

Alessandra Soares Schanoski

**EXPRESSÃO DA MOLÉCULA DO MHC CLASSE I PELO
TUMOR DE WALKER 256 DURANTE SUA CONVERSÃO DE
VARIANTE A (AGRESSIVA) EM VARIANTE AR (REGRESSIVA)**

Dissertação de Mestrado

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Guimarães
CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Tereza Cristina Samico Cavalcanti**

**UNICAMP
2004**

Alessandra Soares Schanoski

**EXPRESSÃO DA MOLÉCULA DO MHC CLASSE I PELO
TUMOR DE WALKER 256 DURANTE SUA CONVERSÃO DE
VARIANTE A (AGRESSIVA) EM VARIANTE AR (REGRESSIVA)**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título de
Mestre em Tocoginecologia, área de
Ciências Biomédicas

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Guimarães
CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Tereza Cristina Samico Cavalcanti

UNICAMP
2004

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

Sc16e Schanoski, Alessandra Soares
Expressão da molécula de MHC de classe I pelo
tumor de Walker 256 durante sua conversão de
variante A (agressiva) em variante AR (regressiva).
/ Alessandra Soares Schanoski. Campinas, SP :
[s.n.], 2004.

Orientadores : Fernando Guimarães, Tereza
Cristina Samico Cavalcanti
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Imunologia. 2. Câncer – aspectos imunológicos.
3. Células cancerosas. 4. Tumores. 5. Tumores
ascísticos I. Fernando Guimarães. II. Tereza Cristina
Samico Cavalcanti. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno Alessandra Soares Schanoski

Orientador: Prof. Dr. Fernando Guimarães

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tereza Cristina Samico Cavalcanti

Membros:

1.

2.

3.

**Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

Data: / /

*“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais volta ao seu tamanho original.”*

(Albert Einstein)

Dedico este trabalho...

*...aos meus pais, Mateus, Adriana e Tadzia
por me fazerem sentir o orgulho que têm de mim.*

*... ao João,
que sempre foi meu formador de opiniões revolucionárias preferido.*

*...em memória de Marcos que,
sem dúvida, adoraria ter acompanhado este trabalho.*

Agradecimentos

À Prof^{el}. Dr^a. Tereza Cristina Samico Cavalcanti, que me co-orientou, e até mesmo brigou por mim, com muita dedicação.

Ao Prof. Dr. Fernando Guimarães que me orientou no mestrado e na iniciação científica, proporcionando-me as discussões científicas mais valiosas que pude ter e por me ensinar todas as técnicas de manuseios com animais.

Aos Prof^{os}. Dr^s. Ovídio Rettori e Ana Neusa Vieira Mattos, pela padronização das técnicas de manuseio das variantes A e AR do tumor de Walker 256.

À estudante Priscila Juliano Bianchi, que me auxiliou em toda a parte experimental e por sua “inteligência imunológica” surpreendente.

Ao Sr. Amílton Garcia, Júlio Moraes e Sr. João Batista pelo cuidado com os ratos e pela grande amizade.

À secretária da pós-graduação Margarete Souza Donadon, pelo imenso carinho e eficiência no decorrer do curso.

A todos da ASTEC, principalmente à Sueli Chaves, pela colaboração e formatação do trabalho e pela grande amizade.

À Cláudia Campos, do Laboratório de Bioenergética/Departamento de Parasitologia/FCM/UNICAMP, pelo uso do citômetro de fluxo.

Este trabalho foi financiado pela:
PROAP/ Coordenação e Apoio ao Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	ix
Resumo	x
Summary	xii
1. Introdução.....	14
1.1. Tumor de W256	15
1.2. Variantes A e AR do tumor de W256.....	16
1.3. Resposta imune contra o câncer	20
1.4. Molécula de MHC classe I e as células tumorais	22
2. Objetivos.....	25
2.1. Objetivo geral.....	25
2.2. Objetivos específicos.....	25
3. Sujeitos e Métodos	26
3.1. Seleção de Sujeitos	26
3.1.1. Critério de inclusão	26
3.1.2. Critério de exclusão	26
3.2. Variáveis	27
3.2.1. Variáveis independentes	27
3.2.2. Variável dependente	27
3.3. Condições de alojamento dos animais.....	28
3.4. Protocolo experimental	28
3.5. Obtenção da suspensão de células tumorais da variante A de W256.....	30
3.6. Passagens ip das células tumorais de W256.....	30
3.7. Fragilidade osmótica.....	31
3.8. Peso relativo do baço	33
3.9. Expressão de molécula do MHC classe I pelas células tumorais de W256 A e AR	34
3.10. Análise estatística.....	35
4. Resultados.....	36
4.1. Tumor de W256	36
4.2. Conversão da variante A para AR do tumor de W256	37
4.3. Rejeição da variante AR do tumor de W256	41
4.4. Expressão da molécula do MHC classe I nas células tumorais.....	42
5. Discussão	44
6. Conclusões.....	54
7. Referências Bibliográficas.....	56
8. Bibliografia de Normatizações.....	66
9. Anexos	67
9.1. Anexo 1 - Artigo aceito pela revista Cancer Letters em janeiro de 2004.	67

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

A	Variante A do tumor de Walker 256
AR	Variante AR do tumor de Walker 256
FCM	Fragilidade corpuscular média
FITC	Fluoresceína de isotiocianeto conjugada
FO	Fragilidade osmótica das hemácias circulantes
g	Grama(s)
ip	Intraperitoneal
IRR	Irradiação
l	Litro(s)
mAb	Anticorpo monoclonal
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
ml	Mililitro(s)
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
sc	Subcutâneo
SEM	Erro padrão da média
W256	Tumor de Walker 256

Resumo

Normalmente, para manutenção e crescimento de tumores, realizam-se passagens de células tumorais por diferentes meios. Esta prática, comum na oncologia experimental, por vezes resulta em mudanças de algumas propriedades biológicas destas células, podendo gerar novas variantes tumorais. Este fenômeno quando observado *in vivo* é, usualmente, atribuído à pressão seletiva do micro-ambiente, com subsequente propagação de um subclone de células tumorais. No presente trabalho foram realizadas passagens sucessivas da variante A (agressiva) do tumor de Walker 256 (W256) pela cavidade peritoneal de ratos, no sentido de se estudar o surgimento da variante regressiva AR. A expressão da molécula de MHC classe I pelas variantes A e AR foi determinada, visto que variações na expressão desta molécula podem explicar mudanças na imunogenicidade das células tumorais, que seriam um dos motivos do surgimento da variante regressiva AR. A variante tumoral AR foi identificada a cada passagem intraperitoneal (20×10^6 células tumorais/4-5 dias) por induzir o aumento da fragilidade osmótica de eritrócitos e esplenomegalia, enquanto a variante A foi identificada por induzir diminuição da FO de eritrócitos com hipertrofia

moderada do baço. No decorrer de 25 passagens ip ocorreu a conversão da variante tumoral A em AR em todas as séries experimentais realizadas, sem que houvesse um número regular de passagens ip para este evento. Em uma das séries experimentais ocorreu regressão do tumor e subsequente, o hospedeiro era capaz de rejeitar ambas as variantes tumorais, quando desafiado novamente. A intensidade relativa de fluorescência foi 1,6 vezes maior na variante AR ($n=15, 14,1 \pm 1,32$) do que na variante A ($n=10, 9,0 \pm 1,22$) indicando aumento no número de células MHC classe I positivas. Estes dados sugerem que o aparecimento da variante AR seria consequência de fatores presentes na cavidade peritoneal dos hospedeiros, que levariam ao aumento das células de W256 MHC classe I positivas, provavelmente devido à imunosseleção das células de W256 MHC classe I negativas.

Summary

Novel tumor cell variants can be obtained by serially passaging tumor cells in different media and/or environments. In vivo environmental selective pressures usually account for this phenomenon, leading to tumor cell changes and/or clonal expansions. Serial intraperitoneal (ip) passages of the Walker 256 (W256) tumor A variant was followed in rats for studying the generation of its immunogenic AR variant. The MHC class I molecule expression was assessed by flow cytometry, since variations in this molecule, would explain changes in tumor cell immunogenicity. The AR variant was identified in every ip passage (20×10^6 tumor cells every 4-5 days) by an increase in red blood cell (RBC) osmotic fragility (OF) with marked spleen hypertrophy, whereas the A variant was identified by a decrease in RBC OF with moderate spleen hypertrophy. Within 25 ip passages, all serial repetitions shifted from A to AR variant. The number of ip passages required for the shift was variable. Subsequently, tumor cells were rejected in one experimental repetition and immunity against the AR and A variants was conferred. The relative fluorescence intensity was 1,6 times higher in the AR variant ($n=15$, 14.21 ± 1.32) than in the A variant ($n=10$,

9.10±1.22) showing an increase in the number of MHC class I positive cells. These data provide evidence that the generation of the AR variant could result from factors present in the ip environment leading to an increase in the number of W256 MHC class I positive tumor cells, probably due to immune cell selection of MHC class I negative tumor cells.

1. Introdução

Na oncologia experimental, para manutenção e crescimento de tumores, realizam-se passagens de células tumorais por diferentes meios. Esta prática, por vezes, resulta em mudanças de algumas propriedades biológicas destas células. Frequentemente, tais propriedades estão diretamente relacionadas à tumorigenicidade, ou seja, à capacidade de crescimento local de tumores transplantados, capacidade de gerar metástases, ou ainda, induzir alterações fisiológicas no hospedeiro. Por outro lado, a atenuação destas propriedades e, em condição extrema, a regressão do tumor estariam associadas ao aumento de sua imunogenicidade e fatores do microambiente tumoral, como por exemplo, alterações no metabolismo de oxigênio e de enzimas, as quais são cruciais para o desenvolvimento dos tumores (TANNOCK, 1983; GARRIDO et al., 1986 a; b; GAFORIO et al., 1991; MIALDEA et al., 1992; BONNOTTE et al., 1998; GABRILOVICH e PISAREV, 2003).

Nos modelos experimentais que utilizam camundongos transplantados com o melanoma B16 e o tumor KHL, a capacidade das células tumorais

produzirem metástases pode ser modificada. A modificação ocorre à medida que as células tumorais são mantidas sob crescimento *in vivo* ou *in vitro* (TANNOCK, 1983). Além destes modelos, foram obtidas a partir de carcinoma de cólon de ratos, duas variantes de células tumorais, as quais foram designadas como PRO e REG. A variante PRO apresentou crescimento contínuo no organismo do hospedeiro produzindo metástases e causando sua morte, ao passo que a variante REG, após crescer de duas a três semanas, passou a regredir até seu total desaparecimento (BONNOTTE et al., 1998).

1.1. Tumor de W256

O tumor de Walker 256, de origem espontânea, foi observado pela primeira vez por George Walker (1928) na região da glândula mamária de uma rata albina prenhe e regredia totalmente durante o período de lactação. Porém voltava a se desenvolver logo após o desmame da prole. Naquela ocasião, aquele tumor foi denominado como tumor de Walker 256 (W256), o qual foi classificado histologicamente como carcinoma (EARLE, 1935). Posteriormente, testes de transplantabilidade mostraram a capacidade de fragmentos do tumor original crescerem em ratos receptores (EARLE, 1935). As características de transplantabilidade deste tumor, bem como técnicas de crioconservação e de cultura de tecidos, permitiram manter esta linhagem até a atualidade, sendo descritas variantes morfológicas como sarcoma, carcinosarcoma e carcinoma (IWAMA-MATTOS et al., 1973).

Desde então, diversas vias de inoculação foram utilizadas para administração das células tumorais de W256, como as vias subcutânea (sc), intramucoslar, intraperitoneal (ip), intrapleural, intracardiaca, intra-esplênica, sangüínea arterial, venosa e tecido ósseo (IWAMA-MATOS et al., 1973). Quando é utilizada a via subcutânea há o desenvolvimento de tumores sólidos, inicialmente firmes à palpação, encapsulados e de forma arredondada, que provocam infiltração da pele e da musculatura adjacente (EARLE, 1935; IWAMA de MATTOS, 1979). Por outro lado, a inoculação destas células tumorais através da via (ip), ocasiona o desenvolvimento da forma ascítica do tumor de W256 (IWAMA-MATOS et al., 1973).

O tumor de W256 tem sido amplamente usado nos estudos de fisiopatologia do câncer (TOAL et al., 1960; MORRISON , 1971; ZUCKER et al., 1977; GUAITANI et al., 1982; TAYEK e BRASEL, 1990; RETTORI et al., 1998; MOREIRA et al., 2001; VENTRUCCI et al., 2001). Já foram observadas duas linhagens morfológica e estruturalmente diferentes de células tumorais de W256, nomeadas como WS e WR (SIMPKINS et al., 1991), sendo que outros autores obtiveram também duas variantes deste tumor descritas, previamente, como W256 A e B (GUAITANI et al., 1983).

1.2. Variantes A e AR do tumor de W256

As células tumorais de W256 A são conhecidas por sua tumorigenicidade (GUAITANI et al., 1982). Uma vez administradas no rato, seja através de inoculações sc, ip, ou de outras vias menos freqüentes (como no tecido muscular ou

diretamente em órgãos) passam a proliferar, sendo raras as regressões de tumores já instalados (IWAMA de MATTOS, 1979; IWAMA de MATTOS et al., 1980).

De fato, assume-se que este tumor apresente 100% de instalação e desenvolvimento no organismo do hospedeiro (IWAMA de MATTOS et al., 1974; RETTORI et al., 1995; GUIMARÃES et al., 1999). Uma variante menos agressiva do tumor de W256 A, designada como AR, foi obtida por RETTORI em 1992 no Laboratório de Pesquisas Bioquímicas do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Esta variante foi isolada por ocasião da manutenção das células da variante A, através de aproximadamente 60 passagens ip sucessivas, uma a cada quatro dias (GUIMARÃES, 2000; GREGORINI, 2001; CAVALCANTI et al., 2003).

Pode-se observar a menor agressividade da variante AR através de uma inoculação sc destas células, onde, apesar da instalação e crescimento iniciais dos tumores, ocorrem regressões em 70% a 80% dos animais inoculados (SCHANOSKI, 2000; GREGORINI, 2001; RETTORI et al., 2001; VIEIRA-MATOS et al., 2001; GUIMARÃES et al., 2002; SCHANOSKI et al., 2002; CAVALCANTI et al., 2003).

A regressão da variante AR ocorre usualmente a partir do 14º dia após a inoculação das células no sc; entretanto, sua menor velocidade de crescimento já pode ser notada a partir do terceiro dia após a inoculação (GUIMARÃES et al., 2000a;b; GUIMARÃES, 2000; VIEIRA-MATOS et al., 2001).

