

C 703885  
R 1437755  
03/01/02  
R#4,95

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

**ESTABELECIMENTO E VALIDAÇÃO DO MODELO DE**  
**TUMOR DE PULMÃO EM RATO COM O**  
**CARCINOSSARCOMA DE WALKER – AVALIAÇÃO DO**  
**EFEITO ANTITUMORAL DA TALIDOMIDA**

**ANTERO GOMES NETO**

**FORTALEZA – CE**

**2001**

Dec  
616.99424  
9 612e  
2001  
ex. 2

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

# **UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

## **Faculdade de Medicina**

Departamento de Fisiologia e Farmacologia

Estabelecimento e Validação do Modelo de Tumor de Pulmão em Rato com o Carcinossarcoma de Walker – Avaliação do Efeito Antitumoral da Talidomida

Antero Gomes Neto

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

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

Co-Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho

**Fortaleza  
2001**



UFC	BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA
Nº. 1437755	
03	01 12002

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Faculdade de Medicina da  
Universidade Federal do Ceará

G612e Gomes Neto, Antero

Estabelecimento e validação do modelo de tumor de pulmão em rato com o carcinossarcoma de Walker – Avaliação do efeito antitumoral da talidomida/Antero Gomes Neto. – Fortaleza 2001.

99 f. Ilus.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro.

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará. Curso de Pós-Graduação em Farmacologia.

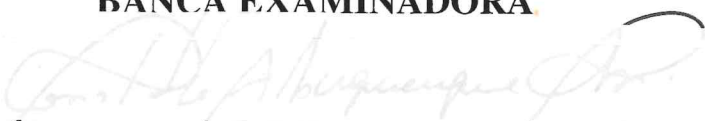
1. Neoplasias Pulmonares. 2. Modelo Experimental. 3. Talidomida. I. Título 616.99424


**ESTABELECIMENTO E VALIDAÇÃO DO MODELO DE TUMOR DE  
PULMÃO EM RATO COM O CARCINOSSARCOMA DE WALKER –  
AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTITUMORAL DA TALIDOMIDA**

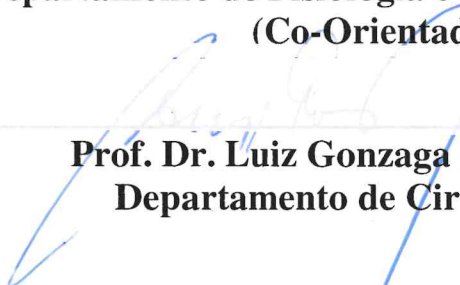
  
\_\_\_\_\_  
**Antero Gomes Neto**

**Dissertação Aprovada com Louvor em: 17/08/2001**

**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro**  
**Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFC**  
**(Orientador)**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho**  
**Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFC**  
**(Co-Orientador)**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Luiz Gonzaga Porto Pinheiro**  
**Departamento de Cirurgia - UFC**

**Trabalho realizado no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do  
Câncer (LAFICA) e Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) do  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do  
Ceará – UFC-**

A minha esposa, Vivianne, que esteve sempre do meu lado, não só como mulher, mas também na qualidade de médica e mestra em farmacologia, participando de todas as etapas do mestrado, trocando idéias, dando sugestões e, enfim, incentivando-me com grande dose de otimismo a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Maria Gomes e Raimundo Camelo,  
que tiveram a sabedoria de apontar o caminho que eu  
deveria trilhar na vida.

Aos meus filhos, Larissa e Leonardo, que me dão  
carinho, alegria e inspiração, e são a razão do meu viver.

“A ciência e a arte vêm aos homens por intermédio da experiência.”

Aristóteles.

“E eu sempre tive um imenso desejo de aprender a distinguir o verdadeiro do falso, para ver claro nas minhas ações e caminhar com segurança nesta vida.”

Descartes.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, que acreditou e nos incentivou na realização desse trabalho, e com quem pude contar em todos os momentos da minha pesquisa.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Manoel Odorico Moraes que nos estimulou a enveredar na pesquisa do câncer, o que acabou culminando com o desenvolvimento do modelo de tumor de pulmão em ratos no nosso trabalho.

Ao Prof. Dr. Francisco Valdeci Ferreira do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UFC e Chefe do Laboratório de Patologia do Hospital do Câncer do Ceará, pela análise minuciosa dos exames histopatológicos deste trabalho, o meu especial agradecimento.

À Direção do Hospital Geral Dr. César Cals (HGCC) por permitir a realização das tomografias para execução desse trabalho.

Ao Dr. Marcílio Dias de Holanda Neto pelo seu voluntarismo, esmero e profissionalismo, sem medir esforços, sacrificou parte do seu precioso tempo, na realização das tomografias de tórax dos nossos animais, sem as quais, o nosso trabalho não teria sido realizado.

Aos alunos do Curso de Medicina, Bruno Machado Furtado, Silvana Araújo de Aguiar e, especialmente, ao Breno Bezerra Gomes de Pinho Pessoa que participaram ativamente, com muita habilidade cirúrgica, responsabilidade e espírito científico, na realização desse trabalho.

Ao Prof. e amigo, Armênio Aguiar do Santos pelo seu apoio e disponibilidade em ajudar no desenvolvimento desse trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, que acreditou e nos incentivou na realização desse trabalho, e com quem pude contar em todos os momentos da minha pesquisa.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Manoel Odorico Moraes que nos estimulou a enveredar na pesquisa do câncer, o que acabou culminando com o desenvolvimento do modelo de tumor de pulmão em ratos no nosso trabalho.

Ao Prof. Dr. Francisco Valdeci Ferreira do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UFC e Chefe do Laboratório de Patologia do Hospital do Câncer do Ceará, pela análise minuciosa dos exames histopatológicos deste trabalho, o meu especial agradecimento.

À Direção do Hospital Geral Dr. César Cals (HGCC) por permitir a realização das tomografias para execução desse trabalho.

Ao Dr. Marcílio Dias de Holanda Neto pelo seu voluntarismo, esmero e profissionalismo, sem medir esforços, sacrificou parte do seu precioso tempo, na realização das tomografias de tórax dos nossos animais, sem as quais, o nosso trabalho não teria sido realizado.

Aos alunos do Curso de Medicina, Bruno Machado Furtado, Silvana Araújo de Aguiar e, especialmente, ao Breno Bezerra Gomes de Pinho Pessoa que participaram ativamente, com muita habilidade cirúrgica, responsabilidade e espírito científico, na realização desse trabalho.

