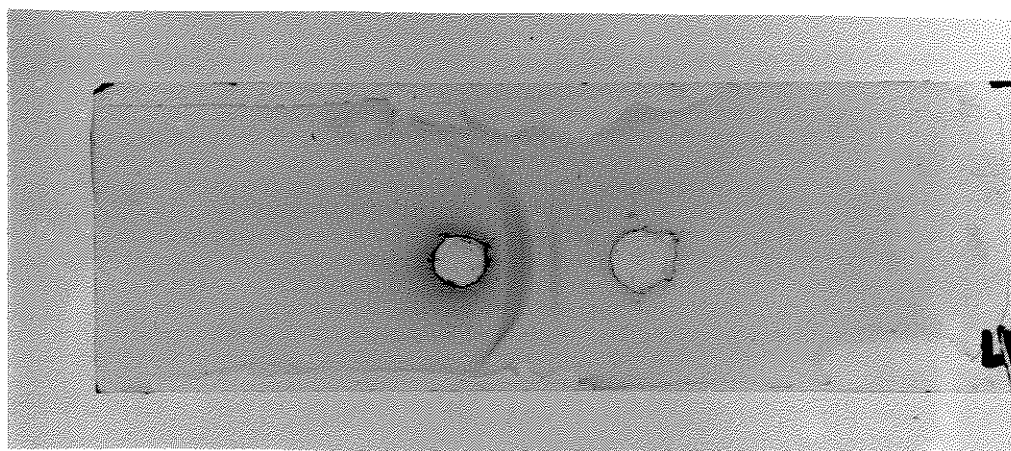
Esquema obtido à partir de observação das lâminas.



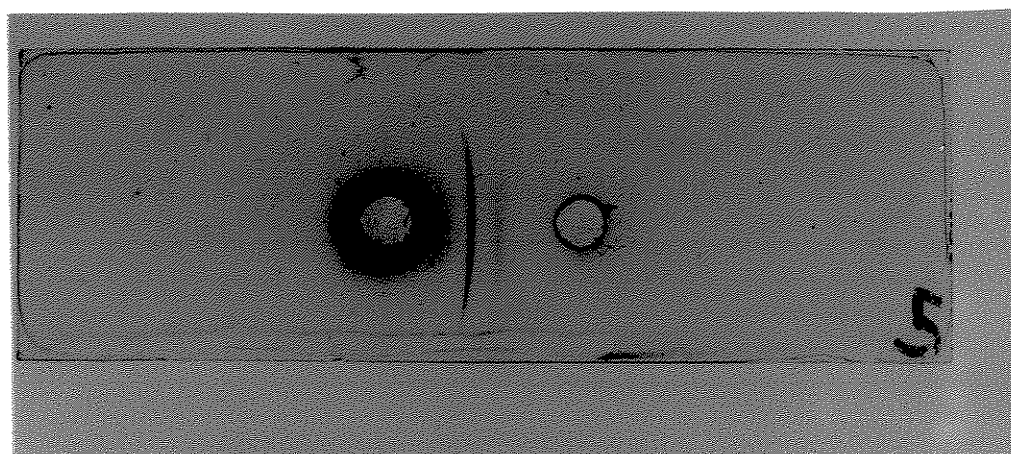
(A)



(B)



(A)

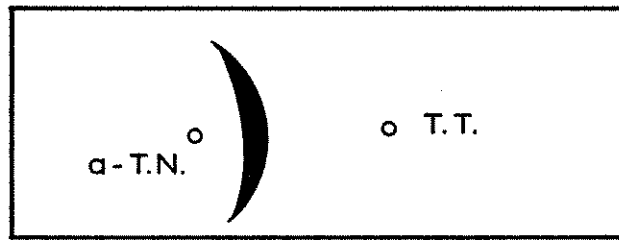


(B)

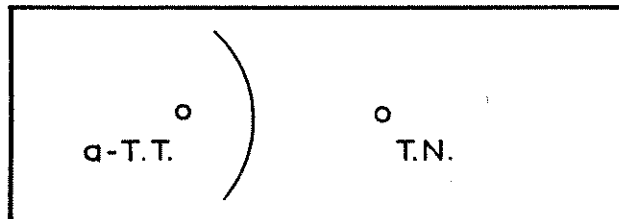
Fig.3.: (A) Imunodifusão, realizada em agarose à 1%, com anticorpos produzidos contra o Tecido Normal e antígenos de Tecido Tumoral; (B) Imunodifusão realizada em agarose à 1%, com anticorpos produzidos contra o tecido Tumoral e antígenos de Tecido Normal.

Coloração: "Coomassie Blue" à 0,5%.

Esquema obtido à partir de observação das lâminas.



(A)



(B)

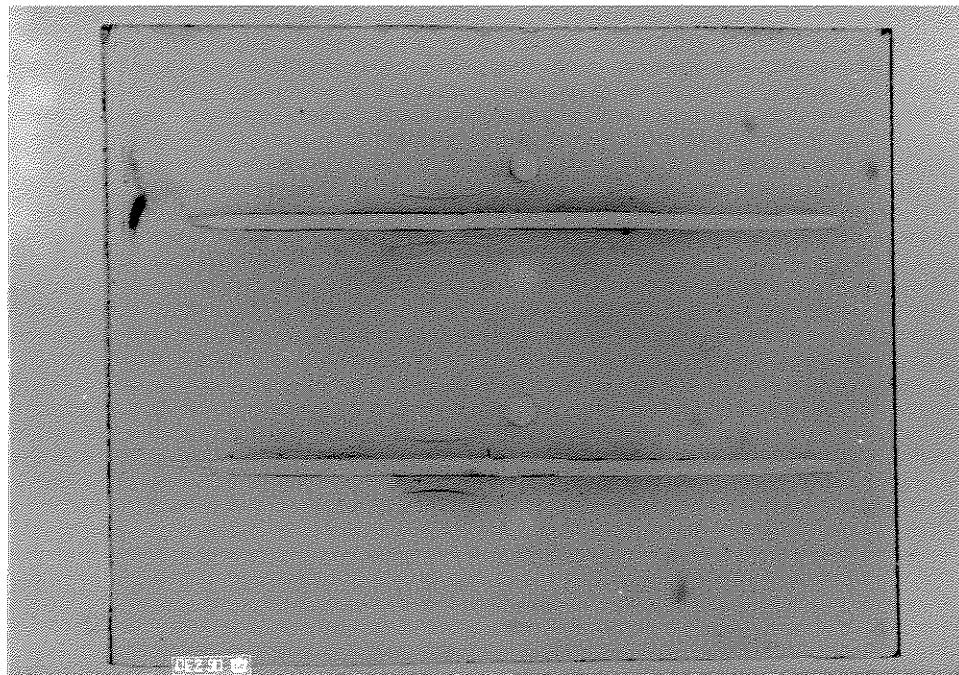
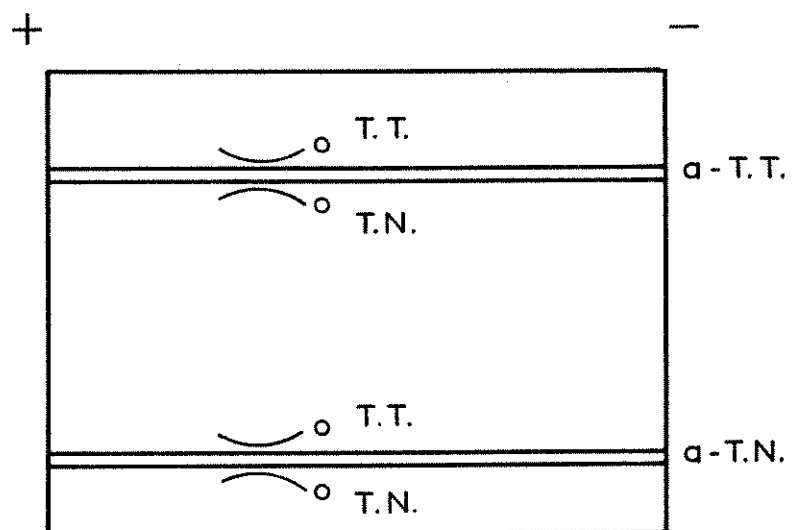


Fig.4.: Análise Imunoeletroforética realizada em agarose 1%.
Tampão de corrida: Tampão Barbital 0,025M, pH 8,6.
Coloração "Coomassie Blue" a 0,5%.
Canaleta superior: soro anti tecido tumoral (a-T.T.).
Canaleta inferior: soro anti tecido normal (a-T.N.).
Poços de aplicação: poços superiores: T.T.
poços inferiores: T.N.