No período de 5^º a 12^º dia após a inoculação, a taxa de crescimento dos tumores AR que regridem foi significativamente a menor (0,29g/dia) quando comparada com as de AR que não regriram (0,47g/dia) e com as taxas do tumor A (1,66g/dia) (Figura 1). Após a regressão da variante AR, os ratos são capazes de rejeitar a instalação tanto da variante AR como da A, caso sejam novamente inoculados (GUIMARÃES et al., 2000b;c; RETTORI et al., 2001). Além disso, observou-se que a inoculação da variante AR induzia esplenomegalia significativa em relação a induzida pela variante A (GUIMARÃES et al., 2000a;b;c; GUIMARÃES et al., 2002; SCHANOSKI et al., 2002) (Figura 2). Outra diferença observada foi que animais portadores da variante A geralmente apresentam diminuição na fragilidade osmótica de suas hemácias circulantes, enquanto que nos ratos inoculados com a variante AR foi observado o efeito oposto (GUIMARÃES et al., 2000b;c; GUIMARÃES et al., 2002; SCHANOSKI et al., 2002; CAVALCANTI et al., 2003).

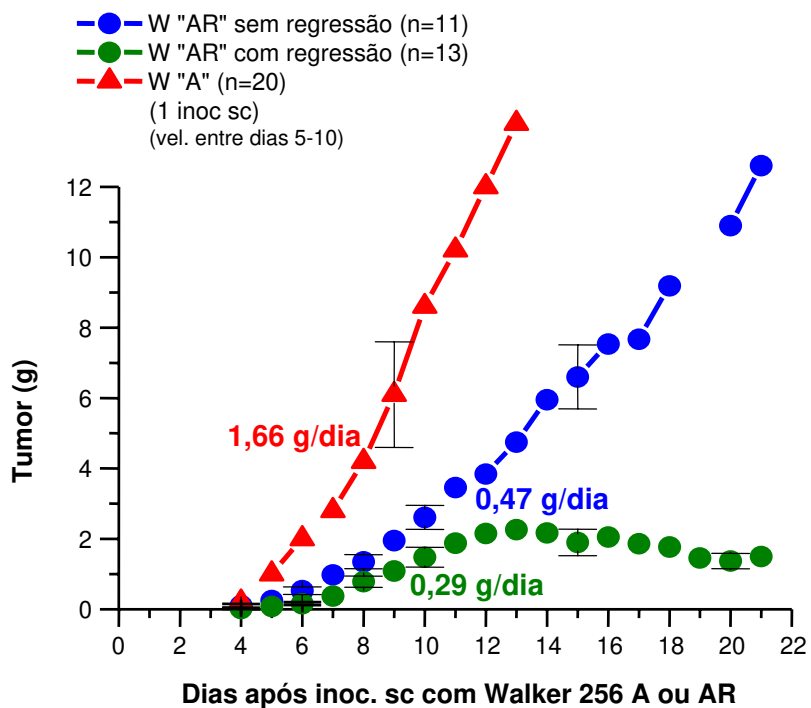


Figura 1. Peso médio de tumores pertencentes às variantes A e AR do tumor de W256 durante o crescimento sc (GUIMARÃES et al., 2000b).

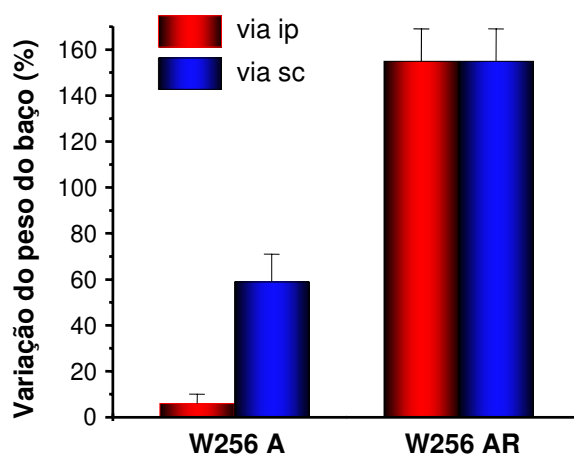


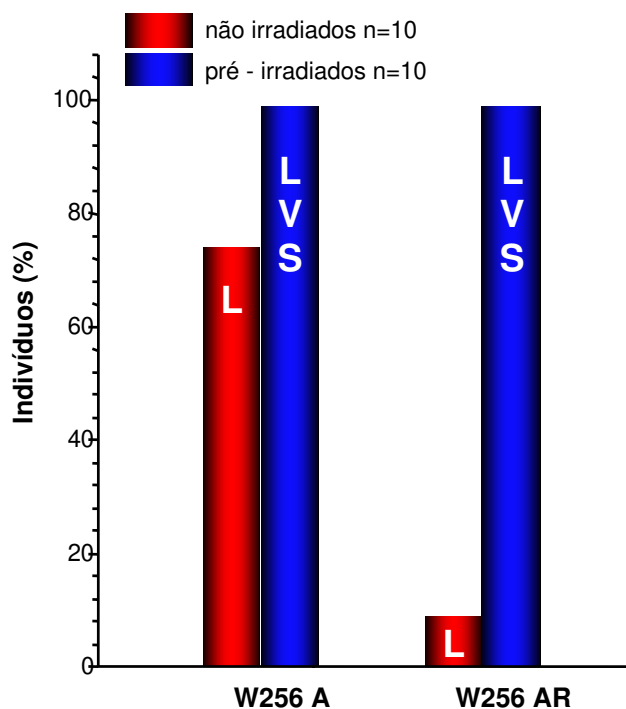
Figura 2. Variação média do peso do baço de ratos portadores das variantes A e AR do tumor de W256 (GUIMARÃES et al., 2000a).

1.3. Resposta imune contra o câncer

Em princípio, não parecia haver influência do sistema imunológico contra o tumor de W256 (IWAMA de MATTOS, 1979), porém seu papel foi percebido quando o sistema imunológico foi alterado. Quando ratos são imunodeprimidos, pela administração de doses subletais de irradiação (IRR), prévia à inoculação das células tumorais (A ou AR), estes animais têm o desenvolvimento tumoral e a ocorrência de seus efeitos sistêmicos facilitados. A IRR abole a característica regressiva da variante AR, resultando no aumento da velocidade e no crescimento contínuo de 100% dos tumores. A disseminação metastática, que na variante AR é usualmente incipiente, passa a ocorrer em 100% dos animais imunodeprimidos pela IRR, atingindo tecidos raramente acometidos como vísceras e músculos. Estes resultados sugerem que a menor agressividade da variante AR em relação à variante A não seria consequência da diminuição na capacidade de crescimento tumoral ou da disseminação metastática, mas da resistência que o sistema imune do hospedeiro gera contra a variante AR (SCHANOSKI, 2000) (Figura 3).

É sabido que o baço, sendo um órgão linfóide secundário, é responsável, pelo menos em parte, pela atividade do sistema imunológico contra patógenos e possui em suas artérias esplênicas grandes quantidades de células efectoras do sistema imune como monócitos e/ou macrófagos e células dendríticas (ABRAHAMSOHN, 2001). Logo, a indução de esplenomegalia pela variante AR pode ser um indicador de que a atividade do sistema imune contra as variantes tumorais é diferenciada. Isto poderia ocorrer devido à presença de uma

sinalização mais eficiente para o sistema imune. Assim, o processo de atenuação da variante A, através de passagens ip, seria explicado como consequência do aumento da imunogenicidade das células tumorais da variante AR do tumor de W256.



(L,V e S):gânglios linfáticos, vísceras e tecidos moles

Figura 3. Disseminação precoce de metástases (até duas semanas após a inoculação sc) em ratos portadores das variantes A e AR do tumor de W256 (SCHANOSKI, 2000).

1.4. Molécula de MHC classe I e as células tumorais

Os antígenos de MHC classe I pertencem a um grupo de moléculas de superfície altamente polimórficas que funcionam como estruturas importantes na sinalização para o sistema imune (GAFORIO et al., 1991). Estas moléculas interagem com pequenos peptídeos endógenos ou exógenos para serem exteriorizados na superfície da membrana celular. Células efectoras do sistema imune reconhecem estes peptídeos através do MHC classe I. Conseqüentemente, alterações qualitativas ou quantitativas na expressão do MHC classe I em células transformadas podem afetar o reconhecimento de peptídeos estranhos ou endógenos, que estariam agindo como antígenos tumorais específicos (MIALDEA et al., 1992).

Logo, a sinalização das células tumorais para o sistema imune provém da correta expressão da molécula de MHC classe I, bem como da presença de “*tumor associated antigens*” (TAAS) e de outras moléculas de superfície que favorecem o reconhecimento da célula tumoral como “*non-self*”, induzindo, desta maneira, uma série de eventos que poderiam levar ao êxito da resposta imune contra os tumores (PETERSEN et al., 1991; MUTTI et al., 1998; FOSS, 2002).

A baixa expressão de antígenos tumorais, especificamente moléculas de MHC classe I, é um importante mecanismo usado para se explicar a falha do sistema imune contra tumores. Vários estudos propuseram que variantes tumorais,

que não expressam ou expressam erroneamente a molécula de MHC classe I, originaram-se através de imunosseleção (FESTENTEIN e GARRIDO, 1986; HÄMERLING et al., 1986; LJUNGGREN e KÄRRE, 1986; GAFORIO et al., 1991; PETERSEN et al., 1991; MIALDEA et al., 1992; MUTTI et al., 1998, REES e MIAN, 1999; GARCIA-LORA et al., 2001; GARRIDO e ALGARRA, 2001; FOSS, 2002, GARCIA-LORA et al., 2003a;b;c).

PETERSEN et al. (1991) e GARCIA-LORA et al. (2001) propuseram que tumores em desenvolvimento passam precocemente por um processo de imunosseleção, durante o qual clones imunogênicos das células tumorais são eliminados pelas células T citotóxicas, cujo processo depende da expressão da molécula de MHC classe I, enquanto que os clones de baixa imunogenicidade permaneceriam ativos. O crescimento de tumores em camundongos atímicos tem provido também evidências para esta hipótese, mostrando que a deficiência imunológica destes animais propicia que as células tumorais expressem as moléculas de MHC classe I.

Além disso, já se obteve, após sucessivas passagens *in vivo*, diferentes variantes tumorais a partir do tumor GR9 induzido quimicamente. Estas variantes tumorais apresentavam diferenças entre si, na expressão da molécula de MHC classe I e no desenvolvimento de metástases (PÉREZ et al., 1985; GARRIDO et al., 1986a;b).

Os resultados obtidos anteriormente através de diversos estudos, os quais discutem se a molécula de MHC classe I é expressa ou não por células

tumorais influenciando na sinalização para o sistema imunológico (PETERSEN et al., 1991; GARCIA-LORA et al., 2001; FOSS, 2002; KHONG e RESTIFO, 2002), sugerem que a atenuação da agressividade da variante A, originando a AR, poderia ser explicada pelo aumento da expressão de molécula de MHC classe I. Entretanto, ainda não havia sido observado se há diferença na expressão de moléculas de MHC classe I nas variantes A e AR do tumor de W256.

O propósito do presente estudo foi demonstrar em ratos Wistar a provável geração da variante imunogênica AR de W256, através de passagens ip sucessivas da variante A deste tumor, e verificar se há diferenças na expressão da molécula de MHC classe I entre as duas variantes tumorais.

2. *Objetivos*

2.1. **Objetivo geral**

Estudar a expressão da molécula de MHC classe I no processo de conversão da variante A para AR do tumor de W256.

2.2. **Objetivos específicos**

- Comparar o número de passagens ip sucessivas necessárias para a conversão da variante A para AR.
- Comparar a expressão da molécula de MHC classe I entre A e AR do tumor de W256 em conexão com as diferenças já observadas na fragilidade osmótica das hemácias circulantes e o peso relativo do baço nos animais portadores destas variantes.

3. *Sujeitos e Métodos*

3.1. Seleção de Sujeitos

Os sujeitos do presente estudo foram 200 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) com 8 a 12 semanas de vida.

Os animais foram escolhidos aleatoriamente no momento da realização dos experimentos, entre aqueles com idade adequada, no biotério do Laboratório de Pesquisas Bioquímicas/CAISM/Unicamp.

3.1.1. Critério de inclusão

- Animais sadios não isogênicos.

3.1.2. Critério de exclusão

- Presença de patologia de qualquer natureza e idade inferior a 8 semanas ou superior a 12 semanas.

3.2. Variáveis

3.2.1. Variáveis independentes

- Número de passagens ip de células tumorais da variante A até que ocorresse a conversão para a variante AR do tumor de Walker 256.
- Expressão da molécula de MHC classe I pelas células das variantes A e AR do tumor de W256.

3.2.2. Variável dependente

Conversão das células tumorais de W256 da variante A para variante AR.

Categorias:

- Variante A do tumor de W256: variante tumoral progressiva quando inoculada no sc ou ip; identificada por induzir esplenomegalia moderada (em média 60% de aumento no peso relativo do baço) e diminuição da fragilidade osmótica das hemácias do hospedeiro.
- Variante AR do tumor de W256: variante tumoral regressiva em 60% a 80% dos indivíduos após a inoculação sc; identificada por induzir esplenomegalia acentuada (em média 160% de aumento no peso relativo do baço) e aumento na fragilidade osmótica das hemácias do hospedeiro.
- Fragilidade osmótica (FO) ou fragilidade corpuscular média (FCM) das hemácias circulantes: teste baseado na resistência das hemácias à hipotonicidade e que refere a concentração de cloreto de sódio (NaCl) necessária para induzir lise em 50% das hemácias. Os valores considerados normais para fragilidade corpuscular média foram de 4,0 a 4,5g NaCl/l.

- Peso relativo do baço: peso do órgão em gramas para cada 100g de peso corpóreo (peso percentual do órgão) de ratos.
- Expressão da molécula de MHC classe I pelas células tumorais das variantes A e AR de W256: expressão ou não da molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I na superfície das células tumorais.

3.3. Condições de alojamento dos animais

Os ratos foram alojados no Biotério do Laboratório de Pesquisas Bioquímicas/CAISM/Unicamp em gaiolas plásticas com capacidade para cinco animais e com cama de maravalha de pinho. Durante os experimentos, o Biotério foi mantido em temperatura (22 ± 2 °C) e fotoperíodo (12 horas; das 6h às 18h) constantes. Os animais receberam ração (Labina/Purina, Campinas, SP, Brasil) e água *ad libitum*. Foram seguidas as orientações do guia geral para bem-estar do Comitê Coordenador do Reino Unido de Pesquisa em Câncer (1998). Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal (COBEA/IB/Unicamp).

3.4. Protocolo experimental

Foram realizadas três seqüências de passagens ip sucessivas.

