

C639800
R1322192
04/09/00

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E
FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FARMACOLOGIA

**Avaliação da Interferência de Imunossupressores no
Desenvolvimento de Metástases em Ratos Inoculados com
Um Fibro-Histiocitoma Maligno de Baixo Índice
Metastático.**

PATRÍCIA BONAVIDES DE CASTRO CAMPOS

FORTALEZA - CE

2000

9616-992
C216w
2000
ext.2

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**Avaliação da Interferência de Imunossupressores no Desenvolvimento de
Metástases em Ratos Inoculados com Um Fibro-Histiocitoma Maligno de
Baixo Índice Metastático.**

PATRÍCIA BONAVIDES DE CASTRO CAMPOS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes

FORTALEZA – CE

2000

FICHA CATALOGRÁFICA

C 216a	Campos, Patrícia Bonavides de Castro.
2000	Avaliação da interferência de imunossupressores no desenvolvimento de metástases em ratos inoculados com um fibro-histiocitoma maligno de baixo índice metastático / Patrícia Bonavides de Castro Campos. – Fortaleza, 2000.
	164 f.: il.
	Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes.
	Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará.
	Faculdade de Medicina.
	1. Metástase neoplásica. 2. Imunossupressão – Neoplasias.
	3. Fibro-histiocitoma maligno. 4. Ciclosporina A
	4. Corticosteróides. 5. Azatioprina. 6. Micofenolato mofetil (CellCept).
	I. Título II. Moraes, Odorico Manoel (orientador).
	616.992

Esta Dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se á disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida universidade.

A citação de qualquer trecho desta Dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Patrícia Bonavides de Castro Campos

Dissertação aprovada com louvor em: 10/05/2000

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
UFC
Orientador da Dissertação

Prof. Dr. Henry de Holanda Campos
Departamento de Clínica Médica
UFC

Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
UFC

“A esperança é o sonho do homem acordado.”

- Aristóteles -

**“De tudo, ficaram três coisas:
a certeza de que estava sempre começando,
a certeza de que era preciso continuar
e a certeza de que seria interrompido antes de terminar.
Fazer da interrupção um caminho novo.
Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada,
do sonho uma ponte, da procura um encontro.”**

- Fernando Sabino -

Ao meu esposo, Giuliano Menezes Campos, meu grande amor, por existir, dando sentido à minha vida, sempre presente com seu amor, companheirismo, compreensão, apoio e dedicação.

**Aos meus pais, Oscar Costa de Castro e
Odessa Bonavides de Castro, pelo que sou
hoje, por seus ensinamento, amor e
dedicação a mim conferidos.**

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de agradecer a Deus, sobretudo, pelo dom da vida, por ter me concedido fé, saúde, força, perseverança, e entendimento para realizar esse trabalho.

Gostaria de agradecer ao Prof. Doutor Manoel Odorico de Moraes, professor orientador desse projeto, pelos constantes ensinamentos, apoio, e confiança em meu trabalho. Por seu exemplo como mestre e pesquisador, desde a graduação, que despertaram em mim o gosto pelo ensino e a pesquisa do câncer. Gostaria de agradecer ainda, por ter se tornado além de mestre um amigo, sempre compreensivo.

Ao Prof. Doutor Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, por ter aceito integrar essa banca, por seus ensinamentos ao longo da graduação e durante o curso de Mestrado, sempre presente com seu espírito científico crítico, que me ajudaram a enriquecer este trabalho.

Ao Diretor da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Prof. Doutor Henry de Holanda Campos, por ter aceito integrar esta banca, por seu exemplo de médico e mestre, bem como pela sua disponibilidade em prestar auxílio no desenvolvimento desse trabalho.

À Prof. Sílvia Magalhães, pela disponibilidade e imensa ajuda prestada ao realizar os hemogramas dos animais.

Ao Prof. Luiz Gonzaga Porto, pelo exemplo de dedicação ao estudo e prevenção no combate ao câncer, bem como por ter me incentivado ao estudo da oncologia, sempre acreditando em meu trabalho.

Aos colegas **Filadelfo Rodrigues Filho, Francisco Helder Cavalcante Félix e Débora Santos Bruno**, uma grande amiga, pela importante participação que tiveram no início desse projeto, quando ainda éramos estudantes de iniciação à pesquisa.

À estudante de medicina **Renata Amaral de Moraes**, pelo profissionalismo que sempre demonstrou ao longo deste trabalho. Pela grande amiga que se tornou, sempre ajudando-me nos momentos mais difíceis.

Aos estudantes de medicina **Cristina Sampaio do Vale e Márcia Maciel, Karenne, Mayko** e à colega **Danielle de Menezes Ferreira**, por terem me ajudado no desenvolvimento desse trabalho.

Ao colega **Prof. Paulo Ferdinando de Melo Oliveira**, pelos comentários sempre enriquecedores em relação a este trabalho e à colega **Diane Isabele Magno Cavalcante**, pela ajuda na realização das microfotografias.

A todos os professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

Aos amigos do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

À **Silvana**, técnica do Laboratório de Oncologia Experimental, por seu trabalho e profissionalismo que tanto me ajudaram no desenvolvimento desse projeto.

Às secretárias **Silvia, Marta, Áura, Maria Thereza e Flávia**, pela presteza com que sempre me atenderam quando necessário.

Aos colegas **Filadelfo Rodrigues Filho, Francisco Helder Cavalcante Félix e Débora Santos Bruno**, uma grande amiga, pela importante participação que tiveram no início desse projeto, quando ainda éramos estudantes de iniciação à pesquisa.

À estudante de medicina **Renata Amaral de Moraes**, pelo profissionalismo que sempre demostrou ao longo deste trabalho. Pela grande amiga que se tornou, sempre ajudando-me nos momentos mais difíceis.

Aos estudantes de medicina **Cristina Sampaio do Vale e Márcia Maciel, Karen Nine, Mayko** e à colega **Danielle de Menezes Ferreira**, por terem me ajudado no desenvolvimento desse trabalho.

Ao colega **Prof. Paulo Ferdinando de Melo Oliveira**, pelos comentários sempre enriquecedores em relação a este trabalho e à colega **Diane Isabele Magno Cavalcante**, pela ajuda na realização das microfotografias.

A todos os professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

Aos amigos do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

À **Silvana**, técnica do Laboratório de Oncologia Experimental, por seu trabalho e profissionalismo que tanto me ajudaram no desenvolvimento desse projeto.

Às secretárias **Sílvia, Marta, Áura, Maria Thereza e Flávia**, pela presteza com que sempre me atenderam quando necessário.

Aos meus irmão **Marcelo e Fábio Bonavides de Castro**, pelo apoio prestado.

Ao Laboratório **Luís Pasteur**, onde foi feito uma parte desse trabalho.

À **ABTO (Associação Brasileira de Transplante de Órgãos)**, pela disponibilidade com que atendeu aos pedidos de consulta científica.

Ao **GEON (Grupo de Estudo em Oncologia) e ICC (Instituto do Câncer do Ceará)**, pelas lições ali aprendidas e apoio no estudo do câncer.

À minha avó, **Aldaísa Viana Bonavides**, por seu exemplo de vida e seu apoio sempre demonstrado.

À memória de meu avô, **Anníbal Fernandes Bonavides**, pelo exemplo de vida, pelo humanista que foi, vindo a falecer prematuramente de câncer.

À carinhosa lembrança de **Germana Amaral de Moraes**.

Ao **CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa) e à FUNCAP (Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa)**, pela confiança depositada em mim, a fim de que levasse adiante este trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho e não foram aqui nominados, os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Avaliação da Interferência de Imunossupressores no Desenvolvimento de Metástases em Ratos Inoculados com um Fibro-Histiocitoma Maligno de Baixo Índice Metastático.- PATRÍCIA BONAVIDES DE CASTRO CAMPOS. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Fortaleza. 2000. Orientador: Manoel Odorico de Moraes.

As metástases constituem a principal causa de falha no tratamento oncológico. São tumores secundários que crescem a partir de populações celulares heterogêneas, oriundas de um tumor primário maligno, o que possivelmente acontece quando essas populações escapam da vigilância imunológica. A participação do sistema imune, em tumores imunogênicos, é fundamental para a manutenção da baixa agressividade. A Ciclosporina (CS) é o protótipo de uma geração de imunossupressores utilizada em doenças autoimunes e transplantes de órgãos, e que atua inibindo a função dos linfócitos T-auxiliares. O presente trabalho objetivou avaliar as possíveis influências da imunossupressão induzida pela CS, no desenvolvimento de metástases a partir de um tumor de rato de baixo índice metastático (fibro-histiocitoma T.E.G.S. 2047), inoculado via s.c. (suspenção de 10^6 células/rato), comparando-a com drogas imunossupressoras tradicionais, inespecíficas: Azatioprina (AZA) e Metilprednisolona (MP) e com uma droga nova, o Micofenolato Mofetil (MMF). O MMF inibe especificamente a proliferação de linfócitos, e a glicosilação de proteínas envolvidas na adesão de linfócitos e monócitos ao endotélio vascular. O estudo foi realizado em ratos Wistar entre 4 e 6 semanas de idade. Nossos resultados mostraram que, nos animais tratados com CS (10 mg/Kg/dia) o índice de metástase pulmonar do tumor T.E.G.S. aumentou significativamente de 0% em nossos controles (animais com tumor que não receberam imunossupressores), para 72,72% ($p<0,01$). Esse aumento foi também significativo em relação à AZA e MP ($p<0,01$). A CS levou a um aumento do volume tumoral em comparação ao grupo controle e demais grupos estudados. Os animais tratados com AZA (4 mg/Kg/dia) e MP (1 mg/Kg/dia) tiveram um aumento de metástases significativo em relação ao controle ($p<0,05$), respectivamente 43,75% e 50%. O MMF (20 mg/Kg/dia), entretanto, não causou o desenvolvimento de metástases em nosso modelo experimental, possivelmente por seu efeito ao nível de moléculas de adesão. Em relação ao hemograma observou-se uma linfopenia nos animais tratados com CS e MP, e uma linfocitose e neutrofilia nos tratados com MMF. Nosso trabalho sugere uma ativa participação das drogas utilizadas no esquema clássico de imunossupressão (CS/ AZA/ MP), principalmente da CS na inibição dos mecanismos envolvidos na vigilância imunológica do tumor T.E.G.S. 2047. Os resultados com MMF podem sugerir ainda, que um possível bloqueio ao nível de moléculas de adesão, poderia bloquear em uma outra etapa, a cascata metastática.

ABSTRACT

Evaluation of the Influence of Immunosuppressive Drugs in the Development of Metastasis in Rats inoculated with a Low Metastatic Malignant Fibrous-Histiocytoma. - PATRÍCIA BONAVIDES DE CASTRO CAMPOS. Paper presented to the Course of Post-graduation in Pharmacology of the Federal University of Ceará as a prerequisite for the gain of the Master title's in Pharmacology, Fortaleza, 2000. Professor: Manoel Odorico de Moraes.

Metastasis is responsible for death in the majority of cancer patients. Metastases are secondary tumors that grow out from heterogenous populations of primary malignant tumors, which possibly occurs when these cellular populations escape from the immunologic surveillance and colonise at distant sites. The participation of the immune system is important in immunogenic tumors to reduce malignancy. Cyclosporine (CS) is a prototype of a generation of immunosuppressive drugs widely used in organ transplantation and autoimmune disease. CS acts by inhibiting the function of T helper cells. The subject of this work was to determine the influence of CS in the development of metastasis from a low metastatic tumor (fibrous histiocytoma T.E.G.S. 2047), inoculated s.c. (suspension of 10^6 cells/rat). Comparison was made with other traditional immunosuppressant drugs: Azathioprin (AZA), methylprednisolone (MP), and with a new drug, Mycophenolate mofetil or CellCept (MMF). The latter is a pro drug of mycophenolic acid, and inhibits specifically lymphocyte proliferation, and blocks the glycosylation of proteins involved in the intercellular adhesion of lymphocytes and monocytes to endothelial cells. The study was performed on Wistar rats, 4-6 weeks old. Our results showed that in the animals treated with CS (10 mg/Kg/day) the incidence of lung metastasis increased from 0% in our control groups (animals with tumors and without immunosuppressor treatment), to 72,72% ($p<0,01$). This value was significantly higher with respect to AZA or MP ($p<0,01$). CS also increased the tumor volume of the primary tumors with respect to the other groups. The animals treated with AZA (4 mg/Kg/day) and MP (1 mg/Kg/day) showed a significant increase in the incidence of lung metastasis ($p<0,05$), 43,75% and 50%, respectively. With respect to MMF it did not cause any metastasis in our model, probably due to its effect on adhesion molecules. Hematological studies showed ymphopenia in the animals treated with CS and MP, and a lymphocytosis and neutrophilia in the ones treated with MMF. Our findings suggest the active participation of the drugs used in the classic immunosuppressive scheme (CS/ AZA/ MP), mainly CS in the inhibition of mechanisms involved in the immunologic surveillance of this tumor. Our results with MMF may suggest a possible blockade at the level of adhesion molecules, could block another step in the metastatic cascade, the adhesion of metastatic cells to the endothelium.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	01
1. Relevância do Trabalho	01
2. Metástases	03
2.1 Heterogeneidade Tumoral	03
2.2 Angiogênese	04
3. A Cascata Metastática	05
3.1 Deslocamento das Células da Massa Tumoral e o Papel das Caderinas	05
3.2 Invasão da Matriz Extracelular (MEC)	07
3.3 Circulação Sangüínea	08
3.4 Disseminação Vascular e Escolha dos Órgãos-Alvo	10
3.4.1 Interação Célula Tumoral-Célula Endotelial	12
3.4.1.a Superfamília das Imunoglobulinas	12
3.4.1.b Selectinas	14
3.4.1.c CD44	15
3.5 Viabilização das Metástases	16
4. Imunologia Tumoral	19
5. Fibro-Histiocitomas	26
6. O Tumor T.E.G.S. 2047	27
7. A Ciclosporina	32
8. A Metilprednisolona	40
9. A Azatioprina	45
10. Micofenolato Mofetil (CellCept)	48

OBJETIVOS	53
1. Objetivos Gerais	53
2. Objetivos Específicos	53
MATERIAL E MÉTODOS	55
1. Reagentes e Soluções	55
2. Preparação das Soluções Utilizadas na Cultura de Células	56
2.1 Penicilina	56
2.2 Gentamicina	56
2.3 Fugizon	56
2.4 Bicarbonato de Sódio	57
2.5 Hidróxido de Sódio	57
2.6 Soro Fetal Bovino	57
2.7 Solução Salina Tamponada	57
2.8 Tripsina	57
3. Meio de Cultura	58
4. Fluxo Laminar	58
5. Frascos de Cultura	59
6. Vidraria	59
7. Materiais Diversos	59
8. Equipamentos	60
9. Limpeza e Esterilização dos Equipamentos	60
10. Animais	61
11. Tumor T.E.G.S. 2047	61
12. Técnica de Transplante do Tumor para Manutenção <i>in vivo</i>	62
13. Células	63
13.1 Cultura Primária	63
13.2 Manutenção das Culturas	64

13.3 Observação das Células	65
13.3.a Microscópio de Contraste de Fase	65
13.3.b Microscopia Óptica de	65
14. Obtenção do Inóculo Celular	66
14.1 Contagem das Células	66
15. Armazenamento das Células	66
16. Tumores	67
17. Drogas	67
17.1 Ciclosporina (CS)	67
17.2 Azatioprina (AZA)	68
17.3 Metilprednisolona (MP)	68
17.4 Micofenolato Mofetil (MFM) ou CellCept (CC)	69
18. Descrição do Experimento	70
18.1 Fase 1	70
18.2 Fase 2	70
18.3 Fase 3	71
18.3.a Primeira Etapa	71
18.3.b Segunda Etapa	71
18.4 Hemograma	72
18.5 Punção Intracardíaca	72
18.6 Curva de Crescimento Tumoral	74
19. Análise Estatística	75
RESULTADOS	76
1. Fase 1	83
1.1 Crescimento do Tumor e Índice de Pega	83
1.2 Avaliação da Presença de Metástases	87

2. Fase 2	91
2.1 Crescimento do Tumor e Índice de Pega	91
2.2 Avaliação da Presença de Metástases	99
2.3 Avaliação do Hemograma	103
3. Fase 3	105
3.1 Primeira Etapa	105
3.2 Segunda Etapa	107
3.2.1 Crescimento do Tumor e índice de Pega	107
3.2.2 Avaliação da Presença de Metástases	113
3.2.3 Avaliação do Hemograma	114
4. Avaliação do índice Metastático Geral	117
5. Perfil dos Índices Leucocitários em Ratos Wistar	119
DISCUSSÃO	122
1. Imunossupressão x Neoplasias	122
2. Ciclosporina, sua ação no sistema imunológico e sua influência no desenvolvimento de metástases no modelo experimental do tumor T.E.G.S. 2047	124
3. Drogas imunossupressoras (Azatioprina e corticóide), suas ações no sistema imunológico e influência no desenvolvimento de metástases no modelo experimental do tumor T.E.G.S. 2047	135
4. Micofenolato mofetil (CellCept), sua ação no sistema imunológico e sua influência sobre a progressão tumoral no modelo experimental do tumor T.E.G.S. 2047	137
5. Influência da Ciclosporina, Azatioprina, Metilprednisolona e Micofenolato mofetil nos índices leucocitários dos animais com tumor T.E.G.S. 2047	140
CONCLUSÕES	142
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	144

ABREVIATURAS

ADCC:	Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo
AMF:	Ácido Micofenólico
APC:	Célula Apresentadora de Antígeno
AZA:	Azatioprina
cm:	Centímetro
COX 2:	Cicloxygenase II
CPHI:	Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe I
CPHII:	Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe II
CS:	Ciclosporina
dGTP:	desoxi- Trifosfato de Guanosina
DMSO:	Dimetil Sulfóxido
ELAM-1:	Endothelial Leucocyte Adhesion Molecule -1
EN:	Exterminadoras Naturais
FHM:	Fibro-histiocitoma Maligno Humano
CC:	CellCept
Gc:	Glicocorticóide
GAMF:	Glucuronídeo do Ácido Micofenólico
GMCSF:	Fator Estimulante de Colônia de Granulócitos e Macrófagos
GMP:	Monofosfato de Guanosina
gp:	Glicoproteína
GTP:	Trifosfato de Guanosina
h:	Hora
H-E:	Hematoxilina-Eosina
HEVEs:	“High Endothelial Venules” ou Vênulas Endoteliais Altas
i.p.:	Intraperitoneal
ICAM-1:	Intercellular Adhesion Molecule-1
IFN:	Interferon
IGg:	Imunoglobulina

IL-1:	Interleucina-1
IL-6:	Interleucina-6
IMPDH:	Inosina Monofosfato Desidrogenase
kDa:	Kilodalton
Kg:	Kilograma
LFA-1:	Lymphocyte-Functionig Antigen-1
LPS:	Lipopolissacarídeo
MEC:	Matriz Extracelular
mg:	Miligrama
mL:	Mililitro
mm:	Milímetro
MMF:	Micofenolato Mofetil
MP:	Metilprednisolona
6-MP:	6-Mercaptopurina
N:	Normal
ng:	Nanograma
NK:	Natural Killer
°C:	Grau Centígrado ou Célsius
P:	Passagem
PBS:	Solução Salina Tamponada de Fosfato
PLA₂:	Fosfolipase A
rpm:	Rotações por Minuto
s.c.:	Subcutâneo
SLe^x:	Sialyl Lw ^{is} ^x
T.E.G.S.:	Tumor Espontâneo na Região da Glândula Salivar
Ta:	T auxiliar
TAM:	Macrófagos Associados a Tumores
Tc:	T citotóxica
TD:	Tempo de Duplicação

TGF:	Fator de Crescimento de Fibroblasto
TNF:	Fator de Necrose Tumoral
Ts:	T supressor
UFC:	Universidade Federal do Ceará
v:	Volume
VCAM-1:	Vascular-Cellular Adhesion Molecula-1
VLA-4:	Very Late Antigen-4
x:	Vezes
μg:	Micrograma
μL:	Microlitro

Figura 01: Símbolos e Unidades de Medida utilizados no trabalho.

Figura 02: Função de Biotransformação da Medicação de Risco.

Figura 03: Estrutura química da Amiodarona.

Figura 04: Estrutura química da Quinidina.

Figura 05: Fórmula estrutural do Metoclopramida.

Figura 06: Representação esquemática das estruturas químicas.

Figura 10: Linhagem de células rTGM, linhagem de fibroblastos muridas em cultura, onde se pode observar que compõem o tumor: (1) Fibroblastos arredondados; (2). Micrófagos e (3) Macrófagos.

Figura 11: Microfotografia da linhagem rTGM, T.E.G.S. 2047, martelo 10x, coloração hematoxilina-eosina, corredor 40x.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01:** A Cascata Metastática Pg. 06
- Figura 02:** Representação esquemática da invasão da MEC pelas células tumorais (modificado de Venegas & Fleck, 1992). Pg.09
- Figura 03:** Adesão da célula tumoral ao endotélio capilar do órgão-alvo através de receptores presentes nas células tumorais e moléculas de adesão expressas pelas células endoteliais, com posterior invasão da MEC. Pg.18
- Figura 04:** Estrutura da Ciclosporina, um peptídeo cíclico hidrofóbico, formado por 11 aminoácidos (Modificado de Borel, 1994). Pg. 33
- Figura 05:** Mecanismo hipotético de ação da Ciclosporina (CS). Modificado de Borel (1994). Pg.36
- Figura 06:** Estrutura química da Metilprednisolona. Pg. 43
- Figura 07:** Estrutura química da Azatioprina (a) e 6-Mercaptoperquina (b). Pg. 46
- Figura 08:** Fórmula estrutural do Micofenolato Mofetil. Pg. 50
- Figura 09:** Representação esquemática da metodologia utilizada. Pg. 73
- Figura 10:** Linhagem de células FHM, derivadas do tumor T.E.G.S. 2047, mantidas em cultura, onde se pode evidenciar os dois tipos celulares que compõem o tumor: fusiformes, semelhantes à fibroblastos (1) e arredondadas (2). Microscópio invertido 200X. Pg. 77
- Figura 11:** Microfotografia da linhagem de células FHM, derivadas do tumor T.E.G.S. 2047, mantidas em cultura e posteriormente coradas com hematoxilina-eosina, onde se pode evidenciar os dois tipos celulares

que compõem o tumor: fusiformes, semelhantes à fibroblastos (1) e arredondadas (2). (a) HE 100X; (b) HE 400X. Pg. 78

Figura 12: Rato portador de tumor resultante da inoculação de 10^6 células da linhagem FHM, via s.c., obtidas a partir da cultura do tumor T.E.G.S. 2047. Pg. 79

Figura 13: Microfotografia mostrando o padrão histológico do tumor T.E.G.S 2047.: (a) HE 40; (b) corte histológico mostrando a disposição das células ao redor de um vaso, mostrando ainda áreas que lembram um padrão alveolar, HE 100. Pg. 80

Figura 14: Microfotografia tumor T.E.G.S. 2047, mostrando em: (a) padrão de células fusiformes, HE 400; e em (b) padrão de células arredondadas, HE 400. (a) HE 100X; (b) HE 400X. Pg. 81

Figura 15: Microfotografia do tumor T.E.G.S. 2047, mostrando figuras de mitose: em (a) figura típica de mitose, HE 1000; em (b) figura de mitose atípica, HE 1000. Pg. 82

Figura 16: Fotografia de tumores de animais dos grupos 2 (controle), abaixo da régua, e do grupo 1 (tratados com CS 10 mg/Kg/dia). Pode ser evidenciado um tamanho maior para os tumores do grupo 1, no mesmo período de tempo. Pg. 85

Figura 17: Curva de crescimento tumoral dos animais inoculados com o tumor T.E.G.S. (10^6 células da linhagem FHM) e tratados com Ciclosporina 10 mg/Kg/dia (grupo 3), em relação ao grupo controle (grupo 4), na Fase 1 do experimento. Pg. 86

Figura 18: Percentual de animais inoculados com o tumor T.E.G.S. 2047 (10^6 células da linhagem FHM) portadores de metástases no grupo 3 (tratados com Ciclosporina 10 mg/Kg/dia e grupo 4 (controle), na Fase 1 do experimento. Pg. 88

Figura 19: Fotografia de pulmões de animais inoculados com células FHM obtidas do fibrohistiocitoma T.E.G.S. 2047 e tratados com Ciclosporina na dose de 10 mg/Kg/dia. Pg. 89

Figura 20: Microfotografia de um foco metastático do tumor T.E.G.S 2047 em pulmão de rato inoculado com 1×10^6 células FHM e tratado com Ciclosporina 10 mg/Kg/dia. HE 100X. Pg. 90

Figura 21: Curva de crescimento tumoral dos animais inoculados com o tumor T.E.G.S. 2047 (10^6 células da linhagem FHM) e tratados com Ciclosporina 10 mg/Kg/dia (grupo 1), Azatioprina 4 mg/Kg/dia (grupo 2) e Metilprednisolona 1 mg/Kg/dia (grupo 3), em relação ao controle (grupo 4), na Fase 2 do experimento. Pg. 98

Figura 22: Percentual de animais inoculados com o tumor T.E.G.S. 2047 (10^6 células da linhagem FHM) portadores de metástases no grupo 1 (tratados com Ciclosporina 10 mg/Kg/dia), grupo 2 (tratados com Azatioprina 4 mg/Kg/dia), grupo 3 (tratados com Metilprednisolona 1 mg/Kg/dia) e grupo 4 (controle), na Fase 2 do experimento. Pg. 102

Figura 23: Níveis de leucócitos totais e contagem diferencial dos animais inoculados com o tumor T.E.G.S. 2047 (10^6 células da linhagem FHM) e tratados com Ciclosporina (CS) 10 mg/Kg/dia (grupo 1), Azatioprina (AZA) 4 mg/Kg/dia (grupo 2) e Metilprednisolona (MP) 1 mg/Kg/dia (grupo 3), em relação ao controle (grupo 4), na Fase 2 do experimento. Pg. 105

Figura 24: Curva de crescimento tumoral dos animais inoculados com o tumor T.E.G.S. 2047 (10^6 células da linhagem FHM) e tratados com Micofenolato mofetil (MMF) 20 mg/Kg/dia (grupo 1), em relação ao controle (grupo 2), na 2^a etapa da Fase 3 do experimento. Pg. 113

Figura 25: Níveis de leucócitos totais e contagem diferencial dos animais inoculados com o tumor T.E.G.S. 2047 (10^6 células da linhagem FHM) e tratados com Micofenolato mofetil (MMF) 20 mg/Kg/dia (grupo 1), em relação ao controle (grupo 2), na 2^a etapa da Fase 3 do experimento. Pg. 116

Figura 26: Percentual total de animais inoculados com o tumor T.E.G.S. 2047 (10^6 células da linhagem FHM) portadores de metástases nos animais tratados com Ciclosporina (CS), Azatioprina (AZA), Metilprednisolona (MP), Micofenolato Mofetil (MMF) e nos grupos controle, em todas as fases do experimento. Pg. 118

Figura 27: Comparação dos índices leucocitários entre os grupos controle de nosso experimento na Fase 2 e Fase 3 (2ª etapa), em relação aos índices obtidos a partir de um estudo realizado por Nunes (1994) em ratos Wistar do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (a), e leucograma de ratos Wistar adultos obtidos a partir de um estudo realizado por Cresskoff e colaboradores (1967) (b). Pg. 121

Figura 28: Esquema representativo da ação da Ciclosporina sobre a imunidade celular. CS (Ciclosporina), IL (Interleucina), TNF (Fator de necrose tumoral), IFN (interferon), EN (Exterminadoras Naturais), Ta (Linfócito T auxiliar), Tc (Linfócito T citotóxico), CAA (Célula apresentadora de antígeno). Pg. 128

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01:** Localização, função e principais ligantes das moléculas de adesão envolvidas na cascata metastática. Pg. 17
- Tabela 02:** Índice de “pega” dos tumores a partir da inoculação de 10^6 células FH1 via s.c. no dorso dos animais nos grupos da Fase 1 do experimento. Pg. 83
- Tabela 03:** Valores médios dos diâmetros e volumes do tumor T.E.G.S. observados nos animais do grupo 1 (inoculados com 10^6 células FHM, e tratados com CS 10 mg/Kg/dia) e do grupo 2 ou controle (inoculados com 10^6 células FHM) na Fase 1 do experimento, a cada dia de medição. Os volumes tumorais foram utilizados para a obtenção da curva de crescimento do tumor. Pg. 84
- Tabela 04:** Número de animais necropsiados com presença ou ausência de metástase pulmonar na Fase 1 do experimento. Pg. 87
- Tabela 05:** Índice de pega dos tumores a partir da inoculação de 10^6 células FHM via s.c. no dorso dos animais nos grupos da Fase 2 do experimento. Pg. 91
- Tabela 06:** Valores médios dos diâmetros e volumes do tumor T.E.G.S. observados nos animais do grupo 1 (inoculados com 10^6 células FHM e tratados com CS 10 mg/Kg/dia) na Fase 2 do experimento, a cada dia de medição. Os volumes tumorais foram utilizados para a obtenção da curva de crescimento do tumor. Pg. 93
- Tabela 07:** Valores médios dos diâmetros e volumes do tumor T.E.G.S. observados nos animais do grupo 2 (inoculados com 10^6 células FHM e tratados com Azatioprina 4 mg/Kg/dia) na Fase 2 do experimento, a cada dia de medição. Os volumes tumorais foram utilizados para a obtenção da curva de crescimento do tumor. Pg. 94
- Tabela 08:** Valores médios dos diâmetros e volumes do tumor T.E.G.S. observados nos animais do grupo 3 (inoculados com 10^6 células FHM e tratados com Metilprednisolona 1 mg/Kg/dia) na Fase 2 do

experimento, a cada dia de medição. Os volumes tumorais foram utilizados para a obtenção da curva de crescimento do tumor. Pg. 95

Tabela 09: Valores médios dos diâmetros e volumes do tumor T.E.G.S. observados nos animais do grupo 4 (inoculados com 10^6 células FHM, controle) na Fase 2 do experimento, a cada dia de medição. Os volumes tumorais foram utilizados para a obtenção da curva de crescimento do tumor. Pg. 96

Tabela 10: Comparação entre os valores médios dos volumes do tumor T.E.G.S. observados nos animais dos quatro grupos experimentais na Fase 2 do experimento, a cada dia de medição. Os volumes tumorais foram utilizados para a obtenção da curva de crescimento do tumor. Pg. 97

Tabela 11: Número de animais necropsiados, com presença ou ausência de metástase pulmonar, na Fase 2 do experimento. Pg. 101

Tabela 12: Leucograma dos animais do grupo 4 (inoculados com 10^6 células FHM, controle), grupo 1 (inoculados com 10^6 células FHM, e tratados com CS 10 mg/Kg/dia), grupo 2 (inoculados com 10^6 células FHM, e tratados com Azatioprina 4 mg/Kg/dia) e grupo 3 (inoculados com 10^6 células FHM, e tratados com Metilprednisolona 1 mg/Kg/dia) na Fase 2 do experimento. Pg. 104

Tabela 13: Índice de pega dos tumores a partir da inoculação de 10^6 células FHM via s.c. no dorso dos animais nos grupos da 2^a etapa da Fase 3 do experimento. Pg. 107

Tabela 14: Valores médios dos diâmetros e volumes do tumor T.E.G.S. observados nos animais do grupo 1 (inoculados com 10^6 células FHM e tratados com Micofenolato Mofetil) na 2^a etapa da Fase 3 do experimento, a cada dia de medição. Os volumes tumorais foram utilizados para a obtenção da curva de crescimento do tumor. Pg. 109

Tabela 15: Valores médios dos diâmetros e volumes do tumor T.E.G.S. observados nos animais do grupo 2 (inoculados com 10^6 células FHM, controle) na 2^a etapa da Fase 3 do experimento, a cada dia de medição. Os volumes tumorais foram utilizados para a obtenção da

curva de crescimento do tumor.

Pg. 110

Tabela 16: Comparação entre os valores médios dos volumes do tumor T.E.G.S. observados nos animais do dois grupos experimentais na 2^a etapa da Fase 3 do experimento, a cada dia de medição. Os volumes tumorais foram utilizados para a obtenção da curva de crescimento do tumor.

Pg. 111

Tabela 17: Comparação entre os valores médios dos volumes do tumor T.E.G.S. observados nos animais tratados com Ciclosporina (CS), Azatioprina (AZA), Metilprednisolona (MP), Micofenolato mofetil (MMF) e seus respectivos grupos controle, em todas as 3 fases do experimento, a cada dia de medição.

Pg. 112

Tabela 18: Número de animais necropsiados com presença ou ausência de metástases pulmonares na 2^a etapa da Fase 3 do experimento. Pg. 114

Tabela 19: Leucograma dos animais do grupo 4 (inoculados com 10^6 células FHM, controle), grupo 1 (inoculados com 10^6 células FHM, e tratados com CS 10 mg/Kg/dia), grupo 2 (inoculados com 10^6 células FHM, e tratados com Azatioprina 4 mg/Kg/dia) e grupo 3 (inoculados com 10^6 células FHM, e tratados com Metilprednisolona 1 mg/Kg/dia) na Fase 2 do experimento. Pg. 115

Tabela 20: Índices leucocitários obtidos a partir de um estudo realizado por Nunes e colaboradores (1994) em ratos Wistar do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará.

Pg. 199

Tabela 21: Leucograma de ratos Wistar adultos obtidos a partir de um estudo realizado por Cresskoff e colaboradores (1967).

Pg. 120

INTRODUÇÃO

1. Relevância do Trabalho

As metástases (ou tumores secundários) constituem a principal causa de falha no tratamento oncológico, marcando o limite entre a possibilidade ou não de cura dos tumores malignos (Weiss, 1977; Fidler et al., 1978; Nicolson, 1984). A maioria das mortes por câncer é causada por tumores secundários resistentes à terapia (Fidler & Hart, 1982; Fidler & Poste, 1985; Fidler & Balch, 1987). Sabe-se que, por ocasião do diagnóstico de um tumor sólido, cerca de 30% dos pacientes já se apresentam com metástases clinicamente detectáveis, sendo considerados em sua maior parte como incuráveis (Liotta & Stetler-Stevenson, 1985). Entre os 70% restantes, ditos “livres” de tumores secundários, 35% possuem micrometástases, ou seja, implantes microscópicos considerados de impossível detecção pelos métodos de imagem disponíveis na atualidade (Venegas & Fleck, 1992).

Uma vez que os processos imunológicos envolvidos na rejeição de transplantes são semelhantes à imunologia antitumoral (Abbas et al., 1984a; Roitt, et al., 1992a; Herberman, 1995), tem sido observado, na prática clínica, que pacientes transplantados recebendo agentes imunossupressores têm mostrado uma incidência aumentada de doenças linfoproliferativas ou outros tumores (Penn & Starzl, 1993). A incidência de tumores seria cerca de 25 vezes maior nos receptores de transplante do que na população em geral (Fraumeni & Hoover, 1977). Azatioprina associada ao corticosteróide constituiu o esquema clássico de imunossupressão para transplantes de órgãos permitindo um grau de sucesso razoável. A sobrevida a longo prazo, contudo, estava longe da ideal (Marino & Doyle, 1994). A Ciclosporina teve seu início de utilização prática nos anos 80,

sendo a responsável pela disseminação dos transplantes de órgãos como terapia corrente em nosso mundo (Kahan, 1989). Os primeiros resultados, entretanto, de tumores ocorrendo *de novo* em pacientes transplantados renais, tratados com Ciclosporina, datam de 1987. Essas neoplasias pareciam diferir daquelas descritas após terapia imunossupressora convencional com Azatioprina e corticosteróides, com uma maior incidência e menor tempo de surgimento de tumores (Penn, 1987). Villardel e colaboradores (1992) observaram o surgimento *de novo* de 31 casos de malignidade entre 949 pacientes que receberam transplante renal. Em 1987, Penn (1987) relatou o desenvolvimento de malignidades em 141 pacientes receptores de transplante de órgãos tratados com Ciclosporina, a partir de dados enviados ao centro *Cincinnati Transplant Registry*, em Ohio. Nakamoto e colaboradores (1994) descreveram, em 1994, um caso de carcinoma de células renais com metástases ósseas surgido em um rim nativo de paciente que havia sido submetido a um transplante renal de doador vivo, tendo sido imunossuprimido com Ciclosporina, Azatioprina e Prednisolona. O Micofenolato Mofetil (CellCept), por sua vez, é uma droga nova que tem mostrado resultados promissores em terapias de resgate em rejeições refratárias, sendo usada principalmente em substituição à Azatioprina em casos de intolerância à mesma, não tendo ainda evidências clínicas de desenvolvimento de neoplasias (van Gelder et al., 1997; Noronha et al., 1997; Barbuto et al., 1998).

Com base nessas evidências clínicas, tornou-se relevante observar experimentalmente se a Ciclosporina, bem como as outras drogas supracitadas, isoladamente, levavam ao desenvolvimento de metástases em um modelo de tumor de rato de baixo índice metastático.

2. Metástases

Metástases são tumores secundários que crescem em sítios distantes, a partir de células originárias de um tumor primário maligno constituído de populações celulares heterogêneas. Constituem, assim, lesões cancerosas que não mantêm contigüidade com o tumor primário. A capacidade de metastatização é característica das neoplasias malignas que, por sua invasividade local, penetram nos vasos linfáticos, sanguíneos e cavidades corporais, criando assim oportunidade para sua disseminação (Venegas & Fleck, 1992).

2.1 Heterogeneidade tumoral

O maior obstáculo na erradicação das metástases é o fato das células cancerosas serem biologicamente heterogêneas no tumor primário e principalmente, nos tumores secundários. Estudos em camundongos têm revelado que embora milhões de células tumorais sejam lançadas na circulação a cada dia, apenas poucas metástases são produzidas (Fidler, 1970). A base para a aparente ineficiência desse processo é a heterogeneidade das células tumorais em relação ao potencial metastático, de modo que apenas poucos subclones possuem a combinação correta de produtos gênicos para completar todos os passos no processo de metastatização (Cotran et al., 1994). Segundo a hipótese genética do câncer, a maioria dos tumores é monoclonal em sua origem, resultando da expansão clonal de uma única célula progenitora que incorreu em dano genético (Fialkow, 1979; Hart & Fidler, 1981; Killion & Fidler, 1989; Cotran et al., 1994). Os tumores, entretanto, ao se tornarem clinicamente evidentes, são constituídos de células extremamente heterogêneas, uma vez que, durante o processo de progressão tumoral, ocorrem múltiplas mutações que se acumulam de maneira independente nas diferentes células (Hart & Fidler, 1981; Cotran et al.,

1994). Surgem, então, subpopulações celulares que diferem no que diz respeito a vários atributos fenotípicos, tais como: invasividade, velocidade de crescimento, capacidade metastática, alterações cariotípicas, responsividade hormonal, suscetibilidade a drogas antineoplásicas, antigenicidade e imunogenicidade (Fidler, 1978; Poste & Fidler, 1980; Hart & Fidler, 1981; Killion & Fidler, 1989; Cotran et al., 1994).

2.2 Angiogênese

O suporte inicial de nutrientes para uma célula em expansão pode ser obtido através de difusão simples. Uma vez que a massa tumoral tenha excedido um certo tamanho, o processo de difusão, entretanto, não vai mais ser capaz de prover nutrientes para o cerne, o qual vai tornar-se rapidamente necrótico (Folkman, 1974). A formação de uma massa tumoral maior que 2 mm de diâmetro deve ser seguida de um processo de neoangiogênese, ou a formação de novos capilares sanguíneos (Folkman, 1985; Folkman et al, 1989). As células tumorais, entretanto, devem produzir seus próprios fatores angiogênicos ou induzir células do hospedeiro a produzi-los (Folkman & Klagsburn, 1987). Tal processo de neoformação vascular, além de prover um suporte nutricional para o crescimento das células tumorais, é um passo crítico para a disseminação metastática (Macchiarini et al., 1992; Cotran et al., 1994). Uma característica desses vasos neoformados, importante para o processo de metastatização, é que eles são defeituosos e facilmente invadidos pelas células (Folkman, 1985).

3. A Cascata Metastática

O processo de metastatização envolve uma série de passos complexos que devem ser cumpridos pelas células tumorais, para que as mesmas possam crescer formando tumores secundários em sítios distantes. Ao conjunto dessas etapas podemos chamar de “cascata metastática” (Venegas & Fleck, 1992), a qual envolve numerosas associações entre a célula tumoral e a célula do hospedeiro, bem como entre a célula tumoral e a matriz extracelular (Fidler & Hart, 1982; Liotta et al., 1983; MacDonald & Steeg, 1993). A cascata metastática inclui a invasão local pelas células do tumor primário, penetração na circulação próxima ao tumor, embolização com células sanguíneas, extravasamento e ancoragem ao órgão-alvo (Liotta, 1986), como mostrado na **figura 01**.

A proliferação descontrolada das células neoplásicas no processo de progressão tumoral leva ao aumento do volume tumoral até que, em um determinado momento, ele passa da condição de neoplasia *in situ* para neoplasia invasora (Venegas & Fleck, 1992). Essa transição é definida pela habilidade das células tumorais de invadir tecidos locais e cruzar barreiras teciduais (Stracke & Liotta, 1995).

3.1 Deslocamento das Células da Massa Tumoral e o Papel das Caderinas

A cascata metastática tem início com o deslocamento de células da massa tumoral de origem. Essa separação implica na quebra da adesão intercelular normal responsável pela manutenção da integridade tecidual. As moléculas responsáveis por essa adesão são as caderinas. Elas são glicoproteínas de superfície de membrana capazes de mediar a adesão homotípica célula-célula, dependente de cálcio (Hart & Saini, 1992; Liotta, 1992; Buck, 1995; Stracke

Carcinógenos

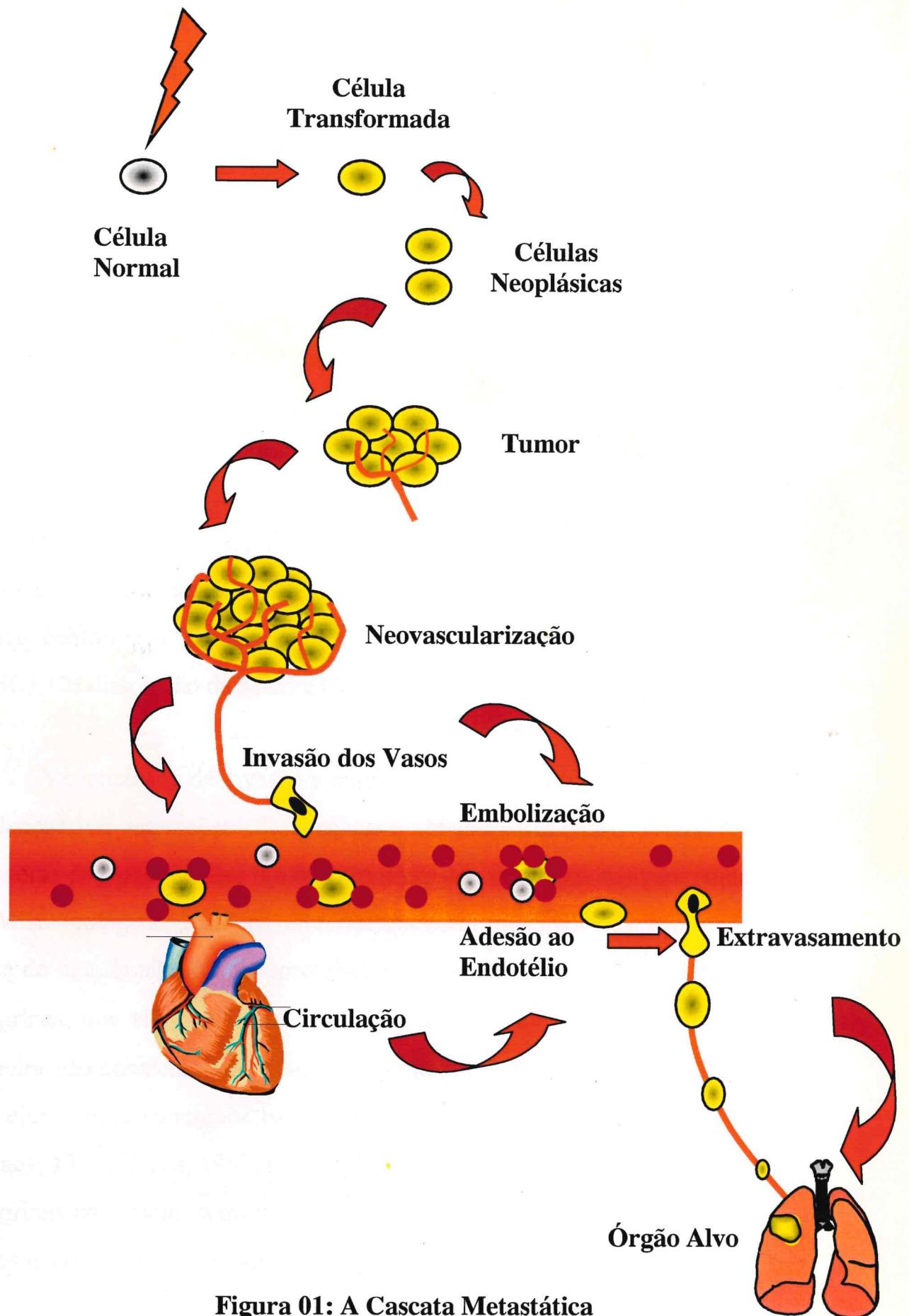


Figura 01: A Cascata Metastática

& Liotta, 1995; Hart, 1996). Os três principais membros dessa família são: E-caderina (E de células epiteliais), N-caderina (N de tecido neural e muscular) e P-caderina (P de placenta), nomeados de acordo com o tipo celular e tecido dos quais foram inicialmente isolados (Herrenknecht, 1996). Análises clínicas de espécimes de tumores (carcinomas) humanos têm mostrado uma correlação inversa entre a expressão de E-caderinas e o estágio de progressão tumoral, sendo a perda de sua função diretamente associada a invasão tumoral e metástase (Takeichi, 1991; Hart, 1996; Menger & Vollmar, 1996).

