

Imunoterapia Ativa Específica e Imunoquimioterapia Adotiva em Tumores Experimentais. Ação da "Interleukin-2"

H. CASTRO FARIA

*Chefe do Centro de Pesquisa Básica do Instituto Nacional do Câncer
— RJ*

R.M. GOMES

N.F. GRYNBERG

A.S.R. SOUZA

S.R. SALMAU

L.A. ABREU

Pesquisadores do Centro de Pesquisa Básica do Instituto Nacional do Câncer — RJ

RESUMO

Uma preparação de proteínas de membrana plasmática de células tumorais obtida por processo original de vesiculação de membrana celular é usada como antígeno específico do tumor.

Em sistema singênico protegeu 80% dos camundongos contra inóculo tumoral.

Inóculo tumoral já estabelecido, em início de crescimento, é curado em 70 a 80% com inoculação de antígeno de membrana com adjuvante, em tumores experimentais de camundongo.

A imunoterapia adotiva específica, isto é, a transferência de linfócitos pré-sensibilizados, não protegeu camundongos contra tumor já desenvolvido.

A imunoquimioterapia adotiva, transferência de linfócitos de baço de animal imunizados pelo tumor + 1 dose de ciclofosfamida foi eficiente, curando 80% dos animais com tumor singênico já estabelecido, sendo que a ciclofosfamida apenas retarda temporariamente o crescimento tumoral.

Este projeto não tem aplicação clínica, pois para o doente não se dispõe de linfócitos isogênicos sensibilizados especificamente contra seu câncer. Está sendo tentada a substituição de linfócitos T sensibilizados por "Interleukin-2" + ciclofosfamida. A "Interleukin-2" é obtida in vitro por ação de macrófago + linfócito T helper + concanavalina A.

Experiências preliminares em tumores experimentais deram nítido retardamento do crescimento dos mesmos.

Este produto está sendo purificado e concentrado e produzido especificamente com antígeno do próprio tumor.

INTRODUÇÃO

Admite-se hoje que a membrana plasmática da célula de tumores espontâneos ou induzidos contém pelo menos três tipos de antígenos de reconhecimento: antígeno próprio da espécie animal, antígeno fetal e antígeno tumor específico.

Apesar do sistema imuno-competente do hospedeiro manifestar reação imunológica específica contra tumor, este pode ter o seu crescimento acelerado (*enhancement* tumoral), retardado ou até mesmo abolido. Supõe-se que estes eventos dependem de um equilíbrio de sistemas opostos, modulados por T citotóxico efetor (T Killer) e sistema inibidor desta atividade (T supressor), sendo o efeito mediado por T *helper*, macrófagos e células B produtoras de anticorpos.

O controle imunológico do crescimento de tumores experimentais vem sendo estuda-

do há alguns anos no Laboratório de Pesquisa do INCa.

O presente trabalho relata sumariamente as diversas etapas já vencidas e o que no momento se está tentando elucidar.

Imunização específica com antígeno de membrana de células de tumores experimentais. Prevenção e tratamento de camundongos e ratos contra tumores quimicamente induzidos

Por processo original de nosso Laboratório é preparado o antígeno de membrana plasmática de células tumorais sem contaminação com organelas celulares (6, 7).

Esta proteína antigênica de membrana confere imunoproteção específica contra o tumor no animal inoculado, em sistema singênico, sem o aparecimento do fenômeno de *enhancement*.

A obtenção do antígeno é conseguida por vesiculação

da membrana da célula quando posta em solução de glicerina a 40% em presença do íon CA^{++} . As vesículas formadas (Fig. 1A) são liberadas, sem romper a célula, em homogenizador tipo Potter (Fig. 1B), sendo isoladas por centrifugação em gradiente de sacarose e suspensas em solução fisiológica (Fig. 1C). Todas estas operações são seguidas por microscopia de fase.