Em linhas gerais, o protocolo experimental consistiu em transferir células tumorais de W256 crescendo como tumor ascítico no ip de um rato doador, sucessivas vezes, para um rato recebedor. Assim, a partir de uma suspensão

de células tumorais da variante A, obtida de um tumor sólido crescendo no tecido sc, iniciaram-se as passagens ip sucessivas. A formação da ascite ocorreu entre 7 e 9 dias após a inoculação ip desta primeira suspensão de células tumorais (primeira passagem). Entretanto, o período necessário para formação da ascite diminuiu para 4 a 5 dias e regularizou-se a partir da segunda passagem ip, quando passaram a ser empregadas 20×10^6 células tumorais/ml.

Com o objetivo de se caracterizar a variante tumoral como A ou AR, a cada passagem ip eram determinados o peso relativo do baço e a FO das hemácias do rato doador.

O protocolo experimental geral das passagens ip está esquematizado na Figura 4.

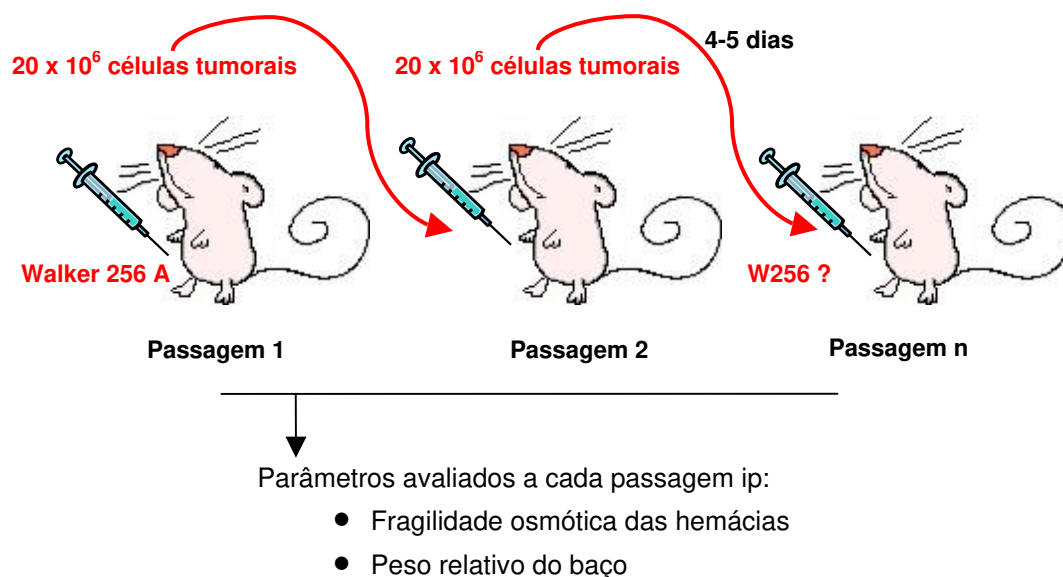


Figura 4. Protocolo Experimental das seqüências de passagens IP sucessivas.

3.5. Obtenção da suspensão de células tumorais da variante A de W256

As suspensões de células tumorais da variante A do tumor de W256 utilizadas para iniciar as passagens ip foram obtidas a partir de tumores sólidos crescendo e mantidos através de transplantes subcutâneos. Para o preparo da suspensão de células tumorais foram selecionados aqueles que apresentassem uma taxa de crescimento superior ou igual a 1,0 g/dia (por volta do 22º dia de crescimento sc).

Neste sentido, o rato portador do tumor sólido que crescia na região dorsal (tóraco-lombar) foi anestesiado com halotano. Através de uma incisão na pele expôs-se o tumor e foram retirados cirurgicamente fragmentos delgados (área ~1,5 cm²) de regiões bem irrigadas da sua periferia .

A suspensão de células tumorais foi obtida picando-se os fragmentos com bisturis sobre uma placa de teflon em solução isotônica tamponada e gelada (~2,0 ml de solução Ringer-lactato). Com o auxílio de uma seringa com agulha de grosso calibre (40,0x12,0mm) coletou-se o sobrenadante (evitando-se os fragmentos maiores) do homogeneizado do tumor e o inoculou na cavidade ip de um rato, dando início à primeira passagem ip.

3.6. Passagens ip das células tumorais de W256

Após a formação da ascite, o que foi facilmente percebido pela expansão do abdômen do rato, as células tumorais foram coletadas puncionando-se a

região ventral do abdômen. Imediatamente após a coleta, o líquido ascítico foi diluído em solução Ringer-lactato (1:2, v/v) o que preveniu a formação de coágulos. Em seguida, a concentração e a viabilidade das células tumorais na suspensão foram determinadas pela contagem em câmara de Neubauer empregando-se solução de 1% de azul Tripan. Após a contagem, a suspensão de células tumorais foi diluída com solução Ringer-lactato para a concentração de 20×10^6 células / ml e 1,0ml desta suspensão foi inoculado através da via ip em um novo rato.

3.7. Fragilidade osmótica

O método utilizado para determinação da fragilidade osmótica (FO) das hemácias foi modificado do descrito por DACIE et al., 1984. A solução-estoque de cloreto de sódio que, osmoticamente, equivale a 100g/l (1,71mol/l) de NaCl, foi preparada da seguinte maneira: foram dissolvidos 90,0g de NaCl; 13,85g de Na_2PO_4 , 2,43g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em água deionizada, ajustando-se o volume final para 1,0l. Ao preparar soluções salinas para o teste de FO das hemácias, utilizaram-se diluições a partir da solução-estoque de 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 gNaCl/l.

A colheita das amostras de sangue heparinizado (0,20ml) foi feita por punção cardíaca em todos os animais no primeiro dia da inoculação ip das células tumorais e 4 a 5 dias após, quando os animais apresentavam ascite e eram sacrificados.

O sangue heparinizado coletado era adicionado às soluções na proporção de 1:100v/v em tubos de ensaio (cada tubo contendo 1,0ml de solução salina+0,01ml de sangue nas diferentes concentrações já citadas), sendo mantidos em temperatura ambiente por 20 minutos, centrifugando-se levemente a 375g/2minutos/27°C (centrífuga 215 Fanem).

Por fim, as amostras eram lidas em espectrofotômetro Beckmam DU-70 em cubetas de plástico (1,0 ml) a 540 nm de absorvância.

Cálculo para obtenção da fragilidade osmótica:

$$\% \text{ hemólise} = \frac{\text{leitura da amostra} - \text{leitura do tubo com } 9,0 \text{ g/l NaCl}}{\text{leitura do tubo com H}_2\text{O}} \times 100$$

Onde:

- tubo com NaCl a 9,0 g/l: tubo branco
- 100: ajuste do valor obtido em percentagem.
- tubo com H₂O: 100% de hemólise.

Cálculo para obtenção da FCM

A fragilidade corpuscular média (FCM) foi definida como a concentração de NaCl na qual 50% das hemácias eram hemolisadas, sendo calculada

através de interpolação dos pontos imediatamente superior e inferior a 50% de hemólise.

3.8. Peso relativo do baço

A cada passagem ip, os animais doadores de células tumorais eram sacrificados, tendo seu baço extraído cirurgicamente. Todo o líquido ascítico dos animais era retirado. Após, os animais bem como os respectivos baços eram pesados individualmente (balança Precisa 205 AM-FR SCS *Swiss Quality*) e o peso relativo do baço calculado através da fórmula:

$$PRb = \frac{Pab(g) \times 100}{Pr(g)}$$

Onde:

- PRb= peso relativo do baço em gramas
- Pab= peso do baço em gramas
- Pr= peso do rato em gramas
- 100= fator de conversão em percentagem

3.9. Expressão de molécula do MHC classe I pelas células tumorais de W256 A e AR

A expressão da molécula de MHC classe I pelas células tumorais das variantes A e AR foi realizada por citometria de fluxo. A técnica usada baseou-se na descrita por GIEZEMAN-SMITS, et al., 1995. Tal análise está fundamentada na marcação direta da molécula de MHC classe I com anticorpo monoclonal (mAb) anti-MHC de classe I total (anti-RT1A), conjugado ao isotiocianato de fluoresceína FITC (clone OX-18) e IgG₁ κ de camundongo conjugado com FITC. Como controle isotópico foi usado o clone MOPC-21. O controle isotópico é inespecífico e não provoca, normalmente, nenhuma marcação, possibilitando que se observe que o anticorpo monoclonal específico (no caso o anti-RT1A) induz marcação significativa quando existe a expressão da molécula de MHC classe I.

Esta análise foi executada com células tumorais obtidas a partir de ascites bem caracterizadas das variantes A ou AR do tumor de W256. Após a colheita, o líquido ascítico foi tratado com 2,0 ml de solução salina tamponada (NaCl 3,0g/l) para lise de hemácias presentes neste fluido. As células tumorais foram lavadas centrifugando-se (200g/5min – centrífuga Incibrás Spin III) duas vezes em solução de Hanks. Em seguida, fixou-se a amostra com formol 4% em PBS. Após 30 minutos repetiu-se a lavagem.

A suspensão final foi padronizada para 5×10^5 células (volume sempre variável entre 50ul e 250μl) em solução de Hanks, usando-se, para contagem, um hemocitômetro (câmara de Neubauer).

As amostras contendo 5×10^5 de células totais foram então transferidas para microtubos (capacidade $\sim 1,5\text{ml}$) aos quais eram adicionados $5,0\mu\text{g}/10,0\mu\text{l}$ da solução contendo concentração ótima do mAb anti - RT1 A ou $80,0\mu\text{g}/20,0\mu\text{l}$ de IgG₁ κ (controle isotípico), que eram incubados na ausência de luz, a 4°C , durante pelo menos uma hora e trinta minutos. Após o período de incubação, o excesso de mAb era retirado, lavando-se a suspensão de células tumorais através de duas centrifugações ($150g/7\text{min}/4^\circ\text{C}$) com $250,0\mu\text{l}$ de solução de Hanks. O precipitado final foi suspenso em $250,0\mu\text{l}$ de solução de Hanks e transferido para frascos apropriados para citometria de fluxo, contendo $250,0\mu\text{l}$ de solução de Hanks (final $\sim 5 \times 10^5$ células/ $250,0\mu\text{l}$).

A concentração ótima do mAb (menor concentração que resulta na maior fluorescência) foi determinada por titulação através de um ensaio preliminar, obtendo-se $5,0\mu\text{g}/10,0\mu\text{l}$ para mAb anti – RT1 A e $80,0\mu\text{g}/20,0\mu\text{l}$ para IgG₁ κ .

É importante ressaltar que todos os procedimentos deste estudo foram realizados com soluções geladas.

3.10. Análise estatística

Os resultados foram relatados como $X \pm \text{EP}$ (SEM). As diferenças entre as variantes tumorais A e AR foram determinadas pelo teste do sinal de Wilcoxon ($p < 0,05$) (SNEDECOR e COCCHRAN, 1989).

4. Resultados

4.1. Tumor de W256

Todas as inoculações ip com células tumorais de W256 resultaram na formação de ascite. Na primeira passagem de cada uma das três séries experimentais, quando foram utilizadas células da variante A obtidas a partir de tumores sc (Figura 5), os animais desenvolveram ascite entre sete e nove dias após a inoculação. Contudo, a partir da segunda passagem, o tempo requerido para o desenvolvimento da ascite diminuiu e regularizou-se, e as células tumorais foram transplantadas a cada quatro a cinco dias. Variações neste período (7 a 9 dias) foram observadas apenas em três ocasiões, o que representa menos de 3% das passagens ip realizadas. Em duas destas ocasiões o atraso para o desenvolvimento da ascite ocorreu quando as células tumorais foram caracterizadas como AR (Figura 6B, 22^a e 23^a passagens), enquanto que na outra o atraso ocorreu dentro da série de passagens ip com células da variante A (Figura 6A, 6^a passagem).

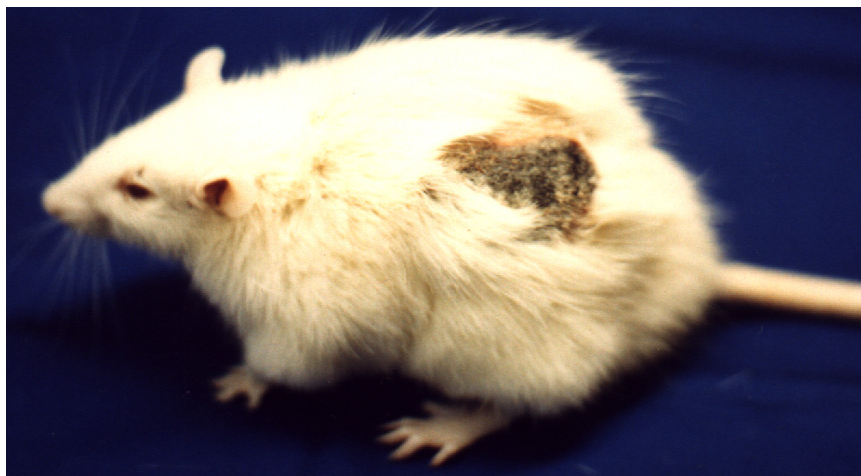


Figura 5. Rato doador de células da variante A do W256 usadas na 1ª passagem ip.

4.2. Conversão da variante A para AR do tumor de W256

A cada passagem com células tumorais, as variantes A e AR do tumor de W256 foram caracterizadas pelas alterações induzidas no baço e na FO das hemácias circulantes do rato. A Figura 6 mostra as alterações da FO, descrita como fragilidade corpuscular média, e o peso relativo do baço nos experimentos realizados. No início da seqüência de passagens ip, as quais seguiram o transplante a partir dos tumores sc, observou-se a

predominância de variações negativas na FCM (indicando a diminuição na FO das hemácias) associada à esplenomegalia moderada (30% em média).

A conversão da variante A para AR foi observada em todas as séries experimentais realizadas (experimentos A, B e C respectivamente, Figura 6).

A conversão das células tumorais para a variante AR foi evidenciada pelo aumento marcante no peso relativo do baço, seguida, após duas a três passagens ip, pelo aumento na FO das hemácias (variação positiva na FCM). A partir deste momento, observou-se a predominância de variações positivas na FCM, indicando o aumento na FO das hemácias dos ratos doadores das células tumorais. A esplenomegalia acentuada também passou a predominar (Figura 7). De fato, os valores médios encontrados para a variação na FCM e esplenomegalia diferem significativamente quando animais portadores da variante A são comparados com os portadores da variante AR (Figura 8).

