

Efeito da solução aquosa de fenol, ácido acético e glicerina sobre o tumor ascítico de Ehrlich. Estudo experimental in vitro¹

Rogério Saad-Hossne², Willian Saad-Hossne³, Renê Gamberini Prado²

Saad-Hossne R, Hossne WS, Prado RG. Efeito da solução aquosa de fenol, ácido acético e glicerina sobre o tumor ascítico de Ehrlich: estudo experimental in vitro. Acta Cir Bras [serial online] 2004 Jan-Fev;19(1). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb>.

RESUMO - Objetivo: Verificar o efeito da solução composta por fenol, ácido acético e glicerina sobre o tumor ascítico de Ehrlich. **Métodos:** Após a coleta do líquido ascítico de três camundongos procedeu-se a incubação, a 37° C, do mesmo com diferentes doses da solução teste (0,50, 0,25, 0,10 e 0,05 ml) e com solução salina (0,50 ml como controle; estudou-se a viabilidade celular pela técnica de exclusão do azul tripan). **Resultados:** Observou-se que ao final de 15 minutos todas as células tumorais encontravam-se inviáveis com as diferentes doses da solução teste. **Conclusão:** A solução proposta, causa, in vitro, a morte das células tumorais ao foral de 15 minutos.

DESCRITORES - Carcinoma de Ehrlich. Terapia combinada. In vitro.

Introdução

O volume de informação a respeito de câncer cresce muito rapidamente em função de alguns fatores: primeiro, o fato do câncer não constituir uma só doença, mas sim um grande conjunto de doenças diferentes, com história natural distinta, multiplicidade de causas e diferentes formas de tratamento; segundo, o progressivo controle das doenças infecto contagiosas (com exceção da AIDS) e o aumento da idade da população, tornaram o câncer um problema mais comum e em evidência, associado também ao aumento progressivo da incidência. Dessa forma, assume papel cada vez mais relevante a pesquisa científica em Oncologia Clínica e/ou experimental.

Paralelamente a isto, o campo da pesquisa terapêutica vem se desenvolvendo no sentido de testar novas formas de tratamento, bem como novas substâncias potencialmente eficazes contra as neoplasias. A pesquisa de teste realizada com novas drogas é um procedimento oneroso e demorado. Como em toda a investigação

com drogas ou medicamentos, antes de se iniciar e realizar as fases de farmacologia clínica, impõe-se a execução de estudos pré clínicos em laboratório. Para isto, faz-se necessária a utilização de modelos experimentais em animais para testar novas drogas; um modelo muito empregado nesta linha de investigação é o tumor de Ehrlich em camundongo. Este tumor tem a capacidade de crescimento em suspensão no líquido ascítico e em tecido celular subcutâneo^{1,2,3}, e após a sua implantação na cavidade peritoneal em camundongos sadios tem como resultado a formação de líquido ascítico tumoral. Em nosso meio, na década de 70, surgiu a idéia do uso de soluções esclerosantes no tratamento da hiperplasia prostática benigna.^{4,5} verificou-se a injeção da solução composta por ácido acético, fenol, glicerina e água destilada em próstata de cães, produzia necrose, seguida de fibrose.

Tendo em vista a ação necrotizante da solução pareceu-nos válido pesquisar o efeito de tal solução em células neoplásicas, inicialmente in vitro e, caso com-

provada a eficácia, testar posteriormente in vivo.

No presente trabalho tivemos como objetivo responder às seguintes indagações: a) solução in vitro causa “morte” (inviabilidade) das células neoplásicas? b) se positivo, a ação ocorre em quanto tempo? c) se positivo, qual a alteração celular que ocorre?.

Escolhemos como modelo o tumor ascítico de Ehrlich e como métrica, o método de azul de tripan e a microscopia ótica e eletrônica

Métodos

1 - Modelo de tumor -Tumor Ascítico de Ehrlich (T.A.E.)

1.1 - Manutenção do tumor in vivo e obtenção das células tumorais

Utilizou-se como modelo experimental o tumor ascítico de Ehrlich em camundongos, proveniente de cepa fornecida em 1990

1. Trabalho realizado no Laboratório de Cirurgia e Cirurgia Experimental “William Saad Hossne” – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP). Botucatu – SP.