Esquema obtido à partir de observação das lâminas.



5.3. Análise Eletroforética em Gel de Poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS).

A análise eletroforética em gel de poliacrilamida na presença de SDS realizada com o extrato bruto resultante da purificação dos fragmentos de tecido tumoral e de tecido normal, permitiu a detecção de muitas semelhanças entre os dois tecidos. Praticamente todos os componentes observados no tecido normal são também encontrados no tecido tumoral.

Apenas um componente, com peso molecular equivalente ao da amostra BSA, que está presente na fração PATT mostra-se praticamente ausente da fração PATN (Fig.5).

Por entendermos ser este o componente contra o qual os anticorpos foram produzidos, foi realizada uma gel filtração com a fração PATT, com o objetivo de se isolar esse antígeno para futuras análises estruturais e imunogênicas.

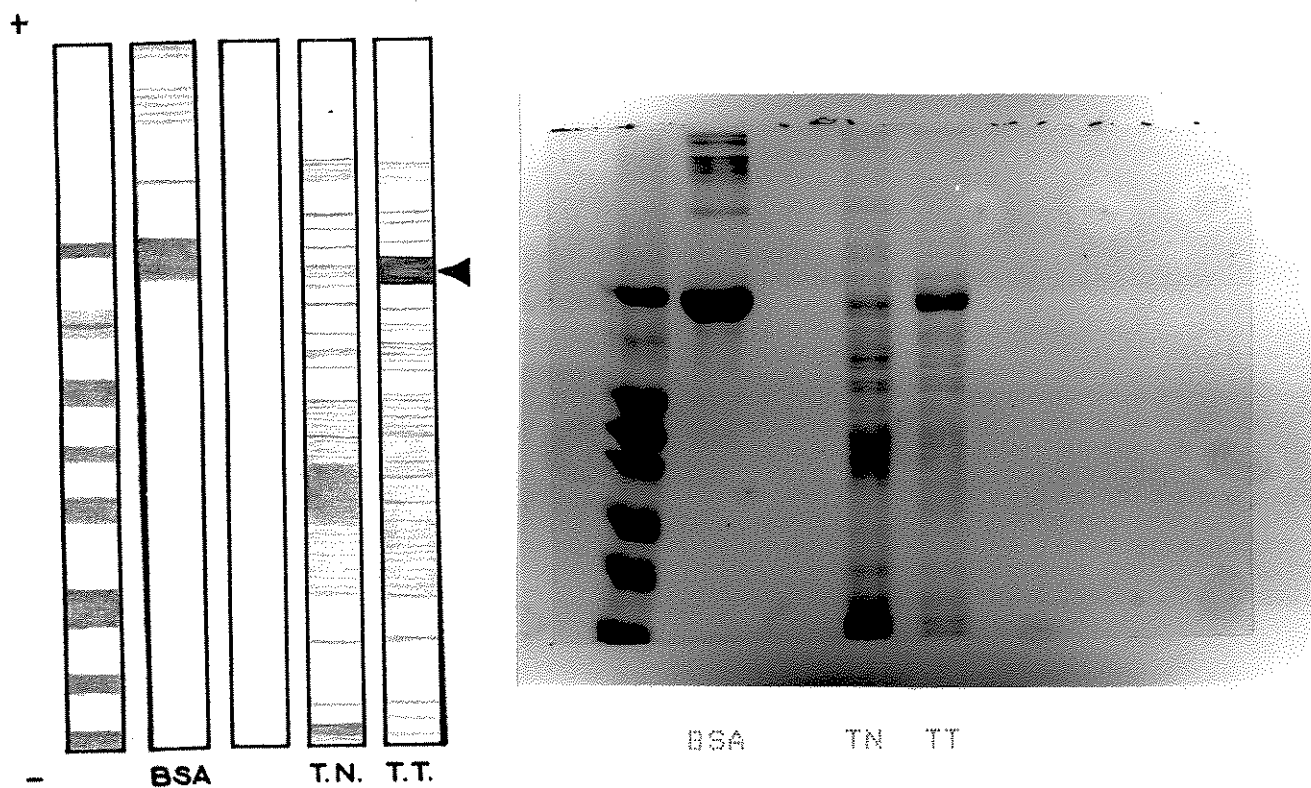


Fig.5.: Análise Eletroforética em Gel de Poliacrilamida na presença de SDS, realizada com o extrato bruto resultante da purificação dos fragmentos tumoral e normal.

Concentração do gel de separação: 10%.

Volume das amostras: 20ul.

Tampão de corrida: Tris (0,025M) - Glicina (0,192M) ,
pH:8,4.

Voltagem empregada: 100V.

Tempo de corrida: 1 hora e 30 minutos.

Coloração: "Coomassie Blue" à 0,5%.

Obs. : Esquema obtido à partir de observação da placa.

5.4. Fracionamento das Proteínas associadas ao Tecido Tumoral (PATT) em Sephadex G-100.

A fração resultante da purificação do fragmento tumoral, denominada de PATT, foi submetida à um processo de fracionamento em coluna de Sephadex G-100, conforme descrito em materiais e métodos.

Essa cromatografia revelou a presença de seis frações, denominadas de: F1, F2, F3, F4, F5 e F6, e foram estabelecidas com base nas leituras espectrofotométricas realizadas à 280 nm (Fig.6).

As frações F1 a F6 foram submetidas à uma análise eletroforética em gel de poliacrilamida na presença de SDS, revelando que a fração F2 possui a mesma mobilidade eletroforética do componente detectado no tecido tumoral e ausente no tecido normal (Fig.7).

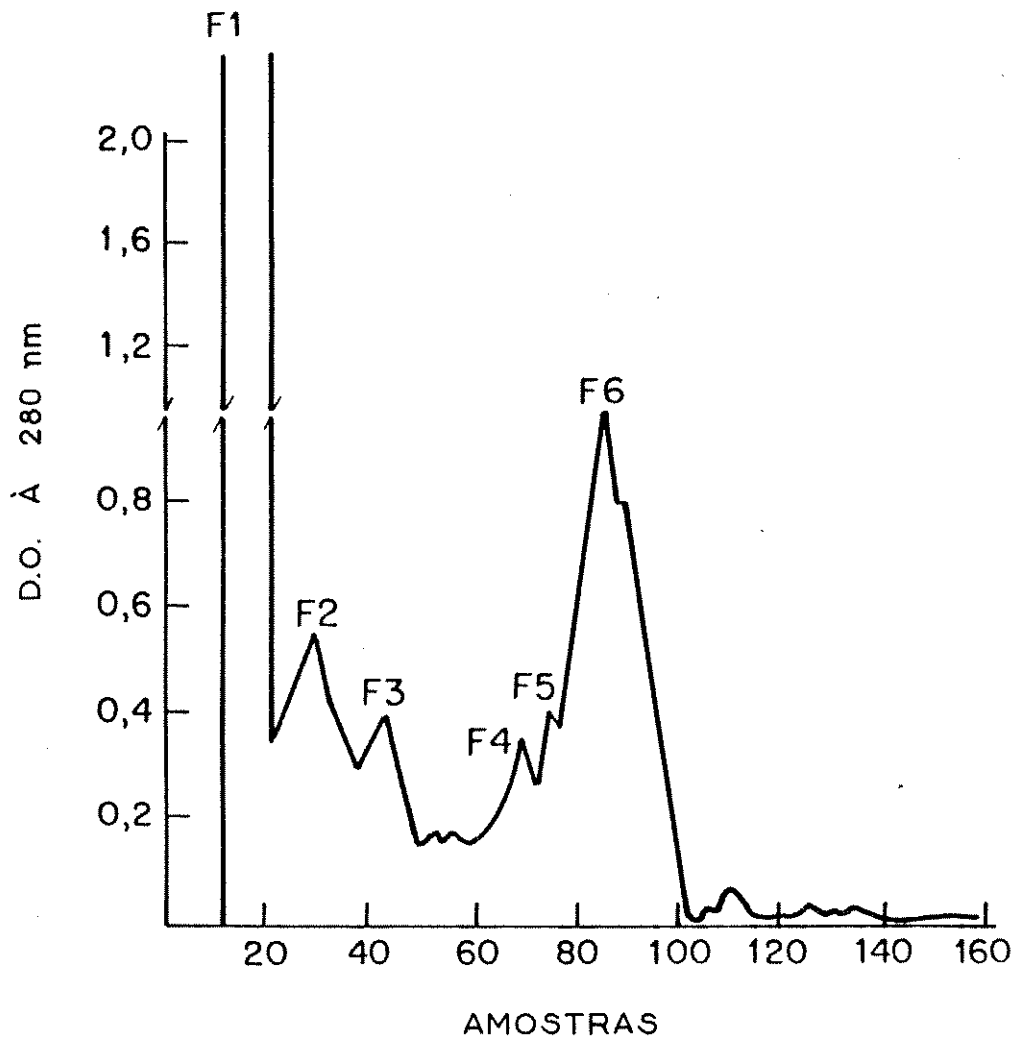


Fig.6.: Cromatografia em Sephadex G-100, da fração resultante da purificação do fragmento tumoral (PATT).