3.2 Invasão da Matriz Extracelular (MEC)

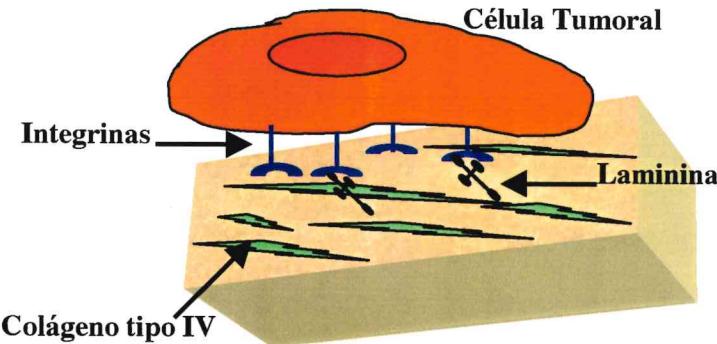
O próximo passo seria a invasão da MEC pelas células malignas. Segundo Liotta e colaboradores (1988), o processo de invasão das células neoplásicas ocorre conforme a Teoria dos Três Passos: (1) adesão à matriz extracelular (MEC); (2) dissolução da MEC e (3) locomoção e migração.

A capacidade de invasão e migração das células tumorais é controlada por mudanças nas interações célula-célula e célula-matriz (Hart, 1996). As células invasoras devem expressar um número adequado de receptores para componentes da MEC (colágeno, laminina, fibronectina e vitronectina). Tais receptores fazem parte de uma família de glicoproteínas de superfície de membrana denominados integrinas, que são heterodímeros constituídos de uma subunidade α ligada de maneira não covalente a uma subunidade β . Elas são requeridas para a interação da célula com a membrana basal e uma posterior migração através do interstício (Hynes, 1987; Hynes, 1992; Buck, 1995; Stracke & Liotta, 1995). A expressão de integrinas nas células tumorais está sujeita a regulação, respondendo a citocinas como o TGF- β (Heino & Massague, 1989; Buck, 1995).

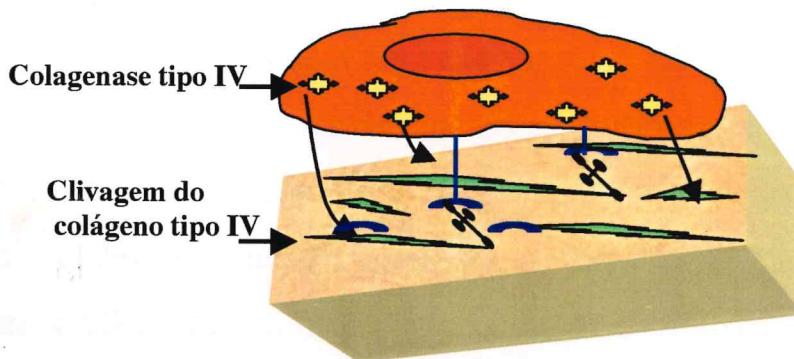
Após a ligação aos elementos da MEC, deve haver uma degradação enzimática ativa de seus componentes (estroma e membrana basal endotelial), permitindo a migração da célula (Contran et al., 1994). Ocorre um processo cíclico de ligação aos componentes da MEC e subsequente liberação de enzimas proteolíticas, de forma direcionada e controlada (Liotta, 1986; Stracke & Liotta, 1995). Há três classes de proteases identificadas: serinas, cisteínas e metaloproteinases (representada pelas colagenases) (Contran et al., 1994). As células tumorais, além de secretarem enzimas proteolíticas, induzem células do hospedeiro (ex.: fibroblastos e macrófagos infiltrantes) a fazê-lo. As células metastáticas mostram uma preferência de ligação ao colágeno tipo IV. A lise enzimática gera, ainda, frações de colágenos e de outros componentes da MEC que são estimuladores da angiogênese, construindo assim um ambiente favorável à manutenção da viabilidade celular e facilitador da progressão tumoral. A migração celular é, dessa maneira, um pré-requisito básico em vários estágios da invasão tecidual, como no destacamento da célula a partir do tumor primário, sua infiltração nos tecidos vizinhos e nos processo de intra e extravasamento vascular (Venegas & Fleck, 1992). Ela parece estar relacionada à produção de citocinas e de alguns fatores de crescimento pelas células neoplásicas (fatores de motilidade autócrinos) (Cotran et al., 1994), dependendo ainda da atividade quimiotática dos próprios produtos de degradação da matriz (fatores de motilidade parácrinos) (Liotta, 1992; Stracke & Liotta, 1995). A **figura 02** mostra a representação esquemática da invasão da MEC pelas células tumorais.

3.3 Circulação Sangüínea

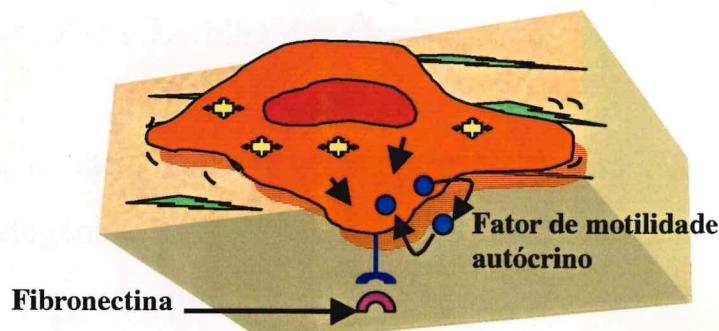
As células ganham acesso à circulação sangüínea após atravessar a membrana basal e o interstício, penetrando nos vasos sanguíneos, onde tendem a formar êmbolos tumorais. Os êmbolos são agregados de células circulantes



a) Adesão da célula tumoral à MEC



b) Secreção de enzimas líticas e degradação da MEC pela célula tumoral.



c) Migração da célula tumoral através da MEC.

Figura 02: Representação esquemática da invasão da MEC pelas células tumorais (modificado de Venegas & Fleck, 1992).

mantidos por interações homotípicas entre as células tumorais (mediadas por caderinas) e por interações heterotípicas com outras células, principalmente plaquetas (McCormic & Zetter, 1992). Uma vez na circulação, as células tumorais são particularmente vulneráveis à destruição pelas defesas imunes naturais e adaptativas do hospedeiro, bem como às condições hidrodinâmicas desfavoráveis. Os êmbolos tumorais parecem aumentar a sobrevivência das células na circulação, funcionando como uma “máscara” para o sistema imunológico, além de facilitar sua implantação nos capilares sanguíneos (Liotta & Stetler-Stevenson, 1985; Cotran et al., 1994).

O extravasamento das células tumorais em sítios distantes envolve a adesão ao endotélio do órgão-alvo, através de ligantes específicos nas células endoteliais e de receptores nas células tumorais. As células tumorais causam então uma retração das células endoteliais expondo a membrana basal, e aderindo posteriormente à MEC (Zetter, 1990; McCormic & Zetter, 1992; Hart & Saini, 1992). A infiltração do tecido alvo pelas células tumorais envolve exatamente o mesmo processo de lise de membrana basal e tecido conjuntivo intersticial já descrito acima (Liotta, 1986).

3.4 Disseminação Vascular e Escolha dos Órgãos-Alvo

Historicamente, há duas teorias para explicar a sítio especificidade durante a disseminação hematogênica das células tumorais. A primeira, a hipótese “da semente e do solo”, proposta por Paget em 1889 (Paget, *apud* Buck, 1995), explicava a tendência de certos tumores em metastatizar para determinados sítios específicos. Segundo Paget, esses tecidos-alvo teriam a capacidade de prover o alojamento e crescimento das células derivadas desse tumor. Quarenta anos após, James Ewing (Ewing, *apud* Buck, 1995) recusou tal teoria, argumentando que,

embora certos tumores parecessem colonizar determinados órgãos em especial, tal fato poderia ser atribuído às rotas da vascularização sanguínea que drenariam o tumor primário. O primeiro órgão encontrado pelas células tumorais seria o principal sítio de parada e o de maior número de colônias metastáticas. Ewing atribuía a grande incidência de metástases pulmonares ao fato deste ser o primeiro sítio encontrado pela maioria das células tumorais após elas serem espalhadas na circulação venosa. A hipótese de Ewing ficou conhecida como teoria mecânica da disseminação metastática (Zetter, 1990). Após sessenta anos de observações e experimentos, sabe-se hoje que ambas as teorias estão parcialmente corretas. Certos órgãos como coração, pele e músculo esquelético, como Paget havia notado, são raramente locais de metástases, apesar do amplo fluxo sanguíneo (Zetter, 1990). Alguns tumores, por outro lado, podem colonizar vários sítios, sendo que o primeiro órgão encontrado, ou o de maior fluxo sanguíneo, vai ser o local mais comum de formação de colônias, como o fígado, por exemplo, ou os linfonodos proximais de drenagem (Buck, 1995). Sabe-se, no entanto, que o crescimento nesses sítios depende de uma MEC apropriada, bem como da liberação de citocinas e fatores angiogênicos oriundos da matriz circulante (Klagsbrun, 1991), como proposto na hipótese da semente e do solo. Outros tumores são mais seletivos, passando por órgãos proximais e colonizando somente órgãos específicos distais (Sugarbaker, 1981; Zetter, 1990). O carcinoma de próstata, por exemplo, metastatiza preferencialmente para o osso, o carcinoma broncogênico, para o cérebro e adrenais, o neuroblastoma, para fígado e osso e o carcinoma de células renais, para a tireoide (Cotran et al., 1994). Sítios específicos parecem ser escolhidos pelas células tumorais circulantes, demonstrando um processo de interação entre a célula tumoral e o órgão-alvo, ao que denominamos tropismo seletivo ou sítio-especificidade (Venegas & Fleck, 1992). Em um estudo pioneiro, Kinsey (1960) transplantou órgãos para sítios ectópicos em camundongos singênicos e mostrou que células tumorais que

normalmente metastatizavam para o pulmão, metastatizaram para o pulmão desses animais bem como para o tecido pulmonar ectopicamente localizado, mas não para outros órgãos. Em 1964, Greene and Harvey (1964) propuseram que essa sítio-especificidade devia-se a uma ligação inicial entre a célula tumoral e moléculas de adesão na superfície luminal das células endoteliais. Auerbach e col. (1987) confirmaram essa teoria em uma série de experimentos, onde células tumorais com diferentes sítio-especificidades foram incubadas com uma cultura de células endoteliais da microcirculação isoladas de diferentes órgãos murinos. As células tumorais aderiram seletivamente às células endoteliais derivadas de seus órgãos-alvo específicos.

3.4.1 Interação Célula Tumoral - Célula Endotelial

As teorias correntes sobre sítio-especificidade estão baseadas no conhecimento atual das moléculas de adesão. Segundo tais teorias, receptores de adesão expressos nas células tumorais vão interagir com moléculas de adesão específicas presentes nos capilares endoteliais do órgão-alvo (Zetter, 1990; Buck, 1995). As principais famílias de moléculas de adesão expressas pelas células neoplásicas são as caderinas, as integrinas, a família das imunoglobulinas, selectinas e CD44 (uma molécula que não se enquadra em nenhum dos grupos) (Hart, 1996). O grupo das caderinas já foi descrito anteriormente. As integrinas, já mencionadas como ligantes para componentes da MEC, podem atuar ainda como ligantes para receptores da família das imunoglobulinas (Hart, 1996).

3.4.1.a Superfamília das Imunoglobulinas

As moléculas de adesão da superfamília das imunoglobulinas contêm um domínio típico de imunoglobulina na sua porção extracelular (Hart, 1996). As

moléculas desse grupo de maior importância na cascata metastática são as envolvidas na adesão da célula tumoral ao endotélio, como a VCAM-1 (Vascular-Cellular Adhesion Molecule-1) e a ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1).

A VCAM-1 é expressa na superfície luminal das células endoteliais, tendo sua expressão induzida por citocinas como TNF- α , IL-1 e LPS. Serve como ligante para a integrina $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) (Osborn et al., 1989; Hart, 1996; McCormic & Zetter, 1992). A integrina VLA-4 (“very late antigen-4”) é expressa em vários tipos de células tumorais, incluindo rhabdomiossarcoma, neuroblastoma, melanoma, bem como em células neoplásicas linfóides (Hart, 1996). A VCAM-1 também está envolvida na adesão de linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos e células EN (Exterminadoras Naturais) ao endotélio vascular através das integrinas $\alpha_4\beta_1$ e $\alpha_4\beta_7$ (Menger & Vollmar, 1996). Hart e colaboradores (1991) sugeriram, então, que as células tumorais circulantes poderiam preparar o leito vascular do órgão-alvo para a adesão, através de citocinas que induziriam a expressão de moléculas de adesão no endotélio.

A molécula ICAM-1 é expressa em células endoteliais, bem como em uma variedade de outros tipos celulares, como nas células hematopoiéticas (Springer, 1990; Menger & Vollmar, 1996). Em condições normais, ela está presente em baixos níveis na célula endotelial, sendo sua expressão dramaticamente aumentada após estimulação por IL-1, TNF- α , IFN- γ , IL-6 e endotoxina (LPS) (McCormic & Zetter, 1992; Menger & Vollmar, 1996). A ICAM-1 funciona como um ligante para a integrina $\alpha L/\beta 2$ (LFA-1 ou “lymphocyte-functioning antigen”) expressa nos linfócitos e em tumores, e para CD11b e CD11c nos neutrófilos (Marlin & Springer, 1987; McCormic & Zetter, 1992).

O papel mais importante da ICAM-1 e VCAM na cascata metastática seria exatamente facilitar o extravasamento das células tumorais para o órgão-alvo, através de sua expressão nas células endoteliais. Essas moléculas, entretanto, têm sido identificadas nas próprias células tumorais. A freqüência da expressão de ICAM-1 é baixa na maioria dos tumores, exceto nos melanomas e certos carcinomas de células escamosas (Buck, 1995). Essa expressão em tumores, ao contrário da expressão em células endoteliais, pode colocar a célula tumoral em desvantagem, já que os linfócitos interagem com a célula alvo via interação com a ICAM-1 expressa no tumor (Springer, 1990; Buck, 1995; Hart, 1996).

3.4.1.b Selectinas

As selectinas representam um grupo de moléculas de adesão composto de três membros bem caracterizados, denominados E-, P- e L-selectina, respectivamente. Os membros da família das selectinas têm uma estrutura em comum, consistindo em um domínio lectínico amino terminal dependente de cálcio no qual vão se ligar os carboidratos, um outro domínio similar ao fator de crescimento epiderme, e um terceiro relacionado à família das proteínas reguladoras do complemento (McCormic & Zetter, 1992; Hart, 1996).

A E-selectina (E de endotélio), referida também como ELAM-1 (“Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule”) é expressa nas células endoteliais mediante indução por citocinas como IL-1, TNF, IFN- γ e LPS (Hart, 1996; McCormic & Zetter, 1992; Buck, 1995). A L-selectina (L de leucócito) é expressa em linfócitos, neutrófilos, macrófagos, monócitos e células EN (Exterminadoras Naturais). Ela é expressa constitutivamente na superfície dos linfócitos (Springer, 1994; Buck, 1995). A P-selectina (P de plaqueta) encontra-se armazenada nas células endoteliais e nas plaquetas. São expressas rapidamente

após estímulos por citocinas, trombina, histamina, complemento e radicais de oxigênio (Buck, 1995; Hart, 1996).

As selectinas, através de seu domínio lectínico, ligam-se a carboidratos nas superfícies celulares, especialmente aos que contêm a estrutura SLe^x (“sialyl Lewis x”) (McCormic & Zetter, 1992; Lasky, 1992; Paulson, 1994). Essa interação selectina-açúcar serve para orientar os leucócitos em direção ao endotélio, tirando as células do fluxo sanguíneo e iniciando um processo conhecido como “rolling”, onde os leucócitos “rolam” ao longo da superfície endotelial, permitindo uma interação posterior mais forte das integrinas com as moléculas de adesão endoteliais (Buck, 1995). Certas neoplasias epiteliais, como carcinomas de colon e pulmão, parecem expressar SLe^x, que serve como ligante para E-selectina. O nível de expressão de SLe^x encontrado em certos tumores parece estar correlacionado com a sua capacidade de formar metástases à distância (McCormic & Zetter, 1992; Hart, 1996). Os mecanismos de extravasamento dos leucócitos normais para sítios inflamatórios, e de extravasamento das células tumorais nos órgãos-alvo parecem ser similares. A interação selectina-açúcar poderia, então, aproximar a célula tumoral circulante expressando SLe^x ao endotélio capilar expressando selectinas, possibilitando que ocorra uma ligação subsequente, mais estável, das integrinas tumorais com as moléculas de adesão endoteliais (Buck, 1995; Hart, 1996).

3.4.1.c CD44

O CD44 foi originalmente identificado como molécula envolvida no “homing” de linfócitos, ou seja, na ligação de linfócitos às HEVs (“high endothelial venules” ou vênulas endoteliais altas) e seu movimento subsequente para os linfonodos. É uma glicoproteína transmembrana de 90 kDa capaz de

ligar-se ao ácido hialurônico (McCormic & Zetter, 1992; Buck, 1995). A expressão de formas variantes de CD44 em células tumorais parece estar correlacionada com o aumento do potencial metastático de vários tumores (Buck, 1995; Hart, 1996; Gunthert et al., 1991).

A **tabela 01** resume a função, localização e ligantes das principais moléculas de adesão envolvidas na cascata metastática. A **figura 03** mostra uma representação esquemática do mecanismo de adesão da célula tumoral ao epitélio do órgão-alvo.

3.5 Viabilização das Metástases

Uma vez no órgão-alvo, a célula metastática deve sobreviver em seu novo ambiente, proliferar formando uma colônia tumoral e escapar do controle do sistema imunitário (Venegas & Fleck, 1992). A formação bem sucedida de um implante metastático requer que a célula tumoral encontre um micro ambiente capaz de prover seu desenvolvimento através da produção de fatores de crescimento. Linhagens celulares altamente metastáticas parecem produzir os próprios fatores de crescimento autócrinos necessários, com alguns deles estimulando, também, a motilidade quimiotática nas células tumorais (Todaro et al., 1980; Anzano et al., 1983; Huff et al., 1986; Halaban et al., 1988; Liapi et al., 1990; Stracke & Liotta, 1995). A viabilização dessa metástase, entretanto, vai depender, fundamentalmente, da neovascularização tumoral e, uma vez adquirido um certo tamanho, a própria metástase pode metastatizar (Hart & Fidler, 1981; Hart & Fidler, 1980).

Tabela 01: Localização, função e principais ligantes das moléculas de adesão envolvidas na cascata metastática.

Molécula de adesão	Ligante	Localização	Função
E-Caderinas	Caderinas	Células de carcinomas	Adesão célula a célula mantendo as conexões intercelulares.
VCAM-1	VLA-4	Superfície luminal das células endoteliais	Adesão entre a célula endotelial do órgão-alvo (VCAM-1) e a célula tumoral (VLA-4).
ICAM-1	LFA-1	Células endoteliais/ Célula tumoral	Adesão entre a célula endotelial do órgão-alvo (ICAM-1) e a célula tumoral (LFA-1)/ interação entra a célula tumoral (ICAM-1) e linfócito Tc ou célula EN (LFA-1).
ELAM-1	SLe ^x	Células endoteliais	Aproximar a célula tumoral circulante expressando SLe ^x ao endotélio do órgão-alvo (ELAM-1).
CD44	Ácido hialurônico	Célula tumoral	Ligaçao às HEV's no tecido linfóide.
Integrínas	Componentes da MEC/ VCAM-1 / ICAM-1	Célula tumoral/ Linfócitos	Ligaçao entre a célula tumoral e a MEC/ Adesão entre a célula endotelial do órgão-alvo (VCAM-1 ou ICAM-1) e a célula tumoral (VLA-4 ou LFA-1)/ Interação entra a célula tumoral (ICAM-1) e linfócito Tc ou célula EN (LFA-1).

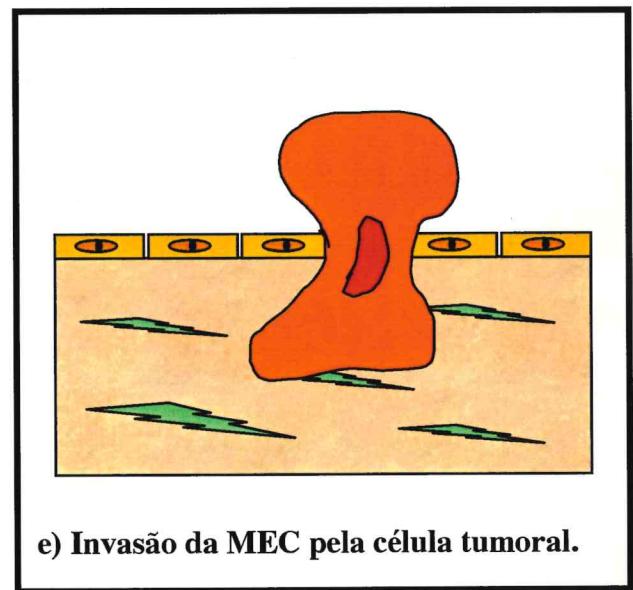
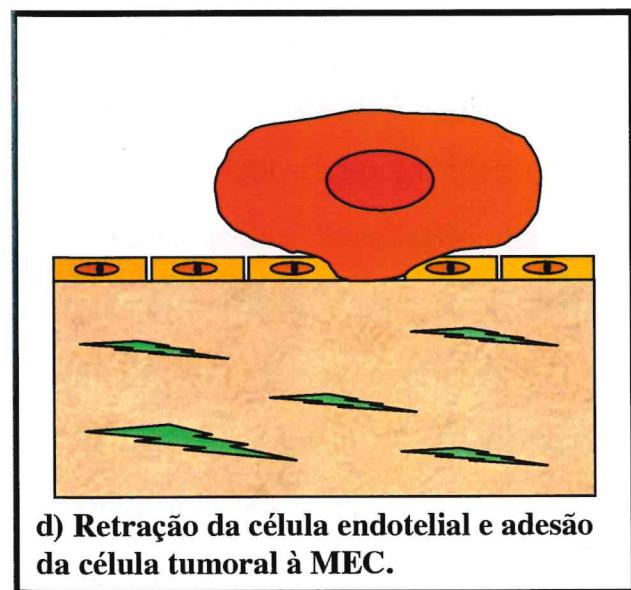
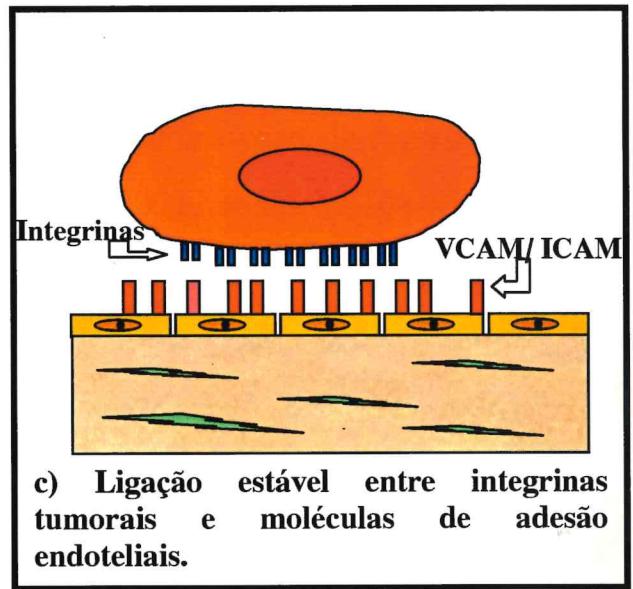
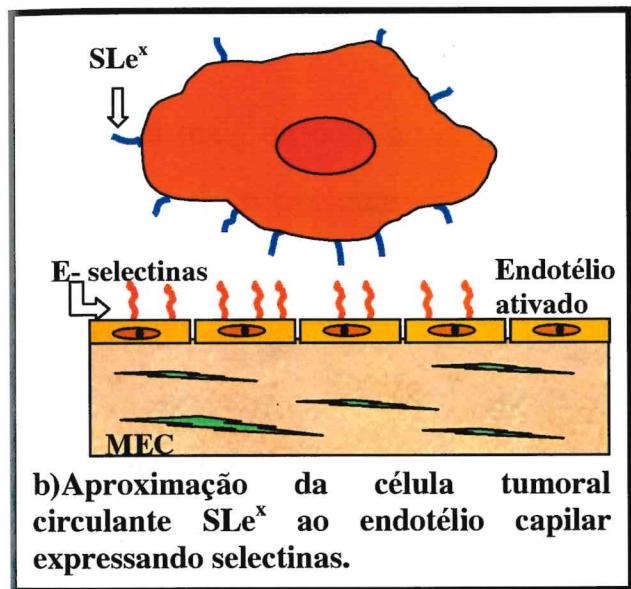
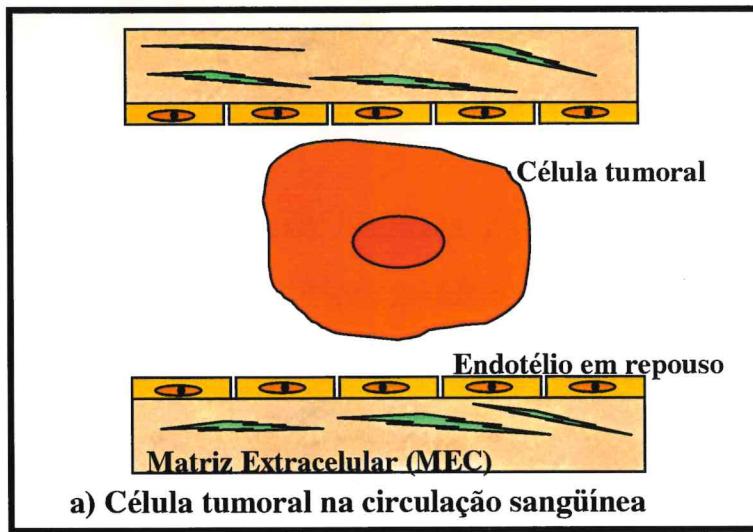


Figura 03: Adesão da célula tumoral ao endotélio capilar do órgão-alvo através de receptores presentes nas células tumorais e moléculas de adesão expressas pelas células endoteliais, com posterior invasão da MEC.

4. Imunologia Tumoral

Durante todos os estágios da “cascata metastática” e principalmente na circulação sanguínea, as células tumorais devem interagir com as células de defesas do organismo (Venegas & Fleck, 1992). A imunidade adaptativa, induzida por抗ígenos tumorais, é semelhante àquela evocada contra transplantes, dependente do reconhecimento de抗ígenos glicoprotéicos de membrana por linfócitos T (Roitt et al., 1992 a).

Há mais de cem anos, William Coley descreveu um caso de regressão de sarcoma após o paciente apresentar um severo ataque de erisipela. Ele observou então o efeito de culturas de estreptococos inativados pelo calor, injetadas em pacientes com câncer, levando à regressão de certos sarcomas. Conclui então, à época, que alguns fatores solúveis dessa cultura seriam responsáveis pela regressão tumoral, os quais foram chamados de “toxinas de Coley”. Posteriormente, na década de 40, Shear e colaboradores, estudando um dos componentes das toxinas de Coley, obtiveram frações ricas em polissacarídeos e livres de proteínas, 1000 vezes mais potentes que as toxinas de Coley em induzir hemorragia e necrose em sarcomas subcutâneos em camundongos. Na década de 70, esse polissacarídeo foi identificado como sendo uma endotoxina, o LPS ou lipopolissacarídeo localizado na parede de bactérias gram negativas. Foi descoberto, então, que a regressão tumoral devia-se à presença, no soro do camundongo estimulado com LPS, de um fator que causava necrose hemorrágica de tumores *in vivo*, e que tem um efeito citotóxico ou citostático sobre células tumorais *in vitro*, o qual foi denominado de Fator de Necrose Tumoral ou TNF, sendo sua principal fonte o fagócito mononuclear ativado por LPS (Oettgen & Old, 1987; Browning & Dagleish, 1996). Na década de 50, foi demonstrado pela primeira vez a capacidade do sistema imune em rejeitar as células tumorais,

usando-se para tal tumores induzidos quimicamente, transplantados em camundongos singênicos (Foley 1953; Prhen & Main, 1957; Browning, 1996). Por volta de 1960, surgiu a teoria da “vigilância imunológica” do câncer, segundo a qual as células do sistema imune estariam continuamente “patrulhando” o organismo e eliminando as células em processo de transformação maligna (Burnet, 1970). Esse conceito de vigilância imunológica foi proposto pela primeira vez por Paul Ehrlich em 1909, tendo sido reformulado posteriormente por MacFarlane Burnet e Lewis Thomas (Herberman, 1995). Tem sido observado na prática, entretanto, que a reação imunológica do hospedeiro frente ao desenvolvimento das neoplasias permite detectar tumores do tipo imunogênico e não imunogênico. Tumores imunogênicos são aqueles cujas células expressam determinantes que podem ser reconhecidos como estranhos pelo sistema imune, e contra os quais pode ser montada uma resposta efetiva. Esses determinantes são moléculas expressas na célula tumoral sendo denominados抗ígenos tumorais. Os tumores não imunogênicos, são aqueles em que o sistema imune não reconhece a existência das células tumorais (Prehn, 1973; Abbas et al., 1994 a; Ville et al., 1996). A transformação maligna, por outro lado, pode ser acompanhada por alterações fenotípicas, incluindo a perda de componentes antigênicos na superfície celular, em um mecanismo conhecido como “escape tumoral” (Roitt et al., 1992 b; Venegas & Fleck, 1992).

A função do sistema imune no controle do desenvolvimento tumoral e progressão metastática é feita principalmente pela imunidade celular, com os linfócitos T, células exterminadoras naturais (EN), e macrófagos (Roitt et al., 1992b; Abbas et al., 1994a; Herberman, 1995; Ville et al., 1996). Uma observação histológica comum que sugere a imunogenicidade de alguns tumores é a presença de infiltrados de células mononucleares compostos de linfócitos T, células *natural killer* (NK) ou exterminadoras naturais (EN) e

macrófagos ao redor da massa tumoral (Prhen, 1977). O prognóstico de certos tipos de tumores, dessa maneira, encontra-se favoravelmente associado à identificação histológica, no sítio tumoral, de um abundante infiltrado de células imunes (Oliver & Nouri, 1992; Herberman, 1995; Abbas et al., 1994 a).

A imunidade tumoral mediada pelas células T tem início com a apresentação de抗ígenos às células Ta ($CD4^+$). Essa apresentação dá-se através de células especializadas denominadas células apresentadoras de抗ígenos (CAA), os quais devem encontrar-se associados a moléculas CPH II (complexo principal de histocompatibilidade classe II). As células CAA geralmente são macrófagos, podendo ainda ser uma outra célula desde que expresse CPH II. As moléculas CPH classe I e II são glicoproteínas integrais de membrana. Para que assim sejam apresentadas, as moléculas抗ígenicas são fagocitadas ou endocitadas pela célula CAA e degradadas em pequenos peptídeos nos lisossomos. Os fragmentos peptídicos são então seletivamente associados a moléculas classe II e o complexo transportado para a superfície celular. As células Ta podem também ser ativadas por células tumorais. Melanomas humanos freqüentemente expressam moléculas CPH II (Palacios, 1982; Restifo & Wang, 1996). As células CAA produzem ainda citocinas envolvidas na ativação dos linfócitos, principalmente a IL-1 que vai ativar a célula Ta estimulada por抗ígenos. A IL-1 ativa ainda as células exterminadoras naturais (EN) e os macrófagos, induzindo neste último a produção de TNF. Após a estimulação pela IL-1, as células Ta tanto expressam receptores para IL-2, como começam a produzir a própria IL-2, efetuando uma ação autócrina (Roitt et al., 1992c; Abbas et al., 1994b; Herberman, 1995). A IL-2 é a principal citocina secretada pela célula Ta, sendo um importante fator estimulador de crescimento para linfócitos e macrófagos (Forni & Foa, 1996). As células Ta ativadas secretam ainda outras citocinas, como o TNF, IFN- γ entre outros que, junto com a IL-2, vão atuar

nas populações celulares envolvidas na imunidade celular, como os linfócitos T citotóxicos (Tc), macrófagos e células exterminadoras naturais (EN), além dos linfócitos B. Inicia-se assim uma cascata de fenômenos humorais e celulares que resultará na imunidade antitumoral (Roitt et al., 1992c; Abbas et al., 1994b). As citocinas liberadas pelas células Ta podem ainda induzir inflamação e necrose hemorrágica. Em algumas circunstâncias, as células Ta secretam citocinas capazes de recrutar efetores não específicos diretamente para o sítio de crescimento tumoral. As células Ta ativadas contra抗ígenos tumorais podem ser ainda diretamente citotóxicas contra as células tumorais como, por exemplo, liberando linfotoxinas (Restifo & Wang, 1996).

As células Tc ($CD8^+$), por sua vez, reconhecem os抗ígenos tumorais, quando os mesmos estão em associação com moléculas do CPH classe I (Roitt et al., 1992c; Hart & Saini, 1992; Abbas et al., 1994a). A ligação do complexo抗ígeno tumoral/ molécula CPH I com os receptores nas células Tc dá início a uma sinalização intracelular para o núcleo do linfócito, estimulando a expressão de suas funções efetoras que, no caso, é destruir a célula tumoral alvo (Ville et al., 1996). A resposta das células Tc pode consistir em proliferação, aumento da regulação de moléculas de superfície, ativação da maquinaria lítica e/ou secreção de citocinas como IL-2, IFN- γ , GM-CSF e TNF- α (Restifo & Wang, 1996; Barth et al., 1991). Para a célula Tc tornar-se completamente ativada, ela deve receber estímulos adicionais, provenientes da ligação de citocinas aos seus receptores de superfície, citocinas essas secretadas pelas células T auxiliares (Ville et al., 1996). Após uma ativação bem sucedida, a célula Tc divide-se em vários clones filhos, todos com especificidade antigenica idêntica. Estes clones vão estar aptos a efetuar a função de vigilância imunológica, reconhecendo e destruindo células potencialmente malignas, as quais expressam peptídeos derivados de proteínas celulares mutantes em associação a moléculas

CPH I (Abbas et al., 1994a; Ville et al., 1996). É interessante notar que o TNF e IFN- γ secretados pelas células Ta podem aumentar a expressão da molécula do CPH I em células alvo e, consequentemente, a lise das mesmas pelos linfócitos Tc (Abbas et al., 1994a). A interação entre as célula Tc e as células tumorais, entretanto, depende ainda de uma interação entre a integrina LFA-1, expressa nos linfócitos, e a molécula ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*), expressa na célula alvo tumoral (Gregory et al., 1988; Hart & Saini, 1992; Hart, 1996), e cuja expressão é estimulada por TNF, IL-1, IFN ou IL-6 (McCormic & Zetter, 1992). Essa ligação entre LFA-1 e ICAM-1 estabiliza o conjugado citolítico entre linfócitos Tc e a célula tumoral. A perda da expressão de ICAM-1 parece permitir às células tumorais circulantes evitar o estabelecimento de conjugados citolíticos estáveis, podendo significar a evasão da destruição pelos linfócitos Tc (Hart & Saini, 1992; Hart, 1996).

Uma outra linha de defesa na imunidade tumoral são as células extermadoras naturais (EN). As células EN foram descobertas há cerca de 20 anos atrás, constituindo uma população de linfócitos não-B, não-T, que têm a capacidade de lisar as células tumorais (Ville et al., 1996). Elas parecem ser particularmente importantes no controle da disseminação hematogênica dos tumores, prevenindo a formação de metástases (Hanna & Fidler, 1980; Hanna & Fidler, 1981; Hanna, 1982; Hanna, 1985; Liotta, 1992; Herberman, 1995). As células EN são estimuladas por citocinas derivadas das células Ta ativadas (principalmente a IL-2), diferenciando-se assim em células LAK ("limphokine-activated Killer cells"). Além de IL-2, as células EN podem ser ativadas por outras citocinas como IL-2, TNF, IL-12 e IFN- γ interferons (α , β , γ). A IL-2 tem dois tipos de efeitos nas células EN: a estimulação da proliferação e o aumento da citotoxicidade. Após estimuladas, as células EN secretam TNF e IFN- γ , especialmente em resposta à IL-2 e IL-12. Elas usam o mesmo mecanismo

lítico das células Tc, isto é, por exocitose de grânulos (com proteínas, citotoxinas, esterases, serinas e proteoglicanos), indução da fragmentação do DNA da célula alvo e apoptose (Abbas et al., 1992a; Abbas et al., 1992b; Herberman, 1995). As EN, no entanto, não expressam receptores para抗ígenos, efetuando sua ação lítica em uma maneira não específica e não restrita ao CPH (Abbas et al., 1992a). Sua função na imunidade anti-tumoral, contudo, vai depender da estimulação concorrente das células T e macrófagos que produzem as citocinas necessárias para o seu estímulo. As células EN parecem ainda ser direcionadas para células cobertas de anticorpos, uma vez que expressam receptores Fc de baixa afinidade para moléculas IgG, constituindo assim, o principal mediador na ADCC ("antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity", ou citotoxicidade celular dependente de anticorpo) (Herberman, 1995). A estabilização de conjugados citolíticos entre as células tumorais e as células EN é dependente, entretanto, da interação entre a molécula LFA-1 expressa nas células EN e a molécula ICAM-1 expressa nas células tumorais (Hart, 1996). Embora a vigilância imunológica seja função das células T抗ígeno-específicas, algumas evidências sugerem que, se essa vigilância não funcionar, as células que irão fazer frente na linha de defesa podem ser as EN (Herberman & Holden, 1978; Ville et al., 1996), especialmente contra células que expressam抗ígenos virais (Abbas et al., 1992a). Um estudo recente sugere que a atividade das células EN encontra-se deprimida em alguns pacientes com câncer, com algumas evidências de que uma baixa atividade das células EN esteja associada a um mau prognóstico (Herberman, 1995).

A terceira linha de defesa na imunidade celular seriam os macrófagos associados a tumores (TAM-"Tumor-Associated Macrophages") que representam o maior componente do infiltrado linforeticular de vários tumores humanos. Em adição à apresentação de抗ígenos, os macrófagos possuem, eles mesmos,

uma capacidade citotóxica tumoral mas, apenas quando ativados por citocinas secretadas por células Ta (como IFN- γ) (Abbas et al., 1992a; Mantovani et al., 1992; Klein & Mantovani, 1993; Ville et al., 1996). As propriedades tumoricidas dos macrófagos têm sido demonstradas extensivamente *in vitro*. Os mecanismos de destruição celular incluem a liberação de TNF, IL-1, radicais livres, proteases e óxido nítrico. As citocinas liberadas pelos macrófagos, por sua vez, vão recrutar células imunes secundárias para o sítio tumoral, de maneira a amplificar os efeitos tumoricidas não-específicos. Os macrófagos podem, também, destruir células tumorais sensibilizadas por anticorpos, atuando como efetor não específico da via de citotoxicidade celular antígeno-específica dependente de anticorpo (ADCC). Os TAM portanto, parecem ter uma função central nas vias de ambas as imunidades antitumorais, a específica (através da ativação inicial de células CD4 $^{+}$) e a não-específica (através de suas propriedades tumoricidas e de sua função de secreção de citocinas) (Ville et al., 1996).

Um outro tipo de resposta, que não a celular, é a resposta imune humoral. Embora a imunidade celular seja a mais importante resposta anti-tumoral, os hospedeiros que portam um tumor produzem anticorpos contra抗ígenos tumorais. O potencial de destruição das células tumorais mediado por anticorpos tem sido largamente demonstrado *in vitro* e é atribuído à ativação do complemento, ou à citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC-antibody-dependent cellular cytotoxicity), tendo como efetores macrófagos ou células EN (Lloyd, 1991; Abbas et al., 1992a; Ville et al., 1996). A função real *in vivo* para esse mecanismo de destruição dependente de imunoglobulina permanece desconhecida, não existindo evidências para uma função protetora contra o desenvolvimento e progressão tumoral (Abbas et al., 1992a).

5. Fibro-Histiocitomas

Os fibro-histiocitomas malignos humanos (FHM) são os sarcomas de partes moles mais comuns na vida adulta tardia, ocorrendo mais comumente nos tecidos conectivos profundos das extremidades, cavidade abdominal e retroperitônneo (Soule & Henriquez, 1972; Weiss e Enzinger, 1978; Kearney et al., 1980). Podem surgir também de estruturas de suporte em vários órgãos, como no osso (Feldman & Lattes, 1977; Weiss e Enzinger, 1978), ou na glândula mamária, onde sua incidência é muito baixa (Vera-Sempere & Llombart-Bosch, 1984). Sua ocorrência foi pioneiramente descrita por O'Brian & Stout (1964), em 1964. Em 1978, Weiss & Enzinger (1978) descreveram os FHM como sendo tumores primitivos, mesenquimais, compostos, em sua forma clássica, de células fusiformes (fibroblásticas-símile) e arredondadas (histiocíticas-símile), o que é refletido pela produção de colágeno e fagocitose ocasional. As células estariam dispostas em um padrão “em redemoinho” e acompanhadas por células gigantes pleomórficas e células inflamatórias. Já foram descritas várias formas de apresentação dos FHM, incluindo FHM fibroso, FHM histiocítico e FHM pleomórfico com variantes mixóide e inflamatória (Soule & Henriques, 1972; FU et al., 1975). Greaves & Facine (1981), em 1981, avaliando 85 fibro-histiocitomas espontâneos em ratos Sprague-Dawley, reconheceram, de acordo com o tipo celular predominante, 4 tipos histológicos: histiocítico (17%), altamente malignos; pleomórfico (33%) e celular (células fusiformes) (17%), tipos potencialmente malignos que levavam ocasionalmente ao aparecimento de metástases e os muito fibrosos (33%), lesões essencialmente benignas. Em relação à metástases, um estudo realizado por Weiss & Enzinger (1978) com 200 casos de FHM humanos, mostrou que as mesmas são mais freqüentes para o pulmão (82%) e linfonodos (32%), sendo ainda influenciadas por fatores como a profundidade tumoral, tamanho e componente inflamatório tumoral.

Tumores pequenos, superficialmente localizados, ou com um proeminente componente inflamatório, metastatizaram menos freqüentemente que os largos mais profundamente localizados. Os FHM entretanto, ainda têm sua histogênese incerta. Alguns autores consideraram sua origem como histiocítica (Kauffman e Stout, 1961; Ozzello et al., 1963; Kempson e Kyriakos, 1972). Ozzello e colaboradores (1963) postularam, baseado em cultura de células, que a origem dessas neoplasias seria a partir de um histiócito ativo com capacidade para agir como um fibroblasto facultativo. Outros autores têm sugerido a origem dos FHM a partir de células primitivas mesenquimais (FU et al., 1975; Greaves et al., 1985). Em relação a tumores em animais experimentais, trabalhos têm demonstrado a ação de carcinógenos químicos no desenvolvimento de tumores, em ratos, semelhantes aos FHM (Pradhan et al., 1974; Konishi et al., 1982). Geaves e colaboradores (1985) demonstraram o surgimento de tumores em ratos, no local de implantação de filtros Millipore, com características semelhantes aos FHM. Sabe-se ainda que muitos tumores de partes moles ocorrem espontaneamente em ratos idosos, com características biológicas, histopatológicas e ultraestruturais semelhantes às de neoplasias fibrohistiocíticas humanas (Goodman, et al., 1979; Goodman et al., 1980; Greaves et al., 1982; Greaves et al., 1985).

6. O Tumor T.E.G.S. 2047

Bezerra de Araújo e colaboradores (1980) descreveram, em julho de 1980, um tumor surgido espontaneamente na região correspondente à glândula salivar em um rato adulto, albino Wistar, pertencente ao biotério do Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC. Ao final de um mês de observação, a massa tumoral já comprometia o olho direito e estava ulcerada, sendo realizado o sacrifício do animal com a ressecção completa do tumor, no Departamento

de Fisiologia e Farmacologia da UFC. Os fragmentos foram utilizados para estudo histopatológico e para transplante subcutâneo em ratos receptores Wistar, pela técnica do trocater (Hamburger & Fishman, 1953). Depois do primeiro transplante, novas repicagens foram feitas a cada 10-15 dias. À necrópsia não foram encontradas evidências de metástases. Ao exame microscópico, segundo a descrição de Bezerra de Araújo e colaboradores (1980), o tumor apresentava abundante estroma vascular edemaciado, extensas áreas de necrose e, basicamente, constituído de dois tipos celulares: a) células arredondadas pequenas, hiperchromáticas, com escasso citoplasma, possuindo um a dois nucléolos evidentes e com a cromatina disposta à periferia do núcleo e b) células de aspecto fusiforme em “chama de vela”, com abundante citoplasma eosinofílico com 1 a 2 nucléolos evidentes e cromatina disposta perifericamente, segundo a descrição dos autores. Descreveram ainda uma disposição das células ao redor dos vasos, lembrando “redemoinhos”, além da presença de cartilagem, áreas mixóides e estruturas que imitam ductos glandulares, e mesmo glândulas sebáceas. As mitoses eram freqüentes, principalmente nas zonas com predomínio das células fusiformes. O índice de “pega” foi de aproximadamente 100% no Departamento de Farmacologia e de aproximadamente 50% no Departamento de Patologia, onde foi observada uma regressão espontânea do tumor. Em virtude do grande pleomorfismo histológico da neoplasia, não foi possível enquadrá-la em nenhum dos tipos descritos na literatura especializada, e por isso os autores resolveram designá-la com o nome de T.E.G.S. 2047, significando Tumor Espontâneo da Glândula Salivar, e 2047 o número com o qual a neoplasia foi registrada no Departamento de Patologia, no ano de 1980 (Bezerra de Araújo et al., 1980). Desde o primeiro transplante, o tumor vem sendo mantido, até a presente data, em ratos albinos Wistar do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, através de transplantes subcutâneos pela técnica do trocater. Trompieri em 1984 (1984) descreveu

características histológicas semelhantes às descritas por Bezerra de Araújo e colaboradores (1980), para o tumor T.E.G.S. 2047 sem, no entanto, enquadrá-lo em nenhuma categoria histopatológica ou classificação.

