

*Este exemplar foi
totalmente corrigido conforme
resoluções da CCPG 1036/83
Piracicaba 018/07/94*

ROZANGELA VERLENGIA

- Bióloga -

**ESTUDO DO PERFIL DE ELETROFORESE E IMUNOELETROFORESE
EM CAMUNDONGOS PORTADORES DO TUMOR DE EHRLICH.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Odontologia Área de Biologia e Patologia Bucodental da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Piracicaba-SP

- 1994 -

ROZANGELA VERLENGIA

- Bióloga -

**ESTUDO DO PERFIL DE ELETROFORESE E IMUNOELETROFORESE
EM CAMUNDONGOS PORTADORES DO TUMOR DE EHRLICH.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Odontologia Área de Biologia e Patologia Bucodental da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ FRANCISCO HÖFLING

Piracicaba-SP

- 1994 -

Aos meus pais ECYDIR e THARSIS,

que, com sabedoria e amor, sempre me incentivaram a trilhar o meu caminho nesta vida,

DEDICO, COM AMOR, ESTE TRABALHO

Ao JOSÉ ROBERTO,

pelo apoio, amor e principalmente pela compreensão,

O MEU AMOR E AGRADECIMENTO,

Aos meus irmãos,

pelo apoio e sobretudo pelo amor, pois sem isso nada valeria a pena,

MEU AGRADECIMENTO E AMOR

Ao Prof. Dr. JOSÉ FRANCISCO HÖFLING, pela orientação e pelo carinho com que acompanhou a criação de cada fragmento deste todo. Mais ainda, pela evidente preocupação de não deixar o profissional destruir o ser humano que nele vive. Pelos atos de humanidade e compreensão,

Meu eterno agradecimento.

AGRADECIMENTOS

Aos funcionários, sobretudo amigos da Área de Microbiologia e Imunologia, **WILMA CORREA FERRAZ**, **ANDERSON LAERTE TEIXEIRA** e **ELZA MARIA THOMAZZINI**, pela participação, apoio e colaboração na realização desta pesquisa.

Às amigas e colegas de trabalho **DENISE**, **MARILDA**, **CLÁUDIA** e **CLEUSA**, pelo carinho, amizade e companheirismo, demonstrando a verdadeira essência do ser humano a cada instante desta jornada, valorizando-me como profissional, sem se preocuparem com meus defeitos pessoais.

Ao Prof. Dr. **JOSÉ LUIZ GUERRA**, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, pelo apoio e exemplo de profissionalismo transmitido, e ainda pela gentileza em nos ceder as amostras das células tumorais do EAT, sem as quais não seria possível a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **MIKE G. SIMPKINS** da Sir William Dunn School of Pathology- University of Oxford, pela gentileza em nos ceder as amostras do EAT, sem as quais não seria possível a realização deste trabalho.

Ao colega **ADEMIR MARIANO**, bioterista, pela amizade e zelo com os animais utilizados neste experimento.

Ao Prof. Dr. **PEDRO LUÍS ROSALEN**, pela amizade e espaço físico concedido para a manutenção dos animais de experimentação.

À **EQUIPE DE PROFESSORES E FUNCIONÁRIOS** do Departamento de Radiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela amizade e colaboração prestada na execução desse trabalho e principalmente pelo carinho com que sempre fui recebida.

Ao Prof. Dr. **RUI CURI** do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas -USP pelas inúmeras sugestões e incentivo.

À Profa. Dra. **ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER**, responsável pelo Laboratório de Microorganismo da ESALQ, e aos Técnicos **JOSÉ ANTÔNIO DA SILVA** e **CÉLIA REGINA PONTIN** pela amizade e colaboração no preparo das amostras para as análises citológicas.

À Profa. Dra. **MARIA LÚCIA CARNEIRO VIEIRA**, responsável pelo laboratório Central de Cultura de Tecido da ESALQ, ao Técnico **CARLOS ALBERTO DE OLIVEIRA** e à aluna de Pós-Graduação **LUCIA YUKA MAYEDA**, pela colaboração nas análises citológicas.

A **IVANI ODAS DEMÉTRIO**, pela realização dos cortes histológicos, assim como pela amizade pessoal.

Ao colega e Prof. **PEDRO DUARTE NOVAES**, pela realização das fotografias e amizade constante.

Ao Prof. Dr. **PAULO CÉSAR O. TRIVELIN**, pela amizade pessoal e confecção dos gráficos.

À Profa. Dra. **SÔNIA VIEIRA**, pela amizade e orientação na escolha e aplicação da análise estatística dos resultados.

À Bibliotecária Sra. **SUELI DUARTE DE OLIVEIRA SOLIANE**, pela competente orientação nas correções das referências bibliográficas e aos demais **FUNCIONÁRIOS** da biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

À Profa. Dra. **DEJANIRA FRANCESCHI DE ANGELIS**, pelo incentivo e amizade.

Aos colegas **LUIZ CARLOS**, **ROBERTO ORTIZ**, **VANESSA**, **ADRIANA** e **JANAINA** pela colaboração na execução deste trabalho e amizade constante.

À **COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA E PATOLOGIA BUCO DENTAL** da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pelos ensinamentos recebidos.

Ao Prof. Dr. **JAIME APARECIDO CURY**, pela colaboração e apoio técnico.

Aos Profs. Dr. **CELSO PAULINO DA COSTA** e **REGINALDO**, pela amizade e apoio.

Ao Prof. Dr. **OSLEI PAES DE ALMEIDA**, pela concessão do espaço para a ampliação das fotografias e pela amizade.

AO CNPq (CONSELHO NACIONAL PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA), pelo apoio financeiro.

A todos que aqui não foram mencionados, mas que, direta ou indiretamente, contribuíram de forma positiva para que este trabalho fosse possível, a minha sincera gratidão.

Meus sinceros agradecimentos

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 01 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 04 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 27 |
| 3.1. Animais..... | 28 |
| 3.2. Tumor experimental..... | 28 |
| 3.3. Manutenção do tumor de Ehrlich..... | 29 |
| 3.4. Preparo das células tumorais para inoculação..... | 29 |
| 3.5. Procedimento experimental..... | 30 |
| 3.5.1. Obtenção do soro de camundongos para testes sorológicos e eletroforese..... | 30 |
| 3.6. Eletroforese..... | 32 |
| 3.6.1. Eletroforese em gel de agarose e densitometria..... | 32 |
| 3.6.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida..... | 32 |
| 3.7. Anti-soros..... | 32 |
| 3.8. Sangria, preparo e conservação do anti-soro..... | 33 |
| 3.9. Sorologia ou testes sorológicos..... | 33 |
| 3.9.1. Determinação do título do anti-soro..... | 33 |
| 3.9.2. Imunoeletroforese..... | 34 |
| 3.9.3. Imunodifusão radial..... | 34 |
| 3.9.4. Imunoeletroforese em foguete (Rocket)..... | 35 |
| 3.10. Monitoramento do crescimento do tumor na sua forma sólida- linhagens 1-G e 2-S..... | 35 |
| 3.11. Padronização da curva de crescimento da forma sólida do tumor de Ehrlich em camundongos..... | 35 |
| 3.12. Imunidade concomitante..... | 36 |
| 3.13. Contagem de cromossomos..... | 37 |
| 3.14. Determinação da concentração de proteínas..... | 37 |
| 3.15. Análise histológica..... | 37 |
| 3.16. Análises estatísticas..... | 38 |
| 3.17. Ilustração..... | 39 |
| 4. RESULTADOS..... | 41 |
| 4.1. Eletroforese..... | 41 |

| | |
|--|------------|
| 4.1.1. Eletroforese em agarose e densitometria..... | 41 |
| 4.1.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida..... | 44 |
| 4.2. Testes sorológicos..... | 45 |
| 4.2.1. Título do anti-soro..... | 45 |
| 4.2.2. Imunoeletroforese..... | 45 |
| 4.2.3. Imunodifusão radial..... | 46 |
| 4.2.4. Imunoeletroforese em foguete (Rocket)..... | 46 |
| 4.3. Monitoramento do crescimento do tumor na sua forma sólida - linhagens 1-G e 2-S..... | 47 |
| 4.4. Padronização da curva de crescimento da forma sólida do tumor de Ehrlich em caumundongos..... | 47 |
| 4.5. Imunidade concomitante..... | 49 |
| 4.6. Contagem de cromossomos..... | 51 |
| 4.7. Ilustrações..... | 52 a 82 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 84 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 95 |
| 7. RESUMO..... | 98 |
| 8. ABSTRACT..... | 101 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 103 |
| 10. APÊNDICE..... | 119 |
| 10.1. Obtenção da concentração padrão das amostras utilizadas, através do uso da câmara de Neubauer, segundo CAMPBELL & CAMPBELL (1986)..... | 120 |
| 10.2. Eletroforese..... | 121 |
| 10.2.1. Eletroforese em gel de agarose..... | 121 |
| 10.2.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida..... | 121 |
| 10.3. Testes sorológicos..... | 124 |
| 10.3.1. Imunoeletroforose..... | 124 |
| 10.3.2. Imunodifusão radial..... | 125 |
| 10.3.3. Eletroforese em foguete..... | 126 |
| 10.4. Preparo citológico das amostras e coloração das lâminas para contagem dos cromossomos..... | 127 |

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Há muito tempo a célula tumoral tem sido interpretada como um agente autônomo capaz de, através do seu crescimento expansivo, invadir os tecidos e se localizar e multiplicar a distância. Nesse processo, as células neoplásicas se modificam e adquirem estruturas antigênicas que não estão presentes em uma célula diferenciada do mesmo tecido, a exemplo dos antígenos oncofetais, antígenos de diferenciação e antígenos de transplante tumor específico (TSTA). Do ponto de vista imunológico, cada organismo empenha-se em desenvolver mecanismos próprios de defesa contra as interações que comprometem sua integridade, destacando-se a resposta imune específica (linfócitos T e B) e não específica (macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células NK, sistema complemento etc.)

Grande parte da compreensão dos mecanismos que envolve o desenvolvimento de uma neoplasia ocorreu após o surgimento da Oncologia Experimental, cuja existência se deu pela introdução dos chamados tumores transplantáveis ou transmissíveis. Esses são tumores de animais, mantidos em laboratório pelo transplante de células tumorais a hospedeiros susceptíveis. Dentro do estudo dos tumores experimentais, um dos grandes avanços foi a conversão da forma sólida dos tumores para a forma ascítica: as células do tumor livre ou complexos de células crescem ativamente no fluido peritoneal, induzindo o acúmulo ascítico e alcançando uma alta concentração celular, o que possibilita estudá-los sob vários pontos de vista tais como: citológico, bioquímico, imunogenético, imunológico entre outros. De maneira geral esses tumores são mantidos pela passagem seriada do fluido ascítico de um animal a outro ou através da utilização de meios de cultura apropriados ou pela manutenção com técnicas de congelamento.

O tumor de Ehrlich, uma neoplasia experimental descoberta por Ehrlich

(1906) e convertido à forma ascítica - após a inoculação das células do tumor sólido na cavidade peritoneal de camundongos - por LOEWENTHAL & JAHN (1932) tem sido, desde então, mantido pela passagem seriada a receptores susceptíveis e "in vitro". Testes de histocompatibilidade, análises da distribuição do número de cromossomos e indução de mutantes através de agentes químicos revelaram que as neoplasias experimentais sofrem alterações no decorrer de sua manutenção tais como: perda de especificidade e transplantabilidade, infiltrabilidade, alterações na taxa de divisão celular e em número de cromossomos.

Tendo em vista esses aspectos e considerando o fato de que atualmente pouco se tem encontrado na literatura sobre o desenvolvimento do tumor de Ehrlich em camundongos, é que nos propusemos a verificar se, após tantos anos de manutenção "in vivo" e "in vitro", o modelo experimental tumor de Ehrlich ascítico ou sólido, promove alterações nas proteínas séricas de camundongos e se mantém seu potencial imunogênico. Para tanto, empregou-se técnicas de eletroforese e sorológicas. Também foi nosso objetivo estudar o fenômeno da imunidade concomitante - relacionado com esse tipo de tumor - visando a avaliar a capacidade do animal portador de um tumor, de rejeitar um segundo inóculo do mesmo tumor.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Evidências da existência de neoplasias em animais surgiram quando o veterinário francês, LEBLANC (1858) publicou seus estudos sobre tumores em animais, demonstrando serem esses constituídos por células semelhantes às dos humanos. Seguiram-se os estudos de McFAYDEAN (1890) e de STICKER (1902), relatando também neoplasias em animais, até que BASHFORD & MURRAY (1904) estabeleceram que, se as neoplasias eram processos que ocorriam em animais domésticos e selvagens, provavelmente deveriam se desenvolver em todos os vertebrados. Hoje sabe-se que tais processos estão presentes não só em vertebrados, como também em cefalocordados, urocordados, hemicordados e em outras espécies de invertebrados.

De modo geral, os tumores humanos e de animais mostram semelhanças essenciais, comportando-se como um crescimento de células, originárias do próprio organismo, que adquirem a capacidade de se multiplicarem indefinidamente. Essa constatação possibilitou o surgimento da Oncologia Comparada, ramo da Oncologia que procura ampliar o conhecimento a respeito das neoplasias, identificando as diferenças e semelhanças entre neoplasias do homem, animais e plantas (DAWE, 1982). Através da Oncologia Comparada, pode-se conhecer e identificar melhor as neoplasias que ocorrem em outros seres vivos. Com o surgimento da Oncologia Experimental - um ramo da Oncologia Comparada - cuja existência se deu pela introdução dos chamados tumores transplantáveis ou transmissíveis, é que se pôde constatar um grande avanço no estudo da cancerologia. Esses tumores de animais são mantidos em laboratório pelo transplante de células tumorais em hospedeiros susceptíveis e "in vitro".

Historicamente, os primeiros relatos de transplante de neoplasias datam de 1777, quando PEYRILHE (1777) inoculou material extraído de neoplasia mamária humana sob a pele de um cão, e LEIDY (1851) transplantou tumores humanos sob a pele de rãs, sendo que ambos os pesquisadores não obtiveram êxito no crescimento

neoplásico nesses heterotransplantes. Começava-se, portanto, a deduzir a importância de ter-se uma relação de parentesco entre doador e receptor desses tecidos. Transplantes bem sucedidos passaram a ser obtidos somente quando tumores espontâneos de animais foram inoculados em receptores de mesma espécie. Assim, HANAU (1889) transplantou um tumor espontâneo de vulva de rata para o testículo de ratos da mesma linhagem e MORAU (1894) transplantou tumores mamários de camundongos fêmeas para outros animais. Nesse aspecto, vários autores vêm, desde o início deste século, realizando transplantes de tumores espontâneos ou induzidos experimentalmente em animais susceptíveis, confirmando, dessa forma, a necessidade de haver uma relação de parentesco entre o doador e receptor.

No início, os tumores eram transplantados para um grande número de animais, obtendo-se crescimento em poucos deles. Hoje, porém, sabe-se que essas neoplasias tornam-se estabilizadas após transferências sucessivas, mantendo suas características por várias gerações. Segundo LUCKE (1953), pode-se dizer que uma linhagem bem estabelecida de tumores transplantáveis em animais de espécies e linhagens definidas representa o mesmo que substâncias químicas puras ou culturas puras de microrganismos. Atualmente dispõe-se, na literatura, de verdadeiros tratados sobre os tipos de tumores transplantáveis (DUNHAM & STEWART, 1953 ; STEWART et al., 1959). Nesses tratados, as linhagens são classificadas de acordo com o tecido de origem e a espécie animal em que se desenvolveram, e têm sido utilizados em estudos da ação de componentes físicos, químicos e biológicos sobre seu crescimento, e também nos estudos de citogenética, patogênese, imunologia, "comportamento biológico", bioquímica e terapêutica das células tumorais.

Nessa linha de investigação, um dos tumores experimentais mais estudados foi o tumor de Ehrlich (EAT), por ser um dos primeiros tumores transplantáveis conhecidos, descrito por EHRLICH em 1906 . Trata-se de uma neoplasia originária do carcinoma mamário de camundongos fêmeas, transplantado em

animais desta espécie, inicialmente na forma sólida. O tumor de Ehrlich foi convertido para a forma ascítica por LOEWENTHAL & JAHN (1932). Após a inoculação de células do tumor sólido de Ehrlich intraperitonealmente, esses autores obtiveram um número substancial de tumores sólidos desenvolvendo-se na cavidade peritoneal, exceto em alguns animais, nos quais após 10 a 14 dias do inóculo inicial, observaram a formação de ascite de aspecto leitoso ou hemorrágico, contendo grande número de células neoplásicas. Demonstraram ainda, que o tempo de sobrevivência do animal, bem como a rapidez do desenvolvimento do processo, dependem do número de células inoculadas. Entretanto, outro aspecto que influencia o tempo de sobrevivência do animal é a presença de sangue no fluido ascítico, HARTVEIT (1961) concluiu em seus estudos que existe uma correlação positiva entre o tempo de sobrevivência e o volume final do tumor, e uma correlação negativa entre o tempo de sobrevivência e o volume de sangue no tumor. SIEGLER & KOPROWSKA (1962_b) descreveram os eventos que seguem a formação do tumor ascítico, observando que células viáveis do tumor penetram no mesentério, proliferando e destruindo as estruturas íntegras dos tecidos infiltrado do hospedeiro. Células do tumor e macrófagos subsequentemente passam para dentro do fluido acumulado, como resultado de alterações provocadas nos capilares e vasos linfáticos pela rápida penetração e infiltração do tumor. A associação de células tumorais exfoliadas e o transudato peritoneal constituem a condição "tumor ascítico". A conversão para a forma ascítica trouxe grandes vantagens, como: a possibilidade da padronização do número de células inoculadas, a quantificação da regressão e do crescimento tumoral, bem como o estudo da célula tumoral propriamente dita (STEWART et al., 1959).

Um dos mais importantes avanços na biologia do câncer foi a demonstração de que uma variedade de tumores experimentais possui antigenicidade capaz de trazer à tona uma resposta imune específica. Considera-se que a primeira demonstração de antigenicidade específica na classe dos tumores experimentais foi

revelada por FOLEY (1953), mostrando que o isolamento por clampeamento de um tumor, induzido por metilcolantreno, já estabelecido, deixou o hospedeiro resistente ao crescimento de um implante subsequente de células do mesmo tumor, porém não ao crescimento de implantes de células de outros tumores. Essas observações já haviam sido antecipadas por GROSS (1943, 1945), o qual demonstrou imunização ativa de camundongos híbridos C3H para o transplante de um tumor recém induzido por metilcolantreno em camundongos C3H. Resultados semelhantes da presença de antígenos sobre a superfície das células tumorais e sua especificidade foram demonstradas por PRENH & MAIN (1957), utilizando tumores (sarcomas) induzidos por 3-metilcolantreno (MCA) e transplantados para camundongos singênicos. Os autores observaram que os animais desenvolveram nódulos tumorais palpáveis e que a remoção cirúrgica dos mesmos, tornou os animais mais resistentes ao crescimento de um segundo inóculo das mesmas células tumorais quando comparado com os controles não tratados ou sensibilizados contra outros sarcomas (MCA) singênicos. Além disso, a imunização com tecido normal não preveniu o crescimento do tumor, bem como não foi rejeitado. Dessa forma, os autores concluíram que os sarcomas MCA possuem antígenos de transplante tumor específicos (TSAT) e que esses eram individuais para cada neoplasia.

Relatos de imunidade específica ao tumor antes desses experimentos não são confiáveis, uma vez, que durante a gênese da Oncologia Experimental, todos os estudos foram realizados, usando-se animais cruzados ao acaso e transplantes de tumores não singênicos. Transplantes bem sucedidos de células malignas e normais requerem que os genes de histocompatibilidade (genes H) do receptor e doador sejam idênticos (GORELIK, 1983). Incompatibilidade nos genes H causa a rejeição de transplantes de células (SNELL, 1948, 1953), sendo que as reações imunológicas são responsáveis por esta rejeição (GORER, 1942, 1956_a).

Antes de 1940, era difícil obter número suficiente de animais de idade e

linhagem uniformes. Desse modo, os pesquisadores tentaram manter os tumores "in vivo" em animais cuja linhagem diferia daquela de origem do tumor; isso foi conseguido após muitos transplantes sucessivos, tendo o tumor deixado de expressar seus gens de histocompatibilidade, passando a crescer em animais de genótipos diferentes. Este tipo de tumor é usualmente referido como não específico, incluindo-se os tumores de Ehrlich, Krebs, Crocker, Bashford e Sarcoma 180 em camundongos; carcinoma de Walker em ratos e melanoma Harding-Passey, Brown-Pearce e o carcinoma V2 em coelhos (SUGIURA, 1965 e KALISS, 1961).

A importância do sistema imune na defesa contra o crescimento de tumores tem sido ressaltado pela teoria da vigilância imunológica. Através do processo de evolução ocorreu a necessidade de existirem mecanismos para a eliminação e inativação de células mutantes potencialmente danosas, as quais aparecem como uma alteração genética hereditária e que pode ser comum em células somáticas, principalmente nos vertebrados homeotérmicos, caracterizando assim, o conceito de vigilância imunológica (THOMAS, 1959 e BURNET, 1970). As reações imunes contra tumores têm sido divididas em imunidade celular (mediada por linfócitos e macrófagos) e imunidade humoral (mediada por anticorpos e complemento). Essas reações imunes envolvem a interação com antígenos de superfície celular, promovendo subsequente proteção. HORN (1956), estudando a antigenicidade de "célula total" e componentes da célula do tumor ascítico de Erlich, verificou, através de anti-soros produzidos em coelho, um efeito citolítico sobre as células cancerosas através do anti-soro para mitocôndria e "célula total" do tumor. Posteriormente, resultados semelhantes foram obtidos com anti-soros da fração celular insolúvel que continha considerável quantidade de material de membrana, juntamente com algum material intracelular de origem não caracterizado. Esses anti-soros exibiram um efeito de proteção contra estímulo subsequente ao tumor imunizante (ENG et al., 1969).

Outros pesquisadores, utilizando a técnica de transplante, demonstraram a

presença do antígeno tumor-específico (TSA), envolvido na imunização de animais receptores com células do tumor, as quais se apresentaram incapazes de se multiplicar. Dentro desse aspecto, DONALDSON & MITCHELL (1959) observaram que a pré-imunização com células irradiadas do tumor de Ehrlich protege os camundongos contra o transplante subsequente de células viáveis do mesmo tumor, quando administrado via intraperitoneal (i.p.). Já a pós-imunização, iniciada um dia depois do implante subcutâneo do tumor, reduziu significativamente a mortalidade, entretanto, quando realizada nos animais portadores do tumor ascítico, não inibiu a multiplicação rápida das células tumorais. Posteriormente, LITTMAN et al. (1968) confirmaram os resultados de proteção conferido pelo inóculo de células irradiadas do tumor de Ehrlich, bem como do Sarcoma 180, acrescentando ainda que o estado de imunidade permaneceu por um longo período de tempo, sendo a via i.p. a que demonstrou maior proteção. Conhecimentos de regressão do tumor e subsequente resistência para uma segunda inoculação foram obtidos através da retirada diária do fluido ascítico de camundongos portadores de tumores ascíticos, os quais se recuperaram completamente do desenvolvimento do tumor, tornando-se imunes à subsequente inoculação das mesmas células tumorais. Esses animais apresentaram ainda, uma imunidade cruzada a outros tumores ascíticos. Nesse sentido, conclui-se que o fluido ascítico livre de células é rico em antígenos tumorais e que a remoção por punção, ao invés da retirada das células cancerosas, é um fator crucial na imunidade alcançada (APFFEL et al., 1968). A resposta contra células tumorais foi ainda observada por KANEKO et al. (1975), avaliando o número de células produtoras de anticorpos anti-EAT no baço de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich, as quais apareceram no sexto dia após o inóculo inicial e atingiram um máximo ao redor do décimo quinto dia.

A imunidade celular é geralmente considerada como sendo a primeira resposta de rejeição evocada contra os tumores experimentais. Sua participação tem sido avaliada por meio de testes de transferência de imunidade ativa, a partir de células

provenientes de doadores imunizados contra os tumores ou obtidas de animais portadores de tumores em desenvolvimento. Dentro dessa linha de pesquisa, MAZUREK & DUPLAN (1963) observaram que camundongos irradiados sub-letalmente, quando reconstituídos com células da medula óssea ou do baço, obtidas de animais imunes à célula do EAT, inibiam o crescimento do mesmo tumor. Resultados semelhantes de proteção contra subsequente inóculo de células viáveis do tumor foram obtidos por ATTIA et al. (1965), através da transferência de células de linfonodo e de peritônio obtidas de animais portadores ou imunizados com células de dois diferentes implantes do carcinoma mamário espontâneo, quando transferidas a receptores isogênicos normais. Posteriormente HAAGENSEN et al. (1978) demonstraram resultados similares, transferindo células de linfonodo e soro de camundongos hiperimunizados com células do adenocarcinoma mamário ascítico 755 (AD755a). Essa imunidade foi específica ao tumor, bem como estendeu-se contra dois outros tumores de origem mamária (EAT e S-180). Outros resultados obtidos por NEEL III & RITTS JUNIOR (1977), utilizando tumor induzido quimicamente, demonstraram que células de baço de animais portadores de tumores (grandes 4cm ou pequenos 38mm de diâmetro), não conferem proteção contra o subsequente inóculo de células do mesmo tumor, quando transferidas aos receptores normais. Por outro lado, o soro dos animais com tumores grandes, protegeu receptores normais contra o subsequente estímulo, o que não foi alcançado com o soro provenientes de animais com tumores pequenos.

O envolvimento dos linfócitos na rejeição de células tumorais por animais receptores de células imunes foi demonstrado por MARUSIC (1978), uma vez que o pré-tratamento das células da medula óssea de doadores imunes com anti-soro anti Thy 1-2 e complemento, anulou a transferência da resistência aos receptores normais contra células viáveis do tumor de YOSHIDA (YAS). Em seqüência aos seus estudos, MARUSIC (1979) avaliou os mecanismos da resposta imune de camundongos portadores do EAT, concluindo que os linfócitos-T são requeridos somente na fase de

indução da resposta imune de camundongos contra EAT, sendo que a fase eferente foi acompanhada por anticorpos. Ainda nessa linha de investigação, outros testes têm sido aplicados, avaliando a participação dos linfócitos nos diferentes órgãos linfóides, bem como o comportamento desses tecidos frente à neoplasia. Assim, SIEGLER & KROPROWSK (1962_a) observaram em seus estudos, realizados com animais portadores do tumor ascítico MT 890, perda dos linfócitos do timo com contração das células epiteliais e alterações similares nos demais órgãos linfóides. Resultados obtidos em análises histológicas por THUNOLD (1967_b) demonstraram marcada hiperplasia do sistema linfóide durante o desenvolvimento do EAT em camundongos machos e fêmeas. Posteriormente, THUNOLD (1968_a) observou uma reação fraca de linfócitos, eosinófilos e histiócitos em camundongos após o inóculo intraperitoneal de células do EAT, porém o crescimento do tumor não foi inibido. Por outro lado, os animais imunes (remoção de um transplante do mesmo tumor da cauda do animal) apresentaram, após o estímulo intraperitoneal de células do EAT, uma distinta agregação de linfócitos com células do tumor, e a inibição do crescimento do mesmo foi observada.

A reatividade dos linfócitos frente a células do tumor foi investigada por ZOLLER et al. (1975), utilizando teste de microcitotoxicidade. Os testes revelaram que células de linfonodo de ratos imunizados contra hepatomas e sarcomas foram citotóxicas para células do tumor imunizante com baixa reatividade cruzada. Entretanto, células de linfonodo de ratos, portadores de tumor, deram reação cruzada contra uma ampla variedade de sarcomas e hepatomas, sugerindo que os portadores dos tumores foram sensibilizados contra antígenos comuns, bem como antígenos específicos associados com esses tumores. Uma maior atividade dos linfócitos provenientes de animais portadores de tumor induzido por metilcolantreno, foi observada quando comparada com as de animais imunizados e normais, em testes de verificação da síntese de DNA produzida "in vitro" quando esses linfócitos foram incubados com células do tumor bloqueadas por mitomicina-C (BURK et al. ,1976).

Outras pesquisas foram realizadas investigando a participação de células específicas da resposta celular contra os tumores. Evidências para o envolvimento de macrófagos na imunidade contra os tumores foram primeiramente demonstradas por OLD et al. (1959), uma vez que infecção por BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) tornou camundongos resistentes ao enxerto do tumor. Em continuidade às investigações sobre a participação dos macrófagos na resposta contra os tumores, EVANS & ALEXANDER (1970) constataram que a adição de macrófagos provenientes de animais imunizados contra o linfoma L5178Y inibiu a divisão celular do mesmo "in vitro". O mesmo foi observado quando macrófagos obtidos de animais normais, foram adicionados, juntamente com células do baço provenientes de animais imunizados contra o linfoma ou com o sobrenadante de cultura de linfócitos incubados com as células do tumor. (EVANS & ALEXANDER, 1972). Outra evidência da influência dos macrófagos contra os tumores foi avaliada por ISA & SANDERS (1975), investigando o crescimento do teratoma 40ZAX em camundongos fêmeas virgens singênicas ou alogênicas. Os autores observaram crescimento do tumor após os animais terem sido tratados com soro anti-macrófago, sendo que os anticorpos encontrados no soro, bem como ligados à superfície do tumor, não foram citotóxicos para a célula do tumor.

Alguns trabalhos utilizando camundongos recém-nascidos timectomizados e atímicos congenitamente (RYGAARD & POVLSEN, 1974 e WESTON, 1973) sugerem que a imunidade humoral desempenha um papel de relevância nos mecanismos de defesa contra os tumores. GORER & AMOS (1956) demonstraram que soro obtido de camundongo hiperimunizado com células ascítica E.L.4, quando inoculado em animais isogênicos e não isogênicos, promoveu uma imunidade passiva a subsequente inoculação de células E.L.4. Resultados de proteção contra subsequente estímulo também foram alcançados por KLEIN & SJOGREEN (1960), incubando células de tumores induzidos por metilcolantreno com soro ou células linfóides provenientes de doadores imunizados contra os tumores.

A ação de anticorpos contra as células tumorais tem sido avaliada empregando-se testes que demonstram a lise das células do tumor "in vitro" quando complemento é adicionado. Segundo FLAX (1956), o soro de coelho anti-tumor Ehrlich e complemento de cobaio preveniu o crescimento do tumor em camundongos, pelo fato das células tumorais terem sido lisadas - o que foi avaliado pela tomada do corante - enquanto que as células tratadas somente com a fração globulínica não foram lisadas. Resultados semelhantes foram obtidos com um sarcoma murino induzido por 3 - metilcolantreno sendo que, a resposta imune citotóxica para antígenos tumor específicos (TSA) residiu nas frações de IgM e IgG com a adição de complemento exógeno (BLOOM, 1970). A classe de anticorpos citotóxicos produzidos após a imunização de coelhos com dois hepatomas (induzido por dietilnitrosanina) de cobaios antigenicamente distintos, designados linhagem 1 e linhagem 10, foi avaliado através da interação com a concanavalina A e protelina A de *Staphylococcus aureus*. As análises dos resultados demonstraram que os tumores da linhagem 1 produziram tanto IgG quanto IgM. Com relação à linhagem de tumor 10 houve somente a produção de IgG (LANGONE et al., 1978).