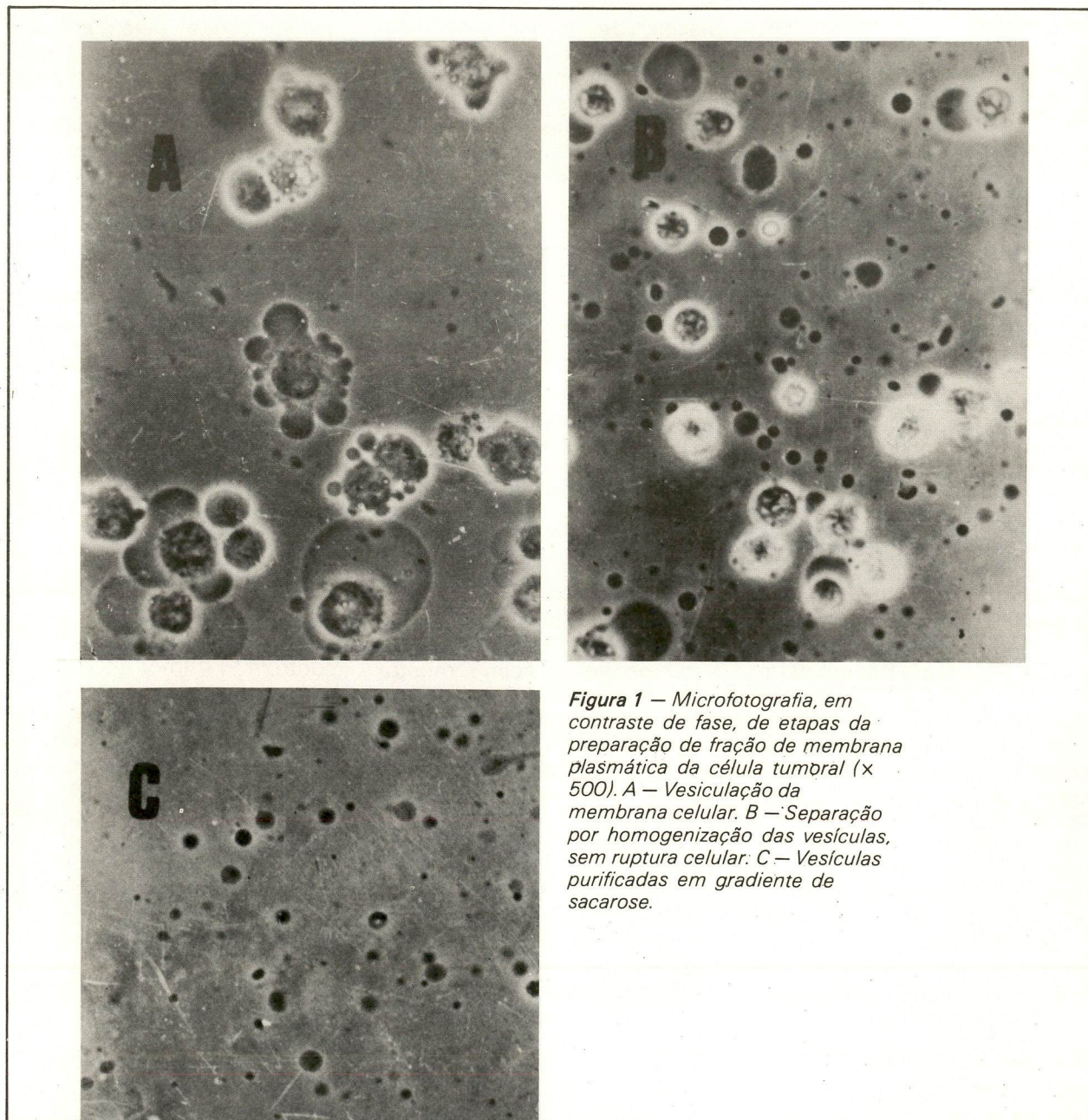


Figura 1 — Microfotografia, em contraste de fase, de etapas da preparação de fração de membrana plasmática da célula tumoral ($\times 500$). A — Vesiculação da membrana celular. B — Separação por homogenização das vesículas, sem ruptura celular. C — Vesículas purificadas em gradiente de sacarose.