Ao Prof. e amigo, Armênio Aguiar do Santos pelo seu apoio e disponibilidade em ajudar no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Francisco Ruy Capaz por colocar a minha disposição equipamentos do seu laboratório

Ao colega e amigo, Prof. José Mauro Mendes Gifoni pelo apoio, incentivo e revisão final do texto dessa dissertação.

Ao Dr. Paulo Ferdinando de Melo Oliveira, pelo seu apoio e dicas sobre o manuseio cirúrgico de pequenos animais, na fase inicial dos experimentos.

Às secretárias, Silvia Maria Azevedo Lima e Aura Rhanes Farias Nogueira Yida que foram sempre solícitas, atendendo-nos com presteza quando eram solicitadas a fazê-lo.

À funcionária, Maria Silvandira Freire de França pela sua colaboração nos trabalhos do laboratório.

À bibliotecária Norma Carvalho Linhares pela revisão das referências bibliográficas.

Aos colegas do mestrado pelo espírito de luta e companheirismo.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho, os nossos sinceros agradecimentos.



## ESTABELECIMENTO E VALIDAÇÃO DO MODELO DE TUMOR DE PULMÃO EM RATO COM O CARCINOSSARCOMA DE WALKER – AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTITUMORAL DA TALIDOMIDA – Antero Gomes Neto. Orientador:

Ronaldo de Albuquerque Ribeiro. Co-Orientador: Manoel Odorico de Moraes Filho. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Data da Defesa: 17/08/2001.

**Introdução:** O câncer de pulmão é o tumor maligno de maior taxa de mortalidade no homem. Avanços terapêuticos têm sido lentos, em parte, pela escassez de modelos experimentais de tumor de pulmão que permitam estudar o comportamento biológico e o efeito antitumoral de novas drogas com ação citotóxica, imunomoduladora e antiangiogênica. **Objetivo:** Desenvolver um modelo de tumor pulmonar em ratos com o carcinossarcoma de Walker, usar um método de imagem (tomografia) para monitorar o crescimento tumoral e avaliar a ação antitumoral da talidomida. **Métodos:** Noventa e cinco ratos Wistar fêmeas, com peso médio de  $210 \pm 53$ g foram distribuídos aleatoriamente em duas fases experimentais. A fase 1 ( $n=11$ ), foi feita para desenvolver a técnica cirúrgica do implante tumoral. Os animais foram anestesiados com pentobarbital, 40 mg/kg, por via intraperitoneal, traqueostomizados, intubados e submetidos a uma toracotomia esquerda para injeção direta no parênquima pulmonar do veículo tumoral. A fase 2 ( $n=84$ ), foi dividida em três etapas: a etapa 1 ( $n=13$ ), para estabelecimento do número de células necessárias para um bom índice de pega tumoral ( $2 \times 10^5$  células do tumor de Walker); a etapa 2 ( $n=24$ ), para estabelecimento da velocidade de crescimento tumoral (grupo I,  $n=8$ ) e sobrevida dos animais (grupo II,  $n=16$ ). Os animais do grupo I foram submetidos a tomografia (TC) de tórax e a necrópsia no sexto dia de implante para se verificar o tamanho e a histologia do tumor. A medida de volume dos tumores em  $\text{cm}^3$  ( $D \times d^2/2$ ) obtida pelos dois métodos (TC e necropsia) foi comparada. Os animais do grupo II foram seguidos até a morte, com pesagem diária; e a etapa 3 ( $n=47$ ), para se avaliar o efeito antitumoral da talidomida no modelo estabelecido. Os animais desta etapa foram distribuídos em quatro grupos: I ( $n=7$ ), controle; II ( $n=17$ ), Talidomida (TLD) 45mg/kg/d/sc; III ( $n=9$ ), TLD 180mg/kg/d/sc; IV ( $n=14$ ), TLD 45mg/kg/d/sc. Os grupos I, II e III foram submetidos a TC e necrópsia no sexto dia, para medir volume tumoral e no IV foi analisada a curva de peso e a sobrevida. **Resultados:** O índice geral de pega do tumor foi de 92,8% (64/69), sendo 81,8% na etapa 1, 100% na etapa 2 e 92,1% na etapa três. A mortalidade cirúrgica foi de 14,3% (12/84) e 3 animais foram excluídos do estudo. As medidas do tumor feitas na TC e comparadas com a necrópsia foram semelhantes ( $r=0,946$ ,  $p<0,0001$ ). A sobrevida mediana dos animais da etapa 2 foi de 10 dias. Na etapa 3, verificou-se que TLD-45 e TLD-180 reduziram de maneira significativa em 76,6% e 77,5% respectivamente o volume tumoral ( $p < 0,05$ ), comparado com o controle. Não houve diferença significativa no tamanho do tumor entre TLD-45 e TLD-180. Verificou-se inibição da caquexia e aumento da sobrevida dos animais tratados com TLD-45 (12d, teste de *Log Rank*:  $p=0,015$ ), em relação ao controle (10d). **Conclusão:** O alto índice de pega e a boa correlação dos dados da tomografia com os da necropsia permite neste modelo, o monitoramento de crescimento tumoral pela TC e, portanto, a avaliação da ação de drogas antitumorais *in vivo* sem a necessidade do sacrifício dos animais. A inibição da caquexia e do crescimento tumoral, não dose dependente, e o aumento da sobrevida dos animais tratados com TLD sugerem um efeito anticaquético e antitumoral desta droga, provavelmente por uma ação imunomoduladora e antiinflamatória local e sistêmica, por bloquear a expressão de fatores de crescimento tumoral ou inibir a síntese de citocinas pró-inflamatórias, ou ainda, por mecanismos desconhecidos.

**ABSTRACT: ESTABLISHMENT AND VALIDATION OF A MODEL OF LUNG TUMOR IN RATS WITH WALKER'S CARCINOSARCOMA – EVALUATION OF THE ANTITUMORAL EFFECT OF THALIDOMIDE.**

Antero Gomes Neto. Orientador: Ronaldo de Albuquerque Ribeiro. Co-Orientador: Manoel Odorico de Moraes Filho. Dissertation submitted as a partial requirement to Master's Degree in Pharmacology to the Postgraduation Pharmacology Course of the Physiology and Pharmacology Department of the Medicine Faculty of Federal University of Ceará. Defense Data: 17/08/2001.