Estudos do efeito do soro de coelho anti-EAT sobre as células do tumor, (ELLEM, 1957) mostraram um aumento no volume celular de cerca de 40% que foi acompanhado por um aumento na permeabilidade da membrana celular, na presença de complemento. Estudos a nível de microscopia eletrônica das células do tumor ascítico de Krebs, tratado "in vitro" com globulina de coelho anti-células do tumor revelaram uma alteração na estrutura da membrana da superfície celular. A subsequente suplementação do complemento para este sistema danificou severamente a matriz citoplasmática, mitocôndria e retículo endoplasmático. Essa seqüência de eventos promove a base estrutural para a ação citotóxica do complemento e anticorpos (GOLDBERG & GREEN, 1959).

Alguns investigadores procuraram reconhecer anormalidades ou alterações

na composição protéica do sangue de animais portadores de tumor. Nesse sentido, CAMPBELL et al. (1959), comparando as proteínas séricas de ratos normais com as de portadores de tumor induzido por 4 - dimetilaminoazobenzeno, através da técnica de eletroforese zonal, verificaram que o soro dos animais portadores de tumor continha mais proteínas de mobilidade das alfas globulinas; pelo método de imunoeletroforese, foi possível observar que as proteínas presentes em concentrações elevadas no soro de animais com tumor apresentavam mobilidade correspondente a alfa 1 e alfa 2 globulina. Resultados semelhantes foram obtidos por PIROSKY & OISGOLD (1961_a), em estudos de imunoeletroforese, utilizando proteínas séricas de ratos portadores de tumor induzido por metilcolantreno - dentro de um sistema-tumor-hospedeiro-isólogo - onde demonstraram um aumento das frações alfa 2-II e beta 3-I e uma diminuição das alfas 2-I e gamaglobulinas. Também demonstraram, dentro de um sistema-tumor-hospedeiro-homólogo (Sarcoma 180), através de traçados imunoeletroforéticos um aumento de todas as subfrações da zona alfa 2 e um aumento moderado da porção gama média e das porções catódicas beta 3 -I globulinas na fase inicial do desenvolvimento do tumor. Na fase avançada do desenvolvimento do tumor, observaram uma acentuada reação e aumento das frações alfa 2; gama e beta 3-I globulinas (PIROSKY & OISGOLD, 1961_b). Análises imunoeletroforéticas foram também realizadas com soro de camundongos portadores de adenocarcinoma mamário espontâneo, adenocarcinoma mamário transplantado pela primeira vez e adenocarcinoma mamário estabilizado (vigésima segunda transferência). Os traçados imunoeletroforéticos dos três sistemas estudados mostraram uma diminuição das alfa 2-I globulinas com o crescimento do tumor e um aumento das beta e gamaglobulinas, na fase inicial do desenvolvimento do tumor (PIROSKY & OISGOLD, 1964).

Outro componente presente no soro que tem despertado a atenção de pesquisadores é o sistema complemento, seja pela sua participação na lise das células tumorais, onde interage com o anticorpo, seja pela promoção de fagocitose, atração

quimiotática de células fagocitárias, seja também na modulação da resposta inflamatória pela atração de eosinófilos e na geração de anafilaxia. HARTVEIT (1970), verificando o título do componente C1 do sistema complemento, no soro de animais portadores do tumor de Ehrlich e do carcinoma Bergen A4 com doze dias de desenvolvimento, observou uma diminuição no título desse componente quando comparados com o título obtido do soro dos animais controles. Posteriormente SAKAMOTO & NISHIOKA (1975), avaliaram a concentração dos componentes C3 e C4 no soro de ratos portadores de tumores induzidos por metilcolantreno (MC) e induzidos por dimetilaminoazobenzeno (DAB). Esses autores, verificaram um aumento nas concentrações dos componentes C3 e C4 com o desenvolvimento do tumor induzido por metilcolantreno, refletindo a manutenção da integridade das defesas do hospedeiro contra o tumor. Já nos ratos com tumores induzido por demetilaminoazobezeno, uma diminuição na concentração desses componentes do sistema complemento foi constatada. Neste caso, o autor sugere que provavelmente o dano provocado no fígado desses animais pela ingestão do DBA, tenha sido o responsável por esta diminuição. Nesta mesma linha de pesquisa, BELLELLI & SEZZI (1976), utilizando a administração do fator de veneno de cobra (CoF), o qual promove uma depleção do componente C3 circulante, investigou a participação desse componente do sistema complemento na rejeição do tumor de Ehrlich e da Leucemia L1210. Esses autores observaram que, camundongos imunizados contra as células do EAT e contra as células da Leucemia L1210, quando tratados com CoF, passaram a desenvolver ambas as neoplasias. Já os animais imunizados contra as células de ambas as neoplasias, foram capazes de rejeitar as células do tumor imunizante quando reestimulados. Assim esses autores, sugeriram que o componente C3 do sistema complemento, participa da rejeição desses tumores experimentais, provavelmente ligando-se a anticorpos sobre as células neoplásicas, formando um complexo imune que estimula a atividade dos macrófagos. Estudos subseqüentes, ainda utilizando o tumor de Ehrlich como modelo experimental,

demonstraram que o soro dos animais portadores desse tumor perderam a capacidade de mediar imunoaderência. Isto ocorreu devido à diminuição na concentração dos fragmentos C3b e C3d, como consequência do consumo dos componentes do sistema complemento pela via alternativa, durante a resposta inflamatória que acompanha o crescimento do tumor (PORTA et al., 1978) .

A relação tumor-hospedeiro tem sido avaliada quanto a capacidade de seus componentes imunes (tais como linfócitos, macrófagos e anticorpos) de reagir "in vitro" contra células do tumor, ou de transferir imunidade ativa ou passiva a receptores normais. Em boa parte dos estudos publicados, o desenvolvimento do tumor foi avaliado obtendo-se componentes imunes de sítios distantes do mesmo. Por outro lado, procurando enfocar a resposta imune no sítio de desenvolvimento do tumor, THUNOLD (1968_b) verificou a presença de globulinas na superfície das células do EAT provenientes de hospedeiros imunologicamente competentes, utilizando testes de aglutinação mista e consumo antiglobulina. Através da imunofluorescência indireta, este autor indicou ainda a presença de anticorpos circulantes após a rejeição do tumor, sendo que estes estavam ausentes em animais apresentando tumor. Imunoglobulinas ligadas à superfície do tumor foram detectadas para a variante ascítica do hepatoma D23 através de testes de imunofluorescência, bem como a presença de anticorpos no soro e no fluido ascítico. Entretanto, quando comparadas ambas as formas - ascítica e sólida - para a presença de anticorpos circulantes, verificaram reações positivas em ambas. Contudo, quando a forma sólida do tumor tornou-se palpável, a presença desses anticorpos não foi mais detectada. Por outro lado, os mesmos foram detectados durante todo o período de desenvolvimento da forma ascítica (ROBINS, 1975). Utilizando a proteína A proveniente de *Staphylococcus aureus* e anticorpos contra as imunoglobulinas de camundongos, DORVAL et al. (1976_b) observaram que os mesmos foram fixados por várias células de tumor crescendo "in vivo", mas não contra seus correspondentes crescendo em cultura. Além disso, a IgG foi encontrada aumentada

com o desenvolvimento do tumor. Ainda nessa linha de pesquisa DORVAL, et al. (1976_a), investigaram a especificidade das imunoglobulinas presentes sobre as células de tumores murino. A remoção artificial das imunoglobulinas através do tratamento com ácido ou pelo cultivo das células tumorais, demonstrou uma correlação direta entre o aumento na expressão dos antígenos associado ao tumor (TAA) e a perda de imunoglobulinas ligadas às células tumorais; porém não demonstrou alterações na expressão de outros antígenos da membrana normal. Segundo RAN et al. (1976), o aumento dos anticorpos citotóxicos ligado às células do tumor segue a cinética do aumento do anticorpo no soro e está inversamente correlacionado com a quantidade de antígenos livres sobre a superfície da célula do tumor (Sarcoma) induzido por vírus polyoma (SEYF-a). Entretanto, dentro desse sistema experimental, a capacidade de ativar complemento é expressada por anticorpos cobrindo populações de células de tumor recente, enquanto que anticorpos cobrindo populações de células do tumor tardio são incapazes de ativar o complemento (BRASLAWASKY, 1976). O principal anticorpo ligado às células do tumor desenvolvendo atividade citotóxica é a IgG2a que apresenta uma atividade elevada entre os 11-15 dias de desenvolvimento do tumor (MOAU & WITZ, 1978).

O desenvolvimento de uma imunidade efetiva a ser desenvolvida pelo hospedeiro contra o crescimento tumoral é ainda ressaltada pela imunidade concomitante anti-tumoral, isto é uma condição de imunidade adquirida que capacita o hospedeiro, com tumor progressivo, a neutralizar o crescimento de um novo implante de células do mesmo tumor, quando inoculado em um sítio distante. Esse tipo de imunidade foi inicialmente demonstrada por EHRLICH em 1906 e posteriormente, BASHFORD et al. (1908) confirmaram estes achados, conduzindo a novos estudos deste fenômeno. Esses autores concluíram que a resistência do animal portador de um tumor a um segundo estímulo do mesmo é mediada por mecanismos imunológicos. Outro aspecto é a resistência do hospedeiro a uma segunda indução do tumor após

(Imunidade semi-concomitante). Este fato foi inicialmente descoberto por UHLENHUTH et al. em 1910, porém esse fenômeno permaneceu esquecido por mais ou menos 40 anos, quando LEWIS & APTEKMAN (1952), utilizando a técnica de regressão artificial através da oclusão da circulação sangüínea do tumor, por um torniquete de borracha durante um dia, demonstraram que o isolamento do crescimento de um sarcoma singênico ou do crescimento de carcinoma em ratos congênitos, resultou na completa regressão dos tumores e ainda que esses animais foram capazes de inibir o crescimento de células do mesmo tumor quando reinoculadas.

Vários são os trabalhos investigando esse fenômeno. GERSHON et al. (1967) observaram, em "hamsters" portadores de implantes de um linfoma alotransplantado com 3 semanas, a regressão de um segundo inóculo de células do mesmo tumor. Essa regressão foi dependente do número de células e do período de permanência do tumor sobre o hospedeiro; e ainda que células do baço, provenientes dos mesmos animais, transferia imunidade passiva a receptores normais. Também observaram que células de peritônio, quando misturadas com células do tumor antes do inóculo, mostraram-se eficazes para evitar o crescimento de tumor em receptores normais. Resultado menos significativo de proteção foi observado removendo-se cirurgicamente um transplante primário do tumor ascítico de Ehrlich da cauda de camundongos em relação ao crescimento de um transplante secundário, subcutâneo ou peritoneal, de células do mesmo tumor. O implante subcutâneo secundário resultou em uma redução no número de tumores desenvolvidos; entretanto, o implante intraperitoneal secundário levou ao desenvolvimento de tumores em muitos animais, contudo aumentou o tempo de sobrevivência dos mesmos (THUNOLD, 1967_a). Posteriormente, FISHER et al. (1970) obtiveram resultados de proteção com tumores induzidos por metilcolantreno e tumores mamários espontâneos, tanto na presença do tumor primário, como quando removido previamente ao segundo estímulo. Entretanto, resultados negativos foram obtidos quando houve a remoção parcial ou completa do

tumor, subseqüentemente a estimulação secundária. Uma outra evidência da resistência adquirida pela remoção do tumor, foi observada em estudos sobre os efeitos de dois métodos de curas: excisão e radioterapia locais aplicadas em camundongos portadores de fibrossarcoma induzido por metilcolantreno. Após completa remoção cirúrgica do tumor, houve uma forte resposta de resistência ao crescimento das células do tumor reimplantado. Por outro lado, a remoção do tumor, realizada após o animal ter sido reestimulado com células do tumor ou o tratamento com irradiação demonstrou uma resistência diminuída pelo hospedeiro, porém não nula (VAAGE, 1971)

Estudos realizados por GERSHON et al. (1971), investigando algumas variáveis que podem influenciar a manifestação da imunidade semi-concomitante depois da excisão de um linfoma alotransplantado em "hamster", demonstraram que após a inoculação do tumor, existe um período limitado no qual a remoção do tumor primário afeta a manifestação da imunidade semi-concomitante. Esse intervalo de tempo depende do número de células do tumor injetadas - grandes números, curto período de tempo. Com relação à imunidade concomitante, DECKERS et al. (1973) observaram que camundongos portadores de fibrossarcoma induzido por metilcolantreno, rejeitaram um segundo isoenxerto do tumor inoculado 14 dias após o início do transplante, mostrando ser a imunidade concomitante específica. Resultados similares foram obtidos por CHANDRADASA (1973), estudando a resistência concomitante em camundongos portadores de sarcoma induzido por metilcolantreno, sendo que o pico da resposta imune ocorreu entre 10 e 14 dias após o implante do tumor. Contudo, após esse período, houve um declínio na resistência à reinoculação com células do tumor. Muitos outros trabalhos nessa linha de investigação concluíram que o grau de inibição a um segundo inóculo está relacionado com o tamanho da massa do tumor primário e também com o período de desenvolvimento do mesmo (DECKERS et al., 1976; GORELIK et al., 1981; GORELIK, 1983 e GUERRA, 1983). Alguns pesquisadores demonstraram que mecanismos imunológicos, principalmente os mediados por células T e macrófagos,

estão envolvidos no fenômeno da imunidade concomitante (GERSHON, 1967; DECKERS et al., 1973; CHANDRADASA, 1973) Por outro lado, pesquisas realizadas com tumores não imunogênicos ou fracamente imunogênicos demonstraram que a imunidade concomitante nestes modelos experimentais não está relacionada com a presença de células efectoras, uma vez que camundongos "nude" e tratados com sílica foram capazes de inibir o segundo inóculo de células do mesmo tumor (GORELIK et al., 1981; GORELIK, 1983; RUGGIERO et al., 1985; RUGGIERO et al., 1990). Segundo MEISS et al (1986), o exame histológico do sítio secundário de crescimento do tumor revelou que a regressão não apresentava necrose, bem como infiltração das células do hospedeiro. Os autores atribuíram esse fenômeno a mecanismos citostáticos.

Um aspecto relevante a ser considerado com relação ao uso desses modelos experimentais é o fato de apresentarem sob contínuo transplante, alterações inesperadas e permanentes na transplantabilidade. STRONG (1926_a; 1926_b), trabalhando com tumores transplantáveis dBrC e dBrD, os quais originaram espontaneamente na linhagem de camundongos DBA (dilute brown strain), observou, na rotina de transplantes deste tumor, alterações no potencial de reação - transplantabilidade - resultando no surgimento de novos tipos de tumores transplantáveis, os quais apresentaram um aumento no vigor proliferativo e perda da especificidade. CLOUDMAN (1932) e BITTNER (1947) confirmaram as observações feitas por STRONG sobre os tumores. MacDOWELL et al. (1939) reportaram que diferenças imunológicas foram encontradas entre células leucêmicas nos animais de origem e aquelas passadas através de uma série de hospedeiros. Alterações de "virulência" , taxa de divisão celular, infiltração, perda de especificidade para as células leucêmicas foram ainda relatadas por MacDOWELL (1946) em suas observações com esse modelo experimental.

Um outro fator a ser considerado foi sugerido por GORER (1947), segundo

* O termo **virulência** foi mantido no texto, em respeito ao pesquisador. Embora tendo este outra conotação atual.

o qual o aumento de um antígeno pode impedir a entrada de outros e que este processo de "mascaramento" pode ser considerado um eliminante de fatores-H fracos durante o curso da passagem do tumor. Dessa forma, o desaparecimento de alguns antígenos requer o rearranjo do equilíbrio gênico, levando a um desbalanceamento do número cromossômico.

O pré-requisito citológico para tais aspectos é demonstrado através de uma ampla heteroploidia presente no tecido maligno quando analisado quanto a distribuição do número cromossômico (HAUSCHKA, 1953; LEVAN, 1956; TJIO & LEVAN, 1956; HAUSCHKA & LEVAN, 1958). Tumores transplantáveis são, deste modo, mosaicos nos quais aberrações mitóticas promovem ampla oportunidade não somente para a perda fisiológica de genes histocompatíveis, mas também para alterações cumulativas de ploidia trazida sobre modificações antigênicas através da desarmonia intercromossomal.

Sob contínua seleção natural em hospedeiros compatíveis, as células com grupos de cromossomos balanceados apresentam vantagens sobre suas competidoras aberrantes. Isso foi evidente a partir de uma série representativa de estudos realizados com tumores ascíticos, os quais, apesar de numerosas irregularidades mitóticas, perpetuaram sua característica diplóide ou tetraplóide com relação ao número modal por mais de cinco gerações de transplantes sucessivos (HAUSCHKA, 1952; HAUSCHKA & LEVAN, 1953). Testes de transplantabilidade realizados por SACHS & GALLY (1955) mostraram que diferenças no número modal de cromossomos estão correlacionadas ainda com diferenças na especificidade da linhagem, no qual os tumores com número elevado de cromossomos duplicados estão relacionado com um alto grau de inespecificidade. A relação de histocompatibilidade entre o enxerto e o hospedeiro, isto é, a influência da ploidia ($2n$ versus $4n$) sobre o grau de especificidade foi confirmado por HAUSCHKA & LEVAN (1953), os quais concluíram ainda, que a ampla transplantabilidade dos tumores, com um número elevado de cromossomos, independem da taxa de crescimento, "virulência", bem como do tecido e linhagem de

origem.

A antigenicidade reduzida dos tumores aneuplóides bem como daqueles próximos aos tetraplóides é interpretada como resultado de alterações no equilíbrio gênico. Em uma célula tetraplóide, mais do que dois "loci" podem ser disponíveis para alguns genes antigênicos. Os alelos antigênicos podem, conseqüentemente, funcionar de forma alterada com relação àquelas para os quais eles são restritos no núcleo diplóide com conseqüente alteração ou extinção de seus produtos finais específicos. Perda de especificidade pode, desse modo, ser vista como uma seleção imunológica de tipos antigênicos mínimos entre variantes de cromossomos viáveis em uma população de células neoplásicas (HAUSCHKA, 1953). O surgimento de células com uma resposta imunológica mínima como conseqüência do fenômeno de seleção imune foi sugerido por KAZIWARA (1954), após a inoculação de uma pequena quantidade de células do tumor ascítico de Ehrlich hiper-diplóide. O autor obteve células tumorais hiper-tetraplóides, como conseqüência da possível resposta imune efetiva temporária produzida pelo animal contra o inóculo. Alterações no número de cromossomos, "virulência" e no padrão invasivo, foram observadas por HAUSCHKA et al. (1955/1956) em seus estudos, investigando a função da imunosseleção na relação entre heteroploidia e especificidade reduzida para três sublinhagens do linfossarcoma ascítico 6C3HED (origem C3H). Ainda testes de hemaglutinação demonstraram que pequenos resíduos de células do tumor diplóide, persistindo na ascite tetraplóide, deram reação positiva com o genótipo dos camundongos nos quais o tumor originou. Esta minoria de células diplóides são gradualmente resselecionada para predominar na população neoplásica, após o tumor ter retornado para o animal da linhagem, no qual este surgiu.

Alterações nas células tumorais foram também detectadas nas linhagens mantidas "in vitro". Trabalhando com três linhagens do hepatoma Novikoff de ratos em cultura HSU (1960) observou que as mesmas perderam a transplantabilidade quando

inoculadas em animais susceptíveis. Entretanto, tornaram os receptores imunes ao implante das células malignas crescendo "in vivo". A perda de transplantabilidade, mesmo em camundongos irradiados e a indução de proteção contra os inóculos das linhagens dos tumores ascitos de Ehrlich; TA3 e 6C3HED foram observadas por MORGAN et al. (1970), que avaliou as características desses tumores crescendo "in vitro". ENG et al. (1970) demonstraram proteção contra as células 6C3HED crescendo "in vivo" após o inóculo prévio de suas correspondentes crescendo "in vitro". Os autores observaram que esta proteção foi mediada por anticorpos, como revelaram os testes de citotoxicidade realizados "in vitro" com soro dos animais imunes, acrescidos do soro de coelho, como fonte de complemento.

Considerando o fato dos tumores serem constituídos por uma população de células heterogêneas e apresentarem uma linhagem de célula precursora que descreve a progressão do tecido neoplásico, NOWEEL (1976) sugeriu o modelo da evolução clonal das populações da célula do tumor. Nesse contexto, o início do tumor ocorre através de uma alteração induzida em uma célula normal única. Com o decorrer do tempo, como resultado da instabilidade genética na expansão da população do tumor, células mutantes são produzidas. A maioria dessas células é eliminada, devido a desvantagem no metabolismo ou destruição imunológica, porém ocasionalmente uma das células tem vantagens seletivas adicionais com respeito à célula do tumor original, bem à células normais, e essa mutante torna-se a precursora de uma nova subpopulação predominante. A interação entre essas novas subpopulações de células formadas através da mutação e as subpopulações de origem foi avaliada por BIDDISON & PALMER (1977), utilizando células tumorais P-815-Y (uma variante do mastocitoma de camundongo P-815). Esses autores observaram que, quando as células mutantes foram coletadas a partir da cavidade peritoneal logo após a fase de rejeição parcial do tumor, essas foram menos sensíveis do que as células do tumor original a linfócitos T citotóxicos (CTL) presentes no exsudato peritoneal dos mesmos camundongos. Como

hipótese, os autores sugerem que isso pode ter ocorrido ou pelo aparecimento de variantes estáveis que perderam antígenos ou por um fenômeno de modulação. Dentro desse mesmo aspecto, a variante P815-X2 foi investigada por UYTENHOVE et al. (1983). Esses investigadores demonstraram que, quando as células tumorais escapam da eliminação devido à rejeição imune, o hospedeiro não se apresenta imunossuprimido. Isso foi mostrado pela rejeição de células P-815 (tumor de origem) injetadas nessa fase, e que as células emergentes (P815-X2) foram menos sensíveis aos CTL quando comparadas com as células P-815. Sugerindo dessa forma que a resistência não é devida à modulação, porém à presença de variantes estáveis que tenham perdido algumas das especificidades antigênicas associadas ao tumor original P-815.

Nessa mesma linha de pesquisa, AABO et al. (1987) estudaram a interação celular "in vivo" entre duas subpopulações do EAT (E1.15 e E1.95) crescendo subcutaneamente e intraperitonealmente em camundongos N/D competentes. Observaram que, quando essas células foram misturadas e inoculadas subcutaneamente, houve uma inibição do crescimento das células E1.95 (não imunogênicas). Por outro lado, o crescimento de ambas as células tumorais na cavidade peritoneal não demonstrou influenciar o crescimento das mesmas. Concluíram que essas manifestações são dependentes de contato e provavelmente a resposta imune mediada por célula T, trazidas à tona pela subpopulação imunogênica, foi a causa da inibição do crescimento da E1.95. Em seqüência aos estudos, AABO et al. (1989) estenderam suas observações, acrescentando uma linhagem de célula geneticamente diferente (leucemia P-388) das subpopulações de células do EAT (E1.15 e E1.95). Os resultados obtidos após o inóculo subcutâneo de todas as células juntas revelaram que as células E1.15 inibem o crescimento das E1.95, entretanto, não alteram o crescimento das células P-388. Isso indica que, além do contato entre as células, é necessário a existência de uma semelhança genética entre as mesmas.

Pelo exposto, podemos observar que o tumores experimentais foram

analisados sob diferentes pontos de vista, como também em diferentes condições. Para tanto, esses tumores tem sido mantido "in vivo" - por passagens sucessivas em animais susceptíveis - e "in vitro"- através de meios de culturas ou por técnicas de congelamento. Embora tumor de Ehrlich tenha sido analisado sob diferentes aspectos, atualmente pouco pudemos encontrar na literatura sobre seu desenvolvimento em relação à vários constituintes sorológicos, o que foi o objetivo desse trabalho. Além disso, foi também nosso objetivo analisar a presença da imunidade concomitante nesse modelo experimental.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais.

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss, não isogênicos, pesando de 25 a 30g, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB) - UNICAMP. Durante a fase experimental, os animais foram mantidos no Biotério da Disciplina de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP, recebendo ração balanceada e água "ad libitum". Segundo os dados contidos no certificado de qualidade genética-sanitária expedido pelo CEMIB/UNICAMP, os animais apresentavam-se livres de doenças virais e parasitárias específicas, enquanto mantidos no Centro de Bioterismo.

2. Tumor experimental.

O tumor utilizado como modelo experimental foi o Tumor de Ehrlich (EAT) originalmente descrito por EHRLICH (1906), obtido junto à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Área de Patologia Experimental e Comparada, cedido gentilmente pelo Prof. Dr. José Luiz Guerra (linhagem 1-G) e posteriormente o mesmo tumor foi obtido através da SIR WILLIAM DUNN SCHOOL OF PATHOLOGY/ University of Oxford cedido gentilmente pelo Prof. Dr. Mike G. Simpkins (linhagem 2-S). Originalmente as linhagens de células representam um adenocarcinoma mamário isolado de camundongos fêmeas, que cresce em várias linhagens desta espécie na forma ascítica, quando inoculadas intraperitonealmente, e na forma sólida, quando inoculadas subcutaneamente. A amostra designada linhagem 1-G estava sendo mantida pela passagem seriada a animais susceptíveis "in vivo", enquanto que as células pertencentes à linhagem 2-S estavam sendo mantidas

congeladas em 90% (MEM 10% FCS) e 10% DMSO (SIMPKINS, 1993 comunicação pessoal).

2. 1. Manutenção do tumor de Ehrlich.

Ambas as linhagens do tumor foram mantidas no Laboratório da disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba na forma ascítica em camundongos Swiss (item 1). Para tanto, cerca de 0,1 ml do fluido ascítico contendo aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células tumorais (SUGIURA, 1965), foi obtido de um animal portador do tumor ascítico com 7 dias de desenvolvimento e imediatamente inoculado intraperitonealmente em camundongos normais. Esse procedimento foi repetido a cada 7 dias, durante todo o tempo de experimentação (SYKORA, 1961). Atualmente, essas células encontram-se congeladas à -70°C , diluídas em glicerol na concentração final de 5 a 10%.

2. 2. Preparo das células tumorais para inoculação.

O preparo das células tumorais para inoculação incluiu a lavagem, contagem, teste de viabilidade e padronização das mesmas. Camundongos portadores de tumor na sua forma ascítica, com 7 dias de desenvolvimento, foram sacrificados com vapor de éter etílico e fixados em decúbito dorsal em suporte apropriado. Após depilação e assepsia da parede abdominal com álcool iodado, esta foi excisada com tesoura cirúrgica de ponta fina para a introdução de seringa de plástico de 1 ml, sem agulha, a fim de retirar o fluido ascítico (Fig. 1). Esse fluido, contendo células tumorais, foi colocado em tubo de ensaio esterilizado, sendo posteriormente transferido 1 ml do mesmo para um tubo de ensaio com rosca e esterilizado, contendo 4 ml de Tampão PBS (Tampão Fosfato-Salina) em pH 7.2 e centrifugado a 1.000 rpm durante 5 minutos

(centrifuga Alpha, mod. 1-A). O sobrenadante foi desprezado e o centrifugado (células tumorais) ressuspensão no mesmo tampão. Esta operação foi repetida por duas vezes, obtendo-se finalmente, a suspensão padrão em 5 ml de Tampão PBS. Entretanto, quando o fluido ascítico se apresentava hemorrágico - principalmente o das amostras obtidas da linhagem 2-S - foi realizada lavagem prévia, com PBS até que não houvesse mais a presença de hemácias na amostra (Fig. 2). Seguiu-se, então, a contagem e teste de viabilidade das células tumorais. Para tanto, a suspensão de células foi diluída 1:10, tendo como diluidor o PBS e posteriormente nova diluição a 1:10, tendo como diluidor Azul de Tripan 0,1%, diluído 1:4 em solução salina (PAPPENHENHEIMER, 1917). A fórmula final para a determinação do número de células viáveis foi deduzida segundo CAMPBELL & CAMPBELL (1986), (ver apêndice).

Todo o material utilizado apresentou, via de regra, uma viabilidade celular em torno de 90%, ou seja, 10% das células apresentavam coloração azul, o que significava serem estas células não viáveis, uma vez que o sistema de permeabilidade seletiva se encontrava inativo. A concentração de células viáveis foi ajustada de acordo com os experimentos realizados.

3. Procedimento experimental.

3. 1. Obtenção do soro de camundongos para testes sorológicos e eletroforese.

Foram utilizados 240 animais da linhagem Swiss, pesando de 25 a 30g, sendo que 180 para a linhagem 1-G e 60 para a linhagem 2-S.

Linhagem 1-G - Os animais foram divididos em 6 grupos de 30, sendo 3 grupos experimentais, diferindo entre si pela via de inoculação utilizada e o volume final inoculado, uma vez que o número de células tumorais foi o mesmo para todos os

grupos ($2,0 \times 10^6$ células).

Grupo A - via intraperitoneal - 0,1 ml (EAT_1).

Grupo B - via subcutânea - 0,05 ml no coxim plantar do membro posterior (EAT_1 -P).

Grupo C - via subcutânea - 0,05 ml na região dorsal (EAT_1 -D).

Os 3 grupos restantes representaram o controle do Grupo A (EAT_1 -C); Grupo B (EAT_1 -PC) e Grupo C (EAT_1 -DC). Os grupos foram posteriormente subdivididos em 6 subgrupos de 15 animais, sacrificados nos respectivos períodos de 7 e 13 dias do desenvolvimento do tumor.

Linhagem 2-S - Os animais foram divididos em 2 grupos de 30, sendo um grupo experimental inoculado com $2,0 \times 10^6$ células em um volume final de 0,05 ml no coxim plantar do membro posterior (EAT_2 -P) e o outro grupo recebeu um inóculo de 0,05 ml de PBS no coxim plantar do membro posterior, representando o controle (EAT_2 -PC). Não houve a obtenção do soro dos animais apresentando a forma ascítica, devido ao fato dos animais inoculados intraperitonealmente com essas células apresentarem um tempo de sobrevivência curta, em média 5 dias e fluido ascítico altamente hemorrágico. Posteriormente esses grupos foram subdivididos em 2 grupos de 15 animais e sacrificados nos respectivos períodos de 7 e 13 dias do desenvolvimento do tumor. Decorridos os períodos, os camundongos foram anestesiados com vapor de éter etílico, sendo que a região ventral esquerda foi tricotomizada com posterior assepsia. Com o auxílio de uma tesoura reta de ponta fina, fez-se a incisão na pele e, em seguida divulsão com uma tesoura de ponta reta romba até localizar-se a artéria braquial, a qual foi seccionada. Com o auxílio de pipeta Pasteur, coletou-se o volume total de sangue em tubos, os quais foram deixados por um período de 2 horas à temperatura ambiente para coagulação. Decorrido esse tempo, os tubos foram centrifugados a 16.000 rpm durante 30 segundos (microcentrífuga Incibrás, mod. Spin 1), transferindo-se em seguida o soro para novos tubos, os quais foram rotulados e estocados a -28°C .

3. 2. Eletroforese

3. 2.1. Eletroforese em gel de agarose e Densitometria.

As amostras do "pool" do soro de camundongos portadores do tumor na forma sólida EAT-P (linhagens 1-G e 2-S) e na forma ascítica EAT (linhagem 1-G) e seus respectivos controles, obtidos nos períodos de 7 e 13 dias, foram submetidas à técnica de eletroforese em agarose segundo HJERTÉN (1961) em tampão veronal/EDTA 0,05 M - pH 8.6 (ver Apêndice).

Os traçados densitométricos foram realizados, utilizando-se o densitômetro modelo Auto-Sacner - Flur-vis, marca HELENA LABORATORY- U.S.A..

3. 2 .2. Eletroforese em gel de poliacrilamida.

As amostras do soro obtidas dos animais inoculados com EAT linhagem 1-G (EAT₁; EAT₁-D e EAT₁-P) foram submetidas à técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida- Dodecilsulfato de Sódio (PAGE-SDS), segundo LAEMMLI (1970), em sistema descontinuo de tampão 0,25M de Tris e 0,192M de Glicina e 0,1% de SDS em pH 8.3 (LAEMMLI, 1970) com gel espaçador 2,5% e o gel separador 7,5%. (ver Apêndice).