A pureza da preparação, a sua não contaminação com resíduos nucleares, mitocôndrias, lisosomas e retículo endoplasmático foi controlada por dosagens de enzimas marcadoras das diversas organelas e por microscopia eletrônica.

Sua ação imunogênica é potencializada por adjuvantes. Foram usados o adjuvante de Freund completo ou a fração P40 de *Corynebacterium granulorum*.

Em camundongo isogênico a injeção s.c. de 400µg de proteína da fração antigênica com adjuvante de Freund, em intervalo de sete dias, protege 60 a 100% dos animais contra a inoculação de 7×10^5 células tumorais singênicas feita 10 dias após a última dose de antígeno. Em todos os animais-controle, que só receberam o adjuvante, o inóculo tumoral cresceu normalmente.

Experiências similares feitas com tumor sólido de rato, também em sistema singênico, forneceram resultados semelhantes.

Com tumores de simplificação antigênica, que crescem em qualquer estirpe de camundongos, como o tumor ascítico de Ehrlich, a eficiência de proteção com o antígeno de membrana variou com o genótipo do animal usado: 100% de proteção no camundongo B10 D₂, 78% em B10 A, 75% em C57, 32% em DBA (7).

A demonstração de sensibilização de linfócitos como consequência da inoculação de antígeno de membrana foi feita pela demonstração de citotoxicidade dos mesmos e com a transformação blástica em presença de células tumorais tratadas com Mitomicina C. Em ambas as técnicas foi usada ³H-timidina na avaliação dos resultados (7).

Com base nos resultados anteriormente obtidos resolveu-se verificar a ação terapêutica do antígeno de mem-

brana contra tumores (4). Foi usado como adjuvante a fração P₄₀ de *Corynebacterium granulorum*, gentilmente enviada pelo Dr. Bizzini, do Instituto Pasteur, por ser fração purificada e não produzir reações alérgicas e ter efeito adjuvante semelhante ao antígeno de Freund.

O tumor ascítico Mec II, induzido em camundongo isogênico B10 A foi usado no presente experimento.

Camundongos B10 A foram inoculados por via i.p. no dia 0 com 5×10^5 células viáveis de tumor singênico Mec II. Três dias após foi iniciado o tratamento, pois já tínhamos a comprovação de que as células tumorais se multiplicavam exponencialmente neste período.

Imunoquimioterapia adotiva específica com linfócitos sensibilizados

Foi verificado que a simples transferência dos linfócitos sensibilizados e inoculados por via i.p. não fazia a regressão de tumor subcutâneo incipiente em sistema singênico. Por outro lado, ciclofosfamida em dose única de 200 mg/kg apenas retardava o crescimento do tumor, não impedindo a sua evolução (1, 3).

Quando usados em associação (2, 5) ou seja, fazendo a transferência de linfócitos sensibilizados pelo antígeno de membrana de tumor seguida da injeção, pela mesma via, de Ciclofosfamida 200 mg/kg foi conseguida a regressão de tumor em 80% dos animais. Nos grupos de

ESQUEMA EXPERIMENTAL		
Grupo	Tratamento	Regressão de tumor (%)
1	300 a 400µg de proteína de membrana plasmática + 100µg de fração P ₄₀ de <i>G. granulorum</i> via i.p.	70 a 80
2	300 a 400µg de proteína de membrana plasmática via i.p.	0
3	100µg de fração P ₄₀ de <i>C. granulorum</i> via i.p.	0
4	Salina via i.p.	0

O esquema acima mostra que a fração de membrana plasmática e P⁴⁰ foi efetiva na regressão de tumor em cerca de 70 a 80% dos animais tratados, em um período de observação de 90 dias.

Os linfócitos dos animais regressores apresentaram transformação blástica (medida por ³H Timidina) em presença de células tumorais tratadas com Mitomicina C enquanto que os animais portadores apresentaram células supressoras no baço, o que foi verificado pelo teste de inibição de migração de macrófagos (MIF) (4).

controle o tumor teve evolução normal.