**Introduction:** Though lung cancer is the most deadly malignancy in man today, therapeutic improvements have been long in coming, partly because of the lack of experimental lung cancer models for the study of the biological behavior and antitumoral effect of new drugs with cytotoxic, immunomodulatory and antiangiogenic action. **Objective:** To develop a rat lung tumor model with Walker's carcinosarcoma, use computerized tomography imaging for the monitoring of tumor growth, and evaluate the antitumoral action of thalidomide.

**Methods:** Ninety-five female Wistar rats, with an average weight of  $210 \pm 53$ g, were randomly assigned to two experimental phases: phase 1 (n=11) aimed at developing a surgical tumor implantation technique. The animals were anaesthetized intraperitoneally with 40 mg/kg of pentobarbital, then tracheostomized, intubated and submitted to a left-sided thoracotomy for direct injection of the tumoral vehicle into the lung parenchyma. Phase 2 (n=84) consisted of three steps: step 1 (n=13) established the number of cells required for a high tumor take rate ( $2 \times 10^5$  cells of Walker's tumor). Step 2 (n=24) established the tumor growth rate (group I, n=8) and the survival rate (group II, n=16). The animals in group I were submitted to thoracic CT scan and necropsy on the 6<sup>th</sup> day of implantation in order to verify tumor size and histology. Tumor volumes in  $\text{cm}^3$  ( $D \times d^2/2$ ) obtained with the two methods (necropsy and CT scan) were compared. The animals in group II were weighed daily and followed until death. Step 3 (n=47) evaluated the antitumoral effect of thalidomide (TLD) in the established model. The animals in this step were assigned to four groups: I (n=7), control; II (n=17), 45 mg/kg/d/sc of TLD; III (n=9), 180 mg/kg/d/sc of TLD; and IV (n=14), 45 mg/kg/d/sc of TLD. The rats in groups I, II and III were submitted to CT scan and necropsy on the 6<sup>th</sup> day for evaluation of tumor size; in group IV the weight curves and survival rates of the animals were analyzed. **Results:** The average tumor take rate was 92.8% (64/69), that is, 81.8% in step 1, 100% in step 2, and 92.1% in step 3. Surgical mortality was 14.3% (12/84); three animals were excluded from the study. The tumor sizes obtained through CT scan and through necropsy were similar ( $r=0.946$ ;  $p<0.0001$ ). The average survival rate of the rats in step 2 was 10 days. In step 3, TLD-45 and TLD-180 significantly reduced tumor volumes by 76.6% and 77.5%, respectively, as compared to the controls ( $p<0.05$ ). No significant difference in tumor reduction was observed between TLD-45 and TLD-180. Cachexia was inhibited and survival increased among the animals treated with TLD-45 (12d, Log Rank test:  $p=0.015$ ) as compared to controls (10d). **Conclusion:** The high tumor take rate and positive correlation between data from CT scans and necropsy makes it possible to monitor tumoral growth by CT imaging and thus evaluate the action of antitumoral drugs *in vivo* without sacrificing the animals. The inhibition of cachexia and tumoral growth in the animals treated with TLD suggests an anticachectic and antitumoral effect in this drug, probably through local and systemic antiinflammatory and immunomodulatory action by blocking the expression of tumor growth factors or inhibiting the synthesis of proinflammatory cytokines, or possibly through some other as yet unidentified mechanism.

## ÍNDICE

## PÁGINA

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 Relevância do Trabalho .....	2
1.2 Modelos Experimentais de Tumor de Pulmão .....	4
1.3 Carcinogênese.....	6
1.3.1 Iniciação .....	6
1.3.2 Promoção .....	7
1.3.3 Progressão.....	8
1.3.4 Divisão Celular.....	9
1.3.5 Crescimento Tumoral .....	11
1.4 Angiogênese .....	13
1.4.1 Substâncias estimuladoras da Angiogênese .....	18
1.4.2 Substâncias Inibidoras da Angiogênese .....	21
1.4.2.1 Talidomida.....	23
1.4.3 Princípios da terapia antiangiogênica.....	27
1.5 Objetivos.....	29
1.5.1 Objetivos específicos.....	29
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
2.1 Material Cirúrgico .....	31
2.2 Drogas e Reagentes... ..	31
2.3 Vidraria.....	32
2.4 Equipamento.....	32
2.5 Outros Materiais .....	32
2.6 Animais e células neoplásicas .....	33
2.7 Anestesia.....	34
2.8 Técnica do implante tumoral.....	34
2.9 Fases Experimentais.. ..	36