3. 3. Anti-soros.

Soros de camundongos normais já descritos no item 3.1. foram usados no preparo de anti-soro total. Coelhos pesando em média 2,5 Kg foram inoculados próximo ao linfonodo (OLIVEIRA, 1975) com antígenos (soro total de camundongos). As injeções foram feitas com 0,5 ml de soro emulsionado em adjuvante de Freund incompleto (15% de lanolina + 85% de Nujol) em partes iguais (v/v). Os demais anti-soros utilizados nos diversos testes sorológicos foram obtidos comercialmente da W.L.

Imunoquímica, codificados como: Ig de carneiro anti-Ig total de camundongo (IM:203.3); e IgG de carneiro anti-IgG de camundongo (IM:306.1) e soro de cabra anti-complemento C3c (GAM/C3c) obtido comercialmente da Nordic & Immunology Laboratories, Netherlands.

3. 4. Sangria, preparo e conservação do anti-soro.

Preliminarmente à injeção do antígeno, foi feita uma sangria e o soro de coelho normal (SN) identificado foi, conservado em congelador (-28°C) para testes posteriores de controle na determinação do antígeno. Iniciou-se a sangria em intervalos de mesmo espaço de tempo, para a obtenção do anti-soro (AS). Nas sangrias, foi feito um pequeno corte longitudinal na veia lateral da orelha do coelho, obtendo-se o sangue (20 a 30 ml) em um becker de 80 ml. O sangue permaneceu em temperatura ambiente (1 a 2 horas) para a coagulação, sendo então transferido para tubos e centrifugados a 16.000 rpm durante 30 segundos (microcentrífuga Incibrás, mod. Spin 1), obtendo-se o soro, o qual foi identificado e mantido em congelador (-28°C)

3. 5. Sorologia ou testes sorológicos

3. 5.1. Determinação do título do anti-soro.

Foram utilizados testes sorológicos de dupla difusão em ágar (OUCHTERLONY, 1949) na determinação do título do anti-soro obtido. Os anti-soros foram diluídos em NaCl a 0,15M, seguindo-se progressão geométrica de razão 2.

3. 5. 2. Imunoeletroforese.

Testes sorológicos de imunoeletroforese segundo GRABAR & WILLIAMS (1953), foram feitos usando-se Imunoglobulina (Ig) de coelho anti-soro de camundongo total, obtido conforme descrito no item 3.3. e 3.4. Este anti-soro foi usado em reação com o soro individual e "pool" (associação de 5 diferentes soros) do soro de camundongos (Ag) inoculados com o tumor de Ehrlich linhagem 1-G, apresentando crescimento ascítico (EAT₁) e sólido (EAT₁-P e EAT₁-D) e seus respectivos controles, obtidos nos períodos de 7 e 13 dias (item 3.1.). Testes de imunoeletroforese foram realizados utilizando-se Ig de carneiro anti-Ig total de camundongo (IM: 203.3) em reação com "pool" do soro de camundongos (Ag) portadores do tumor na forma sólida EAT-P (linhagens 1-G e 2-S) e na forma ascítica EAT (linhagem 1-G) e seus respectivos controles, obtidos no período de 7 e 13 dias (item 3.1.). A difusão ocorreu em câmara úmida por um período de 24 horas, seguida por lavagem em solução de NaCl 0,15M sob agitação constante. A secagem do gel foi realizada com papel de filtro. Posteriormente, as lâminas foram coradas com Amido-Black a 0,02%, descoradas em ácido acético 7% e fotografadas (ver Apêndice) .

3. 5. 3. Imunodifusão radial simples

Testes de imunodifusão radial simples descrito por MANCINI et al. (1965) foram realizados usando-se soro de carneiro anti-IgG de camundongo (W.L. imunoquímica-IM 306.1), em reação com "pool" do soro de camundongos portadores da forma sólida do tumor EAT-P (linhagens 1-G e 2-S) e a forma ascítica EAT (linhagem 1-G) e seus respectivos controles, obtidos no período de 7 e 13 dias (item 3.1.) (ver Apêndice).

3. 5. 4. Imunoeletroforese em foguete (Rocket).

Testes sorológicos de eletroforese em foguete (Rocket), segundo CLARKE & FREEMAN (1967) foram realizados usando-se soro de cabra anti-C3c do complemento (GAM/C3) em reação com "pool" de soro de camundongos portadores de tumor na forma sólida EAT-P (linhagens 1-G e 2-S) e na forma ascítica EAT (linhagem 1-G) e seus respectivos controles, obtidos no período de 13 dias (item 3.1.) (ver Apêndice).

3. 6. Monitoramento do crescimento do tumor Ehrlich linhagens 1-G e 2-S , na sua forma sólida.

Após as células terem sido colhidas e lavadas com PBS, foram ajustadas para as concentrações $1,0 \times 10^1$; $1,0 \times 10^2$; $1,0 \times 10^3$; $5,0 \times 10^3$; $1,0 \times 10^4$; $5,0 \times 10^4$; $1,0 \times 10^5$; $5,0 \times 10^5$; $1,0 \times 10^6$ e 5×10^6 células viáveis, as quais foram utilizadas para o inóculo de 16 grupos de 10 animais, que receberam as concentrações citadas no coxim plantar direito em um volume final de 0,05ml. Observações macroscópicas foram realizadas diariamente, analisando o crescimento do tumor.

3. 7. Padronização da curva de crescimento da forma sólida do tumor de Ehrlich em camundongos.

Com o propósito de padronizar o perfil da curva de crescimento do tumor de Ehrlich na sua forma sólida, de ambas as linhagens (1-G e 2-S), diferentes grupos de camundongos foram inoculados com diferentes suspensões de células (descrição abaixo) do tumor ascítico de Ehrlich diluídas em solução salina tamponada (PBS) em um volume final de 0,05 ml no coxim plantar do membro posterior. Cada grupo foi composto de 5 animais identificados individualmente, procedendo-se diariamente -

digital (Browni & Sharpe, modelo 599-571-3),

Linhagem 1-G- Grupo I - $1,0 \times 10^7$ células

Grupo II - $5,0 \times 10^6$ células

Grupo III - $2,5 \times 10^6$ células

Grupo IV - $1,0 \times 10^6$ células

Linhagem 2-S - Grupo I - $5,0 \times 10^6$ células

Grupo II - $2,5 \times 10^6$ células

Grupo III - $1,0 \times 10^6$ células

Grupo IV - $5,0 \times 10^5$ células

3. 8. Imunidade concomitante.

Com o objetivo de avaliar a capacidade de camundongos portadores dos tumores (linhagens 1-G e 2-S) de rejeitar um segundo inóculo do mesmo tumor, foram utilizados 40 (quarenta) animais divididos em 4 grupos de 10 (dez) animais, sendo 2 grupos experimentais e 2 grupos controles. Dez animais pertencentes ao grupo experimental (linhagem 1-G) foram inoculados com 5×10^6 células e outros dez animais pertencentes ao grupo experimental (linhagem 2-S) foram inoculados com $2,5 \times 10^6$ células em um volume de 0,05ml por via subcutânea no coxim plantar direito do membro posterior. Os grupos controles de ambos os experimentos com igual número de animais receberam 0,05ml de PBS subcutaneamente no coxim plantar direito do membro posterior. Após 12 dias do primeiro inóculo (GUERRA, 1983 e DECKERS, et al., 1973), os 4 grupos de animais receberam um segundo inóculo de $1,0 \times 10^6$ células tumorais, em volume total de 0,05ml por via subcutânea no coxim plantar do membro posterior esquerdo. A taxa de crescimento do tumor foi avaliada diariamente durante todo

o período estudado, utilizando-se um paquímetro digital (Browni & Sharpe, modelo 599-571-3).

3.9. Contagem de cromossomos.

Com o propósito de verificar o número modal do tumor Ehrlich linhagens 1-G e 2-S, camundongos foram inoculados intraperitonealmente com 0,1 ml de fluido ascítico, proveniente de camundongos portadores do tumor com 7 dias de desenvolvimento. Após 4 dias da inoculação, os animais receberam via intraperitoneal uma dose de 0,34 ml de uma solução 0,006% de colchicina por 10g do peso corporal. Após 22 horas, os animais foram sacrificados e as amostras obtidas (ISING, 1955), para o preparo citológico e coloração das lâminas (ver Apêndice).

3.10. Determinação da concentração de proteína total.

A proteína total solúvel foi determinada também usando o "pool" do soro de camundongos inoculados com células tumorais das linhagens 1-G e 2-S no coxim plantar do membro posterior e de animais inoculados com EAT linhagem 1-G via intraperitoneal. Para tanto foi utilizado a Micro-técnica do biureto (GOA, 1953), através do espectrofotômetro marca Technicon, modelo RA 1000.

3.11. Análise histológica

Fragmentos da forma sólida do tumor de Ehrlich obtido do coxim plantar do membro posterior de camundongos foram fixados em formal a 4%; desidratado em seqüência crescente de álcool; diafanizados com xilol e incluídos em parafina histológica. Nos blocos, assim obtidos, foi realizada microtomia conseguindo cortes histológicos com 5 micra de espessura, os quais foram submetidos à coloração de rotina

por hematoxilina (di Carazzi) e eosina (de Lison).

3.12. Análise estatística.

As comparações estatísticas foram feitas através de análise de variância em parcelas subdivididas (split-plot).

A comparação das médias foi feita através da aplicação do teste de Tukey, ao nível de 5% (VIEIRA, 1991).

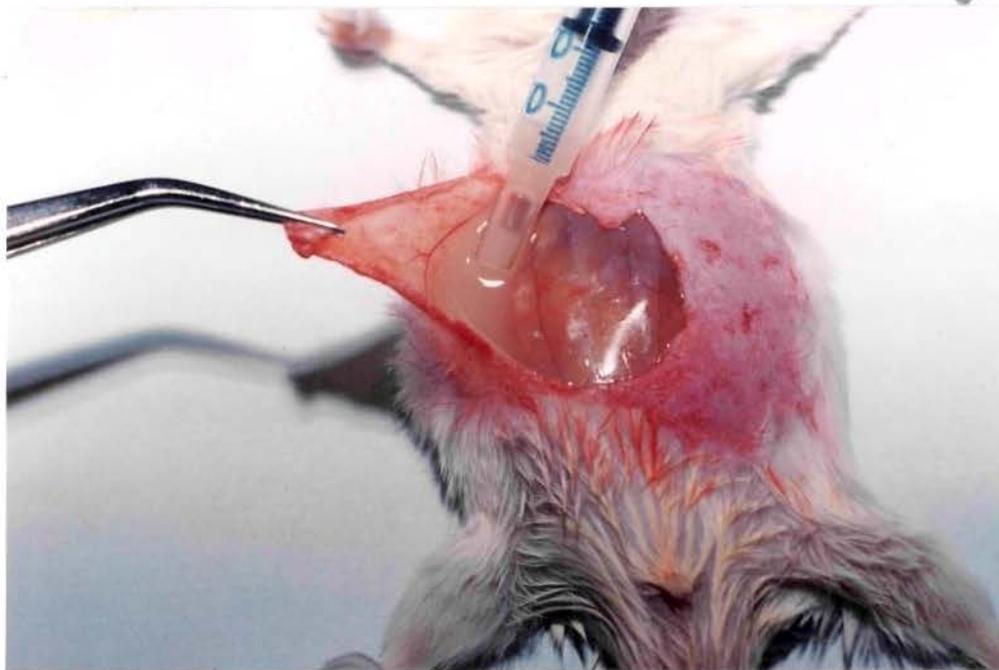


Figura 1- Obtenção do fluido ascítico, contendo as células tumorais.

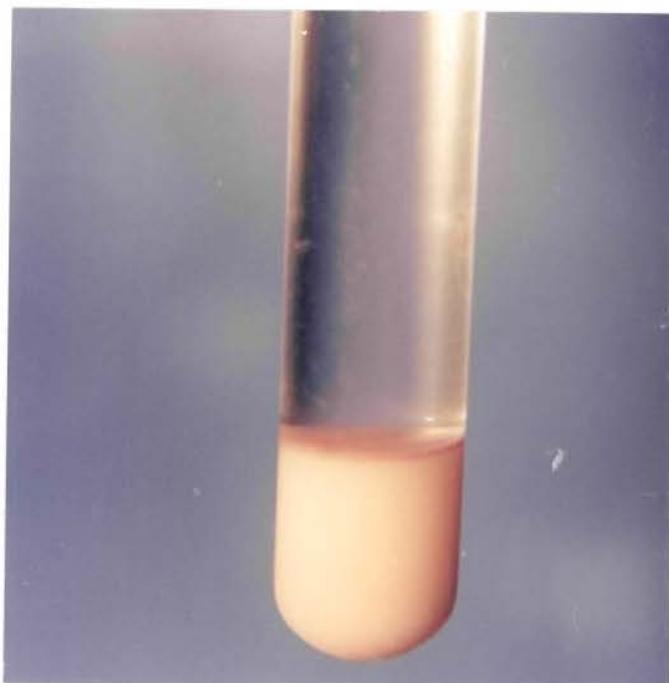


Figura 2 - Sedimento do fluido ascítico após a centrifugação, obtido de camundongos com EAT-linhagem 1-G, 7 dias de desenvolvimento

RESULTADOS

RESULTADOS

Camundongos machos da linhagem Swiss não isogênicos, foram inoculados com uma suspensão padrão de células tumorais, conforme descrito em material e métodos (item 2.2). A Fig.3 mostra os resultados obtidos após 13 dias do implante do tumor ascítico de Ehrlich (EAT). Pode-se verificar um aumento do volume corporal e peso do tumor ou peso do animal portador do tumor, quando comparado ao animal controle normal. O exame microscópico do fluido ascítico desses animais apresentou células esféricas com núcleo volumoso e com um ou mais nucléolos proeminentes (Fig. 4).

A Fig.5 mostra o resultado obtido com camundongo inoculado subcutaneamente com tumor de Ehrlich na sua forma sólida, no coxim plantar de um dos membros posteriores. O exame macroscópico desse tumor, apresentou uma massa palpável, de consistência firme, aspecto homogêneo, coloração branca e brilhante, facilmente destacável das demais estruturas. O exame pela microscopia óptica de rotina (H.E.) desse tumor (Fig. 6) revelou um agrupamento de células neoplásicas arredondadas, com contornos celulares nítidos, aparentemente com pouco citoplasma e com pleomorfismo celular.

1. Eletroforese

1.1. Eletroforese em agarose e densitometria.

Os resultados obtidos pela técnica de eletroforese em agarose realizada com o "pool" do soro de camundongos inoculados com EAT linhagens 1-G e 2-S, apresentando 7 dias de desenvolvimento e os respectivos controles, revelaram a presença de 3 regiões distintas: albumina, alfa-2 globulina e beta globulina. As amostras obtidas com 13 dias do desenvolvimento dos mesmos tumores apresentaram, além

disso, a região da gamaglobulina. As amostras controles desses períodos apresentaram as mesmas regiões das amostras obtidas dos animais com tumor com 7 dias de desenvolvimento (Figuras 7; 8; 9 e 10). A Tabela 1 mostra a concentração de proteína total e a concentração de proteína das diferentes frações em gramas por 100/ml das amostras obtidas, nos períodos de 7 e 13 dias, de ambas as linhagens do EAT, e as dos respectivos controles. As frações protéicas foram calculadas a partir do traçado densitométrico (Figuras 9 e 10) e da concentração de proteína total. A determinação da concentração de proteína total das amostras foi efetuada através da micro-técnica do Biureto (GOA, 1953), utilizando o espectrofotômetro marca Technicon, modelo RA 1000. Conforme exposto na Tabela 1, as concentrações de proteína total do "pool" do soro dos animais com 7 dias de desenvolvimento do tumor linhagens 1-G e 2-S, variaram entre 4,0 e 4,40 g/100 ml. Já os respectivos controles apresentaram uma variação entre 4,08 e 4,40 g/100ml. Com relação aos valores das concentrações de proteína total obtidas a partir do "pool" do soro dos animais com 13 dias de desenvolvimento do tumor, estes variaram entre 4,60 e 4,90 g/100ml. Uma variação similar foi observada nos grupos controles (4,50 e 4,80 g/100ml). Os valores obtidos com a determinação de proteína total para o grupo tratado (tumor) e o grupo controle (PBS), obtidos nos períodos de 7 e 13 dias do desenvolvimento do tumor, foram analisados estatisticamente. As médias dos valores da concentração de proteína total das amostras obtidas no sétimo dia e no décimo terceiro dia dos grupos tratados e controles foram $\bar{x}_t = 4,27$ e $\bar{x}_c = 4,23$; $\bar{x}_t = 4,80$ e $\bar{x}_c = 4,63$ respectivamente, conforme expresso na Tabela 2. Observamos que houve um aumento em percentual na concentração de proteína total do grupo tratado em relação ao grupo controle de 0,94% e de 3,67% respectivamente para as amostras obtidas dos animais com 7 e 13 dias de desenvolvimento do tumor, como mostra a Tabela 2.

Analisando os valores obtidos para cada fração protéica apresentado na Tabela 1, observamos uma variação entre 2,44 e 2,77 g/100ml na concentração de

albumina no grupo de animais com 7 dias de desenvolvimento do tumor; em ambas as linhagens, porém seus controles também apresentaram concentrações aparentemente com poucas diferenças de valores (2,64 a 3,09g/100ml). No grupo de animais com tumor de 13 dias de desenvolvimento, de ambas as linhagens, as concentrações de albumina variaram entre 2,25 e 2,79g/100ml. Já para os animais controle deste grupo, os valores variaram entre 2,89 e 3,28g/100ml. As médias desses valores foram de $x_t = 2,66$ e $x_c = 2,83$ e de $x_t = 2,45$ e $x_c = 3,14$ respectivamente para as amostras obtidas nos períodos de 7 e 13 dias de desenvolvimento do tumor, conforme mostra a Tabela 2. O cálculo do percentual da diferença entre as médias dos grupos tratado e controle, com relação ao grupo controle, revelaram uma diminuição de 6,0% da concentração de albumina nas amostras obtidas no período de 7 dias. Já nas amostras obtidas no período de 13 dias de desenvolvimento do tumor, o percentual da diferença foi de 21,97% como exposto na Tabela 2. Notamos, portanto, diferenças nos valores de albumina entre os grupos de animais com tumores de 7 e 13 dias de desenvolvimento. Também foram notadas variações das concentrações entre o grupo controle e tratado.

As concentrações das proteínas da fração alfa-2 globulina variaram entre 0,65 e 0,92g/100ml no grupo de animais com 7 dias de desenvolvimento do tumor em ambas as linhagens, porém seus controles também apresentaram concentrações aparentemente com poucas diferenças de valores ou seja 0,60 e 0,88g/100ml. No grupo de animais com tumor de 13 dias de desenvolvimento de ambas as linhagens, as concentrações de alfa-2 globulina variaram entre 0,73 e 1,25g/100ml. Valores variando entre 0,58 e 0,96g/100ml foram observados nas amostras obtidas do respectivo grupo controle (Tabela 1). As médias obtidas a partir dos valores da concentração das proteínas da fração alfa-2 foi de $x_t = 0,80$ e $x_c = 0,74$ para as amostras obtidas dos animais com tumor de 7 dias de desenvolvimento e de $x_t = 1,05$ e $x_c = 0,80$ para as amostras colhidas de animais com 13 dias de desenvolvimento do tumor, valores mostrados na Tabela 2. O cálculo do percentual da diferença entre o grupo tratado e o

grupo controle, com relação ao grupo controle, demonstraram um aumento de 8,10% e de 31,25% na concentração das proteínas da fração alfa-2 globulina das amostras obtidas nos períodos de 7 e 13 dias de desenvolvimento do tumor respectivamente. De acordo com esses valores pudemos observar um aumento na concentração da fração alfa-2 com o desenvolvimento do tumor.

Com relação as concentrações das proteínas da fração beta globulina, a Tabela 1 mostra uma variação entre 0,64 e 0,98g/100ml no grupo de camundongos com 7 dias de desenvolvimento do tumor, em ambas as linhagens, e uma variação entre 0,60 e 0,88 nos animais controles. Já valores variando entre 0,90 e 1,18g/100ml foram observados no grupo de animais com tumor de 13 dias de desenvolvimento. Uma variação entre 0,64 e 0,75 foi verificada no grupo de animais controles deste período. As médias desses valores foram de $\bar{x}_t = 0,81$ e $\bar{x}_c = 0,66$ e de $\bar{x}_t = 1,02$ e $\bar{x}_c = 0,99$ respectivamente para as amostras obtidas nos períodos de 7 e 13 dias de desenvolvimento do tumor. Já os valores obtidos da diferença entre o grupo tratado e controle, com relação ao controle, em percentagem, revelaram um aumento na concentração das proteínas da fração beta globulina de 22,72% e de 47,8% respectivamente para as amostras obtidas nos períodos de 7 e 13 dias de desenvolvimento do tumor, como exposto na Tabela 2. Notamos, portanto um aumento nos valores da fração beta globulina entre os grupos de animais com tumores e seus controles. Também notamos um aumento na concentração das proteínas da fração beta globulina com o desenvolvimento do tumor.

1. 2. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os resultados obtidos pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS) com o soro dos camundongos da linhagem 1-G mostraram a presença de 18 e 21 bandas de proteínas para as amostras obtidos dos animais com 7 e 13 dias de desenvolvimento do tumor, respectivamente (Figuras 11 e 12). Nos perfis das amostras obtidas com 7 dias de tumor, foram observadas bandas menos intensas. Essas bandas

apresentaram-se com mobilidades relativas (R_m) de 0,26 (linhas 1 a 3 e 7 a 12) e de 0,88 (linhas 7 a 12), com ausência para os controles; e uma banda de coloração mais difusa e intensa com R_m 0,33 (linha 8), conforme-se pode verificar na Figura 11. Os resultados obtidos com as amostras de 13 dias de desenvolvimento do tumor, cujos perfis eletroforéticos estão expostos na Figura 12, detectaram a presença de 01 banda adicional. Isso se pode observar na porção de baixo peso molecular, ou seja com R_m 0,88, quando comparados aos controles, e a presença de bandas com R_m 0,11 ; 0,12 ; 0,31 quando comparado com as amostras de 7 dias.

2. Testes sorológicos.

2.1. Título do antissoro

O título do anti-soro, obtido a partir de combinações homólogas, em testes sorológicos de dupla difusão (OUCHTERLONY, 1949) foi de número 16. Esse anti-soro foi obtido pela injeção do soro total de camundongo em coelho.

2.2. Imunoeletroforese.

Reações de imunoeletroforese em agarose, com soro individual e "pool", de soro de camundongos portadores da linhagem 1-G do tumor com 7 dias de desenvolvimento, revelaram a presença de 7 sistemas imunoprecipitantes. Essas reações foram realizadas com soro de coelho anti-soro total de camundongo (anti-soro obtido conforme o item 2.3 e 2.4 descritos em material e métodos) Resultados similares foram obtidos com os respectivos controles. Os resultados destas reações encontram-se expressos no esquema 1. As reações sorológicas de imunoeletroforese realizadas com soro individual e "pool" do soro de camundongos portadores da linhagem 1-G do tumor com 13 dias de desenvolvimento, usando-se o mesmo anti-soro da reação anterior revelaram resultados semelhantes aos obtidos com as amostras de 7 dias (esquema 2).

Os esquemas 3 e 4 mostram os resultados obtidos nas reações de imunoelektroforese em agarose. Tais reações foram realizadas entre o "pool" do soro de camundongos portadores das linhagens 1-G e 2-S (obtidos nos períodos de 7 e 13 dias de desenvolvimento do tumor) e o soro de carneiro anti-Ig total de camundongo. Os resultados apresentaram a formação de 4 sistemas de precipitação.

2. 3. Imunodifusão radial.

Os resultados obtidos com o emprego da técnica de imunodifusão radial entre o "pool" do soro de camundongos, portadores do EAT linhagens 1-G e 2-S em reação com IgG de carneiro anti-IgG de camundongo, demonstraram diferenças nos halos de precipitação, quando comparados (Fig. 13). A Tabela 3 mostra as medidas do diâmetro dos anéis de precipitação formados ao redor de cada orifício (local de aplicação das amostras). Esses dados mostraram valores de 3,0, 3,7 e 3,7 mm (linhas 2; 3; 6) para as amostras dos animais portadores do tumor de 7 dias. Já valores da ordem de 4,0, 5,0, 5,0 mm (linhas 8; 10 e 12), foram obtidas para as amostras dos animais portadores do tumor com 13 dias de desenvolvimento. Esses valores demonstraram que houve um aumento nos halos de precipitação durante o desenvolvimento do tumor.

2. 4. Imunoelektroforese em foguete.

Os resultados obtidos através da técnica de eletroforese em foguete com "pool" do soro de camundongos, portadores do EAT linhagens 1-G e 2-S com 13 dias de desenvolvimento em reação com soro de cabra anti-complemento C3c (GAM/C3c), mostraram diferenças no pico eletroforético, quando comparados. Uma diminuição mais acentuada desse componente foi observada no soro dos animais inoculados com EAT linhagem 2-S, quando comparado com o controle (Fig. 14).

3. Monitoramento do crescimento do tumor na sua forma sólida linhagens 1-G e 2-S.

Os resultados obtidos das observações realizadas diariamente após o inóculo de diferentes concentrações de células tumorais, conforme descrito em material e métodos item 3.6., encontram-se na Tabela 4. Os dados revelaram que para a linhagem 1-G a concentração de células necessária para desenvolver o tumor em 100% dos animais receptores foi de $1,0 \times 10^6$ células e de $5,0 \times 10^5$ células para a linhagem 2-S, inoculado em um volume final de 0,05ml.

4. Padronização da curva de crescimento da forma sólida do tumor de Ehrlich em camundongos.

O teste de Tukey, referente aos dados obtidos no experimento utilizando a linhagem 1-G apresentados na Tabela 5, demonstrou que não houve diferença significativa entre os grupos no tempo zero, indicando uma homogeneidade entre os mesmos. A comparação dos dados obtidos pelo teste de Tukey nos grupos, depois do tempo zero, revelou que os grupos I e II apresentaram diferença significativa, a nível de 5%, no segundo dia de mensuração com os grupos III e IV. Diferença significativa foi observada a partir do quinto dia de desenvolvimento do tumor para o grupo III e IV.

Por outro lado, os resultados obtidos do teste de Tukey, realizado para cada grupo, demonstraram que:

Grupo I - apresentou um crescimento com taxas variáveis;

Grupo II - apresentou um crescimento exponencial até o quarto dia, com diferença significativa entre os dias de medidas, passando posteriormente a um crescimento moderado, não apresentando diferença significativa entre os

dias consecutivos;

Grupo III - apresentou um crescimento moderado até o terceiro dia de desenvolvimento, uma vez que o teste de Tukey demonstrou não haver diferença significativa entre os dias consecutivos até esta data. Posteriormente passou a ter um crescimento exponencial, apresentando diferença significativa entre os dias consecutivos;

Grupo IV - não apresentou diferença significativa entre as medidas realizadas diariamente. Entretanto, relacionando o tempo zero com os demais, observa-se diferença significativa a partir do terceiro dia do experimento.

Esses dados estão demonstrados na Figura 15, a qual expressa o incremento em relação à média inicial (Tabela 5) da espessura (mm) da parte central do coxim plantar do membro posterior de camundongos com EAT (Linhagem 1-G).

Resultados semelhantes ao da linhagem 1-G foram obtidos entre os grupos no tempo zero de experimentação para a linhagem 2-S, demonstrando uma homogeneidade entre os grupos utilizados para o estudo, o que pode ser observado na Tabela 6.

Os resultados do teste de Tukey realizado para a linhagem 2-S revelaram que - após o tempo zero - o grupo I apresenta diferença significativa, a nível de 5%, quando comparado com os demais grupos. O mesmo ocorreu com o grupo II, em relação aos grupos III e IV; entretanto, a diferença significativa inicia no segundo dia de experimentação. Resultados semelhantes foram obtidos entre os grupos III e IV, mas a diferença significativa no crescimento só foi observada a partir do quinto dia.

Os testes de Tukey, aplicados para os grupos, demonstraram que:

Grupo I - apresentou um crescimento com taxas variáveis.

Grupo II - apresenta um crescimento exponencial até o quarto dia, passando em seguida para um crescimento moderado, porque o teste de Tukey mostra diferença significativa só no período inicial.

Grupo III - apresenta um crescimento moderado nos três primeiros dias iniciais. Posteriormente demonstrou um crescimento exponencial, o que foi confirmado pelo teste de Tukey.

Grupo IV - apresenta resultados semelhantes aos do Grupo III, entretanto, diferença significativa só foi observada a partir do quarto dia de experimentação.

A Figura 16 mostra estes dados através do incremento em relação à média inicial (Tab. 6) da espessura (mm) da parte central do coxim plantar do membro posterior de camundongos com EAT (linhagem 2-S) .

Os dados obtidos nestas medidas, apresentados na Tabela 5 e 6, foram submetidos à análise de variância. Verificou-se que existe diferença entre as médias dos grupos, entre as médias de dias consecutivos de medida e existe interação entre grupos e dias, isto é, o crescimento no período não é igual para todos os grupos. Os resultados da análise de variância encontram-se no Apêndice (Tabelas 10 e 11).

5. Imunidade concomitante.

Os experimentos foram realizados conforme descrito em material e métodos (item 3.8.). Os dados contidos na Tabela 7 mostram as variações do aumento de espessura do coxim plantar de camundongos sensibilizados e reestimulados com células do EAT (linhagem 1-G), após o décimo segundo dia de desenvolvimento do inóculo primário e o respectivo controle. Os resultados do teste de Tukey demonstraram que não houve diferença significativa entre o grupo experimental e o grupo controle no

tempo zero, indicando uma homogeneidade entre os mesmos. Estatisticamente não houve diferença significativa entre o grupo experimental e o controle, durante todo o período estudado, também não se observou variação ao longo do tempo decorrido após a inoculação. Entretanto, um aumento discreto de espessura foi observado em ambos os grupos (experimental e controle). Isto ocorreu a partir do segundo dia, quando o aumento na espessura foi significativamente maior do que no início do experimento, conforme demonstra a Figura 17, a qual mostra o incremento em relação à média inicial (Tab. 7) da espessura (mm) da parte central do coxim plantar do membro posterior de camundongos reinoculados após o décimo segundo dia de estímulo inicial na pata esquerda com $1,0 \times 10^6$ células/ 0,05ml. As Figuras 19 e 20 mostram, respectivamente, o aspecto macroscópico da pata do camundongo reinoculado e do respectivo controle.

A Tabela 8 mostra as variações de espessura do coxim plantar de camundongos sensibilizados e reinoculados com células do EAT (linhagem 2-S), após o décimo segundo dia do desenvolvimento do inóculo primário e respectivo controle.

Resultados semelhantes ao da linhagem 1-G foram obtidos no tempo zero de experimentação, indicando uma homogeneidade entre os animais utilizados. Os testes estatísticos demonstraram uma diferença significativa, a partir do quinto dia do desenvolvimento do tumor entre os grupos experimental e o grupo controle. Por outro lado, os resultados estatísticos mostram que no grupo experimental não houve variação ao longo do tempo decorrido após a inoculação, entretanto, um crescimento significativo do tumor no grupo controle foi observado entre os 4º e 5º dias, e entre o 5º e 6º dias de desenvolvimento, conforme mostra a Figura 18, a qual expressa o incremento em relação à média inicial (Tab. 8) da espessura (mm) da parte central do coxim plantar do membro posterior de camundongos reinoculados após o décimo segundo do estímulo inicial na pata esquerda com $1,0 \times 10^6$ células/0,05ml. As Figuras 21 e 22 mostram,

respectivamente, o aspecto macroscópico da pata do camundongo reinoculado e do respectivo controle.