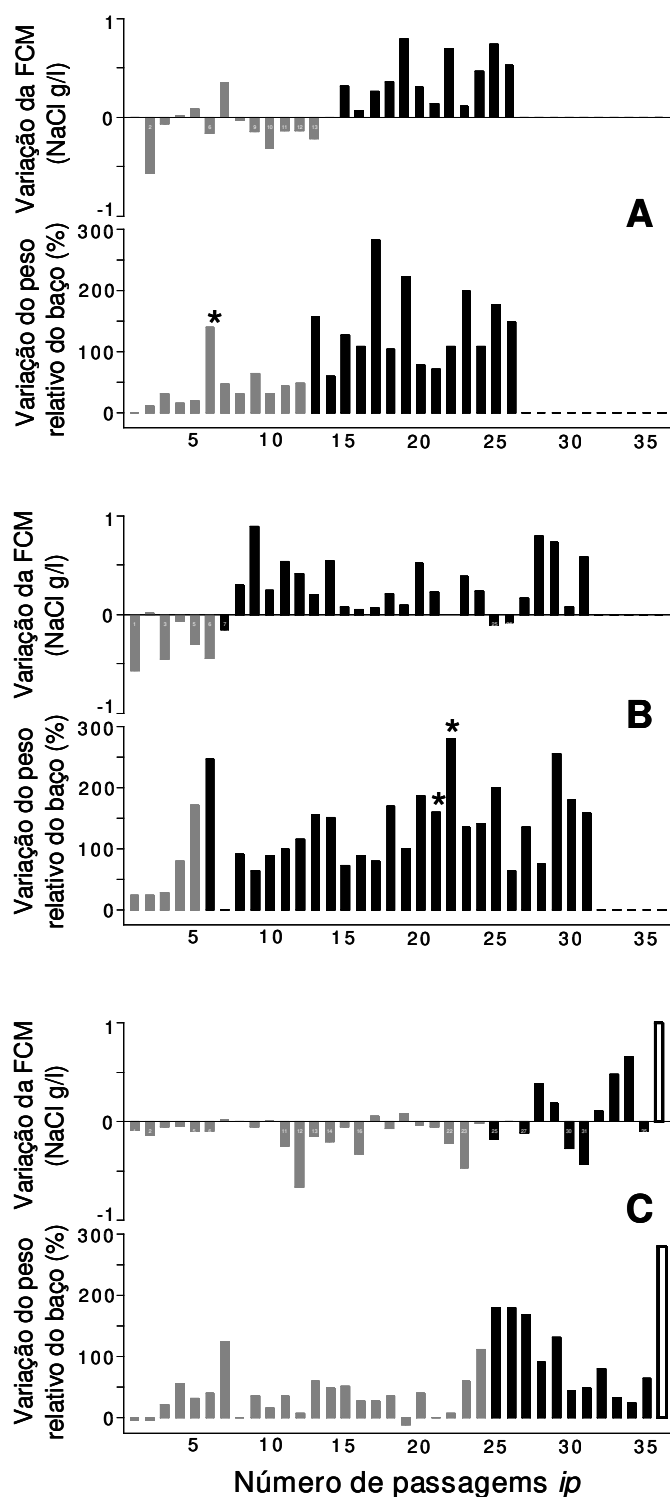


Figura 6. Variação da fragilidade osmótica de hemácias e do peso relativo do baço nos três experimentos (A,B e C) após as passagens ip sucessivas com células do tumor de W256 (20×10^6 células/ml, cada 4-5 dias). (■) variante A, (■) variante AR. FCM: fragilidade corpuscular média= concentração de NaCl(g/l). (□) Rejeição tumoral no experimento C na 36ª passagem; *7-9 dias.

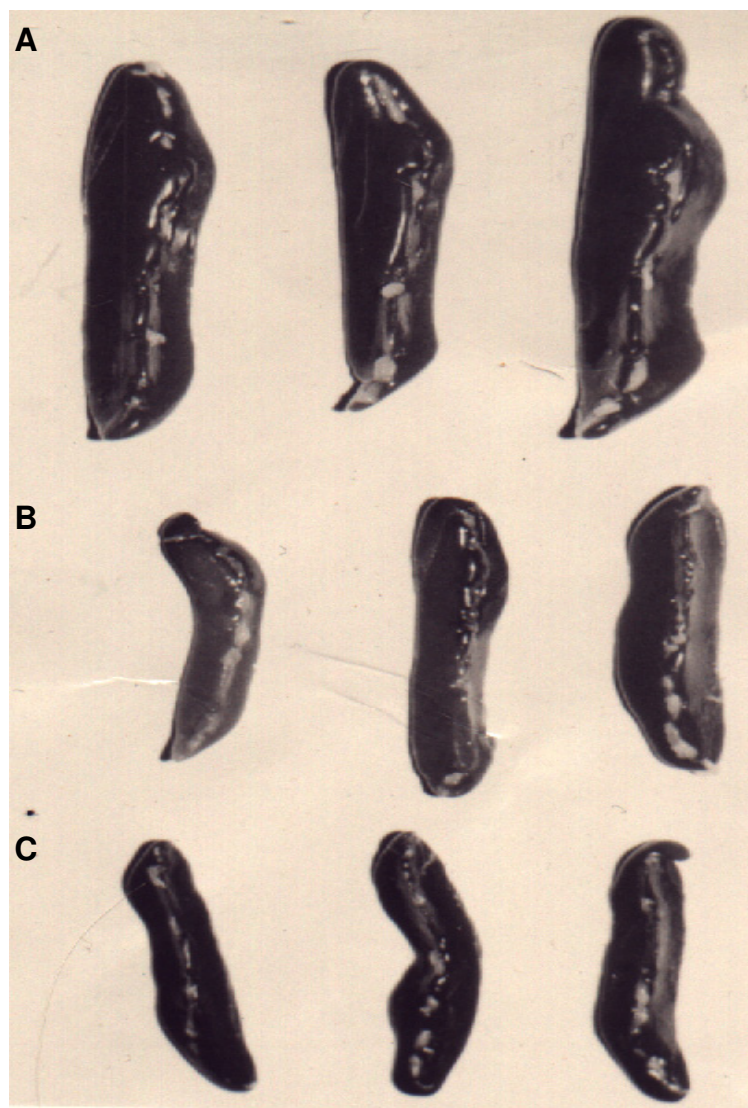


Figura 7. Baços de animais portadores do tumor de W256 variante AR (A), variante A (B) e animais saudáveis (C).

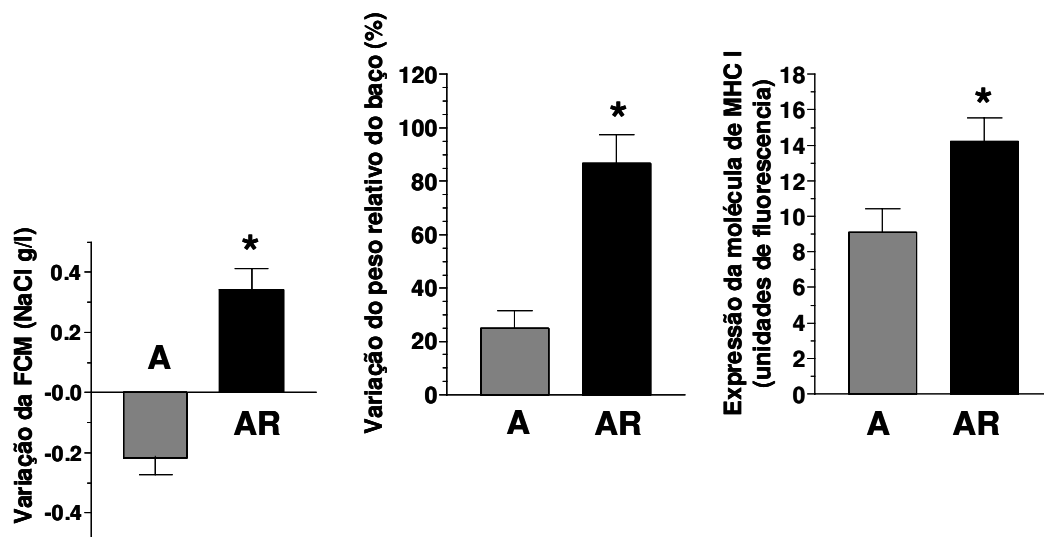


Figura 8. Variação da fragilidade osmótica das hemácias, peso relativo do baço e expressão de MHC classe I em ratos portadores de tumor ascítico da variante A (■ n=10) e variante AR (■ n=15). FCM: fragilidade corpuscular média= concentração de NaCl(g/l). Dados relatados como significativo $\pm$ SEM. *P<0,05

4.3. Rejeição da variante AR do tumor de W256

Após a conversão da variante tumoral A em AR e com a continuidade das passagens ip sucessivas, observou-se a rejeição das células tumorais em uma das três séries experimentais (Figura 6, C passagem ip 36). A rejeição ip de células da variante AR foi acompanhada do aumento expressivo da FO das hemácias (variação da FCM = 1,0g de NaCl) e esplenomegalia (variação do peso relativo do baço = 280%), seguido da imunização do rato contra as variantes tumorais A e

AR (dados não apresentados). A imunização foi confirmada através de novas inoculações ip com altas doses de células tumorais de W256 (100×10^6 células).

4.4. Expressão da molécula do MHC classe I nas células tumorais

Investigou-se a expressão da molécula do MHC classe I, uma vez que a presença desta molécula corresponde a um mecanismo amplamente utilizado para explicar o aumento da imunogenicidade de células tumorais. Conforme esperado, a variante A de W256, crescendo no tecido sc, era composta predominantemente por células MHC classe I negativas (Figura 9). Após a inoculação ip das células tumorais obtidas a partir do tumor sc e no decorrer das passagens ip caracterizadas como variante A, a quantidade de células MHC classe I positivas permaneceu baixa. Entretanto, após a conversão das células tumorais em variante AR a intensidade relativa de fluorescência aumentou 1,6 vezes ($n=15$, $14,21 \pm 1,32$) em relação à observada para a variante A ($n=10$, $9,10 \pm 1,22$). Esta observação indicou o aumento expressivo no número de células tumorais MHC classe I positivas (Figuras 8 e 9).

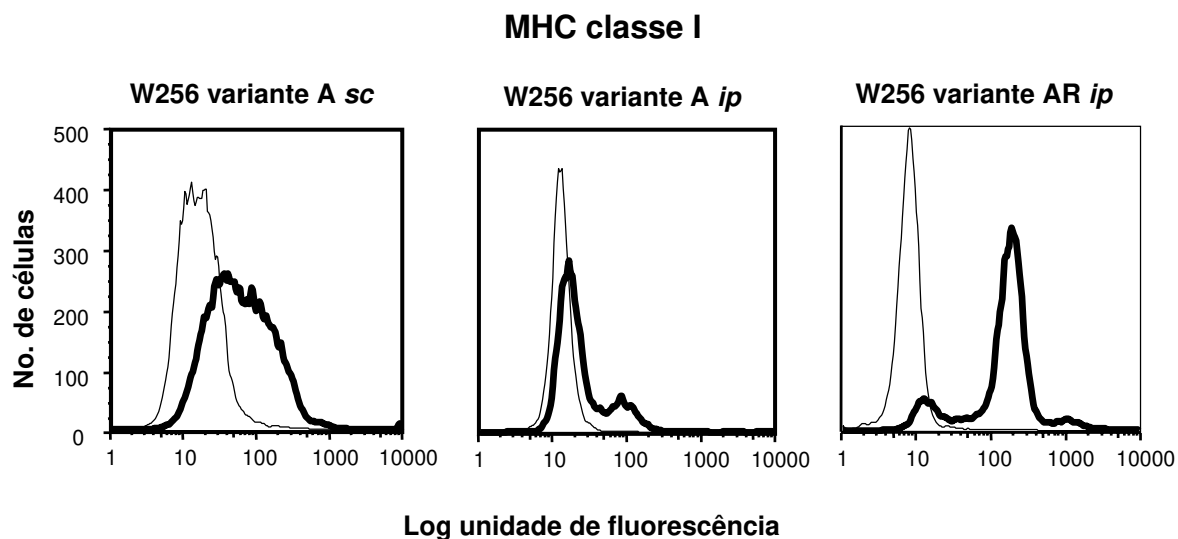


Figura 9. Expressão do MHC classe I na superfície de células das variantes A e AR do tumor de W256. Os histogramas expressam o que foi obtido em um mínimo de 5 ensaios. Anti-MHC classe I de rato (RT1A) conjugado com FITC (—) e anti-IgG1 conjugado com FITC (—). O eixo X denominado contagens, corresponde ao número de células contadas pelo citômetro de fluxo.

5. Discussão

O tumor de W256 é bem conhecido por sua capacidade de crescimento em ratos, e regressões espontâneas são raramente observadas (IWAMA de MATTOS, 1979; IWAMA de MATTOS et al., 1980). As células da variante A do tumor de W256, usadas para iniciar os experimentos do presente estudo, foram obtidas a partir de transplantes de tecidos tumorais sólidos, que cresceram no tecido sc de ratos não isogênicos (raça Wistar). A não isogenicidade dos animais utilizados para se obter a variante A é um fator crucial para que se consiga células tumorais com alta capacidade de crescimento. Cada transplante feito entre animais não isogênicos correspondia à sujeição destas células tumorais a respostas de diferentes origens, fazendo então, com que fossem selecionadas, restando apenas aquelas que continham maior capacidade de crescimento.

De acordo com o artigo de EARLE (1935), o tumor de W256 foi obtido após transplantes sucessivos de um tumor de origem espontânea na mama de uma rata adulta. Earle relatou que Walker obteve 100% de crescimento tumoral ao final de transplantes sucessivos no tecido sc (a partir do doador original para

oito ratos receptores). Este alto percentual de crescimento tumoral, foi também observado quando diferentes raças de ratos foram usadas.

A respeito de regressões espontâneas de tumores, EARLE (1935), relatou: “Durante todos os transplantes que realizou em seu laboratório entre 1928 e 1932, Dr. Walker se deparou com apenas quatro regressões tumorais”. Logo, a capacidade de crescimento tumoral de W256 é uma característica bem conhecida, apresentando raros casos de regressão.

No Laboratório de Pesquisas Bioquímicas do CAISM já obtivemos, a partir de transplantes sc, tumores com 99% de crescimento local. Estes tumores, com capacidade de crescimento muito maior do que aqueles que os originaram, foram adquiridos graças a um mecanismo que envolve transplantes sucessivos, realizados para selecionar os que têm maior capacidade de crescimento. Ou seja, em um grupo de quatro doadores de tumor sc, escolhíamos sempre o que apresentava maior taxa de crescimento (1,0 g/dia, por volta do 20º dia de crescimento). Após repetir este procedimento, aproximadamente cinco vezes, obtínhamos uma variante tumoral bem mais agressiva que a original. Esta variante que apresentava as características de A era inoculada na cavidade ip de ratos para se fazer o estudo da origem da variante menos agressiva, denominada AR. Portanto, tumores de W256 sc que apresentam altas taxas de crescimento são boa fonte de uso da variante A para estudar a hipótese do papel do ambiente ip na geração da variante AR.