2.10 Fase 1. Desenvolvimento da técnica cirúrgica do implante tumoral ..... 36

2.11 Fase 2. Implante de células do tumor de Walker e avaliação dos efeitos da talidomida. .... 37

2.11.1 Etapa 1: Estabelecer o número de células do implante tumoral ..... 37

2.11.2 Etapa 2. Estabelecimento da velocidade de crescimento tumoral e sobrevida dos animais..... 38

2.11.3 Etapa 3. Avaliação da ação antitumoral da talidomida, no modelo estabelecido ..... 40

2.12 Análise Estatística ..... 41

**3. RESULTADOS ..... 42**

3.1 Fase 1. Desenvolvimento da técnica cirúrgica do implante tumoral ..... 43

3.2 Fase 2. Implante de células do tumor de Walker e avaliação dos efeitos da talidomida..... 45

3.2.1 Etapa 1. Número de células versus índice de pega tumoral..... 45

3.2.2 Etapa 2. Crescimento tumoral e sobrevida dos animais..... 49

3.2.3 Etapa 3. Avaliação da ação antitumoral da talidomida, no modelo estabelecido ..... 52

3.3 Avaliação da eficácia da tomografia computadorizada no modelo de tumor de pulmão em rato..... 60

3.4. Mortalidade cirúrgica e índice geral de pega tumoral..... 63

**4 DISCUSSÃO ..... 66**

4.1 Estabelecimento de modelo experimental de tumor de pulmão com o carcinosarcoma de Walker..... 67

4.2 Avaliação do efeito antitumoral da talidomida no modelo de tumor de pulmão ..... 72

**5 CONCLUSÕES..... 83**

**6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.. 84**

**7 PUBLICAÇÕES E PREMIAÇÕES ..... 98**

## **ABREVIATURAS**

**AINES:** Antiinflamatórios não esteroidais

**5-FU:** 5-Fluorouracil

**bFGF:** Fator de crescimento de fibroblasto básico

**cm:** Centímetro

**COX - 2:** Cicloxigenase - 2

**CPPC:** Câncer de pulmão de pequenas células

**CPNPC:** Câncer de pulmão não pequenas células

**d:** dia

**DP:** Desvio padrão

**EGF:** Fator de crescimento epidérmico

**EP:** Erro padrão

**FDA:** Food and drug administration

**GRP:** Peptídeo liberador da gastrina

**g:** Grama

**HE:** Hematoxilina-eosina

**HGF:** Fator de crescimento de hepatócito

**ICAM:** Molécula de adesão intercelular

**IGF:** Fator de crescimento da insulina

**IL-1:** Interleucina-1

**IL-6:** Interleucina-6

**IL-8:** Interleucina-8

**IL-12:** Interleucina-12

**i.p.:** Intraperitoneal

**IFN:** Interferon

**Kg:** Quilograma

**KV:** Quilovolt

**LPS:** Lipopolissacarídeo

**mA:** Miliampere  
**MEC:** Matriz extracelular  
**mg:** Miligrama  
**mL:** Mililitro  
**mg:** Miligrama  
**mm:** Milímetro  
**MMP:** Metaloproteinase de matriz  
**NEC:** Necrópsia  
**NO:** Óxido nítrico  
**°C:** Grau centígrado ou Célsius  
**PDGF:** Fator de crescimento derivado das plaquetas  
**PGE:** Prostaglandina E  
**PO:** Pós-operatório  
**POI:** Pós-operatório imediato  
**r:** Coeficiente de correlação  
**R<sup>2</sup>:** Coeficiente de determinação  
**Rb:** Retinoblastoma  
**RC:** Resposta completa  
**RP:** Resposta parcial  
**s.c.:** Subcutâneo  
**SF:** *scatter factor*  
**TC:** Tomografia computadorizada  
**TFA:** 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato  
**TGF:** Fator transformador de crescimento  
**TLD:** Talidomida  
**TNF:** Fator de necrose tumoral  
**UFC:** Universidade Federal do Ceará  
**V:** Volume  
**VCAM:** Molécula de adesão de célula vascular

**VEGF:** Fator de crescimento do endotélio vascular

**$\alpha$ :** alfa

**$\beta$ :** beta

**$\mu$ L:** Microlitro

**x:** vezes

## LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
<b>Figura 1:</b> Ciclo celular e suas fases G <sub>0</sub> , G <sub>1</sub> , S, G <sub>2</sub> e M.....	10
<b>Figura 2:</b> Os principais fatores angiogênicos expressos pelas células tumorais e por macrófagos do hospedeiro.....	15
<b>Figura 3:</b> Ativação das células do endotélio vascular pela ligação dos principais fatores angiogênicos a receptores específicos nas células endoteliais.....	16
<b>Figura 4:</b> Formação do broto vascular pela diferenciação, proliferação e migração do endotélio vascular ativado .....	17
<b>Figura 5:</b> A formação de novo vaso pelo predomínio dos fatores estimuladores sobre os inibidores da angiogênese.....	18
<b>Figura 6:</b> Estrutura química da talidomida.....	24
<b>Figura 7:</b> Traquéia canulada com abocath 16G. ....	34
<b>Figura 8:</b> Toracotomia esquerda. As costelas retraídas com um blefarostato e o pulmão exposto.....	35
<b>Figura 9:</b> Injeção da suspensão de células no lobo inferior exposto.....	35
<b>Figura 10:</b> Necrópsia com exposição de todos os órgãos intratorácicos .....	38
<b>Figura 11:</b> Animal anestesiado e na posição prona para fazer tomografia.....	40
<b>Figura 12:</b> Pulmões normais de animais sacrificados no 10º dia da toracotomia .....	44
<b>Figura 13:</b> Secção transversal da traquéia ao nível da traqueostomia vista na necrópsia e no exame histopatológico.....	44
<b>Figura 14:</b> Traquéia infiltranda por tumor .....	46
<b>Figura 15:</b> Tumor no pulmão de animal sacrificado no décimo dia do implante de 2x10 <sup>5</sup> células do tumor de Walker.....	47
<b>Figura 16:</b> Exame histopatológico corado pela hematoxilina-eosina de tumor infiltrando parede brônquica. ....	48



<b>Figura 17:</b> Tomografia de tórax e peça de necropsia do animal 1 no 6º dia de implante tumoral.....	50
<b>Figura 18.</b> Tomografia de tórax e peça de necropsia do animal 2, no 6º dia de implante tumoral.....	50
<b>Figura 19.</b> Curva de peso diário dos animais submetidos ao implante de $2 \times 10^5$ células do tumor de Walker.....	51
<b>Figura 20:</b> Gráfico mostrando a correlação dos dados de tomografia com os de necrópsia dos animais do grupo controle.....	54
<b>Figura 21:</b> Gráfico do volume tumoral dos animais no 6º dia do implante de $2 \times 10^5$ células de tumor de Walker.....	57
<b>Figura 22.</b> Tomografia de tórax e peça de necrópsia de animal no 6º dia de Implante tumoral (Grupo controle). ....	58
<b>Figura 23:</b> Tomografia de tórax e peça de necrópsia de animal no 6º dia de implante tumoral (Grupo TLD-180) .....	58
<b>Figura 24:</b> Curva de sobrevivência dos animais (grupo controle versus grupo TLD-45).....	59
<b>Figura 25:</b> Curva de peso dos animais (grupo controle versus grupo TLD-45).....	60
<b>Figura 26:</b> Comparação dos volumes tumorais pelo teste de regressão simples (TC versus necrópsia).....	61
<b>Figura 27:</b> Tomografia de tórax e peça cirúrgica mostrando tumor de pulmão com infiltração da parede torácica. ....	65