Os dados contidos nas Tabelas 7 e 8 foram submetidos à análise de variância. Verificou-se não haver diferença significativa entre as médias de grupos e entre as médias de dias de medida. Também não se observou interação entre grupos e dias, isto é, o crescimento no período apresenta ser igual para todos os grupos. Os dados da análise de variância encontram-se no Apêndice (Tabelas 12 e 13).

6. Número de cromossomos.

Conforme descrito em material e métodos, com o objetivo de caracterizar o número de cromossomos mais comuns das linhagens tumorais utilizadas, designado número modal (o qual representa a principal linha de célula propagando o tumor) procedeu-se à contagem dos cromossomos. A Tabela 9 mostra os resultados obtidos após a contagem de 115 células para a linhagem 1-G e 150 células para a linhagem 2-S. As análises das Figuras 23 e 24, revelaram que o número modal foi de 62 e 78 cromossomos respectivamente, para as linhagens 1-G e 2-S

Morfologicamente foi possível reconhecer a presença de estruturas novas em ambas as linhagens utilizadas no presente estudo. Os principais tipos de cromossomos novos foram: metacêntricos (Figuras 25 e 26).

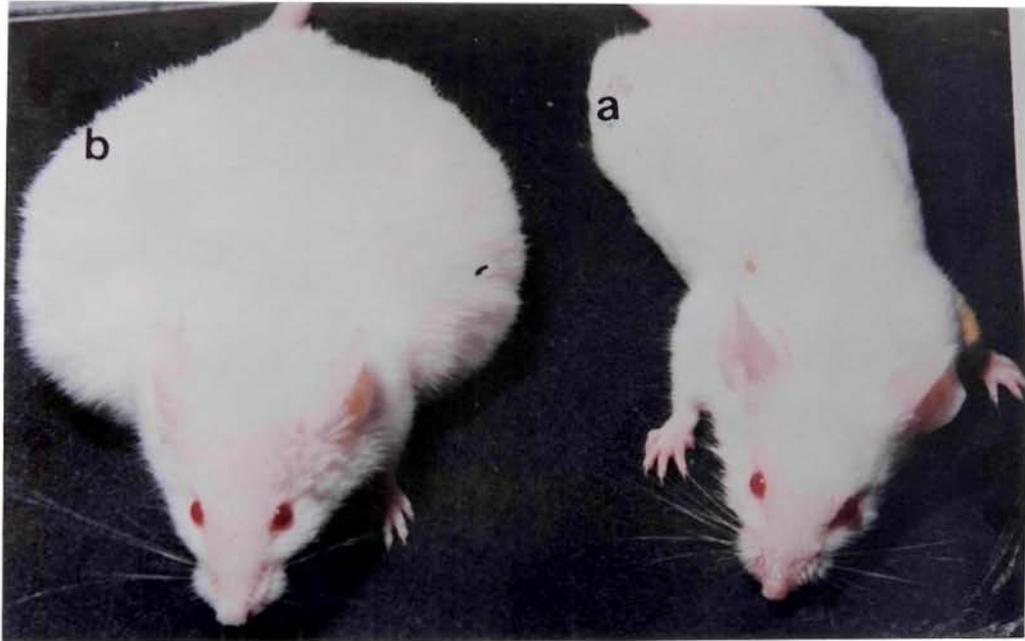


Figura 3 - Camundongos da linhagem Swiss, não isogênicos. a) Camundongo normal, b) camundongo com tumor de Ehrlich linhagem 1-G - 13 dias de desenvolvimento.

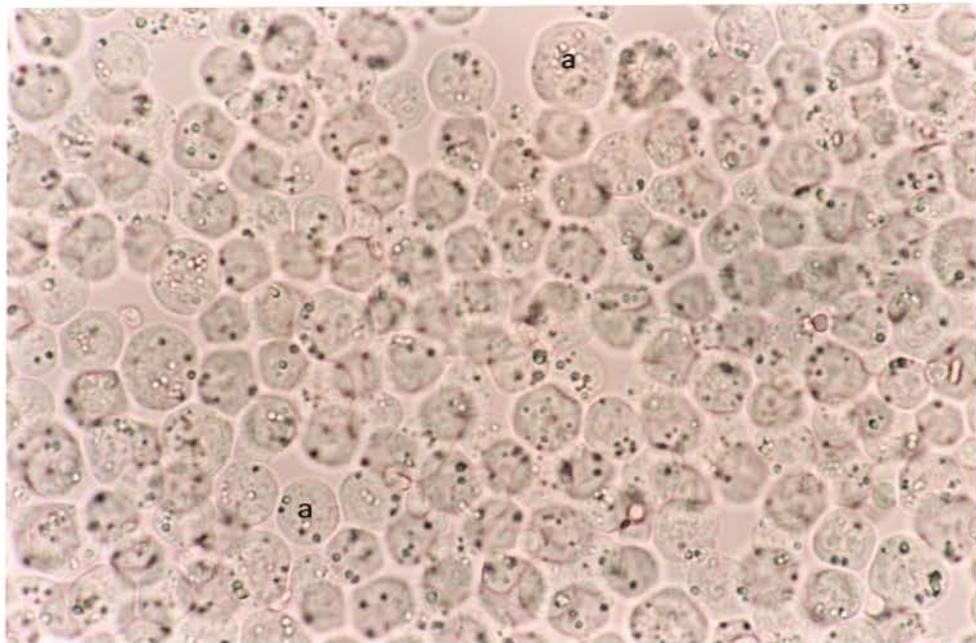


Figura 4 - Fotomicrografia de preparação a fresco do fluido ascítico de camundongo portador do EAT linhagem 1-G com 7 dias de desenvolvimento, a - células. Aumento 660x.



Figura 5 - Camundongo da linhagem Swiss, não isogênico portador do Tumor de Ehrlich Linhagem 1-G na sua forma sólida no coxim plantar de um dos membros posteriores.

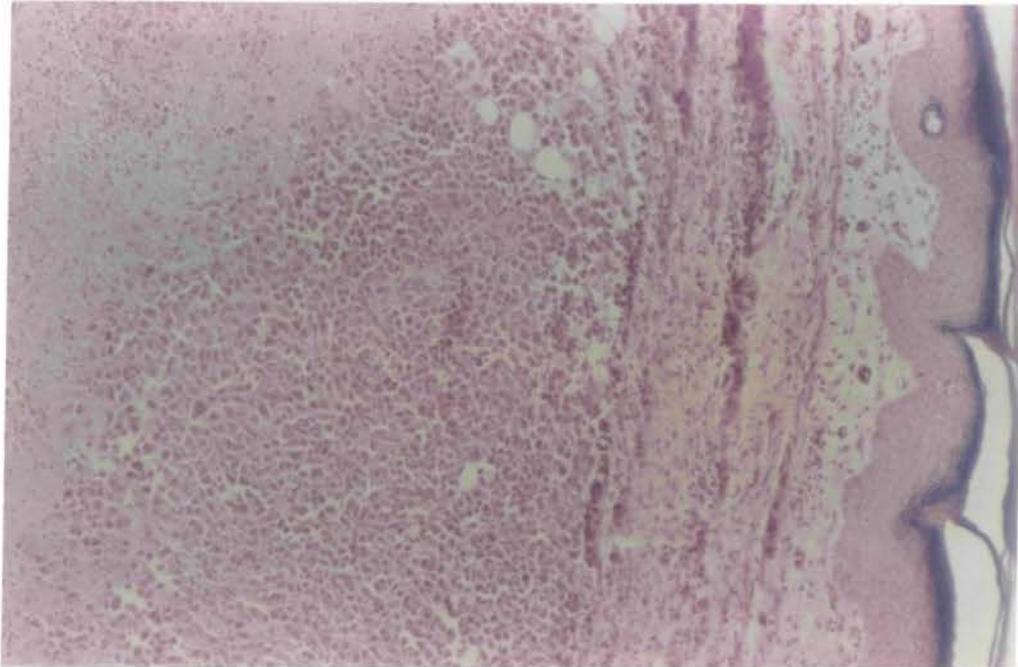


Figura 6 - Fotomicrografia de corte histológico do coxim plantar de camundongos inoculados com células do tumor de Ehrlich linhagem 1-G com 7 dias de evolução. Coloração H.E.. Aumento 160x.

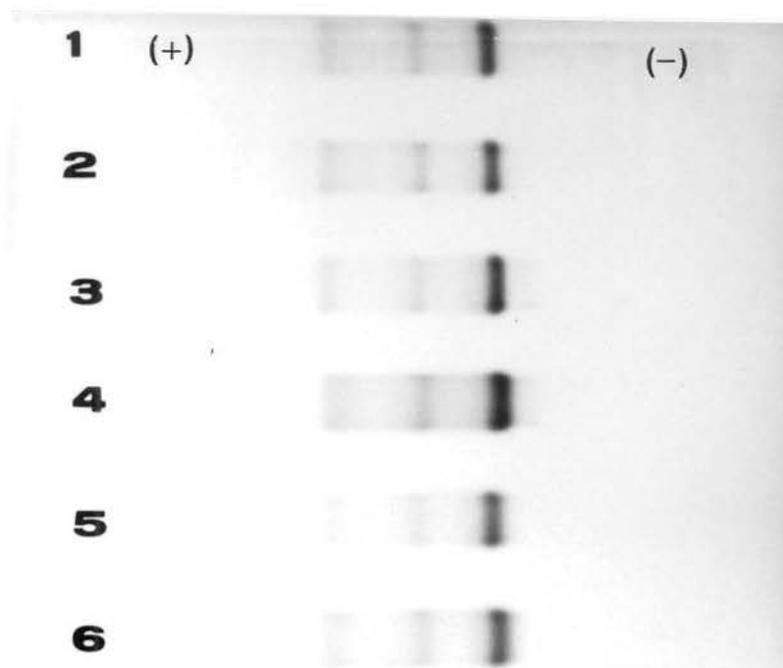


Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose, com o "pool" do soro de camundongos portadores do EAT linhagens 1-G e 2-S com 7 dias de desenvolvimento. Amostras 1) EAT₁-C; 2) EAT₁ ; 3) EAT₁-PC; 4) EAT₁-P; 5) EAT₂-PC e 6) EAT₂-P.

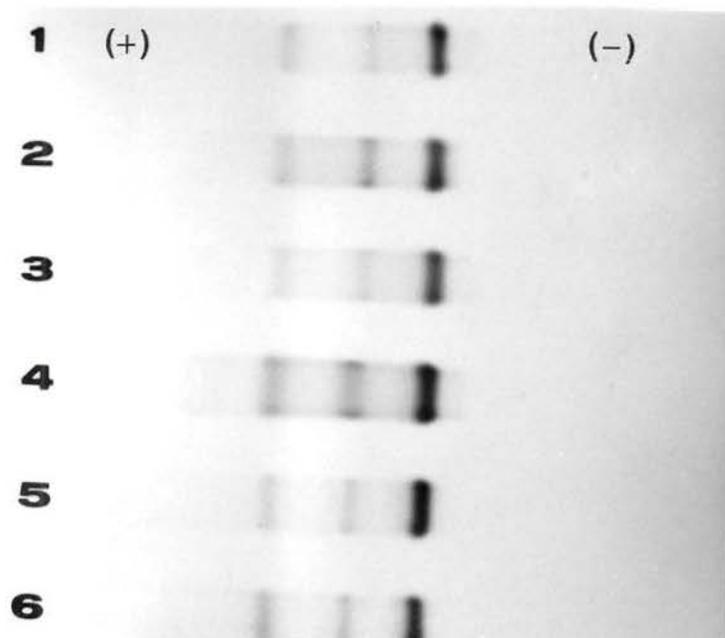


Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose, com o "pool" do soro de camundongos portadores EAT linhagens 1-G e 2-S com 13 dias de desenvolvimento. Amostras 1) EAT₁-C; 2) EAT₁ ; 3) EAT₁-PC; 4) EAT₁-P; 5) EAT₂-PC e 6) EAT₂-P.

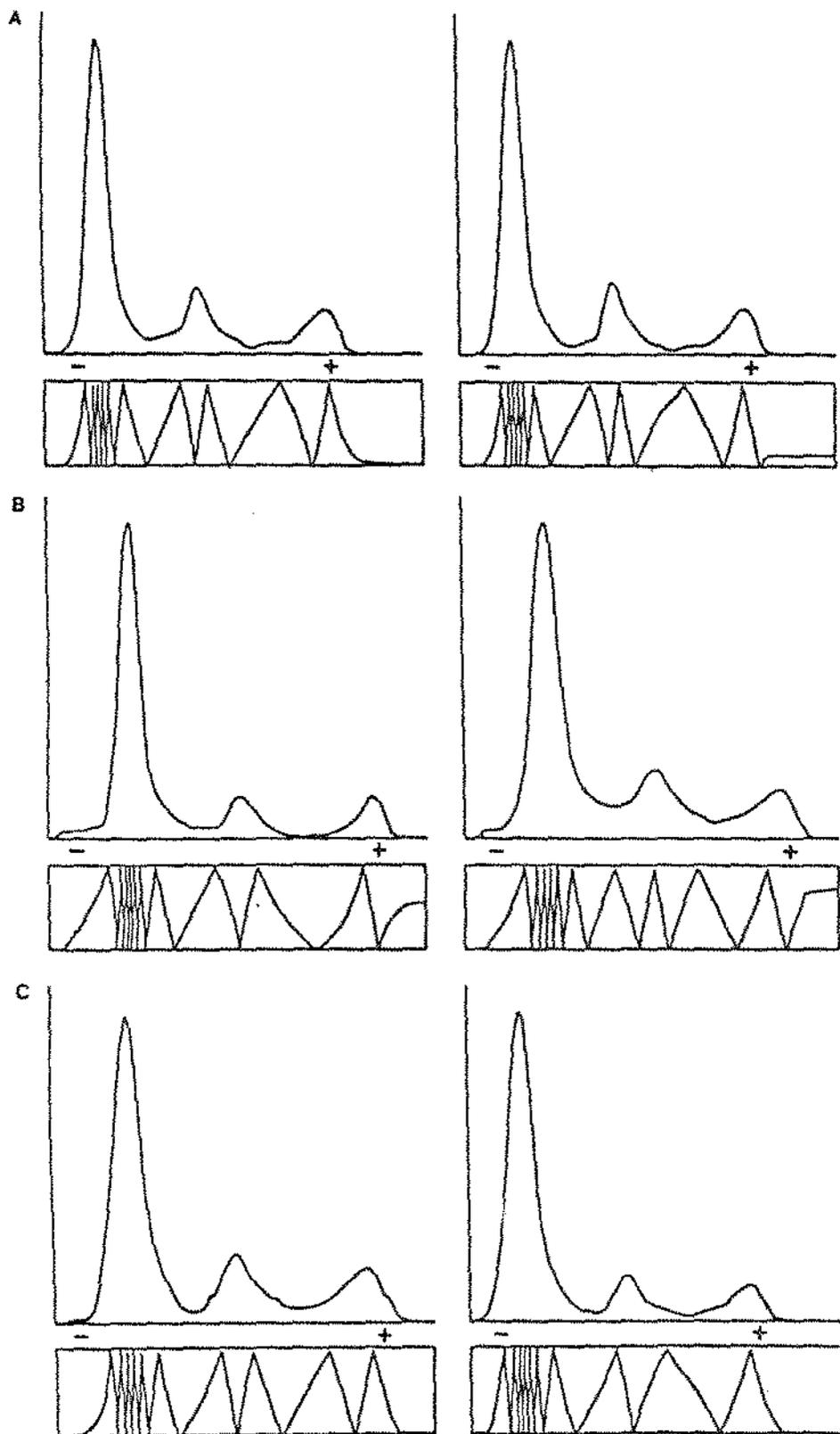


Figura 9. Traçados densitométricos das eletroforeses das amostras do soro de camundongos inoculados com EAT linhagens 1-G e 2-S com 7 dias de desenvolvimento e os respectivos controles.

A - EAT₁-C e EAT₁
 B - EAT₁-PC e EAT₁-P
 C - EAT₂-PC e EAT₂-P

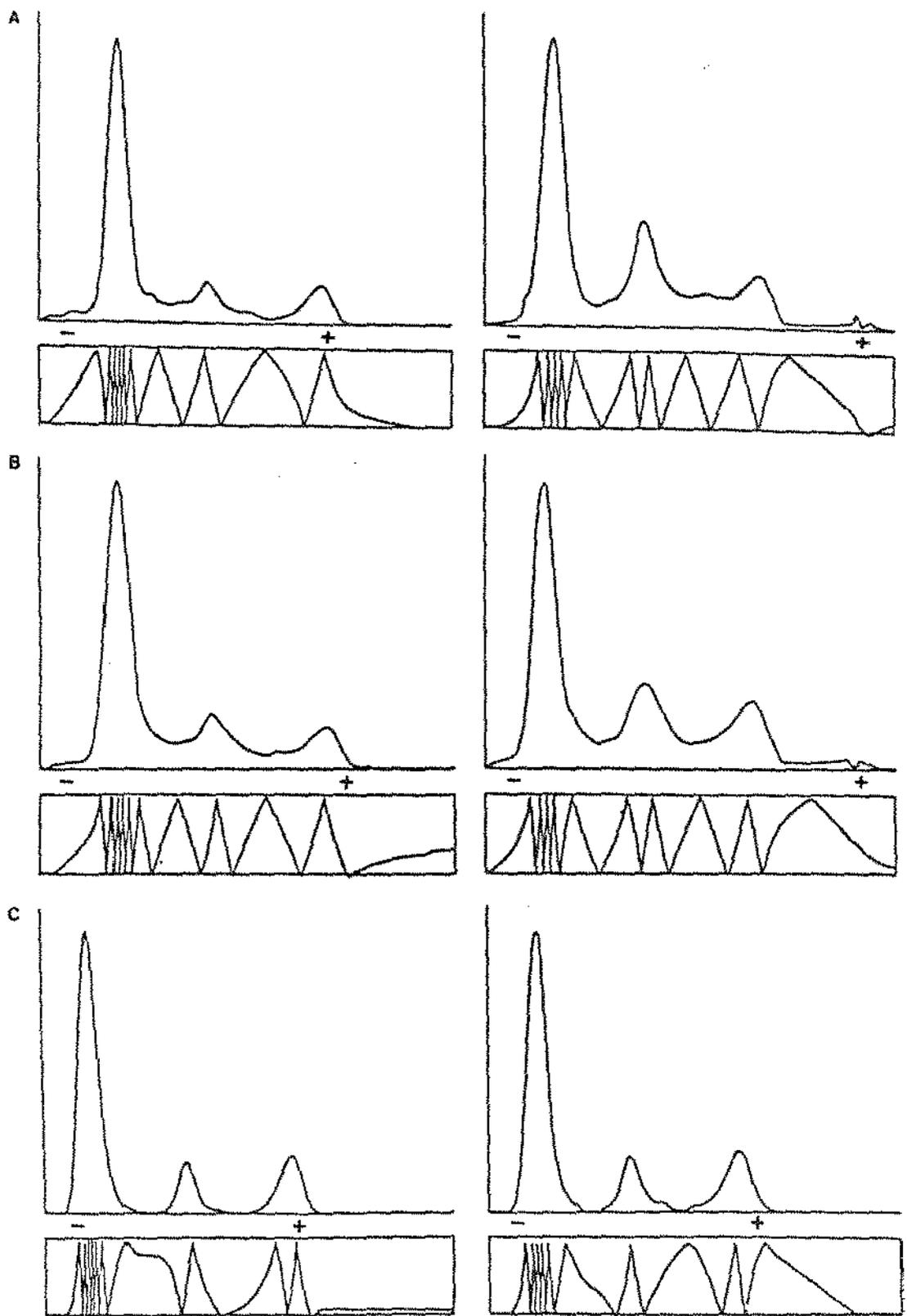


Figura 10- Traçados densitométricos das eletroforeses das amostras do soro de camundongos inoculados com EAT linhagens 1-G e 2-S com 13 dias de desenvolvimento e os respectivos controles.

A - EAT₁-C e EAT₁
 B - EAT₁-PC e EAT₁-P
 C - EAT₂-PC e EAT₂-P

Tabela 1- Concentrações em g/100ml das frações proteicas e da proteína total do "pool" do soro de camundongos portadores do EAT linhagens 1-G e 2-S e dos respectivos controles, obtidos nos períodos de 7 e 13 dias do desenvolvimento do tumor.

| Linhagens / Dias | Amostras Proteínas | TRATADO | | | CONTROLE | | |
|----------------------|-----------------------|------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| | | EAT ₁ | EAT ₁ -P | EAT ₂ -P | EAT ₁ -C | EAT ₁ -PC | EAT ₂ -PC |
| 1-G e 2-S 7 dias | Albumina | 2,44 | 2,77 | 2,77 | 2,64 | 2,76 | 3,09 |
| | Alfa-2 globulina | 0,92 | 0,65 | 0,83 | 0,88 | 0,76 | 0,60 |
| | Beta-globulina | 0,64 | 0,98 | 0,80 | 0,88 | 0,48 | 0,61 |
| | Proteína total | 4,00 | 4,40 | 4,40 | 4,40 | 4,00 | 4,30 |
| 1-G e 2-S 13 dias | Albumina | 2,25 | 2,45 | 2,79 | 3,26 | 2,89 | 3,28 |
| | Alfa-2 globulina | 1,25 | 1,17 | 0,73 | 0,86 | 0,96 | 0,58 |
| | Beta globulina | 0,90 | 0,99 | 1,18 | 0,68 | 0,75 | 0,64 |
| | Gamaglobulina | 0,20 | 0,29 | 0,20 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Proteína total | 4,60 | 4,90 | 4,90 | 4,80 | 4,60 | 4,50 |

Tabela 2- Média (\bar{x}) e percentual da concentração de proteína total e das concentrações das frações protéicas, obtidas dos camundongos inoculados com EAT linhagens 1-G e 2-S com 7 e 13 dias do desenvolvimento do tumor

| Linhagens/ Dias | Proteínas | TRATADO Média (\bar{x}_t) | CONTROLE Média (\bar{x}_c) | PERCENTUAL (%) |
|----------------------|------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-------------------|
| 1-G e 2-S 7 dias | Albumina | 2,66 | 2,83 | -6,00 |
| | Alfa-2 globulina | 0,80 | 0,74 | 8,10 |
| | Beta globulina | 0,81 | 0,66 | 22,72 |
| | Proteína total | 4,27 | 4,23 | 0,94 |
| 1-G e 2-S 13 dias | Albumina | 2,50 | 3,14 | -21,97 |
| | Alfa-2 globulina | 1,05 | 0,80 | 31,25 |
| | Beta globulina | 1,02 | 0,69 | 47,80 |
| | Proteína Total | 4,80 | 4,63 | 3,67 |

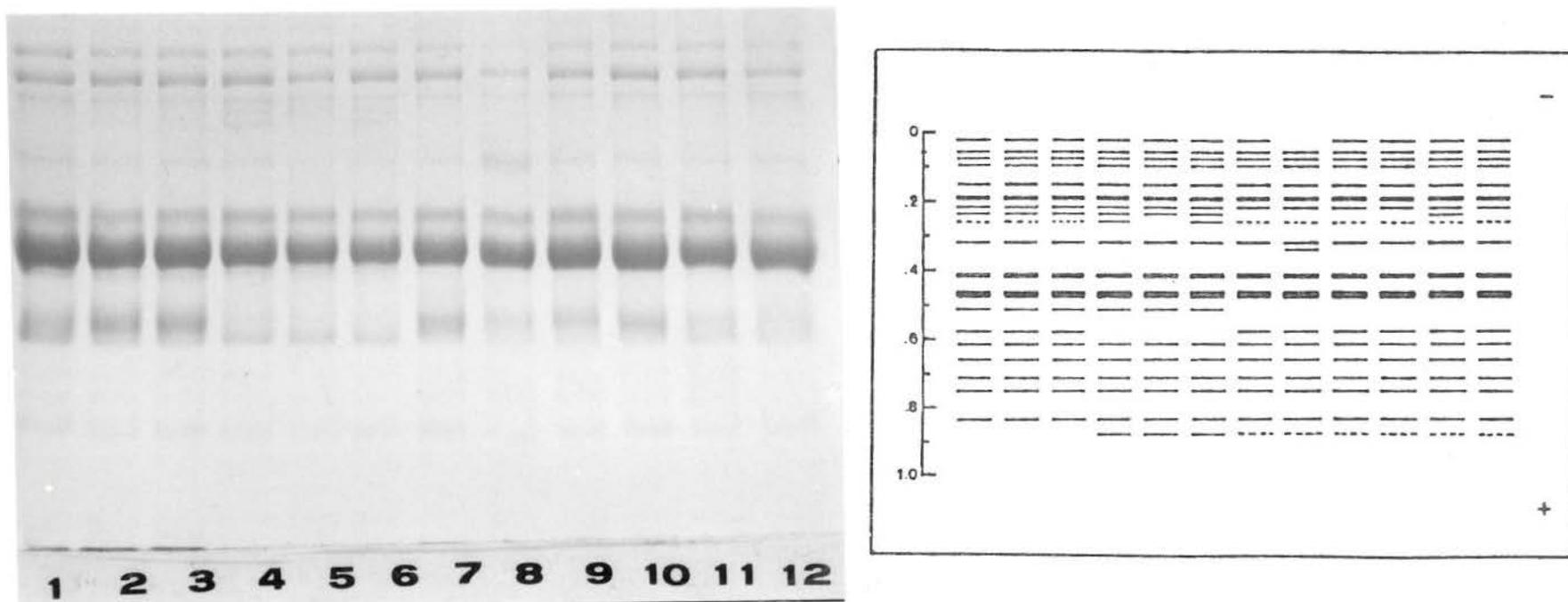


Figura 11- Perfil eletroforético e diagrama esquemático do soro individual e "pool" do soro de camundongos portadores do EAT linhagem 1-G, com 7 dias de desenvolvimento. 1) "pool" EAT₁-C; 2) "pool" EAT₁-DC; 3) "pool" EAT₁-PC; 4) "pool" EAT₁; 5 e 6) soro individual EAT₁; 7) "pool" EAT₁-D; 8 e 9) soro individual do EAT₁; 10) "pool" EAT₁-P e 11 e 12) soro individual EAT₁-P.

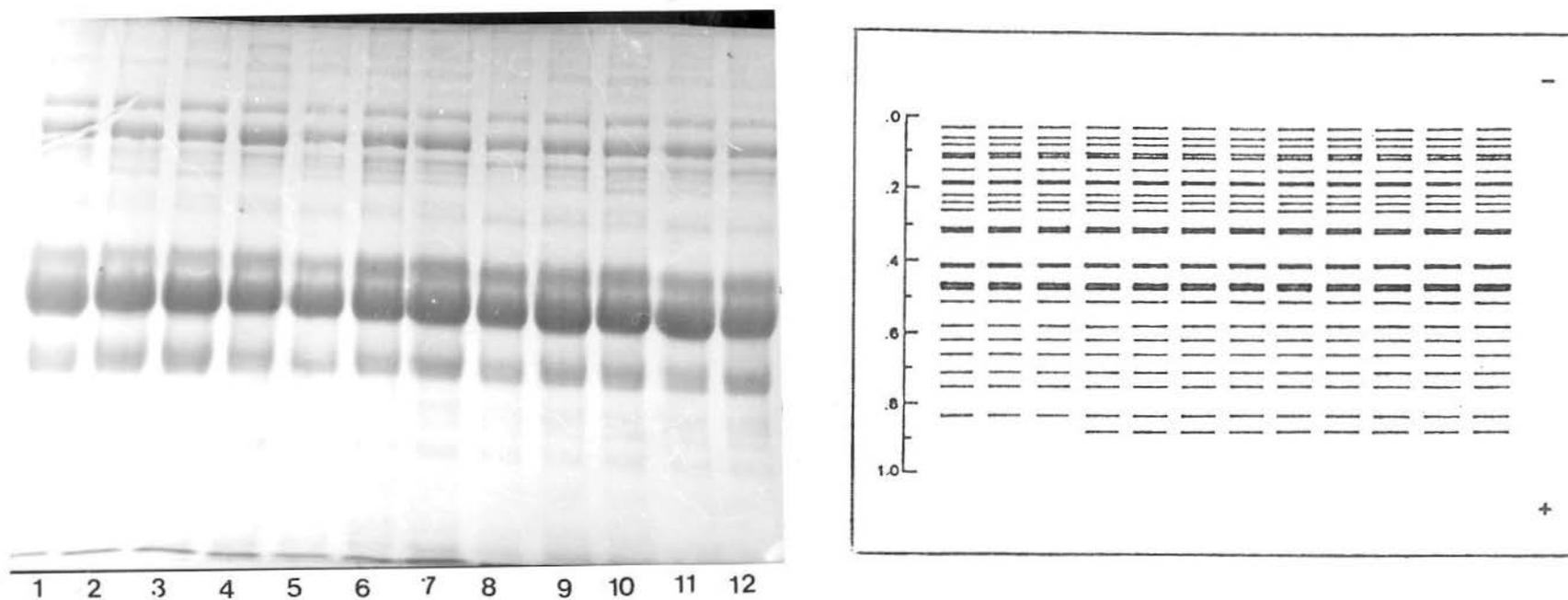
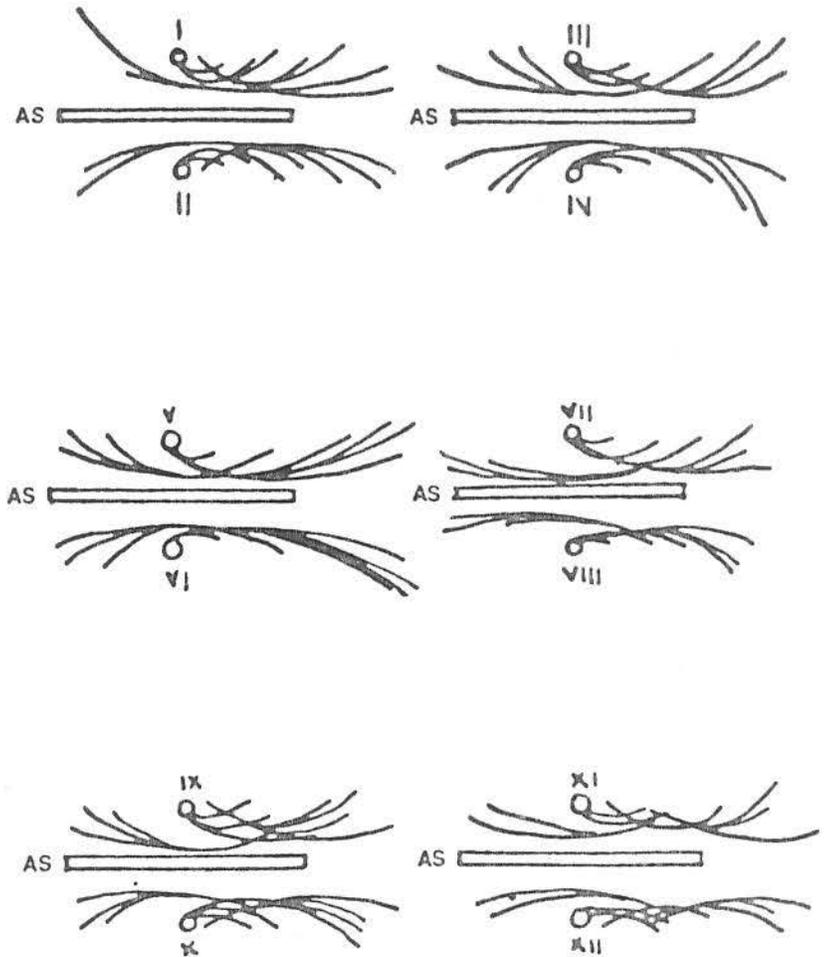
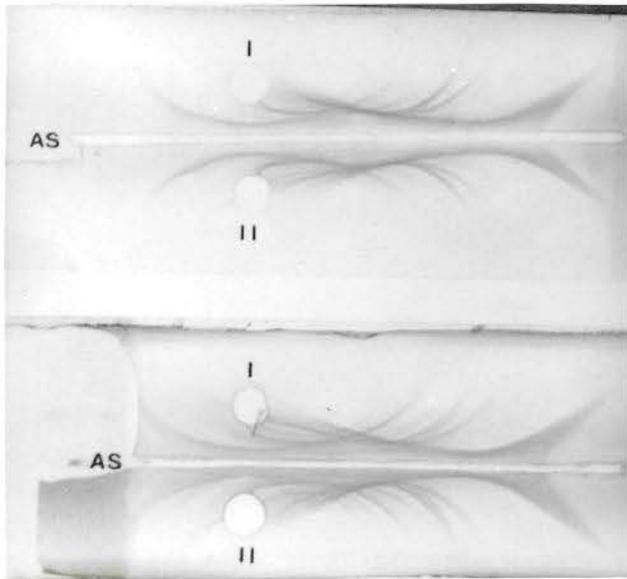
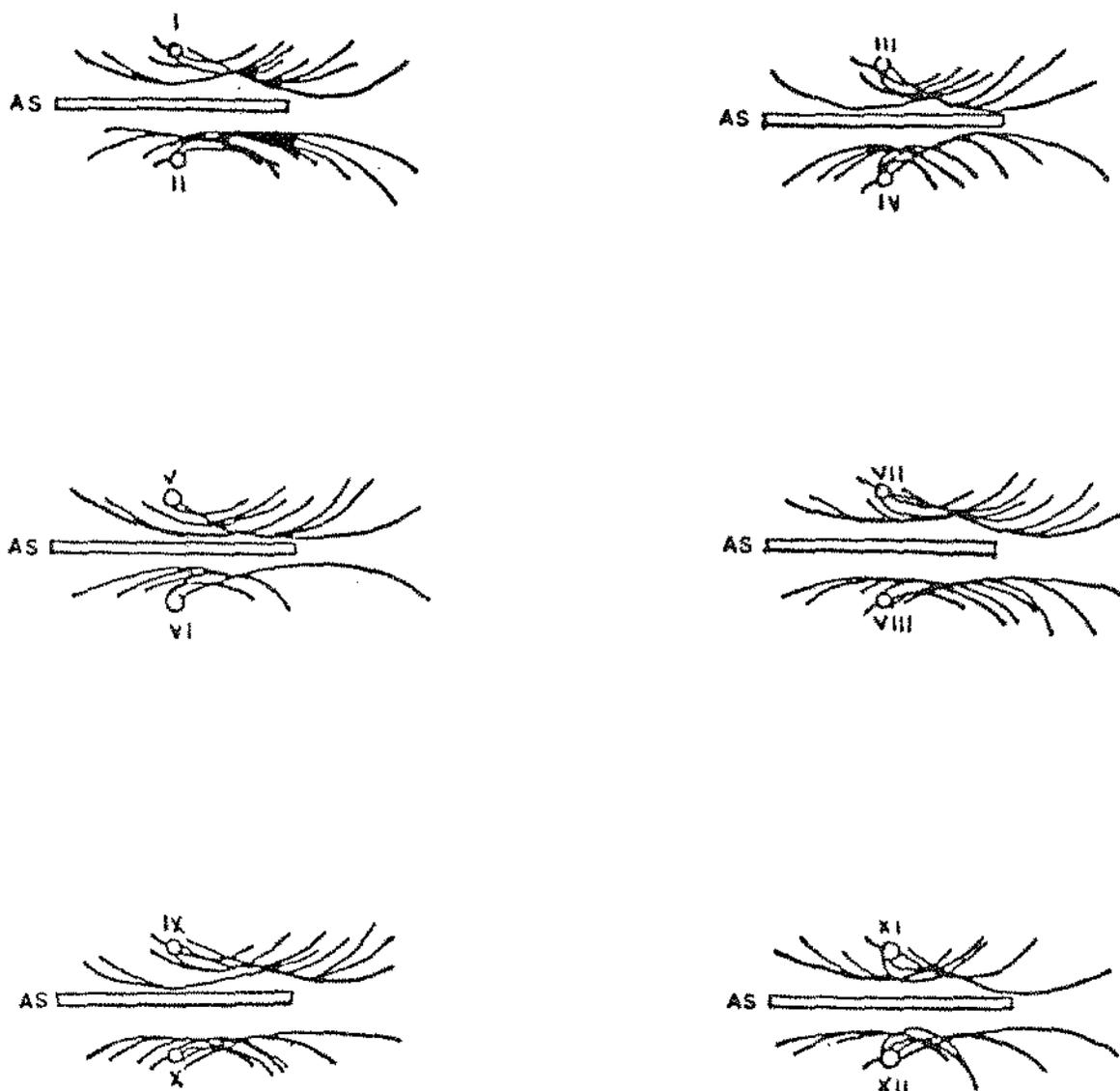