Realizando um estudo morfológico mais profundo, para caracterizar tal neoplasia, Ribeiro (1987) em 1987 indicou a inclusão do tumor T.E.G.S. 2047 na categoria dos Fibrohistiocitomas Malignos. Segundo a descrição do autor, à microscopia óptica e eletrônica, o tumor mostrou-se constituído por células histiocíticas símiles, principalmente, fibroblásticas símiles e células indiferenciadas, sendo a citoquímica enzimática fortemente positiva para a α -naftil acetato esterase e fosfatase ácida, indicando a natureza histiocítica do tumor. O estudo imunohistoquímico do tecido tumoral revelou positividade nas reações para Lisozima e Vimentina, confirmando a sua natureza fibrohistiocítica. A aparência geral do tumor T.E.G.S. 2047, segundo Ribeiro (1987), mostrava uma estreita semelhança com o tipo celular descrito por Greaves & Faccine (1981) e também com o seu correspondente humano (Soule & Enriquez, 1972; Weiss & Enzinger, 1978; Kearney et al., 1980). O índice de pega do tumor em 40 animais transplantados foi de 82,5%, com a curva de crescimento tumoral mostrando um padrão Gompertziano (Steel, 1977). Em relação aos índices mitóticos, pareceu haver uma progressiva diminuição com a evolução do tumor. A redução da taxa de crescimento nos últimos dias de evolução do tumor, no entanto, deveu-se mais ao aumento da perda celular, que à diminuição da produção celular, segundo Ribeiro (1987). A incidência de metástases foi muito pequena (3,3%), as quais estavam localizadas apenas no pulmão, apresentando o mesmo padrão morfológico do tumor primário, o que demonstra a pouca agressividade do tumor (Ribeiro, 1987).

O estudo farmacológico do tumor T.E.G.S. 2047 por Trompieri (1984),

características histológicas semelhantes às descritas por Bezerra de Araújo e colaboradores (1980), para o tumor T.E.G.S. 2047 sem, no entanto, enquadrá-lo em nenhuma categoria histopatológica ou classificação.

Realizando um estudo morfológico mais profundo, para caracterizar tal neoplasia, Ribeiro (1987) em 1987 indicou a inclusão do tumor T.E.G.S. 2047 na categoria dos Fibrohistiocitomas Malignos. Segundo a descrição do autor, à microscopia óptica e eletrônica, o tumor mostrou-se constituído por células histiocíticas símiles, principalmente, fibroblásticas símiles e células indiferenciadas, sendo a citoquímica enzimática fortemente positiva para a α -naftil acetato esterase e fosfatase ácida, indicando a natureza histiocítica do tumor. O estudo imunohistoquímico do tecido tumoral revelou positividade nas reações para Lisozima e Vimentina, confirmando a sua natureza fibrohistiocítica. A aparência geral do tumor T.E.G.S. 2047, segundo Ribeiro (1987), mostrava uma estreita semelhança com o tipo celular descrito por Greaves & Faccine (1981) e também com o seu correspondente humano (Soule & Enriquez, 1972; Weiss & Enzinger, 1978; Kearney et al., 1980). O índice de pega do tumor em 40 animais transplantados foi de 82,5%, com a curva de crescimento tumoral mostrando um padrão Gompertziano (Steel, 1977). Em relação aos índices mitóticos, pareceu haver uma progressiva diminuição com a evolução do tumor. A redução da taxa de crescimento nos últimos dias de evolução do tumor, no entanto, deveu-se mais ao aumento da perda celular, que à diminuição da produção celular, segundo Ribeiro (1987). A incidência de metástases foi muito pequena (3,3%), as quais estavam localizadas apenas no pulmão, apresentando o mesmo padrão morfológico do tumor primário, o que demonstra a pouca agressividade do tumor (Ribeiro, 1987).

O estudo farmacológico do tumor T.E.G.S. 2047 por Trompieri (1984),

evidenciou a presença de uma substância prostaglandina-símile. Ribeiro, posteriormente, em 1987, detectou a presença de um material biologicamente ativo, nos extratos tumorais metanólicos ou acetônicos do tumor T.E.G.S. 2047. Os ensaios farmacológicos sugeriram a presença neste material de um composto triptamínico-símile, o qual pode, não necessariamente, tratar-se de 5-Hidroxitriptamina (Ribeiro, 1987).

O estabelecimento e caracterização de uma linhagem celular derivada do fibro-histiocitoma maligno T.E.G.S. 2047, a linhagem FHM, foi realizada por Porto (1996), a partir da cultura primária do tumor, que se encontrava no 14º dia de evolução. Morfologicamente, a população celular que constituía a passagem P0 era formada por dois tipos distintos de células: uma grande maioria de células globosas e o restante de células fusiformes (semelhantes a fibroblastos). A população celular, ao atingir a confluência, era constituída por células arredondadas formando aglomerados tridimensionais disformes. Ao longo das passagens seguintes, as células foram se tornando menores, com um aumento da população celular com morfologia fusiforme. Uma morfologia mais estável, entretanto, foi descrita por Porto (1996) nas células de P12, com um padrão celular predominantemente fusiforme. A clonagem da cultura do tumor T.E.G.S. 2047, a partir de P2, permitiu a Porto (1996) isolar dois tipos celulares morfologicamente diferentes: o FHM_{c1}, constituído de células arredondadas, e o FHM_{c2}, constituído de células fusiformes de crescimento mais lento, sendo este último o único com capacidade para se perpetuar em cultura. Observou-se ainda que os tumores originados a partir da inoculação das células oriundas da cultura do T.E.G.S. 2047 remontavam a arquitetura do tumor original. Em relação à citocinética *in vitro*, houve uma discreta diminuição na taxa de crescimento coincidente com um aumento no número de passagens. Porto (1996) observou, ainda, que nenhum dos 29 animais inoculados com as passagens P2, P6 e

P12 apresentou evidências de metástase pulmonar ou em qualquer outro órgão examinado. A avaliação do índice de colonização de células das mesmas passagens constatou que apenas 2 em 10 animais inoculados com 10^5 células de P2 por via endovenosa, apresentaram metástases pulmonares. Em relação ao cariotípico, a distribuição modal dos cromossomos da passagem P2 das células FHM foi de 30 cromossomos, enquanto que o cariotípico de um rato normal contém 42 cromossomos por célula diplóide (Porto, 1996), o que demonstra uma instabilidade genética. Porto realizou ainda o estudo imunohistoquímico do tumor doador (T.E.G.S. 2047), das células em cultura e dos tumores obtidos a partir da reinoculação dessas células. O tumor doador T.E.G.S. 2047 mostrou uma expressão para vimentina em aproximadamente 23% das células, indicando linhagem mesenquimal, confirmando os achados de Ribeiro (1987). Houve, entretanto, nos achados de Porto (1996) um decréscimo progressivo na expressão da vimentina nas diversas passagens da linhagem celular FHM1 mantidas em cultura, consideradas como inespecíficas após P6. A reinoculação dessas células em animais, entretanto, remontava um tumor com os mesmos níveis de expressão anteriores de vimentina (23%). Em relação à esterase, a citoquímica mostrou uma expressão em 80% das células do tumor original, caindo para 40% na suspensão celular. Nas células FHM mantidas em cultura, esse nível ficou em torno de 40% nas células de P1, em 20% de P2, com valores nulos em P4. Porto (1996) encontrou ainda baixos níveis de expressão de CD45 e CD68, devendo-se talvez, segundo ele, a linfócitos e/ou macrófagos que infiltram o tumor. A célula que se perpetua em cultura, segundo Porto (1996), poderia ser então um fibroblasto transformado, aneuplóide, com capacidade tumorigênica, não sendo o tumor derivado de macrófagos ou monócitos. A presença dessas células, conjectura ele, poderia ser decorrente da liberação pelos fibroblastos malignos de fatores quimiotáticos e/ou, indiretamente, do estímulo de macrófagos residentes que liberariam outras citocinas (como TNF) (Souza et al., 1988), capazes de induzir

migração. Esse fato explicaria a reprodução do tumor *in vivo* após a reinoculação das células de P6 e P12. Crossara e colaboradores (1995) já haviam demonstrado que as células FHM em cultura liberam espontaneamente TNF no sobrenadante. Crossara e colaboradores (1995) sugeriram, então, que o TNF liberado pelas células FHM seria responsável pela migração de neutrófilos para o tumor *in vivo*. O fibro-histiocitoma T.E.G.S. 2047 seria, dessa maneira, segundo Porto (1996), constituído por fibroblastos transformados, associados a outras células, tais como monócitos e linfócitos possivelmente reativos, que infiltram o tumor.

7. A Ciclosporina

Ciclosporina (CS) é o protótipo de uma geração de imunossupressores que vem sendo largamente utilizada em transplantes de órgão e doenças auto-imunes (Kahan, 1989). É uma droga caracterizada por uma ação imunorreguladora seletiva e reversível, modulando especificamente subpopulações definidas de células imunocompetentes, como os linfócitos (Borel, 1994). A CS é um undecapeptídeo cíclico hidrofóbico isolada de espécies de fungos, dentre as quais o *Tolypocladium inflatum Gams*, de onde foi inicialmente isolada e produzida por fermentação (Borel & Kis, 1991). A figura 04 mostra a estrutura química da CS, elucidada em 1975 por Petcher e colaboradores (Petcher et al., 1976). É um peptídeo neutro, rico em aminoácidos hidrofóbicos, insolúvel em água e *n*-hexano, mas, solúvel em muitos outros solventes orgânicos e em lipídios (Borel, 1994). A história de sua descoberta teve início em 1970 quando uma nova cepa de fungos (*Tolypocladium inflatum*) foi descoberta em amostras de solo por B.Thiele no "Microbiology Department at Sandoz Ltd, Basel, Switzerland" (Borel & Kis, 1991). Em 1972, a ação imunossupressora de uma mistura de metabólitos ("ciclosporins"), denominada metabólito 24-556, foi descoberta por Borel em um modelo em camundongo envolvendo inibição de hemaglutinação (Borel,

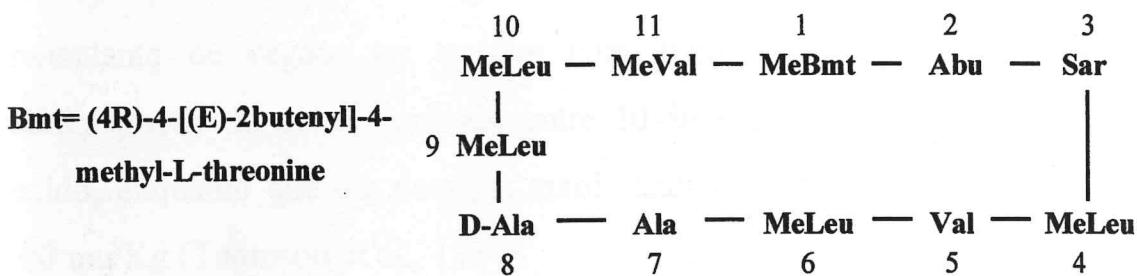
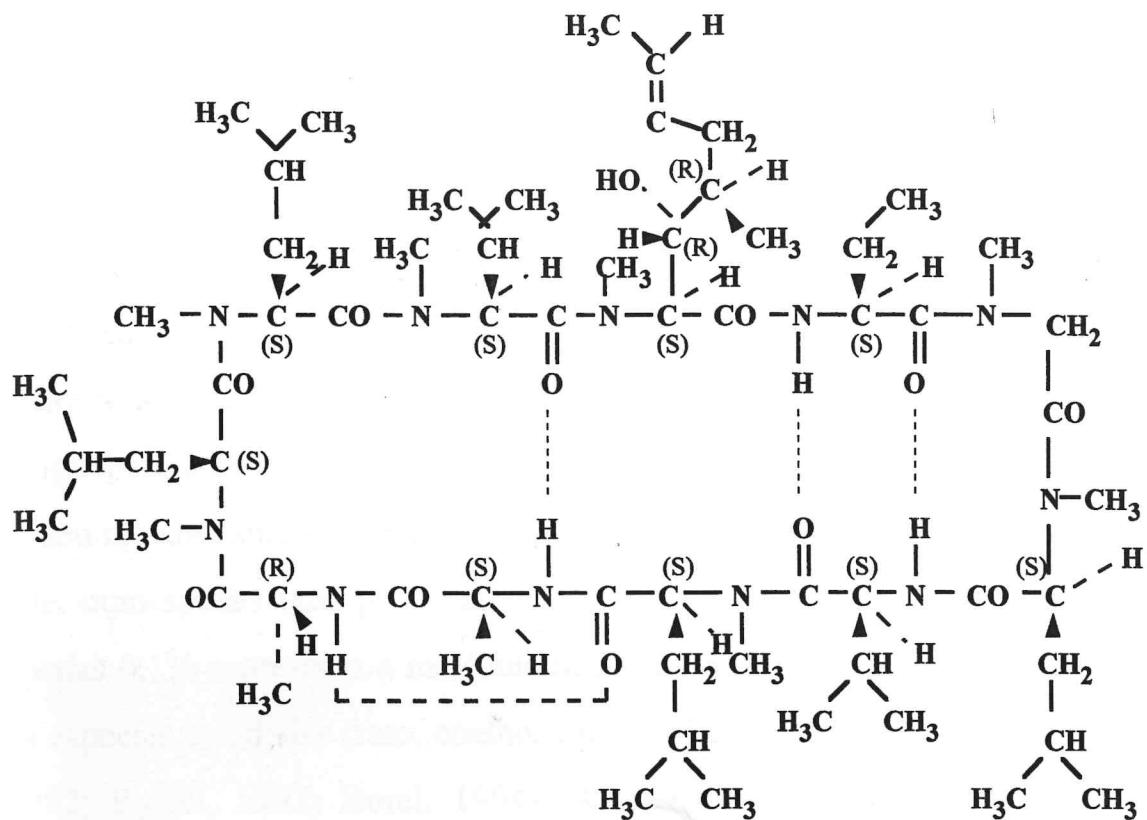


Figura 04: Estrutura da Ciclosporina, um peptídeo cíclico hidrofóbico, formado por 11 aminoácidos (Modificado de Borel, 1994).

1974; Borel, 1976). Em 1973, Rügger purificou a CS a partir da mistura de metabólitos 24-556 (Rüegger et al., 1976). Em 1974, Borel e colaboradores estudaram a ação imunossupressora da CS *in vivo* e *in vitro*, a qual foi posteriormente sintetizada completamente por Wenger em 1981 (Borel, 1976; Wenger & Payne, 1989; Borel & Kis, 1991; Borel, 1994).

A CS é absorvida pelo trato gastrointestinal, sendo sua meia vida plasmática de 17 a 40 horas, apresentando uma curva bifásica. Acumula-se na maioria dos tecidos. Cerca de 34% da droga está presente no plasma, sendo 5% droga livre, 24% ligada à lipoproteínas e 5% ligada a outras proteínas plasmáticas. O seu metabolismo é hepático e sua excreção dá-se principalmente pelo fígado e bile, com apenas uma pequena quantidade pelos rins (cerca de 10%, dos quais apenas 0,1% representa a molécula nativa ou a droga não modificada), em todas as espécies estudadas (rato, coelho, cachorro) e em humanos (Britton & Palacios, 1982; Ryffel, 1992; Borel, 1994). A dose terapêutica (imunossupressora) no homem é em torno de 10 a 20 mg por Kg de peso corporal por dia, correspondendo a 100-400 ng/ml no plasma (Britton & Palacios, 1982). O transplante de órgãos ou tecidos com sucesso em ratos tem requerido a administração de doses variando entre 10-50 mg/Kg, dependendo do órgão ou tecido, enquanto que em doenças autoimunes em ratos essa dose varia de 10 a 100 mg/Kg (Thomson et al., 1984).

A CS liga-se na membrana celular a uma glicoproteína de membrana denominada gp 170, que é expressa fisiologicamente nas células renais e hepáticas, e nas células tumorais resistentes a múltiplas drogas. No citosol, a CS liga-se a uma proteína de 18 kDa, denominada ciclofilina, entrando posteriormente no núcleo, onde impede a transcrição de alguns genes (Handschrumer et al., 1984; Ryffel, 1989; Ryffel, 1992; Borel, 1994). A

figura 05 mostra o mecanismo de ação celular da CS. A Ciclosporina inibe fortemente a imunidade mediada por células, a qual tem um importante papel na rejeição de transplantes e na hipersensibilidade tardia. Ela atua nos eventos celulares iniciais da resposta imunológica, inibindo reversivelmente a função dos linfócitos T "helper" ou T auxiliares (Ta) antígeno-dependentes ativados imediatamente após o reconhecimento desses抗ígenos e mitógenos. As células Ta são as principais células envolvidas na rejeição de transplantes. Como resultado, a célula T permanece em uma fase de "repouso" do ciclo celular, incapaz de produzir e liberar citocinas, falhando, dessa maneira, na indução e montagem de uma resposta imune (Borel & Kis, 1991; Borel, 1994). A CS, ao nível celular, parece inibir a capacidade das células Ta de sintetizar e liberar IL-2, inibindo a transcrição de seu RNAm. Ela inibe também a secreção de outras citocinas pelas células Ta ativadas, como IFN- γ , IL-4, GM-CSF, entre outras envolvidas na função de linfócitos e macrófagos, além da transcrição do receptor da transferrina. A nível celular, isso significa que a geração de células Tc, bem como a de outras células efetoras que destroem as células alvo através da interação com antígeno, é inibida (Ryffel, 1989; Borel & Kis, 1991; Ryffel, 1992; Borel, 1994). É importante notar que, após a célula Ta ter sido estimulada, por mitógenos ou抗ígenos, a CS não é mais capaz de suprimir a sua proliferação, pois ela interfere somente na produção de citocinas, mas não no efeito das citocinas já produzidas sobre suas células alvo. A CS também não afeta diretamente as principais funções de macrófagos e granulócitos, como fagocitose, quimiotaxia e liberação de superóxidos e citocinas (Britton & Palacios, 1982; Thomson et al., 1984; Borel, 1994; Thomson et al., 1984). A CS interfere ainda, indiretamente, com a função das células EN, uma vez que ela inibe a produção de IFN (um modulador positivo das células EN) pelas células Ta, (Britton & Palacios, 1982).

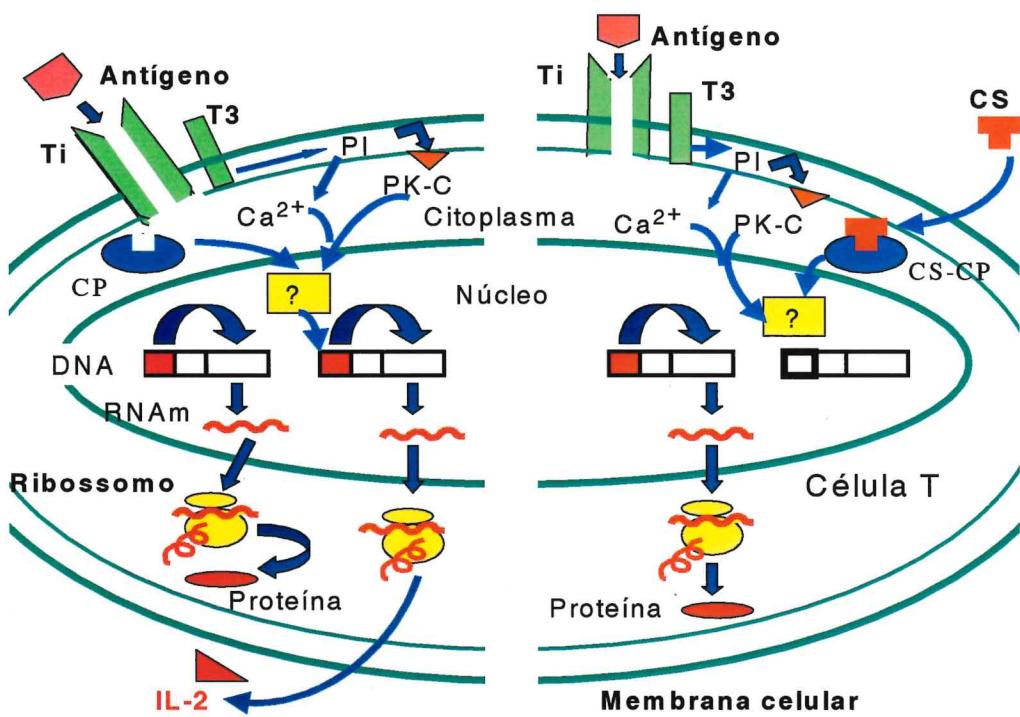


Figura 05: Mecanismo hipotético de ação da Ciclosporina (CS). Modificado de Borel (1994). Os conhecimentos atuais sobre o efeito da CS na ativação da célula T podem ser resumidos como se segue:

1. CS não inibe o reconhecimento do antígeno pelo receptor da célula T.
2. A CS não tem efeito na sinalização transmembrana. A ativação da proteína quinase C (PK-C) induzida por mitógeno ou antígeno e o “turnover” do fosfoinositol (PI) com consequente aumento do nível intracelular de Ca^{++} não são inibidos.
3. A CS se difunde passivamente através da membrana e se concentra no meio intracelular, onde se liga à ciclofilina (CP-proteína receptora de CS de 18 kDa). O substrato para essa enzima é altamente desconhecido, mas está muito envolvido no processo de ativação, eventualmente interferindo com um fator de ligação nuclear de sítios regulatórios de genes específicos.
4. Foi demonstrado que CS, em linhagens celulares humanas e murinas e em linfócitos normais, inibe a transcrição do RNA mensageiro para uma variedade de linfocinas. Contudo, ela não inibe a síntese protéica induzida por mitógenos.
5. A CS inibe a síntese do receptor de IL-2 apenas em altas concentrações.
6. A síntese de outros抗ígenos de ativação e a expressão de produtos dos genes do complexo maior de histocompatibilidade são significativamente reduzidos pela CS.
7. Os efeitos de altas concentrações de CS nas células apresentadoras de抗ígenos, o processamento e a apresentação do抗ígeno nas células T, bem como a produção de IL-1 é ainda controversa.

Ao contrário de outros agentes imunossupressores como a azatioprina e colchicina, a CS inibe preferencialmente as células T, embora em altas concentrações ela também deprima a função das células B. A CS inibe ainda a imunidade dependente de anticorpo, mas apenas contra抗ígenos celulares dependentes de células T. A produção de anticorpos contra抗ígenos independentes de células T, como lipopolissacarídeos, é pouco afetada (Britton & Palacios, 1982; Borel & Kis, 1991; Borel, 1994).

Outros efeitos da ação da CS no sistema imune são bem menos definidos e parcialmente controversos. Eles incluem: a inibição da produção de IL-1 ao atuar nas células Ta, e não, nos macrófagos; inibição da expressão de receptores para IL-2 na membrana; inibição da expressão de receptores para IL-1, tornando a célula não responsiva à IL-1 e incapaz de produzir IL-2; poupar a função das células T supressoras; inibição direta de células T citotóxicas ativadas (Borel, 1994; Britton & Palacios, 1982; Palacios & Möller 1981). A CS inibe ainda a ativação da transcrição de proto-oncogenes que foram induzidos por estímulos, como o c-fos, c-myc, c-src, não tendo efeito na transcrição basal desses genes. Relatos indicando que a CS cause a ativação de genes, entretanto, não têm sido reportados (Ryffel, 1989).

A Ciclosporina por si só não possui efeito aglutinante, citolítico, citostático ou estimulante sobre os linfócitos. Seu efeito imunossupressor é rapidamente revertido quando o tratamento é parado, demonstrando ser a droga não linfocitotóxica (Borel, 1994). Sua administração simultânea à imunização parece ser mais efetiva, e seu efeito inibitório é altamente tempo-dependente, isto é, a percentagem de inibição diminui proporcionalmente com o aumento do intervalo de tempo entre a adição do mitógeno e da CS à cultura. A CS possui ainda um

efeito inibitório dose-dependente na proliferação de linfócitos humanos em resposta a vários estímulos.

Em relação aos efeitos colaterais, é importante notar que a razão entre a dose tóxica e a dose necessária para efeitos farmacológicos é significativamente superior a outros agentes. Em animais, os efeitos colaterais são mínimos nas doses imunossupressoras (Borel, 1994). Na prática clínica, a nefrotoxicidade é um fenômeno dose-dependente, não sendo um fator limitante quando a CS é dada em baixas doses e tem seus níveis monitorizados. Pinheiro em 1995 (Pinheiro, 1995) sugeriu que a nifedipina e, principalmente, o PCA 4248 (um antagonista do Fator Ativador de Plaquetas) exerciam uma ação protetora sobre a nefrotoxicidade induzida pela CS em rins de coelho. Outros efeitos de menor importância são a hepatotoxicidade moderada e sintomas como anorexia, letargia, hirsutismo, hipertrofia gengival, tremor, náusea e diarréia. Um outro efeito seria o aparecimento de neoplasias (Hows et al., 1981; Keown et al., 1981; Britton & Palacios, 1982; Borel & Kis, 1991), principalmente as desordens linfoproliferativas (Calne et al., 1979; Ryffel, 1992). A célula B contendo o vírus Epstein-Barr tem sua proliferação aumentada na presença da CS, mesmo em doses imunossupressoras terapêuticas (Borel, 1994). Segundo Borel (1994), a maioria dos casos de malignidades deve-se às alterações nos mecanismos de vigilância imunológica, uma vez que não há estudos indicando que a CS seja tumorigênica. A Ciclosporina ao inibir a sinalização das células T em resposta a抗ígenos, provavelmente levaria a uma excessiva resposta das células B, favorecendo estados linfoproliferativos, em virtude de sua ação imunossupressora, e não a uma ação tumorigênica direta nas células susceptíveis (Britton & Palacios, 1982; Penn, 1987). Em relação às complicações infeciosas, as virais são as mais comuns nos pacientes com terapia imunossupressora, especialmente Epstein-Barr (EB), papiloma e herpes vírus. Infecções bacterianas ou fúngicas não têm uma

frequência alta em pacientes tratados com CS. Devido à ação específica da CS, a predisposição a infecções em pacientes tratados com Ciclosporina é menor quando comparada a outras drogas imunossupressoras, sendo entretanto as virais mais comuns quando comparadas às bacterianas ou fúngicas (White, 1982; Ryffel, 1992).

Quanto às alterações hematológicas, tem sido encontrada uma linfopenia progressiva e monocitose, bem como eosinopenia em ratos. A severidade desse efeito é relacionada à dose e duração do tratamento e é reversível após sua descontinuação (Thompson et al., 1984). Não há entretanto nenhuma aparente alteração no processo de maturação de nenhuma das principais linhagens celulares da medula. A linfopenia concomitante é consistente com um efeito citopático seletivo da CS nas células linfoides. Vários experimentos têm indicado essa ação específica da CS, uma vez que não é detectado nenhum efeito funcional nas células hematopoiéticas (poupando as “stem cells” e sua maturação), fagócitos ou células tumorais, ou outros compartimentos com um rápido *turnover* celular como o intestino (Wiesinger & Borel, 1980; Borel & Kis, 1991; Borel, 1994). Um outro efeito da CS, demonstrado em estudos com animais, bem como em pacientes transplantados, é uma redução da razão entre as células T_H/T_S , resultante de uma diminuição no número de células T_H (com uma diminuição funcional concomitante) e de um número normal de células T_S (com um modesto aumento de atividade) (Thomson et al., 1981; Van Buren et al., 1982; Thomson et al., 1984).

Uma nova aplicação da Ciclosporina é o seu uso para reverter a resistência a múltiplas drogas (MDR) mediada pela glicoproteína-P. Ela é um eficiente bloqueador do bombeamento de efluxo da glicoproteína-P, resultando em

maiores concentrações intracelulares das drogas e aumento da morte celular (Silbermann et al., 1989; Kahan, 1989).

8. A Metilprednisolona

As drogas imunossupressoras convencionais usadas neste estudo foram a metilprednisolona (MP) e a azatioprina (AZA), que inibem inespecificamente a imunidade envolvida na rejeição de transplantes e a imunidade de tumores (Mantovani et al., 1994).

Os esteróides adrenocorticais representam a primeira classe de drogas imunossupressoras historicamente usadas. Os corticosteróides utilizados para a imunossupressão clínica são os glicocorticóides sintéticos, os quais representam uma parte essencial do tratamento imunossuppressor crônico baseado em CS ou AZA. Além do uso na profilaxia das rejeições, os glicocorticóides (Gc) são classicamente utilizados no tratamento de rejeição aguda em andamento (Marino & Doyle, 1994). Eles atuam ativando seus receptores citoplasmáticos a regularem de maneira direta ou indireta a transcrição de certos genes-alvo. O hormônio livre no plasma entra na célula e liga-se ao seu receptor no citoplasma. Esse receptor encontra-se ligado a proteínas, como a proteína do choque térmico, que o estabilizam, impedindo que se ligue ao DNA. Ao ligar-se ao receptor, o Gc induz mudanças conformacionais que permitem a dissociação das proteínas de choque térmico e exposição do domínio de ligação ao DNA. O complexo hormônio-receptor é então transportado para o núcleo, onde liga-se a elementos receptores de Gc no DNA e induz ou suprime a transcrição de determinados genes (Mantovani et al., 1994; Schimmer & Parker, 1996; Goldfien, 1998). Entre os genes que codificam as citocinas, entretanto, poucos possuem a seqüência de DNA à qual o complexo hormônio-receptor liga-se, denominada GRE

(“glucocorticoid response elements”), sugerindo que os Gc atuam na maioria das vezes de maneira indireta. O Gc pode interagir com outros fatores de transcrição, como o AP-1 (“transcription factor activator protein-1”), que é um heterodímero das oncoproteínas Fos e Jun, que induz a transcrição do gene para colagenase. A ligação do Gc à AP-1 previne que ela se ligue aos seus genes-alvo induzindo-os. Entretanto, nem todos os efeitos imunes dos Gc podem ser explicados pelo bloqueio de AP-1, pois a maioria dos genes-alvo dos Gc não possuem sítio de ligação para essa proteína. Um segundo alvo dos Gc, o NF-κB (“nuclear factor kappa B”), é um fator de transcrição que ativa um grande número de importantes genes reguladores do sistema imune e de genes da inflamação, em resposta a estímulos pró-inflamatórios. A sua inibição parece ser a principal responsável pela atividade antiinflamatória e imunossupressora dos Gc. O complexo receptor-glicocorticóide liga-se ao NF-κB impedindo que o mesmo ligue-se ao DNA aumentando a ativação de genes. Esse, entretanto, não é o mais importante mecanismo de ação dos Gc. O NF-κB encontra-se no citoplasma em complexo com seu inibidor, a proteína I_KB α . Quando a célula é estimulada por sinais imunológicos, ocorre fosforilação dos grupos I_KB α , uma alteração química que leva à quebra da ligação e liberação de NF-κB. O NF-κB então migra para o núcleo onde ele vai ativar os seus genes-alvo. Os Gc, por sua vez, aumentam a transcrição do gene para I_KB α , levando a um aumento na concentração de I_KB α na célula, permitindo que essa proteína ligue-se ao NF-κB no citoplasma, tornando-o inativo, mesmo em condições de estímulo em que ele seria liberado para entrar no núcleo celular. Assim uma produção aumentada de I_KB α com o conseqüente bloqueio da atividade de NF-κB, parece explicar a maioria dos efeitos dos Gc, inibindo a produção de várias citocinas e bloqueando a resposta imune (Marx, 1995; Scheinman et al., 1995 Barnes, 1996).

Metilprednisolona, prednisolona e prednisona constituem os três glicocorticóides geralmente usados na prática clínica para terapia imunossupressora de manutenção e tratamento de rejeição. Eles têm alta ação antiinflamatória e baixo poder mineralocorticotrófico. A Metilprednisolona (**figura 06**), a droga utilizada nesse trabalho, é a mais comumente usada para tratar episódios de rejeição em pacientes transplantados, sendo a prednisona geralmente usada para terapia de manutenção. É disponível em preparações oral e endovenosa, e tem o menor poder mineralocorticotrófico. O succinato de metilprednisolona para uso endovenoso deve ser hidrolisado através de um metabolismo hepático, a fim de ter uma atividade de esteróide (Marino & Doyle, 1994). A meia vida das três drogas, prednisona, prednisolona e metilprednisolona parecem ser semelhantes após administração oral, estando entre 12-36 h (Rang et al., 1995 a). A dose oral equivalente de 5 mg de prednisona, é de 5 mg para prednisolona e 4 mg para a metilprednisolona. A dose utilizada em doenças autoimunes é de 1 mg/Kg/dia de prednisona em humanos (Goldfien, 1998). O seu metabolismo dá-se no fígado e sua excreção é basicamente renal (Marino & Doyle, 1994).

Em relação às suas atividades antiinflamatórias, sabe-se que os Gc reduzem a síntese de prostaglandinas e leucotrienos, uma vez que inibem a atividade da Fosfolipase A₂ (PLA₂). Os Gc induzem a formação de um mediador protéico antiinflamatório, a lipocortina, que atua inibindo a atividade da PLA₂ ao reduzir a disponibilidade de seus substratos fosfolípedes. Eles reduzem ainda a expressão de cicloxigenases nas células inflamatórias, principalmente a de COX2 (Rang et al., 1995a; Goldfien, 1998).

A imunofarmacologia dos Gc é altamente dependente da espécie animal envolvida. As respostas imunes mediadas por células T são bloqueadas

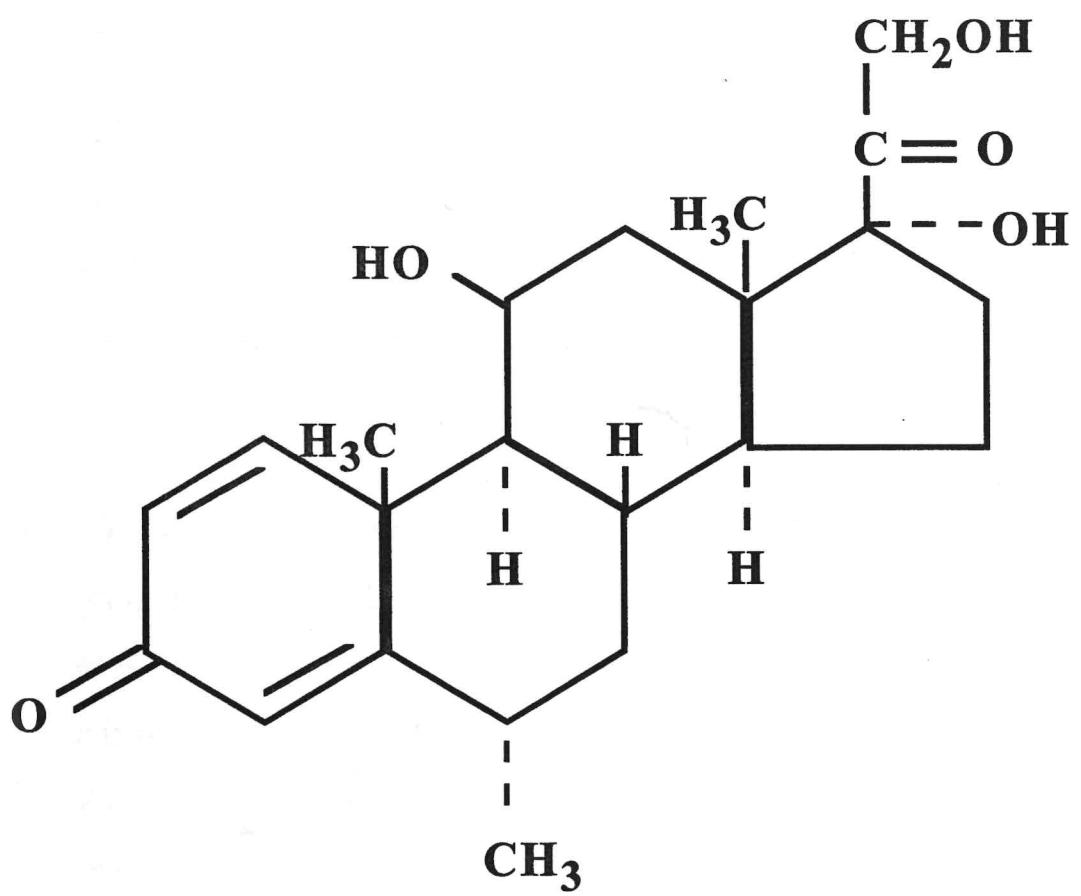


Figura 07: Estrutura química da Metilprednisolona.

pela exposição a Gc tanto *in vitro* como *in vivo*. Eles induzem apoptose em linfócitos de espécies sensíveis, como nos camundongos, enquanto que nos linfócitos humanos, considerados mais resistentes, o enfraquecimento funcional é provavelmente o mecanismo mais importante. O mecanismo de ação dos Gc quando usado em doses altas, entretanto, recai basicamente sobre sua ação lítica direta em linfoblastos. As células T são mais afetadas pelos Gc que as células B, e as células T CD4⁺ são desproporcionalmente diminuídas em relação às células CD8⁺. Eles também causam inibição de função das células NK ou EN (Mantovani et al., 1994). Os glicocorticoides têm ainda um profundo efeito sobre a concentração, distribuição e função dos leucócitos periféricos. Após uma única dose de Gc de ação curta, a concentração de neutrófilos aumenta, enquanto que os linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos na circulação diminuem em número, resultando de um movimento do leito vascular para o tecido linfóide. As mudanças alcançam um pico máximo em 6 hs e são dissipadas após 24 hs (Mantovani et al., 1994; Goldfien, 1998).

Os fagócitos mononucleares são o principal alvo para a atividade imunossupressora dos Gc, os quais interferem na função macrofágica por diferentes mecanismos. Além de monocitopenia e bloqueio do recrutamento tecidual, os Gc causam defeitos de diferenciação, de ativação e de função dos macrófagos maduros, sendo particularmente importante a ação na inibição da produção de citocinas, como IL-1, IFN- γ e TNF (Goldfien, 1998). Os Gc inibem ainda o processamento e apresentação de抗ígenos, uma vez que ao estabilizarem os lisossomas monocitários, diminuem a digestão dos抗ígenos e sua apresentação pelos macrófagos ao sistema imune (Gerrard et al., 1984; Marino & Doyle, 1994; Goldfien, 1998). É possível explicar, então, que os efeitos dos Gc são exercidos através da inibição da síntese de várias citocinas produzidas por macrófagos (ex. IL-1 e TNF), e pelos linfócitos T (ex. IL-2), efeito esse

dependente da inibição da expressão de genes nas células imunocompetentes. A inibição de IL-2, contudo, não é um efeito direto, sendo mediada pelo bloqueio da liberação de IL-1 por macrófagos ativados (Mantovani et al., 1994; Marino & Doyle, 1994; Dinarello & Mier, 1987; Lew et al., 1988).

Em relação aos efeitos colaterais, os glicocorticóides têm a maior lista de possíveis complicações entre as drogas imunossupressoras convencionais, como doença óssea, catarata, perfuração colônica, cushing, diabetes, retardo de crescimento, hipertensão, infecções, distúrbios neurológicos, obesidade, úlcera péptica e cicatrização defeituosa de feridas. Vários organismos oportunistas, além dos patógenos usuais, devem ser considerados, como *Aspergillus*, *Nocardia*, *Pneumocystis carinii*, CMV, herpes simplex, herpes zooster e *Candida albicans* e *Mycobacterium tuberculosis* (Marino & Doyle, 1994).

9. A Azatioprina

A azatioprina (AZA) é o principal agente citotóxico usado para imunossupressão. Foi introduzida na prática clínica em 1962, sendo, logo após, o seu uso combinado com esteróides em transplantes renal e hepático, tornando-se, esse, o tratamento padrão por quase 20 anos. A AZA foi a droga imunossupressora mais usada até a introdução clínica da Ciclosporina em 1979 (Marino & Doyle, 1994; Rang et al, 1995b).

A Azatioprina é um antimetabólito análogo aos antagonistas das purinas, inibindo competitivamente a síntese de nucleotídeos e, com isso, interferindo na multiplicação celular. Dessa forma a AZA não atua apenas no sistema imune. Ela é um derivado imidazólico da 6-mercaptopurina (6MP), um análogo da purina que inibe a síntese de DNA, estando ambas as estruturas ilustradas na **figura 07**. A

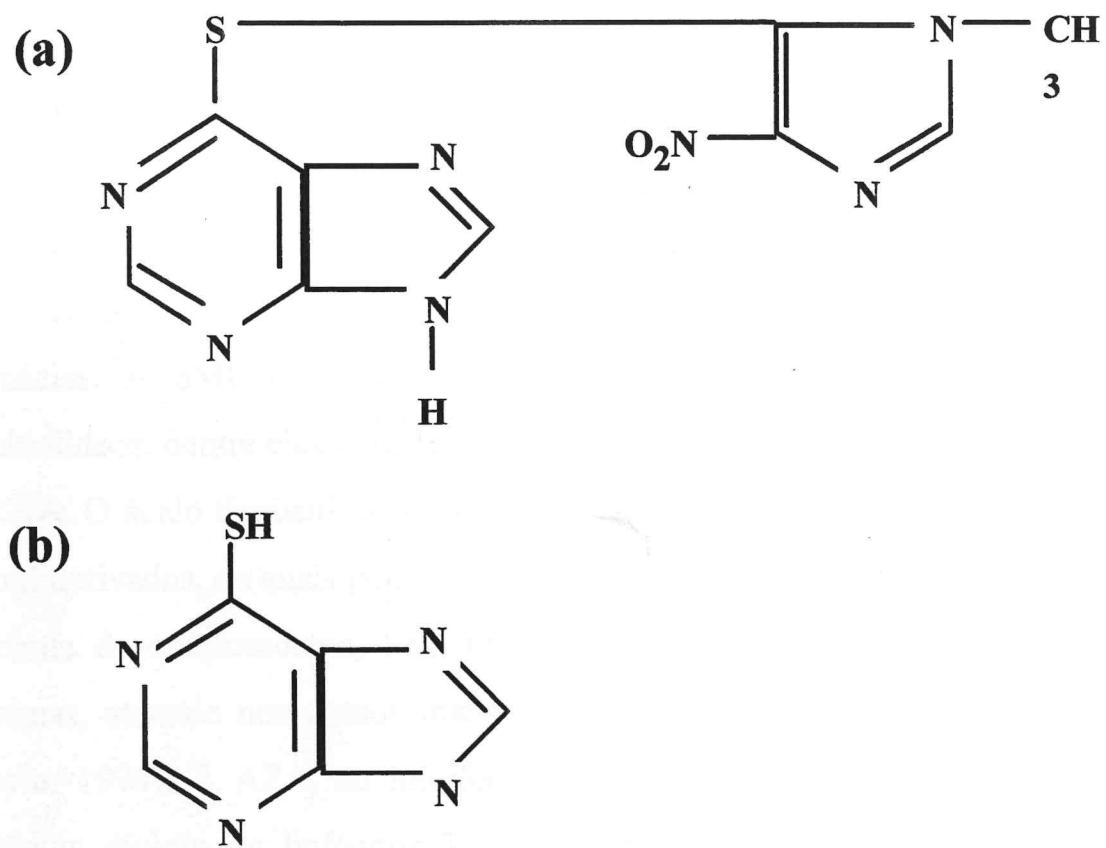


Figura 07: Estrutura química da Azatioprina (a) e 6-Mercaptoperina (b).

AZA foi originalmente sintetizada como uma forma de liberação lenta da 6MP, mas logo foi demonstrado que, no plasma, a maioria da droga era rapidamente clivada não enzimaticamente em 6MP e metilnitroimidazol (Mantovani et al., 1994). A AZA é bem absorvida pelo trato gastrointestinal e metabolizada basicamente em mercaptopurina. A droga existe na forma oral e endovenosa. O pico de atividade plasmática é alcançado em duas horas após sua administração, e seu efeito dura por 12 a 24 horas. Sua excreção é urinária, sendo grande parte do material ativo degradado em ácido 6-tioúrico. Pequenas quantidades de droga inalterada e mercaptopurina também são excretadas pelo rim (Barbuto et al., 1998).

A clivagem da AZA em 6MP dá-se principalmente pelo glutation nas hemárias. A 6MP é então convertida dentro das células em uma série de nucleotídeos, dentre eles o ácido tioguanílico, que interfere com a síntese de DNA e RNA. O ácido tioguanílico leva à formação de trifosfato de tioguanosina e seus deoxi derivados, os quais podem ser incorporados aos ácidos nucléicos e produzir quebras de cromossomos, bem como interferir com a síntese e ação de co-enzimas, atuando nos passos iniciais da síntese *de novo* de purinas (Marino & Doyle, 1994). A AZA, ao interferir com a mitose das células linfóides, afeta, então, a divisão de linfócitos T e B ativados. A produção de anticorpos e a imunidade mediada por células é inibida pela AZA, entretanto, as tiopurinas afetam as respostas dependentes de células T mais do que a produção de anticorpos (Mantovani et al., 1994).

A AZA tem uma atividade diferenciada nas células envolvidas na imunidade natural. Ela tem pouco efeito na atividade das células EN (Exterminadoras Naturais), ao contrário da CS. As células fagocíticas, em contraste, são profundamente afetadas pela AZA. Essa droga inibe a produção

de polimorfos e monócitos resultando em baixos níveis dessas células na circulação e nos sítios de inflamação. A produção de monócitos é bloqueada ao nível de pró-monócitos, havendo ainda uma diminuição na fração de monócitos a serem recrutados nos locais de inflamação. A função dos fagócitos mononucleares, entretanto, não é substancialmente afetada por sua ação antiinflamatória (Mantovani et al., 1994).

A AZA afeta a resposta imune primária, mas é de pouca utilidade quando tenta-se seu uso para reverter uma resposta imune em andamento. O tratamento imunossupressor deve começar no dia do transplante, ou dois ou três dias antes, nas doses de 3 a 4 mg/Kg/dia. A dose de AZA na prática clínica deve ser ajustada com base nos sinais de toxicidade, principalmente os efeitos na contagem dos leucócitos circulantes. As possíveis complicações relacionadas com a administração da AZA, além da supressão da medula óssea, podem incluir hepatotoxicidade, alopecia, eritemas cutâneos, febre por drogas, náuseas e vômitos (Marino & Doyle, 1994). A depressão da medula óssea, principal toxicidade da AZA, geralmente se manifesta com leucopenia, embora também possa haver anemia, trombocitopenia e sangramento (Barbuto et al., 1998).