<b>Figura 17:</b> Tomografia de tórax e peça de necropsia do animal 1 no 6º dia de implante tumoral.....	50
<b>Figura 18.</b> Tomografia de tórax e peça de necropsia do animal 2, no 6º dia de implante tumoral.....	50
<b>Figura 19.</b> Curva de peso diário dos animais submetidos ao implante de $2 \times 10^5$ células do tumor de Walker.....	51
<b>Figura 20:</b> Gráfico mostrando a correlação dos dados de tomografia com os de necrópsia dos animais do grupo controle.....	54
<b>Figura 21:</b> Gráfico do volume tumoral dos animais no 6º dia do implante de $2 \times 10^5$ células de tumor de Walker.....	57
<b>Figura 22.</b> Tomografia de tórax e peça de necrópsia de animal no 6º dia de Implante tumoral (Grupo controle). ....	58
<b>Figura 23:</b> Tomografia de tórax e peça de necrópsia de animal no 60 dia de implante tumoral (Grupo TLD-180) .....	58
<b>Figura 24:</b> Curva de sobrevivência dos animais (grupo controle versus grupo TLD-45).....	59
<b>Figura 25:</b> Curva de peso dos animais (grupo controle versus grupo TLD-45).....	60
<b>Figura 26:</b> Comparação dos volumes tumorais pelo teste de regressão simples (TC versus necrópsia).....	61
<b>Figura 27:</b> Tomografia de tórax e peça cirúrgica mostrando tumor de pulmão com infiltração da parede torácica. ....	65

## LISTA DE TABELAS

	PAGINA
<b>Tabela 1:</b> Principais substâncias estimuladoras da angiogênese.....	20
<b>Tabela 2:</b> Principais substâncias inibidoras da angiogênese.....	23
<b>Tabela 3:</b> Valores médios dos diâmetros e volumes tumorais de animais do grupo controle, no dia do sacrifício dos animais (d6).....	53
<b>Tabela 4:</b> Valores médios dos diâmetros e volumes tumorais de animais do grupo II (TLD-45), no dia do sacrifício dos animais (d6) .....	55
<b>Tabela 5:</b> Valores médios dos diâmetros e volumes tumorais de animais do grupo III (TLD-180), no dia do sacrifício dos animais (d6) .....	56
<b>Tabela 6:</b> Diâmetros e volumes tumorais dos três grupos de animais submetidos ao implante de $2 \times 10^5$ células do tumor de Walker. ....	57
<b>Tabela 7:</b> Valores médios dos volumes tumorais de 25 animais submetidos à tomografia e à necrópsia, no 6º dia do implante de $2 \times 10^5$ células do tumor de Walker.....	62
<b>Tabela 8:</b> Mortalidade cirúrgica dos animais submetidos à toracotomia e implante de células do tumor de Walker nas três etapas experimentais.....	63
<b>Tabela 9:</b> Índice geral de pega dos tumores nos animais submetidos à toracotomia e ao implante de células do tumor de Walker.. ....	64

## 1. INTRODUÇÃO

Este trabalho tem como objetivo principal analisar a evolução da literatura brasileira no século XIX, com ênfase na obra de Machado de Assis. O estudo será dividido em três partes principais: a primeira abordará o contexto histórico e literário da época; a segunda, a trajetória de Machado de Assis; e a terceira, uma análise detalhada de sua obra mais relevante. A metodologia utilizada será a análise crítica de textos literários e históricos, buscando estabelecer conexões entre o contexto social e a produção literária. A importância deste estudo reside na compreensão da formação da identidade literária brasileira e no papel central de Machado de Assis nesse processo.

O presente trabalho foi desenvolvido sob a orientação do professor Dr. João Silva, da Universidade Federal de São Paulo. Agradeço a todos os professores e colegas que contribuíram para a realização deste projeto. Agradeço também aos meus pais, João e Maria, pelo apoio e incentivo durante toda a minha trajetória acadêmica. Este trabalho é dedicado a todos aqueles que buscam compreender a riqueza da literatura brasileira e o legado de Machado de Assis.

## 1.1. Relevância do Trabalho

O câncer de pulmão é o tumor maligno mais freqüente na população masculina na maioria dos países do primeiro mundo. Nos Estados Unidos, o câncer de pulmão é responsável por 30% de todas as mortes por câncer, sendo maior que a mortalidade combinada por câncer de mama, próstata, cólon e ovário (Feinstein & Bach, 2000). No Brasil, o câncer de pulmão é também o responsável pela maior taxa de mortalidade no homem, seguida do câncer de próstata, estômago e outros, e ocupa o segundo lugar na mulher, sendo superado somente pelo câncer de mama (Instituto, 2001). O cigarro é o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer de pulmão, mas 10 a 15% dos casos estão relacionados à exposição a fatores carcinógenos ambientais e ocupacionais. Dentre estes, podemos citar alguns compostos industriais como o alumínio, arsênio, asbestos, clorometileter, derivados do cromo e do níquel, berílio, cádmio, sílica, formaldeído, além da exposição a compostos radioativos e poluição ambiental. O carcinoma epidermóide e o de pequenas células são os dois tipos de câncer que praticamente só ocorrem nos fumantes, enquanto o adenocarcinoma pode estar relacionado com os outros fatores de risco. O risco de ter câncer de pulmão é duas vezes maior no homem que na mulher, embora a incidência no sexo feminino venha aumentando em proporção maior, em decorrência do aumento do consumo de cigarro pelas mulheres nas últimas décadas.

O prognóstico do paciente com câncer de pulmão ainda é ruim e a probabilidade de sobrevida em 5 anos depois do diagnóstico é cerca de 15%, apesar das estratégias de tratamento combinado de cirurgia com radioterapia e quimioterapia, além do desenvolvimento de novas drogas antitumorais. A alta mortalidade do câncer de pulmão deve-se principalmente ao fato de 85% dos casos serem diagnosticados numa fase avançada, quando já ocorreu

disseminação sistêmica da doença (Dominioni et al., 2000). Nesta fase, a possibilidade de cura é remota e os tratamentos disponíveis são basicamente paliativos dos sintomas locais e sistêmicos da doença, influenciando pouco no aumento da sobrevida dos pacientes. Mesmo assim, tem havido nos últimos 5 anos um aumento na sobrevida dos pacientes com câncer de pulmão submetidos a novos protocolos de quimioterapia, envolvendo o uso de novas drogas como: paclitaxel, docetaxel, gencitabina, carboplatino e vinorelbina (Bunn & Kelly, 1998).

A implementação de novos métodos para o diagnóstico precoce do câncer de pulmão tem sido a regra, uma vez que a ressecção do tumor nos estágios iniciais oferece uma elevada taxa de cura.

A tomografia helicoidal do tórax e a citologia do escarro com pesquisa de marcadores biológicos de estados pré-cancerosos são as duas técnicas modernas mais empregadas na busca do diagnóstico precoce do câncer de pulmão (Tockman et al., 2000). Estes exames têm sido usados em programas de *screening* para população de alto risco, com o intuito de diagnosticar um percentual maior de casos em uma fase precoce e localizada da doença, em vários centros de oncologia do mundo.