Neste sentido, o presente estudo confirmou a observação prévia de que transplantar sucessivamente células da variante A, através da cavidade ip de ratos, acarretaria expansão clonal destas células, resultando na origem da variante AR (Rettori, comunicação pessoal). Porém, não havíamos realizado o acompanhamento detalhado, utilizando o estudo das alterações na variação da FO de hemácias circulantes, peso relativo de baços e determinação de MHC classe I, das células tumorais de W256 durante passagens ip, como neste trabalho.

Estudos prévios mostraram que a principal característica da variante A é induzir anemia aguda em ratos, acompanhada de diminuição da FO das hemácias, indicando redução no volume dos eritrócitos circulantes (VIDO et al., 2000; VIDO, 2000; GREGORINI, 2001; RETTORI et al., 2001; VIEIRA-MATOS et al., 2001; GUIMARÃES et al., 2002; SCHANOSKI et al., 2002; CAVALCANTI et al., 2003). De maneira contrária ao que ocorre na variante A, foi observado que ratos portadores da variante AR do tumor de W256 desenvolvem anemia temporária associada ao aumento marcado na FO das hemácias (RETTORI et al., 2001; VIEIRA-MATOS et al., 2001; GUIMARÃES et al., 2002; SCHANOSKI et al., 2002; CAVALCANTI et al., 2003). Além disso, para definirmos as variantes tumorais como A ou AR, durante a seqüência de passagens ip de células, foram avaliadas a alteração no peso de baços e a FO das hemácias, a fresco, obtidas de ratos doadores em cada passagem ip das células de W256.

As inoculações ip de suspensões de células da variante A, obtidas de tumor sólido, foram consideradas como primeiras passagens. Na primeira passagem, todos os ratos desenvolveram ascite entre sete e nove dias após a inoculação

das células tumorais e a morte ocorria após dez dias da inoculação. Contudo, na segunda e nas passagens ip subseqüentes, o tempo requerido para o desenvolvimento da ascite foi menor e menos variável (quatro a cinco dias).

Os resultados do presente estudo confirmaram que as variantes A e AR necessitam do mesmo tempo para desenvolver ascite: após 4-5 dias o líquido ascítico contém 120×10^6 células/ml, utilizando-se a inoculação original de 20×10^6 células/ml. Foi observado também que em 3% do total de passagens de células, a formação da ascite ocorreu, aproximadamente, após 9 dias. Em duas ocasiões, o atraso da ascite foi observado durante o período no qual os tumores ascíticos foram caracterizados como pertencentes à variante AR (Figura 6 B, 22^a e 23^a passagens ip) e em uma das ocasiões durante o período em que as características da variante A predominaram (Figura 6 A, 6^a passagem ip). Em todos estes casos, o retardo no desenvolvimento da ascite foi associado ao aumento do baço e da FO das hemácias (uma variação positiva na FCM, Figura 6).

O retardo na formação da ascite pode ser explicado pela provável imunogenicidade de AR perante a variante A, pois proporcionou maior sobrevida aos animais portadores do tumor. Além disso, o atraso no desenvolvimento da ascite em ratos portadores da variante A, nos casos observados neste estudo (3%), pode ser atribuído ao desenvolvimento de tumor sólido na cavidade ip, que foi observado durante a autópsia. A presença de tumor sólido no ip deveu-se ao erro na inoculação das células da variante A (ao invés de se fazer inoculação ip fez-se sc).

Apesar da variabilidade no número de passagens necessárias à conversão A-AR, o presente estudo mostrou que todas as passagens ip sucessivas resultaram em células que tinham as características da variante AR. Nas três seqüências de passagens ip, as quais seguiram os transplantes a partir de tumor sc, foi observada, primeiramente, a predominância de alterações negativas ou nenhuma alteração na FCM (indicando uma diminuição na FO das hemácias) associada à esplenomegalia moderada. A conversão das células tumorais para a variante AR, durante as passagens ip, foi notada por esplenomegalia marcada e aumento na FO das hemácias.

Continuando as passagens ip após a detecção da variante AR, foi observada, em uma das repetições experimentais, a rejeição das células tumorais. A rejeição das células tumorais AR de W256 já foi descrita em ratos portadores de tumor sc (SCHANOSKI, 2000; RETTORI et al., 2001; VIEIRA-MATOS et al., 2001; GUIMARÃES et al., 2002; SCHANOSKI et al., 2002). Todavia, no presente estudo foi a primeira vez que se detectou a rejeição de células tumorais AR na cavidade intraperitoneal. Similar à rejeição sc, a ip da variante AR de W256 foi acompanhada pelo aumento expressivo da FO das hemácias (variação de FCM= 1,0g NaCl) e esplenomegalia por volta de 280% em relação ao baço de ratos normais. A rejeição foi seguida de possível desenvolvimento de imunidade contra ambas as variantes tumorais, como aconteceu na regressão de tumores sc. Após esta rejeição da variante AR, desafiamos o rato com inoculações de altas doses de células tumorais das duas variantes (100×10^6 células tumorais) e o animal foi incapaz de desenvolver o tumor. Contudo, de maneira diferente da

rejeição do tumor sc (60% a 80% de rejeições nos animais portadores do tumor) o presente estudo mostra que as rejeições ip são raramente observadas.

A possível explicação para a diferença entre crescimento do tumor de W256 no ip e no sc poderia estar relacionada ao microambiente ip, o qual permitiria a alta taxa de proliferação das células da variante AR de W256. Nos tumores subcutâneos, a proliferação celular poderia ser rapidamente limitada pelo aumento da deficiência na irrigação, acompanhada de necrose tumoral. A necrose dificultaria, então, a proliferação das células tumorais. Neste momento, estima-se que metade das novas células formadas entraria em estado permanente de G_1 ou de G_0 após cada replicação, levando-as ao processo de necrose ou de apoptose, enquanto que na cavidade intraperitoneal as células tumorais continuariam tendo condições para proliferarem (BASSUKAS e MAURER-SCHULTZE, 1990; TANNOCK, 1992; RETTORI et al., 1995; VIDO; 2000; VIDO et al., 2000). Como se pode imaginar, as células entrando em estado permanente de G_1 ou de G_0 , logo após a replicação, ficam estagnadas ao processo de crescimento, pois seu ciclo celular é interrompido.

Como consequência, os efeitos letais do tumor seriam induzidos precocemente na cavidade ip, não dando tempo para o desenvolvimento eficaz da resposta imune. Além disso, a cavidade ip poderia ser considerada como o ambiente excelente para a nutrição e proliferação das células tumorais, no qual a ascite se desenvolve tendo ausência de necrose.

Todas estas observações corroboram com o estudo prévio que sugere que as alterações na FO das hemácias, induzidas pela variante AR, poderiam estar associadas com a resposta imune contra o câncer. Nesse estudo discute-se que a possível participação de imunoglobulinas e a presença de resposta imune policlonal possam ser responsáveis pela natureza hemolítica da anemia, com sua manifestação precoce e temporária, em animais portadores de AR e, ainda, sinalizando para a elaboração da resposta imune adaptativa do hospedeiro, a qual nem sempre é garantida (CAVALCANTI et al., 2003).

Diferentes mecanismos têm sido descritos para se explicar o porquê das muitas falhas da resposta imune contra os tumores. BURNET (1970), definiu como vigilância imunológica a capacidade do sistema imunológico do hospedeiro de detectar patógenos, bem como células tumorais. A vigilância imunológica seria capaz, então, de distinguir as células normais daquelas que sofreram alguma modificação (GARRIDO e ALGARRA 2001). A afirmativa de que o câncer é causado pelo crescimento progressivo da progênie de uma única célula que sofreu modificações genéticas (JANEWAY et al., 2001; PARDOLL, 2003) sugere que as células tumorais deveriam ser reconhecidas pela vigilância imunológica. De fato, muitos estudos acordaram e estudaram a presença desta vigilância imunológica contra o câncer, porém, isto só foi possível porque foram detectadas algumas vias de escape usadas pelas células tumorais. Esses estudos discutiram ainda que sem estes mecanismos de escape o crescimento tumoral não ocorreria, ou seria confinado e controlado pelo sistema imunológico do hospedeiro (GARRIDO e ALGARRA, 2001; SMYTH et al., 2001; DUNN et

al., 2002; KHONG e RESTIFO, 2002; TODRIK, 2002; GARCIA-LORA et al., 2003a;b;c; PARDOLL, 2003).

Dentre os muitos mecanismos de escape detectados, já se documentou que as transformações malignas que ocorrem nas células tumorais são acompanhadas por mudanças fenotípicas celulares, as quais podem envolver a expressão da molécula de MHC classe I por estas células. Falhas quantitativas e qualitativas na expressão da molécula de MHC classe I pelas células tumorais são alterações freqüentemente observadas em tumores humanos e experimentais. Estas falhas na expressão do MHC classe I são usadas para explicar a redução na imunogenicidade das células tumorais e na resposta imunológica citotóxica (FESTENTEIN e GARRIDO, 1986; HÄMERLING et al., 1986; LJUNGGREN e KÄRRE, 1986; GAFORIO et al., 1991; PETERSEN et al., 1991; MIALDEA et al., 1992; MUTTI et al., 1998, REES e MIAN, 1999; GARCIA-LORA et al., 2001; GARRIDO e ALGARRA, 2001; FOSS, 2002, GARCIA-LORA et al., 2003a;b;c).

Em conexão com este conhecimento comum, o presente estudo mostrou que a variante A, crescendo no tecido sc, é predominantemente constituída por células MHC classe I negativas, um fato que pode contribuir para a tumorigenicidade. Após a inoculação de suspensão celular a partir de tumor sc na cavidade ip de ratos e durante a seqüência de passagens ip sucessivas, quando as células tumorais foram caracterizadas como pertencentes à variante A, a predominância de células MHC classe I negativas diminuiu consideravelmente. Contudo, a intensidade relativa de fluorescência encontrada, após a conversão das células tumorais em AR, aumentou 1,6 vezes ($n=15$, $14,21 \pm 1,32$) em

comparação com as da variante A ($n=10, 9,10\pm1,22$), indicando aumento no número de células tumorais MHC classe I positivas. Este resultado sugere a possível relação entre a expressão da molécula de MHC classe I e o aumento da imunogenicidade das células da variante AR. O presente trabalho propõe que a cavidade ip dos ratos é um ambiente que promove condições para o aumento das células tumorais MHC classe I positivas. Além disso, estes resultados corroboram com dados obtidos anteriormente que também mostram a existência de populações celulares heterogêneas em tumores, as quais são compostas por células MHC classe I negativas e positivas, porém sempre havendo predominância de uma ou da outra população celular (GARCIA-LORA et al., 2003a;b;c).

O mecanismo exato acerca da origem da variante AR ainda é desconhecido. Todavia, a explicação aceita para a origem de novas variantes tumorais é que este fenômeno seria consequência de propagação diferencial de subclones tumorais em seu microambiente, o qual incluiria o sistema imunológico, processo este recentemente chamado de “*immunological sculpting*” (TANNOCK, 1983; DUNN et al, 2002; KHONG e RESTIFO, 2002). O modelo tumoral de W256 é constituído por ambas as células, MHC classe I positivas e negativas, as quais seriam diferencialmente selecionadas e se propagariam, dependendo se inoculadas no tecido sc ou no ip.

Além disso, sabe-se que neste processo de crescimento tumoral na cavidade ip, bem como no “*immunological sculpting*”, há grande participação das células NK (KAWAMURA et al., 1999; DAS e KHAR, 2002). Este fato pode estar conectado com a destruição seletiva de células MHC classe I negativas

(variante A) de W256 na cavidade ip, já que as células NK somente são capazes de reconhecer as células tumorais que não expressam MHC classe I (hipótese do “*missing self*”). Desta forma, uma vez ocorrendo ausência desta molécula nas células tumorais - bem como de W256 - suscitaria para que as mesmas estivessem mais susceptíveis à mediação citotóxica das células NK, as quais seriam capazes de exercer resposta imunológica eficiente contra as células tumorais (GIEZEMAN-SMITS et al., 1995; MORETTA et al., 1996; ROLSTAD et al., 1997; SMYTH et al., 2000; JANEWAY et al., 2001; ROLSTAD et al., 2001; DAS e KHAR, 2002; FARAG et al., 2002; KELLY et al., 2002).

Dessa forma, os resultados do presente estudo sugerem que a geração da variante AR seria consequência de fatores presentes na cavidade ip, os quais levariam a um aumento nas células de W256 MHC classe I positivas, provavelmente devido a uma seleção imunológica das células tumorais MHC classe I negativas.

6. Conclusões

- Alterações na fragilidade osmótica das hemácias, bem como as que ocorrem no peso relativo dos baços de animais portadores de W256, e expressão de MHC classe I pelas células tumorais, são fatores que podem ser comparados e interligados. Os animais portadores da variante A possuem diminuição na fragilidade osmótica das hemácias, esplenomegalia moderada e baixa expressão da molécula de MHC classe I. Os animais portadores da variante AR, apresentam características opostas.
- No líquido ascítico contendo células de W256, há duas populações celulares heterogêneas, uma MHC classe I positiva (variante AR) e outra MHC classe I negativa (variantes A). Isto ocorre, provavelmente, porque no ip dos animais as células da variante AR podem ser destruídas pelas células T citotóxicas, pois são reconhecidas através da expressão do MHC classe I, aumentando, assim, o número de células da variante A (MHC classe I negativas). Este processo é

chamado de imunosseleção. Entretanto, todos estes mecanismos ainda não foram comprovados.

- A provável imunogenicidade da variante AR em relação à variante A do tumor de W256 está relacionada com a maior expressão, por AR, da molécula de MHC classe I.

7. Referências Bibliográficas

ABRAHAMSOHN, I.A. Células e órgãos do sistema imune. In: CALICH, V; VAZ, C. **Imunologia**. Rio de Janeiro: Revinter; 2001. p.31-54.

BASSUKAS, I.D.; MAURER-SCHULTZE, B.D. Growth of metastases of the mouse adenocarcinoma EO 771: an allometric relationship between growth of the primary tumors and their metastases. **Clin Exp Metast**, 8:329-43, 1990.

BONNOTTE, B.; FAVRE, N.; MONTET, M.; FROMENTIN, A.; SOLARY, E.; MARTIN, M. et al. Bcl-2-mediated inhibition of apoptosis prevents immunogenicity and restores tumorigenicity of spontaneously regressive tumors. **J Immunol**, 161:1433-8, 1998.

BURNET, F.M. The concept of immunological surveillance. **Progr Exp Tumor Res**, 13:1-27, 1970.