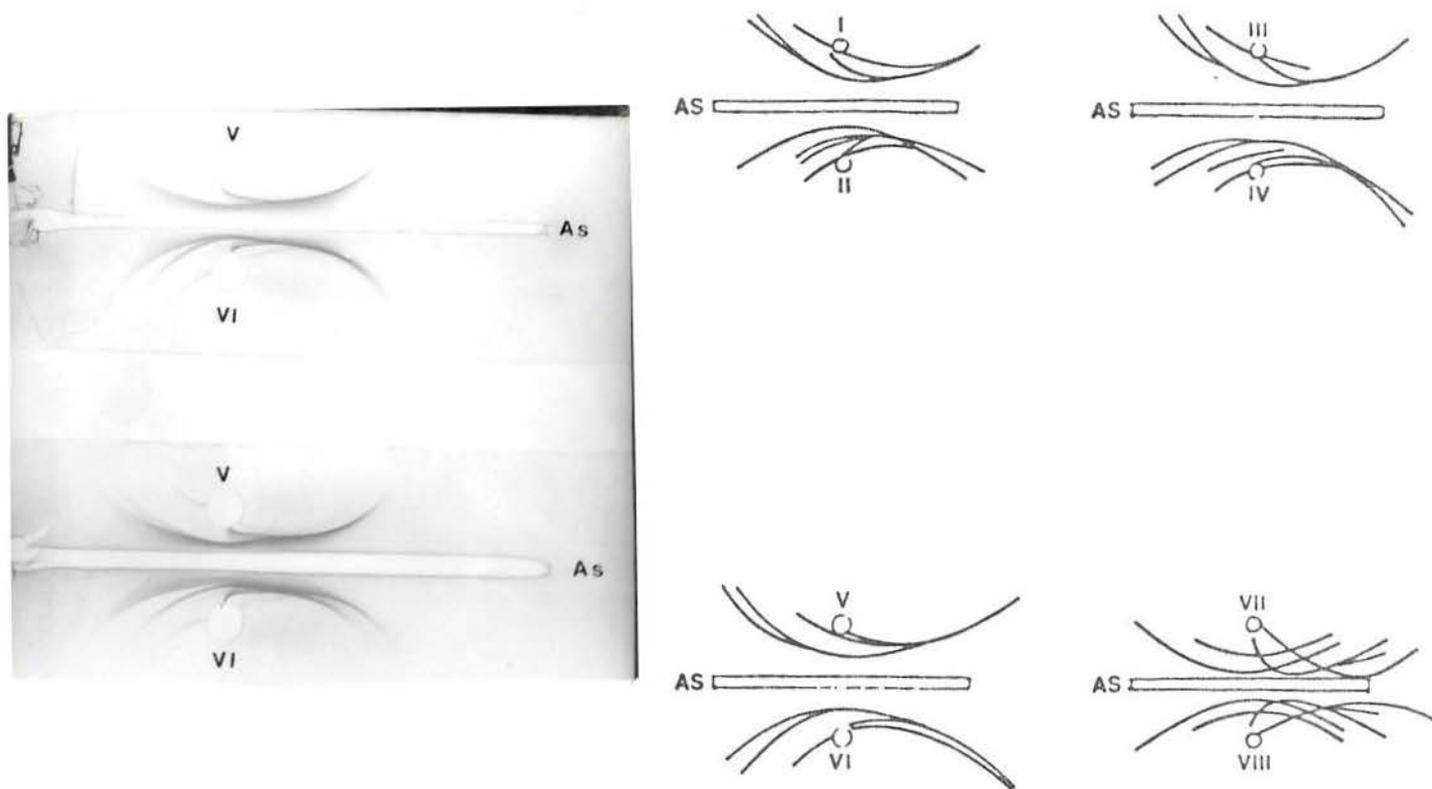
Figura 12- Perfil eletroforético e diagrama esquemático do soro individual e "pool" do soro de camundongos portadores do EAT linhagem 1-G, com 13 dias de desenvolvimento. 1) "pool" EAT₁-C; 2) "pool" EAT₁-DC; 3) "pool" EAT₁-PC; 4) "pool" EAT₁; 5 e 6) soro individual EAT₁; 7) "pool" EAT₁-D; 8 e 9) soro individual do EAT₁; 10) "pool" EAT₁-P e 11 e 12) soro individual EAT₁-P.



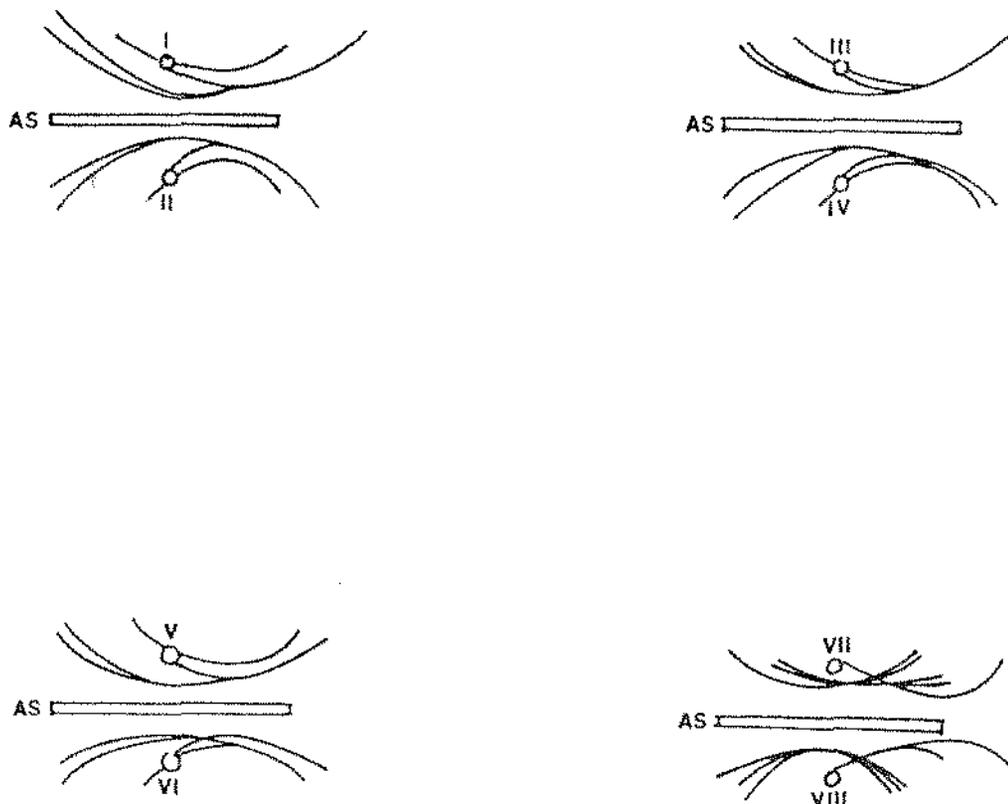
Esquema 1 - Reações de imunoelctroforese em agarose a 1,5% (Barbital) com soro individual e "pool" do soro de camundongos portadores da linhagem 1-G do EAT com 7 dias de desenvolvimento. As - Ig de coelho anti-soro de camundongo total e antígeno, I) "pool" EAT₁-C; II) "pool" EAT₁; III) soro individual EAT₁-C; IV) soro individual EAT₁; V) "pool" EAT₁-DC; VI) "pool" EAT₁-D; VII) soro individual EAT₁-DC; VIII) soro individual EAT₁-D; IX) "pool" EAT₁-PC; X) "pool" EAT₁-P; XI) soro individual EAT₁-PC e XII) soro individual EAT₁-P.



Esquema 2 -Reações de imunoeletroforese em agarose a 1,5% (Barbital) com soro individual e "pool" do soro de camundongos portadores da linhagem 1-G do EAT com 13 dias de desenvolvimento. As - Ig de coelho anti-soro de camundongo total e antígeno, I) "pool" EAT₁-C; II) "pool" EAT₁; III) soro individual EAT₁-C; IV) soro individual EAT₁; V) "pool" EAT₁-DC; VI) "pool" EAT₁-D; VII) soro individual EAT₁-DC; VIII) soro individual EAT₁-D; IX) "pool" EAT₁-PC; X) "pool" EAT₁-P; XI) soro individual EAT₁-PC e XII) soro individual EAT₁-P.



Esquema 3 - Reações de imunoeletroforese em agarose a 1,5% (Barbital) com "pool" do soro de camundongos portadores das linhagens 1-G e 2-S do EAT com 7 dias de desenvolvimento. As - Ig de carneiro anti-Ig total de camundongo e antígenos. I) "pool" EAT₁-C; II) "pool" EAT₁; III) "pool" EAT₁-DC; IV) "pool" EAT₁-D; V) "pool" EAT₁-PC; VI) "pool" EAT₁-P; VII) "pool" EAT₂-PC e VIII) "pool" EAT₂-P.



Esquema 4 - Reações de imunoeletroforese em agarose a 1,5% (Barbital) com "pool" do soro camundongos portadores das linhagens 1-G e 2-S do EAT com 13 dias de desenvolvimento. As - Ig de carneiro anti-Ig total de camundongo e antígenos, -I) "pool"EAT₁-C; II) "pool" EAT₁; III) "pool"EAT₁-DC; IV) "pool"EAT₁-D; V) "pool"EAT₁-PC; VI) "pool"EAT₁-P; VII) "pool" EAT₂-PC e VIII) "pool"EAT₂-P.

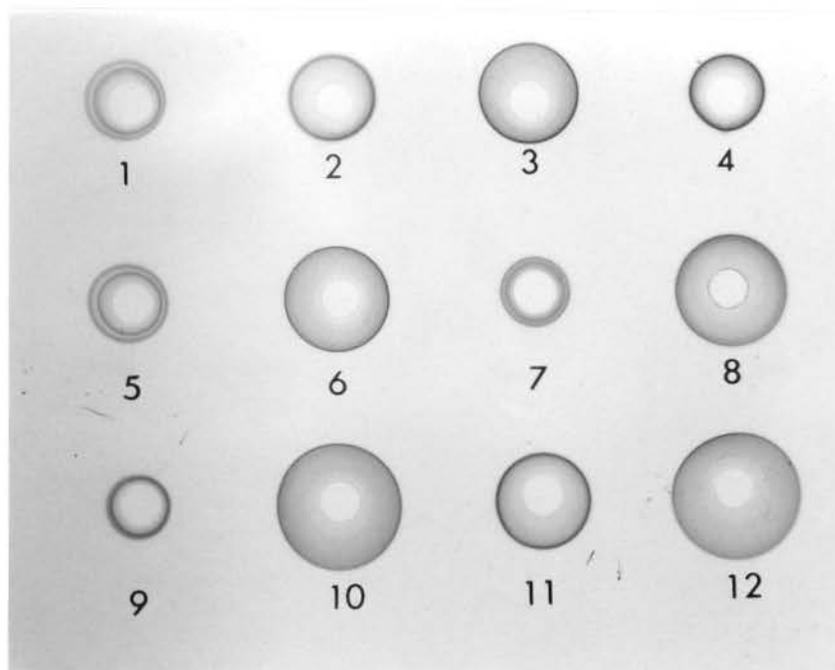


Figura 13 -- Reações de imunodifusão radial em agarose a 1,5% (Barbital) com "pool" do soro de camundongos portadores das linhagens 1-G e 2-S do EAT com 7 e 13 dias de desenvolvimento. As - IgG de carneiro anti-IgG de camundongo (Im: 306.1) e antígenos 1) "pool"EAT₁-C; 2) "pool" EAT₁; 3) "pool"EAT₁-P; 4) "pool"EAT₁-PC; 5) "pool" EAT₂-PC e 6) "pool"EAT₂-P; 7) "pool"EAT₁-C; 8) "pool" EAT₁; 9) "pool"EAT₁-PC; 10) "pool"EAT₁-P; 11) "pool" EAT₂-PC e 12) "pool"EAT₂-P.

Tabela 3 - Diâmetro em mm dos anéis de precipitação formados devida a reação do soro de carneiro anti-IgG de camundongo com o "pool" do soro de camundongos inoculados com o tumor de Ehrlich linhagens 1-G e 2-S, nos períodos de 7 e 13 dias, e os controles.

| Linhagens/ dias | TRATADO | | CONTROLE | |
|----------------------|---------------------|----------|----------------------|----------|
| | Amostras | Diâmetro | Amostras | Diâmetro |
| 1-G e 2-S 7 dias | EAT ₁ | 3,0 | EAT ₁ -C | 2,5 |
| | EAT ₁ -P | 3,7 | EAT ₁ -PC | 2,0 |
| | EAT ₂ -P | 3,7 | EAT ₂ -PC | 2,5 |
| 1-G e 2-S 13 dias | EAT ₁ | 4,0 | EAT ₁ | 1,5 |
| | EAT ₁ -P | 5,0 | EAT ₁ -P | 1,5 |
| | EAT ₂ -P | 5,0 | EAT ₂ -PC | 3,2 |

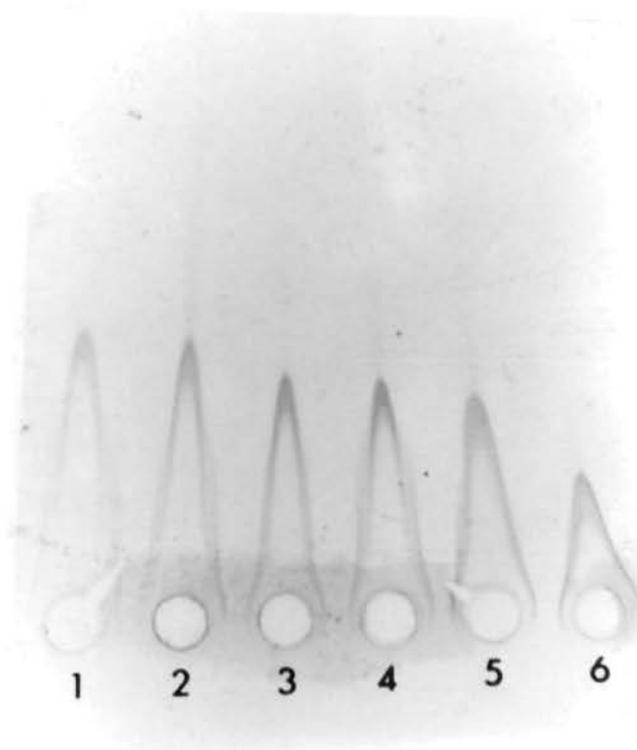


Figura 14 - Reações de Imunoeletroforese em foguete (Rocket) em agarose a 1% (Tris/Barbital) com soro de camundongos portadores do EAT-linhagens 1-G e 2-S com 13 dias de desenvolvimento. As. soro de cabra anti-complemento C3c e antígenos 1) "pool" EAT₁-C; 2) "pool" EAT₁; 3) "pool" EAT₁-PC; 4) "pool" EAT₁-P; 5) "pool" EAT₂-PC e 6) "pool" EAT₂-P.

Tabela 4- Efeito do número de células do tumor linhagens 1-G e 2-S inoculadas sobre a porcentagem do crescimento do tumor.

| Linhagens | Número de animais | Número de células/0,05ml | Crescimento do tumor sólido em % |
|-----------|-------------------|--------------------------|----------------------------------|
| 1-G | 10 | $5,0 \times 10^6$ | 100 |
| | 10 | $1,0 \times 10^6$ | 100 |
| | 10 | $5,0 \times 10^5$ | 90 |
| | 10 | $1,0 \times 10^5$ | 90 |
| | 10 | $5,0 \times 10^4$ | 50 |
| | 10 | $1,0 \times 10^4$ | 50 |
| | 10 | $5,0 \times 10^3$ | 40 |
| | 10 | $1,0 \times 10^3$ | 30 |
| | 10 | $5,0 \times 10^2$ | 0 |
| 2-S | 10 | $1,0 \times 10^6$ | 100 |
| | 10 | $5,0 \times 10^5$ | 100 |
| | 10 | $1,0 \times 10^5$ | 90 |
| | 10 | $5,0 \times 10^4$ | 80 |
| | 10 | $1,0 \times 10^4$ | 70 |
| | 10 | $5,0 \times 10^3$ | 50 |
| | 10 | $1,0 \times 10^3$ | 40 |
| | 10 | $5,0 \times 10^2$ | 30 |
| | 10 | $1,0 \times 10^2$ | 10 |
| | 10 | $1,0 \times 10^1$ | 0 |

Tabela 5 - Medidas de espessura e respectivas médias, em mm da parte central do coxim plantar de camundongos inoculados com EAT linhagem 1-G, em função do número de células inoculadas e dias da inoculação.

| n. células inoculadas | Animal | dia | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|--------------------------------|--------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Grupo I $1,0 \times 10^7$ | 1 | | 3.28 | 4.35 | 4.67 | 5.12 | 5.45 | 6.11 | 6.45 | 6.80 | 6.98 |
| | 2 | | 3.22 | 4.13 | 4.47 | 5.07 | 5.49 | 5.95 | 6.40 | 6.77 | 7.02 |
| | 3 | | 3.28 | 4.18 | 4.48 | 5.17 | 5.46 | 5.71 | 6.67 | 6.91 | 7.15 |
| | 4 | | 3.30 | 4.10 | 4.39 | 5.06 | 5.28 | 5.69 | 5.90 | 6.15 | 6.33 |
| | 5 | | 3.28 | 3.96 | 4.15 | 4.66 | 5.00 | 5.39 | 5.93 | 6.18 | 6.42 |
| | Média | | 3,27 | 4,14 | 4,43 | 5,02 | 5,34 | 5,77 | 6,27 | 6,56 | 6,78 |
| Grupo II $5,0 \times 10^6$ | 1 | | 3.13 | 3.76 | 3.98 | 4.36 | 4.96 | 5.19 | 5.24 | 5.40 | 5.78 |
| | 2 | | 3.46 | 4.36 | 4.80 | 5.46 | 5.66 | 5.78 | 6.00 | 6.20 | 6.39 |
| | 3 | | 3.13 | 4.00 | 4.23 | 4.64 | 4.97 | 5.10 | 5.33 | 5.47 | 5.80 |
| | 4 | | 3.20 | 3.90 | 4.14 | 4.30 | 4.48 | 4.99 | 5.36 | 5.67 | 5.75 |
| | 5 | | 3.12 | 3.87 | 4.38 | 4.70 | 5.26 | 5.43 | 5.62 | 5.89 | 6.00 |
| | Média | | 3,21 | 3,98 | 4,31 | 4,69 | 5,07 | 5,30 | 5,51 | 5,73 | 5,94 |
| Grupo III $2,5 \times 10^6$ | 1 | | 3.30 | 3.40 | 3.79 | 3.80 | 4.07 | 4.34 | 4.61 | 4.75 | 5.29 |
| | 2 | | 2.96 | 3.41 | 3.62 | 4.05 | 4.51 | 4.96 | 5.44 | 5.23 | 5.88 |
| | 3 | | 3.10 | 3.15 | 3.39 | 3.54 | 3.72 | 3.90 | 4.10 | 4.25 | 4.47 |
| | 4 | | 3.24 | 3.34 | 3.60 | 3.88 | 4.16 | 4.46 | 4.74 | 4.88 | 5.10 |
| | 5 | | 3.00 | 3.27 | 3.36 | 3.63 | 4.05 | 4.47 | 4.91 | 4.92 | 5.20 |
| | Média | | 3,12 | 3,31 | 3,55 | 3,78 | 4,10 | 4,43 | 4,76 | 4,81 | 5,19 |
| Grupo IV $1,0 \times 10^6$ | 1 | | 3.28 | 3.51 | 3.43 | 3.58 | 3.80 | 4.00 | 4.25 | 4.37 | 4.80 |
| | 2 | | 3.15 | 3.41 | 3.32 | 3.39 | 3.58 | 3.73 | 3.97 | 4.10 | 4.39 |
| | 3 | | 3.12 | 3.46 | 3.51 | 3.70 | 3.99 | 4.20 | 4.38 | 4.63 | 4.97 |
| | 4 | | 3.04 | 3.24 | 3.27 | 3.53 | 3.69 | 3.85 | 4.03 | 4.34 | 4.65 |
| | 5 | | 3.33 | 3.59 | 3.63 | 3.85 | 4.06 | 4.31 | 4.50 | 4.79 | 5.00 |
| | Média | | 3,18 | 3,44 | 3,43 | 3,61 | 3,82 | 4,02 | 4,23 | 4,45 | 4,76 |

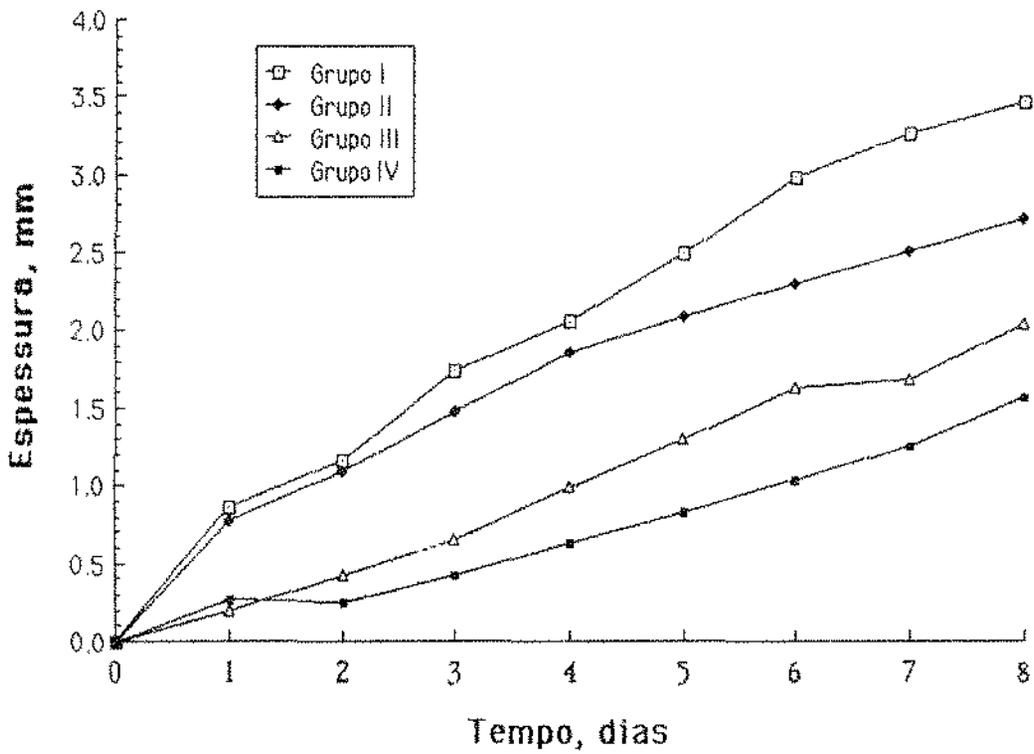


Figura 15. Padronização da curva de crescimento da forma sólida do tumor de Ehrlich em camundongos inoculados com EAT linhagem 1-6, em função do número de células inoculadas e dias da inoculação.

Grupo I - $1,0 \cdot 10^7$ células

Grupo II - $5,0 \cdot 10^6$ células

Grupo III - $2,5 \cdot 10^6$ células

Grupo IV - $1,0 \cdot 10^6$ células

Tabela 6 - Medidas de espessura e respectivas médias, em mm, da parte central do coxim plantar de camundongos inoculados com EAT linhagem 2-S, em função do número de células inoculadas e dias da inoculação.

| n. células inoculadas | dias Animal | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|--------------------------------|----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Grupo I $5,0 \times 10^6$ | 1 | 3.07 | 4.66 | 4.74 | 4.99 | 5.55 | 6.03 | 6.16 | 6.49 | 6.92 |
| | 2 | 3.03 | 4.11 | 4.61 | 5.24 | 5.68 | 5.87 | 6.04 | 6.28 | 6.56 |
| | 3 | 3.30 | 4.16 | 4.56 | 5.00 | 5.39 | 5.89 | 6.01 | 6.19 | 6.79 |
| | 4 | 3.33 | 5.35 | 5.51 | 5.55 | 5.71 | 6.26 | 6.50 | 6.91 | 7.46 |
| | 5 | 3.07 | 4.32 | 4.58 | 5.01 | 5.55 | 6.01 | 6.42 | 6.62 | 7.08 |
| | Média | | 3,16 | 4,52 | 4,80 | 5,16 | 5,58 | 6,01 | 6,23 | 6,50 |
| Grupo II $2,5 \times 10^6$ | 1 | 3.06 | 3.30 | 3.54 | 4.32 | 4.67 | 4.88 | 5.09 | 5.31 | 5.82 |
| | 2 | 3.07 | 3.49 | 3.80 | 4.27 | 4.73 | 5.08 | 5.23 | 5.39 | 5.99 |
| | 3 | 2.98 | 3.30 | 3.69 | 4.23 | 4.74 | 4.92 | 5.10 | 5.29 | 5.59 |
| | 4 | 3.12 | 3.40 | 3.70 | 4.12 | 4.47 | 4.69 | 4.91 | 5.13 | 5.46 |
| | 5 | 2.96 | 3.38 | 3.88 | 4.00 | 4.67 | 5.01 | 5.23 | 5.65 | 6.00 |
| | Média | | 3,04 | 3,37 | 3,72 | 4,19 | 4,66 | 4,92 | 5,11 | 5,35 |
| Grupo III $1,0 \times 10^6$ | 1 | 2.90 | 3.20 | 3.39 | 3.70 | 4.00 | 4.35 | 4.79 | 5.14 | 5.35 |
| | 2 | 3.00 | 3.36 | 3.49 | 3.73 | 4.35 | 4.76 | 5.17 | 5.60 | 5.93 |
| | 3 | 2.70 | 2.99 | 3.05 | 3.41 | 4.00 | 4.26 | 4.40 | 4.78 | 5.00 |
| | 4 | 2.97 | 3.22 | 3.36 | 3.49 | 3.60 | 4.14 | 4.68 | 5.15 | 5.54 |
| | 5 | 3.10 | 3.19 | 3.43 | 3.55 | 3.97 | 4.45 | 4.83 | 5.42 | 5.94 |
| | Média | | 2,93 | 3,19 | 3,34 | 3,58 | 3,98 | 4,39 | 4,77 | 5,22 |
| Grupo IV $5,0 \times 10^5$ | 1 | 2.93 | 3.22 | 3.30 | 3.42 | 3.67 | 4.06 | 4.45 | 4.86 | 5.34 |
| | 2 | 3.00 | 3.10 | 3.31 | 3.47 | 3.76 | 4.06 | 4.24 | 4.66 | 5.10 |
| | 3 | 3.16 | 3.29 | 3.33 | 3.52 | 3.83 | 4.21 | 4.78 | 5.06 | 5.30 |
| | 4 | 3.00 | 3.23 | 3.27 | 3.57 | 3.80 | 4.00 | 4.28 | 4.97 | 5.29 |
| | 5 | 2.89 | 3.09 | 3.14 | 3.36 | 3.51 | 3.79 | 4.07 | 4.36 | 4.79 |
| | Média | | 3,00 | 3,19 | 3,27 | 3,47 | 3,71 | 4,02 | 4,36 | 4,78 |

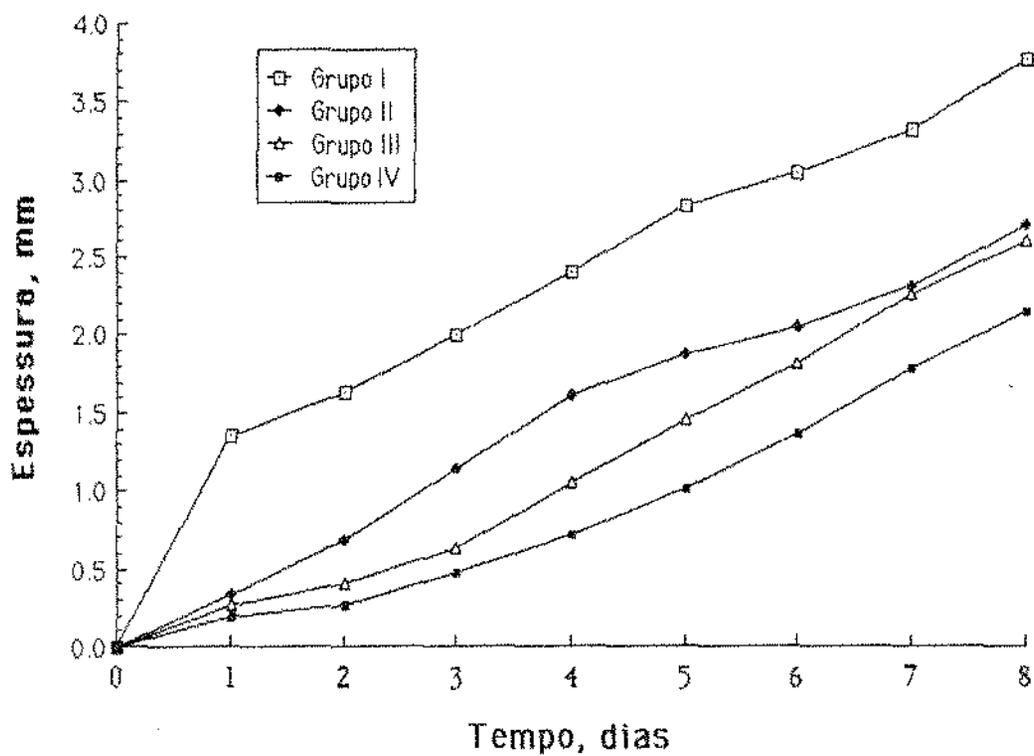


Figura 16. Padronização da curva de crescimento da forma sólida do tumor de Ehrlich em camundongos inoculados com EAT linhagem 2-S, em função do número de células inoculadas e dias da inoculação.