O tratamento foi iniciado após cinco a seis dias de inoculação de 5×10^5 células viáveis de tumor Mec II segundo o esquema seguinte

O período de observação foi de 90 dias.

Como é demonstrado acima, a associação de ciclofosfamida com linfócitos sensibilizados pelo antígeno de membrana tumoral produz regressão em 80% de tumores já estabelecidos.

Segundo literatura atual, o efeito desta associação (Imunoterapia específica + Ciclo-

fosfamida) (7) se deve à maior sensibilidade dos precursores de T supressor ao imunossupressor ciclofosfamida (2), permitindo a ação citotóxica da célula T sobre a célula tumoral.

concentração circulante do inibidor acima do normal ou um bloqueio na síntese de IL-2, mediado por células supressoras, com um comprometimento na geração de linfócitos citotóxicos.

Grupo	Tratamento	% de animais com tumor
1	0,5 ml de solução fisiológica por via i.p.	100
2	0,5 ml de solução de 200 mg/kg de ciclofosfamida por via i.p.	80
3	0,5 ml de suspensão de 5×10^7 linfócitos + solução de 200 mg/kg de ciclofosfamida por via i.p.	20

Uso de "Interleukin-2" em substituição a linfócitos sensibilizados

A transferência de linfócitos especificamente pré-sensibilizados não apresenta valor clínico, pois não pode ser usada em pacientes, já que é exigida isogenicidade dos linfócitos para evitar uma reação aos antígenos de histocompatibilidade (doença enxerto x hospedeiro). Outro esquema foi então projetado: a substituição de linfócitos sensibilizados por doses de "Interleukin-2".

A "Interleukin-2" (IL-2) é um fator inespecífico liberado por linfócitos T *helper* em presença de macrófagos e antígenos ou lectinas como Con A, PHA e outras (9, 13). A transformação blástica e a proliferação de linfócitos citotóxicos *in vitro* e provavelmente *in vivo* são dependentes da produção desse fator.

Animais normais apresentam no plasma uma glicoproteína capaz de bloquear a ação da IL-2 (11). A produção desse inibidor é timo dependente e efetuada provavelmente por células supressoras (10, 11). Fundamenta-se então a hipótese de animais portadores de tumor, ou outro antígeno, apresentarem uma

O projeto agora em desenvolvimento no nosso Laboratório, inoculação de IL-2 + Ciclofosfamida, justifica-se teoricamente, pois a inoculação de IL-2 deve produzir proliferação de T citotóxico (substituindo, portanto, a injeção de linfócitos pré-sensibilizados) e a injeção de ciclofosfamida, bloqueando T supressor, desfaz possivelmente a ação anti-IL-2 do soro do animal.

A IL-2 é obtida a partir de células de baços de camundongos B10 A cultivando-se 5×10^6 células/ml de meio RPMI-1640 suplementado com 0,5% de FCS, glutamina, asparagina, piruvato, B-mercaptoetanol e $5 \mu\text{g/ml}$ de Con A. Após 48 h de cultura em atmosfera de 7% de CO_2 o sobrenadante centrifugado a 12.000 g e adsorvido em Sephadex G-75 é precipitado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A fração protéica é dissolvida e dialisada em PBS. Esta preparação contém IL-2 semipurificada e concentrada de 15 a 30 vezes.

Nas experiências preliminares de substituição de linfócitos sensibilizados por IL-2, foi observado um retardamento nítido do crescimento do tumor, num período de observação de 30 dias, o que justi-

fica o prosseguimento de experimentos usando não só IL-2 mais concentrada e purificada como também IL-2 específica (produzida pelo antígeno de tumor).

SUMMARY

Proteins from plasmatic membrane of tumor cells were obtained by blistering the membrane of tumors cells and used as tumor antigen.

In a syngeneic system, the inoculation of the prepared antigen resulted in 80% protection of mice against tumor challenge.

Eradication of established tumors was obtained with the same antigen material.