10. O Micofenolato Mofetil (CellCept)

O Micofenolato Mofetil (Cell Cept) é uma droga imunossupressora nova, tendo sido chamada de “droga racionalmente planejada”, uma vez desenvolvida para atingir um mecanismo específico para a inibição da proliferação de linfócitos. Trata-se de uma pró-droga do ácido micofenólico (AMF), um inibidor potente dos linfócitos humanos e produto da fermentação de diferentes fungos *Penicillium* (Allison & Eugui, 1993; Allison & Eugui, 1994). O Micofenolato Mofetil (MMF) foi produzido através da esterificação do AMF (ácido micofenólico), tendo sido

escolhido para desenvolvimento como imunossupressor pelo fato de ter, aproximadamente, duas vezes a biodisponibilidade do AMF em animais. O CellCept (Micofenolato Mofetil) é o éster 2-morfolinoetil do AMF, cujo nome químico é 2-morfolinoeti l(E)-6-(1,3-dihidro-4-hidroxi-6-metoxi-7 metil-3-oxo-5 isobenzofuranil)-4-metil-4-hexenoato (CellCept, [199?]). A figura 08 mostra sua fórmula estrutural. O MMF, após administração oral ou endovenosa, é rapidamente convertido para o AMF, que é o metabólito ativo. O AMF é então metabolizado no fígado para GAMF (glucuronídeo do ácido micofenólico), que é o metabólito inativo. A biodisponibilidade do MMF é de cerca de 94%, com uma meia vida de 17hs. Sua excreção é renal (CellCept, [199?]; Bullingham et al., 1996).

O AMF é um inibidor potente, seletivo, não competitivo e reversível da inosina monofosfato desidrogenase (IMPDH), uma importante enzima envolvida na síntese *de novo* do nucleotídeo guanosina, a principal via utilizada pelos linfócitos T e B (Franklin & Cook, 1969). A inibição de IMPDH resulta na depleção de GMP (guanosina monofosfato), que normalmente é fosforilada para a forma trifosfato (GTP), e então convertida para a molécula desoxi (dGTP), a qual é incorporada ao DNA pela DNA polimerase. A depleção de GMP (e consequentemente de GTP e dGTP) altera a síntese do DNA, exercendo, assim, um efeito anti-proliferativo e citostático sobre os linfócitos. O AMF, entretanto, não se incorpora ao DNA. Os linfócitos T e B são criticamente dependentes da via *de novo* para sua proliferação, enquanto que outros tipos celulares podem usar as vias de salvamento para a síntese de purinas (CellCept, [199?]; Allison & Eugui, 1993; Allison & Eugui, 1994). O AMF inibe ainda a formação de anticorpos pelos linfócitos B (Eugui et al., 1991a). Uma outra função do AMF é o bloqueio da glicosilação de proteínas de membrana, ou moléculas de adesão de linfócitos e monócitos, as quais estão envolvidas na adesão intercelular às

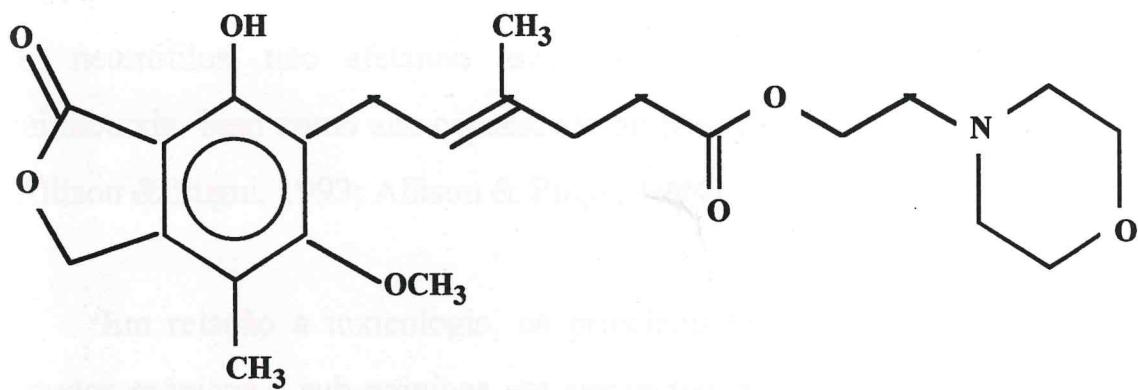


Figura 08: Fórmula estrutural do Micofenolato Mofetil.

células endoteliais e às células alvo. Uma das glicoproteínas de membrana de linfócitos afetada é a VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$), que é o ligante para a molécula 1 de adesão da célula vascular (VCAM-1 ou Vascular Adhesion Molecule-1), envolvidas na adesão intercelular. Com isso, há uma diminuição da adesão de leucócitos ao endotélio vascular, diminuindo sua migração para os locais de inflamação e rejeição de enxerto (Albelda & Buck, 1990; Elices et al., 1990; Allison et al., 1993; Allison & Eugui, 1993; Noronha et al., 1997).

Estudos têm mostrado ser o AMF um potente inibidor da proliferação das células da linhagem monocítica, induzindo a diferenciação e podendo diminuir a produção de citocinas por este tipo de célula no decorrer do tempo (Allison & Eugui, 1993; CellCept, [199?]). O micofenolato mofetil parece não depletar GTP em neutrófilos, não afetando assim a resposta dos neutrófilos humanos à quimiotaxia, bem como sua capacidade de produzir superóxido e matar bactérias (Allison & Eugui, 1993; Allison & Eugui, 1994).

Em relação à toxicologia, os principais sistemas de órgãos afetados nos estudos crônicos e sub-crônicos em camundongos, ratos, cães e macacos, foram os tecidos hematopoiético e linfóide. A toxicidade hematopoiética foi mais evidenciada por contagens diminuídas de eritrócitos em roedores e contagens diminuídas de linfócitos em não-roedores. O AMF não mostrou-se tumorigênico em estudos com ratos e camundongos, nem demonstrou atividade genotóxica em modelos experimentais (*in vivo* e *in vitro*), mas apresentou efeitos teratogênicos em ratos e coelhos (CellCept, [199?]; Allison & Eugui, 1994). Os principais efeitos colaterais do CellCept observados em estudos clínicos multicêntricos foram hematológicos, gastrointestinais e infecções, não tendo se mostrado nefrotóxico (Vanrenterghem, 1997; Zanker et al., 1998). Em estudos controlados, apenas 1% dos pacientes recebendo CellCept desenvolveu

doença linfoproliferativa ou linfoma. Além disso, até 2% dos pacientes desenvolveram neutropenia grave. Os principais efeitos adversos associados com a administração do MMF incluíram diarréia, leucopenia, septicemia (geralmente viremia por CMV), vômitos e uma frequência mais alta de certos tipos de infecção (CellCept, [199?]).

Estudos clínicos têm demonstrado que o CellCept, em combinação com corticosteróides e CS, reduz a incidência de rejeição de enxertos renais, durante os primeiros seis meses após o transplante, tendo sido usada nesses esquemas tríplices em substituição à AZA, principalmente devido à intolerância à mesma. Em conjunto com corticóide, pode ser uma alternativa para pacientes com intolerância à Ciclosporina. A dose de 3 g/dia, por sua vez, tem-se mostrado segura e eficaz, não podendo ser estabelecida, entretanto, nenhuma vantagem de eficácia comparada com uma dose de 2 g/dia. Pacientes recebendo a dose de 2 g/dia demonstraram um perfil geral de segurança melhor do que aqueles recebendo 3 g/dia (CellCept, [199?]; Sollinger et al., 1992; Placebo, 1995; Vanrenterghem, 1997; Noronha et al., 1997; van Gelder et al., 1997). Em um estudo experimental em ratos, desenvolvido na Finlândia (Martelius et al., 1997), a dose de 20 mg/Kg/dia i.p. de CellCept como monoterapia diminuiu significativamente a ativação imune do processo de rejeição de transplante hepático em um modelo desenvolvido em rato, embora sendo menos efetivo que o tratamento convencional triplo (CS, AZA e MP).

Objetivos Fisiológicos

O Micofenolato Mofetil (CellCept) é então um imunossupressor novo que inibe seletivamente a proliferação de linfócitos e causa uma diminuição na expressão de moléculas de adesão *in vitro* (Eugui et al., 1991b).

OBJETIVOS

Como visto anteriormente, a resposta imunológica antitumoral é semelhante à imunologia contra transplantes (Roitt, 1992a), tendo sido observado que a incidência de tumores é em torno de 25 vezes maior nos receptores de transplantes que na população em geral (Fraumeni & Hoover, 1977).

Utilizando um tumor de rato, de baixo índice metastático e possivelmente imunogênico, o tumor T.E.G.S. 2047, idealizamos um experimento com o objetivo de detectar as possíveis influências da imunossupressão induzida pela Ciclosporina, no desenvolvimento de metástases originadas dessa neoplasia, em ratos Wistar, comparando-a com outras drogas imunossupressoras. A Ciclosporina é uma droga específica que atua nos eventos celulares iniciais da resposta imunológica. Para tanto, a nossa pesquisa se propôs aos seguintes objetivos:

1. Objetivos Gerais:

Avaliar a interferência de imunossupressores no desenvolvimento de metástases em ratos inoculados com um fibrohistiocitoma maligno de baixo índice metastático.

2. Objetivos Específicos:

2.1. Avaliar a interferência da Ciclosporina no desenvolvimento de metástases em animais inoculados com linhagem celular do tumor T.E.G.S. 2047;

2.2. Comparar a ação da Ciclosporina no desenvolvimento de metástases com

outras drogas utilizadas em transplantes de órgãos e doenças auto-imunes, consideradas “drogas imunossupressoras convencionais”, como a Azatioprina e a Metilprednisolona.

- 2.3. Avaliar a influência no desenvolvimento de metástases de um novo agente imunossupressor, o Micofenolato mofetil (CellCept) que é considerado uma droga “racionalmente planejada” para atuar sobre os linfócitos, fazendo um paralelo com a Ciclosporina.
- 2.4. Avaliar a curva de crescimento tumoral nos animais inoculados com a linhagem FHM do tumor T.E.G.S. 2047 e tratados com as drogas imunossupressoras, em comparação aos tumores dos animais que receberam somente as células FHM (não receberam tratamento imunossupressor). *(aa, Brasil)*

- 2.5. Avaliação dos índices leucocitários em sangue periférico em animais inoculados com a linhagem FHM do tumor T.E.G.S. 2047 e tratados com as drogas imunossupressoras, em comparação aos animais que receberam somente as células FHM (não receberam tratamento imunossupressor). *(o (plano, Brasil))*

Histórico de Sócio (CONVÉTICA ou PMA)

Solução Salina Temperada de Fisiológica

Tríptico 2,5% (CIBCO EPI)

Solução de Ringer com Lactato

Fimaz, Dextrof. Fuso com 500 ml. diluído

0,6g Cloreto de Potássio 0,03g Clorotetrac.

- dia 0,11g

MATERIAL E MÉTODOS

1. Reagentes e Soluções

Água: As soluções foram preparadas com água tridestilada ou de preferência bidestilada, deionizada e autoclavada.

Álcool 70% (Reagen, Brasil)

Cloranfenicol (Ariston, Brasil): Succinato sódico (Frasco ampola de 1g)

Eosina (Synth, Brasil)

Éter etílico (Synth, Brasil)

Detertec (VETEC, Brasil)

DMSO (Dimetilsulfóxido, VETEC, Brasil)

Hematoxilina (Reagen, Brasil)

Formaldeído (Reagen, Brasil)

Álcool etílico (Reagen, Brasil)

Álcool iodado (Reagen, Brasil)

Gentamicina (10Lmg/mL, GIBCO BRL, USA)

Penicilina potássica (1.000.000 UI; MEGAPEN-1, Brasil)

Fugizon (Anfotericina B 50 mg, Bristol-Myers-Squibb, Indústria Brasileira)

Bicarbonato de sódio (Reagen, Brasil)

Hidróxido de Sódio (CINÉTICA QUÍMICA LTDA)

Solução Salina Tamponada de Fosfato (PBS)

Tripsina 2,5% (GIBCO BRL)

Solução de Ringer com Lactato de Sódio (Química Farmacêutica Gaspar Viana, Brasil): Frasco com 500 mL, cada 100 mL contendo Cloreto de Sódio 0,6g; Cloreto de Potássio 0,03g; Cloreto de Cálcio 2H₂O 0,02g e Lactato de Sódio 0,31g.

Soro Fetal Bovino (500 mL, Cultilab mat. Cel. LTDA, Campinas, SP, Brasil)

Meio RPMI 1640 com L-glutamina e 25 mM tampão HEPES, sem bicarbonato de sódio (GIBCO BRL, USA)

2. Preparação das Soluções Utilizadas na Cultura de Células:

2. 1 Penicilina

A dose de Penicilina utilizada foi de 75.000 UI/500mL de meio RPMI. Para tanto, o sal de Penicilina foi dissolvido em PBS estéril a fim de se obter um “stock” de penicilina na concentração de 500.000 U/mL, mantido a 4°C. As 75.000 UI de Penicilina eram obtidas em 150 µL da solução anteriormente preparada, sendo então adicionadas a 500 mL de meio, quando apropriado.

adicionada final de 10% de SFG no meio

2. 2 Gentamicina

A dose de Gentamicina utilizada era de 26 µg/500 mL de meio RPMI. Dessa maneira, o frasco de Gentamicina de 10 mg/mL foi diluído para uma solução de 1 mg/mL, a qual foi estocada a 4°C. Para obter-se as 26 µg, utilizou-se 26 µL dessa solução, os quais eram adicionados em 500 mL de meio quando apropriado.

2. 3 Fugizon

A dose de Fugizon utilizada foi de 1,25 µg/500 mL de meio RPMI. O frasco com 50 mg era diluído em água bidestilada e deionizada para 5 mg/mL, e estocada a 4°C. Para obter-se as 1,25 µg de Fugizon, utilizou-se 250 µl dessa solução, os quais eram adicionados em 500 mL de meio quando apropriado.

2. 4 Bicarbonato de Sódio

Foi preparada uma solução de bicarbonato de sódio a 7,5%, através da dissolução de 7,5 g de NaHCO₃ em 100 mL de água destilada. A solução foi filtrada em uma membrana de milipore e estocada a 4°C. Foi utilizado 30 mL para cada litro de meio RPMI.

2. 5 Hidróxido de Sódio

Foi preparada uma solução a 1N, sendo adicionado 6,4 mL para cada litro de meio RPMI.

2. 6 Soro Fetal Bovino (SFB)

O soro foi estocado a -20°C em frascos de 100 mL. Quando necessário, os frascos eram descongelados e adicionados ao meio a fim de se obter uma concentração final de 10% de SFB no meio, ou seja, 1 mL de SFB para cada mL de meio RPMI.

2. 7 Solução Salina Tamponada (PBS)

Foi obtida através da dissolução de um envelope de PBS para cada 1000 mL de água bidestilada e deionizada, esterilizada por autoclavação a 120°C por 30 minutos, sendo retirado 1 mL para testes de esterilização e estocada a 4°C até o seu uso.

2. 8 Tripsina

Adicionou-se 0,125g de EDTA a 450 mL de PBS, sendo a solução autoclavada por 20 minutos. A essa solução PBS/EDTA foi adicionado 50 mL de uma solução estéril de tripsina a 2,5%, obtendo-se uma concentração final de tripsina a 0,25%. A solução estéril final de Tripsina/EDTA/PBS foi estocada a 4°C em alíquotas de 100 mL.

3. Meio de Cultura

O meio RPMI 1640 foi adquirido em envelopes de 10 gramas da GIBCO BRL, contendo glutamina e HEPES, sendo dissolvido em 1000 mL de água bidestilada, deionizada e esterilizada em autoclave. A essa solução foi adicionado então 3,2 mL de NaOH 1N. O meio foi então aliquotado em garrafas de 500 mL, para posterior utilização, e estocado a 20°C. Quando necessário, 500 mL de meio eram descongelados em banho maria a 37°C e suplementados com 15 mL de NaHCO₃ (a 7,5%), com 150 µL de Penicilina (a 5000.000 UI/mL), 26 µL de Gentamicina (a 1 mg/mL), com 250 µL de Fugizon (a 5 mg/mL), e filtrados por sucção em membrana de milipore em um filtro NALGENE. Após a filtração, foi adicionado 10% de Soro Bovino Fetal (50 mL) ao meio estéril, sendo retirada uma alíquota de 1 mL para realização de teste de esterilidade em uma estufa a 37°C.

4. Fluxo Laminar

A sala de cultura de células foi mantida isolada dos outros compartimentos do laboratório. Quando não estava em uso, mantinha-se ligada uma luz ultravioleta na mesma. A capela de fluxo laminar é constituída por um gabinete principal, dentro do qual circula uma cortina de ar horizontalmente, o qual passava por um filtro do tipo “High Efficiency Particulate Air” (HEPA). Esse filtro, que retém partículas de até 0,3 mm, tendo o ar portanto grande pureza, formou um ambiente onde foi possível trabalhar em condições ótimas de esterilidade.

5. Frascos de Cultura

A manutenção das células foi realizada em frascos de cultura de células descartáveis, que podiam ser do tipo T25, com área de crescimento de 25 cm² para um volume de 7 mL; e T75, com área de crescimento 75 cm² para um volume de 20 mL, ambos da CORNING.

6. Vidraria

Becher de 10, 50 e 100 mL (Pyrex, USA)

Erlenmeyer 250 mL (Pyrex, USA)

Pipetas 1, 5, 10 mL (LABORGLAS, Brasil ou ISLAB, Brasil ou Pyrex, USA)

Placas de Petri do tipo bacteriológico (Pyrex, USA)

7. Materiais Diversos

Agulhas descartáveis 10 x 5 e 25 x 7 (BD, Brasil ou IBRAS-CBO)

Filtros de membrana millipore para 500 mL (NALGENE, USA)

Lâminas (PERFECTA, Ind. Brasileira)

Lamínulas (GLASSTECNIA, Ind. Brasileira)

Luvas cirúrgicas (Lengruber, Brasil)

Luvas de procedimento (Blowtex, USA)

Material cirúrgico: pinça dente de rato, pinça de dissecção, bisturi, tesoura, trocater (EDLO, Brasil)

Parafina para preparação histológica (PARARLAST, Brasil)

Seringas descartáveis de 1, 3, 5 e 20 mL (BD, Brasil)

Filmes de 35 mm para fotos dos animais, e das células em microscópio óptico: Kodak Gold ASA 100

Filmes para fotos das células em microscópio invertido: filme preto e branco Kodak T400 CN.

8. Equipamentos

Agitador magnético (QUIMIS, Brasil)

Autoclave (Fabbe)

Balança (tara de 0 a 50 g, d=0,001 g, KERN 430-21, USA)

Balança para animais (tara de 0 a 2.000 g, Mettler P3, USA)

Banho-Maria (FANEM, Modelo 100, São Paulo, Brasil)

Calculadora

Centrífuga (FANEM-Excelsa Baby 1, modelo 206, São Paulo, Brasil)

Contador de Automação Técnico H3 (BAYER)

Estufa de Secagem e Esterilização (FANEM, modelo 315 SE, São Paulo, Brasil)

Estufa de CO₂ (NUAIRE TS AUTFLOW, USA)

Medidor de pH, Netron (Digimed, Brasil)

Micrótomo (SLEE MAINZ. Alemanha)

Microscópio ótico (DIMEX, México)

Microscópio invertido (NIKON, Japão)

9. Limpeza e Esterilização dos Equipamentos

O material cirúrgico foi lavado em água corrente, com o uso de detergente. Após a secagem à temperatura ambiente ou em estufa, foi armazenado em caixas de aço inoxidável e embrulhado em papel Kraft (pardo). A esterilização foi feita em autoclave a uma temperatura de 120°C durante 45 minutos a 2 atm.

A vidraria, depois de usada, foi lavada imediatamente em água corrente e imersa em solução de DETERTEC por 2 horas. Após esse tempo, foi imersa em água destilada por 1 hora, e então seca à temperatura ambiente. O material foi embrulhado em papel Kraft (pardo) e levado ao autoclave a uma temperatura de 120°C durante 45 minutos a 2 atm. As pipetas, após lavadas em água corrente foram imersas em DETERTEC por 48 horas, sendo então imersas em um lavador “Permution” por 2 horas. Após esse tempo, eram imersas em água destilada por 1 hora e, finalmente secas à temperatura ambiente, garnecidas com algodão em rama, adicionadas em tubos de aço inoxidável e levadas ao autoclave nas mesmas condições descritas acima. Após autoclavadas, as pipetas foram mantidas em estufa a uma temperatura de 170°C.

Os frascos de cultura foram descartados após serem aspergidos internamente com formol.

10. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com 4 a 6 semanas de nascidos, pesando entre 100 e 120g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Estes animais foram divididos aleatoriamente em grupos de 10 animais cada. Todos os animais foram mantidos em gaiolas de aço inoxidável, recebendo, na parte superior, água “*ad libitum*” e ração balanceada (Fri-Ribe Ratos)

11. Tumor T.E.G.S. 2047

O tumor utilizado foi o T.E.G.S. 2047 surgido espontaneamente em um rato Wistar do sexo masculino do biotério do Departamento de Patologia e Medicina

Legal da UFC (Bezerra de Araújo et al., 1980) e que, desde então, vem sendo mantido no laboratório de Oncologia Experimental do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC através de transplantes subcutâneos e cultura de células.

12. Técnica de Transplante do Tumor para Manutenção *in vivo*

Escolhia-se um animal doador com 10 a 14 dias de evolução do tumor T.E.G.S. 2047, que era sacrificado por inalação de éter etílico. O animal era colocado sobre uma bandeja estéril em uma capela de transplante, sendo feita uma antisepsia da pele com álcool iodado. Mediante uma incisão na pele que recobre o tumor, o mesmo foi completamente excisado, utilizando um conjunto de material cirúrgico. O tumor foi então colocado em uma placa de Petri contendo 10 mL de Ringer com lactato e 1 mL de cloranfenicol (100 mg/mL) onde foi lavado para retirar o excesso de sangue, bem como os debris e áreas de necrose tumoral. Os fragmentos tumorais limpos foram transferidos para uma outra placa de Petri contendo uma solução de 10 mL de Ringer com lactato e 1 mL de cloranfenicol (100 mg/mL), onde foram recortados fragmentos com tamanho aproximado de 0,5 x 0,5 cm. A solução de Ringer com lactato foi usada com a finalidade de manter as células neoplásicas com vitalidade, e o cloranfenicol foi adicionado na intenção de inibir a proliferação bacteriana.

(Continua a descrição no texto seguinte)

Os animais receptores foram anestesiados com éter etílico e colocados em uma outra bandeja estéril. Uma antisepsia da pele do animal foi realizada com álcool etílico a 70%. Por meio de um trocater (Hamburger & Fishman, 1953) introduzido na região lombar de cada animal receptor, em direção à região axilar, e em seu espaço subcutâneo, injetou-se cerca de 6 fragmentos tumorais. Fazia-se então uma antisepsia no local da introdução do trocater, e os animais receptores

(cerca de 5) eram mantidos em gaiolas recebendo água “*ad libitum*” e ração balanceada.

13. Células

A linhagem FHM foi obtida a partir da cultura primária do fibrohistiocitoma experimental T.E.G.S. 2047.

13. 1 Cultura Primária

Escolheu-se para a cultura primária um animal doador previamente inoculado com o tumor T.E.G.S. 2047 pela técnica do trocater (Hamburger & Fishman, 1953) e com, aproximadamente, 15 dias de evolução tumoral. O animal foi sacrificado por deslocamento cervical, seguido de assepsia e transferência para um ambiente estéril de uma capela de fluxo laminar. Neste ambiente estéril, o tumor foi removido, utilizando-se para tal dois conjuntos de materiais cirúrgicos previamente autoclavados. Após a exérese, o tumor foi colocado em uma placa de Petri contendo PBS, onde foi lavado para retirar o excesso de sangue e retirados os debríss e áreas de necrose tumoral. Os fragmentos tumorais foram colocados em uma outra placa de Petri contendo uma solução de tripsina a 0,125% onde foi iniciada a desagregação mecânica utilizando bisturi e pinça. O macerado tumoral resultante foi então colocado junto com a tripsina em um Erlenmeyer com bala magnética e submetido a um agitador mecânico a aproximadamente 50 rpm por 5 minutos. O sobrenadante obtido foi colocado em um tubo “Falcon” de 15 mL contendo meio RPMI completo (com soro bovino fetal), na proporção de 1:3, para neutralizar a atividade enzimática da tripsina. A suspensão de células, em seguida, foi submetida a uma centrifugação a 100 rpm por 2 minutos, obtendo-se assim um “pellet” que foi ressuspensionado em 5 mL de meio. As células foram então

plaqueadas em frascos de cultura de 25 cm². Os frascos foram mantidos em uma estufa em uma atmosfera de 5% de CO₂ e a 37°C. Transcorridas as 24 horas, foi procedida a troca do meio de cultura para retirar as células não aderidas. Quando confluentes, as células eram repicadas para frascos de 75cm³ a fim de expandir a cultura para se obter o número de células necessário para o experimento (1 x 10⁶/para cada animal a ser inoculado).

13. 2 Manutenção das Culturas

A manutenção da linhagem FHM do tumor T.E.G.S. 2047 foi feita em meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino a 10%, Gentamicina, Penicilina e Fugisone, em uma atmosfera de 5% CO₂ a 37°C. As células foram mantidas em frascos de plástico descartáveis, cuja capacidade variou de acordo com o uso a que se destinavam (25 ou 75 cm²). Se o objetivo era expandir as células para inoculação, utilizava-se o frasco 75 cm², se era apenas para mantê-las em cultura, utilizava-se o de 25 cm². A freqüência de repicagem, que se dava em ambiente estéril de um fluxo laminar, variou dependendo da quantidade de células em cada frasco, geralmente a cada 3 dias. A repicagem das células consistia em tripsinização de uma monocamada confluente. Procedia-se descartando o meio RPMI do frasco de cultura em um expurgo contendo 5 mL de solução de formol. As células foram então, cuidadosamente lavadas com 5 mL de PBS para retirar o meio remanescente além de células mortas. Adicionava-se à cultura um pequeno volume (1 mL para frascos de 25 cm³ e 3 mL para frascos de 75cm³) de tripsina a 0,125% deixando-a agir por 1 minuto. Após esse período, procedia-se à agitação do frasco, fora do fluxo laminar, para as células se destacarem, o que podia ser visualizado em um microscópio invertido de contraste de fase. Em ambiente estéril, novamente, adicionava-se meio RPMI completo na proporção de 1:3, para neutralizar a atividade enzimática da tripsina. A suspensão de células

resultante foi levada a um tubo “Falcon” de 15 mL, sendo centrifugada a 100 rpm por 2 minutos, obtendo-se assim um “pellet”. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuspendido em 5 mL de RPMI. As células foram contadas e quantidades apropriadas foram repicadas para novos frascos de cultura contendo meio. Esses frascos contendo as células foram então levados para uma estufa de CO² a uma atmosfera a 37°C onde deviam permanecer com a tampa semi-rosqueada para permitir a troca de gases.

13. 3 Observação das Células

13. 3. a Microscópio de Contraste de Fase

As células em crescimento foram observadas rotineiramente em um microscópio invertido de contraste de fase, e quando necessário, fotografadas em filme preto e branco Kodak T400 CN, usando uma câmara Nikon.

13. 3. b Microscopia Óptica

Para a observação de mais detalhes, algumas células foram cultivadas em lâminas de vidro mantidas dentro de placas de Petri contendo meio RPMI. O espaço entre a base e a tampa da placa foi selado com uma fita cirúrgica de micropore, o que permitia a troca de gases, reduzindo, contudo, a passagem de esporos de fungos. As células cresciam sobre a lâmina e em áreas da placa ao redor da mesma. Após um tempo de cultivo, a lâmina foi retirada da placa de Petri e fixada em uma solução de álcool a 80% por 10 minutos. Após esse tempo, a lâmina foi removida e lavada em uma seqüência de 3 recipientes contendo xitol 100%, água corrente e 3 recipientes com álcool 100%. As lâminas foram então coradas em hematoxilina por 10 minutos, lavadas em água corrente e

colocadas em um recipiente com água estéril por 10 minutos. Em seguida, foi feita a coloração com eosina, por 30 segundos, e posterior lavagem, em uma seqüência de passagens por água corrente, 3 recipientes com álcool a 100% e 3 recipientes contendo xitol a 100%. As lâminas, quando secas, foram montadas em bálsamo do Canadá. Essas lâminas serviram para estudo e documentação fotográfica da morfologia dessas células em cultura.

14. Obtenção do Inóculo Celular

As células isoladas foram obtidas por tripsinização de uma monocamada confluente, em ambiente estéril de fluxo laminar como descrito anteriormente. O “pellet” obtido, entretanto, foi ressuspensionado em 3 mL de PBS. Uma amostra de 20 µL foi retirada para contagem das células em uma câmara de Neubauer a fim de se poder diluir a suspensão celular na concentração 1×10^6 células /mL de PBS.

14. 1 Contagem das Células

A contagem era feita nos quatro quadrantes da câmara de Neubauer, observada em um microscópio óptico binocular. O resultado foi obtido calculando-se a média aritmética do número de células dos quatro quadrantes, que multiplicado por 10^4 representava a quantidade de células em cada mL da suspensão.

15. Armazenamento das Células

Alguns frascos de cultura tiveram as suas células estocadas em nitrogênio líquido para uso no experimento seguinte. As células a serem congeladas foram tripsinizadas, como descrito anteriormente, e ressuspensionadas a uma

concentração 1 a 2 x 10⁶ células/mL em meio RPMI suplementado com 10% de dimetil sulfóxido (DMSO). Alíquotas de 1 mL dessa suspensão celular foram dispensadas em pequenas ampolas de plástico com tampa rosqueada e armazenadas, por 24 horas, em freezer a uma temperatura de -70°C. Após esse período, as ampolas foram transferidas para o tanque de armazenamento do nitrogênio líquido, em lotes de 2 a 6 ampolas, e mantidas a -195°C. O descongelamento das células quando necessário, era feito o mais rápido possível por agitação da ampola em banho maria a 37°C. A suspensão de células era então transferida para um tubo “Falcon” de 15 mL contendo 5 mL de PBS, e centrifugada a 100 rpm por 2 minutos. O sobrenadante era então descartado e o “pellet” ressuspendido em meio RPMI e distribuídos em frascos de cultura como previamente descrito. A manutenção posterior dessas células foi feita em conformidade com a técnica descrita anteriormente.

16. Tumores

Foram obtidos a partir da inoculação, em cada rato, de 1 x 10⁶ células da linhagem FHM em suspensão em 1 mL de PBS, as quais foram inoculadas via subcutânea (s.c.), próximo à região axilar ou no dorso do animal. Usou-se para tal seringas de 1 mL e agulhas de insulina (10 x 5).

17. Drogas

17. 1 Ciclosporina (CS)

A Ciclosporina foi obtida da Biosintética, Indústria Brasileira, na concentração de 100 mg/mL, solução oral. Ela foi preparada por dissolução em azeite de oliva e administrada por via subcutânea, na dose de 10 mg/Kg/dia

por animal. A via s.c. foi escolhida por apresentar maior facilidade de administração, ser bem tolerada pelo animal e por resultar em níveis sanguíneos constantes e reproduzíveis de Ciclosporina, com pequena variação sérica, mantendo assim uma adequada imunossupressão com mínima toxicidade (Wassef et al., 1985).

A dose de Ciclosporina oral varia entre 7,5-25 mg/Kg/dia em transplantes humanos (Barbuto et al., 1998).

17. 2 Azatioprina (AZA)

A Azatioprina foi obtida da EUROFARMA LABORATÓRIOS LTDA, Indústria Brasileira, com 50 mg cada comprimido. Os comprimidos de Azatioprina foram macerados, diluídos em água destilada e administrados via s.c. na dose de 4 mg/Kg/dia/animal.

A dose de Azatioprina em transplantes de órgão varia entre 3-4 mg/Kg/dia em humanos (Marino & Doyle, 1994).

17. 3 Metil-prednisolona (MP)

Foi utilizado o Depo- Medrol, que é o 21-Aacetato de Metil-prednisolona, em suspensão aquosa injetável com 40 mg/mL em cada frasco, da RHODIA FARMA LTDA. Indústria Brasileira. A Metilprednisolona foi diluída em água destilada e administrada via s.c. na dose de 1 mg/Kg/dia.

A dose de 1 mg/Kg/dia de MP foi escolhida considerando-se que a dose utilizada de Prednisona em doenças autoimunes em humanos é de 1 mg/Kg/dia, e levando-se em conta que 5 mg de Prednisona corresponde a 4 mg de Metilprednisolona (Goldfien, 1998).

17. 4 Micofenolato Mofetil (MMF) ou Cell Cept (CC)

O Micofenolato Mofetil (CellCept) foi obtido da Roche, Indústria Brasileira, com 500 mg cada comprimido. Os comprimidos de MFM foram macerados em uma capela de fluxo laminar, devido à sua toxicidade, diluídos em água destilada e administrados via s.c. nas doses de 40 mg/Kg/dia ou de 20 mg/Kg/dia.

As doses de 40 mg/Kg/dia e 20 mg/Kg/dia foram obtidas, respectivamente, a partir das doses de 3 g/dia e 2 g/dia em humanos, considerando-se um adulto de 70 Kg (CellCept, [199?]). A dose de 2 g/dia corresponderia, a aproximadamente 28 mg/Kg/dia, entretanto, utilizamos a dose de 20 mg/Kg/dia por ser a mais utilizada em modelos experimentais em ratos (Martelius et al., 1997; Müller et al., 1998).

As doses de todas as drogas foram obtidas dos intervalos de doses utilizadas em humanos, comparando-as com as doses usadas em modelos experimentais.

A diluição de cada droga foi calculada de acordo com o peso médio dos animais do grupo a ser tratado, de modo que a dose diária por animal estivesse contida em 0,5 mL da solução.

18. Descrição do Experimento

18. 1 Fase 1

Em uma primeira fase, foram utilizados 2 grupos de 10 animais cada. No grupo 2 (controle) os animais foram inoculados por via s.c. com as células tumorais (10^6 células FHM diluídas em 1mL de PBS) e acompanhados até a morte. No grupo 1, os animais foram inoculados via s.c. com as células tumorais (10^6 células diluídas em 1 mL de PBS), e tratados com CS 10 mg/Kg/dia via s.c., iniciando o tratamento 24 horas antes da inoculação das células, e continuando até a morte do animal. A inoculação das células era feita no dorso do animal, em local diferente ao da administração da Ciclosporina.

18. 2 Fase 2

Nesta fase, utilizou-se a mesma metodologia de inoculação e tratamento, da fase anterior, em 4 grupos de 10 animais cada. Os grupos 1, 2 e 3 foram inoculados via s.c. com as células tumorais (10^6 células FHM diluídas em 1 mL de PBS). O grupo 1 foi tratado com CS a 10 mg/Kg/dia via s.c., o grupo 2, com Azatioprina a 4 mg/Kg/dia via s.c. e o grupo 3, com Metilprednisolona a 1 mg/Kg/dia via s.c.. O tratamento com as respectivas drogas foi iniciado 24 horas antes da inoculação das células, continuando até a morte do animal. O grupo 4 recebeu somente as células tumorais (10^6 células FHM diluídas em 1 mL de PBS), funcionando como grupo controle. Ao final de 30 dias, antes do sacrifício dos animais, foi feita a colheita de sangue (0,5 mL por animal) através de punção intracardíaca. Cada grupo, nessa fase, teve seu experimento repetido de 2 a 3 vezes, de modo que obtivemos 30 animais no grupo 1, 20 animais no grupo 2, 30 animais no grupo 3 e 26 animais no grupo 4.

18. 3 Fase 3

Esta terceira fase foi realizada em duas etapas, sendo mantida a mesma metodologia de inoculação e tratamento das fases anteriores.

18. 3. a Primeira Etapa

Foram utilizados 2 grupos de 10 animais cada, todos eles inoculados com as células tumorais via s.c. (10^6 células FHM diluídas em 1 mL de PBS). O grupo 1 foi tratado com Micofenolato Mofetil (MMF) via s.c. na dose de 40 mg/Kg/dia, iniciando o tratamento 24 horas antes da inoculação das células e prosseguindo até a morte dos animais. O grupo 2 recebeu somente as células tumorais funcionando como controle.

18. 3. b Segunda etapa

Em uma segunda etapa, foram também utilizados 2 grupos animais, o 1º com 10 animais e o 2º com 5, ambos os grupos inoculados com as células tumorais via s.c. (10^6 células FHM diluídas em 1 mL de PBS). O grupo 1 foi tratado com MMF na dose de 20 mg/Kg/dia e o grupo 2 recebeu somente as células tumorais, funcionando como controle. Ao final do experimento, foi coletado o sangue dos animais para realização do hemograma.

Todos os animais, em todas as fases do experimento, foram observados diariamente, e os tumores, quando presentes, mensurados a cada 2 dias para realização de uma curva de crescimento tumoral. O sacrifício dos animais foi realizado por deslocamento cervical. Todos eles foram necropsiados e tiveram observados macroscopicamente o fígado, o baço e o pulmão para a pesquisa de focos metastáticos. Os órgãos com alguma alteração ou

suspeitos eram fixados em formol a 10%, incluídos em parafina, cortados em micrótomo à espessura de 4 a 6 μm , corados pela técnica da Hematoxilina/Eosina e enviados para análise microscópica. Quando necessário, os cortes histopatológicos eram fotografados em microcâmera Samsung acoplada a um microscópio Nikon. O tempo em que o sacrifício deveria ser realizado foi determinado pelo estado geral dos animais, avaliando principalmente a dispneia e caquexia, ou o surgimento dos primeiros animais com morte espontânea. A figura 09 mostra uma representação esquemática da metodologia por nós utilizada.

18. 4 Hemograma

O anticoagulante usado no hemograma foi o EDTA a 1%. Os tubos de vidro para a colheita do sangue foram instilados com 200 μL de EDTA a 1% e mantidos em estufa a 37°C, por cerca de 3 dias, para evaporação da água. Após esse período, os tubos eram retirados da estufa, e o pó de EDTA raspado com uma espátula fina para melhor diluição com o sangue. Os tubos foram fechados com tampa de borracha. Após a colheita do sangue dos animais, os tubos foram imediatamente encaminhados ao Laboratório Luís Pasteur, onde foi realizado a contagem das células em um aparelho de automação técnico, com posterior revisão das lâminas.

18. 5 Punção Intracardíaca

O rato foi anestesiado com éter etílico, mantendo-se um tubo contendo algumas gotas de éter ao redor das vias aéreas superiores para assegurar a anestesia durante o procedimento. O animal foi posicionado com a cabeça voltada para a mão esquerda do experimentador. Com o polegar esquerdo, localizou-se o ponto de palpação máxima entre a 4^a, 5^a e 6^a costelas. Para colher o sangue,

suspeitos eram fixados em formol a 10%, incluídos em parafina, cortados em micrótomo à espessura de 4 a 6 μm , corados pela técnica da Hematoxilina/Eosina e enviados para análise microscópica. Quando necessário, os cortes histopatológicos eram fotografados em microcâmera Samsung acoplada a um microscópio Nikon. O tempo em que o sacrifício deveria ser realizado foi determinado pelo estado geral dos animais, avaliando principalmente a dispnéia e caquexia, ou o surgimento dos primeiros animais com morte espontânea. A figura 09 mostra uma representação esquemática da metodologia por nós utilizada.

18. 4 Hemograma

O anticoagulante usado no hemograma foi o EDTA a 1%. Os tubos de vidro para a colheita do sangue foram instilados com 200 μL de EDTA a 1% e mantidos em estufa a 37°C, por cerca de 3 dias, para evaporação da água. Após esse período, os tubos eram retirados da estufa, e o pó de EDTA raspado com uma espátula fina para melhor diluição com o sangue. Os tubos foram fechados com tampa de borracha. Após a colheita do sangue dos animais, os tubos foram imediatamente encaminhados ao Laboratório Luís Pasteur, onde foi realizado a contagem das células em um aparelho de automação técnico, com posterior revisão das lâminas.

18. 5 Punção Intracardíaca

O rato foi anestesiado com éter etílico, mantendo-se um tubo contendo algumas gotas de éter ao redor das vias aéreas superiores para assegurar a anestesia durante o procedimento. O animal foi posicionado com a cabeça voltada para a mão esquerda do experimentador. Com o polegar esquerdo, localizou-se o ponto de palpitação máxima entre a 4^a, 5^a e 6^a costelas. Para colher o sangue,

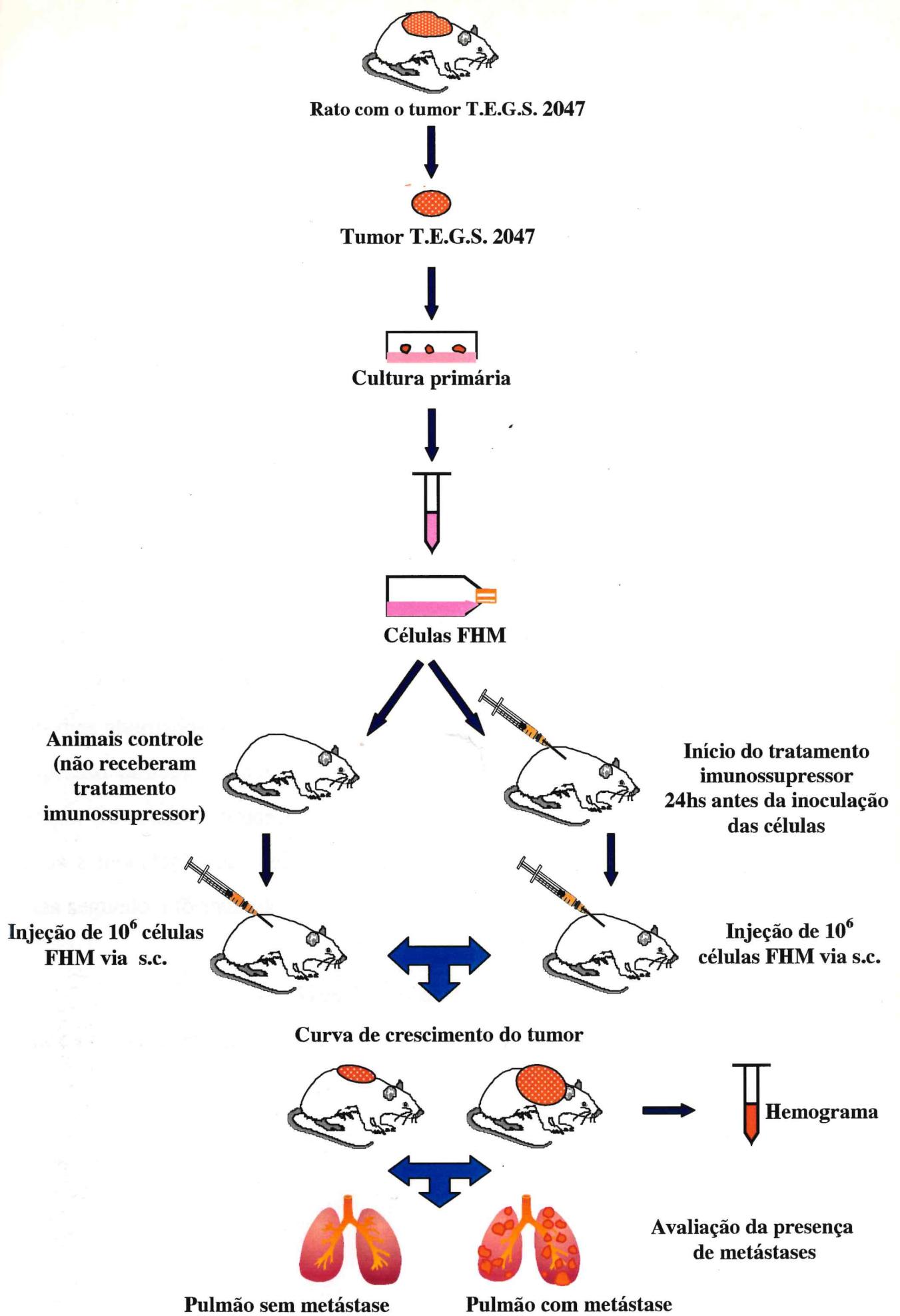


Figura 09: Representação esquemática da metodologia utilizada.

utilizou-se uma seringa estéril de 3 mL. Uma solução de EDTA a 1% foi aspirada e descartada em um expurgo apenas para “banhar” a seringa. Quando o coração foi localizado, com a seringa na mão direita, fez-se a punção com a agulha suavemente adentrando a cavidade torácica em direção ao ponto de palpitação cardíaca, fazendo um ângulo de 45° com o eixo longitudinal do rato. Quando o coração podia ser sentido batendo contra a ponta da agulha, a seringa era empurrada e, uma vez penetrado o ventrículo esquerdo, o sangue jorra para dentro da seringa, devendo-se então aspirar gradualmente 0,5 mL, que foram colocados nos tubos com EDTA previamente preparados (0,5 mL de sangue para 200 µL de EDTA 1%).

18. 6 Curva de Crescimento Tumoral

Os valores foram obtidos no decorrer do tratamento através da mensuração, em dias alternados, dos dois diâmetros perpendiculares do tumor. O resultado era expresso através da média diária dos volumes tumorais dos animais de cada grupo. Os volumes tumorais (cm^3) foram plotados contra o tempo (dias) decorrido após a inoculação das células. Os volumes totais foram calculados a cada dois dias segundo a fórmula de Steel (1977):

$$V(\text{cm}^3) = D \cdot d^2 / 2$$

onde D = diâmetro maior do tumor e d = diâmetro menor do tumor.

O tempo de duplicação (TD) ou *doubling time*, que consiste no número de dias necessários para que haja duplicação do volume tumoral, foi calculado considerando-se a parte da curva em crescimento exponencial, segundo a fórmula:

$$\text{TD (dias)} = \frac{\ln 2}{n}$$

onde Nd= número de dias e n= 3,32 ($\log V - \log V_0$), e onde V_0 = volume tumoral no início da fase log e V= volume tumoral no final da fase log (Freshney, 1987).

19. Análise estatística

Os volumes tumorais utilizados para obtenção da curva de crescimento do tumor foram expressos em média \pm erro padrão. Os índices leucocitários também foram expressos em média \pm erro padrão. Para avaliação da curva de crescimento da Fase 2 do experimento (CS/ AZA/ MP/ Controle) e para a comparação dos índices leucocitários, foi realizada análise de variância utilizando Teste de Dunnet, considerando-se como significativo $p < 0,05$. Para as demais curvas, foi realizada análise de variância utilizando tese “t” de Student não pareado, tendo como significativo $p < 0,05$. A análise dos índices metastáticos foi feita usando teste de hipótese de proporções, considerando-se a tabela de distribuição Normal (N), considerando-se significativo $p < 0,05$.

RESULTADOS

Não foi encontrada nenhuma evidência de metástase nos animais inoculados para manutenção do tumor T.E.G.S. 2047.