Grupo I - $5,0 \cdot 10^6$ células

Grupo III - $1,0 \cdot 10^6$ células

Grupo II - $2,5 \cdot 10^6$ células

Grupo IV - $5,0 \cdot 10^5$ células

Tabela 7 - Medidas de espessura e respectivas médias, em mm da parte central do coxim plantar de camundongos reinoculados com $1,0 \times 10^6$ células do EAT linhagem 1-G, em função do número de células e dias da inoculação.

| GRUPO | Animal | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|-------|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| I | 1 | 3.10 | 3.43 | 3.60 | 3.85 | 3.86 | 4.36 | 4.38 | 4.54 | 4.70 |
| | 2 | 2.97 | 3.21 | 3.40 | 3.55 | 3.85 | 4.14 | 4.17 | 4.38 | 4.70 |
| | 3 | 3.08 | 3.36 | 3.38 | 3.45 | 3.63 | 3.82 | 4.04 | 4.13 | 4.22 |
| | 4 | 3.31 | 3.43 | 3.39 | 3.55 | 3.60 | 3.66 | 3.84 | 3.87 | 3.90 |
| | 5 | 3.19 | 3.47 | 3.31 | 3.77 | 3.85 | 4.09 | 4.23 | 4.42 | 4.61 |
| | 6 | 3.19 | 3.55 | 3.56 | 3.78 | 4.09 | 4.20 | 4.52 | 4.67 | 4.82 |
| | 7 | 3.09 | 3.21 | 3.14 | 3.09 | 3.10 | 3.20 | 3.14 | 3.15 | 3.10 |
| | 8 | 3.28 | 3.46 | 3.55 | 3.70 | 3.91 | 3.97 | 4.10 | 4.29 | 4.48 |
| | 9 | 2.99 | 3.43 | 3.49 | 3.77 | 3.93 | 4.46 | 4.87 | 5.02 | 5.17 |
| | 10 | 3.16 | 3.60 | 3.72 | 4.06 | 4.32 | 4.62 | 5.06 | 5.26 | 5.46 |
| Média | | 3,14 | 3,42 | 3,45 | 3,66 | 3,81 | 4,05 | 4,24 | 4,37 | 4,51 |
| II | 1 | 3.22 | 3.50 | 3.59 | 3.89 | 4.12 | 4.49 | 4.68 | 4.93 | 5.18 |
| | 2 | 3.20 | 3.54 | 3.50 | 3.71 | 3.92 | 4.22 | 4.41 | 4.61 | 4.81 |
| | 3 | 2.99 | 3.49 | 3.37 | 3.38 | 3.49 | 3.86 | 3.86 | 3.96 | 4.06 |
| | 4 | 3.23 | 3.36 | 3.47 | 3.53 | 3.60 | 3.99 | 4.16 | 4.44 | 4.72 |
| | 5 | 3.35 | 3.72 | 3.43 | 3.77 | 4.18 | 4.23 | 4.45 | 4.68 | 4.91 |
| | 6 | 3.24 | 3.34 | 3.39 | 3.51 | 3.74 | 4.13 | 4.50 | 4.67 | 4.91 |
| | 7 | 3.12 | 3.43 | 3.32 | 3.55 | 3.64 | 3.72 | 3.95 | 4.13 | 4.31 |
| | 8 | 3.20 | 3.45 | 3.33 | 3.53 | 3.69 | 3.61 | 4.01 | 4.19 | 4.19 |
| | 9 | 3.20 | 3.41 | 3.46 | 3.81 | 4.16 | 4.55 | 4.77 | 4.95 | 5.13 |
| | 10 | 2.96 | 3.27 | 3.37 | 3.55 | 3.97 | 4.10 | 4.55 | 4.67 | 4.79 |
| Média | | 3,17 | 3,45 | 3,45 | 3,62 | 3,85 | 4,09 | 4,33 | 4,52 | 4,70 |

GRUPO I: grupo experimental (segundo inóculo - pata esquerda) $1,0 \times 10^6$ células inoculadas.

GRUPO II: grupo controle (segundo inóculo - pata esquerda) $1,0 \times 10^6$ células inoculadas.

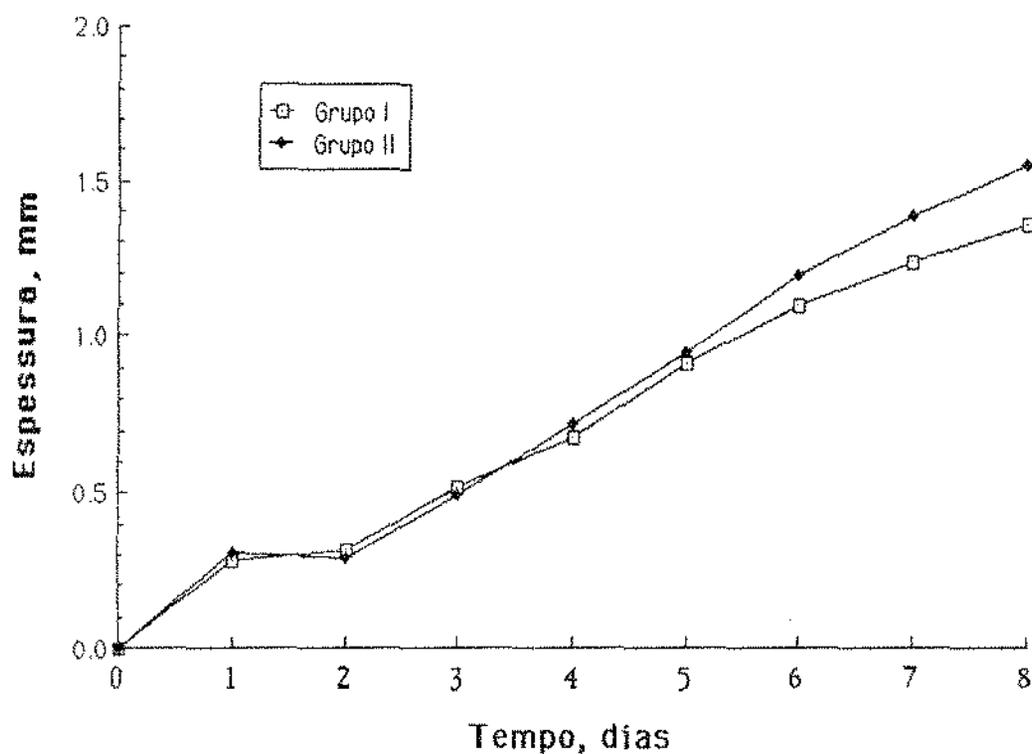


Figura 17. Curva de crescimento da forma sólida do tumor de Ehrlich em camundongos reinoculados com EAT linhagem 1-G, em função do número de células inoculadas e dias da inoculação.

Grupo I - Grupo reinoculado na pata esquerda com $1,0 \cdot 10^6$ células

Grupo II - Grupo controle inoculado na pata esquerda com $1,0 \cdot 10^6$ células

Tabela 8 - Medidas de espessura e respectivas médias, em mm da parte central do coxim plantar de camundongos reinoculados com $1,0 \times 10^6$ células EAT linhagem 2-S, em função do número de células inoculadas e dias da inoculação.

| GRUPO | día Animal | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|-------|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| I | 1 | 3.26 | 3.69 | 3.76 | 3.93 | 4.31 | 4.63 | 4.85 | 5.06 | 5.27 |
| | 2 | 3.04 | 3.24 | 3.41 | 3.42 | 3.41 | 3.74 | 4.04 | 4.50 | 4.96 |
| | 3 | 3.23 | 3.18 | 3.18 | 3.26 | 3.39 | 3.27 | 3.47 | 3.64 | 3.81 |
| | 4 | 3.27 | 3.67 | 3.51 | 3.61 | 4.03 | 4.52 | 4.62 | 4.84 | 5.06 |
| | 5 | 3.12 | 3.56 | 3.70 | 3.61 | 3.66 | 3.62 | 3.62 | 3.70 | 3.78 |
| | 6 | 2.93 | 3.30 | 3.16 | 3.55 | 3.69 | 3.73 | 4.30 | 4.72 | 4.74 |
| | 7 | 3.17 | 3.43 | 3.73 | 3.69 | 3.67 | 3.96 | 4.04 | 4.38 | 4.76 |
| | 8 | 3.39 | 3.75 | 3.81 | 4.25 | 4.78 | 5.24 | 5.46 | 5.82 | 6.18 |
| | 9 | 3.09 | 3.61 | 3.60 | 3.81 | 3.87 | 4.35 | 4.62 | 4.87 | 5.12 |
| | 10 | 3.28 | 3.66 | 3.53 | 3.65 | 3.57 | 4.19 | 4.00 | 4.30 | 4.60 |
| Média | | 3,18 | 3,51 | 3,54 | 3,68 | 3,84 | 4,13 | 4,30 | 4,58 | 4,83 |
| II | 1 | 3.27 | 3.15 | 3.26 | 4.34 | 3.57 | 4.33 | 5.28 | 5.34 | 5.40 |
| | 2 | 3.41 | 3.49 | 3.54 | 3.44 | 3.49 | 3.65 | 3.78 | 3.84 | 3.90 |
| | 3 | 3.13 | 3.62 | 3.69 | 3.93 | 4.09 | 4.86 | 5.04 | 5.22 | 5.40 |
| | 4 | 3.29 | 3.85 | 3.93 | 4.20 | 4.56 | 5.47 | 5.45 | 5.77 | 6.03 |
| | 5 | 3.10 | 3.32 | 3.46 | 3.57 | 4.02 | 4.66 | 4.89 | 5.11 | 5.33 |
| | 6 | 2.97 | 3.24 | 3.20 | 3.65 | 4.13 | 4.31 | 4.67 | 4.91 | 5.15 |
| | 7 | 3.13 | 3.52 | 3.65 | 3.76 | 4.21 | 4.85 | 5.06 | 5.23 | 5.40 |
| | 8 | 3.25 | 3.59 | 3.66 | 3.84 | 4.19 | 4.73 | 5.29 | 5.45 | 5.61 |
| | 9 | 3.40 | 3.70 | 3.55 | 3.83 | 4.30 | 4.74 | 5.44 | 5.78 | 6.12 |
| | 10 | 3.21 | 3.58 | 3.40 | 3.67 | 3.95 | 4.32 | 5.01 | 5.22 | 5.43 |
| Média | | 3,22 | 3,51 | 3,53 | 3,72 | 4,05 | 4,59 | 4,99 | 5,19 | 5,38 |

GRUPO I: grupo experimental (segundo inóculo - pata esquerda) $1,0 \times 10^6$ células inoculadas.

GRUPO II: grupo experimental (segundo inóculo - pata esquerda) $1,0 \times 10^6$ células inoculadas.

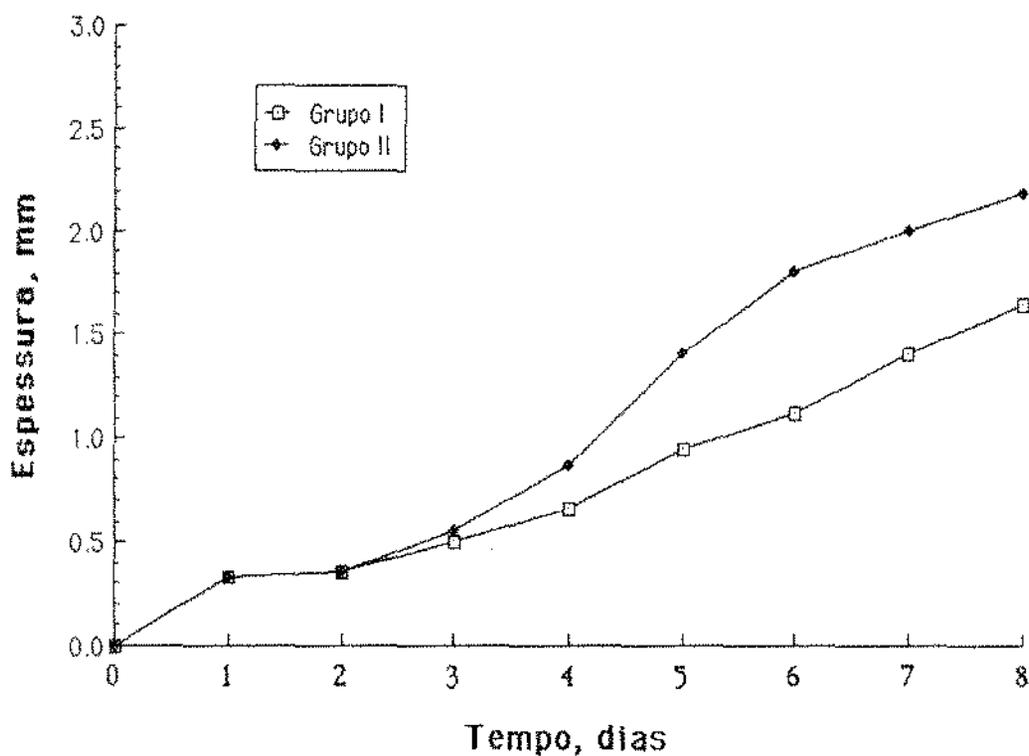


Figura 18. Curva de crescimento da forma sólida do tumor de Ehrlich em camundongos reinoculados com EAT linhagem 2-S, em função do número de células inoculadas e dias da inoculação.

Grupo I - Grupo reinoculado na pata esquerda com $1,0 \cdot 10^6$ células

Grupo II - Grupo controle inoculado na pata esquerda com $1,0 \cdot 10^6$ células



Figura 19 - Camundongo inoculados com EAT linhagem 1-G. Pata esquerda, tumor de 7 dias de desenvolvimento; pata direita, tumor com 19 dias de desenvolvimento



Figura 20 - Camundongo inoculado com EAT linhagem 1-G. Pata esquerda, tumor com 7 dias de desenvolvimento, animal controle.



Figura 21 - Camundongo inoculado com EAT linhagem 2-S. Pata esquerda, tumor com 7 dias de desenvolvimento; pata direita, tumor com 19 dias de desenvolvimento.



Figura 22 - Camundongo inoculado com EAT linhagem 2-S. Pata esquerda, tumor com 7 dias de desenvolvimento, animal controle.

Tabela 9. Número de cromossomos do tumor de Ehrlich linhagens 1-G e 2-S.

| Número de células | | Número de cromossomos | |
|-------------------|--------------|-----------------------|--------------|
| linhagem 1-G | linhagem 2-S | linhagem 1-G | linhagem 2-S |
| 1 | 1 | 35 | 51 |
| 1 | 1 | 37 | 52 |
| 1 | 2 | 49 | 53 |
| 1 | 1 | 51 | 54 |
| 1 | 1 | 52 | 55 |
| 4 | 1 | 54 | 57 |
| 1 | 1 | 55 | 60 |
| 6 | 1 | 56 | 61 |
| 5 | 1 | 57 | 62 |
| 2 | 1 | 58 | 63 |
| 1 | 1 | 59 | 64 |
| 5 | 1 | 60 | 65 |
| 9 | 2 | 61 | 66 |
| 29 | 1 | 62 | 68 |
| 14 | 1 | 63 | 69 |
| 14 | 1 | 64 | 70 |
| 5 | 6 | 65 | 71 |
| 7 | 2 | 66 | 72 |
| 1 | 7 | 67 | 73 |
| 1 | 6 | 68 | 74 |
| 1 | 19 | 70 | 75 |
| 2 | 12 | 71 | 76 |
| 1 | 20 | 78 | 77 |
| 1 | 29 | 82 | 78 |
| 1 | 17 | 109 | 79 |
| 1 | 6 | 114 | 80 |
| | 2 | | 81 |
| | 1 | | 83 |
| | 1 | | 84 |
| | 1 | | 88 |
| | 2 | | 89 |
| | 1 | | 91 |
| | 1 | | 113 |
| | 1 | | 120 |
| Total | 116 | | 153 |
| Moda | | 62 | 78 |

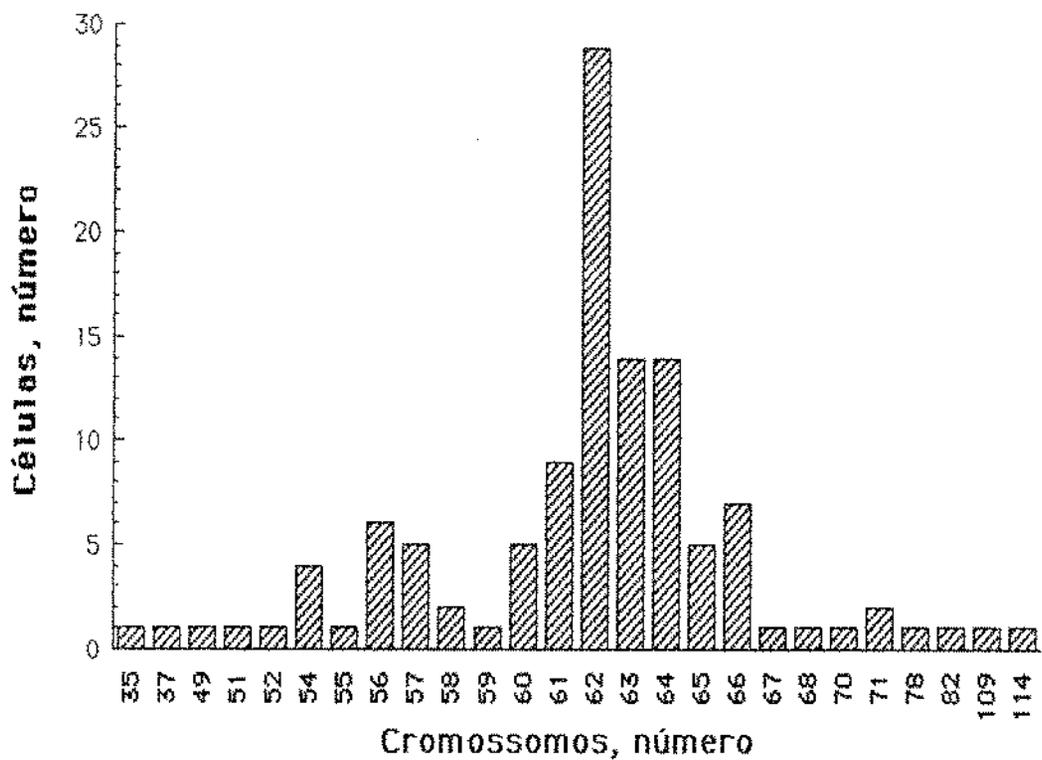


Figura 23. Histograma da frequência do número de cromossomos das células do EAT linhagem 1-6.

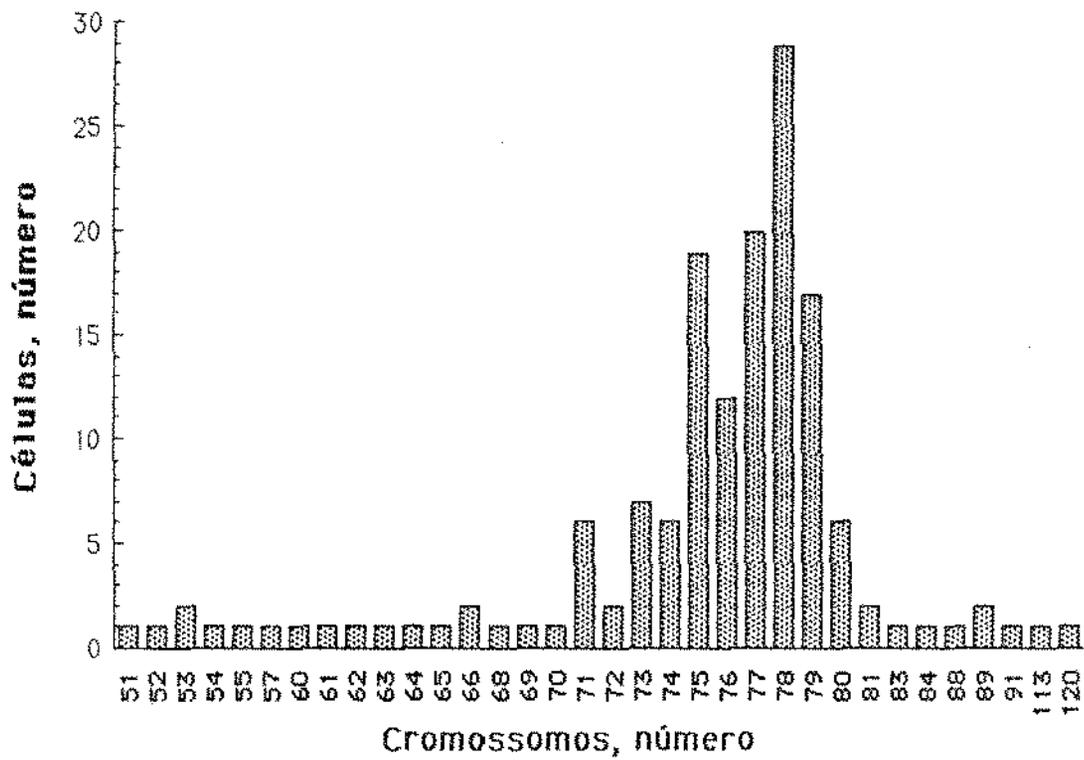


Figura 24. Histograma da frequência do número de cromossomos das células do EAT Inhagem 2-5.

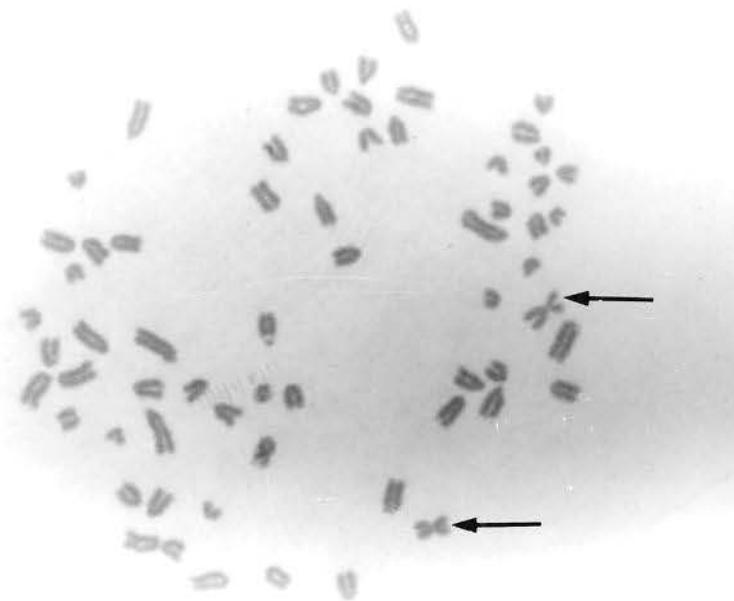


Figura 25 - Fotomicrografia óptica dos cromossomos do EAT linhagem 1-G. Coloração de orcéina acética 2%, fotografado em imersão com filtro verde IF 550. (→ cromossomos metacêntricos). Aumento 1000x.



Figura 26 - Fotomicrografia óptica dos cromossomos do EAT-inhagem 2-S. Coloração de orcéina acética a 2%, fotográfado em imersão com filtro verde IF 550. (→ cromossomo metacêntrico). Aumento 1000x.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Diante dos resultados obtidos com o emprego das diferentes metodologias e previamente apresentados, pudemos verificar por exemplo, no estudo em que se utilizou a técnica de eletroforese em agarose, que o soro dos animais portadores de tumores com 7 dias de desenvolvimento, bem como o soro dos animais controles - 7 e 13 dias -, apresentaram 3 regiões distintas: albumina, alfa-2 e beta globulina. Por outro lado, os animais apresentando tumores com 13 dias de desenvolvimento mostraram, além disso, a fração das gamaglobulinas (Fig. 7 a 10). Ausência de anticorpos circulantes em animais portadores de EAT foi observado por THUNOLD (1968_b), utilizando a técnica de imunofluorescência indireta. Por outro lado, os testes de aglutinação mista e consumo de antiglobulina realizados por este autor, mostraram a presença de globulinas na superfície das células tumorais. ROBINS, em 1975 avaliando a cinética da resposta de anticorpos circulantes para a forma sólida e ascítica do hepatoma D23, através de testes de imunofluorescência de membrana, observou reações positivas a partir do terceiro dia de implante das células tumorais para ambas as formas. Entretanto, os animais portadores da forma sólida do tumor deixaram de apresentar anticorpos circulantes, quando esses se tornaram palpáveis, sugerindo a absorção dos anticorpos pelas células da massa tumoral, uma vez que anticorpos ligados à superfície das células tumorais na forma ascítica foram observados. Embora os padrões eletroforéticos obtidos por nós mostrassem que os animais portadores de tumores com 7 dias de desenvolvimento apresentaram ausência de anticorpos circulantes (Fig. 7 a 10), os resultados obtidos com tumor de 13 dias de desenvolvimento, demonstraram a presença da fração gamaglobulina. Um aspecto a ser considerado, é o fato dos animais utilizados neste experimento serem oriundos do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP). Neste Centro a técnica de manejo e o controle sanitário utilizado, previnem a contaminação

desses animais por uma ampla variedade de vírus e parasitoses. Isto pode contribuir naturalmente para a presença de uma baixa concentração das proteínas da fração gamaglobulina. Desta forma, é possível que a técnica utilizada não demonstre sensibilidade suficiente para detectar a presença de gamaglobulinas nos animais controles, bem como nos animais portadores de tumores com 7 dias de desenvolvimento e, provavelmente, com o decorrer do desenvolvimento do tumor houve um aumento das proteínas dessa fração, permitindo dessa forma, sua detecção. Contudo, não podemos descartar a possibilidade de ter ocorrido desnaturação das proteínas durante o processo de congelamento e descongelamento, uma vez que padrões eletroforéticos do soro de camundongos e ratos normais, apresentando 5 regiões distintas: albumina; alfa-1; alfa-2; beta e gamaglobulinas foram observados por GLEASON & FRIEDBERG (1953); CAMPBELL et al. (1959) e PIROSKY & OISGOLD (1961_a).

As concentrações protéicas obtidas para as diferentes frações do soro dos animais portadores do EAT linhagens 1-G e 2-S com 7 e 13 dias de desenvolvimento (Tab. 1 e 2) revelaram uma diminuição nos níveis de albumina e um aumento nos níveis das alfa-2 e beta globulina. Resultados semelhantes da diminuição na concentração de albumina foram também obtidos por GLEASON & FRIEDBERG (1953), analisando através da técnica de eletroforese de papel de filtro, o soro de camundongos C3H portadores do carcinoma mamário espontâneo. CAMPBELL et al. (1959) observaram que os soros dos animais portadores de tumor induzido por metilcolantreno apresentaram mais proteínas da mobilidade das alfa globulinas, quando comparados com o soro dos animais normais. Padrões eletroforéticos semelhantes também foram obtidos com o soro de indivíduos cancerosos, onde se verificou uma diminuição na concentração de albumina e um aumento nas concentrações das frações alfa-1 e alfa-2 globulinas, bem como das frações beta e gamaglobulinas (MIDER et al., 1950). Os resultados obtidos em nosso trabalho sugerem que os animais portadores do EAT linhagens 1-G e 2-S apresentaram uma hipoalbuminemia e, de modo geral,

desses animais por uma ampla variedade de vírus e parasitoses. Isto pode contribuir naturalmente para a presença de uma baixa concentração das proteínas da fração gamaglobulina. Desta forma, é possível que a técnica utilizada não demonstre sensibilidade suficiente para detectar a presença de gamaglobulinas nos animais controles, bem como nos animais portadores de tumores com 7 dias de desenvolvimento e, provavelmente, com o decorrer do desenvolvimento do tumor houve um aumento das proteínas dessa fração, permitindo dessa forma, sua detecção. Contudo, não podemos descartar a possibilidade de ter ocorrido desnaturação das proteínas durante o processo de congelamento e descongelamento, uma vez que padrões eletroforéticos do soro de camundongos e ratos normais, apresentando 5 regiões distintas: albumina; alfa-1; alfa-2; beta e gamaglobulinas foram observados por GLEASON & FRIEDBERG (1953); CAMPBELL et al. (1959) e PIROSKY & OISGOLD (1961_a).