Volume da amostra aplicada: 5ml (72,5mg de proteínas).

Dimensões da coluna: 100cm x 2,5cm.

Tampão de eluição: PBS azida 0,2%.

Velocidade do fluxo: 36ml/h. Amostras coletadas: 2ml/tubo.

Tempo requerido: 19 horas.

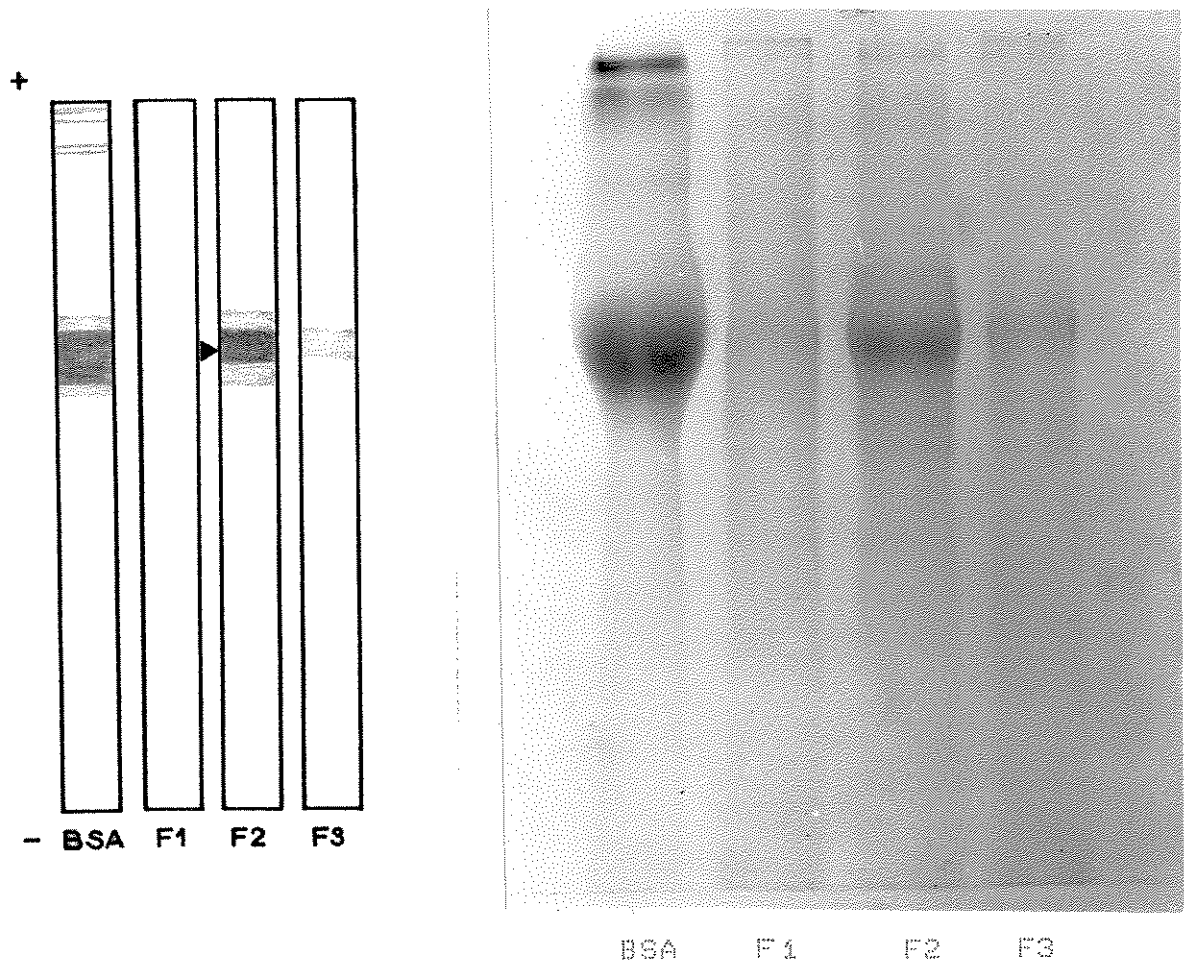


Fig.7.: Análise eletroforética em gel de poliacrilamida, na presença de SDS, realizada com as frações: F1, F2, F3, resultantes da cromatografia em Sephadex G-100.
 Concentração do gel de separação: 10%.
 Volume das amostras aplicadas: 20ul.
 Tampão de corrida: Tris (0,025M) - Glicina (0,192M) , pH:8,4.
 Voltagem empregada: 100V.
 Tempo de corrida: 1 hora e 10 minutos.
 Coloração: "Coomassie Blue" à 0,5%.

Obs. : Esquema obtido à partir de observação da placa.

5.5. Linfoproliferação frente à Antígeno Tumoral e Mitógeno.

Os resultados das culturas de células mononucleadas do paciente portador de Adenocarcinoma Renal estágio IV e de indivíduo normal, frente à antígeno tumoral e frente à fito-hemaglutinina (PHA), são mostrados nas tabelas II e III.

A análise dos resultados obtidos na tabela II mostram que a estimulação das células T do paciente foi, em média, cinco vezes maior do que a estimulação conseguida com células de indivíduo normal. A estimulação das células T do paciente mostrou-se também, em média, seis vezes maior que o resultado obtido nas culturas controle, enquanto que a estimulação das células de indivíduo normal estava apenas uma vez e meia aumentada quando comparada ao seu respectivo controle.

Em relação à estimulação com mitógeno (PHA) também se observa que os resultados das culturas de células do paciente está uma vez e meia aumentada em relação à estimulação das células de indivíduo normal com o mesmo mitógeno.

Esses resultados sugerem a presença de linfócitos do paciente, especificamente sensibilizados com antígenos extraídos de seu próprio tumor.

Células	Ag. pg/ml	³ HT/Incorporada (cpm x 10 ⁻³)
P	100	5.268,3 +- 345,41
	50	6.615 +- 2.474
	10	3.906,66 +- 1.058,02
	5	2.553,33 +- 312,10
N	100	688,3 +- 598
	50	848,3 +- 668,2
	10	770 +- 349,3
	5	703,33 +- 697,5

Tabela II: Resultados obtidos das culturas de células de paciente portadora de Adenocarcinoma Renal estágio IV (P) e de indivíduo normal (N), frente à antígeno extraído de massa tumoral da própria paciente em diversas concentrações.

Controles: paciente = 738,33 +- 16,07

normal = 747,50 +- 491,43

Células	PHA	³ HT/Incorporada (cpm x 10 ⁻³)
P	1/4	18301,66 +- 1299,04
	1/8	20368,33 +- 1654,76
N	1/4	10298,33 +- 4031,35
	1/8	13930 +- 5170,28

Tabela III: Resultados obtidos das culturas de células mononucleadas de paciente portadora de Adenocarcinoma Renal estágio IV (P) e de indivíduo normal (N), frente à fito-hemaglutinina (PHA) nas diluições de 1:4 e 1:8.

5.6. Dosagem de TNF (Fator de Necrose Tumoral).

Duas amostras de sangue do paciente portador de Adenocarcinoma Renal estágio IV foram coletadas nos dias 28/02/89 e 12/09/89, e o TNF presente no soro quantificado.

Os resultados são mostrados na tabela IV.

Os valores obtidos com a dosagem de TNF se mostram muito aumentados em relação aos valores de TNF em indivíduos normais que fica em torno de 100 pg/ml.