A cultura primária do tumor T.E.G.S. 2047 (com aproximadamente 15 dias de evolução) permitiu obter a linhagem celular FHM. A observação dessas culturas em microscópio invertido de contraste de fase permitiu evidenciar os dois tipos celulares descritos por Porto (1996) que compõem o tumor: células arredondadas e células fusiformes (semelhantes a fibroblasto). A **figura 10** mostra uma microfotografia (em microscópio invertido) da linhagem FHM mantida em cultura. A **figura 11** mostra duas microfotografias das células da linhagem FHM observadas em microscópio óptico e coradas com hematoxilina-eosina.

A inoculação da suspensão de 10^6 células da linhagem FHM, diluídas em 1 mL de PBS, via s.c. no dorso do animal, remontou o tumor T.E.G.S. 2047, como mostra a **figura 12**, apresentando ao exame microscópico as mesmas características histopatológicas descritas por Bezerra de Araújo e colaboradores (1980), Ribeiro (1987) e Porto (1996). As **figuras 13, 14 e 15** mostram microfotografias de cortes histológicos do tumor T.E.G.S. 2047.

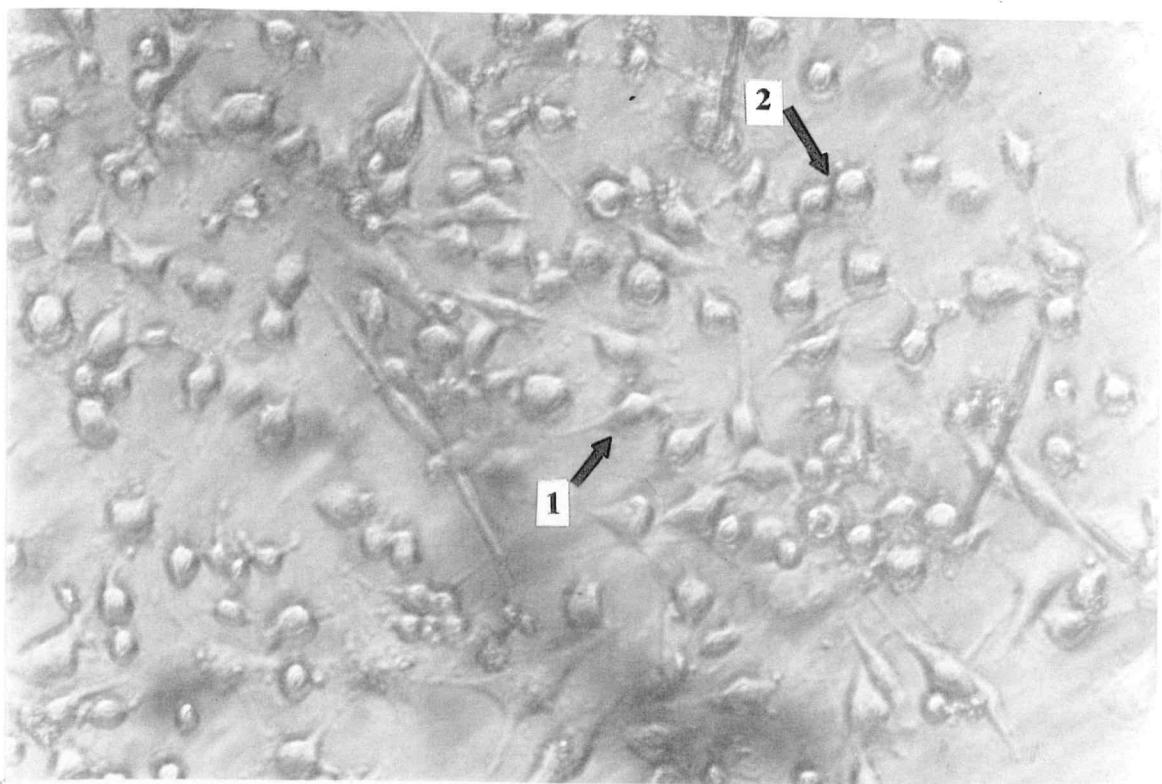
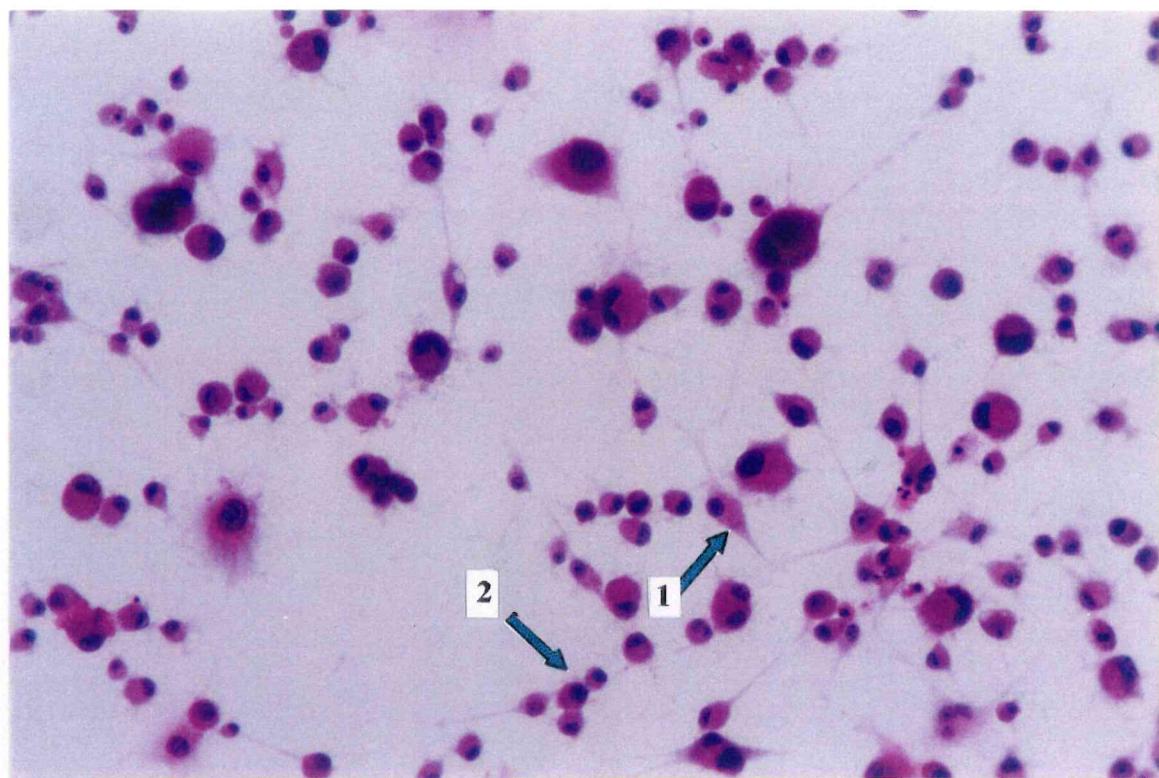


Figura 10: Linhagem de células FHM, derivadas do tumor T.E.G.S. 2047, mantidas em cultura, onde se pode evidenciar os dois tipos celulares que compõem o tumor: fusiformes, semelhantes à fibroblastos (1) e arredondadas (2). Microscópio invertido 200X.

(a)



(b)

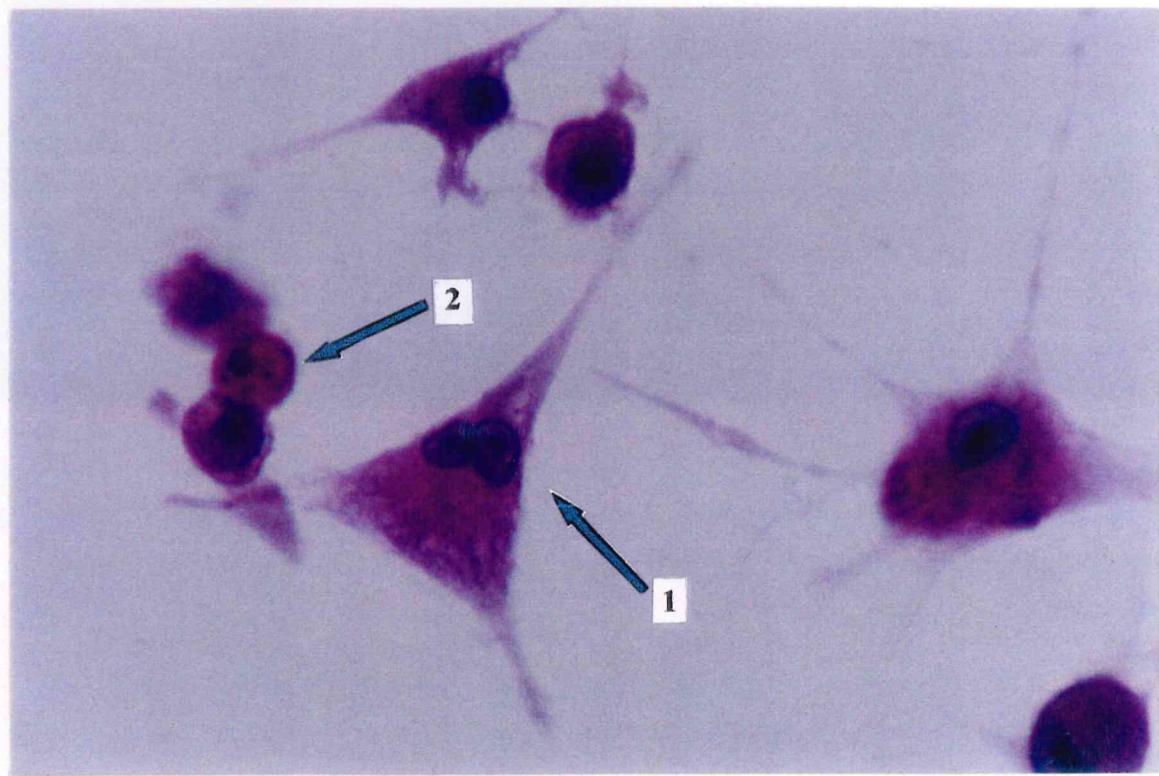
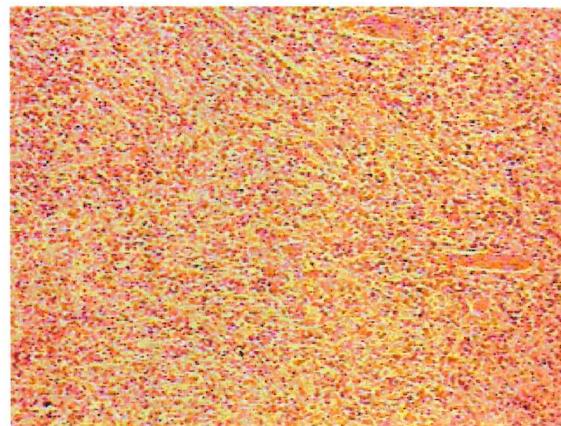


Figura 11: Microfotografia da linhagem de células FHM, derivadas do tumor T.E.G.S. 2047, mantidas em cultura e posteriormente coradas com hematoxilina-eosina, onde se pode evidenciar os dois tipos celulares que compõem o tumor: fusiformes, semelhantes à fibroblastos (1) e arredondadas (2). (a) HE 100X; (b) HE 400X.



Figura 12: Rato portador de tumor resultante da inoculação de 10^6 células da linhagem FHM, via s.c., obtidas a partir da cultura do tumor T.E.G.S. 2047.

(a)



(b)

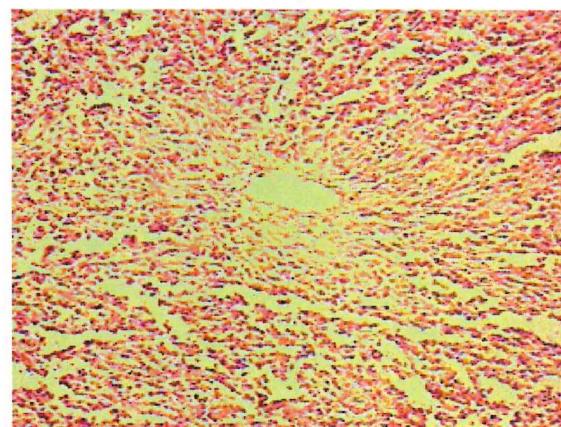
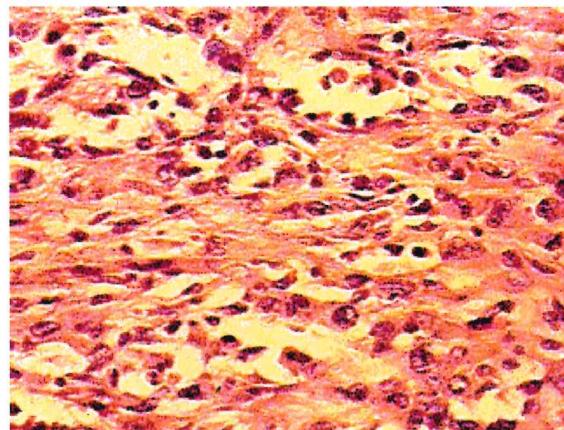


Figura 13: Microfotografia mostrando o padrão histológico do tumor T.E.G.S 2047.: (a) HE 40; (b) corte histológico mostrando a disposição das células ao redor de um vaso, mostrando ainda áreas que lembram um padrão alveolar, HE 100.

(a)



(b)

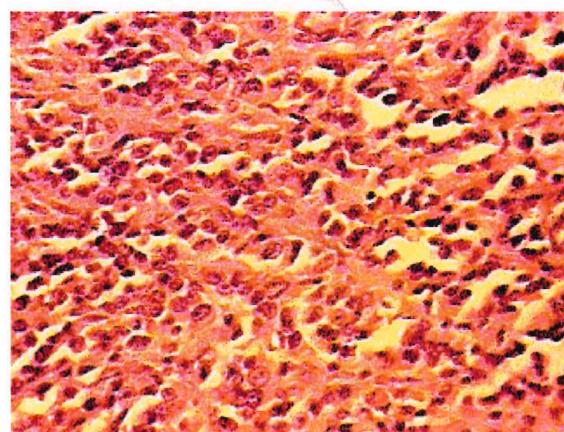
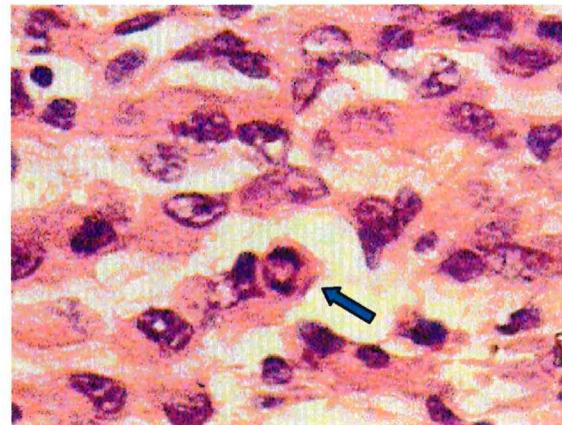


Figura 14: Microfotografia tumor T.E.G.S. 2047, mostrando em: (a) padrão de células fusiformes, HE 400; e em (b) padrão de células arredondadas, HE 400.

(a)



(b)

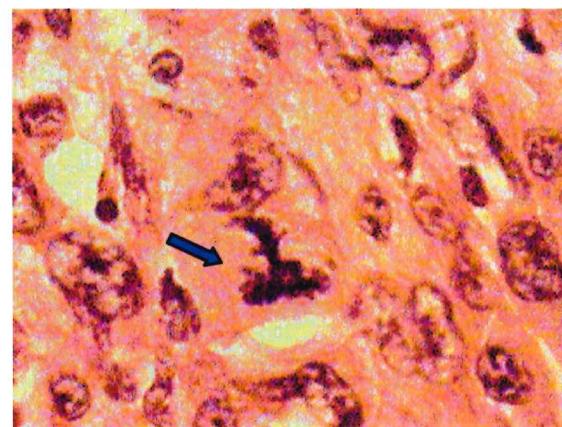


Figura 15: Microfotografia do tumor T.E.G.S. 2047, mostrando figuras de mitose: em (a) figura típica de mitose, HE 1000; em (b) figura de mitose atípica, HE 1000.

1. Fase 1

1. 1 Crescimento do Tumor e Índice de Pega

O índice de pega dos tumores nos animais do grupo 1 (inoculados com 10^6 células FHM e tratados com Ciclosporina 10 mg/Kg/dia) e nos animais do grupo 2 ou controle (inoculados somente com 10^6 células FHM) foi de 100%, conforme mostra a **tabela 02**.

Tabela 02: Índice de “pega” dos tumores a partir da inoculação de 10^6 células FH1 via s.c. no dorso dos animais nos grupos da Fase 1 do experimento.

Grupos	Nº de animais inoculados com 10^6 células FHM	Nº de animais que desenvolveram tumor	Índice pega
1 (CS)	10	10	100%
2 (controle)	10	10	100%

Os tumores cresceram como massas subcutâneas, ovóides ou esféricas, com dimensões variáveis (figura 16). À necropsia, apresentavam uma grande área de necrose central.

Os valores médios dos volumes tumorais observados durante a curva de crescimento do tumor T.E.G.S. 2047, obtido a partir da inoculação de 10^6 células, nos grupos 1 e 2 encontram-se, respectivamente, nas **tabelas 03 e 04**. Um crescimento tumoral significativamente maior foi observado no grupo tratado com Ciclosporina (grupo 1) em relação ao grupo controle (grupo 2), com $p < 0,05$ no 8º dia após a inoculação das células, e $p < 0,01$ ao longo da curva a partir do 12º dia após a inoculação das células, conforme mostra a **figura 17**. O tempo de duplicação do volume tumoral (TD) foi de 6,46 dias/cm² para o grupo controle, enquanto que no grupo tratado com Ciclosporina, o TD foi de 6,29 dias/cm².

Tabela 03: Valores médios dos diâmetros e volumes do tumor T.E.G.S. observados nos animais do grupo 1 (inoculados com 10^6 células FHM, e tratados com CS 10 mg/Kg/dia) e do grupo 2 ou controle (inoculados com 10^6 células FHM) na Fase 1 do experimento, a cada dia de medição. Os volumes tumorais foram utilizados para a obtenção da curva de crescimento do tumor. (*)

Valores médios (volume cm ³) dos dois grupos a cada dia de medição					
	Grupo 1 (Ciclosporina)		Grupo 2 (Controle)		
Dias após a transplante	Volume (cm ³)	Número de animais	Volume (cm ³)	Número de animais	
04	2,1 ± 0,094	10			
08	4,2 ± 0,252	10			
12	12 ± 0,632	10	1,98 ± 0,158	10	
16	20 ± 1,075	10	3,4 ± 0,252	10	
20	28 ± 1,011	10	7,8 ± 0,505	10	
24	40 ± 1,676	10	17,73 ± 1,075	10	
28	44 ± 1,707	10	26 ± 1,359	10	
32	46 ± 1,138	10	35 ± 1,423	10	
36			37 ± 1,549	10	
40			40 ± 1,296	10	

(*) Resultados expressos em média ± erro padrão.



Figura 16: Fotografia de tumores de animais do grupo 2 (controle), abaixo da régua, e do grupo 1 (tratados com Ciclosporina 10 mg/Kg/dia), acima da régua. Pode ser evidenciado um tamanho maior para os tumores do grupo 1, no mesmo período de tempo.

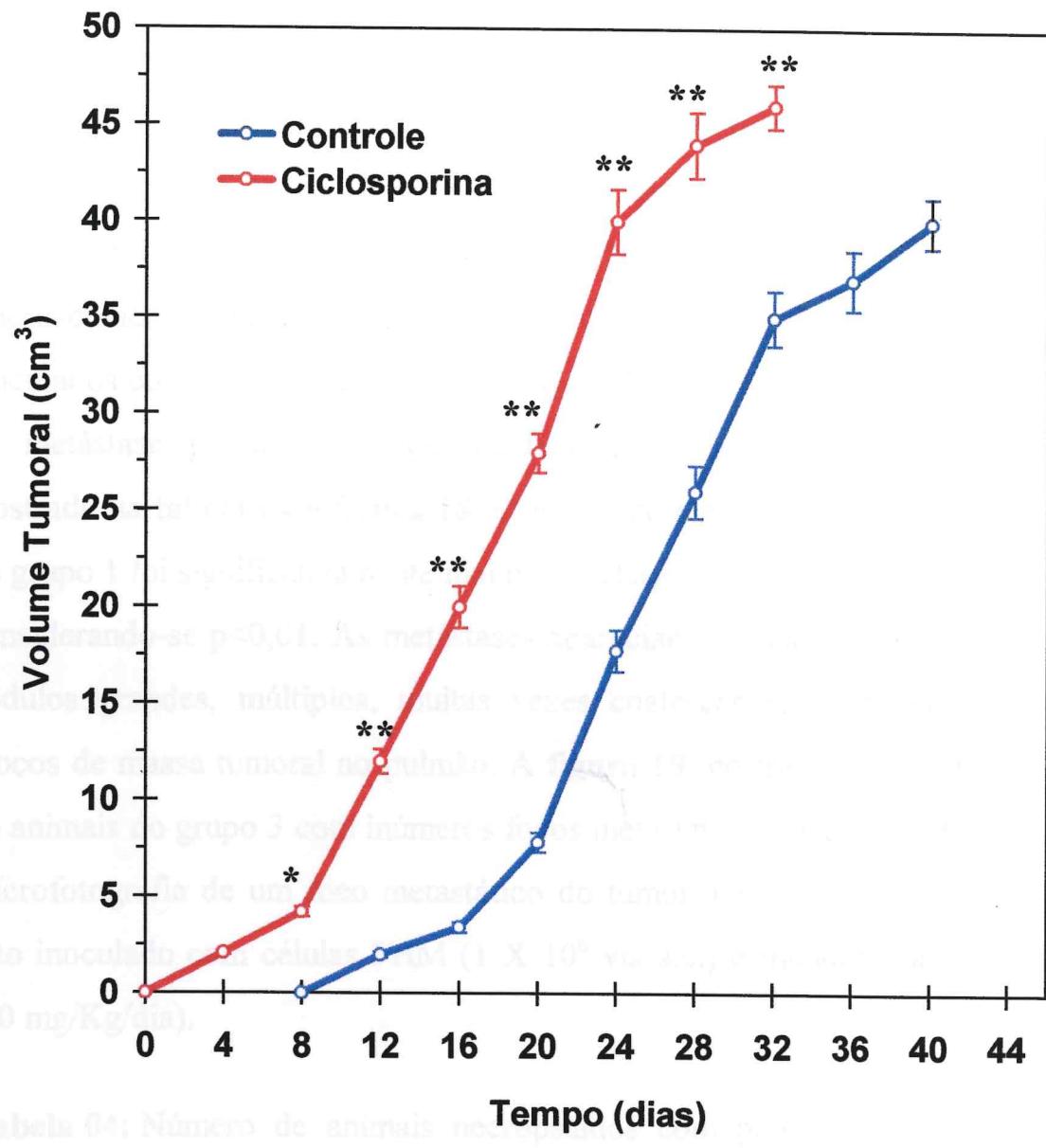


Tabela 04: Número de animais necropsiados com metástase pulmonar na Fase 1 do experimento.

Grupos

Animais submetidos à necropsia

Morte espontânea

Sacrifício

Figura 17: Curva de crescimento tumoral dos animais inoculados com o tumor T.E.G.S. 2047 (10^6 células da linhagem FHM) e tratados com Ciclosporina 10 mg/Kg/dia (grupo 1), em relação ao controle (grupo 2), na Fase 1 do experimento. Cada ponto corresponde à média ± erro padrão. (*) P<0,05 comparado ao controle. () P<0,01 comparado ao controle.**

1. 2 Avaliação da Presença de Metástases

Os animais do grupo 1 (inoculados com 10^6 células FHM, e tratados com CS 10 mg/Kg/dia) (n=10) foram sacrificados no 32º dia após a inoculação das células FHM, e os do grupo 2 ou controle (inoculados com 10^6 células FHM) (n=10) no 40º dia. Após a necrópsia, foi constatado um índice de 70% dos animais do grupo tratado com CS (grupo 1) com metástase pulmonar macroscópica, enquanto que os animais do grupo controle (grupo 2), embora inoculados com os mesmos tipos de células, não apresentaram nenhuma evidência de metástase pulmonar ou em nenhum outro órgão examinado, conforme mostrado na **tabela 04** e **figura 18**. O índice de metástase pulmonar nos animais do grupo 1 foi significativamente maior em relação aos animais do grupo controle, considerando-se $p<0,01$. As metástases apareciam na maioria dos pulmões como nódulos grandes, múltiplos, muitas vezes coalescentes, formando verdadeiros blocos de massa tumoral no pulmão. A **figura 19** mostra a foto de dois pulmões de animais do grupo 3 com inúmeros focos metastáticos. A **figura 20** mostra uma microfotografia de um foco metastático do tumor T.E.G.S. 2047 em pulmão de rato inoculado com células FHM (1×10^6 via s.c.) e tratados com Ciclosporina (10 mg/Kg/dia).

Tabela 04: Número de animais necropsiados com presença ou ausência de metástase pulmonar na Fase 1 do experimento.

Grupos	Animais submetidos à necrópsia				
	Morte espontânea		Sacrificados		Incidência metástases
	nº de animais necropsiados	nº de animais com metástase	nº de animais necropsiados	nº de animais com metástase	
1 (CS)	—/—		10 / 7		10/ 7 (70%) **
2 (controle)	—/—		10 / 0		10/ 0 (00%)

(**) $P<0,01$, em comparação ao controle.

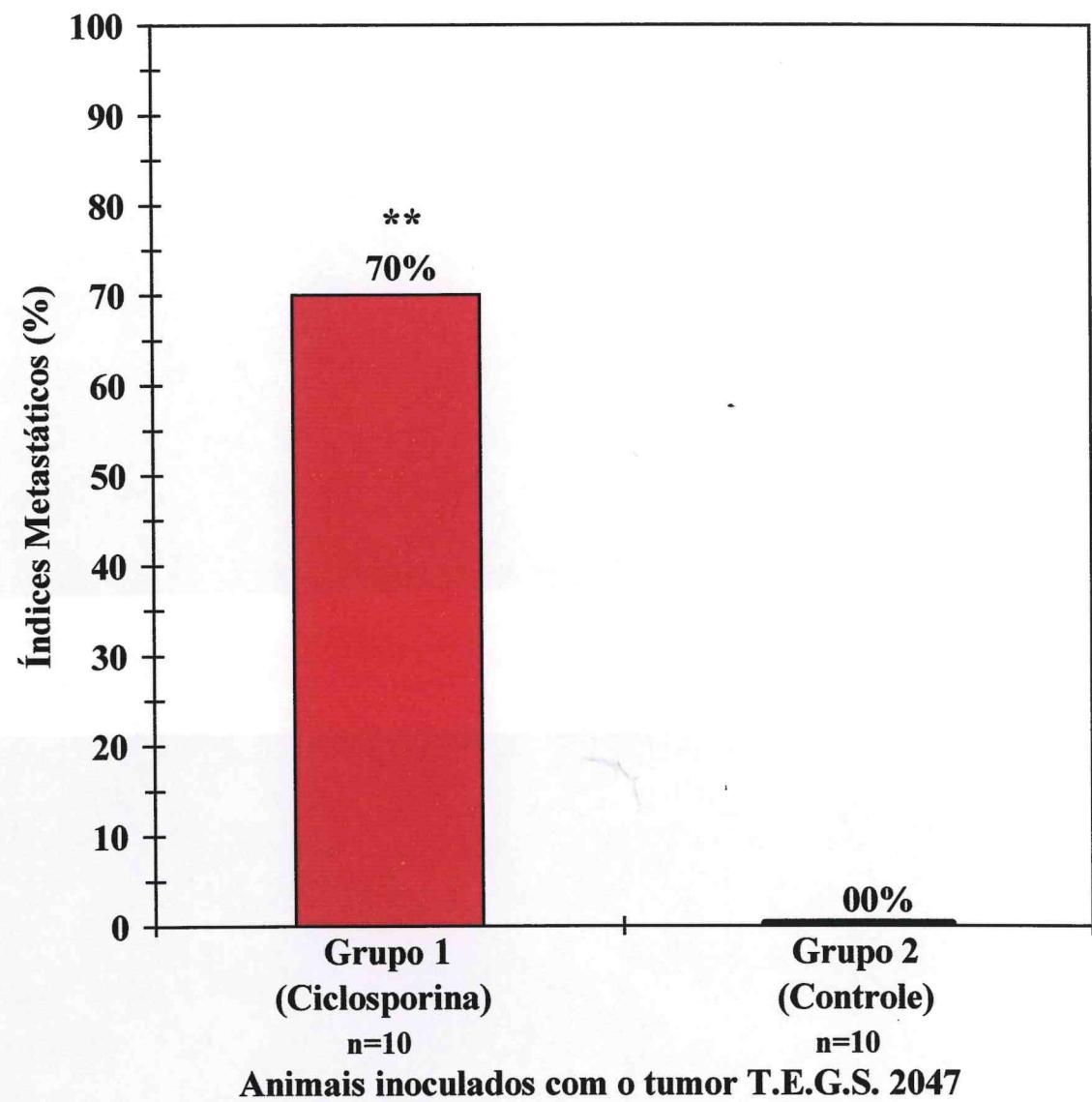


Figura 18: Percentual de animais inoculados com o tumor T.E.G.S. 2047 (10^6 células da linhagem FHM) portadores de metástases no grupo 1 (tratados com Ciclosporina 10 mg/Kg/dia) e grupo 2 (controle), na Fase 1 do experimento. (*) P<0,01 comparado ao controle.

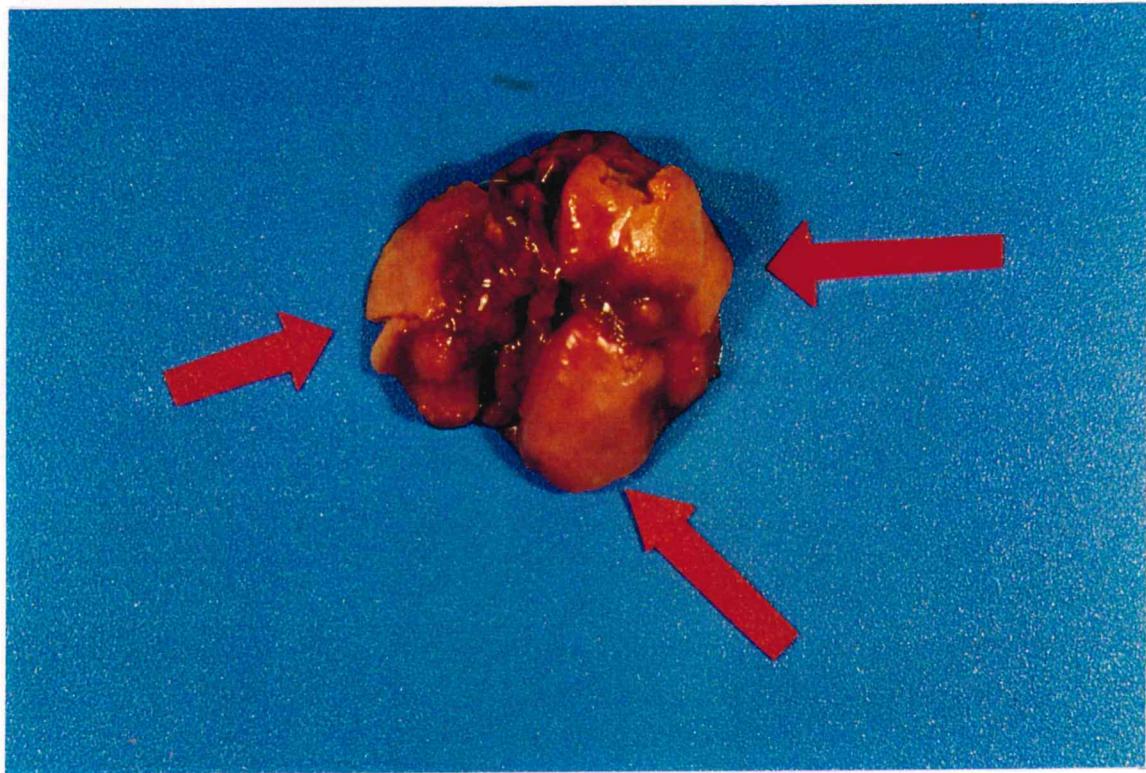
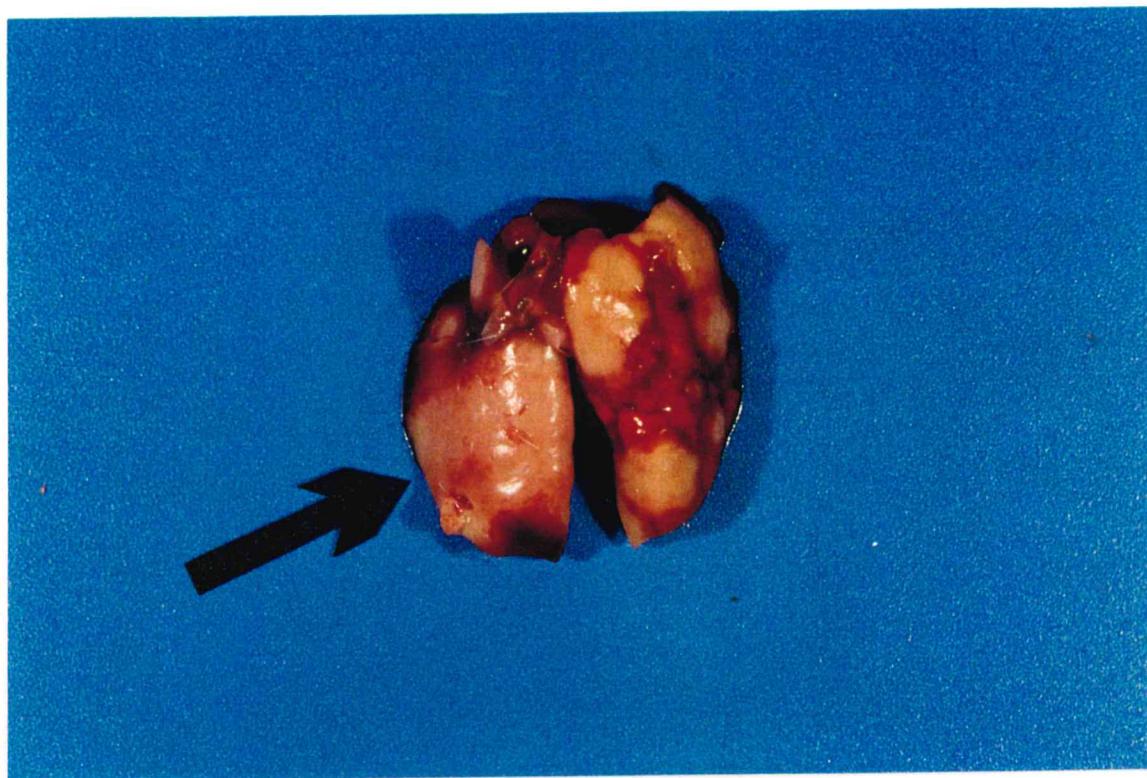


Figura 19: Fotografia de pulmões de animais inoculados com células FHM obtidas a partir da cultura primária do fibrohistiocitoma T.E.G.S. 2047 e tratados com Ciclosporina na dose de 10 mg/ Kg/ dia.

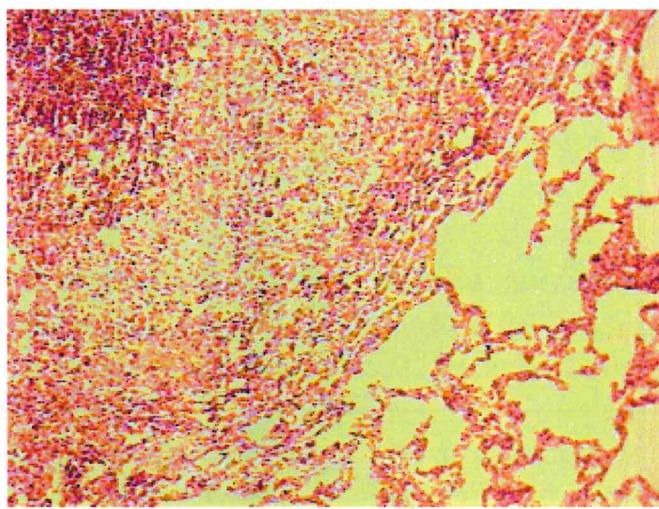


Figura 20: Microfotografia de um foco metastático do tumor T.E.G.S 2047 em pulmão de rato inoculado com 1×10^6 células FHM e tratado com Ciclosporina 10 mg/Kg/dia. HE 100X.

2. Fase 2

2. 1 Crescimento do Tumor e Índice de Pega

A **tabela 05** mostra que o índice de pega dos tumores foi de 100% nos animais do grupo 1 (inoculados com 10^6 células FHM e tratados com Ciclosporina 10 mg/Kg/dia), grupo 2 (inoculados com 10^6 células FHM e tratados com Azatioprina 4 mg/Kg/dia) e grupo 3 (inoculados com 10^6 células FHM e tratados com Metilprednisolona 1 mg/Kg/dia). No grupo 4 (controle, inoculado com 10^6 células FHM), o índice foi de 73%.

Tabela 05: Índice de pega dos tumores a partir da inoculação de 10^6 células FHM via s.c. no dorso dos animais nos grupos da Fase 2 do experimento.

Grupos	Nº de animais inoculados com 10^6 células FHM	Nº de animais que desenvolveram tumor	Índice pega
1 (CS)	30	30	100%
2 (AZA)	20	20	100%
3 (MP)	30	30	100%
4 (Controle)	26	19	73%

Os valores médios dos volumes e diâmetros observados no tumor T.E.G.S. 2047 obtidos durante a curva de crescimento dos animais nos grupos 1, 2, 3 e 4 encontram-se, respectivamente, nas **tabelas 06, 07, 08 e 09**. A **tabela 10** faz uma comparação dos volumes observados a cada dia de medição nos quatro grupos. As curvas de crescimento tiveram início por volta do 12º dia após a inoculação das células tumorais. Um crescimento tumoral significativamente maior foi

observado, a partir do 14º dia, nos animais do grupo tratado com Ciclosporina (grupo 1) em relação aos animais do grupo controle (grupo 4), bem como aos animais dos grupos tratados com Azatioprina (grupo 2) e Metilprednisolona (grupo 3), considerando-se significativo $p<0,05$ para o 14º dia, e $p<0,01$ ao longo da curva a partir do 16º dia. Os animais do grupo tratado com Metilprednisolona (grupo 3) mostraram um maior crescimento tumoral em relação ao grupo controle e ao grupo tratado com Azatioprina (grupo 2) após o 18º dia de inoculação das células ($p<0,05$). Os animais do grupo tratado com Azatioprina (grupo 2) não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) no volume tumoral em relação ao grupo controle. A **figura 21** mostra as curvas de crescimento dos quatro grupos. O tempo de duplicação (TD) do volume tumoral foi de 2,69 dias/cm³ para o grupo controle (grupo 4), enquanto que no grupo tratado com CS (Grupo 1) foi de 2,22 dias/cm³, no tratado com Azatioprina (grupo 2) foi de 2,82 dias/cm³ e no tratado com Metilprednisolona (grupo 3) foi de 2,74 dias/cm³.

Tabela 06: Valores médios dos diâmetros e volumes do tumor T.E.G.S. observados nos animais do grupo 1 (inoculados com 10^6 células FHM e tratados com CS 10 mg/Kg/dia) na Fase 2 do experimento, a cada dia de medição. Os volumes tumorais foram utilizados para a obtenção da curva de crescimento do tumor. (*)

Dias após a inoculação das células	Valores médios do grupo a cada dia de medição			
	Diâmetro maior (cm ³)	Diâmetro menor (cm ³)	Volume (cm ³)	Número de animais
12	1,98 ± 0,098	1,4 ± 0,042	1,97 ± 0,172	10
14	2,8 ± 0,134	1,8 ± 0,089	4,608 ± 0,474	10
16	3,78 ± 0,209	2,27 ± 0,091	10,023 ± 1,025	10
18	4,43 ± 0,213	2,89 ± 0,216	19,628 ± 3,185	10
20	5,25 ± 0,245	3,35 ± 0,201	30,962 ± 4,466	10
22	5,87 ± 0,343	3,82 ± 0,165	44,778 ± 5,868	10

(*) Resultados expressos em média ± erro padrão.

Tabela 07: Valores médios dos diâmetros e volumes do tumor T.E.G.S. observados nos animais do grupo 2 (inoculados com 10^6 células FHM e tratados com Azatioprina 4 mg/Kg/dia) na Fase 2 do experimento, a cada dia de medição. Os volumes tumorais foram utilizados para a obtenção da curva de crescimento do tumor. (*)

Valores médios do grupo a cada dia de medição

Dias após a inoculação das células	Diâmetro maior (cm^3)	Diâmetro menor (cm^3)	Volume (cm^3)	Número de animais
12	1,575 ± 0,072	1,031 ± 0,05	0,865 ± 0,096	8
14	2,011 ± 0,161	1,272 ± 0,125	1,931 ± 0,394	8
16	2,475 ± 0,255	1,487 ± 0,134	3,183 ± 0,637	8
18	2,687 ± 0,288	1,625 ± 0,161	4,251 ± 0,998	8
20	3,262 ± 0,373	1,887 ± 0,161	6,782 ± 1,678	8
22	3,812 ± 0,495	2,161 ± 0,143	10,113 ± 2,347	8

(*) Resultados expressos em média ± erro padrão.

Tabela 08: Valores médios dos diâmetros e volumes do tumor T.E.G.S. observados nos animais do grupo 3 (inoculados com 10^6 células FHM e tratados com Metilprednisolona 1 mg/Kg/dia) na Fase 2 do experimento, a cada dia de medição. Os volumes tumorais foram utilizados para a obtenção da curva de crescimento do tumor. (*)

Dias após a Inoculação das células	Valores médios do grupo a cada dia de medição			
	Diâmetro maior (cm ³)	Diâmetro menor (cm ³)	Volume (cm ³)	Número de animais
12	1,54 ± 0,116	1,24 ± 0,119	1,415 ± 0,354	10
14	2,06 ± 0,141	1,42 ± 0,086	2,167 ± 0,303	10
16	2,86 ± 0,201	1,78 ± 0,094	4,697 ± 0,601	10
18	3,32 ± 0,233	1,94 ± 0,122	6,523 ± 0,945	10
20	3,9 ± 0,301	2,4 ± 0,152	12, 099 ± 2,257	10
22	4,344 ± 0,325	2,666 ± 0,266	17,703 ± 4,69	9

(*) Resultados expressos em média ± erro padrão.

Tabela 09: Valores médios dos diâmetros e volumes do tumor T.E.G.S. observados nos animais do grupo 4 (inoculados com 10^6 células FHM, controle) na Fase 2 do experimento, a cada dia de medição. Os volumes tumorais foram utilizados para a obtenção da curva de crescimento do tumor. (*)

Valores médios do grupo a cada dia de medição				
Dias após a inoculação das células	Diâmetro maior (cm^3)	Diâmetro menor (cm^3)	Volume (cm^3)	Número de animais
12	1,414 ± 0,233	0,768 ± 0,033	0,449 ± 0,1	7
14	1,442 ± 0,321	1,142 ± 0,089	1,018 ± 0,198	7
16	2,128 ± 0,134	1,471 ± 0,118	2,409 ± 0,398	7
18	2,471 ± 0,202	1,514 ± 0,143	3,133 ± 0,772	7
20	3,08 ± 0,249	1,783 ± 0,11	5,032 ± 0,747	6
22	3,3 ± 0,476	1,8 ± 0,131	5,888 ± 1,411	6

(*) Resultados expressos em média ± erro padrão.

Tabela 10: Comparação entre os valores médios dos volumes do tumor T.E.G.S. observados nos animais dos quatro grupos experimentais na Fase 2 do experimento, a cada dia de medição. Os volumes tumorais foram utilizados para a obtenção da curva de crescimento do tumor. (*)

Dias após a inoculação das células	Valores médios (volume cm ³) dos quatro grupos a cada dia de medição			
	Grupo 1 Ciclosporina	Grupo 2 Azatioprina	Grupo 3 Metilprednisolona	Grupo 4 Controle
12	1,97 ± 0,172	0,865 ± 0,096	1,415 ± 0,354	0,449 ± 0,1
14	4,608 ± 0,474	1,931 ± 0,394	2,167 ± 0,303	1,018 ± 0,198
16	10,023 ± 1,025	3,183 ± 0,637	4,697 ± 0,601	2,409 ± 0,398
18	19,628 ± 3,185	4,251 ± 0,998	6,523 ± 0,945	3,133 ± 0,772
20	30,962 ± 4,466	6,782 ± 1,678	12,099 ± 2,257	5,032 ± 0,747
22	44,778 ± 5,868	10,113 ± 2,347	17,703 ± 4,69	5,888 ± 1,411

(*) Resultados expressos em média ± erro padrão.