As concentrações protéicas obtidas para as diferentes frações do soro dos animais portadores do EAT linhagens 1-G e 2-S com 7 e 13 dias de desenvolvimento (Tab. 1 e 2) revelaram uma diminuição nos níveis de albumina e um aumento nos níveis das alfa-2 e beta globulina. Resultados semelhantes da diminuição na concentração de albumina foram também obtidos por GLEASON & FRIEDBERG (1953), analisando através da técnica de eletroforese de papel de filtro, o soro de camundongos C3H portadores do carcinoma mamário espontâneo. CAMPBELL et al. (1959) observaram que os soros dos animais portadores de tumor induzido por metilcolantreno apresentaram mais proteínas da mobilidade das alfa globulinas, quando comparados com o soro dos animais normais. Padrões eletroforéticos semelhantes também foram obtidos com o soro de indivíduos cancerosos, onde se verificou uma diminuição na concentração de albumina e um aumento nas concentrações das frações alfa-1 e alfa-2 globulinas, bem como das frações beta e gamaglobulinas (MIDER et al., 1950). Os resultados obtidos em nosso trabalho sugerem que os animais portadores do EAT linhagens 1-G e 2-S apresentaram uma hipoalbuminemia e, de modo geral,

animais foram inoculados com EAT linhagens 1-G e 2-S por essa técnica. No entanto, deve ser levado em conta o fato dessa técnica ser mais qualitativa do que quantitativa detectando, dessa forma, somente alterações marcantes, tais como perda significativa de proteínas ou ausência das mesmas o que, provavelmente, foi um fator importante nos resultados obtidos. Contudo, a presença do tumor promove alterações nas proteínas séricas dos camundongos conforme se pode observar nas Tab. 1 e 2 e Fig. 11 e 12.

Os resultados obtidos nos testes sorológicos de imunodifusão radial, pelos quais se procurou detectar as concentrações de IgG no soro de camundongos inoculados com EAT linhagens 1-G e 2-S com 7 e 13 dias de desenvolvimento, revelaram uma elevação na concentração de IgG, com o desenvolvimento do tumor (Tab. 3). KANEKO et al. (1975), avaliando o número de células produtoras de anticorpos anti-EAT, no baço de camundongos portadores do tumor sólido, observaram uma intensificação da resposta imune durante o desenvolvimento do tumor. Essa se iniciou no sexto dia após o inóculo inicial, atingindo um máximo ao redor do décimo quinto dia. Segundo LANGONE et al. (1978), as classes de anticorpos citotóxicos, produzidos após imunização de coelhos com dois hepatomas (induzido por dietilnitrosanina) antigenicamente distintos, foram IgG e IgM para o tumor designado linhagem 1 e a imunização com a linhagem de tumor 10 produziu somente IgG. Os dados obtidos em nossas investigações sugerem que as células do EAT linhagens 1-G e 2-S foram capazes de induzir a formação de uma resposta imune nos camundongos, dentre as quais destacamos a síntese de IgG.

Tendo em vista o aumento na concentração de IgG nos animais portadores do EAT linhagens 1-G e 2-S e considerando o fato dessa Ig ter a capacidade de ativar o complemento é que resolvemos investigar os níveis do componente C3c através do emprego da técnica de eletroforese em foguete. Os resultados demonstraram uma leve diminuição no pico eletroforético do componente C3c no soro dos animais portadores da linhagem 1-G tanto na forma sólida quanto na forma ascítica e uma diminuição mais

acentuada foi observada no soro dos animais portadores da linhagem 2-S (Fig. 14). BELLELLI & SEZZI (1976), avaliando a participação do componente C3 na rejeição imunológica dos tumores experimentais, relataram que os animais imunizados contra células tumorais de Leucemia L1210 e do tumor de Ehrlich desenvolveram os tumores quando reestimulados com as respectivas células tumorais, após o tratamento com o fator de veneno de cobra. Os autores sugerindo, desta forma, que o C3 está envolvido na rejeição dos tumores considerados experimentais. Segundo PORTA et al. (1978), os estudos das variações funcionais na atividade do complemento, realizados logo após ao enxerto das células do carcinoma ascítico de Ehrlich, demonstraram que o soro desses animais perderam a capacidade de mediar imunoaderência, devido à diminuição na concentração do C3b e C3d. Esses resultados levaram os autores a concluir que o complemento é consumido durante a resposta inflamatória, a qual acompanha o crescimento do tumor. Os resultados obtidos em nossa pesquisa sugerem que o componente C3 do complemento participa de uma resposta imunológica contra as células tumorais do EAT linhagens 1-G e 2-S. Os resultados obtidos com o soro dos animais portadores do EAT com 7 dias de desenvolvimento não foram mostrados, pois tivemos dificuldades em obter uma reprodutibilidade dos testes. Contudo, há indicações de que ocorra uma diminuição nos níveis do componente C3 do complemento nesse estágio de desenvolvimento do tumor.

Com referência ao comportamento proliferativo das células tumorais linhagens 1-G e 2-S, os resultados obtidos a partir dos estudos de monitoramento do crescimento do tumor na forma sólida demonstraram existir uma relação direta entre o número de células inoculadas e a porcentagem de animais apresentando o desenvolvimento do tumor (Tab. 5). Esse comportamento também foi descrito para o desenvolvimento do tumor de Ehrlich na sua forma ascítica (SUGIURA, 1965). As concentrações mínimas necessárias para o desenvolvimento do tumor em 100% dos receptores inoculados foi de $1,0 \times 10^6$ células para a linhagem 1-G e de $5,0 \times 10^5$

células para a linhagem 2-S, quando inoculado em um volume final de 0,05ml. Nessas quantidades, indícios de crescimento do tumor foram verificados a partir do terceiro dia após o inóculo das células tumorais, nos camundongos portadores de ambas as linhagens. Com relação às quantidades inferiores de células inoculadas, o crescimento do tumor foi observado iniciar-se vários dias após o inóculo, alcançando até mesmo um período de latência de 15 dias ou mais nos casos em que foram inoculadas as concentrações de $1,0 \times 10^3$ células e $1,0 \times 10^2$ células em um volume final de 0,05 ml respectivamente para as linhagens 1-G e 2-S. Os resultados obtidos dessas observações sugerem que o tumor de Ehrlich linhagem 2-S é mais proliferativo do que o tumor pertencente à linhagem 1-G. Observamos também que o crescimento das células tumorais de ambas as linhagens foi contínuo. Além disso, o período compreendido entre a inoculação das células tumorais e o início do crescimento exponencial dessa neoplasia (escape) é inversamente proporcional à concentração do inóculo utilizado. Desse modo observamos que o crescimento do tumor nos animais do grupo I e II de ambas as linhagens tumorais (Fig. 15 e 16) demonstrou um escape a partir do primeiro dia de evolução tumoral. Com relação aos animais do grupo III de ambas as linhagens e do grupo IV da linhagem 1-G o escape ocorreu ao redor do terceiro dia, após o implante inicial; porém nos animais do grupo IV linhagem 2-S o escape foi observado após o quarto dia de evolução do tumor. O perfil da curva de crescimento do EAT na forma sólida obtido por GUERRA em 1983, onde o escape das células neoplásicas foi observado a partir do quinto dia do implante, difere dos resultados aqui apresentados, embora o mesmo modelo experimental EAT linhagem 1-G e metodologia tenham sido empregados. Inicialmente, pelos nossos resultados, pode-se sugerir, que o aumento exponencial do tumor na fase inicial do desenvolvimento para o grupo I e II (Fig. 15 e 16) de ambas as linhagens tumorais, tenha ocorrido devido a um processo inflamatório provocado pelo trauma do inóculo, uma vez que um aumento de espessura da pata dos animais controles foi observado. Entretanto, uma condição normal da pata dos animais

controles foi observado um dia após o inóculo do PBS. Assim, uma segunda sugestão é que esse aumento tenha ocorrido devido ao próprio desenvolvimento das células neoplásicas, embora dados histológicos não tenham sido realizados neste estudo.

Nos estudos realizados por DECKERS, et al. (1973), avaliando o efeito do tamanho do tumor sob o desenvolvimento da imunidade concomitante em camundongos portadores de fibrossarcoma, induzido por metilcolantreno, foi demonstrado que a rejeição do segundo inóculo ocorreu 14 dias após o transplante inicial. Resultados similares foram obtidos por CHANDRADASA (1973), utilizando dois sarcomas murinos (MC23 e MC26) - induzido por metilcolantreno-. Os resultados obtidos por este autor, revelaram que o pico da resistência antitumor, ocorreu entre o 10 e 14 dia após o implante dos tumores. O autor constatou também, que ocorreu uma perda maior que 50% da resistência antitumor, quando a reinoculação das células foi realizada uma semana depois. Relatos semelhantes foram descritos por GUERRA (1983), estudando a imunidade concomitante relacionada com o tumor de Ehrlich. Em seus estudos, este autor observou que a resistência ao segundo inóculo aumentou gradativamente, atingindo um pico 12 dia após o inóculo inicial. Embora o período entre o inóculo primário e a reestimulação, utilizado neste trabalho tenham sido similares aos empregados por DECKERS, et al. (1973); CHANDRADASA, (1973) e GUERRA (1983), nossos resultados demonstraram que os animais portadores do EAT de ambas as linhagens não foram capazes de impedir o desenvolvimento do segundo inóculo quando administrado 12 dias após o implante do tumor primário (Fig. 17 e 18). Um aspecto importante a ser considerado, com relação a imunidade concomitante, é o fato da imunidade específica ao tumor desenvolver-se durante o crescimento do mesmo. Entretanto, a mesma é perdida, quando o tumor adquire um determinado tamanho. Esse fato tem sido observado nos mais diferentes modelos de neoplasia: leucemia linfóide P-388; leucemia linfóide B; adenocarcinoma mamário, carcinoma do pulmão Lewis, entre outros (CHANDRADASA, 1973; DECKERS et al., 1973; DECKERS et al., 1976;

GORELIK, 1983; RUGGIERO et al., 1985). Esse fato foi também evidenciado no modelo de imunidade semi-concomitante, uma vez que a inibição do crescimento das células tumorais re-estimuladas após a excisão do tumor, mostrou depender do espaço de tempo entre o inóculo primário e a excisão, sendo que esse intervalo de tempo varia com o tamanho do inóculo inicial (GERSHON et al, 1971). Perda da transferência de imunidade ativa a receptores normais, através de células de peritônio e de baço provenientes de animais portadores de tumores, também foi observada (BARKI & YOUN, 1969 e DECKERS et al., 1971). Assim, não podemos afirmar que ambos os modelos experimentais utilizados no presente trabalho perderam a capacidade de induzir uma resistência ao segundo inóculo. Provavelmente o inóculo primário tenha alcançado um tamanho crítico, uma vez que foi observado um crescimento exponencial no início do desenvolvimento do mesmo, deprimindo a resistência dos animais.

A contagem cromossômica demonstrou que ambas as linhagens do EAT utilizadas no presente estudo são constituídas por uma população de células heterogêneas. Esses resultados estão de acordo com uma série de estudos efetuados com os tumores ascíticos (HAUSCHKA, 1953; HAUSCHKA & LEVAN, 1953; SACHS & GALLILY, 1955 e LEVAN, 1956). As Figuras 18 e 19 mostram o histograma de frequência do número cromossômico das linhagens estudadas, 1-G e 2-S, respectivamente. Podemos observar que o número modal da linhagem 1-G foi de 62 cromossomos e de 78 cromossomos para a linhagem 2-S. Considerando que o tumor de Ehrlich é uma neoplasia experimental não específica, isto é, cresce em várias linhagens de camundongos (KALLIS, 1961 e SUGIURA, 1965), os resultados aqui obtidos, mostram concordância com os estudos realizados por HAUSCHKA (1953); SACHS & GALLILY (1955) e LEVAN (1956) relacionando o número de cromossomos e a especificidade do hospedeiro. Desses estudos, conclui-se que os tumores com números cromossômicos próximos ao tetraplóide desenvolvem-se e levam à morte hospedeiros de diferentes linhagens. Entretanto, os tumores próximos ao número de cromossomos

diplóide regredem, quando inoculados em hospedeiros diferentes daqueles onde o tumor se originou (HAUSCHKA, 1953; HAUSCHKA & LEVAN, 1953; SACHS & GALLILY, 1955 e LEVAN, 1956). Conforme relatos na literatura, os camundongos apresentam um número cromossômico equivalente a $2n=40$ e são todos telocêntricos (acrocêntricos) na sua constituição morfológica (HAUSCHKA, 1953; KAZIWARA, 1954; LEVAN, 1956 e HAUSCHKA & LEVAN, 1958). Nesse aspecto, a linhagem 1-G apresenta um número cromossômico triplóide ($3n$), provavelmente em consequência de distúrbios de anáfases secundárias, tais como não disjunção, atraso ou ocorrência de cromossomos duplicados devido à fusão nuclear; fusão celular (TIMONEN, 1950; HAUSCHKA & LEVAN, 1953 e LEVAN, 1956). A linhagem 2-S apresentou um número próximo ao tetraplóide ($4n$), como resultado de uma provável fissão cêntrica ou mecanismos que envolvem rearranjos ou aberrações numéricas que geram um aumento no número cromossômico da célula. Tais rearranjos cromossômicos proporcionam o aparecimento de novas formas morfológicas (cromossomos metacêntricos), fato esse por nós evidenciado, conforme mostra a Figura 20 e 21 . Esses resultados estão de acordo com vários estudos realizados com tumores ascíticos de camundongos (KAZIWARA, 1954; TJIO & LEVAN, 1956 e HAUSCHKA & LEVAN, 1958).

Segundo LEVAN & BIESELE (1958) as alterações no meio de manutenção de uma população de células heterogêneas, através de um processo de seleção, será conduzida a uma adaptação genética ao novo ambiente. Tal fato foi observado com relação às células tumorais da linhagem 2-S quando comparadas com o número modal das células cedidas pelo Prof. Dr. Mike G. Simpikins (comunicação pessoal). Os resultados das análises citológicas por nós obtidos mostraram um cariótipo $2n=78$, variando de 51 a 120 (Tab. 10), enquanto as células cedidas pelo Prof. Dr. Mike G. Simpikins apresentavam um cariótipo de $2n=76$ com uma variação de 71 a 94 quando congeladas em 90% (MEM 10% FCS) e 10% de DMSO. Resultados semelhantes de alteração no número cromossômico foram observados por ISING (1955), transferindo o

tumor de Ehrlich com um número modal de cromossomos variando de 79 a 80 para "hamster" o qual passou a apresentar como linha precursora células com 76 cromossomos. Os resultados por nós obtidos sugerem que a alteração no meio de manutenção das células tumorais da linhagem 2-S induziu uma alteração no número cromossômico em resposta a uma adaptação ao seu novo ambiente.

Neste trabalho, o conjunto de informações obtidos e apresentados, mostra que, embora as células tumorais do EAT-linhagens 1-G e 2-S e que vem sendo mantidas por muitos anos, promovem alterações nas proteínas séricas do animal hospedeiro, e mantém suas características imunogênicas. A linhagem 1-G, mostrou ter aumentado sua capacidade proliferativa em relação aos resultados de Guerra (1983). A imunidade concomitante, porém, não foi detectada dentro dos períodos de tempo e número de células aqui empregados. Em relação à isso, outros estudos poderiam ser realizados empregando-se novos períodos de tempo e diferentes números de células por inóculo, podendo assim contribuir para a confirmação ou não da presença desse tipo de imunidade neste modelo experimental atualmente. Outros estudos ainda poderiam ser realizados analisando os mecanismos imunológicos de escape do tumor, uma vez que a presença de uma resposta imune foi observada.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

O conjunto de dados aqui apresentados, no modelo experimental utilizado, permitem nos concluir que:

1. O desenvolvimento das células tumorais das linhagens 1-G e 2-S utilizadas alteram as concentrações das proteínas séricas - albumina, frações alfa-2, beta-globulinas, complemento e IgG.
2. O implante das células tumorais da linhagem 1-G na cavidade peritoneal e no coxim plantar, bem como o implante das células tumorais linhagem 2-S no coxim plantar, induzem a formação de uma resposta imune específica contra as mesmas.
3. O crescimento de ambas as linhagens tumorais na sua forma sólida dependem do número de células inoculadas, sendo que para a linhagem 1-G a quantidade de células necessárias para desenvolver tumores em todos os animais foi de $1,0 \times 10^6$ células/0,05ml; enquanto que para a linhagem 2-S foi de $5,0 \times 10^5$ células/0,05ml.
4. As células tumorais pertencentes à linhagem 2-S são mais proliferativas do que as células tumorais pertencentes à linhagem 1-G.
5. As linhagens tumorais 1-G e 2-S estudadas nas condições experimentais realizadas, não desenvolveram um estado de imunidade concomitante, quando inoculadas em camundongos.
6. As contagens cromossômicas indicaram que as células tumorais das linhagens 1-G e 2-S representam clones diferentes de células do tumor de Ehrlich.

RESUMO

RESUMO

Aspectos imunológicos de camundongos portadores do tumor de Ehrlich, linhagens 1-G e 2-S, foram avaliados através do emprego de técnicas de eletroforese. O soro dos animais utilizados nos testes foi colhido nos períodos de 7 e 13 dias após a inoculação de $2,0 \times 10^6$ células tumorais da linhagem 1-G na cavidade peritoneal e da mesma concentração de células das linhagens 1-G ou 2-S no coxim plantar de camundongos. O fenômeno de imunidade concomitante relacionado a esse tipo de tumor foi investigado reinoculando-se os camundongos no coxim plantar esquerdo 12 dias após o implante do tumor primário (coxim plantar direito), com uma concentração de $1,0 \times 10^6$ células tumorais das linhagens 1-G ou 2-S. Os resultados da eletroforese em agarose do soro de camundongos inoculados com as células tumorais das linhagens 1-G e 2-S mostraram uma diminuição na concentração de albumina e um aumento nas concentrações das frações de alfa-2 e beta globulina. Usando-se a técnica de gel de poliacrilamida, o perfil eletroforético do soro de camundongos inoculados com células tumorais da linhagem 1-G revelou a ocorrência de proteínas com R_m 0,88 após 7 dias de desenvolvimento do tumor. Soro de animais com 13 dias de desenvolvimento do tumor, mostrou a presença de bandas protéicas com R_m 0,11, 0,12 e 0,31. Com o desenvolvimento do tumor, uma elevação na concentração de IgG e uma diminuição do complemento foram observados através da imunodifusão radial e eletroforese em foguete, respectivamente. O crescimento das células tumorais das linhagens 1-G e 2-S, na forma sólida, demonstrou um desenvolvimento contínuo e dependente do número de células inoculadas. As células tumorais 2-S demonstraram ser mais proliferativas, uma vez que o inóculo de $5,0 \times 10^5$ células promoveu o crescimento do tumor em 100% dos camundongos, enquanto que resultados semelhantes somente foram conseguidos após o inóculo de $1,0 \times 10^6$ células da linhagem 1-G. As medidas da espessura da pata, revelaram que o desenvolvimento do tumor de Ehrlich, na forma

sólida, apresentou um crescimento exponencial inicial, quando as concentrações de $1,0 \times 10^7$ e $5,0 \times 10^6$ células da linhagem 1-G e $2,5 \times 10^6$ e $1,0 \times 10^6$ células da linhagem 2-S foram inoculadas. Concentrações inferiores de células apresentaram um crescimento inicial moderado. Camundongos portadores do tumor de Ehrlich, linhagens 1-G ou 2-S, testados para imunidade concomitante, demonstraram não serem capazes de rejeitar um segundo inóculo das mesmas células doze dias após o inóculo primário. Com relação ao número de cromossomos, as análises citológicas revelaram que as linhagens 1-G e 2-S representam diferentes clones das células do tumor de Ehrlich, com um número modal de 62 e 78 cromossomos, respectivamente.

ABSTRACT

ABSTRACT

Immunological aspects of mice bearing Ehrlich's carcinoma, lines 1-G and 2-S, were evaluated by using electrophoresis technics. The serum was collected 7 and 13 days after the inoculation of 2.0×10^6 tumor cells, line 1-G, in the peritoneal cavity and the same concentration of tumor cells, lines 1-G and 2-S, in the footpad. The concomitant immunity phenomenon was investigated by reinoculating 1.0×10^6 of either 1-G or 2-S tumor cells 12 days after the implant of the primary tumor. Electrophoresis in agarose showed that both cell types induced a decrease of albumin and an increase of alpha 2 and beta globulins levels. Using polyacrilamide gel electrophoresis the serum of mice inoculated with tumor cells line 1-G revealed proteins bands with Rm 0.88 at 7 and 13 days of tumor development. After 13 days of tumor growth the serum also showed the presence of proteins bands with Rm 0.11, 0.12 and 0.31. The increase of IgG levels with tumor development and a decrease in complement levels were observed in radial immunodiffusion and rocket electrophoresis respectively. The growth of tumor cells, lines 1-G and 2-S, in solid form, was continuous and dose dependent. The 2-S tumor cells were more invasive, since the inoculation of 5.0×10^5 cells promoted 100% of growth, while to achieve similar results with 1-G it was necessary the inoculation of 1.0×10^6 cells. The measurement of the degree of swelling of the footpad, when 1.0×10^7 and 5.0×10^6 cells of 1-G line were inoculated, revealed an exponential growth in the beginning of tumor development. Lower concentrations of cells showed only moderate growth. Mice with Ehrlich's tumor either, from lines 1-G or 2-S, tested for concomitant immunity, did not reject a second inoculum of the same cells 12 days after the first inoculum. The cytological analysis showed that 1-G and 2-S lines represent diferent clones of Ehrlich's carcinoma, displaying a modal number of 62 and 78 cromosomes respectively.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA*

- AABO, K. et al. Interaction among two subpopulations of Ehrlich ascites tumor in vivo: Evidence of a contact mediated immune response. *Acta path. microbiol. immunol. scand. Sect. A.*, **95**: 325-32, 1987.
- _____. et al. Interaction between three subpopulations of Ehrlich ascites tumor and a P388 murine leukemia in mixed solid tumors in immune competent mice. *Acta path. microbiol. immunol. scand.*, **97(3)**: 212-20, 1989.
- APFFEL, C.A. et al. Recovery with immunity after serial tapping of transplantable mouse ascites tumours. *Br. J. Cancer*, **20**: 122-6, 1968.
- ATTIA, M.A.; DeOME, K.B.; WEISS, D.W. Immunology of spontaneous mammary carcinomas in mice. II. Resistance to a rapidly and a slowly developing tumor. *Cancer Res.*, **25**: 451-7, 1965.
- BARSKI, G. & YOUN, J.K. Evolution of cell-mediated immunity in mice bearing an antigenic tumor. Influence of tumor growth and surgical removal. *J. natn. Cancer Inst.*, **43**: 111-21, 1969.
- BASHFORD, E. et al. General results of propagation of malignant new growths. In: _____ et al. SCIENTIFIC REPORT ON THE INVESTIGATION OF THE IMPERIAL CANCER RESEARCH FUND, 3. 1908. *Anais*. London, Taylor and Francis, 1908. p.262-8. Apud MEISS, R.P. et al. Histologic aspects of concomitant resistance induced by nonimmunogenic murine tumors. *J. natn. Cancer Inst.*, **76**: 1163-75, 1986.
- De acordo com a NB66, de 1978 da associação Brasileira de normas Técnicas. Abreviatura dos periódicos de conformidade com o World List of Scientific Periodicals.

- BASFORD, E.F. & MURRAY, J.A. The significance of the zoological distribution, the nature on mitoses, and the transmissibility of cancer. *Br. med. J.*, 1: 269-71, 1904. Apud STEWART, H.L. et al. *Transplantable and transmissible tumors of animals: atlas of tumor pathology*. Washington, National Academy of Sciences, 1959. sec.12, fasc.40, p.11-29.
- BELLELLI, L. & SEZZI, M.L. C'3 participation in the rejection of some experimental tumors. *Oncology.*, 33: 215-8, 1976.
- BIDDISON, W.E. & PALMER, J.C. Development of tumor cell resistance to syngeneic cell-mediated cytotoxicity during growth of ascitic mastocytoma P 815-Y. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, 74: 329-35, 1977.
- BITTNER, J.J. A genetic study of transplantation of tumors arising hybrid mice. *Am. J. Cancer.*, 15: 2202-47, 1947.
- BLOOM, E.T. Quantitative detection of cytotoxic antibodies against tumor-specific antigens of murine sarcomas induced by 3-methylcholanthrene. *J. natn. Cancer Inst.*, 45: 443-53, 1970.
- BRASLAWSKY, G.; RAN, M; WITZ, I.P. Tumor bound immunoglobulins: the relationship between the in vivo coating of tumor cell by potentially cytotoxic anti-tumor antibodies, and the expression of immune complex receptors. *Int. J. Cancer.*, 18: 116-21, 1976.
- BURK, M.W.; YU, S.; MACKHANN, C.F. Tumor-specific immune responsiveness of tumor bearing host. *Israel J. med. Sci.*, 12(4/5): 360-8, 1976.
- BURNET, F.M. The concept of immunological surveillance. *Prog. exp. Tumor Res.*, 13: 1-27, 1970.

- CAMPBELL J. M.; CAMPBELL, J.B. Matemática em hematologia. In: **Matemática de laboratório aplicações médicas e biológicas.** _____ & _____. 3ed. São Paulo, Roca , 1986. cap. 11 pag. 185-215.
- CAMPBELL, P.N.; KERNOT, B.A.; ROITT, I.M. A comparison of the serum proteins of normal rats with those of rats bearing liver tumours. **Biochem. J.**, 71: 155-8, 1959.
- CHANDRADASA, K.D. The development and specific suppression of concomitant immunity in two syngeneic tumour-host systems. **Int. J. Cancer.**, 11: 648-62, 1973.
- CLARKE, H.G.M. & FREEMAN, T. A quantitative immunoelectrophoresis method (Laurell electrophoresis). **Protides biol. Fluids**, 14: 503, 1967.
- CLOUDMAN, A.M. Comparative study of transplantability of 8 mammary gland tumors arising in inbred mice. **Am. J. Cancer.**, 16: 568-630, 1932.
- DAWE, C.J. Comparative neoplasia. In: HOLLAND, J. F. & FREI III, E. **Cancer Medicine**. 2.ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1982. p.209.
- DECKERS, P.J. et al. The adoptive transfer of concomitant tumor immunity to murine tumor isografts with spleen cells from tumor bearing animals. **Cancer Res.**, 31: 734-42, 1971.
- _____. et al. The effect of tumor size on concomitant tumor immunity. **Cancer Res.**, 33: 33-9, 1973.
- _____. et al. The specificity of concomitant tumor immunity at large tumor volumes. **Cancer Res.**, 36: 3690-4, 1976.
- DONALDSON, D.M. & MITCHELL, J.R. Immunization against Ehrlich's ascites carcinoma with X-irradiated tumor cells. **Proc. Soc. exp. Biol. Med.**, 101: 204-7, 1959.

- DORVAL, G. et al. Tumor-bound immunoglobulins: an in vivo phenomenon of masked specificity. *J. natn. Cancer Inst.*, **56**: 523-7, 1976_a.
- _____. et. al. Tumor-bound immunoglobulins. I. Further analysis of the characteristics of binding of immunoglobulins to in vivo-grown tumor cells. *Int. J. Cancer*, **17**: 109-19, 1976_b.
- DUNHAM, L.J. & STEWART, H.L. A survey of transplantable and transmissible animal tumor. *J. natn. Cancer Inst.*, **29**: 1299-377, 1953.
- EHRlich, P. Experimentally carcinomstudien an mausen. *Arb. K. Inst. exp. Ther. Frankf. a. M.*, **1**: 78-80, 1906.
- ELLEM, K.A.O Studies on the mechanism of the cytotoxic action of antisera. *Aust. J. Sci.*, **20**: 116-7, 1957.
- ENG, C.P.; HINDMARSH, J.A.; MORGAN, J.F. Antigenic relationships of various fractions of the Ehrlich ascites tumor investigated by different immunoserological methods. *Can. J. Microbiol.*, **15**: 1085-90, 1969.
- _____; KLEINE, I.P.; _____. Tumor-specific immunity induce by nontumorigenic 6C3HED ascites tissue culture cell. *J. natn. Cancer Inst.*, **45**: 235-42, 1970.
- EVANS, R. & ALEXANDER, P. Cooperation of immune lymphoid cells with macrophages in tumour immunity. *Nature*, **228**: 620-2, 1970.
- _____. & _____. Mechanism of immunologically specific killer of tumor cells by macrophages. *Nature*, **236**(5343): 168-70, 1972. (Erratum. *Nature*, **237** (5349): 60, 1972).
- FISHER, B.; SAFFER, E.A.; FISHER, E.R. Comparison of concomitant and sinecomitant tumor immunity. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **135**: 68-76, 1970.

- FLAX, M.H. The action of anti-Ehrlich ascites tumor antibody. *Cancer Res.*, **16**: 774-83, 1956.
- FOLEY, E.J. Antigenic properties of methycholantrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res.*, **13**: 835-37, 1953.
- GERSHON, R.K. & KONDO, K. Dependence of concomitant tumor immunity on continued antigenic stimulation. *J. natn. Cancer Inst.*, **46**: 1169-75, 1971
- _____; CARTER, R.L.; _____. On concomitant immunity in tumour-bearing hamsters. *Nature*, **18**: 674-6, 1967.
- GLEASON, T.L. & FRIEDBERG, F. Filter-paper electrophoresis of serum proteins from small animals. *Physiol. Zoöl.*, **26**(2): 95-100, 1953.
- GOA, J. A micro biuret method for protein determination. Determination of total protein in cerebrospinal fluid. *Scand. J. clin. Lab. Invest.*, **5**: 218-22, 1953.
- GOLDBERG, B. & GREEN, H. The cytotoxic action of immune gamma globulin and complement on krebs ascites tumor cells. *J. exp. Med.*, **109**: 505-10, 1959.
- GORELIK, E. Resistance to tumor-bearing mice to a second tumor challenge. *Cancer Res.*, **43**: 138-45, 1983.
- _____; SEGAL, S.; FELDMAN, M. On the mechanism of tumor " concomitant immunity. *Int. J. Cancer*, **27**: 847-56, 1981.
- GORER, P.A. The role of antibodies in immunity to transplanted Leukemia in mice. *J. Path. Bact.*, **54**: 41-65, 1942.
- _____. The significance of studies with transplanted tumors. *Br. J. Cancer*, **2**: 103-7, 1947.
- _____. 1956_a. Apud GORELIK, E. Concomitant tumor immunity and the resistance to a second tumor challenge. *Adv. Cancer Res.*, **39**: 71-120, 1983.

- GORER, P. A. & AMOS, D.B. Passive immunity in mice against C57BL leukosiss E.L.4 by means of iso-immune serum. *Cancer Res.*, **16**: 338-43, 1956.
- GRABAR, P. & WILLIAMS, C.A. A method permitting the combined study of the electrophoretic and immunochemical propeties of a misture of proteins application to blood serum. *Biochem. biophys. Acta*, **10**: 193-4; 1953.
- GROSS, P.A. The specificity of acquired tumor immunity. *J. Immun.*, **50**: 91-9, 1945.
- _____. 1943. Apud OLD, L.J. & BOYSE, E.A. Immunology of experimental tumors. *A. Rev. Med.*, **15**: 167-86, 1964.
- GUERRA, J.L. Aspectos do processo inflamatório em camundongos portadores do tumor de Ehrlich. São Paulo, 1983. Tese (doutoramento) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-USP.
- HAAGENSEN, D.E. et al. Immunologic control of the ascites form of murine adenocarcinoma 755. I. Protection with syngeneic immune serum or lymphoid cells. *J. natn. Cancer Inst.*, **60**(1): 131-9, 1978.
- HANAU, A. Erfolgreiche experimentelle uebertragund von carcinom. *Fortschr. Med.* **7**: 321-39, 1889. Apud STEWART, H.L. et al. *Transplantable and transmissible tumors of animals: atlas of tumor pathology*. Washington, National Academy of Sciences, 1959. sec. 12, fasc. 40, p.11-29.
- HARTVEIT, F. The complement content of the serum of normal as opposed to tumour bearing mice. *Br. J. Cancer*, **24**: 714-20, 1970.
- _____. The survival time of mice with Ehrlich's ascites carcinoma related to the sex and weight of the mouse, and the blood content of the tumour. *Br. J. Cancer*, **15**: 336-41, 1961.
- HAUSCHKA, T.S. Cell population studies on mouse ascites tumors. *Tans. N. Y. Acad. Sci.*, **16**: 64-73, 1953.