A análise desses resultados também mostra uma queda dos valores de TNF no soro do paciente, seis meses após o início da imunoterapia ativa específica.

Data	pg/ml
28/02/89	965,45
12/09/89	656,90

Tabela IV: Resultados obtidos da dosagem de TNF no soro do paciente portador de Adenocarcinoma Renal estágio IV, através do método Elisa.

6. Discussão.

A procura de antígenos associados aos tumores humanos contra os quais o hospedeiro produz uma resposta imune tem sido alvo de muitas investigações. Algumas evidências podem ser concluídas de observações e estudos realizados "IN VIVO". Primeiro, o uso de imunoterapia ativa, em tratamento de cancer, tem como premissa básica a suposição de que os tumores humanos são imunogênicos e que o hospedeiro é capaz de reagir de modo imunologicamente específico contra seu próprio tumor. Infelizmente, apesar de uma vasta experimentação clínica, tais tentativas de imunoterapia demonstraram pouco sucesso. Geralmente, as tentativas de imunoterapia têm sido mal controladas ou com resultados sem ênfase (CZAJKOWSKI et alii, 1968; NADLER and MODRE, 1970; GRANT et alii, 1974; McILLMURRAY et alii, 1977).

Uma outra abordagem, "IN VIVO", eticamente duvidosa, tem envolvido o auto-transplante de células tumorais viáveis em pacientes (SOUTHERN et alii, 1962). Entretanto, POWLES et alii (1971), observaram que a inoculação de células blásticas autólogas irradiadas em pacientes com leucemia aguda, produz um aumento transitório da resposta linfoproliferativa contra células tumorais "IN VITRO". Além disso, respostas imunes de pacientes à extratos autólogos através de testes de hipersensibilidade foram relatadas (HUGHES and LYTTON, 1964; STEWART and ORIGAZA, 1971).

Embora todos esses estudos tenham produzido algumas evidências sugestivas a favor de reações imunológicas mediadas por células contra antígenos tumorais, a sua confirmação necessita provas conclusivas.

O tratamento do cancer do trato genito-urinário com proteínas polimerizadas do tumor (PTP), particularmente o adenocarcinoma renal, tem sido descrito por TALLBERG et alii, 1974; TYKKA et alii, 1978; NEIDHART et alii, 1980; TYKKA et alii, 1981.

No presente trabalho proteínas, polimerizadas com ECF (TALLBERG, 1974; MORI et alii, 1989), associadas ao carcinoma renal humano ou tecido renal normal foram avaliadas quanto a sua antigenicidade. Um componente de PTP ausente no tecido normal foi separado por cromatografia em Sephadex G-100 e testado em Eletroforese em gel de poliacrilamida. Este antígeno demonstrou ação linfoproliferativa aumentada "IN VITRO" em culturas de células mononucleadas do paciente comparadas com células de indivíduos normais.

Recentemente, MORI et alii, 1989, publicaram um trabalho demonstrando a viabilidade de polimerizar proteínas associadas aos tumores murinos da bexiga. Resultados do trabalho de MORI estão de acordo com resultados obtidos por nós no presente trabalho.

Pode-se verificar que a imunodifusão em gel de ágar do antígeno, sem purificação, frente a anti-soros absorvidos não foi suficiente para revelar diferenças antigênicas entre tecido tumoral e tecido normal (Fig. 1,2,3).

Do mesmo modo a análise eletroforética em gel de ágar, de PATT e PATN, mostrou um componente cuja migração eletroforética corresponde à região de IgM (Fig.4) e diferenças antigênicas entre o tecido normal e o tecido tumoral não puderam ser reveladas.

Uma análise química e imunoquímica sistemática revela que alguns tumores acumulam glicolipídeos que estão ausentes ou presentes em apenas pequenas quantidades no tecido normal. Gg3

em linfomas de camundongos (ROSENFELDER et alii, 1977), antígeno do grupo sanguíneo A em indivíduos cancerosos dos grupos O e B (BREIMER, 1980; HATTORI et alii, 1981; YOKOTA et alii, 1981) e antígenos de Forssman em indivíduos Forssman negativos (YODA et alii, 1980) são alguns exemplos. Nossos resultados, através de eletroforese em gel de poliacrilamida das frações PATT e PATN, revelaram a presença de um antígeno no tecido tumoral praticamente ausente no tecido normal (Fig. 5) e que apresenta um peso molecular equivalente ao da BSA. Resultados semelhantes foram encontrados por KAMIYAMA et alii, 1980, quando do estudo de um adenocarcinoma mamário. Os autores isolaram, de uma única amostra de massa tumoral, um antígeno com peso molecular estimado em 67.000 e que estava ausente no tecido mamário normal.

A cromatografia do material semi-purificado do carcinoma renal (PATT) em Sephadex G-100 (Fig. 6) resultou em seis frações que foram analisadas novamente com eletroforese em gel de poliacrilamida. O resultado desta análise revelou que a fração F2 representa o antígeno tumoral, praticamente ausente no tecido normal.

A imunogenicidade de F2 foi verificada em testes de linfoproliferação "IN VITRO". Culturas de células mononucleadas do paciente doador do tumor primário e de indivíduos normais foram preparadas e submetidas à ação de F2 e fito-hemaglutinina (Tabelas 2 e 3). A linfoproliferação das células do paciente com F2 foi cinco vezes maior do que em células de indivíduo normal, o que sugere uma imunossensibilização das células do paciente com o mesmo antígeno tumoral conseguido no presente trabalho. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por VÁNKY et alii, 1971; MAVLIGIT et alii, 1973; VÁNKY et alii, 1974.

Evidências consideráveis sugerem que monócitos e macrófagos têm um papel importante na defesa do hospedeiro contra o crescimento tumoral (ADAMS et alii, 1979; NATHAN et alii, 1980; MADE et alii, 1980). A produção e liberação de TNF (Fator

de Necrose Tumoral) é um dos mecanismos efetores citolíticos através do qual os monócitos e macrófagos ativados destroem certas células neoplásicas "IN VITRO" (URBAN et alii, 1986; SUGARMAN et alii, 1985). Entretanto, não está claro se estas células respondem diretamente às células tumorais e como elas distinguem células normais e células neoplásicas.

Após a rotina de imunoterapia aplicada no paciente doador do tumor primário com a vacina, da qual F2 foi purificada, a dosagem de TNF (Fator de Necrose Tumoral) foi realizada no soro do paciente e comparada pelo seu valor antes da imunoterapia (Tabela 4). Pode-se verificar uma queda de cerca de 47% no valor de TNF no soro do paciente durante um intervalo de seis meses de imunoterapia e que o valor de TNF no paciente é geralmente mais elevado, em torno de seis a nove vezes, do que em indivíduos normais. Recentes estudos de BASKWILL et alii, 1987 e NARA et alii, 1987, também demonstram elevados níveis de TNF no soro de pacientes com cancer. Porém, como algumas linhagens de células tumorais produzem TNF (KRONKE et alii, 1988), esses estudos não puderam distinguir se o aumento do fator no soro era causado pela liberação por monócitos/macrófagos ativados ou por células tumorais.

Os resultados obtidos no presente trabalho são coerentes com os dados encontrados na literatura e mostram que a vacina apresenta imunogenicidade.

O estado clínico do paciente em tratamento há dois anos com esta vacina, talvez seja a observação mais importante neste estudo. O carcinoma renal é um tumor imprevisível podendo crescer lenta ou rapidamente e as regressões espontâneas raramente ocorrem. A sobrevida do paciente, após cirurgia, é pequena mesmo recebendo tratamento agressivo como quimioterápicos contra as metástases. Entretanto, após cirurgia para ressecção da massa tumoral e início imediato da imunoterapia com a vacina preparada à partir de seu tumor o paciente apresentou ganho de peso e ca-

pacidade funcional normal mantidos durante todo o período de tratamento. A regressão de metástases pulmonares, que são frequentes nesse tipo de carcinoma, também foram observadas.

Portanto, ao nosso ver, o sucesso clínico, obtido em relação ao paciente, representa os efeitos terapêuticos da vacina preparada com antígenos associados ao tumor, muito embora um estudo maior e mais abrangente seja necessário para provar este ponto.