CAVALCANTI, T.C.; GREGORINI, C.C.; GUIMARÃES, F.; RETTORI, O.; VIEIRA-MATOS, A.N. Changes in red blood cell osmotic fragility induced by total plasma and fractions from rats bearing progressive and regressive variants of the Walker 256 tumor. **Braz J Med Biol Res**, 36:887-95, 2003.

DACIE, J.V.; LEWIS, S.M.; GORDON, E.C. Investigation of hereditary haemolytic anaemias, In: DACIE, J.V.; LEWIS, S.M. **Practical hematology**. Churchill Livinstone; 1984. p.152-78.

DAS, S.; KHAR, A. Regulation of NK cell function in vivo by those of tumour transplanted in the peritoneum. **Immunol Letters**, 83:133-42, 2002.

DUNN, G.P.; BRUCE, A.T.; LLOYD, J.O.; SCHREIBER, R.D. Cancer immunoediting: from immuno-surveillance to tumor scape. **Nature Immunol**, 3:991-8, 2002.

EARLE, W.R.A. Study of the Walker rat mammary carcinoma 256, in vivo and in vitro. **Am J Cancer**, 24:566-612, 1935.

FARAG, S.S.; FEHINGER, L.R.; VELARDI, A.; CALIGURI, M.A. Natural Killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. **Blood**, 100:1935-47, 2002.

FESTENSTEIN, H.; GARRIDO, F. MHC antigens and malignancy. **Nature** 322:502-3, 1986.

FOSS, F.M. Immunologic mechanisms of antitumor activity. **Sem Oncol**, 29:5-11, 2002.

GABRILOVICH, D.; PISAREV, V. Tumor Scape from Immune Response: Mechanisms and Targets of activity. **Curr Drug Targ**, 4:1-11, 2003.

GAFORIO, J.J.; PÉREZ, M.; ALGARRA, I.; MIALDEA, M.J.; LJUNGGREN, H.G.; GARRIDO, F. Differential mRNA levels of c-myc, c-fos and MHC class I in several clones of a murine fibrosarcoma. **Int J Cancer**, 49:906-10, 1991.

GARCIA-LORA, A.; ALGARRA, I.; GAFORIO, J.; RUIZ-CABELLO, F.; GARRIDO, F. Immunoselection by T lymphocytes generates repeated MHC class I-deficient metastatic tumor variantes. **Int J Cancer**, 91:109-19, 2001.

GARCIA-LORA, A.; ALGARRA, I.; COLLADO, A.; GARRIDO, F. Tumour immunology, vaccination and escape strategies. **Eur J Immunogenetic**, 30:177-83, 2003a.

GARCIA-LORA, A.; MARTINEZ, M.; ALGARRA, I.; GAFORIO, J.J.; GARRIDO, F. MHC class I-deficient metastatic tumor variants immunoselected by T lymphocytes originate from the coordinated downregulation of APM components. **Int J Cancer**, 106:521-7, 2003b.

GARCIA-LORA, A.; ALGARRA, I.; GARRIDO, F. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. **J Cell Physiol**, 195:346-55, 2003c.

GARRIDO, F.; PÉREZ, M.; DELGADO, C.; GARRIDO M. L.; ROJANO, J., ALGARRA, I. et al. Influence of class I H-2 gene expression on local tumor growth. **Exp Clin Immunogenetic**, 13:98-100, 1986a.

GARRIDO, M.L.; PÉREZ, C.; DELGADO, J.; ROJANO, I.; ALGARRA, A.; GARRIDO, F. Immunogenicity of H-2 positive and H-2 negative clones of a mouse tumour, GR9. **J Immunogenetic**, 13:159-67, 1986b.

GARRIDO, F.; ALGARRA, I. MHC antigens and tumor escape from immune surveillance. **Adv Cancer Res**, 83:117-58, 2001.

GIEZEMAN-SMITS, M.; KUPPEN, K.; GEESKE, E.; EGGERMONT, A.; STALS, F.; WONIGEIT, K. et al. The role of MHC class I expression in rat NK cell-mediated lysis of singeneic tumor cells and virus-infected cells. **Immunobiology**, 195:286-99, 1995.

GUAITANI, A.; RECCHIA, M.; CARLI, M.; ROCCHETTI, M.; BARTŐSEK, I.; GARATTINI, S. Walker carcinoma 256: a model for studies on tumor induced anorexia and cachexia. *Oncology*, 39:173-8, 1982.

GUAITANI, A.; TORRE, P.D.; MORASCA, L.; PINTUS, C.; BARTŐSEK, I. Two line of Walker carcinoma 256: their peculiarities and different interactions with the host. *Tumori*, 69:1-9, 1983.

GUIMARÃES, F.; RETTORI, O.; VIEIRA-MATOS, A.N.; FERNANDES, S.A. The influence of septal lesions on sodium and water retention induced by Walker 256 tumor. *Braz J Med Biol Res*, 32:309-17, 1999.

GUIMARÃES, F. **Influência da lesão da área septal do cérebro de ratos sobre os linfócitos (CD4⁺ e CD8⁺) do baço e efeitos sistêmicos induzidos pelo tumor de Walker 256.** Campinas, 2000. [Tese - Doutorado – Instituto de Biologia - UNICAMP].

GUIMARÃES, F.; SCHANOSKI, A.; CAVALCANTI, T.C.; VIEIRA-MATOS, A.N.; RETTORI, O. Early splenic hipertrophy after intra-peritoneal (ip) inoculation of a regressive variant (AR) of the Walker 256 tumor. In: XXV INTERNATIONAL MEETING OF THE BRAZILIAN SOCIETY OF IMMUNOLOGY: Insights for Therapeutic Intervention, Florianópolis, 2000a.

GUIMARÃES, F.; CAVALCANTI, T.C.; VIEIRA-MATOS, A.N.; FERNANDES, G.; RETTORI, O. Progressive and regressive Walker 256 tumors as models for study on innate immunity. In: **15^a** REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, Caxambu, 2000b.

GUIMARÃES, F.; CAVALCANTI, T.C.; VIEIRA-MATOS, A.N.; FERNANDES, G.; RETTORI, O. Innate immune response (I.I.R.) related effects in the Walker 256 “A” progressor tumor and its “AR” regressor variant. In: **15^a** REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, Caxambu, 2000 c.

GUIMARÃES F; SCHANOSKI A.; JULIANO P.B., CAVALCANTI T.C., VIEIRA-MATOS A.N., RETTORI O. Study of Walker 256 tumor shifts from A variant into AR immunogenic variant through successive intraperitoneal passages. In: XXVII CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE IMUNOLOGIA, Salvador, 2002.

GREGORINI, C.C. **Isolamento parcial de frações protéicas plasmáticas de ratos com Tumor de Walker 256 associadas às alterações de fragilidade osmótica de Hemácias**. Campinas, 2001 [Dissertação - Mestrado – Instituto de Biologia – UNICAMP].

HÄMMERLING, G.J.; KLAR, D.; KATZAV, S.; SEGAL, S.; FELDMAN, M.; WALLICH, R. et al. A. Manipulation of metastasis and tumour growth by transfection with histocompatibility class I genes. **J Immunogenetic**, 13:153-7, 1986.

IWAMA, M.C.F.; FRANCO, M.F.; LEMONICA, L. Tumor de Walker. Um bom modelo experimental para o ensino de neoplasias. **Ciência e Cultura**, 23:267-71, 1973.

IWAMA de MATTOS, M.C.; FRANCO, M.F.; BASSO, N.A. Histologia dos nódulos linfáticos regionais e distantes de ratos transplantados com tumor de Walker. **Ciência e Cultura**, 26:175-9, 1974.

IWAMA DE MATTOS, M.C.F. Carcino-sarcoma 256 de Walker: Disseminação metastática em duas linhagens do tumor. **Rev. Bras Pesq Biom Biol**, 12:147-53, 1979.

IWAMA DE MATTOS, M.C.F.; MONTENEGRO, M.R.; SILVA, C.R.V. Walker 256 carcinossarcoma: pathology, microscopic and ultrastructural features of tumoral circulating cells. **Ciência e Cultura**, 32:849-57, 1980.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHOLOMCHIK, M.
Manipulation of the Immune Response. In: JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.;
WALPORT, M.; SHOLOMCHIK, M. **Immunobiology**. Garland Publishing, 2001.
p. 566-67.

KAWAMURA, T.; SEKI, S; TAKEDA, K.; NARITA, J.; EBE, Y.; NAITO, M. et al.
Protective effect of NK1.1+T cells as NK cells against intraperitoneal tumors in
mice. **Cell immunol**, 193:219-25, 1999.

KELLY, J.M.; DARCY, P.K.; MARKBY, J.L.; GODFREY, D.I.; TAKEDA, H.Y.;
SMYTH, M.J. Induction of tumor-specific T cell memory by NK cell-mediated
tumor rejection. **Nature Publ Groups**, 3:83-90, 2002.

KHONG, H.T.; RESTIFO, N.P. Natural selection of tumor variants in the
generation of “tumor escape” phenotypes. **Nature Immunol**, 3:999-1005, 2002.

LJUNGGREN, H.G.; KÄRRE, K. Variations in MHC antigen expression on
tumours and its significance experimental strategies and interpretations in the
analysis of changes in MHC genes expression during tumour progression.
Opposing influences of T cell and natural killer mediated resistance? **J**
Immunogenetic, 13:141-51, 1986.

MIALDEA, M.J.; MARTIN, J.; GAFORIO, J.J.; ALGARRA, I.; PÉREZ, M.;
GONZALEZ, A. et al. Effect of MHC class-I transfection on local tumor growth
and metastasis in an H-2-negative clone derived from a chemically induced
fibrosarcoma. **Int J Cancer**, 52:153-8, 1992.

MOREIRA, N.X.; CURI, R.; PADOVESE, R.; MANCINI-FILHO, J. Incorporation
of dietary *trans* mono-unsaturated fatty acids into tissues of Walker 256 tumor-
bearing rats. **Braz J Med Biol Res**, 34:501-8, 2001.

MORETTA, A.; BOTTINO, C.; VITALE, M.; PENDE, D.; BIASSONI, M.C.M.; MORETTA, L. Receptors for HLA class I molecules in human natural killer cells. ***Ann Rev. Immunol***, 14:618-48, 1996.

MORRISON, S.B. Water intake and exchange and hydration of rats during growth of Walker 256 carcinosarcoma. ***J Nat Cancer Inst***, 46:825-30, 1971.

MUTTI, L.; VALLE, M.; BALBI, B.; ORENGO, A.M.; LAZZARO, A.; ALCIATO, P. et al. Primary human mesothelioma cells express class II MHC, ICAM-1 and B7-2 and can present recall antigens to autologous blood lymphocytes. ***Int J Cancer***, 78:740-9, 1998.

PARDOLL, D. Does the immune system see tumors as foreign or self? ***Annual Rev. Immunol***, 21:807-39, 2003.

PÉREZ, M.; ALGARRA, I.; GARRIDO, F. Different H-2 phenotypes in clones derived from a new BALB/c solid tumor. Its relevance for local tumor growth. ***Inmunología***, 4:60-9, 1985.

PETERSEN, B.L.; ENGEL, A.M.; JULL-MADSEN, H.; MOURITSEN, S.; SVANE, I.; WERDELIN, O. Tumors developing in nude mice express unusually large amounts of MHC class I antigens. ***Acta Pathol Microb Immunol Scand***, 99:1111-9, 1991.

REES, R.C.; MIAN, S. Selective MHC expression in tumours modulates adaptative and innate antitumour responses. ***Cancer Immunol Immunoth***, 48:374-81, 1999.

RETTORI, O.; VIEIRA-MATOS, A.N.; TAHIN, Q.S. Variability and discontinuity of the pathognomonic systemic effects caused by the Walker 256 tumor progression in rats. ***Tumori***, 81:370-7, 1995.

RETTORI, O.; CAVALCANTI, T.C.; GUIMARÃES, F.; VIEIRA-MATOS, A.N. RBC's osmotic fragility studies during the induction of the hemolytic component of cancer anemia. **FASEB J**, 12:A-476, 1998.

RETTORI, O.; GUIMARÃES, F.; CAVALCANTI, T.; VIEIRA-MATOS, A.N. Main effects related with the immune response against the Walker 256 "A" tumor and its regressive "AR" variant. In: 11th INTERNATIONAL CONGRESS FOR IMMUNOLOGY, Stockholm, 2001.

ROLSTAD, B.; VAAGE, J.T.; NAPER, R.C.; LAMBRACHT, D.; WONIGEIT, K.; JOLY, E. et al. Positive and negative MHC class I recognition by rat NK cells. **Immunol Rev**, 155:91-104, 1997.

ROLSTAD, B.; NAPER, C.; LØVIK, G.; VAAGE, J.T.; RYAN, J.C.; BÄCKMAN-PETERSSON, E. et al. Rat natural killer cell receptor systems and recognition of MHC class I molecules. **Immunol Rev**, 181:149-57, 2001.

SCHANOSKI, A. **Desenvolvimento do tumor de Walker 256 AR em ratos imunossuprimidos por irradiação**. Campinas, 2000. [Trabalho de conclusão de curso - Instituto de Ciências Biológicas e Química – Pontifícia Universidade Católica de Campinas].

SCHANOSKI, A.; JULIANO, P.B.; CAMPOS, C.B.L.; CAVALCANTI, T.C., VIEIRA-MATOS, A.N., RETTORI, O. et al. Walker 256 tumor MHC class I expression during the shift from A variant into the immunogenic AR variant. In: 6th LATIN AMERICAN CONGRESS OF IMMUNOLOGY, Havana, 2002.

SIMPKINS, H.; LEHMAN, J.M.; MAZURKIEWICZ, J.E.; DAVIS, B.H. A morphological and phenotypic analysis of Walker 256 cells. **Cancer Res**, 51:1334-8, 1991.

SMYTH, M.J.; THIA, K.Y.T.; STREET, S.E.A.; CRETNEY, E.; TRAPANI, A.; TANIGUCHI, M. et al. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. **J exp Med**, 191:661-8, 2000.

SMYTH, M.J.; GODFREY, D.I.; TRAPANI, J.A. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. **Nature Publ Groups**, 2:293-9, 2001.

SNEDECOR, G.W.; COCCHRAN, W.G. Shortcut and non parametric methods, In: SNEDECOR, G.W.; COCCHRAN, W.G. **Statistical methods**, Iowa State University Press/AMES, 1989. p.71-140

TANNOCK, I.F. Biology of tumor growth. In: TANNOCK, I.F. Biology of tumor growth. **Hospital practice**. New York: MacGraw Hill; 1983. p.81-93.

TANNOCK, I.A. Cell proliferation. In: TANNOCK, I.A. **The basic science of oncology**. New York: MacGraw Hill; 1992. p.154-77.