2. Professor Doutor do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da UNESP.

3. Professor Emérito do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da UNESP.

pelo Laboratório do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (U.S.P.). A manutenção do tumor *in vivo* tem sido feita pela injeção intraperitoneal de 10^7 células a cada sete dias em camundongos receptores.

Os animais portadores do tumor foram sacrificados por deslocamento da coluna cervical sete dias após a inoculação tumoral e fixados a placa de cortiça. Após a assepsia da parede abdominal com álcool iodado realizou-se laparotomia mediana, com retirada de todo o líquido ascítico possível, por meio de aspiração com seringa de 5 ml, com a transferência do líquido para um tubo de ensaio seco e estéril.

A seguir, o líquido foi centrifugado duas vezes a 1500 rpm durante dez minutos, sendo o sobrenadante descartado e as células tumorais novamente suspensas em solução salina tamponada ao volume original (3 ml a 5 ml). O número total de células na suspensão foi determinado pela contagem de células na câmara de Neubauer, com o emprego de microscópio óptico de campo claro; a concentração desejada (10^7 células por ml) de células foi obtida mediante a diluição da suspensão em salina tamponada.

1.2. Teste de viabilidade celular pela técnica de exclusão do azul tripan

Com a finalidade de se determinar a viabilidade das células tumorais, à suspensão de células (0,9 ml) foi acrescido azul tripan (0,1 ml a 0,2%). Em seguida, uma gota da suspensão foi colocada entre lâmina e lamínula e realizada a contagem percentual, sendo consideradas mortas (inviáveis) as células que incorporavam o corante e, vivas as que excluíam o azul tripan. No protocolo experimental foram utilizadas para manutenção do tumor, apenas suspensões com viabilidade celular superior a 95%.

2 – Solução-teste (S.T.)

A solução testada é composta de fenol (0,6 g), ácido acético (0,6 g), glicerina (1,2 g) e água bidestilada (28,0 ml), preparada no Laboratório de Cirurgia Experimental

do Departamento de Cirurgia e Ortopedia (Fac. Med. Botucatu).

3 – Protocolo

Procurou-se investigar o efeito *in vitro* da solução em estudo sobre as células tumorais, tendo sido realizados testes repetidos (três leituras).

Foi coletado o líquido ascítico de três animais com tumor de Ehrlich e feita a diluição para a concentração de 10^7 células tumorais por ml de líquido ascítico. Foi retirado 1 ml desta diluição (10^7 células tumorais) e incubado a 37° C com diferentes doses da solução teste (0,50 ml, 0,25 ml, 0,10 ml e 0,05 ml) e com solução salina (SS - 0,50 ml), como controle. Foi estudada a percentagem de células viáveis pelo teste de azul tripan a cada cinco minutos; foi também

analisado à microscopia ótica e eletrônica o efeito da solução teste sobre as células tumorais.

Resultados

Os resultados (médios) obtidos pelo teste de exclusão do azul tripan estão expostos na Tabela 1 e na Figura 1, onde se verifica o percentual de viabilidade de células tumorais incubadas com diferentes doses da solução-teste ou com solução salina (controle), aos 5, 10 e 15 minutos.

Evidencia-se nitidamente a associação entre a solução-teste e a morte das células tumorais. O efeito aos cinco minutos é maior com a dose mais elevada; aos 15 minutos, porém, todas as células tumorais perderam sua viabilidade, independentemente da dosagem empregada.