- HAUSCHKA, T.S. Immunologic aspects of cancer: a review. *Cancer Res.*, 12(9): 615-33, 1952.
- _____. & LEVAN, A. Cytologic and functional characterization of single cell clones isolated from the Krebs-2 and Ehrlich ascites tumors. *J. natn. Cancer Inst.*, 21: 77-109, 1958.
- _____. & _____. Inverse relationship between chromosome ploidy and host-specificity of sixteen transplantable tumors. *Transplantable exp. Cell. Res.*, 4: 45-67, 1953.
- _____. et al. Immunoselection of polyploides from predominancy diploid cell population. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 63: 683-707, 1955/1956.
- HJERTÉN, S. Agarose as an anticonvection agent in zone electrophoresis. *Biochem. biophys. Acta*, 53: 514-7, 1961.
- HORN, E.C. Ascites tumor development. II cytotoxicity of various antisera prepared against Ehrlich ascites tumor cell components. *Cancer Res.*, 16: 595-9, 1956
- HSU, T.C. Reduction of transplantability of Novikoff hepatoma cells grown in vitro and the consequent protecting effect to the host against their malignant progenitor. *J. natn. Cancer Inst.*, 25(5): 927-35, 1960.
- ISA, A.M. & SANDERS, B.R. Enhancement of tumor growth in allogeneic mice following impairment of macrophage function. *Transplantation*, 20: 296-302, 1975.
- ISING, V. Chromosome studies in Ehrlich mouse ascites cancer after heterologous transplantation through Hamsters. *Br. J. Cancer*, 9: 592-9, 1955.
- KALISS, N. The transplanted tumor as a research tool in cancer immunology. *Cancer Res.*, 21: 1203-8, 1961.

- KANEKO, Y.; NITTA, K. ; UMEZAWA, H. A kinetic aspect of the antibody production against Ehrlich tumor cells in mice bearing Ehrlich solid tumor. *Gann*, **66**(5): 573-5 1975.
- KAZIWARA, K. Derivation of stable polyploid sublines from a hyperdiploid Ehrlich ascites carcinoma. *Cancer Res.*, **14**(11): 795-801, 1954.
- KLEIN, E. & SJOGREEN, H.O. Humoral and cellular factors in homograft and isograft immunity against sarcoma cells. *Cancer Res.*, **20**: 452-61, 1960.
- LAEMMLI, V.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-6, 1970.
- LANGONE, J.J.; BOYLE, M.D.P.; BORSOS, T. Complement-dependent cytotoxic antitumor antibody. I. Immunoglobulin class determined by interaction with protein A or concanavalin A. *J. natn. Cancer Inst.*, **60**(2): 411-8, 1978.
- LAURELL, C.B. Quantitative estimation of protein by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Analyt. Biochem.*, **15**: 45-52, 1966.
- LEBLANC, U. Recherches sur le cancer des animaux. *Rec. Med. vét.*, **35**: 769-83: 902-16, 1858. Apud STEWART, H.L. et al. *Transplantable and transmissible tumors of animals: atlas of tumor pathology*. Washington, National Academy of Sciences, 1959. sec. 12, fasc. 40, p.11-29.
- LEIDY, J. Remarks on transplantation of animal tissue. *Proc. Acad. nat. Sci. Philad.*, **5**: 201-12, 1851. Apud STEWART, H.L. et al. *Transplantable and transmissible tumors of animals: atlas of tumor pathology*. Washington, National Academy of Sciences, 1959. sec. 12, fasc. 40, p.11-29.
- LEVAN, A. Chromosomes in cancer tissue. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **63**(5): 774-89, 1956.
- _____ & BIESELE, J.J. Role of chromosomes in cancerogenesis as studied in serial tissue culture of mamalian cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **71**: 1022-53, 1958.

- LEWIS, M. & APTEKAMAN, P. *Cancer*, **5**: 411-3, 1952. Apud GORELIK, E. Concomitant tumor immunity and the resistance to a second tumor challenge. *Adv. Cancer Res.*, **39**: 71-120, 1952..
- LITTMAN, M.L.; KIM, Y.C.; SUK D. Immunization of mice to Sarcoma 180 and Ehrlich carcinoma with ultraviolet-killed tumor vaccine. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **127**: 7-17, 1968.
- LOEWENTHAL, H. & JAHN, G. Übertragungsversuche mit carcinomatöser mäuse ascitesflüssigkeit und ihr verhalten gegen physikalische und chemische einwirkungen. *Z. Krebsforsch.*, **37**: 439-47, 1932.
- LUCKÉ, B. Foreword. In: DUNHAM, L.J. & STEWART, H.L. A survey of transplantable and transmissible animal tumor. *J. natn. Cancer Inst.*, **29**: 1299-377, 1953.
- MacDOWELL, E.C. The influence of transplantation upon immunological properties of Leukemic cells. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, **25**: 416-20, 1939.
- _____. Variation in leukemic cells of mice. *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.*, **11**: 156-74, 1946.
- McFADYEAM, J. The occurrence of tumours in the domesticated animals. *J. comp. Path. Ther.*, **3**: 35-45, 1890. Apud STEWART, H.L. et al. *Transplantable and transmissible tumors of animals: atlas of tumor pathology*. Washington, National Academy of Sciences, 1959. sec.12, fasc.40, p.11-29.
- MANCINI, G.; CARBONARA, A.O.; HEREMANS, J.F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*, **2**: 235, 1965.
- MARUSIC, M. Immune mechanisms in Ehrlich ascites tumor growth in mice. *Eur. J. Cancer*, **15**: 39-45, 1979.
- _____. Transfer of immunity by transfer of bone marrow cell: T-cell dependency. *Cell. Immunol.*, **38**: 440-8, 1978.

- MAZUREK, C. & DUPLAN, J.F. Etudes sur l'immunité provoquée contre la tumeur d'Ehrlich. *Acta Un. int. Cancr.*, **19**: 124-7, 1963.
- MEISS, R.P. et al. Histologic aspects of concomitant resistance induced by nonimmunogenic murine tumors. *J. natn. Cancer Inst.*, **76**: 1163-75, 1986.
- MIDER, G.G.; ALLENG, E.L.; MORTN, J.J. 1950. Apud WINZLER, R.J. Plasma proteins in cancer. *Adv. Cancer Res.*, **1**: 503-47, 1953.
- MOAU, N. & WITZ, J.P. Characterization of immunoglobulins eluted from murine tumor cells: Binding patterns of cytotoxic anti-tumor IgG. *J. Immunol. Meth.*, **22**: 51-62, 1978.
- MORAU, H. Recherches expérimentales sur la transmissibilité de certains néoplasmes. *Archs. Méd. exp. Anat. path.*, **6**: 677-705, 1894. Apud STEWART, H.L. et al. *Transplantable and transmissible tumors of animals: atlas of tumor pathology*. Washington, National Academy of Sciences, 1959. sec.12, fasc.40, p.11-29.
- MORGAN, J.F. et al. Loss of transplantability and induction of immunoprotection by mouse ascites tumor cells in tissue culture (34782). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **134**: 305-8, 1970.
- NEEL III, H.B. & RITTS, R.E. Transfer of tumor-specific immunity with syngeneic spleen cells and serum from mice that have large tumors and metastases. *Cancer*, **40**(4): 1643-9, 1977.
- NOWELL, P.C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, **194**(1): 23-8, 1976.
- OLD, L.J.; CLARKE, D.A.; BENACEERRAF, B. Effect of Bacillus Calmette-Guérin infection on transplanted tumours in the mouse. *Nature*, **184**: 291, 1959.
- OLIVEIRA, A.R. Considerações sobre anti-soros obtidos pela técnica de injeção de antígenos no linfonodulo. *Summ. Phytopath.*, **1**(1): 61-64, 1975.

- OUCHTERLONY, O. Antigen-antibody reactions in gles. *Ark. Kemi. Geol.*, **266**: 14, 1949.
- PAPPENHEIMER, A.M. Experimental studies upon lymphocytes. I. The reactions of lymphocytes under various experimental conditions. *J. exp. Med.*, **25**: 633-50, 1917.
- PEYRILHE, B. A dissertation on cancerous diseases, London, St. Paul'Church-yard, 1777. Apud STEWART, H.L. et al. *Transplantable and transmissible tumors of animals: atlas of tumor pathology*. Washington, National Academy of Sciences, 1959. sec.12, fasc.40, p.11-29.
- PIROSKY, R.R. & OISGOLD, S.R. Espectro immunoelectroforetico del suero de ratones portadores de tumor. I tumor de metilcolantreno en transplante isologo. *Revta Soc. argent. Biol.*, **37**: 296-307, 1961_a.
- PIROSKY, R.R. & OISGOLD, S.R. Espectro immunoelectroforetico del suero de ratones portadores de tumores de transplante. II Sarcoma 180. *Revta Soc. argent. Biol.*, **37**: 308-15, 1961_b.
- _____ & _____. The sequence of mouse serum protein changes during the progressing growth of a spontaneous mammary tumour and of the same tumour grafted in isologous system. *Br. J. Cancer*, **18**(1): 165-71, 1964.
- PORTA, C.; VILLA M.L.; CLERICI, E. Immunoaderence and complement in cancer-bearing mice. *Br. J. Cancer*, **37**: 23-7, 1978.
- PREHN, R.T. & MAIN, J.M. Immunity to methylcholantrene-induced Sarcomas. *J. natn. Cancer Inst.*, **18**(6): 769-75, 1957.
- RAN, M.; KLEIN G.; WITZ, I.P. Tumo-bound immunoglobulins evidence for the in vivo coating of tumor cells by potentially cytotoxic anti-tumor antibodies. *Int. J. Cancer*, **17**: 90-7, 1976.

- ROBINS, R.A. Serum antibody responses to an ascitic variant of rat hepatoma D23. *Br. J. Cancer*, **32**: 21-7, 1975.
- RUGGIERO, R.A. et al. "Concomitant immunity" in murine tumours of non-detectable immunogenicity. *Br. J. Cancer*, **51**: 37- 48 1985.
- _____. et al. Correlation between seric antitumor activity and concomitant resistance in mice bearing nonimmunogenic tumors. *Cancer Res.*, **50**: 7159-65, 1990.
- RYGAARD, J. & POVLSEN, C.O. Is immunological surveillance not a cell-mediated immune function. *Transplantation*, **17** (1): 135-6, 1974.
- SACHS, L. & GALLILYZ, R. The chromosomes and transplantability of tumors. I. Fundamental chromosome numbers and strain specificity in ascites tumors. *J. natn. Cancer Inst.*, **15** (5): 1267-89, 1955.
- SAKAMOTO, M. & NISHIOKA, K. Studies on rat complement. II. Complement level in experimental tumor in rats. *Jap. J. exp. Med.*, **45**(3): 191-8, 1975.
- SIEGLER, R. & KOPROWSKA I. Host responses to a transplantable "Ascitic " tumor. *Cancer Res.*, **22**: 1278-83, 1962_a.
- _____. & _____. Mechanism of an ascites tumor formation. *Cancer Res.*, **22**: 1273-77, 1962_b.
- SIMPKINS, M.G. 1993 Comunicação pessoal
- SNELL, G. 1948. Apud GORELIK, E. Concomitant tumor immunity and the resistance to a second tumor challenge. *Adv. Cancer Res.*, **39**: 71-120, 1983.
- _____. 1953. Apud. GORELIK, E. Concomitant tumor immunity and the resistance to a second tumor challenge. *Adv. Cancer Res.*, **39**: 71-120, 1983.

- STEWART, H.L. et al. **Transplantable and transmissible tumors of animals: atlas of tumor pathology.** Washington, National Academy of Sciences, 1959. sec.12, fasc.40, p.11-29.
- STICKER, A. Über den Krebs der thiere insbesondere über die empfänglichkeit der verschiedenen: hausthierarten und über die unterschiede des thier und menschenkrebses. *Arch. klin. Chir.*, 65: 616-96; 1023-1087, 1902. Apud STEWART, H.L. et al. **Transplantable and transmissible tumors of animals: atlas of tumor pathology.** Washington, National Academy of Sciences, 1959. sec. 12, fasc.40, p.11-29.
- STRONG, L.C. Changes in the reaction potencial of a tanspalntable tumor. *J. exp. Med.*, 43: 713-24, 1926_a.
- _____. On the occurrence of mutations within transplantable neoplasmas. *Genetics*, 11: 294-303, 1926_b.
- SUGIURA, K. Tumor transplantation. *Meth. Anim. exp.*, 2 : 171-222, 1965.
- SÝKORA, I. The ascitic tumour cell and its growth. *Neoplasma*, 8(4): 395-402, 1961.
- THOMAS, L. Discussion. In: LAWRENCE, H.S., ed. **Cellular and humoral aspects of the hypersensitive state.** New York, Harper, 1959. p.529. Apud BURNET, F.M. The concept of immunological surveillance. *Prog. exp. Tumor Res.*, 13: 1-27, 1970.
- THUNOLD, S. Acquired immunity after surgical removal of subcutaneous Ehrlich's ascites carcinoma. *Acta path. microbiol. scand.*, 71: 564-574, 1967_a.
- _____. Globulin coating in vivo of Ehrlich's ascites carcinoma cells. *Transplantation*, 6(5): 716-27, 1968_b.
- _____. Local cellular reactions and splenic weight changes in mice with Ehrlich's ascites carcinoma. *Acta path. microbiol. scand.*, 72: 542-52, 1968_a.

- THUNOLD, S. Sex differences in tumour growth and lymphoid reactions in mice with Ehrlich's ascites carcinoma. *Acta path. microbiol. scand.*, 69: 521-33, 1967_b.
- TIJO, H.J. & LEVAN, A. Comparative idiogram analysis of the rat and Yoshida rat sarcoma. *Hereditas*, 42: 218-4, 1956.
- TIMONEN, S. Mitosis in normal endometrium and genetical cancer. *Acta obstet. gynec. scand.*, 31(2): 1-88, 1950.
- UHLENHUTH, H. & STEFFENHAGEM, 1910, Apud WOGLOM, W.H. Immunity to transplantable tumours. *Cancer Rev.*, 4(3-4): 129-203, 1929.
- UYTTENHOVE, C.; MARYANSKI J.; BOON T. Escape of mouse mastocytoma P815 after nearly complete rejection is due to antigen-loss variants rather than immunosuppression. *J. exp. Med.*, 157: 1040-52, 1983.
- VAAGE, J. Concomitant immunity and specific depression of immunity by residual or reinjected tumor tissue. *Cancer Res.*, 31: 1655-62, 1971.
- VIEIRA, M.L.C. **Estudos de associação de cromossomos acrocêntricos humanos em indivíduos de variantes s⁺**. Curitiba, 1980. Tese (mestrado) Universidade Federal do Paraná.
- VIEIRA, S. *Introdução à bioestatística*. 2.ed. Rio de Janeiro, Campus, 1991.
- WESTON, B.J. The thymus and immune surveillance. In: DAVIES, A.J. & CARTER, R.L., ed. *Contemporary topics in immunology*. New York, Plenum, 1973. v.2, p. 237-52.
- WINZLER, R.J. Plasma proteins in cancer. *Adv. Cancer Res.*, 1: 503-47, 1953.
- ZOLLER, M.; PRICE, M.R.; BALDWIN, R.W. Cell-mediated cytotoxicity to chemically induced rat tumours. *Int. J. Cancer*, 16: 593-606, 1975.

APÊNDICE

APÊNDICE

1. Obtenção da concentração padrão das amostras utilizadas, através do uso da câmara de Newbauer, segundo CAMPBELL & CAMPBELL (1986).

A contagem foi feita em câmara de Newbauer, levando-se em conta os quadrados externos correspondentes à contagem de leucócitos. As células coradas em azul foram consideradas não viáveis (denotando estar inativo o seu sistema de permeabilidade seletiva) sendo portanto, desprezadas. A fórmula final para a determinação do número de células viáveis seguiu-se de acordo com o esquema abaixo.

$$\frac{\text{N. cels. da suspensão}}{\text{ml}} = \text{n. cels. contadas} \times \text{fator final}$$

sendo que:

$$\text{Fator final} = \frac{\text{fator de profundidade} \times \text{fator de diluição}}{\text{área contada}}$$

onde:

| | |
|-----------------------|-------|
| Fator de profundidade | = 10 |
| Fator de diluição | =100 |
| área contada | =4mm |
| mm para ml. | =1000 |

assim:

$$\text{Fator final} = 2,5 \times 10^5 \text{ células por ml}$$

2. Eletroforese.

2.1. Eletroforese em gel de agarose.

A eletroforese foi realizada em placas de agarose Celmgel (Comercial CELM), onde foram aplicados com o auxílio do aplicador CELMEGEM 0,6 microlitros do soro no filme de agarose. A corrida eletroforética foi feita utilizando o tampão Veronal/EDTA 0,05M - pH 8.6 e processou-se a temperatura ambiente, durante 30 minutos em cuba apropriada modelo Corning a 90 volts. constante. Ao término da corrida a placa foi seca em estufa a 45°C. por 24 horas e em seguida corada em amido black 2% e posteriormente descorada em ácido acético 10%.

2.1.1. Solução tampão.

| | |
|--|-----------|
| Dietilbarbiturato de sódio | 10,30g |
| Ácido Etilenodiaminotetraácetico (EDTA)..... | 0,35g |
| Água q.s.p..... | 1000,00ml |
| pH..... | 8.6 |

2.1.2. Solução corante..

| | |
|-----------------------|----------|
| Amido-Black..... | 0,02g |
| Ácido acético 7%..... | 100,00ml |

2.1.3. Solução descorante.

| | |
|--------------------------|----|
| Ácido acético (v/v)..... | 7% |
|--------------------------|----|

2.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida.

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida-Duodecil sulfato de sódio (PAGE-SDS), foi feita segundo LAEMMLI (1970), em sistema descontínuo de

tampão 0,025M e TRIS e 0,192M de Glicina e 0,1% de SDS em pH 8.3 (LAEMMLI, 1970) com gel separador 2,5% e o gel espaçador 7,5%.

Aproximadamente 15 microlitros de soro diluído 1/17 em solução fisiológica foram solubilizados em mistura dissociante descrito por LAEMMLI (1970). As proteínas foram dissociadas em imersão em água à 100°C por 3 minutos. A eletroforese (PAGE-SDS), processou-se em temperatura ambiente a 100 volts em corrente constante de 20 mA, até que o marcador (Bromofenol Blue) atingisse o final do gel. Após a corrida, o gel foi removido da placa e corado em Coomassie Blue-250 0,1% por 2 horas. A lavagem (descoloração) do gel foi feita usando-se solução descorante.

2.2.1. Soluções estoque.

| | (A) |
|--------------|------------|
| HCl (1N) | 48,00 ml |
| Tris | 36,60 g |
| Temed | 0,23 ml |
| água q.s. p. | 1000,00 ml |
| pH | 8.9 |

| | (B) |
|-------------|-----------|
| HCl (1N) | 48,00 ml |
| Tris | 5,98 g |
| Temed | 0,46 ml |
| água q.s.p. | 100,00 ml |
| pH | 6.7 |

| | (C) |
|----------------|-----------|
| Acrilamida | 28,00 g |
| Bis-Acrilamida | 0,80 g |
| água | 100,00 ml |

| | (D) |
|----------------|-----------|
| Acrilamida | 10,00 g |
| Bis-acrilamida | 2,50 g |
| água | 100,00 ml |

| | (E) | | (F) |
|-------------|-----------|-----------------|-----------|
| Riboflavina | 4,00 g | Persulfato de K | 0,166 g |
| água | 100,00 ml | água | 100,00 ml |

2.2.2. Solução Tampão para Corrida (10x).

| | |
|--------------|-----------|
| Tris..... | 6,0g |
| Glicina..... | 28,80g |
| Água..... | 1000,00ml |
| pH..... | 8.3 |

2.2.3. Solução corante.

| | |
|----------------------------|----------|
| Coomassie Blue G-250 | 0,10g |
| Metanol | 25,00ml |
| Acido acético..... | 7,0 ml |
| Água q.s.p. | 100,00ml |

2.2.4. Solução para Descoloração e Estoque do Gel.

| | |
|--------------------|----------|
| Metanol | 25,00ml |
| Ácido acético..... | 7,0 ml |
| Água q.s.p. | 100,00ml |

3. Testes sorológicos

3.1. Imunoeletroforese.

Testes sorológicos de imunoeletroforese com soro de coelho anti-Ig de camundongo total, obtido conforme descrito no material método (item 3.3. e 3.4.) em reação com o soro individual e "pool" de camundongos (Antígenos) submetido ao carcinoma de Ehrlich/linha 1-G, apresentando crescimento ascítico (EAT₁) e sólido (EAT₁-P e EAT₁-D) e seus respectivos controles, obtidos nos períodos de 7 e 13 dias e testes de imunoeletroforese com Ig de carneiro anti-Ig total de camundongo (W.L. Imunoquímica IM: 203.3), em reação com "pool" de soro de camundongo (Antígeno) portando tumor na forma sólida EAT-P (linhas 1-G e 2-S) e na forma ascítica EAT (linha 1-G) e seus respectivos controles, obtidos nos períodos de 7 e 13 dias. Ambos os testes foram realizados em agarose a 1,5% em tampão Barbital pH 8.6 a 0,04M (GRABAR & WILLIAMAS, 1953).

Aproximadamente 20 microlitros de soro (Antígeno) diluído 1/5 em solução fisiológica foram submetidos a imunoeletroforese com 100 microlitros de anti-soro (soro de coelho anti-Ig de camundongo total e soro de carneiro anti-Ig total de camundongo-IM:103).

A imunoeletroforese foi realizada em cuba de eletroforese apropriada contendo Tampão Barbital pH 8.6 a 0,04M a 10mA por lâmina por um período de 90 minutos, onde procedeu-se a separação eletroforética do antígeno. Ao término da corrida, adicionou-se 100 microlitros de anti-soro comercial ou 100 microlitros de anti-soro produzido no laboratório (item 3.3. e 3.4.), na canaleta central, para a segunda etapa da reação. A secagem do gel foi realizada com papel de filtro. Posteriormente, as lâminas foram coradas com Amido-Black 0,02% e descoradas em ácido acético 7%.

3.1.1. Gel de agarose 1,5%.

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| Agarose | 1,50g |
| Tampão Barbital pH 8.6 0,04M..... | 100,00ml. |

3.1.2. Solução Tampão para corrida.

| | |
|----------------------------------|-----------|
| Azida sódica | 2,0 g. |
| Ácido dietilbarbiturico | 1,60g. |
| Dietilbarbiturato de sódico..... | 8,24g |
| Água q.s.p. | 1000,00ml |
| pH..... | 8.6 |

3.1.3. Solução corante e descorante, ver item 2.1.2. e 2.1.3.

3.2. Imunodifusão radial simples.

Testes de imunodifusão radial simples foram realizados em agarose a 1% com tampão Barbital pH 8.6 à 0,04M (GRABAR & WILLIAMAS, 1953), com "pool" de soro de camundongos (Ag) portando tumor na forma sólida EAT-P (linhas 1-G e 2-S) e na forma ascítica EAT (linha 2-S) e seus respectivos controles. (item 3.1.).

Aproximadamente 250 microlitros de Ig de carneiro anti-IgG de camundongo (W.L. Imunoquímica IM; 306.1) foram adicionados a 15ml de agarose 1,5% (mantida em B.M. à 55°C), na proporção de 16 microlitros de anti-soro/cm² de agarose, distribuída em lâmina de 100 x 100 mm. Posteriormente à adição de 20 microlitro do antígeno diluído 1/4 nos orifícios a placa permaneceu difundindo em câmara úmida por um período de 48 horas, seguido de lavagem com solução de NaCl 0,15M sob agitação branda e constante. A secagem do gel foi realizada com papel filtro a T.A. ou a 37°C ou

de forma direta com secador. Posteriormente o gel foi corado em amido black, e em seguida descorado (ver preparo da agarose e do tampão item 3.1.1. e 3.1.2. e solução corante e descorante item 2.1.2. e 2.1.3.).

3.3. Eletroforese em foguete (Rocket).

Testes de eletroforese em foguete com anti-soro anti-complemento C3c (Nordic & Immunology GAM/C3c) foram realizados em agarose a 1% com tampão Tris/Barbitone pH 8.6 a 0,49 M (LAURELL, 1966) em reação com soro de camundongos portadores de tumor na forma sólida EAT-P (linhas 1-G e 2-S) e na forma ascítica EAT (linha 1-G) e seus respectivos controles, obtidos conforme descrito no material e método (item 3.1).

Aproximadamente 150 microlitros de anti-soro anti-complemento C3c de camundongo, foram adicionados a 15ml de agarose 1% (mantida em B.M. a 55°C), na proporção de 10 microlitros de soro/cm² de agarose, distribuído em lâminas de 100 x 100 mm, usando-se moldura (frame) apropriado. Posteriormente à adição de 20 microlitro das amostras diluídas 1/30 em Tampão Tris/Barbitone pH 8.6 a 0,49M, estas permaneceram no aparelho de eletroforese sob resfriamento. A eletroforese permaneceu "over-night" em tampão Tris/Barbitone pH 8.6 ajustando-se o potencial gradiente no gel de 1.5 - 2.0 volts/cm², utilizando-se voltímetro adequado. Ao término da eletroforese, submeteu-se o gel à pressão ou lavagem com salina a 0,15M, procedendo-se posteriormente a secagem direta com secador ou com papel filtro a T.A. ou a 37°C. Após 48 horas o gel foi corado em "Coomasie Blue" em seguida descorado. (Ver preparo de substâncias abaixo).

3.2.1. Gel de agarose 1%.

| | |
|-----------------------------|----------|
| Agarose..... | 1,0 g |
| Tampão Tris/Barbitone | 100,00ml |

3.2.2. Tampão para corrida.

| | |
|---|------------|
| Tris | 44,30g. |
| Barbitone (ácido dietilbarbiturato) | 22,40g. |
| Lactato de cálcio | 0,53g |
| Azida sódica | 1,00g |
| Água q.s.p. | 1000,00ml. |
| pH..... | 8.6 |

Diluir 1 + 4 antes do uso.

3.2.3. Solução corante.

| | |
|-------------------------------|-----------|
| Coomassie Brilhante Blue..... | 5,00g. |
| Etanol 96% | 450,00ml. |
| Ácido acético | 100,00ml. |
| Água..... | 450,00ml. |

3.2.4. Solução descorante, ver item 2.1.3.

7. Preparo citológico da amostra e coloração das lâminas para contagem dos cromossomos.

O volume ascítico total obtido do animal foi transferido para tubos de centrifuga e estes foram centrifugadas à 900 r.p.m. por 5 minutos (centrifuga Excelsa BAB Y). Em seguida, ao sedimento total foi adicionado 1 ml de solução hipotônica de KCl (0,075M à 37°C) e após ressuspender lentamente, adicionou-se mais 5 ml

permanecendo em repouso por 10 minutos. Em seguida centrifugou-se novamente e o sobrenadante foi fixado com metanol e ácido acético (na proporção de 3:1). De início, colocou-se 1 ml de fixador e após ressuspensão completou-se com mais 5 ml, ressuspendendo novamente. Procedeu-se a nova centrifugação, e ao precipitado foi acrescentado 5 ml de fixador, seguida de ressuspensão, permanecendo por 60 minutos a 10°C em geladeira. Decorridos o tempo de fixação, as amostras foram centrifugadas e ao sedimento adicionou-se 0,5 ml de fixador. Em seguida, procedeu-se a distribuição do material nas lâminas permitindo-as secarem naturalmente (cf. VIEIRA, 1980). Usou-se lâminas previamente limpas, imersas em álcool etílico absoluto comercial e mantidas na geladeira. Depois de secas as lâminas foram cobertas com uma solução de orceína acética (orceína acética 2% + ácido acético 60% cf. ISING, 1955). Passados 5 minutos as lâminas foram lavadas e deixadas secarem, rotuladas e fotografada em imersão, com o auxílio de um microscópio Olympus Pan F. Para a contagem selecionou-se somente células com um citoplasma de contorno arredondado, indicativo de que nenhum cromossomo escapou da célula durante o procedimento de preparo.

Tabela 10 - Análise de variância da espessura (mm) da parte central do coxim plantar posterior de camundongos implantados com EAT linhagem 1-G, em função do número de células e dias da inoculação.

| CAUSAS DE VARIAÇÃO | GL | SQ | QM | F |
|--------------------|-----|----------|---------|--------|
| Grupos | 3 | 57.1784 | 19.0594 | 36.92 |
| Resíduo (a) | 16 | 8.2592 | 0.5162 | |
| Camundongos | 19 | 65.4377 | | |
| Dias | 8 | 108.9828 | 13.6228 | 544.53 |
| Grupos x dias | 24 | 11.2316 | 0.4679 | 18.70 |
| Resíduo (b) | 128 | 3.2022 | 0.0250 | |
| Sub-total | 160 | 123.4167 | | |
| Total | 179 | 188.8544 | | |

Tabela 11 - Análise de variância da espessura (mm) da parte central do coxim plantar posterior de camundongos implantados com EAT linhagem 2-S, em função do número de células inoculadas e dias da inoculação.

| CAUSAS DE VARIAÇÃO | GL | SQ | QM | F |
|--------------------|-----|----------|---------|--------|
| Grupos | 3 | 63.1823 | 21.0608 | 74.57 |
| Resíduo (a) | 16 | 4.5183 | 0.2824 | |
| Camundongos | 19 | 67.7006 | | |
| Dias | 8 | 139.4239 | 17.4279 | 833.03 |
| Grupos x dias | 24 | 7.7535 | 0.3230 | 15.44 |
| Resíduo (b) | 128 | 2.6779 | 0.0209 | |
| Sub-total | 160 | 149.8553 | | |
| Total | 179 | 217.5560 | | |

Tabela 12 - Análise de variância da espessura (mm) do coxim plantar posterior de camundongos reinoculados com 10^6 células do EAT linhagem 1-G, em função do número de células e dias da inoculação.

| CAUSAS DE VARIÇÃO | GL | SQ | QM | F |
|-------------------|-----|---------|--------|--------|
| Grupos | 1 | 0.1537 | 0.1537 | 0.22 |
| Resíduo (a) | 18 | 12.2113 | 0.6784 | |
| Camundongos | 19 | 12.3650 | | |
| Dias | 8 | 40.5563 | 5.0695 | 115.11 |
| Grupos x dias | 8 | 0.2371 | 0.0296 | 0.67 |
| Resíduo (b) | 144 | 6.3413 | 0.0440 | |
| Sub-total | 160 | 47.1347 | | |
| Total | 179 | 59.4998 | | |

Tabela 13 - Análise de variância da espessura (mm) da parte central do coxim plantar de camundongos reinoculados com 10^6 células do EA /linhagem 2-S, em função do número de células inoculadas e dias da inoculação.

| CAUSAS DE VARIACÃO | GL | SQ | QM | F |
|--------------------|-----|----------|--------|--------|
| Grupos | 1 | 3.7468 | 3.7468 | 3.46 |
| Resíduo (a) | 18 | 19.4920 | 1.0828 | |
| Camundongos | 19 | 23.2389 | | |
| Dias | 8 | 73.0888 | 9.1361 | 120.28 |
| Grupos x dias | 8 | 3.2926 | 0.4115 | 5.41 |
| Resíduo (b) | 144 | 10.9376 | 0.0759 | |
| Sub-total | 160 | 87.3190 | | |
| Total | 179 | 110.5580 | | |