TAYEK, J.A.; BRASEL, J.A. Effects of tumor necrosis factor- α on skeletal muscle and Walker 256 carcinosarcoma protein metabolism studied in vivo. **Cancer Res**, 90:175-81, 1990.

TOAL, J.N.; MILLAR, F.K.; BROOKS, R.H.; WHITE, J. Sodium retention by rats bearing the Walker carcinosarcoma 256. **Am J Physiol**, 200:175-81, 1960.

TODRYK, S.A. A sense of tumor for the immune system. **Immunology**, 107:1-4, 2002.

UNITED KINGDON COORDINATING COMMITTEE ON CANCER RESEARCH (UKCCR). Guidelines for the welfare of animals in experinebtal neoplasia. **Laboratory Animals**. 22: 195-01, 1998.

VENTRUCCI, G.; MELLO, M.A.; GOMES-MARCONDES, M.C. Effect of leucine-supplemented diet on body composition changes in pregnant rats bearing Walker 256 tumor, **Braz J Med Biol Res**, 34:333-8, 2001.

VIDO, A.A.; CAVALCANTI, T.C.; GUIMARÃES, F.; VIEIRA-MATOS, A.N.; RETTORI, O. The hemolytic component of cancer anemia: effects of osmotic and metabolic stress on the erythrocytes of rats bearing multifocal inoculations of the Walker 256 tumor. **Braz J Med Biol Res**, 33:815-22, 2000.

VIDO, A.A. **Estudo do componente hemolítico da anemia do câncer: efeito do estresse osmótico e metabólico nos eritrócitos de ratos portadores de tumor de Walker 256**. Campinas, 2000. [Dissertação -Mestrado – Instituto de Biologia - UNICAMP].

VIEIRA-MATOS, A.N.; RETTORI, O.; GUIMARÃES, F.; CAVALCANTI, T.C. Progressive and regressive Walker 256 tumors as models for the study of innate and adaptive immune responses. In: 11th INTERNATIONAL CONGRESS FOR IMMUNOLOGY, Stockholm, 2001.

ZUCKER, S.; LYSIC, R. M.; DI STEFANO, J. Pathogenesis of anemia in rats with Walker 256 carcinosarcoma. **J Clin Med**, 90:502-11, 1977.

8. Bibliografia de Normatizações

FRANÇA, J.L.; BORGES, S.M.; VASCONCELLOS, A.C.; MAGALHÃES, M.H.A.
– **Manual para normatização de publicações técnico-científicas**. 4^a ed.,
Editora UFMG, Belo Horizonte, 1998. 213p.

Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses. Faculdade
de Ciências Médicas, UNICAMP. Ed. SAD – Deliberação CCPG-001/98
(alterada 2002).

9. Anexos

9.1. Anexo 1 - Artigo aceito pela revista Cancer Letters em janeiro de 2004.

Walker 256 tumor MHC class I expression during the shift from A variant to the immunogenic AR variant

Alessandra Soares Schanoski¹, Tereza Cristina Cavalcanti¹, Cláudia Barbosa Ladeira Campos², Ana Neuza Viera-Matos³, Ovídio. Rettori³ and Fernando Guimarães^{1*}

¹ Laboratório de Pesquisas Bioquímicas, Centro de Assistência Integral à Saúde da Mulher, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

² Laboratório de Bioenergética, Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

³ Departamento de Ciência da Saúde, Colegiado de Medicina, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, Brasil

*Address for correspondence:

Fernando Guimarães

Laboratório de Pesquisas Bioquímicas – CAISM

Universidade Estadual de Campinas

PoBox 6081, CEP 13083-970 – Campinas, SP-Brasil

E-mail: samico@caism.unicamp.br

Phone: + 55 (19) 37889462

FAX: +55-19-788-9383

The abbreviations used are: FACS, fluorescence-activated cell sorter; FITC, fluorescein isothiocyanate-conjugated; PBS, phosphate buffer saline; SEM, standard error of the mean

Abstract

Novel tumor cell variants can be obtained by serially passaging tumor cells in different media and/or environments. Serial intraperitoneal (ip) passages of the Walker 256 tumor A variant was followed for studying the generation of its regressive AR variant. MHC class I molecule expression was assessed since variations in this molecule would explain changes in tumor cell immunogenicity and therefore, the shift from progressive A variant to the regressive AR variant. Within 25 ip passages all serial repetitions shifted from A to AR variant, which was characterized by a significant increase in red blood cell (RBC) osmotic fragility with marked spleen hypertrophy in the host. In one serial repetition AR tumor cells were rejected (ip passage number 36) and immunity against the AR and A variants was conferred. Flow cytometry analysis showed a significant increase in the number MHC class I positive cells in AR variant ($n=15$, 14.21 ± 1.32) compared with A variant ($n=10$, 9.10 ± 1.22). These data provide evidence that the generation of the AR variant could result from factors present in the ip environment leading to an increase in the number of Walker 256 MHC class I positive tumor cells, probably due to immune selection of MHC class I negative tumor cells.

Key words:

MHC class I expression, ascitic tumor, tumor cell variants, Walker 256 tumor

1. Introduction

In the field of experimental oncology, it is well known that novel tumor cell variants can be obtained by serial passages of a given tumor in different media and/or environments. In an *in vivo* system this phenomenon, frequently considered to be random, is usually explained in terms of microenvironment/medium selective pressures which could lead to tumor cell changes and/or a clone expansion, resulting in any different tumor variant [1-2]. Novel tumor variants very often exhibit differences from their original tumors, concerning local growth and metastatic capacities [3-5].

The Walker 256 (W256) tumor has been extensively used in studies of cancer pathophysiology [6-12]. Two variants of this tumor have been previously reported as W256 A and B [9]. During the course of investigation into the systemic effects induced by the tumor, a regressive W256 variant named AR was obtained. The AR variant was obtained after serial passages of W256 A tumor cells in the intraperitoneal (ip) cavity of rats, where it grows as an ascitic tumor, suggesting that the site of growth has an important role in selecting new tumor cell variants. The W256 AR variant differs from the A variant in that the former variant has a slower growth rate resulting in 60-80% regressions which are followed by development of immunity against both the A and AR W256 variants when the latter variant is injected subcutaneously (sc) [13]. This fact might indicate that the AR variant immunogenicity is incremental. Nevertheless, the phenomenon of W256 tumor shift from the A variant to its AR variant during serial ip passages is little understood and the molecular basis for the increase in immunogenicity remains unknown.

MHC class I molecules play a crucial role in immune defense. Alterations in MHC class I molecule expression on tumor cells is an important mechanism accounting for changes in tumor cell immunogenicity and sensitivity to cytotoxic immune effectors which can directly affect tumor growth and metastatic spread [1, 3, 4, 15-19].

In this work we proposed to carry out serial ip passages of the W256 A variant to study the generation of the AR variant and observe whether there were differences in MHC class I expression between A and AR variants. The shift from A to AR variant could be monitored by addressing two well established effects induced by the tumor variants. The

AR variant induces a marked splenomegaly, whereas only a moderate splenomegaly is seen in rats bearing the A variant [13]. In addition, the W256 A variant induces a decrease in red blood cell (RBC) osmotic fragility [14], while an opposite effect occurs when the AR variant is employed [13].

2. Materials and methods

2.1 Animals

Two hundred male Wistar rats (*Rattus norvegicus albinos*), aged 8-12 weeks, were used throughout the experiments. Rats were housed (5/cage) under controlled temperature ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$) and maintained on a 12-hour light-dark cycle. The animals were fed with standard rat chow (Labina/ Purina, Campinas, SP, Brazil) and water. The general guidelines for animal welfare of the United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research [20] were followed and all animal experiments were approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation (IB/UNICAMP).

2.2 Tumor

The Walker 256 (W256) tumor was kindly provided by Dr. Maria C. Cintra Gomes, Department of Physiology, IB/UNICAMP. The cell line originally came from the National Cancer Institute Bank, MA, USA. The tumor is currently kept in the laboratory frozen in liquid nitrogen and maintained through subcutaneous (sc) or intraperitoneal (ip) passages in rats.

Tumor cell suspensions of the W256 A variant were prepared separately from three different solid tumors, which had been maintained through serial sc transplantation and had presented a high growth rate (1.0 g/day around the 20th day of growth). As a routine procedure, thin sections of a well-irrigated tumor surface were obtained from a donor rat while it was under halothane anesthesia. Tumor sections were cut with a scalpel in a plate containing 2.0 ml of cold isotonic buffer, pH 7.4 (PBS). The resulting tumor cell suspensions of the W256 A variant were taken using an 18-G needle attached to a syringe. These cells were then injected into the ip cavity of a recipient rat to initiate the experiment (first ip passage). From the moment that ascites was developed, tumor cells were serially transferred to the ip cavity of the rat. Serial ip passages of W256 tumor cells were carried out by transferring 20×10^6 tumor cells/ ml from a tumor-bearing rat to a new recipient rat every 4-5 days. At each passage, viability of ascitic tumor cells was assessed by Trypan blue exclusion and the number of tumor cells was adjusted by

diluting the cell suspension with lactated Ringer's solution. Three serial repetitions of W256 tumor cells ip passages were conducted.

2.3 Blood sampling

Blood samples were collected from the rats just before tumor injection (day 0) and again 4-5 days later, simultaneously collecting ascitic fluid. The rats were anesthetized with halothane and a 0.2 ml blood sample was collected from the suborbital plexus in 0.02 ml of heparin (5000 IU/ml).

Red blood cell (RBC) osmotic fragility

The RBC osmotic fragility was determined by a method designed by Dacie and co-workers [21]. For practical purposes, the median corpuscular fragility (MCF) was employed for data analysis of RBC osmotic fragility, defined as the NaCl concentration (g/l) causing a 50% RBC lysis.

2.4 Relative spleen weight

The spleen relative weight (g/100g of body weight) in tumor-bearing rats was assessed after collecting ascitic fluid, when the rats were sacrificed under deep anesthesia. Spleens were removed and weighed. Rat body weight was assessed after complete drainage of ascitic fluid. Alternatively, in some experiments, spleen weight (g) was estimated through the organ's length (mm) during surgery, employing an empirical curve built with data from 70 individual specimens ranging in weight from 0.27 to 2.90 g, thus allowing the rats to be kept alive.

2.5 MHC class I expression on tumor cells

The expression of the MHC class I molecule on the A and AR cell variants was determined based on the method described by Giezman-Smits et al. [22]. Tumor cell suspensions were prepared from ascitic fluid sampling in ip passages. After sampling, the ascitic fluid was diluted in PBS, pH 7.4 (1:3, v/v) and centrifuged (150 g/5 min). The cells were suspended in lysis solution (NaCl 3 g/l, pH 7.4), centrifuged (150 g/5 min) and washed once in PBS solution. These cells were then formalized and washed twice with PBS solution. Afterwards, 5×10^5 tumor cells were incubated with a saturating

amount of FITC-conjugated anti-rat RT1-A (clone Ox-18; 5.0 µg/10.0 µl) or FITC-conjugated mouse IgG1κ (clone MOPC-21; 80.0 µg/ 20.0 µl) as isotype control. After, the cells were washed and MHC class I expression on tumor cells was assessed by FACS analysis. Each sample analyzed consisted of a minimum of 10^4 cells.

2.6 Autopsy

Autopsies were performed on all tumor-bearing rats. Special attention was paid to the eventual presence of metastasis, invasion of important tissue and bleeding.

2.7 Statistical Analysis

The results were reported as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM), and differences between the A and AR tumor cell variants were determined by the Wilcoxon test ($p < 0.05$) [23].

3. Results

3.1 Tumor

All ip injections of W256 tumor cells resulted in the proliferation of ascitic tumor cells. At the first ip passage, using W256 A variant cells that were obtained from sc tumors, it took 7-9 days for ascites to develop. However, from the second ip passage onwards, the time required for developing ascites was less variable and shorter when tumor cells started to be transplanted every 4-5 days. Longer periods (about 7-9 days) for ascites development were observed only on 3 occasions during the serial ip passages, representing about 3% of the total ip passages carried out. In two of these occasions, the delay was observed during the period in which the ascitic tumors cells were characterized as AR variant (Fig.1B, 22nd and 23rd passages), whereas in one of them, it was during the period when the A variant characteristics predominated (Fig.1A, 6th passage). In addition, the delay in developing ascites in the rat bearing the A variant could be attributed to a solid tumor developed in the ip cavity and found at autopsy.

3.2 Shift from A to AR cell variant

At each ip passage of tumor cells, A and AR variants of W256 tumor cells were characterized by evaluating the spleen hyperplasia and RBC osmotic fragility in donor rats. Fig.1 shows changes in RBC osmotic fragility, described as MCF, and spleen relative weight in rats of three experiments. In the sequence of ip passages, which followed the transplantation from the sc tumors, a predominance of unchanged or negative MCF variations (indicating a decrease in the RBC osmotic fragility) associated with moderate spleen hypertrophy was initially observed.

The shift of tumor cells from A to AR variant was observed in all three experiments, occurring at ip passages numbers 13, 6 and 25, respectively. The shift of tumor cells to AR variant was evidenced by a marked increase in spleen relative weight, which was followed by an increase in RBC osmotic fragility occurring 2-3 ip passages later (a positive MCF variation). From that moment onward, a predominance of positive MCF variations was observed, indicating an increase in RBC osmotic fragility in donor rats. Splenomegaly also predominated. Actually, MCF variations and splenomegaly values in

rats bearing the A or AR tumor cell variants were found to be significantly different (Fig.2).

3.3 AR tumor cell rejection

After tumor cells had shifted to the AR variant, serial ip passages were continued and tumor cell rejection was ultimately observed in one serial repetition. The ip rejection of the W256 AR variant was accompanied by a marked increase in RBC osmotic fragility (MCF variation=1.00g NaCl) and splenomegaly (relative spleen weight variation=280%), followed by the development of immunity against both the A and AR variants (Fig.1C, passage 36). Immunization was confirmed by challenging the rat with high-dose ip injections of W256 tumor cells (100×10^6 tumor cells).

3.4 MHC class I expression on tumor cells

MHC class I molecule expression on tumor cells was assessed, since it is a widespread mechanism used to explain changes in tumor cell immunogenicity. As expected, the W256 A tumors grown in sc tissue were predominantly composed of MHC class I negative cells (Fig.3). After cell suspensions from the sc tumors were injected into the ip cavity of the rat and during serial ip passages when tumor cells were characterized as A variants, the amount of MHC class I positive cells remained low (Fig.3). However, after tumor cells had shifted to the AR variant, the relative fluorescence intensity in this variant was found to be 1.6 times higher ($n=15$, 14.21 ± 1.32) than in the A variant ($n=10$, 9.10 ± 1.22), indicating a remarkable increase in the number of MHC class I positive cells (Fig.2 and 3).