TABELA 1 - Viabilidade celular média (%) após a incubação de células tumorais (10^7 cels.) com diferentes doses da solução-teste ou com solução salina, após 5, 10 e 15 minutos

Tratamento	5 minutos	10 minutos	15 minutos
T.A.E. + S.S.	97%	96%	96%
T.A.E. + 0,50 ml S.T.	6%	0%	0%
T.A.E. + 0,25 ml S.T.	11%	5%	0%
T.A.E. + 0,10 ml S.T.	31%	20%	0%
T.A.E. + 0,05 ml S.T.	36%	22%	0%

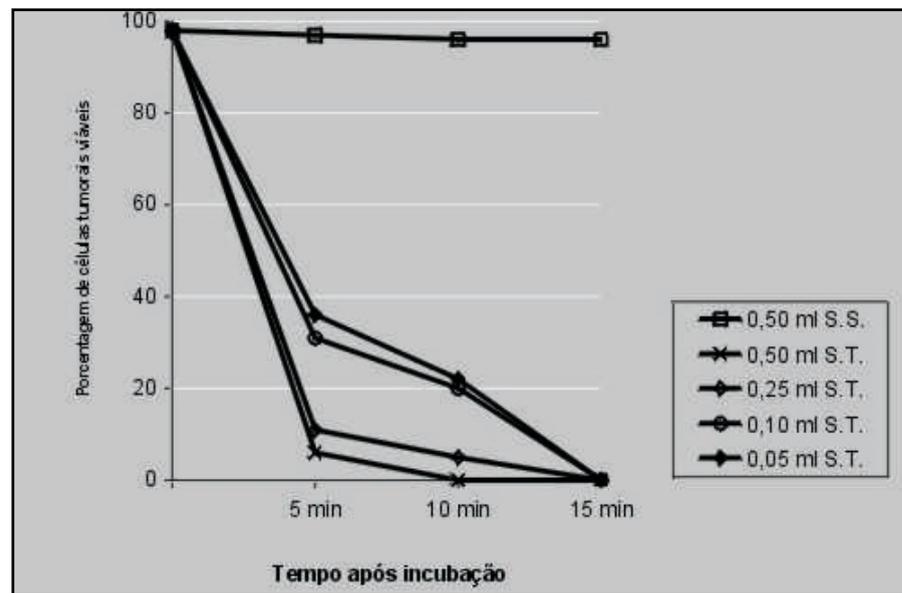


FIGURA 1 – Porcentagem média de células tumorais viáveis após 5, 10 e 15 minutos de incubação com S.S ou S.T.

As Figuras 2a e 2b mostram o aspecto das células tumorais à microscopia ótica, entre 5 e 10 minutos de incubação com S.S ou

S.T. (0,50 ml) respectivamente: na Figura 2a nota-se que as células conservam-se viáveis, não assumindo o corante (células

“translúcidas”). Na Figura 2b, pode-se observar que as células coram-se intensamente de azul (células não viáveis).

As Figuras 3a e 3b mostram uma célula tumoral, não tratada, à microscopia eletrônica; evidencia-se núcleo volumoso de contorno irregular, com cromatina descondensada e nucléolos exuberantes. A superfície celular é recoberta por grande quantidade de pequenas projeções filiformes. O citoplasma é pobre em organelas,

apresenta grande quantidade de ribossomas livres, pequenas mitocôndrias esparsas, gotas lipídicas e complexo de Golgi evidente, além de esparsas cisternas de retículo endoplasmático rugoso. Visualizam-se vacúolos, de conteúdo variado.

As Figuras 4a e 4b mostram o aspecto da célula tumoral à microscopia eletrônica entre 5 e 10 minutos de incubação com 0,50 ml de S.T.; a célula tumoral não apresenta alteração de forma, quer da superfície

(membrana) celular como da nuclear. O núcleo apresenta massas densas e irregulares aderidas à carioteca e em meio a material bastante eletrolucente. No citoplasma, as organelas não são caracterizáveis, exceto as gotas lipídicas. Existem pequenos grumos de material denso floculado, além de estruturas membranosas vesiculares e lamelares, imersas em citosol elétron-transparente. A célula é nitidamente não viável.