Os pacientes com câncer de pulmão no estágio I geralmente são assintomáticos (5 a 10%) e o diagnóstico é estabelecido de forma acidental por uma radiografia do tórax feita de rotina por causa não relacionada, ou raramente, como *screening* para câncer de pulmão em pacientes de alto risco (fumantes ativos ou ex-fumantes).

O alto índice de ressecabilidade do câncer de pulmão no estágio I, aliado às baixas taxas de complicações e à elevada taxa de cura (53 a 100%) dos

pacientes tratados cirurgicamente, tornam a cirurgia o tratamento de eleição dos pacientes com câncer detectado precocemente neste estágio. Infelizmente, dos 15% de pacientes com câncer de pulmão diagnosticado numa fase de ressecabilidade da doença, o percentual de pacientes operados no estágio I nas grandes séries da literatura é inferior a 60%, variando de 28 a 60% (Dominioni et al., 2000).

Os avanços na busca de novas alternativas terapêuticas para o câncer de pulmão em estágio avançado têm sido lentos, em parte, pela escassez de modelos experimentais de tumor de pulmão que permitam estudar ou acelerar os estudos do comportamento biológico e o efeito antitumoral de novas drogas com ação citotóxica, imunomoduladora e antiangiogênica.

## **1.2. Modelos Experimentais de Tumor de Pulmão**

Na década de 80, foram desenvolvidos modelos de tumor de pulmão em cães (Paladugo et al., 1980) e ratos (Reznik-Schüller & Gregg, 1981) induzidos por carcinógenos, mas estes modelos, não se prestaram para o estudo rotineiro do câncer de pulmão. Os tumores nestes modelos necessitavam de longo tempo de indução para se desenvolverem, eram geralmente multicêntricos e de tipos histológicos variáveis, o que limitava bastante o teste de drogas antitumorais.

McLemore e colaboradores (1987), descreveram um modelo de tumor de pulmão em camundongos atímicos com linhagens de células do carcinoma broncogênico humano. Neste modelo, as células foram implantadas no pulmão (lobo inferior direito) por cateter passado através de punção da traquéia cervical e introduzido pelo brônquio principal direito até o lobo inferior. Foi mostrada uma taxa de mortalidade de 100% dos animais submetidos ao implante

pulmonar de  $10^6$  células, enquanto somente 5% dos animais morreram com o implante da mesma quantidade de células no subcutâneo. Estes resultados corroboraram a teoria de Paget (1889), que diz que o desenvolvimento e a progressão do tumor são dependentes da interação tumor-órgão específico, ou seja, o tumor necessita de solo fértil para o seu crescimento. Portanto, fazem-se necessários estudos usando outras linhagens tumorais, para avaliar o comportamento biológico e o teste de drogas anti-neoplásicas em modelos experimentais de tumor de pulmão.

Wang e colaboradores (1997), descreveram pela primeira vez, um modelo de tumor de pulmão em ratos Fisher com o sarcoma induzido pelo metilcolantreno. O método utilizado para a implantação das células tumorais no parênquima pulmonar foi a punção direta feita através de toracotomia, ou a via endobrônquica com cateter passado por punção traqueal.

Até o presente não há relato na literatura de um modelo de câncer de pulmão usando o tumor 256 de Walker, apesar dele já ter sido inoculado experimentalmente por diferentes vias com índices variáveis de pega. O tumor de Walker é um carcinossarcoma de origem espontânea de glândula mamária de rata (Earle, 1935) e tem comportamento biológico agressivo, sendo localmente invasivo e com alto poder de metastatização por via linfática e hematogênica (Iwama de Matos et al., 1980). Os primeiros trabalhos com o tumor de Walker foram feitos com a inoculação das células deste tumor por via subcutânea, intraperitoneal ou intramuscular (Earle, 1935; Caldarola et al., 1968; Iwama de Matos et al., 1980). Posteriormente, Soares e colaboradores (1993) inocularam células ( $2,5 \times 10^6$ ) do tumor de Walker no pulmão, através da traquéia de ratos Wistar, com o desenvolvimento de linfangite carcinomatosa em 40% dos animais. Mais recentemente, Oliveira e colaboradores (1998), desenvolveram



um modelo de tumor de estômago em ratos Wistar e obtiveram excelente índice de pega tumoral com a inoculação de  $10^6$  células do tumor de Walker.

Neste trabalho, desenvolveu-se um modelo de tumor pulmonar em ratos com o carcinossarcoma de Walker, através da implantação das células tumorais no parênquima pulmonar por toracotomia, e usou-se um método de imagem (tomografia de tórax) para o diagnóstico *in vivo* da presença do tumor, fazendo-se uma correlação com os achados de necropsia e anatomopatológico.

### **1.3. Carcinogênese**

A carcinogênese é um processo que ocorre em várias etapas, onde as células sofrem alterações e desenvolvem características de malignidade como crescimento desordenado, invasividade, imortalidade e metástase. As alterações exatas ou os eventos celulares que se processam em cada ponto da transformação maligna não são todos conhecidos. A transformação neoplásica pode ser dividida em três etapas (Shields, 2000): 1) iniciação; 2) promoção; e 3) progressão.

#### **1.3.1 Iniciação**

Na iniciação, ocorre a interação de células normais com um agente carcinógeno (ex. benzopireno), resultando em alguns tipos de dano celular, que podem ou não ser reparados durante a divisão, no ciclo celular.

#### **1.3.2. Promoção**

Na promoção, as células que sofreram um dano celular na etapa de iniciação, proliferam-se formando um clone de células. Os agentes promotores

são os responsáveis pelo aumento da proliferação das células, resultando na formação de uma grande subpopulação de células com um defeito genético. Os agentes promotores puros não são genotóxicos e, portanto, não têm atividade carcinogênica quando administrados isoladamente. Um dos agentes promotores mais estudado na literatura é o 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TFA), presente no óleo de cróton. O TFA se liga a receptores (proteína quinase C) presentes nas células de todos os vertebrados e ativa um sistema de transdução de sinal intracelular que fosforila uma grande variedade de substratos. Isto resulta na síntese alterada de prostaglandinas e influxo de íons que induzem um aumento da proliferação celular, freqüentemente com alteração da diferenciação celular (Greenblatt et al.,1995). A administração ou a exposição prolongada a agentes promotores aumenta a freqüência de transformação de células iniciadas ou lesões pré-neoplásicas em células que expressam fenótipos malignos, embora, a transformação possa ocorrer por fatores intrínsecos, na ausência dos agentes promotores. Isto explica porque um ex-fumante tem uma menor incidência do que os fumantes, mas não está isento da possibilidade de ter um câncer de pulmão. A retirada dos agentes iniciadores e promotores presentes no cigarro reduz, mas não elimina o risco de câncer porque a mutação das células iniciadas poderia já ter ocorrido antes da retirada destes agentes. Os agentes com atividade iniciadora e promotora são chamados de carcinógenos completos.