4. Discussion

4.1 Tumor developments

It is currently well known that W256 tumor is characterized by its growth capacity. Spontaneous tumor regression is still rarely observed. In our laboratory, serial selective transplantation of sc tumors with higher growth rates (1.0 g/day around the 20th day of growth) have resulted in tumor cells with a 99% local growth capacity (data not shown), presenting the A variant characteristics. Therefore, W256 sc tumors with high growth rates could provide a good source of A variant tumor cells to test our study's hypothesis about the role of the ip environment in the generation of AR variant.

4.2 Shift from A to AR cell variant

In the present study, we confirmed the previous observation (O. Rettori, personal communication) that serial transplants of W256 A tumor cells through the ip cavity of rats would result in a shift to its immunogenic AR variant. In despite of the variability in the number ip passages required for the shift of W256 tumor cells our study showed that all serial repetitions began to exhibit the AR variant pattern.

We have previously shown that the W256 A variant is characterized by induction of acute anemia accompanied by a decrease in RBC osmotic fragility, indicating a reduction in the volume of the host's circulating RBC [14]. In contrast, we found that rats bearing W256 AR variant tumors systematically developed temporary anemia associated with a marked increase in RBC osmotic fragility [13]. Moreover, the AR variant induced a marked splenomegaly (160% in average), whereas only a moderate splenomegaly (60% in average) was seen in rats bearing the A variant. Therefore, in the present experiments, to define whether the tumor cell variant was A or AR during serial transplantations, we evaluated spleen hyperplasia and osmotic fragility in fresh RBCs drawn from the donor rat at each ip passage of W256 tumor cells.

Intraperitoneal injections of A variant tumor cell suspensions obtained from solid tumors were designated ip passage number one. At this first passage, all rats developed ascites 7-9 days after ip injection and death would happen in 10 days. However, from the second ip passage onwards, the time required to develop ascites varied less and was

shorter, then tumor cells started to be transplanted every 4-5 days. Our observations confirmed that A and AR tumor cell variants required an equal amount of time to develop ascites and whenever 20×10^6 tumor cells were employed, ascites would result at approximately 120×10^6 tumor cells/ml.

Furthermore, by continuing the serial ip passages of the AR variant, it was ultimately observed the tumor cell rejection in one experimental repetition. Rejection of the W256 AR variant had already been described in rats bearing sc tumor and it was the first time that an ip rejection was observed. Similar to that observed in subcutaneous rejection, intraperitoneal rejection of the W256 AR variant was accompanied by a temporary and marked increase in RBC osmotic fragility (MCF variation=1.00g NaCl), splenomegaly (relative spleen weight variation=280%), and followed by the development of immunity against both A and AR variants (Fig.1C, 36th passage). Immunization was confirmed by challenging the rats with high-dose ip injections of W256 tumor cells (100×10^6 tumor cells). However, unlike the sc AR tumors, whose rejection rate is 60-80%, the present study showed that rejection of ip tumor cells would be rarely observed. A possible explanation for this difference might be related to the ip environment, allowing the W256 AR tumor cells a higher proliferative rate. In solid tumors, an increasing irrigation deficit would rapidly restrict cell proliferation, virtually leading to a steady state when half of the newly formed cells would arrest in G₁ or enter the G₀ state after each replication. Many of these cells would later progress to apoptosis or necrosis [10, 14, 26, 27], whereas virtually all tumor cells in the ip cavity would continue to proliferate.

Consequently, the tumor's lethal effects would be induced earlier in the ip tumor growth, not allowing time to develop an immune response. Collectively, these observations support our previous results [13], suggesting that alterations in RBC osmotic fragility induced by the W256 AR variant might be associated with the immune response against cancer. Perhaps they signal a step towards developing an adaptive immune response in the host. However, the success of this response is still not guaranteed.

4.3 MHC class I expression on tumor cells

It is well-documented that malignant transformation is accompanied by phenotypic cell changes, which may involve expression of MHC class I molecules. Indeed, loss or

downregulation of MHC class I molecule expression on tumor cells in human and experimental tumors are frequently found alterations that have been used to account for the reduction in tumor cell immunogenicity and sensitivity to cytotoxic immune effectors [1, 3, 4, 15-19].

In agreement to this common knowledge, the present study showed that the W256 A variant tumor grown in sc tissue predominantly consisted of MHC class I negative cells (Fig.3), a fact that might contribute to its tumorigenicity. After cell suspensions from the sc tumor were injected into the ip cavity of the rat and during serial ip passages when tumor cells were characterized as A variant, the number of MHC class I positive cells remained low (Fig.3). However, after tumor cells shifted to the AR variant, the relative fluorescence intensity increased 1.6 times ($n=15$, 14.21 ± 1.32) compared to the A variant ($n=10$, 9.10 ± 1.22), indicating a remarkable increase in the number of MHC positive cells (Fig.2 and 3).

These observations suggest that there is a possible relationship between MHC class I expression and the increase in AR variant immunogenicity. Moreover, it also indicates that the ip rat cavity is an environment that is favorable to increasing the number of Walker 256 tumor MHC class I positive cells. The precise mechanism underlying the origin of the AR variant is unknown. However, it may be the currently accepted explanation for the origin of new tumor variants, resulting from the differential propagation of tumor subclones in their microenvironment, and including the immune system in a process recently termed “immunological sculpting” [2, 26, 27].

In the W256 model, tumors could be consisted of both MHC class I positive and negative cells, which would be differentially selected and propagated depending on whether they were injected into sc tissue or into the ip cavity. Indeed, the role of resident peritoneal NK cells in preventing ip tumor growth has been shown [28, 29]. This fact might be connected with a selective destruction of W256 MHC class I negative cells in the ip cavity, since tumor cells lacking this molecule might be more susceptible to NK cell-mediated cytotoxicity [30]. These data provide evidence that the generation of the AR variant could result from factors present in the ip environment, leading to an increase in Walker 256 MHC class I positive tumor cells, probably due to immune cell selective destruction of MHC class I negative tumor cells.

Acknowledgments

Alessandra Soares Schanoski was the recipient of a CAPES fellowship. Research supported by PROAP/CAPES and CAISM/UNICAMP. The authors are indebted to Mr. Amilton Garcia for animal care and Ms. Priscila Bianchi Juliano, for experimental assistance

References

- [1] A. Garcia-Lora, I. Algarra, J. Gaforio, F. Ruiz-Cabello, F. Garrido, Immunoselection by T lymphocytes generates repeated MHC class I-deficient metastatic tumor variants, *Int. J. Cancer* 91 (2001) 109-119.
- [2] H.T. Khong, N.P. Restifo, Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes, *Nat. Immun.* 3 (2002) 999-1005.
- [3] J.J. Gaforio, M. Perez, I. Algarra, M.J. Mialdea, H.G. Ljunggren, F. Garrido, Differential mRNA levels of c-myc, c-fos and MHC class I in several clones of a murine fibrosarcoma, *Int. J. Cancer* 49 (1991) 906-910.
- [4] M.J. Mialdea, J. Martin, J.J. Gaforio, I. Algarra, M. Perez, A. Gonzalez, H.G. Ljunggren, F. Garrido, Effect of MHC class-I transfection on local tumor growth and metastasis in an H-2-negative clone derived from a chemically induced fibrosarcoma, *Int. J. Cancer* 52 (1992) 153-158.
- [5] B. Bonnotte, N. Favre, M. Montet, A. Fromentin, E. Solary, M. Martin, F. Martin, Bcl-2-mediated inhibition of apoptosis prevents immunogenicity and restores tumorigenicity of spontaneously regressive tumors. *J. Immunol.* 161 (1998) 1433-1438.
- [6] J.N. Toal, F.K. Millar, R.H. Brooks, J. White, Sodium retention by rats bearing the Walker carcinosarcoma 256, *Am. J. Phys.* 200 (1960) 175-181.
- [7] S.B. Morrison, Water intake and exchange and hydration of rats during growth of Walker 256 carcinosarcoma, *J. Natl Cancer I.* 46 (1971) 825-830.
- [8] S. Zucker, R. M. Lysic, J. Di Stefano, Pathogenesis of anemia in rats with Walker 256 carcinosarcoma, *J. Clin. Med.* 90 (1977) 502-511.

- [9] A. Guaitani, M. Recchia, M. Carli, M. Rocchitti, I. Bartosek, S. Garattini, Walker carcinoma 256: a model for studies on tumor induced anorexia and cachexia, *Oncology* 39 (1982) 173-178.
- [10] O. Rettori, A.N. Vieira-Matos, Q.S. Tahin, Variability and discontinuity of the pathognomonic systemic effects caused by the Walker 256 tumor progression in rats, *Tumori* 81 (1995) 370-377.
- [11] F. Guimarães, T.C. Cavalcanti, O. Rettori, A.N. Vieira-Mattos, The influence of septal lesions on sodium and water retention induced by Walker 256 tumor, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32 (1999) 309-317.
- [12] G. Ventrucci, M.A. Mello, M.C. Gomes-Marcondes, Effect of leucine-supplemented diet on body composition changes in pregnant rats bearing Walker 256 tumor, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34(3) (2001) 333-338.
- [13] T.C. Cavalcanti, C.C. Gregorini, F. Guimarães, O. Rettori, A.N. Vieira-Matos, Changes in red Blood cell osmotic fragility induced by total plasma and fractions from rats bearing progressive and regressive variants of the Walker 256 tumor, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36 (2003) 887-895.
- [14] A.A. Vido, T.C. Cavalcanti, F. Guimarães, A.N. Vieira-Matos, O. Rettori, The hemolytic component of cancer anemia: effects of osmotic and metabolic stress on the erythrocytes of rats bearing multifocal inoculations of the Walker 256 tumor, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33 (2000) 815 - 822.
- [15] B.L. Petersen, A.M. Engel, H. Jull-Madsen, S. Mouritsen, I. Svane, O. Werdelin, Tumors developing in nude mice express unusually large amounts of MHC class I antigens, *A.P.M.I.S.* 99 (1991) 1111-1119.

- [16] L. Mutti, M. Valle, B. Balbi, A.M. Orengo, A. Lazzaro, P. Alciato, E. Gatti, P.G. Betta, E. Pozzi, Primary human mesothelioma cells express class II MHC, ICAM-1 and B7-2 and can present recall antigens to autologous blood lymphocytes. *Int. J. Cancer* 78 (1998) 740-749.
- [17] R.C. Rees, S. Mian, Selective MHC expression in tumours modulates adaptive and innate antitumour responses, *Cancer Immunol. Immun.* 48 (1999) 374–381.
- [18] F. Garrido, I. Algarra, MHC antigens and tumor escape from immune surveillance, *Adv. Cancer Res.* 83 (2001) 117-158.
- [19] Foos FM, Immunologic mechanisms of antitumor activity, *Semin. Oncol.* 29 (2002) 5–11.
- [20] United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research Guidelines for welfare of animals in experimental neoplasia, *Lab. Anim.* 22: 195-201.
- [21] J.V. Dacie, S.M. Lewis, E.C. Gordon, Investigation of hereditary haemolytic anaemias, in: J.V. Dacie JV, S.M. Lewis (Eds.), *Practical Hematology*, 6th Edition., Churchill Livingstone, Edinburgh 1984, pp. 152-178.
- [22] M. Giezeman-Smits, K. Kuppen, E. Geeske, A. Eggermont, F. Stals, K. Wonigeit, G. Fleuren, The role of MHC class I expression in rat NK cell-mediated lysis of syngeneic tumor cells and virus-infected cells, *Immunobiology* 195 (1996) 286-299.
- [23] G.W. Snedecor, W.G. Cochran, Shortcut and non parametric methods, in: G.W. Snedecor, W.G. Cochran (Eds.) *Statistical Methods*, 8th Edition., Iowa State University Press/AMES (1989) pp. 71-72, 138-140.
- [24] W.R. Earle, A study of the Walker rat mammary carcinoma 256, in vivo and in vitro, *Am. J. Cancer* 24 (1935) 566-612.

- [25] I.D. Bassukas, B.D. Maurer-Schultze, Growth of metastases of the mouse adenocarcinoma EO 771: an allometric relationship between growth of the primary tumors and their metastases, *Clin. Exp. Metastas.* 8(4) (1990) 329-343.
- [26] I.A. Tannock, Cell proliferation, in: I.F. Tannock, R.P. Hill (Eds.), *The Basic Science of Oncology*, 2nd Edition., MacGraw Hill, Toronto (1992).
- [27] G.P. Dunn, A.T. Bruce, J.O. Lloyd, R.D. Schreiber, Cancer immunoediting: from immuno-surveillance to tumor scape, *Nat. Immun.* 3(11) (2002) 991-998.
- [28] T. Kawamura, S. Seki, K. Takeda, J. Narita, Y. Ebe, M. Naito, H. Hirade, T. Abo, Protective effect of NK1.1+T cells as NK cells against intraperitoneal tumors in mice, *Cell. immunol.* 193(2) (1999) 219-225.
- [29] S. Das, A. Khar, Regulation of NK cell function in vivo by those of tumour transplanted in the peritoneum, *Immunol. Lett.* 83 (2002) 133-142.
- [30] B. Rolstad, J.T. Vaage, R.C. Naper, D. Lambracht, K. Wonigeit, E. Joly, G.W. Butcher, Positive and negative MHC class I recognition by rat NK cells, *Immunol. Rev.* 155 (1997) 91-104.

Figure 1. Red blood cells (RBC) osmotic fragility and spleen relative weight variations in three different experiments (A, B, and C), after serial ip passages of the W256 tumor cells (20x 10⁶/ml, every 4-5 days). (gray bar) A variant of the W256 tumor, (black bar) AR variant of the W256 tumor. MCF: Median corpuscular fragility = NaCl concentration (g/l) causing a 50% RBC lysis. MCF variation represents the change in RBC MCF between the day tumor cells were injected (day 0) and the day the animals were sacrificed (days 4-5). To calculate the percentage of spleen variation, we used the standard spleen relative weight (0.25 g/100 g body weight). (white bar) Tumor cell rejection in experiment C passage number 36; *7-9 days for ip passage.

Figure 2. Red blood cells (RBC) osmotic fragility and spleen relative weight variations and MHC class I positive tumor cells in rats bearing A (gray bar, n=10) or AR variant (black bar, n=15) W256 ascitic tumors. MCF: Median corpuscular fragility = NaCl concentration (g/l) causing a 50% RBC lysis. Data are reported as mean $\pm$ SEM. *P<0.05 Wilcoxon test.

Figure 3. Cell surface expression of MHC class I molecules on A and AR variants of the W256 tumor. Data are representative of at least 5 assays. (thick line) FITC-conjugated anti-rat RT1A (0X18) and (thin line) FITC-conjugated mouse IgG1 κ (isotype control).