Adoptive specific immunotherapy by the inoculation of spleen cells of immune mice or Cyclophosphamide alone were ineffective against established syngeneic tumor.

Adoptive chemoimmunotherapy-spleen cells of immune mice + Cyclophosphamide eradicated 80% of established syngeneic tumor.

Considering the possibility of similar procedures being employed in patients, we are trying, in mice bearing syngeneic tumor to change the spleen lymphocyte injection by "Interleukin-2" produced "in vitro" with macrophage + T helper and Con A.

Preliminary data on established tumors results in a very clear delay of tumor growth as compared to the control group.

We are now trying to prepare pure "Interleukin-2" produced with tumor specific antigen.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

1. ABREU, L.A. & ABREU, R.R. — Effect of cyclophosphamide on serum ceruloplasmin oxidase activity in sarcoma bearing rats. *Arch. Geschwulstforsch* 51:394-397 (1981).
2. BERENDT, M.J. & NORTH, R.J. — T-cell-mediated suppression of antitumor immunity. An explanation of progressive growth of an immunogenic tumor. *J. Exp. Med.* 151:69-80 (1980).
3. CALABRESI, P. & PARKS JR., E.R. — Alkylating agents, antimetabolites, hormones, and others antiproliferating agents *In: The pharmacological basis of therapeutics*. L.S. Goodman & A. Gilman, eds., 5th ed., Mac Millan, New York, pp. 1254-1307 (1975).
4. CASTRO FARIA, H., GRYNBERG, N.F., SOUZA, A.S.R. & GOMES, R.M. — Eradication of established murine tumor with plasma membrane vesicles and *Corynebacterium granulorum* fraction. 4th Int. Congress of Immunology. Paris, abstr. 10.5.11 (1980).
5. CHEEVER, M.A., GREENBERG, P.P. & FEFER, A. — Specificity of adoptive chemoimmunotherapy of established

- syngeneic tumors. *J. Immunol.* 125:711 (1980).
6. FARIA, H.C., PREZA, P., MARINHO, R. & BASTOS, V.C. — Specific resistance elicited in mice or rats by injection of plasmatic membrane from syngeneic tumor cells obtained by a new technique. XII Congresso Int. del Cancer, abstr. 1/22. Buenos Aires (1978).
 7. FEFER, A. — Tumor Immunotherapy. In: *Antineoplastic and Immunosuppressive agents I*. A.C. Sartorelli and D.G. Johns, eds., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 528-554 (1974).
 8. GOMES, R.M., PREZA, P., BASTOS, V.C., COELHO, M.G.P., KOVARY, K. & CASTRO FARIA, H. — Controle do crescimento do tumor experimental. I. Proteção do hospedeiro por inoculação prévia da fração de membrana plasmática de célula tumoral. *Rev. Bras. de Pesquisas Méd. e Biol.* 111:229-236 (1978).
 9. GRONVIK, K.O. & ANDERSON, J. — The role of T cell growth stimulating factors in T cell triggering. *Immunol. Rev.* 51:35-57 (1980).
 10. HARDT, C., HEEG, K., PFIZENMAIER, K., ROLLENGHOFF, M. & WAGNER, H. — Regulation of cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses in vivo: Functional activity of Ly 1 T helper cell derived Interleukin-2 (IL-2) is controlled by T cell derived IL-2 inhibitor. 4th Int. Congress of Immunology, abstr. 6.4.05, Paris (1980).
 11. WAGNER, H., HARDT, C., HEEG, K., PFIZENMAIER, K., SOLBACH, W., BARTLETT, R., STOCKINGER, H. & ROLLINGHOFF, M. T-T cell interactions during cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses: T cell derived helper factor (Interleukin-2) as a probe to analyse CTL responsiveness and thymic maturation of CTL progenitors. *Immunol. Rev.* 51:215-255 (1980).
 12. WATSON, J. & MOCHIZUKI, D. — Interleukin-2: A class of T cell growth factors. — *Immunol. Rev.* 51:257-278 (1980).