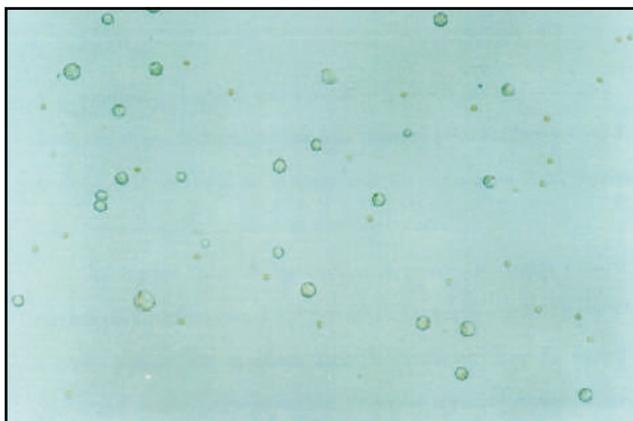


FIGURA 2a – Aspecto das células tumorais a microscopia óptica entre 5 e 10 minutos de incubação com 0,50 ml S.S., pelo teste de viabilidade celular pela técnica de exclusão do azul tripan. Notar que as células estão viáveis e não se coram (“translúcidas”). X200.

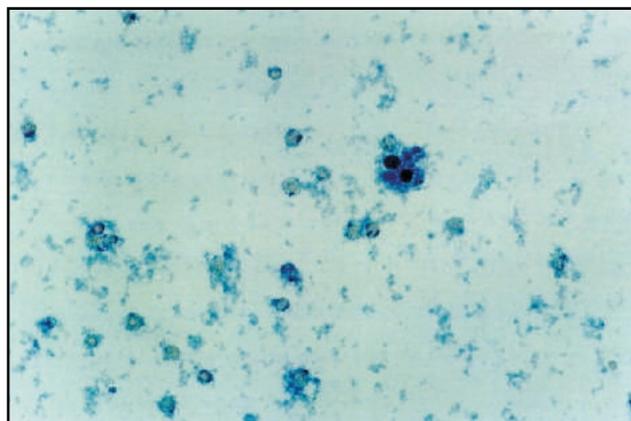


FIGURA 2b – Aspecto das células tumorais a microscopia óptica entre 5 e 10 minutos de incubação com 0,50 ml S.T., pelo teste de viabilidade celular pela técnica de exclusão do azul tripan. Notar que as células não viáveis coram-se intensamente. X200.

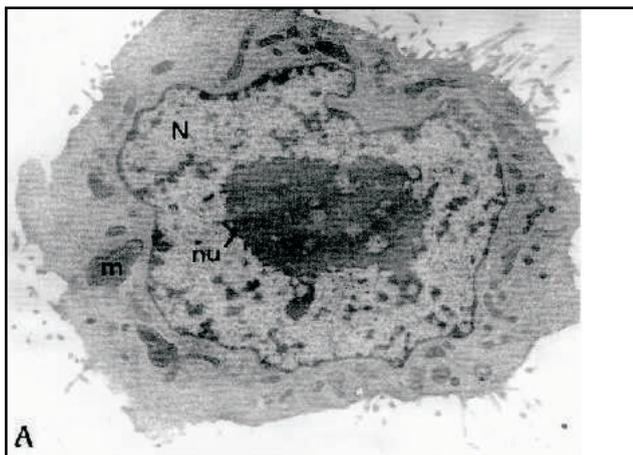


FIGURA 3a – Elétron-micrografia de células tumorais de Ehrlich do grupo-controle. Aspecto geral da célula tumoral: Núcleo (N) com nucléolo (nu) exuberante, citoplasma rico em ribossomas livres e com poucas mitocôndrias (m), notar as projeções filiformes da superfície celular. X 10.000.

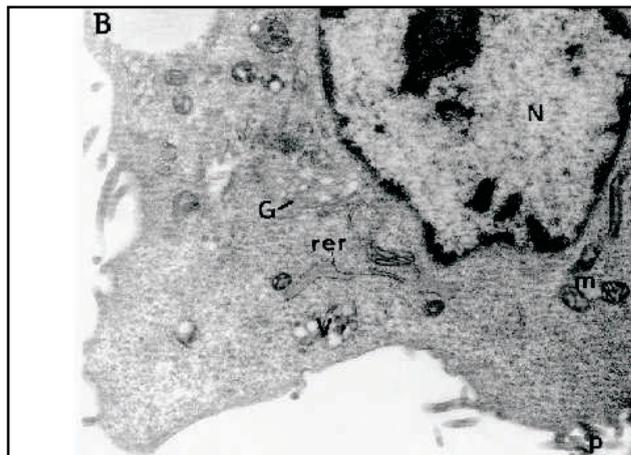


FIGURA 3b - Elétron-micrografia de células tumorais de Ehrlich do grupo-controle. Detalhe da célula tumoral: Citoplasma com pequenas mitocôndrias (m), complexo de Golgi (G), cisterna de retículo endoplasmático rugoso (rer), vacúolos (V), núcleo (N) e projeções de superfície (p). X 23.000.