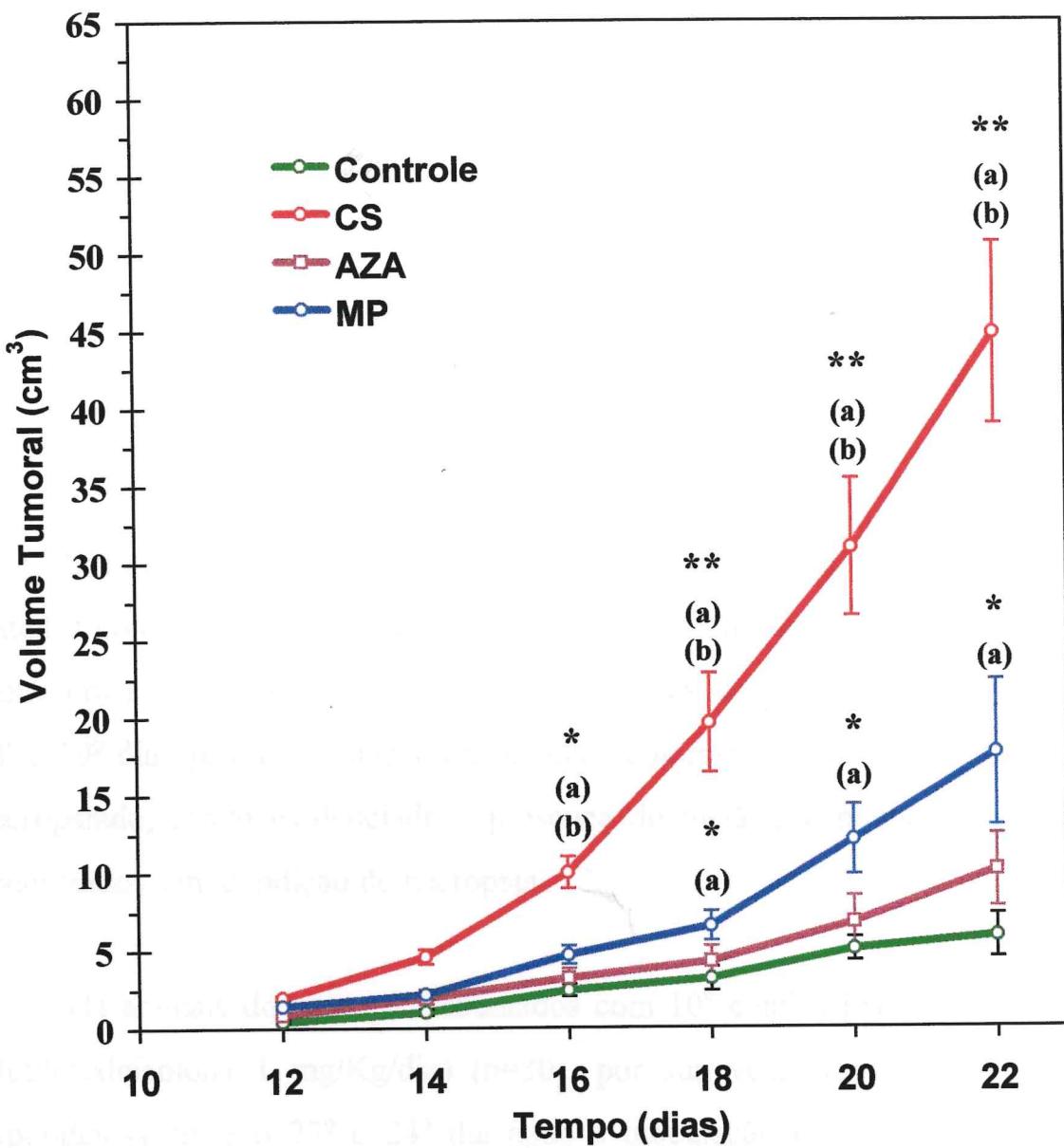


Figura 21: Curva de crescimento tumoral dos animais inoculados com o tumor T.E.G.S. 2047 (10^6 células da linhagem FHM) e tratados com Ciclosporina 10 mg/Kg/dia (grupo 1), Azatioprina 4 mg/Kg/dia (grupo 2) e Metilprednisolona 1 mg/Kg/dia (grupo 3), em relação ao controle (grupo 4), na Fase 2 do experimento. Cada ponto corresponde à média \pm erro padrão. (*) P<0,05 comparado ao controle. () P<0,01 comparado ao controle. (a) P<0,05 comparado à AZA. (b) P<0,05 comparado à MP.**

2. 2 Avaliação da Presença de Metástases

Entre os animais do grupo 1 (inoculados com 10^6 células FHM e tratados com Ciclosporina 10 mg/Kg/dia) (n=30), 11 morreram espontaneamente entre o 15º e 26º dia após a inoculação das células tumorais. Foram necropsiados 4 desses 11 animais, sendo observada a presença de metástase pulmonar em todos eles. Os 7 animais restantes, entretanto, foram encontrados sem condições de necrópsia, devido ao estado de decomposição.

Em relação aos animais do grupo 2 (inoculados com 10^6 células FHM e tratados com Azatioprina 4 mg/Kg/dia) (n=20) foi observado a regressão total do tumor em 1 animal. Observou-se ainda a morte espontânea de 4 animais, entre o 14º e 19º dia após a inoculação das células tumorais. Dentre esses animais 1 foi necropsiado, sendo evidenciada a presença de metástase pulmonar, e 3 foram encontrados sem condição de necrópsia.

Os animais do grupo 3 (inoculados com 10^6 células FHM e tratados com Metilprednisolona 1 mg/Kg/dia) (n=30), por sua vez, apresentaram 5 mortes espontâneas entre o 22º e 24º dia após a inoculação das células tumorais. A necrópsia foi realizada em apenas 1 deles, sendo evidenciada a presença de metástase pulmonar. Os 4 animais restantes, entretanto, foram encontrados sem condições de necrópsia.

Nenhuma morte espontânea foi observada nos animais no grupo 4 (controle, inoculado com 10^6 células FHM) (n=19).

O sacrifício dos animais restantes, em todos os grupos, deu-se no 27º dia após a inoculação das células, sendo todos submetidos à necrópsia.

Observou-se então a presença de metástases pulmonares em 13 dos 19 animais sacrificados no grupo tratado com CS (grupo 1); em 6 dos 15 animais no grupo tratado com MP (grupo 2); e em 12 dos 25 animais no grupo tratado com AZA (grupo 3). O grupo controle (grupo 4), entretanto, não apresentou metástase em nenhum dos 19 animais sacrificados.

Foi constatado ao final do experimento um índice total de metástase pulmonar, dentre os animais submetidos à necrópsia, em 73,91% (17/23) dos animais do grupo 1 (inoculados com 10^6 células FHM e tratados com CS), 43,75% (7/16) dos animais do grupo 2 (inoculados com 10^6 células FHM e tratados com AZA), 50% (13/26) dos animais do grupo 3 (inoculados com 10^6 células FHM e tratados com MP), enquanto que o grupo controle (grupo 4), embora inoculado com os mesmos tipos de células, não apresentou nenhuma evidência de metástase pulmonar ou em nenhum outro órgão examinado, conforme demostrado na **figura 22**. Houve, então, um maior índice de metástase pulmonar nos animais do grupo 1 em relação ao grupo controle ($p<0,01$) e aos grupos 2 e 3 ($p<0,05$). Os animais dos grupos 2 e 3 mostraram uma maior incidência de metástase pulmonar em relação ao grupo controle ($p<0,01$), mas não mostraram diferença estatisticamente significativa entre si (considerando-se $p<0,05$). As metástases exibiam o mesmo padrão macroscópico da fase anterior. Os dados em relação à morte espontânea, sacrifício e necrópsia dos animais estão exibidos na **tabela 11**.

Tabela 11: Número de animais necropsiados, com presença ou ausência de metástase pulmonar, na Fase 2 do experimento.

Grupos	Animais submetidos à necrópsia					
	Morte espontânea		Sacrificados		Incidência metástases	
	nº de animais necropsiados	nº de animais com metástase	nº de animais necropsiados	nº de animais com metástase		
1 (CS) c	4 / 4		19 / 13		23/ 17 (73,91%) **, a, b	
2 (AZA) d, e	1 / 1		15 / 6		16/ 7 (43,75 %) **	
3 (MP) f	1 / 1		25 / 12		26/ 13 (50%) **	
4 (controle)	—/—		19 / 0		19/0 (00%)	

(**) $p<0,01$ comparado ao controle.

(a) $p<0,05$, comparado à AZA.

(b) $P<0,05$, comparado à MP.

(c) Sete animais tiveram morte espontânea sem condições de necrópsia.

(d) Três animais tiveram morte espontânea sem condições de necrópsia.

(e) Houve regressão espontânea do tumor em 01 animal.

(f) Quatro animais tiveram morte espontânea sem condições de necrópsia

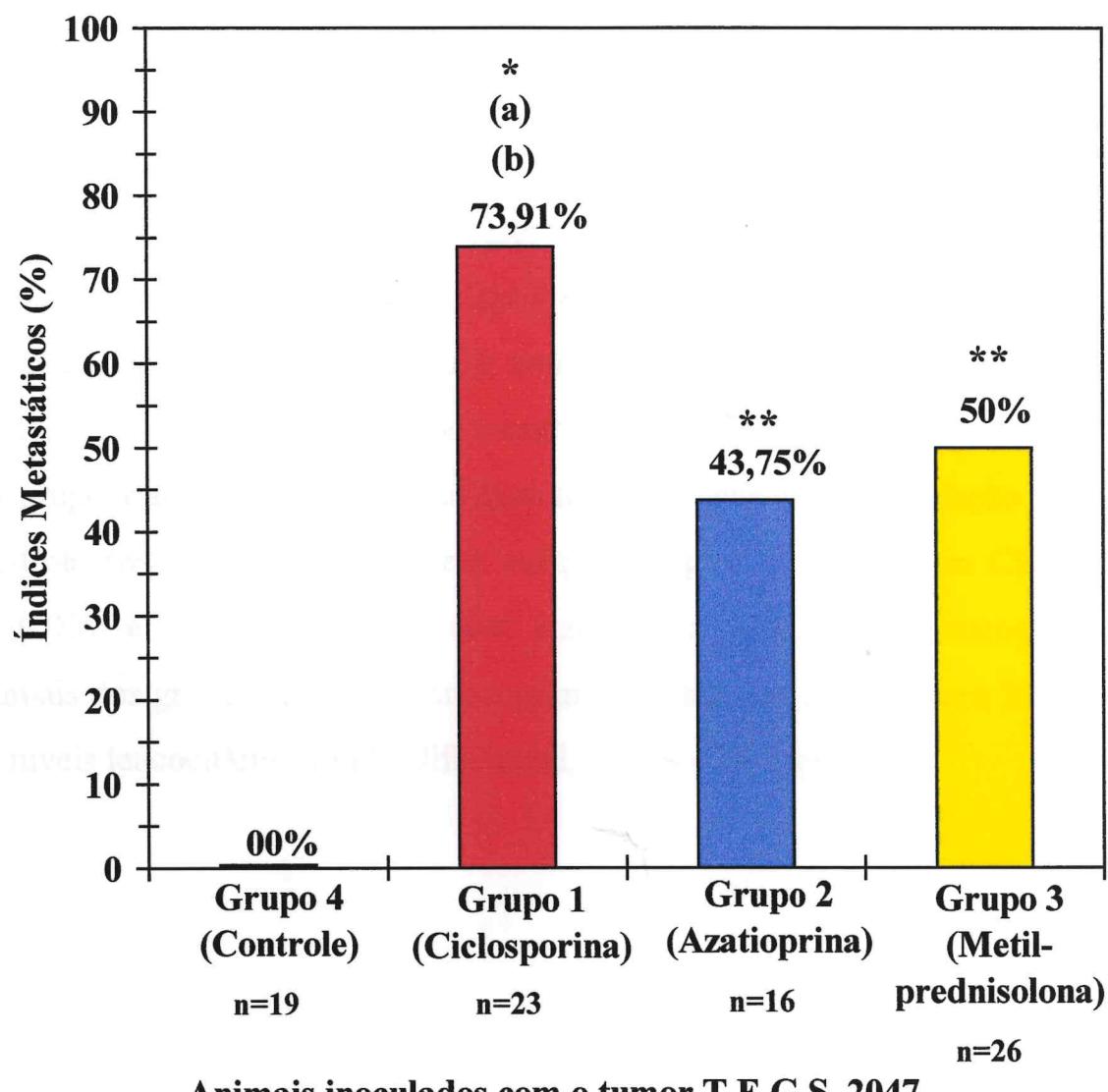


Figura 22: Percentual de animais inoculados com o tumor T.E.G.S. 2047 (10^6 células da linhagem FHM) portadores de metástases no grupo 1 (tratados com Ciclosporina 10 mg/Kg/dia), grupo 2 (tratados com Azatioprina 4 mg/Kg/dia), grupo 3 (tratados com Metilprednisolona 1 mg/Kg/dia) e grupo 4 (controle), na Fase 2 do experimento. (**) $P<0,01$ comparado ao controle. (a) $P<0,05$ comparado à AZA. (b) $P<0,05$ comparado à MP.

2. 3 Avaliação do Hemograma

Não foram observadas alterações estatisticamente significativas a nível de leucócitos totais, de nenhum grupo, em relação ao controle, considerando-se uma significância de $p<0,05$. Foi observado, entretanto, uma linfopenia ($p<0,05$) no grupo tratado com Ciclosporina (grupo 1), em relação ao grupo controle. No grupo tratado com Metilprednisolona (grupo 3), observou-se uma linfopenia em relação ao grupo controle ($p<0,01$), bem como em relação ao grupo tratado com Ciclosporina ($p<0,05$), e ao grupo tratado com Azatioprina ($p<0,05$). Observou-se no grupo tratado com Metilprednisolona uma neutrofilia em relação ao grupo controle ($p<0,05$), bem como em relação ao grupo tratado com Ciclosporina ($p<0,05$), e ao grupo tratado com Azatioprina ($p<0,05$). O leucograma dos animais dos grupos 4, 1, 2 e 3 encontram-se na **tabelas 12**. A **figura 23** compara os níveis leucocitários, total e diferencial, desses quatro grupos.

Tabela 12: Leucograma dos animais do grupo 4 (inoculados com 10^6 células FHM, controle), grupo 1 (inoculados com 10^6 células FHM, e tratados com CS 10 mg/Kg/dia), grupo 2 (inoculados com 10^6 células FHM, e tratados com Azatioprina 4 mg/Kg/dia) e grupo 3 (inoculados com 10^6 células FHM, e tratados com Metilprednisolona 1 mg/Kg/dia) na Fase 2 do experimento. (*)

Leucograma	Grupo 4 (Controle)		Grupo 1 (Ciclosporina)		Grupo 3 (Azatioprina)		Grupo 4 (Metilprednisolona)						
			Valores médios do grupo de 5 animais		Valores médios do grupo de 5 animais		Valores médios do grupo de 5 animais						
	x 10 ⁹ /L	%	x 10 ⁹ /L	%	x 10 ⁹ /L	%	x 10 ⁹ /L	%					
Leucócitos totais	12,04	± 2,28	—	—	11,17	± 1,57	—	10,59	± 1,57	—	9,81	± 0,65	—
Segmentados	3,32	± 1,18	27,5	—	3,46	± 0,8	31	2,44	± 0,70	23	5,61	± 0,51	57
Linfócitos	6,76	± 0,71	56	—	5,1	± 0,5	46	6,26	± 1,15	59	2,5	± 0,41	25,5
Monócitos	1,11	± 0,3	9	—	1,58	± 0,22	14	1,16	± 0,11	11	0,83	± 0,23	8,5
Eosinófilos	0,14	± 0,06	1,1	—	3,32	± 0,007	0,4	0,04	± 0,016	0,4	0,034	± 0,024	0,34
Basófilos	0,14	± 0,09	1,2	—	3,32	± 0,017	0,5	0,09	± 0,03	0,9	0,11	± 0,06	1,2

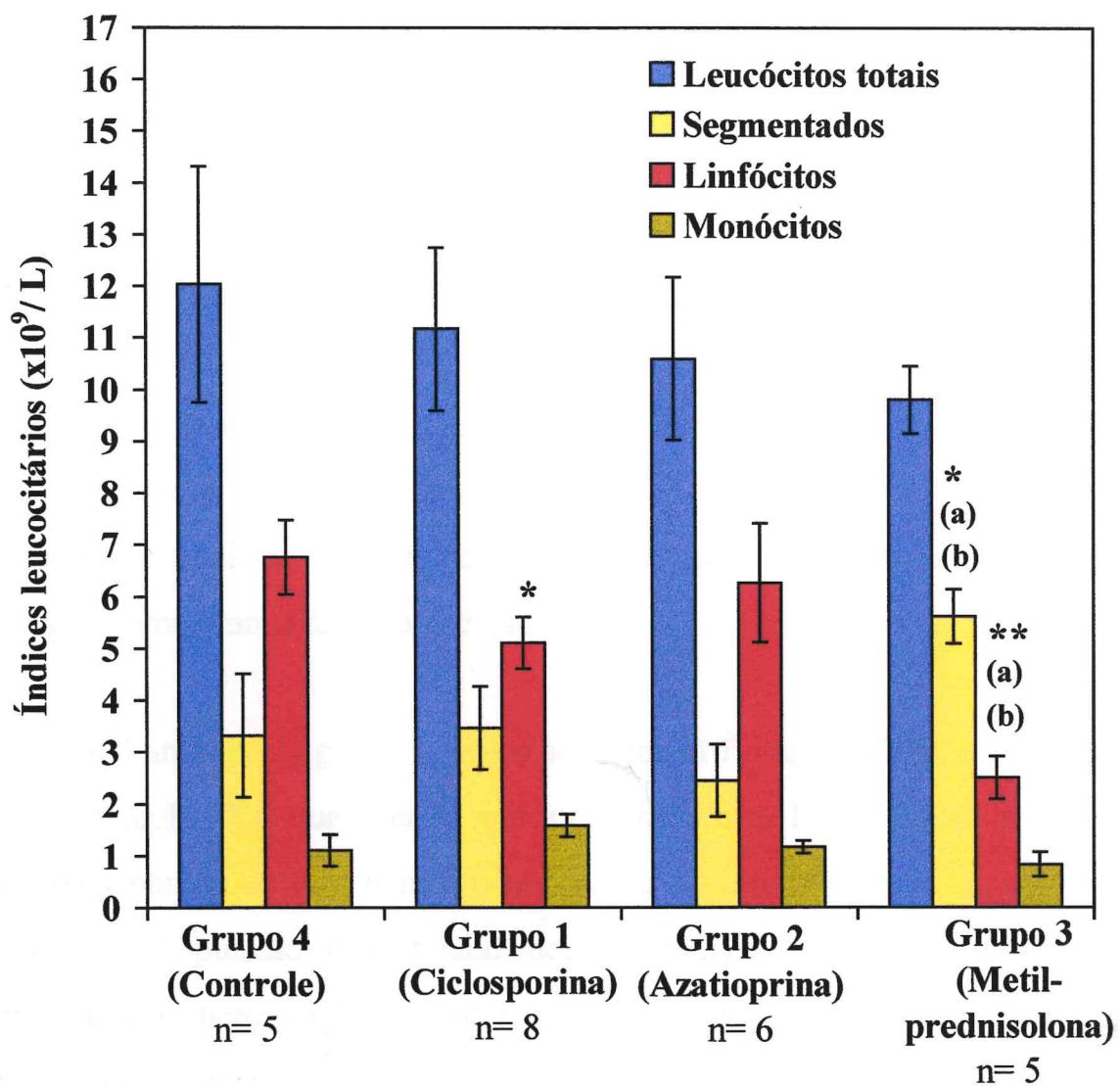


Figura 23: Níveis de leucócitos totais e contagem diferencial dos animais inoculados com o tumor T.E.G.S. 2047 (10^6 células da linhagem FHM) e tratados com Ciclosporina (CS) 10 mg/Kg/dia (grupo 1), Azatioprina (AZA) 4 mg/Kg/dia (grupo 2) e Metilprednisolona (MP) 1 mg/Kg/dia (grupo 3), em relação ao controle (grupo 4), na Fase 2 do experimento. (*) $p<0,05$ comparado ao controle. (**) $p<0,01$ comparado ao controle. (a) $p<0,05$ comparado à CS. (b) $p<0,05$ comparado à AZA.

3. Fase 3

3. 1 Primeira etapa

A dose de 40 mg/Kg/dia de Micofenolato mofetil mostrou-se tóxica. O índice de pega dos tumores nos animais do grupo controle, inoculados com 10^6 células FHM (grupo 2) foi de 100%. No grupo 1 (animais inoculados com 10^6 células FHM e tratados com Micofenolato mofetil 40 mg/Kg/dia), entretanto, 8 dos 10 animais morreram na 1^a semana de experimento, tendo as mortes início no 2º dia após a inoculação das células, ou seja, 3 dias após o início do tratamento com MMF. Os tumores cresceram nos 2 animais restantes como massas subcutâneas, ovóides ou esféricas, com dimensões variáveis, apresentando, à necrópsia, uma grande área de necrose central.

Os 8 animais do grupo 1 (inoculados com 10^6 células FHM e tratados com MMF 40 mg/Kg/dia) que tiveram morte espontânea na 1^a semana de experimento não apresentaram desenvolvimento tumoral, conforme observado à palpação e à necrópsia. O pulmão e o fígado desses animais, entretanto, mostravam-se extremamente hemorrágicos. Entre os 2 animais que desenvolveram massa tumoral subcutânea 1 teve morte espontânea no 32º dia após a inoculação das células tumorais, e o outro foi sacrificado no 36º dia. A necrópsia desses dois animais não evidenciou a presença de metástase pulmonar ou em nenhum outro órgão examinado.

Nos animais do grupo 2 ou controle (inoculados com 10^6 células FHM) ($n=8$), nenhuma morte espontânea foi observada, os quais foram sacrificados e necropsiados no 36º dia após a inoculação das células. À necrópsia, nenhuma metástase pulmonar ou em nenhuma outro órgão examinado foi

evidenciada em nenhum dos 8 animais do grupo controle.

3. 2 Segunda etapa

3. 2. 1 Crescimento do Tumor e Índice de Pega

O índice de pega dos tumores nos animais do grupo 2 (inoculados com 10^6 células FHM) foi de 100%. O índice de pega do tumor nos animais do grupo 1 (inoculados com 10^6 células FH1 e tratados com Micofenolato Mofetil 20 mg/Kg/dia) foi de 70%, conforme mostra a **tabela 13**. Nesses animais, os tumores cresceram como massas subcutâneas, ovóides ou esféricas, com dimensões variáveis, apresentando à necrópsia, uma grande área de necrose central.

Tabela 13: Índice de pega dos tumores a partir da inoculação de 10^6 células FHM via s.c. no dorso dos animais nos grupos da 2^a etapa da Fase 3 do experimento.

Grupos	Nº de animais inoculados com 10^6 células FHM	Nº de animais que desenvolveram tumor	Índice pega
1 (MMF)	10	7	70%
2 (controle)	5	5	100%

Os valores médios dos volumes e diâmetros observados no tumor T.E.G.S. 2047 obtidos durante a curva de crescimento dos animais nos grupos 1 e 2 encontram-se, respectivamente, nas **tabelas 14 e 15**. A **tabela 16** faz uma comparação entre os volumes tumorais observados a cada dia de medição nos dois grupos. A **tabela 17** faz uma comparação entre os volumes tumorais observados a cada dia de medição em todos os grupos nas 3 fases do experimento. As curvas de crescimento tiveram início por volta do 20º dia após a inoculação das células tumorais. Em conformidade com a curva de

crescimento tumoral observada na primeira etapa dessa fase, não houve diferença significativamente estatística, considerando-se como índice de significância $p<0,05$, entre os volumes tumorais dos animais do grupo 1 (tratados com Micofenolato Mofetil 20 mg/Kg/dia) e do grupo 2 (grupo controle, inoculado somente com 10^6 células FHM), como mostra a **figura 24**.

Tabela 14: Valores médios dos diâmetros e volumes do tumor T.E.G.S. observados nos animais do grupo 1 (inoculados com 10^6 células FHM e tratados com Micofenolato Mofetil) na 2^a etapa da Fase 3 do experimento, a cada dia de medição. Os volumes tumorais foram utilizados para a obtenção da curva de crescimento do tumor. (*)

Valores médios do grupo a cada dia de medição

Dias após a Inoculação das células	Diâmetro maior (cm ³)	Diâmetro menor (cm ³)	Volume (cm ³)	Número de animais
20	3,066 ± 0,744	2,066 ± 0,29	7,723 ± 3,832	3
24	4,18 ± 0,297	3,1 ± 0,109	20,596 ± 3,114	5
26	3,583 ± 0,449	3,15 ± 0,538	24,133 ± 9,238	6
28	4,083 ± 0,594	3,3 ± 0,637	32,778 ± 14,969	6
30	4,6 ± 0,653	3,516 ± 0,401	34,69 ± 10,218	6
36	4,866 ± 0,595	3,766 ± 0,48	42,247 ± 13,359	6
38	5,4 ± 0,641	4,616 ± 0,536	69,438 ± 25,876	6
42	5,533 ± 0,686	4,916 ± 0,612	82,399 ± 28,594	6
44	5,966 ± 0,677	5,233 ± 0,576	96,608 ± 31,674	6

(*) Resultados expressos em média ± erro padrão.

Tabela 15: Valores médios dos diâmetros e volumes do tumor T.E.G.S. observados nos animais do grupo 2 (inoculados com 10^6 células FHM, controle) na 2^a etapa da Fase 3 do experimento, a cada dia de medição. Os volumes tumorais foram utilizados para a obtenção da curva de crescimento do tumor. (*)

Valores médios do grupo a cada dia de medição				
Dias após a Inoculação das células	Diâmetro maior (cm ³)	Diâmetro menor (cm ³)	Volume (cm ³)	Número de animais
20	2,366 ± 0,392	3,1 ± 0,466	5,267 ± 2,598	3
24	3,866 ± 0,284	3,1 ± 0,305	19,431 ± 4,605	3
26	4,333 ± 0,44	3,666 ± 0,726	33,666 ± 15,194	3
28	4,4 ± 0,416	3,9 ± 0,665	37,474 ± 14,258	3
30	5,2 ± 0,529	4,033 ± 0,317	44,093 ± 10,184	3
36	5,2 ± 0,435	4,133 ± 0,317	46,861 ± 9,955	3
38	5,3 ± 0,665	4,433 ± 0,233	53,105 ± 9,9	3
42	5,433 ± 0,560	4,6 ± 0,305	59,318 ± 12,834	3
44	5,433 ± 0,56	4,6 ± 0,305	59,318 ± 12,834	3

(*) Resultados expressos em média ± erro padrão.

Tabela 16: Comparação entre os valores médios dos volumes do tumor T.E.G.S. observados nos animais do dois grupos experimentais na 2^a etapa da Fase 3 do experimento, a cada dia de medição. Os volumes tumorais foram utilizados para a obtenção da curva de crescimento do tumor. (*)

Valores médios (volume cm³) dos dois grupos a cada dia de medição

Dias após a inoculação das células	Grupo 1 Micofenolato mofetil	Grupo 2 Controle
20	7,723 ± 3,832	5,267 ± 2,598
24	20,596 ± 3,114	19,431 ± 4,605
26	24,133 ± 9,238	33,666 ± 15,194
28	32,778 ± 14,969	37,474 ± 14,258
30	34,69 ± 10,218	44,093 ± 10,184
36	42,247 ± 13,359	46,861 ± 9,955
38	69,438 ± 25,876	53,105 ± 9,9
42	82,399 ± 28,594	59,318 ± 12,834
44	96,608 ± 31,674	59,318 ± 12,834

(*) Resultados expressos em média ± erro padrão.

Tabela 17: Comparação entre os valores médios dos volumes do tumor T.E.G.S. observados nos animais tratados com Ciclosporina (CS), Azatioprina (AZA), Metilprednisolona (MP), Micofenolato mofetil (MMF) e seus respectivos grupos controle, em todas as 3 fases do experimento, a cada dia de medição. (*)

Nº dias ^(a)	Valores médios (volume cm ³) a cada dia de medição							
	Fase 1		Fase 2				Fase 3	
	Grupo1 CS	Grupo2 Controle	Grupo1 CS	Grupo2 AZA	Grupo3 MP	Grupo4 Controle	Grupo1 MMF	Grupo2 Controle
04	2,1 $\pm 0,094$							
08	4,2 $\pm 0,252$							
12	12 $\pm 0,632$	1,98 $\pm 0,158$	1,97 $\pm 0,172$	0,865 $\pm 0,096$	1,415 $\pm 0,354$	0,449 $\pm 0,354$		
14				4,608 $\pm 0,474$	1,931 $\pm 0,394$	2,167 $\pm 0,303$	1,018 $\pm 0,198$	
16	20 $\pm 1,075$	3,4 $\pm 0,252$		10,023 $\pm 1,025$	3,183 $\pm 0,637$	4,697 $\pm 0,601$	2,409 $\pm 0,398$	
18				19,628 $\pm 3,185$	4,251 $\pm 0,998$	6,523 $\pm 0,945$	3,133 $\pm 0,772$	
20	28 $\pm 1,011$	7,8 $\pm 0,505$		30,962 $\pm 4,466$	6,782 $\pm 1,678$	12,099 $\pm 2,257$	5,032 $\pm 0,747$	7,723 $\pm 3,832$ 5,267 $\pm 2,598$
22				44,778 $\pm 5,868$	10,113 $\pm 2,347$	17,703 $\pm 4,69$	5,888 $\pm 1,411$	
24	40 $\pm 1,676$	17,73 $\pm 1,075$					20,596 $\pm 3,114$	19,431 $\pm 4,605$
26							24,133 $\pm 9,238$	33,666 $\pm 15,194$
28	44 $\pm 1,707$	26 $\pm 1,359$					32,778 $\pm 14,969$	37,474 $\pm 14,258$
30							34,69 $\pm 10,218$	44,093 $\pm 10,184$
32	46 $\pm 1,138$	35 $\pm 1,423$						
36		37 $\pm 1,549$					42,247 $\pm 13,359$	46,861 $\pm 9,955$
38							69,438 $\pm 25,876$	53,105 $\pm 12,834$
40	40 $\pm 1,296$							
42							82,399 $\pm 28,594$	59,318 $\pm 12,834$
44							96,608 $\pm 31,674$	59,318 $\pm 12,834$

*) Resultados expressos em média \pm erro padrão.

(a) Dias após a inoculação das células.

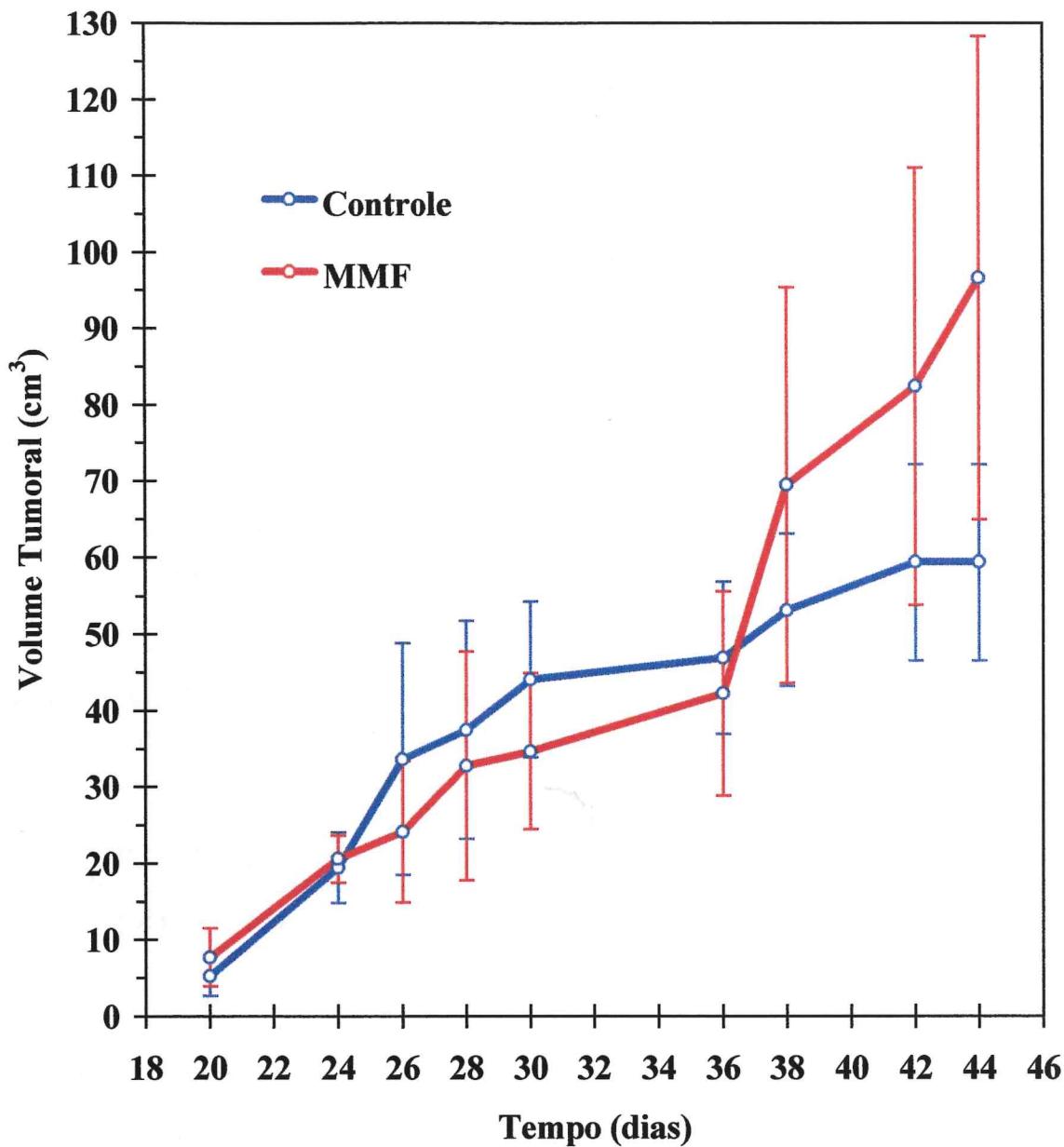


Figura 24: Curva de crescimento tumoral dos animais inoculados com o tumor T.E.G.S. 2047 (10^6 células da linhagem FHM) e tratados com Micofenolato mofetil (MMF) 20 mg/Kg/dia (grupo 1), em relação ao controle (grupo 2), na 2^a etapa da Fase 3 do experimento. Cada ponto corresponde à média \pm erro padrão. (*) P<0,05 comparado ao controle.

3. 2. 2 Avaliação da Presença de Metástases

Os animais do grupo 1 (inoculados com 10^6 células FHM e tratados com MMF 20 mg/Kg/dia) e grupo 2 ou controle (inoculados com 10^6 células FHM) foram todos sacrificados no 45º dia após a inoculação das células tumorais, não tendo havido nenhuma morte espontânea. Os animais, tanto do grupo controle (n=5) como do grupo tratado com Micofenolato Mofetil 20 mg/Kg/dia (grupo 1) (n=7), não apresentavam nenhuma evidência de metástase pulmonar ou em nenhum outro órgão examinado à necrópsia. Dos animais do grupo tratado com Micofenolato Mofetil, 1 apresentava focos hemorrágicos e 2 pareciam ter infecção pulmonar. Os dados em relação à morte espontânea, sacrifício e necrópsia dos animais estão exibidos na **tabela 18**.

Tabela 18: Número de animais necropsiados com presença ou ausência de metástases pulmonares na 2ª etapa da Fase 3 do experimento.

Grupos	Animais submetidos à necrópsia				
	Morte espontânea		Sacrificados		Incidência metástases
	nº de animais necropsiados	nº de animais com metástase	nº de animais necropsiados	nº de animais com metástase	
1 (MMF)	— / —		7 / 0		7/ 0 (00%)
2 (controle)	— / —		5 / 0		5/ 0 (00%)

3. 2. 3 Avaliação do Hemograma

Observou-se uma leucocitose, com linfocitose e neutrofilia no grupo tratado com CellCept em relação ao grupo controle ($p<0,05$). A **tabela 19** mostra o leucograma dos animais do grupo 1 (inoculados com 10^6 células FHM e tratados com MMF) e do grupo 2 (controle). A **figura 25** compara os níveis leucocitários, total e diferencial, desses dois grupos.

Tabela 19: Leucograma dos animais do grupo 1 (inoculados com 10^6 células FHM, e tratados com MMF 20 mg/Kg/dia) e grupo 2 (inoculados com 10^6 células FHM, controle) na 2^a etapa da Fase 3 do experimento. (*)

Parâmetros avaliados	Leucograma		Valores médios do grupo de 7 animais		Valores médios do grupo de 7 animais	
	Grupo 1 (Micofenolato mofetil)		Grupo 2 (Controle)			
	$\times 10^9/L$	%	$\times 10^9/L$	%	$\times 10^9/L$	%
Leucócitos totais	8,79	$\pm 1,74$	—	—	5,51	$\pm 0,38$
Segmentados	3,39	$\pm 1,15$	38,6	—	1,69	$\pm 0,58$
Linfócitos	3,76	$\pm 0,73$	42	—	1,98	$\pm 0,11$
Monócitos	0,7	$\pm 0,11$	7,9	—	0,84	$\pm 0,34$
Eosinófilos	0,027	$\pm 0,013$	0,3	—	0,04	$\pm 0,021$
Basófilos	0,067	$\pm 0,017$	0,076	—	0,04	$\pm 0,01$

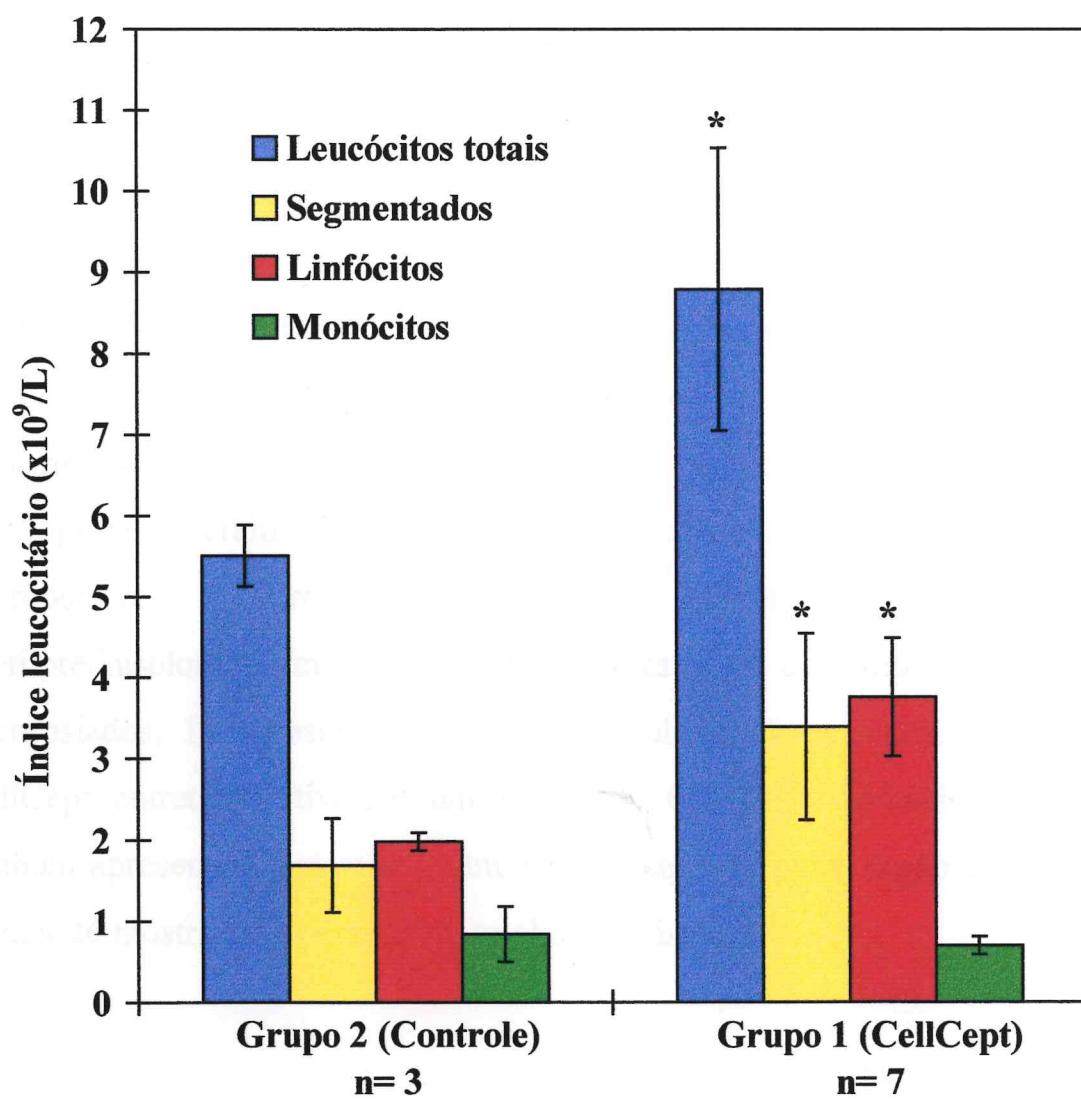


Figura 25: Níveis de leucócitos totais e contagem diferencial dos animais inoculados com o tumor T.E.G.S. 2047 (10^6 células da linhagem FHM) e tratados com Micofenolato mofetil (MMF) 20 mg/Kg/dia (grupo 1), em relação ao controle (grupo 2), na 2^a etapa da Fase 3 do experimento. (*) P<0,05 comparado ao controle.

4. Avaliação do Índice Metastático Geral

Ao avaliarmos o resultado geral das três fases do experimento, observamos que os animais que receberam somente as células tumorais (10^6 células FHM), funcionando como grupo controle, tiveram um índice metastático 0 (zero), ou seja dos 42 animais necropsiados, nenhum apresentou metástase pulmonar ou em nenhum outro órgão examinado. Em relação aos animais inoculados com 10^6 células FHM e que foram tratados com imunossupressores, os que receberam Ciclosporina tiveram um índice metastático de 72,72% (de 33 animais necropsiados, 24 apresentavam metástase pulmonar); os que receberam Azatioprina tiveram um índice metastático de 43,75% (de 16 animais necropsiados, 7 apresentavam metástase pulmonar); os que receberam Metilprednisolona tiveram um índice metastático de 50% (de 26 animais necropsiados, 13 apresentavam metástase pulmonar); os animais tratados com CellCept entretanto, tiveram um índice de 0% (de 7 animais necropsiados, nenhum apresentou metástase pulmonar em nenhum outro órgão examinado). A **figura 26** mostra esse percentual total de metástases.

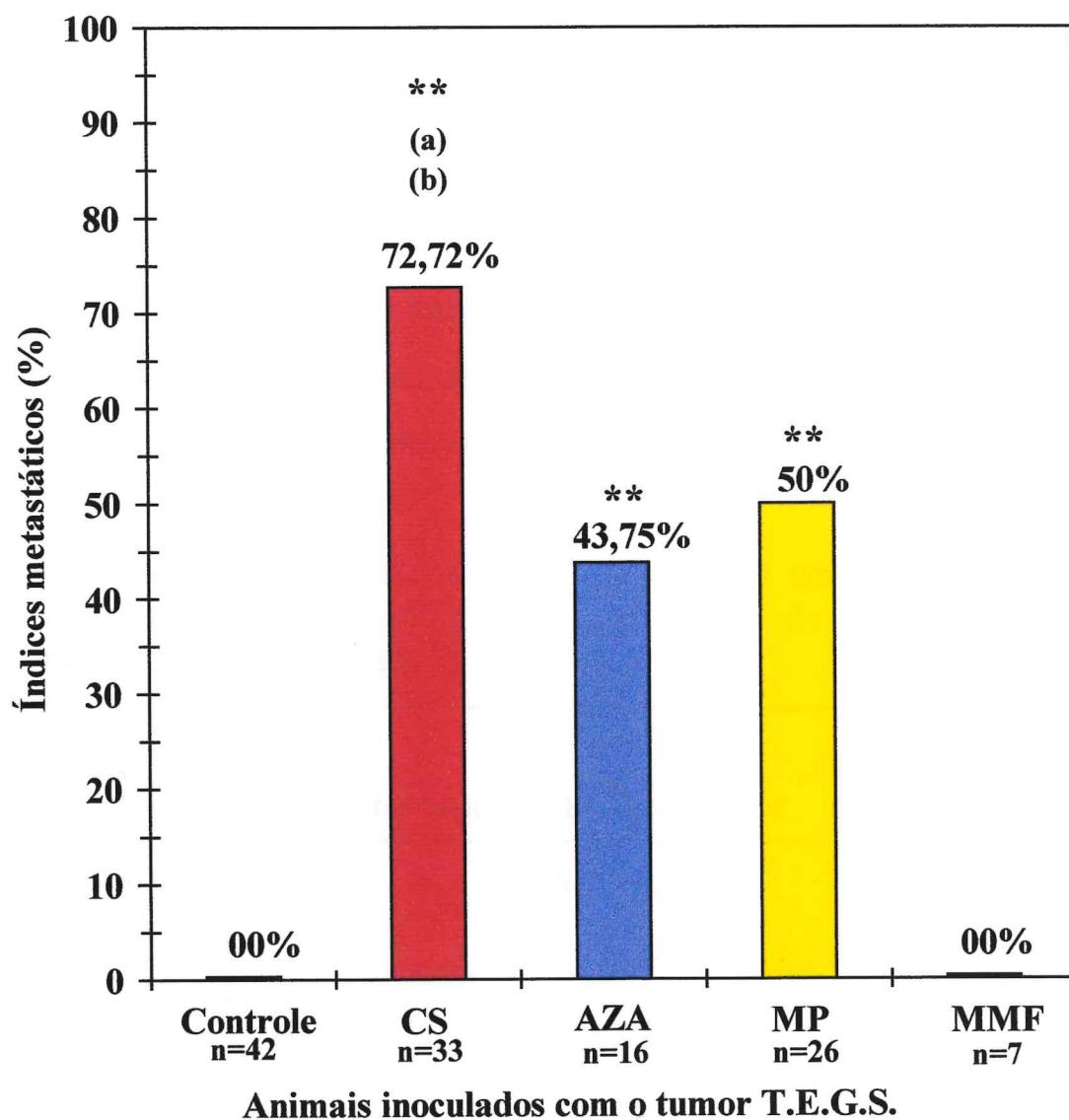


Figura 26: Percentual total de animais inoculados com o tumor T.E.G.S. 2047 (10^6 células da linhagem FHM) portadores de metástases nos animais tratados com Ciclosporina (CS), Azatioprina (AZA), Metilprednisolona (MP), Micofenolato mofetil (MMF) e nos grupos controle, em todas as fases do experimento. (**) $P<0,01$ comparado ao controle. (a) $P<0,05$ comparado à AZA. (b) $P<0,05$ comparado à MP.

5. Perfil dos Índices Leucocitários de Ratos Wistar

A **tabela 20** mostra o perfil dos índices leucocitários de ratos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, realizado por Nunes e colaboradores (1994). A **tabela 21**, entretanto, mostra o leucograma de ratos Wistar adultos sadios realizado por Cresskoff e colaboradores (1967) no *Hematology Laboratory, Hospital of the University of Pennsylvania*. A **figura 27** compara os índices hematológicos citados nas tabelas acima (28 e 27) com os índices obtidos em nossos grupos controle (animais inoculados com 10^6 células FHM via s.c.) da Fase 2 e da Fase 3 (2^a etapa) de nosso experimento.