7. Conclusões

Ainda não está bem estabelecido o papel dos antígenos associados aos tumores no processo imune que ocorre durante crescimento e regressão de uma neoplasia. É claro, entretanto, que antígenos associados ao tumor têm um papel importante e a obtenção destes antígenos numa forma homogênea permite uma caracterização biológica e química intensa, além de providenciar uma ferramenta para obtenção de informações para o diagnóstico e tratamento da doença. O desenvolvimento de uma vacina, à partir de massa tumoral, aplicada em pacientes portadores de Adenocarcinoma Renal estágio IV, levou-nos ao isolamento de um antígeno associado à esse tumor e através dos resultados obtidos podemos concluir que:

1. O extrato do tecido tumoral apresenta um componente ausente no tecido normal.
2. A vacina preparada com o extrato do tecido tumoral apresenta imunogenicidade, comprovada em teste de linfoproliferação.
3. Os valores de TNF no soro do paciente apresentam uma queda após seis meses de imunoterapia ativa específica.

Deve ser lembrado que a imunoterapia com a vacina resulta em aumento da sobrevida dos pacientes e a diminuição ou mesmo desaparecimento das metástases pulmonares que acompanham o Adenocarcinoma Renal estágio IV. No presente trabalho fica claro, após atual análise imunológica da vacina, que tal resultado desta imunoterapia pode ser atribuído à imunogenicidade de F2 que faz parte da vacina e a subsequente ativação do sistema imunológico do paciente com este antígeno.

8. Resumo

À partir de massa tumoral, obtida através de remoção cirúrgica, de um Adenocarcinoma Renal estágio IV obteve-se vários fragmentos que foram submetidos à um processo de extração e polimerização de proteínas associadas à membrana. Esse extrato foi denominado de PATT.

Uma amostra de tecido renal normal também foi submetido à este processo, recebendo a denominação de PATN.

Para efeito de análise comparativa as duas frações, PATT e PATN, foram submetidas:

1. À análise imunológica, através de imunodifusão dupla e imunoeletroforese.
2. À análise eletroforética em gel de poliacrilamida, na presença de SDS.
3. À uma gel filtração em Sephadex G-100.

Através da análise por imunodifusão e imunoeletroforese não foi possível detectar diferenças entre as frações PATT e PATN. Entretanto, a análise eletroforética em gel de poliacrilamida na presença de SDS demonstrou a existência de um componente na fração PATT praticamente ausente na fração PATN.

A gel filtração em Sephadex G-100 da fração PATT resultou na eluição de seis frações denominadas de F1 a F6. Uma

segunda análise eletroforética em gel de poliacrilamida, na presença de SDS, revelou ser a fração F2 a que continha o componente ausente em PATN.

A extração e polimerização de antígenos associados aos tumores têm por objetivo o preparo de uma vacina que é aplicada no próprio paciente doador do tumor. Esse tipo de terapia conhecido como imunoterapia ativa específica, visa a regressão de metástases pulmonares que são frequentes em indivíduos portadores de Adenocarcinoma Renal estágio IV. A imunidade mediada por células de um indivíduo submetido à esse tratamento foi testada através de ensaio de linfoproliferação. Células mononucleadas de sangue periférico de paciente portador de adenocarcinoma renal estágio IV e de indivíduo normal, foram cultivadas em meio com a fração F2 e com fito-hemaglutinina. A análise desses resultados mostra que a linfoproliferação das células do paciente foi cinco vezes maior do que a linfoproliferação em indivíduo normal, sugerindo uma sensibilização específica das células do paciente com o antígeno (F2) extraído de seu tumor no presente trabalho.

Os níveis de TNF (Fator de Necrose Tumoral) desse mesmo paciente foram testados através de ELISA. Os valores encontrados antes do início da imunoterapia eram de seis à nove vezes maiores que os valores encontrados em indivíduo normal. Após seis meses do início do tratamento com a vacina, os valores de TNF no soro do paciente caíram cerca de 47%.

7. Referências Bibliográficas.

ABELEV, G.I.. "Alpha-fetoprotein in Oncogenesis and Association with Malignant Tumors". Adv. Ca. Res. 14:295. 1971.

ADAMS, D.O. and SNYDERMAN, R.. "Do macrophages destroy nascent tumors". JNCI. 62:1341. 1979.

ANDREWS, P. W.; GOODFELLOW, P.N.; SHEVINSKY, L.H.; BRONSON, D.L.; AND KNOWLES, B.B.. "Cell surface antigens of a clonal human embryonal carcinoma cell line: Morphological and antigenic differentiation in culture". Int. J. Ca. 29:523. 1982.

ASHALL, F.; BRAMWELL, M.E.; AND HARRIS, H.. "A new marker for Human Cancer Cell. The Ca antigen and the Ca1 antibody". Lancet. 3:1. 1982.

AVRAMEAS, S. AND TERNYNCK, T.. "Biologically active water-insoluble protein polymers. I. Their use for isolation of antigens and antibodies". J. Biol. Chem. 242:1651. 1967.

AVRAMEAS, S. AND GUILBERT, B.. "Enzyme-immunoassay for the measurement of antigens using peroxidase conjugates". Biochim. 54:837. 1972.

BALKWILL, F.; BURKE, F.; TALBOT, D.; TAVERNIER, J.; OSBORNE, R.; NAYLOR, S.; DURBIN, H. and FIERIS, W.. "Evidence for tumor necrosis factor/cachetin production in cancer". Lancet. 2:1229. 1987.

BARTLETT, G.L.; AND ZBAR, B.. "Tumor-specific vaccine containing Mycobacterium bovis and tumor cells: safety and efficacy". J. Natl. Ca. Inst. 49:1709. 1972.

- BAST, R.C.; FEENEY, M.; LAZARUS, H.; NADLER, L.M.; CALVIN, R.B.; AND KNAPP, R.C.. "Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma". J. Clin. Invest. 68:1331. 1981.
- BAST, R.C.JR.; KLUG, T.L.; ST. JOHN; AND ALII.. "A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer". N. Engl. Med. 309:883. 1983.
- BEKESI, J.G.; ST-ARNEAULT, G.; AND HOLLAND, J.F.. "Increase of leukemia L 1210 immunogenicity by *Vibrio cholerae* neuraminidase treatment". Ca. Res. 31:2130. 1971.
- BRAUTBAR, C.; PELLEGRINO, N.A.; FERRONE, S.; REISFELD, R.A.; PAYNA, R.; AND HAYFLICK, L.. "Fate of HL-A Antigens in again cultured human diploid cell strain. II. Quantitative absorption studies". Exp. Cell. Res. 78:367. 1973.
- BREIMER, M.E.. "Adaptation of mass spectrometry for the analysis of tumor antigens as applied to blood group glycolipids of a human gastric carcinoma". Cancer Res. 40:897. 1980.
- BUBENICK, J.; INDROVA, M.; NEMECKOVA, S.; MALKOVSKY, M.; VON BROEN, B.; PALEK, V.; AND ANDERLIKOVA, J.. "Solubilized Tumor-associated antigens of Methylcholanthrene induced mouse sarcomas. Comparative studies by "IN VITRO" sensitization of Lymphnode cells, macrophage eletrophoretic mobility assay and transplantation tests". Int. J. Ca. 21:348. 1978.
- CHANG, K.S.S.; LAW, L.W.; APELLA, E.. "Distinction between tumor-specific transplantation antigen and virion antigens in solubilized products from membranes of virus-induced leukemic cells". Int. J. Ca. 15:483. 1975.

CHANG, C.; PANCAKE, S.J.; LUBORSKY, W.; MORA, P.T.. "Detergent solubilization and partial purification of tumor specific surface and transplantation antigens from SV-40 virus-transformed mouse cells". *Int. J. Ca.* 19:258. 1977.

CHU, T.M.; HOLYOKE, E.D.; AND DOUGLAS, H.O.. "Isolation of a Glycoprotein antigen from ascites fluid of Pancreatic Carcinoma". *Ca. Res.* 37:1525. 1977.

CORNAIN, S.; DEVRIES, J.E.; COLLARD, J.; VENEGOODR, C.; VAN WINGERDEN, I.; AND RUMKE, P.H.. "Antibodies and antigen expression in human Melanoma detected by the immune adherence test". *Int. J. Ca.* 14:981. 1975.

CZAJKOWSKI, N.P.; ROSENBLAT, M.; WOLF, P.L.; VASQUEZ, J.. "A new method of active immunization to autologous human tissue". *Lancet.* 2:905. 1968.