Discussão

A solução testada é composta de fenol (0,6 g), ácido acético (0,6 g), glicerina (1,2 g) e água bidestilada (28 ml). O fenol é uma substância que tem poder bacterios-tático (solução a 0,02% a 1%) e bactericida

para determinados germes; a aplicação na pele tem efeito analgésico, podendo, porém, acarretar irritação e necrose profunda; sua ação germicida e histotóxica ocorre pela desnaturação de proteínas.

O ácido acético glacial, tem efeito bactericida a 5%, e bacteriostático a 1% , além

de apresentar capacidade cáustica e anti-fúngica⁶.

A glicerina é um álcool trihidroxilado, amplamente empregado como veículo para muitas drogas aplicadas na pele. Quando administrada por via oral, pode ser usada

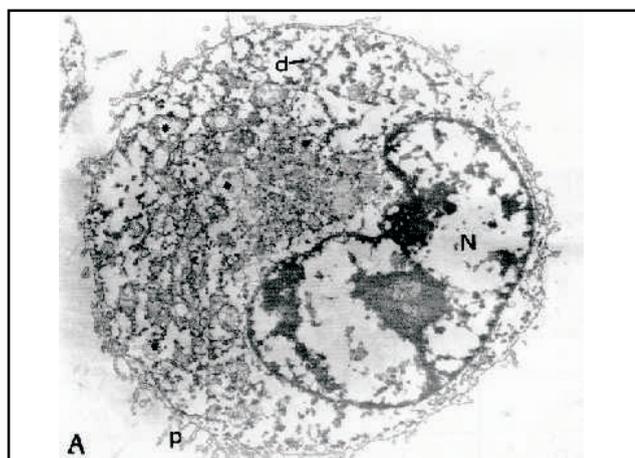


FIGURA 4a – Elétron-micrografia de células tumorais de Ehrlich do grupo tratado com 0,50 ml S.T. – Aspecto geral da célula tumoral: Núcleo (N) eletrolucente com massas densas, citoplasma com estruturas membranosas (l) e massa de material denso floculado (d). Notar a manutenção das pequenas projeções filiformes (p) da superfície celular.X 10.000.

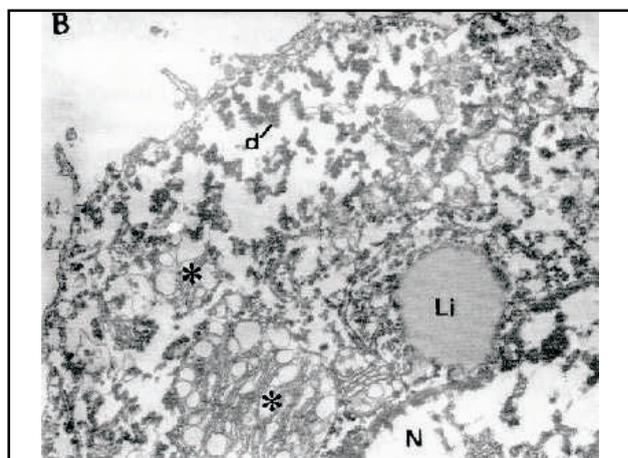


FIGURA 4b - Elétron-micrografia de células tumorais de Ehrlich do grupo tratado com 0,50 ml S.T. – Detalhe da célula tumoral: Citoplasma com estruturas membranosas (*) e material denso floculado (d), núcleo (N) e gotas lipídicas (Li).X 23.000.

no tratamento do edema cerebral e na diminuição da tensão ocular no glaucoma ⁶.