Tabela 20: Índices leucocitários obtidos a partir de um estudo realizado por Nunes e colaboradores (1994) em ratos Wistar do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. (*)

Índices avaliados	Ratos Wistar do Biotério da UFC	Nº de animais
Leucócitos totais ($\times 10^9/L$)	7,996 \pm 0,418	20
Segmentados (%)	23 \pm 1,81	8
Linfócitos (%)	69 \pm 2,64	8
Monócitos (%)	5 \pm 0,67	8
Eosinófilos (%)	2,2 \pm 0,26	8
Basófilos (%)	0,8 \pm 0,41	8

(*) Valor médio \pm erro padrão.

Tabela 21: Leucograma de ratos Wistar adultos obtidos a partir de um estudo realizado por Cresskoff e colaboradores (1967). (*)

Índices avaliados	Valor médio	Variação	Nº de animais
Leucócitos totais ($\times 10^9/L$)	9,0	(6,0 - 18,0)	
Segmentados (%)	20	(8 - 39)	50
Linfócitos (%)	78	(55 - 96)	50
Monócitos (%)	<1	(0 - 3)	50
Eosinófilos (%)	2	(0 - 4)	50
Basófilos (%)	<1	(0 - 0)	50

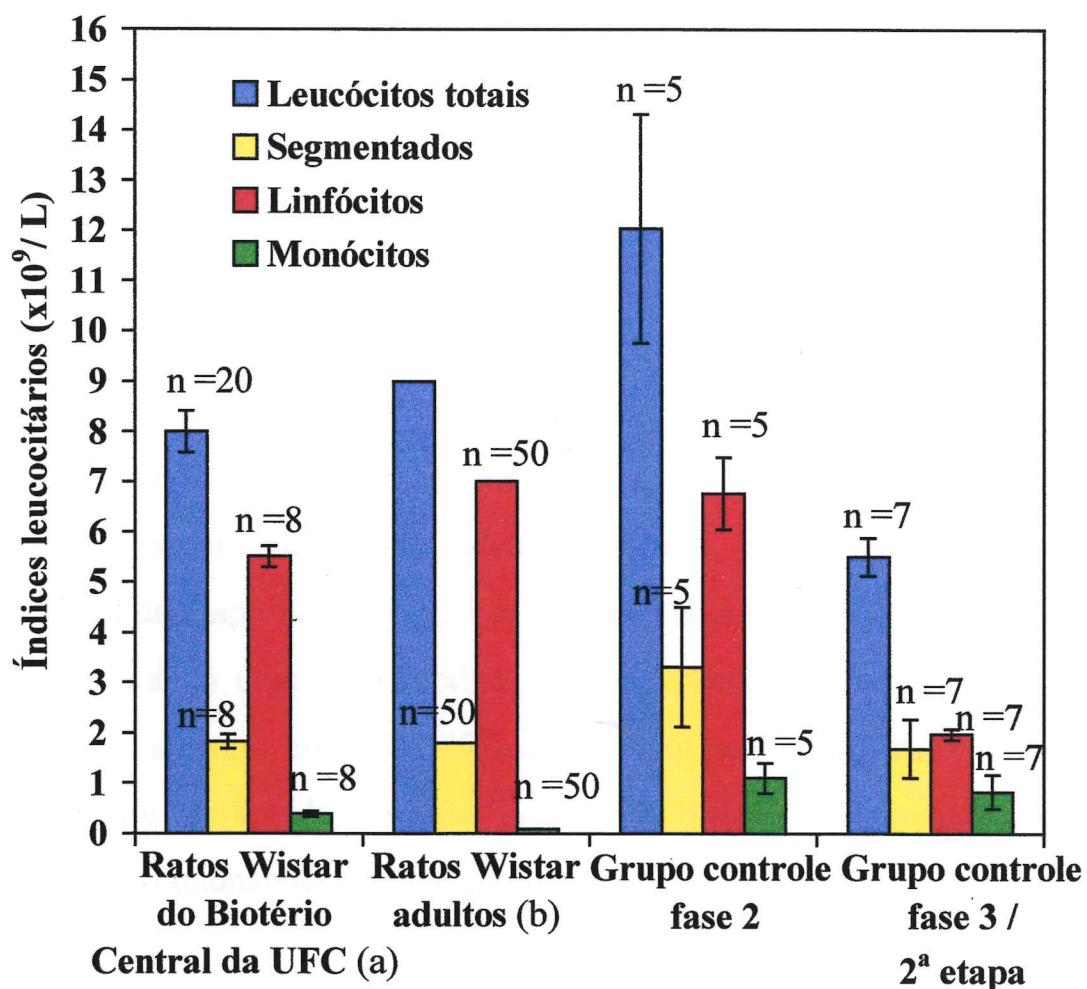


Figura 27: Comparação dos índices leucocitários entre os grupos controle de nosso experimento na Fase 2 e Fase 3 (2^a etapa), em relação aos índices obtidos a partir de um estudo realizado por Nunes (1994) em ratos Wistar do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (a), e leucograma de ratos Wistar adultos obtidos a partir de um estudo realizado por Cresskoff e colaboradores (1967) (b).

DISCUSSÃO

1. Imunossupressão x neoplasias

Diversos fatores imunológicos parecem interferir direta ou indiretamente na gênese, desenvolvimento e metastatização de certos tipos de tumores malignos, principalmente os imunogênicos. O nosso trabalho encontrou evidências de que, através da inibição de alguns desses fatores, é possível explorar a influência do sistema imune na incidência de metástases originadas de um tumor de baixo índice metastático. O fibrohistiocitoma utilizado nesse experimento tem como característica um índice de metastatização muito baixo (3,3%), comprovado através de um modelo de transplantes sucessivos de fragmentos (Ribeiro, 1987). Em nossos experimentos esse índice foi de 0%, comprovado pela inoculação subcutânea da suspensão celular. Em contraste com esses achados, foi constatado no grupo tratado com Ciclosporina uma incidência de metástase pulmonar em 72,72% dos animais, contra 43,75% no grupo tratado com Azatioprina e 50% no grupo tratado Metilprednisolona e 0% no grupo tratado Micofenolato mofetil, uma droga nova “racionalmente planejada”.

Como na maioria dos processos patológicos, uma típica reação inflamatória ocorre nos tecidos invadidos pelas células neoplásicas, no processo de metastatização. A imunidade adaptativa induzida por antígenos tumorais é, por sua vez, similar àquela evocada contra transplantes, dependente do reconhecimento de antígenos glicoprotéicos de membrana por linfócitos T. A ativação das células T inclui a geração das subclasses “helper” ou auxiliar (Ta), supressoras (Ts) e citotóxicas (Tc). A ativação também leva à produção de linfocinas pelas células Ta, que são importantes no recrutamento e ativação de macrófagos e células EN. As Células Tc, por sua vez, são as responsáveis pelo reconhecimento dos antígenos tumorais (Abbas et al, 1994 a; MacDonald &

Steeg, 1983). O mecanismo dependente das células T atua, como visto anteriormente, através da apresentação de抗ígenos associados a moléculas CPH II por células especializadas, geralmente macrófagos, nas quais vai atuar a produção de IL-1. Os linfócitos Ta são induzidos a produzir IL-2, iniciando uma cascata de fenômenos humorais e celulares que resultará na imunidade celular antitumoral. As células Tc reconhecem o抗ígeno tumoral em associação com produtos do CPH I. São então estimuladas por IL-2, multiplicando-se e produzindo IFN- γ , que juntamente com a IL-2 vai estimular as células NK ou EN (Abbas et al, 1994b).

Consideráveis evidências clínicas sugerem que as doenças com deficiência imune estão freqüentemente associadas a uma maior incidência de neoplasias, principalmente leucemias e linfomas. Experimentalmente, Eccles e colaboradores (Eccles et al, 1979; Eccles *apud* Eccles et al., 1980) demonstraram haver um aumento significativo na incidência de metástases em tumores imunogênicos de animais imunossuprimidos por raios X ou timectomia. As recentes observações de sarcoma de Kaposi ou linfomas de células-B em adultos jovens com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), são outras indicações da associação de imunodepressão e o desenvolvimento de malignidade (Herberman, 1995). Uma vez que os processos imunológicos envolvidos na rejeição de transplantes são semelhantes à imunologia antitumoral, tem sido observado na prática clínica que pacientes transplantados recebendo agentes imunossupressores, quer seja Prednisona, Azatioprina ou Ciclosporina, têm mostrado uma incidência aumentada de doenças linfoproliferativas ou outros tumores (Penn & Starzl, 1993). A primeira observação de uma incidência aumentada de tumores malignos em pacientes receptores de transplantes tratados com imunossupressores foi descrita por Penn e colaboradores em 1969 (Penn et al, 1969), sendo confirmada posteriormente por vários autores em diferentes grupos étnicos (Jacobs et

al., 1981; Penn, 1980; Penn, 1987). A incidência de tumores seria cerca de 25 vezes maior nos receptores de transplante do que na população em geral (Fraumeni & Hoover, 1977).

2. Ciclosporina, sua ação no sistema imunológico e sua influência no desenvolvimento de metástases no modelo experimental do tumor T.E.G.S. 2047.

A Ciclosporina teve seu início de utilização prática nos anos 80, sendo a responsável pela disseminação dos transplantes de órgãos com terapia corrente em nosso mundo (Kahan, 1989). Os primeiros resultados de tumores ocorrendo *de novo* em pacientes transplantados renais tratados com Ciclosporina datam de 1987, sendo que essas malignidades pareciam diferir daquelas descritas após terapia imunossupressora convencional (CIT) com Azatioprina e Prednisona (Penn, 1987). Essas observações podem ser explicadas pelo fato de a Azatioprina e Metilprednisolona serem drogas imunossupressoras clássicas, que atuam indistintamente sobre as células do sistema imune, através da inibição da divisão celular e da síntese de citocinas (Mantovani et al, 1994). A Ciclosporina, por sua vez, atua especificamente nos eventos celulares iniciais da resposta imunológica (Borel, 1994). Villardel e colaboradores (1992), por exemplo, observaram o surgimento *de novo* de 31 casos de malignidade entre 949 pacientes que receberam transplante renal, no Departamento de Urologia e Transplante Renal, do Hospital das Clínicas da Universidade de Barcelona. Eles observaram que o tempo médio de surgimento de tumores após a administração de Ciclosporina é menor do que nos pacientes tratados com CIT, havendo ainda um aumento na incidência de linfomas e sarcomas de Kaposi no primeiro grupo. Nos relatos do surgimento *de novo* de câncer em pacientes transplantados, a partir de dados enviados ao centro *Cincinnati Transplant Registry*, em Ohio, desde

1986, as neoplasias, após terapia com Ciclosporina, também mostravam diferenças importantes daquelas observadas após a terapia imunossupressora convencional (CIT). Elas surgiam em média 20 meses após terapia com Ciclosporina e 60 meses após CIT. Uma incidência maior de linfomas, principalmente os não-Hodgkin, sarcomas de Kaposi e carcinomas de células renais era vista nos pacientes tratados com CS em relação aos tratados com CIT. Em adição, havia uma incidência menor de câncer de pele, carcinomas cervicais uterinos e carcinomas da vulva e períneo nos pacientes tratados com CS em relação aos tratados com CIT (Penn, 1987; Penn, 1988; Penn & Brunson, 1988). Apenas cerca de 6% dos pacientes, entretanto, foram tratados exclusivamente com Ciclosporina, sendo as neoplasias, provavelmente, não específicas da terapia imunossupressora com Ciclosporina, mas uma complicação da imunossupressão *per si*, após a introdução dessa droga. Embora alguns centros tenham usado a Ciclosporina como monoterapia (Cyclosporin, 1983), ou uma combinação de Ciclosporina e Azatioprina uma vez que a função do órgão transplantado esteja estabilizada (Kasiske et al., 1993), a maioria usa a terapia tríplice (Ciclosporina, Azatioprina e Esteróides) (Lindholm et al, 1993). Nakamoto e colaboradores (1994), por exemplo, descreveram, em 1994, um caso de carcinoma de células renais com metástases ósseas surgido em um rim nativo de paciente que havia sido submetido a transplante renal de doador vivo, tendo sido imunossuprimido com Ciclosporina, Azatioprina e Prednisolona. Uma vantagem do nosso modelo experimental é que permitiu o estudo em separado dessas drogas, avaliando o impacto que cada uma teria no desenvolvimento de metástases, em nosso modelo do tumor T.E.G.S. 2047.

Ao nível experimental, vários trabalhos têm sugerido uma ação da Ciclosporina na progressão tumoral. Eccles e colaboradores (Eccles et al., 1980) mostraram um aumento no índice de metástases em animais singênicos

(ratos e camundongos), inoculados com sarcomas e linfoma, tratados com Ciclosporina via oral ou parenteral em doses variando de 20-80 mg/Kg/dia. Nenhum efeito, entretanto, foi observado em animais contendo carcinomas de células escamosas ou mamários, que são pobremente imunogênicos, mostrando a importância da Ciclosporina na imunologia antitumoral. Kaartinen e colaboradores (1994) mostraram que tumores sólidos humanos poderiam crescer sob a cápsula renal de ratos imunossuprimidos com Ciclosporina em uma dose inicial de 60 mg/Kg/dia i.p., seguida de doses de 30 mg/Kg/dia três vezes por semana, e que alguns desses tumores mostravam crescimento invasivo e de progressão. Van de Vrie e colaboradores (1997), em experimentos com o modelo intraperitoneal de adenocarcinoma de colon de rato, o tumor CC531, mostraram que a Ciclosporina, na dose de 20 mg/Kg/dia i.p., aumentava o número de metástases locoregionais. Em 1986, van der Elst e colaboradores (1986) mostraram que a injeção intraportal de agregados de células cancerosas em ratos singênicos BDIX levava à colonização hepática em 40% dos animais. O tratamento com Ciclosporina na dose de 10 mg/Kg/dia via intragástrica (i.g.) aumentava esse índice de colonização para 100% dos animais, com um grande aumento do volume dos nódulos tumorais, além da presença de metástases pulmonares e da diminuição da sobrevida no grupo tratado com Ciclosporina. Esse, entretanto, é um modelo de colonização, e não, de metastatização, uma vez que as células são inoculadas diretamente na circulação porta. O modelo experimental do tumor T.E.G.S. 2047, entretanto, mostrou a progressão tumoral não somente ao nível de invasão local, ou de metástases locoregionais, mas o desenvolvimento de metástases à distância após a inoculação s.c. das células neoplásicas e tratamento com Ciclosporina. A dose de CS utilizada, 10 mg/Kg/dia, foi entretanto menor que a utilizada por Eccles e colaboradores (Eccles et al, 1980), Kaartinen e colaboradores (1994) e Van de Vrie e colaboradores (1997), e igual à utilizada por van der Elst e colaboradores (1986), com a vantagem da via de inoculação s.c. ser de fácil

administração. Segundo os estudos de Wassef e colaboradores (1985) sobre a farmacocinética da Ciclosporina em ratos, a via s.c. permite a obtenção de níveis sanguíneos constantes e reproduzíveis de Ciclosporina, com pequena variação sérica. O modelo experimental descrito reproduziu, *in vivo*, as diversas etapas da progressão tumoral, uma vez que as células inoculadas levaram ao desenvolvimento do tumor primário, subcutâneo, devendo as células metastáticas passar pelas etapas da cascata metastática até chegar ao sítio secundário, no caso o pulmão.

O maior índice de metástases pulmonares, em nosso experimento, nos animais dos grupos tratados com Ciclosporina, deve-se provavelmente a uma maior especificidade de ação na imunidade celular. A **figura 28** mostra um esquema do mecanismo de ação da CS na imunidade celular antitumoral. Sabemos que a Ciclosporina atua nos eventos celulares iniciais da resposta imunológica após a estimulação antigênica, inibindo a função das células Ta. As Ta são as principais células envolvidas na rejeição de transplantes. A CS inibe a transcrição do RNAm para IL-2, bem como a secreção de outras citocinas pela célula Ta ativada, como o IFN- γ (Borel, 1994; Abbas et al, 1994a). Essas citocinas, junto com a IL-2, iriam atuar em outras populações celulares envolvidas na imunidade celular, como os linfócitos T citotóxicos (Tc), macrófagos e células extermadoras naturais (EN), além dos linfócitos B (Hart & Saini, 1992). As Células Tc, por sua vez, são as responsáveis pela vigilância imunológica através do reconhecimento dos抗ígenos tumorais (MacDonald & Steeg, 1983; Abbas et al, 1994a). As células Tc reconhecem o抗ígeno tumoral em associação com produtos do CPH I. A Ciclosporina, ao inibir a ativação das células Tc pela IL-2, impede a geração de clones com especificidade antigênica, os quais iriam reconhecer e destruir células que expressassem抗ígenos tumorais em

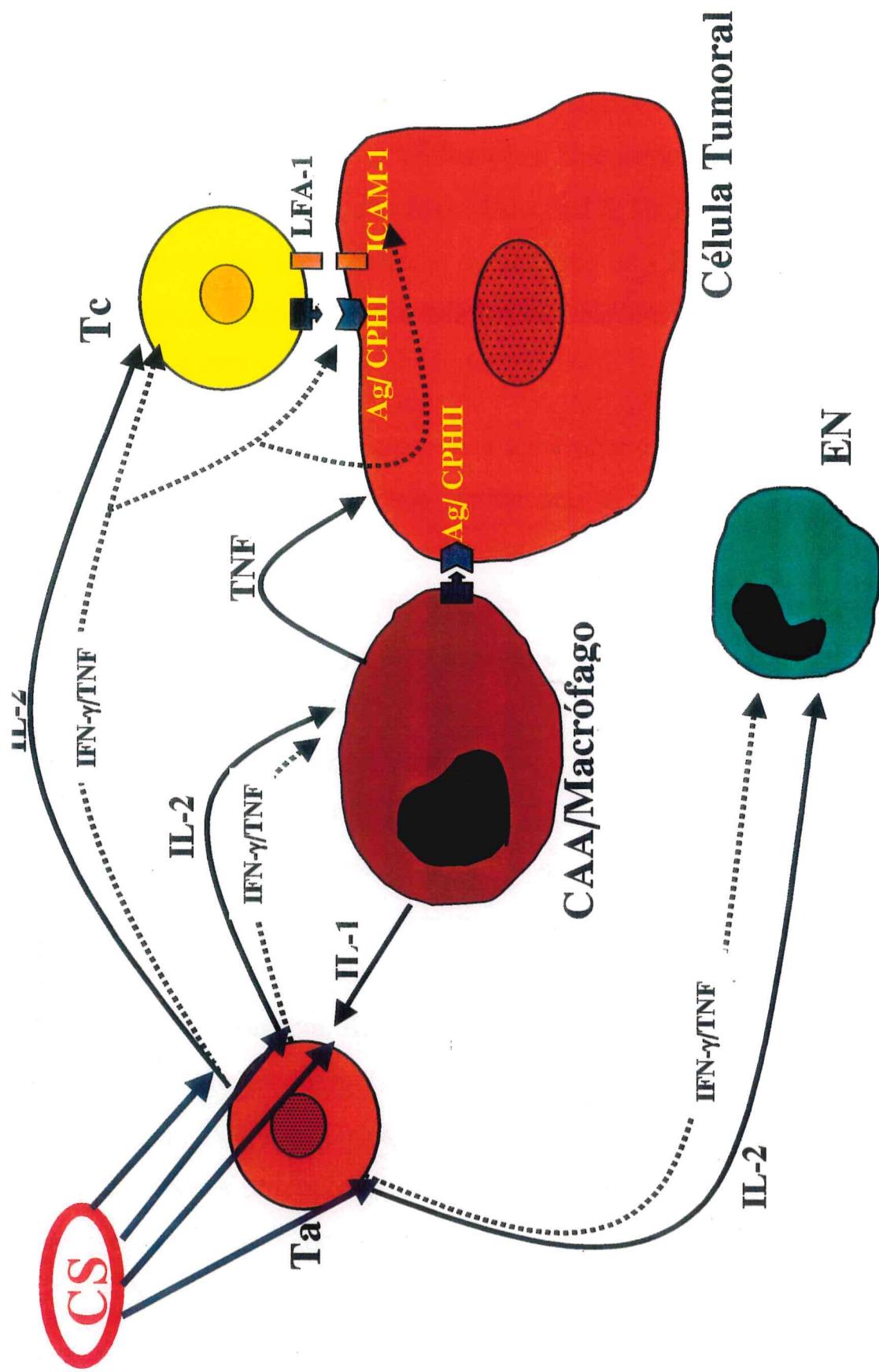


Figura 28: Esquema representativo da ação da Ciclosporina sobre a imunidade celular. CS (Ciclosporina), IL-1 (Interleucina-1), TNF (Fator de Necrose Tumoral), IFN- γ (Interferon- γ), EN (Exterminador Natural), Ta (Linfócito T auxiliar), Tc (Linfócito T citotóxico), CAA (Célula Apresentadora de Antígeno).

associação ao CPH 1. As células Tc ao serem estimuladas por IL-2, produzem também citocinas, como o IFN- γ , o qual tem a capacidade de estimular as células EN e a capacidade citotóxica dos macrófagos. Por outro lado, sabe-se que o TNF e IFN- γ secretados pelas células Ta podem aumentar a expressão da molécula do CPH (Abbas et al., 1994). A Ciclosporina bloquearia, então, esse mecanismo, ao inibir a expressão de tais citocinas (Autenried & Halloran, 1985; Romaniuk et al, 1987; Keown, 1994). A ausência do antígeno de CPH I nas células neoplásicas pode ser efetiva em abolir ou evadir a vigilância imunológica (Hart & Saini, 1992; Browning, 1996).

Dessa maneira, a Ciclosporina inibe uma cascata de fenômenos celulares que resultariam na imunidade antitumoral (Liotta, 1992). Essa cascata de fenômenos, aparentemente interligados, além de levarem a uma inibição da ativação policlonal dos linfócitos Tc, inclui também uma provável ação da Ciclosporina em uma importante inibição de macrófagos e células EN. As células EN parecem ser particularmente importantes no controle da disseminação hematogênica dos tumores, prevenindo a formação de metástases (Hanna & Fidler, 1981; Hanna, 1982; Liotta, 1992). Estudos têm demonstrado serem estas células as principais efetoras, no que concerne ao efeito antimetastático (Herberman, 1995). Elas efetuam sua ação lítica em uma maneira não específica e não restrita ao CPH, tendo sua ativação dependente de citocinas como a IL-2, TNF, e IFN- γ , ou seja, dependente da estimulação concorrente das células T e macrófagos que produzem tais citocinas. (Abbas et al, 1994a; Abbas et al, 1994b; Herberman, 1995). A Ciclosporina poderia estar inibindo a ativação das células EN, ao inibir a produção dessas citocinas pelas células Ta (principalmente), por macrófagos, bem como por células Tc, como visto anteriormente (Abbas et al, 1994 b). Sabendo que a Ciclosporina não inibe as células EN humanas diretamente, poderíamos dizer, então, que ela o faria indiretamente, ao inibir a produção de IFN- γ , um modulador positivo das células EN.

(Britton & Palacios, 1982; Abbas et al, 1994b). Um fato importante que fala a favor do efeito antimetastático das células EN é que as neoplasias malignas raramente metastatizam quando transplantadas para ratos *nude* atípicos. Embora esses animais não possuam linfócitos T maduros funcionais, eles exibem um nível considerável de células EN (Hanna, 1982).

Em relação aos macrófagos, sabe-se que a sua capacidade citotóxica tumoral é dependente da ativação por citocinas secretadas pelas células Ta ($CD4^+$), principalmente o IFN- γ (Abbas et al, 1994a; Ville et al, 1996). O IFN- γ induz a secreção de TNF e IL-1, além de radicais livres proteases e óxido nítrico pelos macrófagos. A Ciclosporina administrada previamente à inoculação do tumor poderia, ao inibir a produção de IFN- γ pelas células Ta, estar inibindo, consequentemente, o estímulo para a expressão de genes responsáveis pela codificação de TNF e interleucinas nos macrófagos. Essa inibição da atividade dos macrófagos pela Ciclosporina poderia inibir, ainda, o recrutamento de células imunes secundárias para o sítio tumoral, ou seja, inibir os efeitos tumoricidas não-específicos.

Uma outra ação da Ciclosporina na inibição da vigilância imunológica seria na interação entre a célula tumoral e o linfócito efetor. A interação entre a integrina LFA-1, expressa nos linfócitos Tc e células EN, e a molécula ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*), expressa na célula alvo tumoral (Fraumeni & Hoover, 1977) é de extrema importância na estabilização do conjugado citolítico (Hart & Saini, 1992; Hart, 1996). Uma vez que a ICAM-1 tem sua expressão estimulada por TNF e IFN- γ , a CS mais uma vez, ao inibir a expressão dessas citocinas, permitiria às células tumorais circulantes evitar o estabelecimento de conjugados citolíticos estáveis, podendo significar a evasão da destruição por linfócitos Tc ou células EN (Hart & Saini, 1992).

Uma vez postulado que os tumores secundários se desenvolvem a partir de subpopulações celulares com habilidade metastática já existentes no tumor primário (Fidler, 1978; Fidler & Post, 1985), pode-se considerar que o tratamento com Ciclosporina permite que o potencial metastático dessas células seja expresso (Eccles et al, 1980). Pode-se conjecturar, ainda, que existam, entre as populações celulares do tumor T.E.G.S. 2047, subpopulações com capacidade para metatastizar. É provável que a Ciclosporina deixe livre estas subpopulações celulares potencialmente metastática ao inibir especificamente a imunidade celular, como visto acima. Essa ação dar-se-ia com a Ciclosporina atuando nos eventos celulares iniciais da resposta imunológica inibindo a função das células T_a, bem como impedindo a estabilização dos conjugados citolíticos entre a célula tumoral e a célula efetora, através de uma possível atuação na expressão de moléculas de adesão. Haveria então, um aumento do número de células escapando do tumor primário, bem como um aumento da sua sobrevida na circulação ou em sítios distantes no hospedeiro imunossuprimido (Eccles et al, 1980).

Não é provável que a ação da Ciclosporina ocorra devido a uma ação mutagênica nessas células tumorais, pois testes de genotoxicidade em estudos clássicos *in vitro* e *in vivo* concluíram que a CS é destituída de qualquer propriedade mutagênica (Zwanenburg et al., 1988; Ryffel, 1992). Outros estudos *in vitro* em células humanas mostraram que a ciclosporina induz trocas entre cromátides irmãs. Entretanto, as concentrações de Ciclosporina usadas nos experimentos eram muito maiores que as utilizadas clinicamente (Penn, 1987).

O nosso modelo de tumor experimental é um importante produtor de TNF (Crossara et al., 1995). Crossara e colaboradores (1995) demonstraram que as células FHM em cultura por 7, 14 e 21 dias liberavam TNF espontaneamente no sobrenadante. A quantidade de TNF liberado era maior

nas culturas com 7 dias quando a maioria das células era histiocito-símile. Após 14 e 21 dias em cultura, a percentagem dessas células caia para, respectivamente, 4% e 0%, mas ainda havia uma significativa produção de TNF, provavelmente advinda das células fibroblasto-símile. O TNF é uma citocina predominantemente produzida por macrófagos ativados, exercendo um efeito citotóxico ou citostático em algumas linhagens celulares *in vitro* e com a capacidade de induzir necrose de tumores sólidos em alguns modelos animais (Orosz et al, 1993). Uma vez que os macrófagos têm importante atividade tumoricida quando mediada pelo TNF, tanto pelo efeito citotóxico direto, como pela mobilização de outras células de defesa do hospedeiro (Abbas et al, 1994a), este fator pode também estar contribuindo para a pequena agressividade do tumor T.E.G.S.-2047. O mecanismo de inibição da produção de TNF atribuído à Ciclosporina, poderia ser, então, um dos prováveis meios pelos quais haveria a estimulação do potencial metastático do tumor.

Os possíveis efeitos da Ciclosporina sobre as moléculas de adesão endoteliais no desenvolvimento de metástases parece, entretanto, contraditório. As células endoteliais podem expressar moléculas de adesão quando estimuladas por TNF ou outras citocinas como IL-1, IFN- α , IFN- γ , IL-6. Entre essas moléculas, podemos citar as da família das imunoglobulinas (ICAM-1 e VCAM-1), e as selectinas (ELAM-1) (McCormick & Zetter, 1992; Orosz et al., 1993; Hart, 1996). Trabalhos têm demonstrado uma modulação na expressão de tais moléculas e o aumento de índices de metastatização. Alguns modelos, utilizando inoculação de TNF exógeno, bem como a neutralização de TNF endógeno, demonstraram que essa citocina trata-se de um importante indutor metastático. Orosz e colaboradores (1993) mostraram que uma única injeção intraperitoneal de TNF humano de camundongo recombinante, 5 hs antes da injeção endovenosa de células de fibrossarcoma induzido por metilcolantreno (CSF1),

aumentou significativamente o número de metástases pulmonares. Experimentos *in vitro* têm demonstrado um aumento tanto da expressão de moléculas de adesão de superfície, como da aderência das células tumorais às células endoteliais, ambos induzido por TNF (Orosz et al., 1993; Dejana et al, 1988; Bereta et al., 1991). O TNF poderia então ter um efeito em contribuir para progressão tumoral ao aumentar a adesão das células tumorais ao endotélio *in vitro*, estimulando a expressão de moléculas de adesão, ou ainda, induzindo enzimas que aumentem a disseminação tumoral, como a colagenase e estimulando a angiogênese *in vivo* (Orosz et al., 1993). No modelo experimental estudado, o tumor T.E.G.S.-2047 é um importante produtor de TNF (Crossara et al, 1995), fato esse que nos levaria a pensar, pelas ações supracitadas do TNF, que esse seria um tumor de elevado índice metastático. Esse fato, entretanto, não ocorre, sendo o T.E.G.S. 2047 um tumor de baixo índice metastático, de apenas 3,3% na literatura (Ribeiro, 1987) e 0% em nossos resultados. Esse baixo índice metastático não deve ser imputado à capacidade citotóxica direta e indireta do TNF, pois a metastatização não depende da massa tumoral como um todo, mas apenas de subclones específicos com capacidade para tal. O baixo índice de metástases do tumor T.E.G.S. 2047 sugere a existência de uma outra barreira para o processo de invasão à distância, que seria provavelmente o importante papel das defesas naturais e adaptativas do hospedeiro, devido a uma potente imunogenicidade desse tumor. Sob essa ótica, o TNF teria alguma atividade antitumoral, como estimular moléculas de adesão no linfócito, estabelecendo os conjugados citolíticos, já descritos acima, bem como sua ação modulatória nas respostas imunes e inflamatórias (Dustin & Springer, 1988; Orosz et al., 1993). A ação da Ciclosporina ao inibir direta ou indiretamente a produção de citocinas, como, IL-2, IFN- γ e TNF, entre outras, as quais têm um papel importante no estímulo à expressão de moléculas de adesão endotelial (Ryffel, 1989; Borel & Kis, 1991; Ryffel, 1992; Borel, 1994), seria a inibição ou diminuição da expressão de tais moléculas. A consequência desse fato

seria uma inibição da disseminação metastática, o que não ocorreu em nosso modelo experimental. Na verdade, observou-se um aumento considerável no número de metástases pulmonares, de 0% no grupo controle para 72% no grupo tratado com Ciclosporina. Seria mais relevante, então, a ação da Ciclosporina em inibir citocinas que estimulariam a expressão de ICAM-1 nos linfócitos e células EN (Hart & Saini, 1992; Hart, 1996), dessa maneira, fazendo com que a célula tumoral pudesse evadir da interação com células efetoras do sistema imunológico.

O aumento no percentual de metástases nos animais tratados com Ciclosporina seria decorrente de sua ação imunossupressora, e não de uma atividade mutagênica ou de modulações a nível de moléculas de adesão endoteliais (o que seria contraditório). Um fato na literatura descrito por Nakamoto e colaboradores (1994) em paciente transplantado renal imunossuprimido com Ciclosporina, Azatioprina e Prednisolona, que corroboraria esse mecanismo, seria a regressão de metástases ósseas após a interrupção do tratamento com Ciclosporina e início de imunoterapia com interferon- α .

Em relação à curva de crescimento tumoral, nos estudos de Eccles e colaboradores, a Ciclosporina não mostrou efeito na velocidade de crescimento de nenhum dos tumores testados (Eccles et al, 1980). Alexander (1992), entretanto, descreveu, um efeito da CS no aumento da velocidade de multiplicação celular e da massa tumoral em tumores murinos e humanos. Em nosso trabalho, a Ciclosporina causou uma aceleração no aumento do volume tumoral, em relação aos tumores dos animais não imunossuprimidos, maior do que as outras drogas imunossuppressoras. Esse efeito deveu-se provavelmente a sua ação específica nos linfócitos Tc, especialmente nos TILs (linfócitos infiltrantes do tumor), uma vez que a vigilância imunológica propriamente dita estaria a encargo da imunidade adquirida (linfócitos T citotóxicos) (Herberman, 1995).

3. Drogas imunossupressoras convencionais (Azatioprina e corticóide), suas ações no sistema imunológico e influência no desenvolvimento de metástases no modelo experimental do tumor T.E.G.S. 2047.

Como visto anteriormente, os estudos clínicos têm mostrado a existência de diferenças entre as malignidades que surgem em pacientes tratados com Ciclosporina e aquelas descritas após terapia imunossupressora convencional (CIT) com Azatioprina e Prednisona (Penn, 1987). Em nossos resultados, o aumento do número de metástases nos grupos tratados com AZA e MP, em relação ao grupo controle, provavelmente deveu-se às atividades imunossupressoras dessas drogas. Em relação à Ciclosporina, entretanto, o percentual de metástases em ambos os grupos foi significativamente menor, pois a Ciclosporina tem um mecanismo de ação específico para a imunidade celular, a principal via da imunologia tumoral, atuando especificamente nos eventos iniciais da resposta imunológica, nas células Ta (Borel & Kis, 1991; Borel, 1994). A Azatioprina e Metilprednisolona tiveram esse menor índice metastático provavelmente por serem drogas imunossupressoras que atuam indistintamente entre as células do sistema imune, afetando a divisão celular e/ou a síntese de citocinas. A Azatioprina afeta a divisão de linfócitos T e B ativados, inibindo a produção de anticorpos e a imunidade mediada por células. Ela tem pouco efeito sobre a atividade das células EN, uma das principais células envolvidas na atividade antimetastática, o que poderia explicar o menor número de metástases, no presente experimento, em relação à Ciclosporina. A Azatioprina inibe, entretanto, a produção de polimorfos e monócitos, bem como o seu recrutamento nos sítios de inflamação, resultando em baixos níveis dessas células na circulação e nos sítios de inflamação. A função dos fagócitos mononucleares maduros, entretanto, não é substancialmente afetada (Mantovani et al., 1994). Em relação à curva de crescimento tumoral, a Azatioprina não mostrou, nesses

experimentos, efeito no aumento do volume tumoral em relação ao grupo controle, como observado com a Ciclosporina. Esse fato poderia ser explicado pela menor especificidade de ação da Azatioprina na vigilância imunológica antitumoral, em relação à CS e/ou por uma ação citotóxica da Azatioprina. Observou-se ainda no grupo tratado com AZA a regressão espontânea do tumor em 01 animal, falando a favor da grande imunogenicidade do tumor T.E.G.S. 2047, em uma correlação com a observação clínica, embora rara, de que alguns tumores passam por uma regressão espontânea (Rosenberg, 1991).

O efeito dos glicocorticoides é exercido através da inibição da liberação de IL-1 e TNF pelos macrófagos ativados. Esse bloqueio da liberação de IL-1 por macrófagos ativados poderia inibir indiretamente a produção de IL-2 pelas células T (Dinarello & Mier, 1987; Lew et al., 1988; Mantovani et al, 1994; Marino & Doyle, 1994). Esse efeito, entretanto, não é exercido diretamente na inibição do RNAm para IL-2 como é feito pela Ciclosporina (Borel, 1992). Os fagócitos mononucleares, dessa maneira, são o principal alvo para a atividade imunossupressora dos glicocorticoides, interferindo na função macrofágica, causando monocitopenia, bloqueando o recrutamento tecidual, causando defeitos de diferenciação, de ativação e de função dos macrófagos maduros (Goldfien, 1998). Essa ação dos Gc é importante, uma vez que os macrófagos constituem um potente sistema de defesa contra o desenvolvimento de metástases, e vigilância imunológica. A presença dos TAM (“Tumor-Associated Macrophages”), entretanto, não significa necessariamente uma resposta protetora do hospedeiro, o que vai depender do grau de citotoxicidade do macrófago, e de fatores que determinem sua estimulação (Key, 1983). Os glicocorticoides também causam inibição de função das células EN. Os glicocorticoides induzem ainda apoptose em linfócitos de espécies sensíveis, como nos camundongos, mas particularmente quando usados em altas doses (Mantovani et al, 1994), o que não foi o caso nesses experimentos. Quanto a uma possível ação dos

glicocorticoides em inibir o processamento e apresentação de抗ígenos pelos macrófagos, ao sistema imune (Gerrard et al., 1984; Goldfien, 1998; Marino & Doyle, 1994), poderia ser sobrepujada por outras células APC (apresentadoras de抗ígenos), ou por células tumorais que tivessem essa capacidade (Palacios, 1982; Restifo & Wang, 1996). Em relação à curva de crescimento tumoral, foi observado um aumento no volume tumoral em relação ao grupo controle, embora significativamente menor do que o observado com a Ciclosporina. Esse efeito pode ser devido à sua ação nos processos imunológicos antitumorais, como nos macrófagos e linfócitos T, embora nesse último sua ação seja bem menos específica que a da Ciclosporina.

4. Micofenolato mofetil (CellCept), sua ação no sistema imunológico e sua influência sobre a progressão tumoral no modelo experimental do tumor T.E.G.S. 2047.

O Micofenolato Mofetil (MMF) foi aprovado pelo FDA em 1995 para uso em pacientes transplantados renais nos EUA, tendo sido lançado oficialmente no Brasil em 1996 (Noronha, 1997). Por seu uso recente como droga imunossupressora, ainda não há evidências clínicas do desenvolvimento de neoplasias (van Gelder et al, 1997; Barbuto et al., 1998). No presente trabalho, não foi observado nenhum foco metastático no grupo tratado com Micofenolato mofetil (CellCept) na dose de 20 mg/Kg/dia, embora essa droga iniba o sistema imune com uma ação antiproliferativa e citostática sobre os linfócitos. Esse fato pode ter ocorrido devido ao bloqueio da glicosilação de proteínas envolvidas na adesão intercelular de linfócitos e monócitos às células endoteliais. A depleção de GTP mediada pelo AMF inibe a transferência de fucose e manose para as glicoproteínas, algumas das quais são moléculas de adesão que medeiam a ligação dos leucócitos às células endoteliais e às células alvo (Albelda

& Buck, 1990; Allison & Eugui, 1993; Allison et al., 1993). Tais moléculas de adesão parecem estar também envolvidas no processo de adesão das células metastáticas às células endoteliais do órgão-alvo (McCormick & Zetter, 1992; Hart, 1996), assim, o Micofenolato Mofetil poderia estar bloqueando esse passo da cascata metastática, e o conseqüente extravasamento da célula tumoral no órgão alvo. Sabe-se ainda que as moléculas de adesão também participam no processo nas fases efetoras e de iniciação da resposta imune. A interação entre células apresentadoras de抗ígenos e linfócitos requer a ligação complementar de moléculas de adesão, e o mesmo fato é verdadeiro sobre a interação dos linfócitos efetores com as células alvo. O bloqueio então, da interação entre moléculas de adesão complementares, poderia exercer uma atividade imunossupressora e antiinflamatória (Allison & Eugui, 1994).

Quanto à dose de 40 mg/Kg/dia de MMF, ela mostrou-se tóxica em nossos experimentos, com 8 dos 10 animais morrendo na 1^a semana de tratamento, antes de desenvolver o tumor. O pulmão e o figado desses animais mostravam-se bastante hemorrágicos. Dessa maneira, baixamos a dose para 20 mg/Kg/dia, que é uma dose que tem se mostrado imunossupressora em modelos experimentais em ratos (Martelius et al., 1997; Müller et al., 1998).

Em relação à curva de crescimento tumoral em nossos experimentos, o Micofenolato Mofetil na dose de 20 mg/Kg/dia, não mostrou diferença significativamente estatística ($p<0,05$) no volume tumoral ou em sua velocidade de crescimento em relação ao grupo controle. Uma característica do Micofenolato Mofetil que poderia explicar essa curva de crescimento tumoral, bem como o não desenvolvimento de metástases, é o fato do Ácido Micofenólico ter uma atividade antitumoral, sendo o MMF usado originalmente, na década de 70, como uma droga antineoplásica (Vanrenterghem, 1997). Entretanto, as altas doses de

AMF requeridas e o seu rápido “clearance” limitou o seu potencial desenvolvimento (Tressler et al., 1994). A atividade antiproliferativa do AMF já havia sido demonstrada *in vitro* contra uma variedade de linhagens de células tumorais (Sweenwy et al., 1972), e *in vivo* contra leucemias, linfomas e tumores sólidos, todos murinos (Carter et al., 1969; Suzuki et al., 1969; Ohsugi et al., 1976). Posteriormente, Tressler e colaboradores (1994) demonstraram que o AMF inibia, *in vitro*, o crescimento de uma variedade de linhagens de células tumorais humanas (leucemias, linfomas e tumores sólidos), provavelmente por um efeito citostático. Eles demonstraram ainda que o tratamento com MMF inibiu o crescimento tumoral (tumores humanos) s.c. em camundongos *nude* atípicos, em doses que variavam entre 120 e 240 mg/Kg/dia. Tressler e colaboradores (1994) mostraram ainda que o MMF (240 mg/Kg/dia) aumentou o tempo de sobrevida de camundongos atípicos inoculados via endovenosa com células de linfoma murino, em um modelo de metástase experimental. Em nossos experimentos não houve uma diminuição do volume tumoral em relação ao controle, como nos experimentos de Tressler e colaboradores (1994). Entretanto, sendo o tumor T.E.G.S. 2047, como visto anteriormente, possivelmente imunogênico, esperar-se-ia que uma droga fortemente imunossupressora como o é o MMF, à semelhança da Ciclosporina, levasse a um aumento do volume tumoral, bem como ao desenvolvimento de metástases em nosso modelo experimental. Esses resultados, entretanto, não foram observados após o tratamento com MMF nesses experimentos, mesmo com as doses utilizadas tendo se mostrado imunossupressoras em outros modelos experimentais (Müller et al., 1998; Martelius et al., 1997). Esses efeitos do MMF poderiam ser explicados, além de sua ação em moléculas de adesão vista acima, por uma atividade citostática sobre as células tumorais.

5. Influência da Ciclosporina, Azatioprina, Metilprednisolona e Micofenolato mofetil nos índices leucocitários dos animais com o tumor T.E.G.S. 2047.

O leucograma refletiu o modo de ação das diferentes drogas imunossupressoras, em nosso experimento. Foi observado uma linfopenia nos animais tratados com Ciclosporina, provavelmente resultante da ação da CS nos linfócitos T. O número de leucócitos totais, entretanto, não mostrou-se alterado, devendo-se talvez a uma ação mais específica ao funcional nos linfócitos T. Nos animais tratados com Azatioprina não foram observadas alterações estatisticamente significativas no leucograma (considerando-se $p<0,05$), demonstrando ser a dose utilizada não tóxica para a medula óssea (Marino & Doyle, 1994). A atividade antiinflamatória da Azatioprina é provavelmente explicada por sua ação na produção de fagócitos. Entretanto, ela diminui o seu recrutamento para fora da circulação (Mantovani et al, 1994; Goldfien, 1998), o que poderia explicar, assim, uma não alteração em seus níveis, no hemograma. Em relação às alterações observadas nos animais tratados com Metilprednisolona, é sabido que os glicocorticoides causam importantes mudanças no número relativo e absoluto de leucócitos na circulação. Em nossos experimentos, foi observado uma neutrofilia nos animais tratados com Metilprednisolona, tanto em relação ao grupo controle ($p<0,05$), como em relação aos grupos tratados com Ciclosporina e Azatioprina ($p<0,05$). A granulocitose neutrofílica geralmente é observada após a administração de glicocorticoides, provavelmente como consequência tanto da estimulação da liberação a partir da medula óssea, como da diminuição da migração para fora da circulação sanguínea (Mantovani et al, 1994; Goldfien, 1998). Foi observado ainda, nesse grupo, uma importante linfopenia, tanto em relação ao grupo controle ($p<0,01$), como em relação aos grupos tratados com Ciclosporina e Azatioprina ($p<0,05$). Esse efeito dos glicocorticoides pode ser devido ao fato de que, em espécies sensíveis, eles

causarem morte celular programada, além da diminuição funcional nos linfócitos (Mantovani et al, 1994; Goldfien, 1998). Em relação ao Micofenolato Mofetil, a leucocitose, com linfocitose e neutrofilia observada em relação ao grupo controle ($p<0,05$), pode ser explicada pela inibição da glicosilação das moléculas de adesão, inibindo assim a adesão dos leucócitos às células endoteliais, e o consequente recrutamento de linfócitos e monócitos para fora da circulação (Albelda & Buck, 1990; Allison & Eugui, 1993; Allison et al., 1993). Trabalhos experimentais em ratos têm demonstrado a inibição do extravasamento vascular de leucócitos. Müller e colaboradores (1998) demonstraram que o Micofenolato Mofetil inibia significativamente a expressão de ICAM-1, bem como levava a uma diminuição no acúmulo de linfócitos no rim remanescente após nefrectomia parcial (5/6 do rim). Em um outro trabalho, Blaheta e colaboradores (1998), observaram *in vitro*, uma diminuição na adesão das células CD4⁺ e CD8⁺ pelo Micofenolato Mofetil. Observaram ainda uma diminuição na expressão de E-selectina e P-selectina na membrana das células endoteliais na presença do MMF. Esse trabalho mostrou ainda que a capacidade de ligação dos linfócitos, associada ao LFA-1(α L/ β 2 ou “antigen-1”), VLA-4 (α 4 β 1 ou “very late antigen-4”), PSGL-1 (“p-selectin glycoprotein ligand-1”), à molécula de adesão ICAM-1, VCAM-1 (“Vascular Adhesion Molecule-1”) e p-selectina, encontrava-se diminuída.