DAWOOD, F.; EMBLETON, M.R.; PRICE, M.R.; PIMM, M.V.; BYERS, V.S. AND BALDWIN, R.W.. "Differentiation between monoclonal antibody-defined antigens on a human osteogenic sarcoma cell line (791 T) and tumor-localizing properties of the anti-791T/36 antibody". *Braz. J. Med. Biol. Res.* 19:257. 1986.

DEVRIES, J. E.; CORNAIN, S.; RUMKE, P.H.. "Cytotoxicity of non-T versus T-lymphocyte from Melanoma patients and healthy donors on short and long term cultured Melanoma cells". *Int. J. Ca.* 14:427. 1974.

EHRlich, P.. "The collected papers of Paul Ehrlich". 2:550. London: Pergamon, 1957. In: Brodt, P. *Tumor Immunology. Three Decades in Review.* *Ann. Rev. Microbiol.* 37:447. 1983.

FERRONE, S.; COOPER, N.R.; PELLEGRINO, N.A.; REISFELD, R.A.. "Interaction of histocompatibility (HL-A) antibodies and complement with synchronized human lymphoid cells in continuous culture". J. Exp. Med. 137:55. 1973.

FOLEY, E.J.. "Antigenic properties of methylcolanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin". Ca. Res. 13:835. 1953.

FOSSATI, G.; COLNAGHI, N.I.; DELLA PORTA, G.; CASCNELLI, N.; VERONESI, V.. "Cellular and humoral immunity against human malignant Melanoma". Int. J. Ca. 8:344. 1971.

GARRET, C.T.. "Oncogenes". Clin. Chim. Acta. 156(1):1. 1986.

GARVEY, J.S.; CREMER, N.E.; AND SUSSDORF, D.H.. "Dissociation from insoluble antigen adsorbents (affinity chromatography). In Methods in Immunology. 3rd. Ed. Massachusetts, W.A. Benjamin, Inc. Part 4, cap. 30:245. 1977.

GARVEY, J.S.; CREMER, N.E.; AND SUSSDORF, D.H.. "Gel Electrophoresis". In Methods in Immunology. 3rd. Ed. Massachusetts, W.A. Benjamin, Inc. Part 5, cap. 37:328. 1977.

GOLDSTEIN, S.; SINGAL, D.P.. "Loss of reactivity of HL-A antigens in clonal populations of cultured human fibroblasts during aging "IN VITRO"". Exp. Cell. Res. 75:278. 1972.

GOREBICK, E.. "Concomitant tumor immunity and the resistance to a second tumor challenge". Adv. Ca. Res. 39:71. 1983.

GRANT, J.P.; BIGNER, D.D.; FISCHINGER, P.J.; BOLOGNESI, D.P.. "Expression of murine leukemia virus structural antigens on the surface of chemically induced murine sarcomas". Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.). 71:5037. 1974.

HAGLUND, C.; ROBERTS, P.J.; SCHEININ, T.M.; MAKELA, O.; JALANKO, H.. "Evaluation of Ca 19-9 as a serum tumor marker in pancreatic cancer". *Brit. J. Ca.* 53:197. 1986(b).

HAIMOTO, H.; TAKASHI, M.; KOSHIKAWA, T.; ASAI, J.; AND KATO, K.. "Enolase isozymes in renal tubules and renal cell carcinoma". *Amer. J. Path.* 124:488. 1986.

HATTORI, H.; UEMURA, K.; TAKETOMI, T.. "Glycolipids of gastric cancer. The presence of blood group A-active glycolipids in cancer tissues from blood group O patients". *Bioch. Biophys. Acta.* 666:361. 1981.

HELLSTROM, I.; HELLSTROM, K.E.; SJOGREN, H.O.; WARNER, G.A.. "Demonstration of cell-mediated immunity to human neoplasms of various histological types". *Int. J. Ca.* 7:1. 1971.

HERLYN, M.; CLARK, W.H.; MASTANGELO, M.J.; GUERRY, D.J.V.; ELDER, D.E.; LA ROSE, D.; HAMILTON, R.; BONDI, E.; TUTHILL, R.; AND STEPLEWSKI, Z.. "Specific immunoreactivity of monoclonal anti-Melanoma antibodies". *Ca Res.* 40:3602. 1980.

HOCKEY, M.S.; STOKES, H.J.; THOMPSON, H.; AND ALII. "Carcinoembryonic antigen (CEA) expression and heterogeneity in primary and autologous metastatic gastric tumours demonstred by monoclonal antibodies". *Br. J. Ca.* 49:129. 1984.

HOLLINSHEAD, A.C.; HERBEMAN, R.B.; JAFFURS, W.J.; ALPERT, L.K.; MILTON, J.P.; AND HARRIS, J.E.. "Soluble membrane antigens of human malignant Melanoma cells". *Cancer.* 34:1235. 1974.

HOLLINSHEAD, A.; ELIAS, G.E.; ARLEN, M.; BUDA, B.; MOSLEY, M.; AND SCHERRER, J.. "Specific active immuniterapy in patients with Adenocarcinoma of the colon utilizing tumor-associated antigens (TAA)". *Cancer.* 56:480. 1985.

HOLMES, E.C.; KAHAN, B.D.; MORTON, D.L.. "Soluble tumor-specific transplantation antigens from Methylcholanthrene-induced guinea pig sarcomas". *Cancer*. 25:373. 1970.

HOLMGREN, J.; LINDHOLM, L.; PERSSON, B.; LAGERGARD, T.; NILSSON, O.; SVENNERHOLM, L.; RUDSTOM, C.M.; UNSGAARD, B.; YNGVASON, F.; PETTERSON, S.; KILLANDER, A.F.. "Detection by monoclonal antibody of carbohydrate antigen Ca 50 in serum of patients with carcinoma". *Brit. Med. J.* 288:1479. 1984.

HUDSON, L.; HAY, F.C.. "Fractionation of serum on G-200 Sephadex". In *Practical Immunology*. 162. 1980.

HUGHES, L.E.; LYTTON, B.. "Antigenic properties of human tumours: Delayed cutaneous hypersensitivity reactions". *Brit. Med. J.* 1:209. 1964.

INABA, S.; PELLIS, N.R.; KAHAN, B.D.. "The effect of immunotherapy with extracted tumor antigen on sinecomitant immunity". *Cancer*. 52:64. 1983.

JUANG, R.H.; CHANG, Y.D.; SUNG, H.Y.; AND SU, J.C.. "Oven-drying method for Polyacrylamide Gel slab packed in cellophane sandwich". *Analytical Bioch.* 141(2):348. 1984.

KAHAN, B.D.; TANAKA, T.; PELLIS, N.R.. "Immunotherapy of a carcinogen-induced murine sarcoma with soluble tumor-specific transplantation antigens". *J. Natl. Ca. Inst.* 65:1001. 1980.

KAMIYAMA, M.; HASHIM, G.A.; KYRIAKIDIS, G.; FITZPARRICK, H.F.. "A tumor-associated antigen isolated from human breast adenocarcinoma". *Clin. Immunol. Immunother.* 16:151. 1980.

KERBEL, R.S.; BLAKSLEE, D.. "Rapid adsorption of a foetal calf serum component by mammalian cells in culture". *Immunology*. 31:881. 1974.

KOHLER, G.; AND MILSTEIN, C.. "Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity". *Nature*. 256:495. 1975.

KOPROWSKI, H.; HERLYN, M.; STEPLEWSKI, Z.; AND SEARS, H.F.. "Specific antigen in serum of patients with colon carcinoma". *Science*. 212:53. 1981.

KRONKE, M.; HENSEL, G.; SCHLUTER, C.; SCHEURICH, P.; SCHUTZE, S.; PFIZENMAIER, K.. "Tumor necrosis factor and lymphotoxin gene expression in human tumor cell lines". *Cancer Res*. 48:5417. 1988.

KUUSELA, P.; JALANKO, H.; ROBERTS, P.; SIPPONEN, P.; MECKLIN, J.P.; PITKANEN, R.; AND MAKELA, O.. "Comparison of Ca 19-9 and carcinoembryonic antigen (CEA) levels in the serum of patients with colorectal diseases". *Brit. J. Ca.* 49:135. 1984.

LAEMMLI, U.K.. "Determination of protein molecular weight in Polyacrylamide Gels". *Nature*. 277:680. 1977.