Em nosso meio,^{4,5} investigou-se os efeitos da injeção da solução na próstata de cães, tendo observado ocorrência de necrose do tecido, seguida de fibrose; não se observaram alterações clínicas ou bioquímicas no sangue ou na urina.

Revedo a literatura, não encontramos referências ao uso dessa solução no tumor ascítico de Ehrlich ou na ascite neoplásica, justificando-se, assim a nosso ver, a oportunidade da investigação proposta em nosso trabalho.

No presente protocolo experimental (teste *in vitro*), optamos por utilizar, empiricamente, as doses de 0,50 ml, 0,25 ml, 0,10 ml e 0,05 ml da solução teste, observando resultados efetivos com as mesmas (Tabela 1). Na verdade, partimos da dose de 0,50 ml (1,67 ml/kg peso, em média), por ter sido este o volume injetado na cavidade peritoneal de cobaias normais, em estudo anterior ⁷, sem a ocorrência de efeitos colaterais, obviamente, o peso da cobaia seja bem maior que o do camundongo. Iniciamos, pois, a pesquisa com doses mais elevadas do que as utilizadas na cobaia normal.

Em nosso estudo, *in vitro*, mostrou-se que a solução-teste, em todas as doses utilizadas, tem efeito intenso (morte celular) sobre a célula tumoral. Esse efeito é dose-dependente, pois é quase imediato quando se utiliza concentração maior (0,50 ml); ele é também rapidamente progressivo,

uma vez que, aos 15 minutos, mesmo com a menor concentração da solução (0,05 ml), todas as células haviam perdido a viabilidade.

À microscopia eletrônica, verificou-se que a solução preserva a membrana celular e a membrana nuclear. A célula tumoral mantém a sua forma. Nota-se, porém, que no citoplasma as organelas não são mais caracterizáveis, pois houve destruição das mesmas; existem pequenos grumos de material denso com aspecto “coagulado”, e a célula torna-se não viável, mas a membrana celular não é destruída.

Verifica-se, pelos dados da literatura, que a maior parte das drogas antineoplásicas atualmente em teste têm como objetivo a destruição das células tumorais através de alterações na síntese proteica. Vale referir, porém, que em grande parte desses testes utilizam-se culturas de células do tumor ascítico, incubadas com substâncias citostáticas como: cisplatina, daunomicina, citosina, colchicina e vincristina⁸, 5-fluorouracil associado a hipertemia⁹, bleomicina¹⁰, beta-alanil mefalan¹¹, verapamil¹² e metrotexate e adriamicina¹³, nestes ensaios, a ação antineoplásica das drogas não é imediata.

A própria técnica da hipertemia, defendida principalmente pela escola japonesa, demonstrou-se efetiva após a incubação de suspensão de células tumorais por uma hora e meia a 43° C; somente após esse período é que as células perdem sua viabilidade¹⁴.

Em nosso caso, pelo contrário, demonstrou-se, *in vitro*, uma ação imediata e intensa da solução sobre as células. Deve ser referido que esse efeito ocorre sobre todas as células, de qualquer natureza, em suspensão no líquido ascítico, lembrando-se contudo que, por ocasião da feita do teste, 95% das células são tumorais^{15,16}.

De qualquer modo, ficou patente que a solução, ao fim de 15 minutos, é efetiva para a morte das células, em doses menores, muito embora haja efeito dose-dependente.

Conclusão

No modelo experimental de tumor ascítico de Ehrlich, a solução aquosa de fenol, ácido acético e glicerina, causa, “*in vitro*”, a morte (*in viabilidade*) das células tumorais, por destruição de estruturas citoplasmáticas e nucleares, sem rompimento da membrana celular; a ação é imediata, levando à destruição total ao final de 15 minutos.

Referências

1. Ehrlich P, Apolant H. Beobachtungen über maligne mausetumoren. Berl Klin Wschr 1905;28:871-4.
2. Loewenthal H, Jahn G. Übertraungsversuche mit carcinomatosis mause ascitesflussigkeit und ihr verhalten gegen physikalische und chemise einwirkungen. Z Krebsforsch 1932;37:439-47.
3. Klein G, Klein E. The transformation of a solid transplantable mouse carcinoma into a “ascite tumor”. Cancer Res 1951;11:466-9.