O presente trabalho vem corroborar a importância da barreira imunológica na supressão da progressão tumoral, sugerindo uma ativa participação da Ciclosporina na inibição dos mecanismos envolvidos na vigilância imunológica do tumor T.E.G.S. 2047, de forma superior às drogas imunossupressoras convencionais (Azatioprina e Metilprednisolona). Em relação ao CellCept, uma droga nova “racionalmente planejada”, apesar de sua ação imunossupressora, com resultados promissores em terapias de resgate em rejeições refratárias (Barbuto et al., 1998), poderia, por sua ação em moléculas de adesão endoteliais, estar

prevendo a formação de metástases em nosso modelo experimental.

CONCLUSÕES

1. Os animais que receberam apenas o tumor T.E.G.S. 2047 (10^6 células via s.c.), não submetidos à imunossupressão, não desenvolveram metástases em nenhum órgão examinado.
2. A Ciclosporina (10 mg/Kg/dia) aumentou o índice de metástase pulmonar (72,72%) nos animais inoculados com o tumor T.E.G.S. 2047, em relação ao grupo controle (0%). A Ciclosporina apresentou um efeito permissivo no desenvolvimento de metástases significativamente maior em relação à Azatioprina e a Metilprednisolona..
3. A Azatioprina (4 mg/Kg/dia) e a Metilprednisolona (1 mg/Kg/dia) causaram um aumento no índice de metástase pulmonar, 43,75% e 50%, respectivamente, nos animais inoculados com o tumor T.E.G.S. 2047, em relação ao grupo controle (0%), não apresentando, entretanto, diferença estatisticamente significativa entre si.
4. O Micofenolato mofetil (CellCept) (20mg/Kg/dia) não causou o desenvolvimento de metástases em nosso modelo experimental.
5. Em relação à curva de crescimento, a Ciclosporina levou a um aumento no volume tumoral do T.E.G.S. 2047 em comparação aos tumores dos animais que não receberam imunossupressão (grupo controle), bem como aos animais dos grupos tratados com Azatioprina e Metilprednisolona.

6. Os tumores dos animais tratados com Metilprednisolona mostraram um desenvolvimento maior em relação ao grupo controle. Os tumores dos animais tratados com Azatioprina, entretanto, não mostraram diferença no volume tumoral em relação ao grupo controle.
6. Os tumores dos animais tratados com Micofenolato mofetil (CellCept), na dose de 20 mg/Kg/dia, também não mostraram diferença no volume em relação ao grupo controle.
7. Quanto ao hemograma, não foram encontradas alterações significativas ao nível dos leucócitos totais nos grupos tratados com CS, AZA e MP. Os animais tratados com Ciclosporina mostraram uma linfopenia. Os animais tratados com Metilprednisolona, por sua vez, apresentaram linfopenia e neutrofilia. Não foram encontradas, entretanto, alterações ao nível leucocitário nos animais tratados com azatioprina. Quanto aos animais tratados com Micofenolato Mofetil, observou-se uma leucocitose, com linfocitose e neutrofilia.

Nosso trabalho sugere uma ativa participação das drogas utilizadas no esquema clássico de imunossupressão (Ciclosporina/ Azatioprina/ Metilprednisolona), principalmente da Ciclosporina na inibição dos mecanismos envolvidos na vigilância imunológica do tumor T.E.G.S. 2047. Eles também corroboram os resultados de outros autores que mostram o aumento da incidência de tumores malignos em pacientes transplantados tratados com CS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., POBER, J. S. *Cellular and molecular immunology*. 2nd ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1994a. cap. 18: Immunity to tumors, p. 356-375.
- _____. *Cellular and molecular immunology*. 2nd ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1994b. cap. 13: Effector mechanisms of T cell-mediated immune reactions, p. 261-277.
- ALBELDA, S. M., BUCK, C. A. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.*, v. 4, p. 2868-2880, 1990.
- ALEXANDER, P. Cyclosporin A and the growth, dissemination and induction of tumors. In: WHITE, D. J. G. *Cyclosporin A*. Amsterdam: Elsevier, 1992. p. 299-305.
- ALLISON, A. C., EUGUI, E. M. Mycophenolate mofetil, a rationally designed immunosuppressive drug. *Clin. Transplant.*, v.7, p. 96-112, 1993.
- ALLISON, A. C., EUGUI, E. M. Mycophenolate mofetil (RS-61443): mode of action and effects on graft rejection. In: THOMSON, A. W., STARZL, T. E. *Immunosuppressive drugs: developments in anti-rejection therapy*. London: Edward Arnold, 1994. cap. 11, p. 141-159.
- ALLISON, A. C., KOWALSKI, W. J., MULLER, C. J., WATERS, R. V., EUGUI, E. M. Mycophenolic acid and brequinar, inhibitions of purine and pyrimidine synthesis, block the glucosylation of adhesion molecules. *Transplant. Proc.*, v. 25, p. 67-70, 1993.
- ANZANO, M. A., ROBERTS, A. B., SMITH, J. M., SPORN, M. B., De LARCO, J. E. Sarcoma growth factor from conditioned medium of virally transformed cells is composed of both type α and β transforming growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 80, p. 6264-6268, 1983.
- AUERBACH, R., LU, W. C., PARDON, E., GUMKOWSKI, F., KAMINSKA, G., KAMINSKI, M. Specificity of adhesion between murine tumor cells and capillary endothelium: an *in vitro* correlate of preferential metastasis *in vivo*. *Cancer Res.*, v. 47, p. 1492-1496, 1987.

AUTENRIED, P., HALLORAN, P. F. Cyclosporine blocks the induction of class I and class II MHC products in mouse kidney by graft-versus-host disease. *J. Immunol.*, v. 135, p. 3922-3928, 1985.

BARBUTO, J. A. M., AKPORIAYE, E. T., HERSH, E. M. Immunopharmacology. In: KATZUNG, B. G. *Basic & clinical pharmacology*. 7th. ed. Connecticut: Appleton & Lange, 1998. cap. 56, p. 916-944.

BARNES, J. Molecular mechanisms of steroid action in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 97, p. 159-168, 1996.

BARTH, R. J., MULE, J. J., SPIESS, P. J., ROSENBERG, S. A. Interferon gamma and tumor necrosis factor have a role in tumor regressions mediated by murine CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.*, v. 173, p. 647-658, 1991.

BERETA, M., BERETA, J., COHEN, S., ZAIFERT, K., COHEN, M. C. Effects of inflammatory cytokines on the adherence of tumor cells to the endothelium in a murine model. *Cell. Immunol.*, v. 136, p. 263-277, 1991.

BEZERRA DE ARAÚJO, R. W., PAULA, L. K. C. DE A., MENEZES, D. B., POMPEU, M. N. L., FERREIRA, F. V. A., FONTELES, M. C. A propósito de um tumor espontâneo na região da glândula salivar de rato albino. Observações preliminares. Histologia e transplante. *Rev. Med. Univ. Fed. Ceará*, v. 20, n. 1/2, p. 21-24, 1980.

BLAHETA, R. A., LECKEL, K., WITTING, B., ZENKER, D., OPPERMANN, E., HARDER, S., SCHOLZ, M., WEBER, S., SCHULDES, H., ENCKE, A., MARKUS, B. H. Inhibition of endothelial receptor expression and of T-cell ligand activity mycophenolate mofetil. *Transpl. Immunol.*, v. 6, p. 251-259, 1988.

BOREL, I. J. Comparison of the immune response to sheep erythrocytes, tetanus toxoid and endotoxin in different strains of mice. *Agents Actions*, v. 4, p. 277-285, 1974.

_____. Comparative study of *in vitro* and *in vivo* drug effects on cell-mediated cytotoxicity. *Immunology*, v. 31, p. 631-641, 1976.

BOREL, J. F. Cyclosporin. In: DALE, M.M., FOREMAN, J. C., FAN, T. P. D. *Textbook of immunopharmacology*. 3th. ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1994. cap. 29, p. 320-329.

BOREL, J. F., KIS, Z. L. The discovery and development of cyclosporine (Sandimmune) *Transplant. Proc.*, v. 23, n. 2, p. 1867-1874, 1991.

BRITTON, S., PALACIOS, R. Cyclosporin A. Usefulness, risks and mechanisms of action. *Immunol. Rev.*, v. 65, p. 5-22, 1982.

BROWNING, M. The role of MHC class I in tumor immunity. In: DALGLEISH, A. G., BROWNING, M. *Tumor immunology: immunotherapy and cancer vaccines*. New York: Cambridge University, 1996. cap. 4, p. 69-94.

BROWNING, M., DALGLEISH, A. G. Introduction and historical perspective. In: DALGLEISH, A. G., BROWNING, M. *Tumor immunology: Immunotherapy and cancer vaccines*. New York: Cambridge University, 1996. cap. 1, p. 1-6.

BUCK, C. A. Adhesion mechanisms controlling cell-cell and cell-matrix interactions during the metastatic process. In: MENDELSON A C., HOWLEY, A., ISRAEL, S. J., LIOTTA L. *The molecular basis of cancer*. Philadelphia: W. B. Saunders, 1995. cap. 9, p. 172-205.

BULLINGHAM, R. E. S., NICHOLLS, A., HALE, M. Pharmacokinetics of mycophenolate mofetil (RS61443): a short review. *Transpl. Proc.*, v. 28, p. 925-929, 1996.

BURNET, F. M. The concept of immunological surveillance. *Prog. Exp. Tumor Res.*, v. 13, p. 1-27, 1970.

CALNE, R. Y., ROLLES, K., WHITE, D. J. G., THIRU, S., MCMASTER, P., CRADDOCK, G. N., AZIZ, S., EVANS, D. B., DUNN, D. C., HENDERSON, R. G., LEWIS, P. Cyclosporine A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreas and 2 livers. *Lancet*, v. 2, p. 1033-1036, 1979.

CARTER, S. B., FRANKLIN, T. J., JONES, D. F., LEONARD, B. J., MILLS, S. D., TURNER, R. W., TURNER, W. B. Mycophenolic acid: an anti-cancer

compound with unusual properties. *Nature* (Lond.), v. 223, p. 848-850, 1969.

CELLCEPT (micofenolato mofetil). Monografia clínica. Rio de Janeiro: Roche, [199?]. 54p.

COTRAN, R. S., KUMAR, V., ROBBINS, S. L. *ROBBINS Pathologic basis of disease*. 5th. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1994. cap.7, p. 241-303.

CRESKOFF, A. J., FITZ-HUGH, T. JR., FARRIS, E. J. Hematology of the rat-methods and standards. In: FARRIS AND GRIFFIT. *The Rat: laboratory investigations*. 2nd. ed. Philadelphia: Lippincot, 1967. cap. 14, p. 406-420.

CROSSARA, D. P., RIBEIRO, R. A., MORAES FILHO, M. O., PORTO, P. R. L., CUNHA, F. Q., FERREIRA, S. H. Tumor necrosis factor accounts for the neutrophil emigration activity released by cultured malignant fibrous histiocytoma cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 28, p. 671-678, 1995.

CYCLOSPORIN in cadaveric renal transplantation.: 1 year follow-up of a multicenter trial. European Multicenter Trial Group. *Lancet*, v. 2, n. 8357, p. 986-989, 1983.

DEJANA, E., BERTOCCHI, F., BORTOLAMI, M. C., REGONESI, A., TONTA, A., BREVIARIO, F., GIAVAZZI, R. Interleukin 1 promotes tumor cell adhesion to cultured human endothelium in a murine model. *J. Clin. Invest.*, v. 82, p. 1466-1470, 1988.

DIAS-BARUFFI, M, CUNHA, F. Q., FERREIRA, S. H., ROQUE-BARREIRA, M. C. Macrophage-released neutrophil chemotactic factor (MNCF) induces PMN-neutrophil migration through lectin-like activity. *Agents Action*, v. 38, p. C54-C56, 1993.

DINARELLO, C. A., MIER, J. W. Lymphokines. *N. Engl. J. Med.*, v. 317, p. 940-945, 1987.

DUSTING, M. L., SPRINGER, T. A. Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of the least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured cells. *J. Cell Biol.*, v. 107, p. 321, 1988.

ECCLES, S. A. *apud* Effect of ciclosporin A on the growth and spontaneous metastasis of syngeneic animals tumors. *Br. J. Cancer*, v. 42, p. 252-259, 1980.

ECCLES, S. A., HECKFORD, S. E., ALEXANDER, P. Effect of ciclosporin A on the growth and spontaneous metastasis of syngeneic animals tumors. *Br. J. Cancer*, v. 42, p. 252-259, 1980.

ECCLES, S. A., STYLES, J. M., HOBBS, S. M., DEAN, C. J. Metastasis in nude rat associated with lack of immune response. *Br. J. Cancer*, v. 40, p. 820-828, 1979.

ELICES, M. J., OSBORN, L., TAKADA, Y., CROUSE, C., LUHOWSKYI, S., HEMLER, M. E., LOBB, R.. R. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLAI-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell*, v. 60, p. 577-584, 1990.

EUGUI, E. M., ALMQUIST, S. J., MULLER, C. D. et al. Lymphocyte-selective cytostatic and immunosuppressive effects of mycophenolic acid in vitro: role of deoxyguanosine nucleotide depletion. *Scand. J. Immunol.*, v. 33, p. 161-173, 1991a.

EUGUI, E. M., MIRKOVICH, A., ALLISON, A. C. Lymphocyte-selective antiproliferative and immunosuppressive effects of mycophenolic acid in mice. *Scand. J. Immunol.*, v. 33, p. 175-183, 1991b.

EWING, J. *apud* BUCK, C. A. Adhesion mechanisms controlling cell-cell and cell- matrix interactions during the metastatic process. In: MENDELSON A C., HOWLEY, A., ISRAEL, S. J., LIOTTA, L. *The molecular basis of cancer*. Philadelphia: W. B. Saunders, 1995. cap. 9, p. 172-205.

FACCIOLI, L. H., SOUZA, G. E. P., CUNHA, F. Q., POOLE, S., FERREIRA, S. H. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration *in vivo* by indirect mechanisms. *Agents Actions*, v. 30, p. 344-349, 1990.

FELDMAN, F., LATTES, R. Primary malignant fibrous histiocytoma (fibrous xanthoma) of bone. *Skeletal Radiol.*, v. 1, p. 145, 1977.

FIALKOW, P. J. Clonal origin of human tumors. *Annu. Rev. Med.*, v. 30, p. 135-176, 1979.

FIDLER, I. J. Metastasis: Quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labed with ^{125}I -5-iodo-2'-deoxyuridine. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 45, p.773-782, 1970.

_____. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res.*, v. 38, p. 2651-2660, 1978.

FIDLER, I. J., BALCH, C. M. The biology of cancer metastasis and implications for therapy. *Curr. Probl. Surg.*, v. 24, p. 130-209, 1987.

FIDLER, I. J., HART, R. I. Biological diversity in metastatic neoplasma: Origins and implications. *Science*, v. 217, p. 998-1003, 1982.

FIDLER, I. J., POSTE, G. The cellular heterogeneity of malignant neoplasma: Implications for adjuvant chemotherapy. *Semin. Oncol.*, v. 12, p. 207-221, 1985.

FIDLER, I. J., GERSTEN, D. M., HART, I. R. The biology of cancer invasion and metastasis. *Adv. Cancer Res.*, v. 28, p.149-250, 1978.

FOLEY, E. J. Antigenic properties of methylcolanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res.*, v. 13, p. 835-837, 1953.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis. *Adv. Cancer Res.*, v. 19, p. 331-358, 1974.

_____. Tumor angiogenesis. *Adv. Cancer Res.*, v. 43, p. 175-203, 1985.

FOLKMAN, J., KLAGSBURN, M. Angiogenic factors. *Science*, v. 235, p. 442-447, 1987.

FOLKMAN, J., WATSON, K., INGBER, D., HANAHAN, D. Induction of angiogenesis during the transcription from hyperplasia to neoplasia. *Nature*, v. 339, p. 58-61, 1989.

FORNI, G., FOA, R. The role of cytokines in tumor rejection. In: DALGLEISH, A. G., BROWNING, M. *Tumor immunology: Immunotherapy and cancer vaccines*. New York: Cambridge University, 1996. cap. 9, p. 199-218.

FRANKLIN, T. J., COOK, J. M. The inhibition of nucleic acids synthesis by mycophenolic acid. *Biochem. J.*, v. 113, p. 515-524, 1969.

FRAUMENI, J. F., HOOVER, R. Immunosurveillance and cancer: epidemiologic observations. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, v. 47, p. 121-126, 1977.

FRESHNEY, R. I. *Culture of Animal Cells – A Manual of Basic Technique*. 2nd ed. New York: Alan R. Liss, Inc., 1987. cap. 18: Quantitation and Experimental Design, p. 227-244.

FU, V. S., GABBIANE, G., KAYE, G. I., LATTE, R. Malignant soft tissue tumors of probable histiocytic origin (Malignant fibrous histiocytomas). General considerations and electrom microscopic and tissue culture studies. *Cancer*, v. 35, p. 176-198, 1975.

GERRARD, T. L., CUUPS, T. R., JURGENSEN, C. H., FAUCI, A. S. Hydrocortisone-mediated inhibition of monocyte antigen presentation: disassociation of inhibitory effect and expression of DR antigen cells. *Immunology*, v. 85, p. 330-339, 1984.

GOLDIFIEN, A. Adrenocorticosteroids & adrenocortical antagonists. In: KATZUNG, B. G. *Basic & clinical pharmacology*. 7th. ed. Connecticut: Appleton & Lange, 1998. cap. 39, p. 635-652.

GOODMAN, D. G., WARD, J. M., SQUIRE, R. A., CHU, C., LINHART, M. S. Neoplastic and nonneoplastic lesions in aging F344 rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 48, p. 237-248, 1979.

GOODMAN, D. G., WARD, J. M., SQUIRE, R. A., PAXTON, M. B., CHU, K. C., LINHART, M. S. Neoplastic and nonneoplastic lesions in aging Osborne-Mendel rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 55, p. 433-447, 1980.

GREAVES, P., FACCINE, J. M. Spontaneous histiocytic neoplasms in rats. *Br. J. Cancer*, v. 43, p. 402-411, 1981.

GREAVES, P., MARTIN, J. M., MASSON, M. T. Spontaneous rat malignant tumors of fibrohistiocytic origin and ultrastructural study. *Vet. Pathol.*, v. 19, p. 497-505, 1982.

GREAVES, P., MARTIN, J. M., RABEMAMPIANINA, Y., Malignant fibrous histiocytoma in rats at sites of implanted millipore filters. *Am J. Pathol.*, v. 120, p. 207-214, 1985.

GREENE, H. S. N., HARVEY, E. K. The relationship between the dissemination of tumor cells and the distribution of metastases. *Cancer Res.*, v. 24, p. 799-811, 1964.

GREGORY, C. C., MURRAY, R. H., EDWARDS, C. F., RICKINSON, A. D. Down-regulation of cell adhesion molecules LFA-3 and ICAM-1 in Epstein-Barr virus-positive Burkitt's lymphoma underlies tumor cell escape from virus-specific T cell surveillance. *J. Exp. Med.*, v. 167, p. 1811-1823, 1998.

GUNTHERT, U., HOFMANN, M., RUDY, W., REBER, S., ZÖLLER, M., HAUSSMANN, I., MATZKU, S., WENZEL, A., PONTA, H., HERRLICH, P. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell*, v. 65, p. 13-24, 1991.

HALABAN, R., KNOW, B. S., GHOSH, S., REBER, S., BOVI, P., BAIRD, A. BFGF as an autocrine growth factor for human melanomas. *Oncogene Res.*, v. 3, p. 177-186, 1988.

HAMBURGER, F., FISHMAN, W. H. *The physiopathology of cancer*. New York, A Hoeber Harper Book, 1953.

HANDSCHUMACHER, R. E., HARDING, M., RICE, J., DRUGGE, E. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science*, v. 226, p. 544-547 1984.

HANNA, N. Role of natural Killer cells in control of cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*, v. 1, p. 45-54, 1982.

_____. The role of natural killer cells in the control of tumor growth and metastasis. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 780, p. 213-226, 1985.

HANNA, N., FIDLER, I. J. The role of natural killer cells in the destruction of circular tumor emboli. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 65, p. 801, 1980.

_____. Relationship between metastatic potential and resistance to natural Killer cell mediated cytotoxicity in three murine tumor systems. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 68, p. 1163, 1981.

HART, I. R. Adhesion receptors and cancer. In: HORTON, M. A. *Molecular biology of cell adhesion molecules*. London: John Wiley, 1996. cap. 6, p. 87-98.

HART, I. R., FIDLER, I. J. Role of organ selectivity in the determination of metastatic patterns of B16 melanoma. *Cancer Res.*, v. 40, p. 2281-2287, 1980.

_____. The implications of tumor heterogeneity for studies on the biology and therapy of cancer metastasis. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 665, p. 37-50, 1981.

HART, I. R., BIRCH, M., MARSHALL, J. F. Cell adhesion receptor expression during melanoma progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*, v. 10, p. 115-128. 1991.

HART, I. R., SAINI, A. Biology of tumor metastasis. *Lancet*, v. 339, p. 1453-1457, 1992.

HEINO, J., MASSAGUE, J. Transforming growth factor- switches the pattern of integrins expressed in MG-63 human osteosarcoma cells and causes a selective loss of cell adhesion to laminin. *J. Biol. Chem.*, v. 264, p. 21806-21811, 1989.

HERBERMAN, R. B. Cellular immunity. In: MENDELSON A C., HOWLEY, A., ISRAEL, S. J., LIOTTA L. *The molecular basis of cancer*. Philadelphia: W. B. Saunders, 1995. cap. 22, p. 511-533.

HERBERMAN, R. B., HOLDEN, H. T. Natural cell mediated immunity. *Adv. Cancer Res.*, v. 27, p. 305-377, 1978.

HERRENKNECHT, K. Cadherins. In: HORTON, M. A. *Molecular biology of cell adhesion molecules*. London: John Wiley, 1996. cap. 4, p. 45-70.

HOOVER, H. C., KETCHAM, A. S. *Am. J. Surg.*, v. 130, p. 405-411, 1975.

HOWS, J., PALMER, S., WANT, S., DEARDEN, C., GORDON-SMITH, E. C. Serum levels of Cyclosporin A and nephrotoxicity in bone marrow transplant patients. *Lancet*, v. 2, p. 145-146, 1981.

HUFF, K. K., KAUFMAN, D., GABBAY, K. H., SPENCER, E. M., LIPMAN, M. E., DICKSON, R. B. Secretion of an insulin-like growth factor-I-related protein by human breast cancer cells. *Cancer Res.*, v. 46, p. 5613, 1986.

HYNES, R. O. Integrins, a family of cell surfaces receptors. *Cell*, v. 48, p. 549, 1987.

_____. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell*, v. 69, p. 11-25, 1992.

JACOBS, C., BRUNNER, F. P., BRYNGER, H., CHAWTLER, C. Malignant diseases in patients treated by dialysis and transplantation in Europe. *Transplant. Proc.*, v. 13, p. 729-732, 1981.

KAARTINEN, M., ERAY, M., LEHTONEN, E., MATOSO-FERREIRA, A., TIENARI, J. Implanted solid human tumours grow under the renal capsule of cyclosporin-immunosuppressed rats. *Scand. J. Immunol.*, v. 39, p. 618-624, 1994.

KAHAN, B. D. Cyclosporin. *N. Engl. J. Med.*, v. 321, p. 1725-1738, 1989.

KASISKE, B. L., HEIM-DUTHOY, K. L., MA, J. Z. Elective cyclosporine withdrawal after renal transplantation: a metaanalysis. *JAMA*, v. 269, p. 395-400, 1993.

KAUFFMAN, S. L., STOUT, A. P. Histiocytic tumors (Fibrous xanthoma and histiocytoma) in children. *Cancer*, v. 14, p. 469-482, 1961.

KEARNEY, M. M., SOULE, E. H., IVINS, J. C. Malignant fibrous histiocytoma: a retrospective study of 167 cases. *Cancer*, v. 45, p. 167-178, 1980.

KEMPSON, R. L., KYRIAKOS, M. Fibroxanthosarcoma of the soft tissues. A type of malignant fibrous histiocytoma. *Cancer*, v. 29, p. 961-976, 1972.

KEOWN, P. A. Influence of cyclosporin A on graft rejection. In: THOMSON A. W., STARZL, T. E. *Immunosuppressive drugs: developments in anti-rejection therapy*. London: Edward Arnold, 1994. cap. 5, p. 63-81.

KEOWN, P., STILLER, C., ULAN, R., SINCLAIR, N. R., WALL, W. J., CARRUTHERS, G., HOWSON, W. Immunological and pharmacological monitoring in the clinical use of Cyclosporin A. *Lancet*, v. 1, p. 686, 1981.

KEY, M. E. Macrophages in cancer metastasis and their relevance to metastatic growth. *Cancer Metastasis Rev.*, v. 2, p. 75-88, 1983.

KILLION, J. J., FIDLER, I. J. The biology of tumor metastasis. *Semin. Oncol.*, v. 16, n. 2, p. 106-115, 1989.

KINSEY, D. L. An experimental study of preferential metastasis. *Cancer*, v. 13, p. 674-676, 1960.

LAGSBRUN, M. Regulators of angiogenesis: Stimulators, inhibitors, and extracellular matrix. *J. Cell Biochem*, v. 47, p. 199-200, 1991.

KLEIN, E., MANTOVANI, A. Action of natural killer cells and macrophages in cancer. *Curr. Opin. Immunol.*, v. 5, p. 714-718, 1993.

KONISHI, Y., MARUYAMA, H., MII, Y., MIYAUCHI, Y., YOKOSE, Y., MASUHARA, K. Malignant fibrous histiocytomas induced by 4-(hydroxiamino)quinoline 1-oxide in rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 68, p. 237-248, 1982.

LASKY, L. A. Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science*, v. 258, p. 964-969, 1992.

LEW, W., OPPENHEIM, J. J., MATSUSHIMA, K. Analysis of the suppression of IL-1 alpha and IL-1 beta production in human peripheral blood mononuclear adherent cells by a glucocorticoid hormone. *J. Immunol.*, v. 140, p. 1895-1902, 1988.

LIAPI, C., RAYNAUD, F., ANDERSON, W. B., EVAINA-BRION, D. High chemotactic response to platelet-derived growth factor of a teratocarcinoma differentiated mesodermal cell line. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, v. 26, p. 388, 1990.

LINDHOLM, A., OHLMAN, S., ALBRECHTSEN, D., TUFVESON, G., PERSSON, H., PERSSON, N. H. The impact of acute rejection episodes on long-term graft function and outcome in 1347 primary renal transplants treated by 3 cyclosporine regimens. *Transplantation*, v. 56, p. 307-315, 1993.

LIOTTA, L. A. Tumor invasion and metastasis - role of the extracellular matrix. Rhodes Memorial Award Lecture. *Cancer Res.*, v. 46, p. 1-17, 1986.

_____. Cancer invasion and metastasis. *Sci. Am.*, v. 2, p. 34-41, 1992.

LIOTTA, L. A., RAO, C. N., BARSKY, S. H. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab. Invest.*, v. 49, p. 636-649, 1983.

LIOTTA, L. A., STETLER-STEVENSON, W. G. Principles of molecular cell biology of cancer: cancer metastasis. In: DE VITA, V. T., HELLMAN, S., ROSENBERG, S. A (Ed.). *Cancer: principles and practice of oncology*. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1985. p.98.

LIOTTA, L. A., WEWER, U. M., RAO, C. N., SCHIFFMANN, E., STRACKE, M., GUIGUIS, R., THORGEIRSSON, U., NUSCHEL, R., SOBEL, M. Biochemical mechanisms of tumor invasion and metastasis. *Adv. Pigm. Cell. Res.*, v. 3, p. 3, 1988.

LLOYD, K. O. Humoral immune responses to tumor-associated carbohydrate antigens. *Semin. Cancer Biol.*, v. 2, p. 421-425, 1991.

MACCHIARINI, P., FONTANINI, G., HARDING, M. J., SQUARTINI, F., ANGELETTI, C. A. Relation of neovascularization to metastasis of non-small cell lung cancer. *Lancet*, v. 340, p. 145-146, 1992.

MACDONALD, N. J., STEEG, P. S. Molecular basis of tumor metastasis. *Cancer Surv.*, v. 16, p. 175-199, 1983.

MANTOVANI, A., BOTTAZZI, B., COLOTTA, F., SOZZANI, S., RUCCO, L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol. Today*, v. 13, p. 265-270, 1992.

MANTOVANI, A., VECCHIO, A., SPEAFICO, F. Immunosuppressive agents. In: DALE, M., FOREMAN, J. C., FAN, T. D. *Textbook of immunopharmacology*. 3th. ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1994. cap. 30, p. 330-334.

MARINO, I. R., DOYLE, H. R. Conventional immunosuppressive drugs. In: THOMSON A. W., STARZL, T. E. *Immunosuppressive drugs: developments in anti-rejection therapy*. London: Edward Arnold, 1994. cap. 1, p. 1-14.

MARLIN, S. D., SPRINGER, T. A. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell*, v. 51, p. 813-819, 1987.

MARTELIUS, T., LAUTENSCHLAGER, I., MÄKISALO, H., HÖCKERSTEDT, K. Mycophenolate mofetil monotherapy significantly decreases the immune response of acute rejection in rat liver allografts. *Transplant. Proc.*, v. 29, p. 3153-3154, 1997.

MARX, J. How do Glucocorticoids Suppress Immunity. *Science*, v. 270, p. 232-233, 1995.

MCCORMIC, B. A., ZETTER, B. R. Adhesive interactions in angiogenesis and metastasis. *Pharmacol. Ther.*, v. 53, p. 239-260, 1992.

MENGER, M. D., VOLLMAR, B. Adhesion molecules as determinants of disease: from molecular biology to surgical research. *Br. J. Surg.*, v. 83, p. 558-601, 1996.

MÜLLER, V., HAMAR, P., SZABO, A., KNUST, E., VOGELSAND, M., HEEMANN, U. Effect of mycophenolate mofetil on the in vivo infiltration of lymphocytes in the rat remnant kidney. *Transplant. Proc.*, v. 30, p. 982, 1998.

NAKAMOTO, T., IGAWA, M., MITANI, S., UEDA, M., USUI, A., USUI, T. Metastatic renal cell carcinoma arising in a native kidney of a renal transplant recipient. *J. Urol.*, v. 152, p. 943-945, 1994.

NICOLSON, G. L. Cell surface molecules and tumor metastasis: regulation of metastatic phenotypic diversity. *Exp. Cell Res.*, v. 150, p. 3-22, 1984.

NORONHA, I. L., ILIVEIRA, A. N., ARAÚJO, M. R., ABENSUR, H.,

QUINTAES, P. S. L., GENZINI, T., PEROSA, M., CAMPAGNARI, J. C., MARCONDES, M., ROMÃO Jr. J. E. Micofenolato mofetil (MMF) em transplante de órgãos. *J. Bras. Nefrol.*, v. 14, n. 4, p. 398-406, 1997.

NUNES, D. C. S., FAVALI, C. B. F., SOUZA FILHO, A., A., S., SILVA, A. C. M., FILGUEIRAS, T. M., LIMA, M. G. S. Evaluation of cellular profile and main constituents of the rat and mouse blood from the animal house of the Federal University of Ceará, Brazil. *Rev. Med. UFC*, v. 34, p. 13-16, 1994.

O' BRIEN, J. E., STOUT, A. P. Malignant fibrous xanthomas. *Cancer*, v. 17, p. 1445-1455, 1964.

OETTGEN, H. F., OLD, L. J. Tumor Necrosis Factor. In: DE VITA, V. T., HELLMAN, S., ROSENBERG, S. A. *Important Advances in Oncology*. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1987. p. 105-130.

OHSUGI, Y., SUZUKI, S., TAKAGAKI, Y. Antitumor and immunosuppressive effects of mycophenolic acid derivates. *Cancer Res.*, v. 36, p. 2923-2927, 1976.

OLIVER, R. T. D., NOURI, A. M. E. T cell immune response to cancer in humans and its relevance for immunodiagnosis and therapy. *Cancer Surv.*, v. 13, p. 173-204, 1992.

OROSZ, P., ECHTENACHER, B., FALK, W., RÜSCOFF, J., DOROTHEA, W., MÄNNEL, D. N. Enhancement of experimental metastasis by tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.*, v. 177, p. 1391-1398, 1993.

OSBORN, L., HESSION, C., TIZARD, R., VASSALO, C., LUHOWSKYI, S., CHI-ROSSO, G., LOBB, R. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell*, v. 59, p. 1203, 1989.

OZELLO, L., STOUT, A. P., MURRAY, M. R. Cultural characteristics of malignant histiocytomas and fibrous xanthomas. *Cancer*, v. 16, p. 331-344, 1963.

PALACIOS, R. Mechanisms of T cell activation: role and functional relationship of HLA-DR antigens and interleukins. *Immunol Rev.*, v. 63, p. 73-110, 1982.

PALACIOS, R., MÖLLER, G. Cyclosporin A blocks receptors for HLA-DR antigens on T cells. *Nature*, v. 290, p. 792-794, 1981.

PAGET, S., BUCK, C. A. Adhesion mechanisms controlling cell-cell and cell-matrix interactions during the metastatic process. In: MENDELSON A C., HOWLEY, A., ISRAEL, S. J., LIOTTA, L. *The molecular basis of cancer*. Philadelphia: W. B. Saunders, 1995. cap. 9, p. 172-205.

PAULSON, J. C. Carbohydrate ligands of leukocyte adhesion molecules and their therapeutic potential. *Prog. Brain Res.*, v. 101, p. 179-184, 1994.

PENN, I. Some contributions of transplantation to our knowledge of cancer. *Transplant. Proc.*, v. 12, p. 676-680, 1980.

_____. Cancers following cyclosporin therapy. *Transplantation*, v. 43, n. 1, p. 32-35, 1987.

_____. Immunosuppression and neoplasia. *Transplant. Proc.*, v. 20, n. 1, p. 276-279, 1988.

PENN, I., BRUNSON, M. E. Cancers after Cyclosporine therapy. *Transplant. Proc.*, v. 20, n. 3, p. 885-892, 1988.

PENN, I., HAMMOND, W., BRETTSCHEIDER, L., STARZL, T. E. Malignant lymphomas in transplantation patients. *Transplant. Proc.*, v. 1, p. 106-112, 1969.

PENN, I., STARZL, T. R. A summary of the status of the novo cancer in transplant recipients. *Transplant. Proc.*, v. 4, p. 719, 1993.

PETCHER, T. J., WEBER, H. P., RUEGGER, A. Crystal and molecular structure of an iodo-derivate of the cyclic undecapeptide cyclosporin A. *Helv. Chim. Acta*, v. 59, n. 5, p. 1480-1489, 1976.

PLACEBO-controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporin. European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. *Lancet*, v. 345, n. 8961, p. 1321-1325, 1995.

PINHEIRO, H. M. *Efeitos da Nifedipina e do PCA 4248, em Antagonista do Fator Ativador de Plaquetas, na Nefrotoxicidade Induzida pela Ciclosporina*. Fortaleza, 1995. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará.

PORTE, P. R. L. *Caracterização de uma linhagem celular originada de um fibro-histiocitoma maligno de rato (TEGS-2047)*. Fortaleza, 1996. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará.

POSTE, G., FIDLER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature*, v. 283, p. 139-146, 1980.

PRADHAN, S. N., CHUNG, E. B., GOSH, B., PAUL, B. D., KAPADIA, G. J. Potential carcinogens: I. Carcinogenicity of some plant extracts and their tannin-containing fractions in rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 52, p. 1579-1582, 1974.

PRHEN, R. T. Cancer and immune response. *Proc. Inst. Med. Chicago*, v. 29, p. 339-345, 1973.

PRHEN, R. T. Immunostimulation of the lympho-dependent phase of neoplastic growth. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 59, p. 1043-1049, 1977.

PRHEN, R. T., MAIN, J. M. Immunity to methylcolanthrene-induced sarcomas. *J. Natl. Cancer Instit.*, v. 18, p. 769-778, 1957.

RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M. *Pharmacology*. 3th. ed. London: Churchill Livingstone, 1995a. cap. 21: The endocrine system, p. 417-453.

_____. *Pharmacology*. 3th. ed. London: Churchill Livingstone, 1995b. cap. 12: Anti-inflammatory immunosuppressant drugs, p. 246-266.

RESTIFO, N. P., WANG, M. Antigen processing and presentation. In: BROWNING, M. J.; DALGLEISH, A. G. *Tumor immunology: immunotherapy and cancer vaccines*. New York: Cambridge University, 1996. cap. 3, p. 39-68.

RIBEIRO, R. A. *Fibro-histiocitoma maligno transplantável em ratos wistar: caracterização (histopatológico, ultraestrutura, citoquímica enzimática e imunohistoquímica), estudo cinético e aspectos farmacológicos*. Fortaleza, 1987. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará.

ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. *Imunologia*. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992a. cap.24: Transplante e rejeição, p. 24.1-24.10.

_____. *Imunologia*. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992 b. cap.18: Imunologia tumoral, p. 18.1-18.17.

_____. *Imunologia*. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992c. cap.8: Cooperação celular na resposta imune, p. 8.1-8.12.

ROMANIUK, A., PROP, J., PETERSEN, A. H., NIEUWENHUIS, P., WILDEVUUR, C. H. R. H. Class II antigen expression on bronchial epithelium in rat lung allografts is prevented by cyclosporine treatment. *Transplant. Proc.*, v. 19, p. 218-220, 1987.

ROSENBERG, S. A. Immunotherapy and gene therapy of cancer. *Cancer Res.*, v. 51, p. 5074s-5079s, 1991.

RUEGGER, A., KUHN, M., LICHTI, H. Cyclosporin A, a peptide metabolite from *Trichoderma polysporum* Rifai, with a remarkable immunosuppressive activity. *Helv. Chim. Acta*, v. 59, n. 4, p. 1075-1092, 1976.

RYFFEL, B. Pharmacology of cyclosporin. VI. Cellular activation: Regulation of intracellular events by cyclosporine. *Pharmacol. Rev.*, v. 41, p. 407, 1989.

_____. The carcinogenicity of ciclosporin. *Toxicology*, v. 73, p. 1-22, 1992.

SCHEINMAN, R. I., COGSWELL, P. C., LOQUIST, A. K., BALDWING, A. S. Jr. Role of Transcriptional Activation of I_kB in Mediation of Immunosuppression by Glucocorticoids. *Science*, v. 270, p. 283-286, 1995.

SCHIMMER, B. P., PARKER, K. L. Adrenocorticotrophic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogs; inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones. In: HARDMAN, J. G., LIMBIRD, L. E., MOLINOFF, P. B., RUDDON, R. W., GILMAN, A. G. (Eds.) *Goodman & Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics*. 9th. ed. New York: McGraw-Hill, 1996. cap. 59, p. 1459-1485.

SILBERMAN, M. H., BOERSMA, A. W. M., JANSSEN, A. L. W., SCHEPER, R. J., HERWEIJER, H., NOOTER, K. Effects of cyclosporin A and verapamil on the intercellular daunorubicin accumulation in Chinese hamster

ovary cells with increasing levels of drug-resistance. *Int. J. Cancer*, v. 44, p. 722-726, 1989.

SOLLINGER, H. W., DEIERTHOI, M. H., BELZER, F. O., DIETHELM, A. G., KAUFFMAN, R. S. RS-61443 - a phase I clinical trial and pilot rescue study. *Transplantation*, v. 53, p. 428-432, 1992.

SOULE, E. H., HENRIQUEZ, P. Atypical fibrous histiocytoma, malignant fibrous histiocytoma, malignant histiocytoma and epithelioid sarcoma: A comparative study of 65 tumors. *Cancer*, v. 30, p. 128-143, 1972.

SOUZA, G. E. P., CUNHA, F. Q., MELLO, R., FERREIRA, S. H. Neutrophil migration induced by inflammatory Stimuli is Reduced by Macrophage Depletion. *Agents Actions*, v. 24, n. 3/4, p. 377-380, 1988.

SPRINGER, T. A. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, v. 346, p. 425-434, 1990.

_____. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, v. 76, p. 301-314, 1994.

STEEL, G. G. *Growth kinetics of tumors – cell population kinetics in relation to the growth and treatment of cancer*. Oxford: Clarendon, 1977. p. 5-55.

STRACKE, M. L., LIOTTA, L. A. Molecular mechanisms of tumor cell metastasis. In: MENDELSON A C., HOWLEY, A., ISRAEL, S. J., LIOTTA L. *The molecular basis of cancer*. Philadelphia: W. B. Saunders 1995. cap. 11, p. 233-247.

SUGARBAKER, E. V. Patterns of metastasis in human malignancies. *Cancer Biol. Rev.*, v. 2, p. 235-303, 1981.

SUZUKI, S., KIMURA, T., ANDO, K., SAWADA, M., TAMURA, G. Antitumor activity of micophenolic acid. *J. Antibiot.*, v. 22, n. 7, p. 297-302, 1969.

SWEENWY, S., GERZON, K., HARRIS, P. N., HOLMES, R. E., POORE, G. A., WILLIAMS, R. H. Experimental antitumor activity and preclinical

toxicology of mycophenolic acid. *Cancer Res.*, v. 32, p. 1795-1802, 1972.

TAKEICHI, M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*, v. 252, p. 1451-1455, 1991.

TAXY, J. B., BATTIFORA, H. Malignant fibrous histiocytoma. An electron microscopic study. *Cancer*, v. 40, p. 254-267, 1977.

THOMSON, A. W., WHITING, P. H., BLAIR, J. T., DAVIDSON, R. J. L., SIMPSON, J. G. Pathological changes developing in the rat during a 3-week course of high dosage cyclosporin A and their reversal following drug withdrawal. *Transplantation*, v. 32, p. 271-277, 1981.

THOMSON, A. W., WHITING, P. H., SIMPSON, J. G. Cyclosporine: Immunology, toxicity and pharmacology in experimental animals. *Agents Actions*, v. 15, n. 3/4, p. 306-327, 1984.

TODARO, G. J., FRYLING, C., DELARCO, J. E. Transforming growth factor produced by certain human tumor cells: polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 77, p. 5258-5262, 1980.

TRESSLER, R. J., GARVIN, L. J., SLATE, D. L. Anti-tumor activity of Mycophenolate Mofetil against human and mouse tumors *in vivo*. *Int. J. Cancer*, v. 57, p. 568-573, 1994.

TROMPIERI, N. M. *Um estudo morfo-farmacológico do tumor TEGS-2047, sob o efeito de substâncias antiinflamatórias não esteróides*. Fortaleza, 1984. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina.

VAN BUREN, C. T., KERMAN, R., AGOSTINO, G., PAYNE, H., FLECHNER, S., KAHAN, B. D. *Surgery*, v. 92, no. 2, p. 167-174, 1982.

VAN DE VRIE, W., MARQUET, R. L., EGGERMONT, A. M. M. Cyclosporin A enhances locoregional metastasis of the CC531 rat colon tumor. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, v. 123, p. 21-24, 1997.

VAN DER ELST, J., DE GREVE, J., GEERTS, F., DE NEVE, W., STORM, G., WILLEMS, G. Quantitative study of liver metastases from colon cancer in

rats after treatment with cyclosporine A. *J. Nat. Cancer Instit.*, v. 77, n. 1, p. 227-232, 1986.

VAN GELDER, T., KLAASSEN, R. J. L., VAN RIEMSDIJ-VAN OVERBEEKE, I., IJZERMANS, J. N. M., WIEMAR, W. Mycophenolate

mofetil and prednisone as maintenance treatment after kidney transplantation. *Transplantation*, v.63, n. 10, p. 1530-1531, 1997.

VANRENTERGHEM, Y. The use of Mycophenolate mofetil (CellCept) in renal transplantation. *Nephron*, v. 76, p. 392-399, 1997.

VENEGAS, L. F., FLECK, J. A biologia das metástases. In: FLECK, J. *Câncer: Integração clínico-biológica*. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. cap. 5, p. 51-68.

VERA-SEMPERE, F., LLOMBART-BOSCH, A. Malignant fibrohistiocytoma (MFH) of the breast: Primary and postirradiation variants - An ultrastructural study. *Pathol. Res. Pract.*, v. 178, p. 289-296, 1984.

VILLARDEL, O. J., OPPENHEIMER, F., TALBOT-WRIGHT, R., RICART, M. J., ANDREU, J., ALCARUZ, A., CARRETERO, R. Increased risk of malignant tumors in renal transplant recipients receiving cyclosporine. *Transplant. Proc.*, v. 24, p. 1948, 1992.

VILLE, R., CHING, H., DORUDI, S. The Immunosurveillance of cancer: specific and nonspecific mechanisms. In: DALGLEISH, A. G., BROWNING, M. *Tumor immunology: Immunotherapy and cancer vaccines*. New York: Cambridge University, 1996. cap. 4, p. 7-38.

WASSEF, R., COHEN, Z., LANGER, B. Pharmacokinetic profiles of cyclosporine in rats. *Transplantation*, v. 40, n. 5, p. 489-493, 1985.

WEISS. L. A pathobiologic overview of metastasis. *Semin. Oncol.*, v. 4, p. 5-17, 1977.

WEISS, S. W., ENZINGER, F. M. Malignant fibrous histiocytoma: an analysis of 220 cases. *Cancer*, v. 41, p. 2250-2266, 1978.

WENGER, R. M., PAYNE, T. Cyclosporine: intrinsic binding energies to

interpret structure-activity relationships. *Prog. Clin. Biol. Res.*, v. 29, p. 301-305, 1989.

WHITE, D. J. G. Cyclosporin A: Clinical Pharmacology and Therapeutic Potential. *Drugs*, v. 24, p. 322-334, 1982.

WIESINGER, D., BOREL, J. F. Studies on the mechanisms of action of cyclosporin A. *Immunology*, v. 156, p. 454-463, 1980.

ZANKER, B., SCHNEEBERGER, H., ROTHENPIELER, U., HILLEBRAND, G., ILLNER, W.D., THEODORAKIS, I., STANGL., M., LAND, D. Mycophenolate mofetil-based, cyclosporine-free induction and maintenance immunosuppression. *Transplantation*, v.66, n. 1, p. 44-49, 1998.

ZETTER, B. R. The cellular basis of site-specific tumor metastasis. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. *New Engl., J. Med.*, v. 322, p. 605-612, 1990.

ZWANENBURG, T. S. B, SUTER, W., MATTER, B. E. Abscence of genotoxic potential for cyclosporine in experimental systems. *Transplant. Proc.*, v. 20, p. 435, 1998.