LEGRUE, S.; ALLISON, J.P.; MACEK, C.M.; PELLIS, N.R.; AND KAHAN, B.. "Immunobiological properties of 1-Butanol-extracted cell surface antigen". *Ca. Res*. 41:3956. 1981.

LOWRY, D.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; AND RANDALL, R.J.. "Protein measurement with the Folin Phenol reagent". *J. Biol. Chem.* 193:265. 1951. In: GARVEY, J.S.; CREMER, N.E.; AND SUSSDORF, D.H. "Lowry (Folin-Ciocalteu) Method. In: *Methods in Immunology*. 3rd. ed. Massachusetts, W.A. Benjamin, Inc. Part 1, cap.12:87. 1977.

MACE, K.F.; EHRKE, M.J.; HORI, K.; MACCBBRIN, D.L.; MIHICH, E.. "Role of tumor necrosis factor in macrophage activation and tumoricidal activity". *Cancer Res*. 48:5427. 1988.

MARTIN, W.J.; WUNDERLICH, J.R.; FLETCHER, F.; AND INMAN, J.K..
"Enhanced immunogenicity of chemically coated syngeneic tumor
cells". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 68:469. 1971.

MATHÉ, G.; WEINER, R.; POUILLART, P.; SCHWARZENBERG, L.; JASMIN,
C.; SCHENEIDER, M.; HRYNT, M.; AMIEL, J.L.; DE VASSAL, F.; AND
ROSENFELD, C.. "BCG in cancer immunotherapy. I. Experimental and
clinical trial of its use in the treatment of leukemia minimal
and/or residual disease". *Natl. Ca. Int. Monogr.* 39:165. 1973.

MAVLIGIT, G.M.; AMBUS, V.; GUTTERMAN, J.V.; HERSH, E.M.. "antigen
solubilized from human solid tumors: Lymphocyte stimulation and
cutaneous delayed hypersensitivity". *Nature (New Biol.)*.
243:188. 1973.

McGEE, J.O.; WOODS, J.C.; ASHALL, F.; BRAMWELL, M.E.; AND HAR-
RIS, H.. "A new marker for human cancer cells. II. Immunohistolo-
gical detection of the Ca antigen in human tissues with the Ca1
antibody". *Lancet*. 3:7. 1982.

McILLMURRAY, M.B.; EMBLETON, M.J.; REEVES, W.G.; TANGMAN, M.J.S. and
DEANE, M.. "Controlled trial of active immunotherapy in management
of stage II B malignant melanoma". *Brit. Med. J.* 1:540. 1977.

MORI, K.; IKEMOTO, S.; NISHIO, T.; MAEKAWA, S.. "Ethylchloroform-
miate polymerized tumor protein immunotherapy of murine bladder
tumor". *Cancer*. 63:667. 1989.

MORI, K.; IKEMOTO, S.; NISHIO, T.; MAEKAWA, S.. "Immunotherapy of
murine bladder tumor with 1-Butanol extract (Submitted to *Can-
cer*). 1988.

MORTON, D.L.; EILBER, F.R.; HOLMES, E.C.; PARKS, F.C.; AND RAM-
MING, K.P.. "Present status of BCG immunotherapy of malignant me-
lanoma". *Ca. Immunol. Immunother.* 1:93. 1976.

MOSHAHAKIS, V.; McILHINNEY, R.A.J.; RAGHAVEN, D.; AND NEVILLE, A.M.. "Monoclonal antibodies to detect human tumors. An experimental approach". J. Clin. Pathol. 34:314. 1981.

MOTTA, R.; AND BRULEY, M.. "Quantitative study of the Histocompatibility antigen on the surface of normal and leukaemic cell in mice. I. Variations in the expression of groups H-2 specificities in four leukaemias induced by 7,12 dimethyl-benz-(a) anthracene". Transplantation. 15:22. 1973.

NADLER, S.H. and MOORE, G.E.. "Response to injection of cultured human tumor cells". Clin. studies Arch. Surgery. (Chicago). 100:244. 1970.

NARA, K.; ODAGIRI, H.; FUJUI, M.; YAMANAKA, Y.; YOKOYAMA, M.; MORITA, T.; SASAKI, M.; KON, M. and ABO, T.. "Increased production of tumor necrosis factor and prostaglandin E₂ by monocytes in cancer patients and its unique modulation by their plasma". Cancer Immunol. Immunother. 25:126. 1987.

NATHAN, C.F.; HENRY, W.; MURRAY, M.D. and COHN, Z.A.. "The macrophage as an effector cell". N. Engl. J. Med. 303:622. 1980.

NATORI, T.; LAW, L.W.; AND APELLA, E.. "Biological and biochemical properties of Nonidet P-40-solubilized and partially purified tumor-specific antigens of transplantation type from plasma membranes of a Methylcholantrene-induced Sarcoma". Ca. Res. 37:3406. 1977.

NEIDHART, J.A.; MURPHY, S.G.; HENNICK, L.A.; WISE, H.A.. "Active specific Immunotherapy of stage IV renal carcinoma with aggregated tumor antigen adjuvant". Cancer. 46:1128. 1980.

NICOLSON, G.L.. "Trans-membrane control of the receptors on normal and tumor cells. II. Surface changes associated with transformation and malignancy". *Bioch. Biophys. acta.* 458:1. 1976.

NICOLSON, G.L.. "Organ colonization and the cell surface properties of malignant cells". *Biochim. Biophys. Acta.* 695:113. 1982.

NOWELL, P.C. "Mechanisms of tumor progression". *Ca. Res.* 46:2203. 1986.

OLD, L.G.. "Cancer Immunology: the search for specificity-G.H.A. clowes memorial lecture". *Ca. Res.* 41:361. 1981.

OUCHTERLONY, O.. "Antigen-antibody reactions in gels". *Acta Pathologica Microbiol. Scand.* 26:507. 1949. In: GARVEY, J.S.; CREMER, N.E.; AND SUSSDORF, D.H. "Ouchterlony Method". In: *Methods in Immunology*. 3rd. ed. Massachusetts, W.A. Benjamin, Inc. Part 5, cap.36:313. 1977.

PAPSIDERO, L.D.; NEMOTO, T.; CROGHAN, G.A.; AND CHU, T.M.. "Expression of ductal carcinoma antigen in breast cancer sera as defined using monoclonal antibody F36/22". *Ca. Res.* 44:4659. 1984.

PASTERNAK, L.; PASTERNAK, G.; AND KARSTEIN, V.. "Immunogenicity of soluble extracts from a UV light-induced mouse sarcoma". *Ca Immunol. Immunother.* 3:273. 1978.

PELLEGRINO, M.A.; FERRONE, S.; NATHALIE, P.G.; PELLEGRINO, A.; REISFELD, R.A.. "Expression of HL-A antigens in synchronized cultures of human lymphocytes". *J. Immunol.* 108:579. 1972.

PELLIS, N.R.; BALDWIN, H.T.; KAHAN, B.D.. "Tumor-specific and allospecific immunotherapy of soluble extracts from chemically induced murine sarcomas". *J. Immunol.* 113:708. 1974.

PELLIS, N.R.; YAMAGISHI, H.; MACEK, C.M.; AND KAHAN, B.D.. "Specificity and biological activity of extracted murine tumor-specific transplantation antigens". Int. J. Ca. 26:443. 1980.

PINTO, V.B.; GELDER, F.B.; AND MORRIS, D.M.. "Purification, partial characterization and clinical evaluation of an Adenocarcinoma-associated antigen". Ca. Res. 46:6520. 1986.

POWLES, R.L.; BALCHIN, L.A.; HAMILTON-FAIRLEY, G.; ALEXANDER, P.. "Recognition of leukaemia cells as foreign before and after autoimmunization". Brit. Med. J. 1:486. 1971.

POWLES, R.L.. "The application of immunotherapy to the treatment of cancer". Pharmacol. Ther. 4:281. 1979.

POWLES, R.L.; CROWTHER, D.; BATEMAN, C.J.T.; BEARD, M.E.J.; McELWAIN, T.J.; RUSSEL, J.; LISTER, T.A. WHITEHOUSE, J.M.A.; WRIGLEY, P.F.M.; PIKE, M.; ALEXANDER, P. AND FAIRLEY, G.H.. "Immunotherapy for acute myelogenous leukemia". Br. J. Ca. 28:365. 1973.