Saad-Hosne R e col.

4. Camara FR. Injeção prostática de solução esclerosante. Estudo experimental no cão [Tese Doutorado]. Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Medicina; 1973.
5. Camara FR, Hossne WS, Montenegro MRG. Injeção prostática de solução esclerosante. Estudo experimental no cão. *J Bras Urol* 1976;2:278-81.
6. Goodman LS, Gilman AG. As bases farmacológicas da terapêutica. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 1987.
7. Saad-Hossne R. Ação necrotizante da solução de fenol, ácido acético e glicerina. Instilação peritoneal. Alterações bioquímicas e anatomopatológicas. In : Resumos do 1. Congresso Médico Acadêmico; 1992. Botucatu.
8. Bielka H, Hoinkis G, Oesterreich S, Stahl J, Benndorf R. Induction of small stress protein on Ehrlich ascites carcinoma cells by anticancer drugs. *FEBS Lett* 1994;343: 165-7.
9. Tsumura M, Yoshiga K, Takada K. Enhancement of antitumor effect of 5-fluorouracil combined with hyperthermia on Ehrlich ascites tumor in vivo. *Cancer Res* 1988;48:3977-80.
10. Kato T. Enhancement of bleomycin activity in vitro on growth of Ehrlich ascite tumor cells [Abstract]. *Nippon Igaku Hoshasen Gakkaiu Zasshi* 1988;11:1230-7.
11. Tsay BL, Wolfenbarger L. Phase I study of beta-alanyl-mephalan as a potent anticancer drug. *Cancer Chemother Pharmacol* 1987;19:190-6.
12. Friche E, Skovsgaard T, Nissen NI. Effect of verapamil on daunorubicin accumulation in Ehrlich ascites tumor. *Cancer Chemother Pharmacol* 1987;19:35.
13. Levin E, Chernavsky A. Effect of antineoplastic drugs on Ehrlich tumor cells. *Biomed Pharmacother* 1989;43:215-7.
14. Fung KP, Lam WP, Wen HL, Choy YM, Lee CY. Effect of hyperthermia on growth of Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Biochem Biophys* 1988;10:117-24.
15. Sigiura K. Tumor transplantation. In: Gray WI. *Methods of animal experimentation*. New York: Academic Press;1965. v.2, p. 171-222.
16. Fecchio D. Inflamação e tumor de Ehrlich: efeitos da modulação da resposta inflamatória sobre o crescimento tumoral [Tese - Doutorado]. Universidade de São Paulo – Instituto de Ciências Biológicas; 1989.

Saad-Hossne R, Hossne WS, Prado RG. Effects of watery solution of phenol, acetic acid and glycerin in Ehrlich mouse ascites tumor: experimental study in vitro. *Acta Cir Bras* [serial online] 2004 Jan-Feb;19(1). Available from URL: <http://www.scielo.br/acb>.

ABSTRACT - Purpose: To evaluate the effects of phenol, acetic and glycerin solution in Ehrlich ascites tumor. **Methods:** After the ascites liquid of three mice was collected, the incubation of these cells took place at 37 degrees Celsius with saline solution (0,50mL) and different solution dosages (0,25mL, 0,10mL e 0,05mL). **Results:** After 15 minutes all tumors cells were dead regardless of the dosage. Whereas in the control group the tumor cells were alive. **Conclusion:** This solution destroys the tumor cells in vitro after 15 minutes.

KEY WORDS – Carcinoma. Ehrlich tumor. Combined modality therapy. In vitro.

Conflito de interesse: nenhum
Fonte de financiamento: nenhuma

Correspondência:

Prof. Rogério Saad-Hossne
Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP
Depto. Cirurgia e Ortopedia
18618-970 Botucatu – São Paulo
Tel: (14) 6802-6269
cgeral@fmb.unesp.br

Data do recebimento: 18/11/2004
Data da revisão: 12/12/2003
Data da aprovação: 06/01/2004

Fotos coloridas disponíveis em www.scielo.br/acb