#### 4.1.3.3. Agentes iniciadores

A transformação de uma célula normal em maligna resulta da disfunção de genes que regulam o crescimento, a diferenciação e a morte celular. Isto geralmente ocorre pela ativação de proto-oncogenes (ex., *ras* e *myc*) e/ou inativação de genes supressores, tais como *p53*, *rb* e *BRCA*. As alterações moleculares que ocorrem nestes genes são, portanto, eventos cruciais na carcinogênese (Greenblatt, 1995).

### 1.3.3. Progressão

Nesta etapa, as células que passaram pelas duas primeiras fases e adquiriram um fenótipo maligno, proliferam-se, invadem os tecidos adjacentes e disseminam-se por via linfática ou hemática, dando origem às metástases. Estes eventos são facilitados pela instabilidade genômica decorrente da superexpressão ou ativação de oncogenes e deleção ou inativação de genes supressores de tumor.

A proliferação celular em ritmo acelerado não é uma característica somente dos tumores malignos, visto que em alguns sistemas orgânicos (ex., gônadas, medula óssea e epitélio gastrointestinal), as células normais exibem também uma alta velocidade de proliferação. Nestes órgãos, entretanto, existe um equilíbrio, onde a manutenção da homeostase tissular é determinada pela alta velocidade de maturação e de morte celular programada (apoptose). A apoptose é um processo ativo, controlado por genes específicos, caracterizado pelo uso de energia celular, síntese de proteína e RNA, ativação de proteases específicas e endonucleases, resultando em proteólise intracelular, fragmentação do DNA e morte celular. A apoptose contribui para um adequado desempenho da função celular em uma variedade de processos fisiológicos e patológicos. A proteína do gene supressor de tumor *p53* induz a apoptose de células que tiveram seus DNAs danificados, enquanto a proteína do oncogene *bcl-2*, expressado pelo câncer de pulmão de pequenas células, inibe a via final da apoptose desencadeada por outros sinais. O descontrole ou supressão da apoptose por alterações moleculares é uma das características dos tumores malignos que influencia de forma significativa no aumento da resistência às drogas antineoplásicas.

Os agentes quimioterápicos citotóxicos têm como população alvo, as células que estão em processo de proliferação ou divisão celular, quer sejam malignas ou benignas, e atuam inibindo a síntese de DNA ou interferindo por mecanismos diversos no metabolismo e nas etapas de divisão celular.

A invasão tissular pelo tumor se faz pela lise da matriz extracelular (MEC) por uma classe de enzimas produzidas pelo tumor e clivadoras do colágeno, chamadas de metaloproteinases. Liota (1992), observou que os tumores que produziam maior quantidade desta enzima apresentavam um maior grau de invasividade.

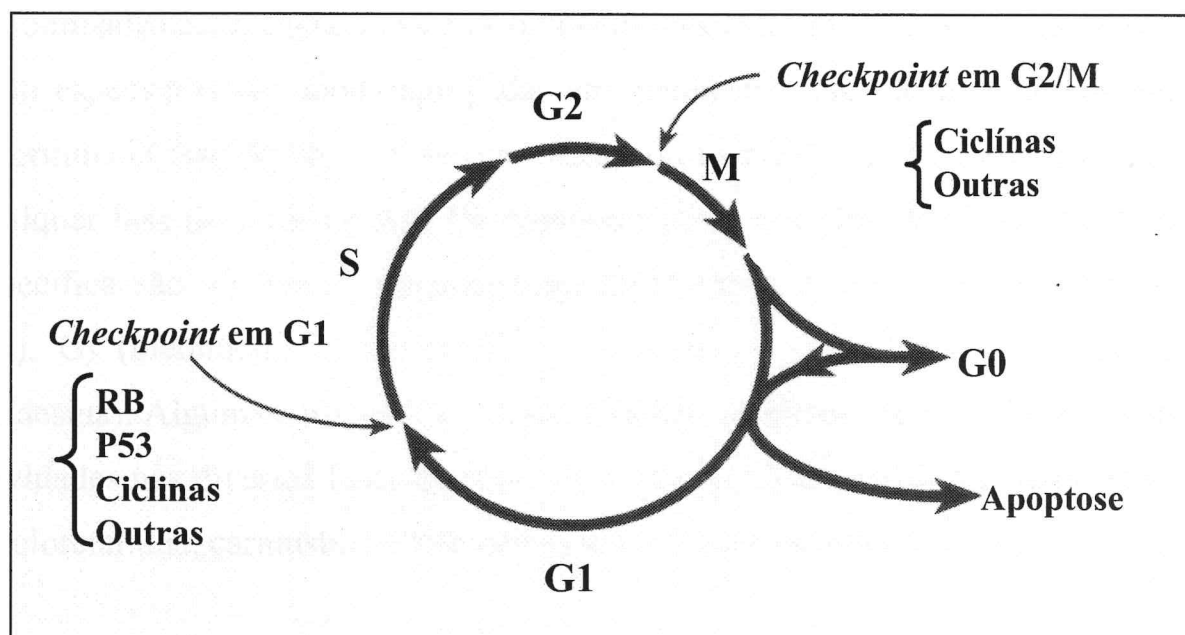
As células tumorais metastatizam-se por um mecanismo ativo que envolve uma cascata de eventos (Temeck, 1998) e se inicia pelo desgarramento das células tumorais facilitada pela quebra da integridade das junções intercelulares em decorrência da perda de expressão ou “down-regulation” de uma glicoproteína transmembrana chamada E- caderina (Behrens & Bichmeier, 1994). No passo seguinte, as células adentram a circulação sanguínea ou linfática por um processo de migração e, por fim, ao alcançarem o órgão alvo, deixam o espaço vascular por um processo de transmigração, e iniciam a colonização e formação da metástase. O processo de migração das células tumorais através do endotélio vascular ocorre de forma similar ao dos neutrófilos durante os processos infecciosos (Wagner et al., 1996). Isto se faz através de uma interação das moléculas de adesão das células tumorais (integrinas  $\alpha$  e  $\beta$ ) com as moléculas expressas pelo endotélio vascular ativado do hospedeiro (selectinas L, E e P, e imunoglobulinas ICAM e VCAM).