PRAGER, M.D.; AND BAECHEL, F.S.. "Methods for modification of cancer cells to enhance their antigenicity". Methods Ca. Res. 9:339. 1973.

PREHN, R.T.; AND MAIN, J.M.. "Immunity to methylcholantrene-induced sarcoma". J. Natl. Ca. Inst. 18:769. 1957.

RAY, P.K.; TAHKUR, F.S.; AND SUNDARAM, K.. "Anti-tumor immunity. I. Differential response of neuraminidase-treated and X-irradiated tumor vaccine". Eur. J. Ca. 11:1. 1975.

REISFELD, R.A.; PELLEGRINO, M.A.; AND KAHAN, B.D.. "Salt extraction of soluble HL-A antigens". Science. 172:1134. 1971.

RICHARDS, B.; ROBISON, M.R.G.; PIDCOCK, N.B.; AND COOPER, E.H..
"Serum protein profiles in carcinoma of the kidney". Eur. Urol.
8:32. 1982.

RITTS, R.E.Jr.; DEL VILLANO, B.C.; GO, V.L.; HERBERMAN, R.B.;
KLUG, T.L.; AND ZURAWSKI, V.R.Jr.. "Initial clinical evaluation
of an immunoradiometric assay for CA 19-9 using the NCI serum
bank". JNCI.. 33:339. 1984.

ROSENFELDER, G.; YOUNG, W.W.Jr.; HAKOMORI, S.. "Association of the
glycolipid pattern with antigenic alteration in mouse fibro-
blasts transformed by murine sarcoma virus". cancer Res.
37:1333. 1977.

SALMON, S.E.. "Immunotherapy of cancer: present status of trials
in man". Ca. Res. 37:1245. 1977.

SEIBERT, E.; SORG, C.; HAPPLE, R.; MACHER, E.. "Membrane-associated
antigens of human malignant Melanoma. II. Specificity of hu-
man sera reacting with cultured melanoma cells". Int. J. Ca.
19:172. 1977.

SELLI, C.; COZZOLINO, F.; CARINI, M.; LENZI, R.; AND VERCELLI,
D.. "Serum beta 2 microglobulin levels in patients with renal
cell carcinoma". Urol. Res. 12:261. 1984.

SHEER, D.; SCHLOM, J.; AND COOPER, H.L.. "Purification and compo-
sition of human tumor-associated glycoprotein (TAG-72) defined
by monoclonal antibodies CC49 and B72.3". Ca. Res. 48:6811.
1988.

SHIKU, H.; TAKAHASHI, T.; OETTGEN, H.F.; AND OLD, L.J.. "Cell
surface antigens of human malignant Melanoma. I. Serological ty-
ping with immune adherence assays and definition of two new sur-
face antigens". J. Exp. Med. 144:873. 1976.

SLANETZ, C.A.; MCCOLLESTER, D.L.; AND KANOR, S.. "Autologous anti cancer antigen preparation for specific immunotherapy in advanced cancer patients". *Ca. Immunol. Immunother.* 13:75. 1982.

SORG, C.; BRUGGEN, J.; SEIBERT, E.; AND MACHER, E.. "Membrane-associated antigens of human malignant Melanoma. IV. Changes in expression of antigens on cultured Melanoma cells". *Ca. Immunother.* 3:259. 1978.

SOUTHAM, C.M.; BRUNSCHWEIG, A.; DIXON, A.. "biological interations in normal neoplastic growth". Boston, Little Brown. 1962. P.52.

STACHER, S.A.; THOMPSON, C.H.; RIGLAR, C.; AND MCKENZIE, I.F.C.. "A new breast carcinoma antigen defined by a monoclonal antibody". *J. Natl. Ca. Inst.* 75:801. 1985.

STEWART, T.H.M. and ORIGAZA, M.. "The presence of delayed hypersensitivity in patients toward cellular extracts of their malignant tumors". *cancer.* 28:1472. 1971.

SUFRIN, G.; MINK, I.; FITZPATRICK, J.; MOORE, R.; AND MURPHY, G.P.. "Coagulation factors in renal adenocarcinoma". *J. Urol.* 119:727. 1978.

SUGARMAN, B.J.; AGGARWAL, B.B.; HASS, P.E.; FIGARI, I.S.; PALLADINO, M.A. and SHEPARD, H.M.. "recombinant human tumor necrosis factor: alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells "in vitro"". *Science.* 230:943. 1985.

TAKACS, B.. "Eletrophoresis of proteins in Polyacrylamide Slab Gels". *Immunol. Methods.* 51. 1979.

TAKASHI, M.; HAIMOTO, H.; TANAKA, J.; MURASE, T.; AND KATO, K.. "Evaluation of Gamma-Glucosylase as a tumor marker for renal cell carcinoma". *J. Urol.* 141:830. 1989.

TALLBERG, T.. "Cancer-Immunotherapy by means of polymerised autologous tumor tissue with special reference to some patients with pulmonary tumor". Scand. J. Resp. Dis. (suppl.), 89:107. 1974.

TALLBERG, T.; TYKKA, H.; HALTTNEN, P.; LEHTONEN, T.; KALIMA, T.; AND SARNA, S.. "Active Specific Immunotherapy with supportive measures in the treatment of palliatively nephrectomized, renal adenocarcinoma patients". Eur. Urol. 11(4):233. 1985.

THOMPSON, C.H.; LICHTENSTEIN, M.; STACKER, S.A.. "Immunocintigraphy for detection of lymph node metastases from breast cancer". Lancet. 245. 1984.

TJANDRA, J.J.; RUSSEL, I.S.; COLLINS, J.P.; STACKER, S.A.; AND MCKENZIE, I.F.C.. "The application of mammary serum antigen assay in the management of breast cancer - a preliminary report". Brit. J. Surg. 75:811. 1988.

TYKKA, H.; DRAVISTO, K.J.; LEHTONEN, T.; SARNA, S.; AND TALLBERG, T.. "Active Specific Immunotherapy of advanced renal-cell carcinoma". Eur. Urol. 4:250. 1978.

TYKKA, H.. "Active immunotherapy with supportive measures in the treatment of advanced palliative nephrectomized renal adenocarcinoma: a control clinical study". Scand. J. Urol. Nephrol. (Suppl.) 63:7. 1981.

URBAN, J.L.; SHEPARD, M.A.; ROTHSTEIN, J.L.; SUGARMAN, B.J. and SCHREIDER, H.. "Tumor necrosis factor: a potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:5233. 1986.

VÁNKY, F.; STJERSWARD, J. and NILSONNE, V.. "Cellular immunity to human sarcoma". J. Nat. Cancer Inst. 46:1145. 1971.

VANKY, F.; KLEIN, E.; STJERSWARD, J. and NILSSONNE, V.. "Cellular immunity against tumor-associated antigens in humans: lymphocyte stimulation and skin reaction". *Int. J. Cancer*, 14:277. 1974.

VIZA, D.; PHILLIPS, J.. "Identification of an antigen associated with malignant melanoma". *Int. J. Ca.* 16:312. 1975.

VOLLMERS, H.P.; AND BIRCHMEIER, W.. "Monoclonal antibodies inhibit the adhesion of mouse B16 melanoma cells "IN VITRO" and block lung metastasis "IN VIVO"". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 80:3729. 1983.

VOLLMERS, H.P.; AND BIRCHMEIER, W.. "Monoclonal antibodies that prevent adhesion of B16 melanoma cells and reduce metastasis in mice: cross-reaction with human tumor cells". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 80:6863. 1983.

WALDRON, J.A.; HORN, R.G. AND ROSENTHAL, A.L. "Antigen-induced proliferation of guinea pig lymphocytes in vitro: obligatory role of macrophages in the recognition of antigen by immune T-Lymphocytes". *J. Immunol.* Vol. 111(1):58. 1973.

YAMADA, K.M.; OLDEN, K.; AND PASTAN.. "I. Transformation-sensitive cell surface protein: isolation, characterization and role in cellular morphology and adhesion". *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 312:256. 1978.

YODA, Y.; ISHIBASHI, T.; MAKITA, A.. "Isolation, characterization and biosynthesis of Forssman antigen in human lung and lung carcinoma". *J. Biochem.* 88:1887. 1980.

YOKOTA, M.; WARNER, G.; HAKOMORI, S.. "Blood group A-like glycolipid and a novel Forssman antigen in the hepato-carcinoma of a blood O group individual". *Cancer Res.* 41:4185. 1981.