#### **1.3.4. Divisão Celular**

O conhecimento da biologia tumoral que envolve o ciclo celular e a cinética de crescimento do tumor é fundamental para se compreender os

princípios que norteiam o uso de drogas citotóxicas e antineoplásicas. A divisão celular é um processo complexo, que ocorre em fases bem definidas, conhecido como ciclo celular ou ciclo de vida da célula. Alguns genes e proteínas são responsáveis pela regulação do ciclo celular, dentre eles podemos destacar os genes do retinoblastoma (*rb*) e o *p53*, além da família das ciclinas.

A replicação do DNA se processa na fase S, ou fase de síntese. A divisão celular em duas células filhas ocorre na fase M (mitose). Estes períodos são separados por fases Gs (*gaps*:  $G_0$ ,  $G_1$  e  $G_2$ ), como mostra a **figura 1**, durante as quais são sintetizadas as proteínas e enzimas que serão usadas nas fases subseqüentes.



**Figura 1: Ciclo celular e suas fases  $G_0$ ,  $G_1$ , S,  $G_2$  e M. São também mostrados alguns genes que controlam o ciclo celular e têm uma função na carcinogênese (*rb*, *p53* e ciclinas).**

Na fase  $G_0$ , as células ficam em estado de repouso e realizam funções especializadas, entrando no ciclo de divisão somente quando são recrutadas

para fazê-lo. A fase  $G_1$  precede a fase S, e é nesta fase que são sintetizadas as proteínas, RNA e enzimas necessárias para a síntese do DNA. O ciclo celular é controlado nesta fase por um  $G_1$  *checkpoint*, onde as células aguardam um sinal para entrarem na fase S. A fase  $G_2$  precede a fase M, e nesta fase o fuso mitótico é organizado, o processo de síntese de proteína continua e o volume celular aumenta. Na transição da fase  $G_2$  para M acontece o segundo *checkpoint*. A duração de cada fase do ciclo varia com o tipo de célula de diferentes tumores e também entre as células de um mesmo tumor. A fase S dura em torno de 10 a 20 horas, a fase M de 0,5 a 1 hora e as fases  $G_s$  de 2 a 10 horas (Twardowski et al., 2000).

Os agentes quimioterápicos podem atuar nas células que estão ou não em divisão celular. As drogas com atividade nas células em divisão são denominadas ciclo específicas e as outras drogas ciclo inespecíficas. As drogas ciclo específicas são ainda agrupadas em compostos que são mais ativos em determinada fase do ciclo (fase específica), ou naqueles que têm atividade em qualquer fase do ciclo celular. Os quimioterápicos que têm atividades em fase específica são:  $G_1$  (ex., L-asparaginase, prednisona); S (ex., methotrexate, 5-FU);  $G_2$  (bleomicina e etoposide); e M (taxanes, vincristina, vinblastina e vindesina). Algumas drogas (ex., ciclofosfamida, cisplatina, doxorubicina) têm atividades nas diversas fases do ciclo (fase inespecíficas), enquanto outras (ex., mecloretamina, carmustine e lomustine) são ciclo inespecíficas.

### **1.3.5. Crescimento Tumoral**

A velocidade de crescimento tumoral depende da interação de fatores que incluem a duração do ciclo celular (média de tempo entre mitoses das células em divisão), a fração de crescimento (proporção de células malignas em divisão), o número total de células malignas e a velocidade de morte das células

tumorais. As comunicações intercelulares, através de citocinas que incluem fatores de crescimento, podem estimular ou inibir o processo de proliferação celular. A proliferação das células da maioria dos pacientes com câncer de pulmão é aumentada pelo envolvimento de fatores de crescimento que atuam pela via autócrina e parácrina. Os fatores de crescimento secretados na região pericelular que estimulam as células vizinhas são chamados de agentes parácrinos, enquanto os que interagem com receptores das células que os produziram são denominados agentes autócrinos. Os fatores de crescimento da insulina (IGF-I e IGF-II) e o peptídeo liberador da gastrina (GRP) atuam como fatores autócrinos no câncer de pulmão de pequenas células (CPPC), enquanto o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator transformador de crescimento  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) participam de forma autócrina no câncer de pulmão não pequenas células (CPNPC). O crescimento dos CPPC e CPNPC pode ser inibido pelo uso de anticorpos monoclonais contra esses fatores (Pass et al., 2001). Os fatores transformadores do crescimento  $\beta$  (TGF-  $\beta$ 1 e TGF-  $\beta$ ) são associados a receptores com efeitos pleiotrópicos de uma variedade de tipos celulares normais e malignos. Estes fatores são secretados pelo CPPC e CPNPC, tendo uma ação imunossupressora nestes cânceres (Pass et al., 2001).

A curva de crescimento de um tumor sólido mostra uma fase inicial de crescimento exponencial rápido e uma fase terminal de crescimento lento. Na primeira parte da curva a maioria das células está no ciclo de divisão, mas geralmente no momento em que o tumor é diagnosticado, a velocidade de crescimento tem se tornado lenta e somente uma pequena fração de células se encontra em divisão (Twardowski et al., 2000). Isto tem grandes implicações terapêuticas porque as células em lento processo de divisão tendem a ser menos responsivas a agentes quimioterápicos e, infelizmente, na porção inicial da curva onde uma alta fração das células está em divisão e, portanto, mais



susceptível às drogas citotóxicas, a doença ainda não se tornou clinicamente detectável.

#### **1.4. Angiogênese**

A angiogênese é um processo pelo qual novos vasos sanguíneos são formados. Em condições fisiológicas, o endotélio vascular fica em estado quiescente, apresentando baixa velocidade de divisão celular. No início do processo de angiogênese as células saem do estado de quiescência e começam a proliferar rapidamente, embora o façam por um período curto de tempo, geralmente de poucos dias, como no processo de reparação de uma ferida cirúrgica, e na ovulação e formação do corpo lúteo. Em condições patológicas tais como na artrite e no câncer, o processo de angiogênese pode persistir durante meses ou anos e raramente termina espontaneamente.

O tumor maligno para suprir o aporte nutricional necessário ao crescimento e expansão necessita induzir a formação de novos vasos sanguíneos. A hipótese de que o crescimento tumoral era dependente da angiogênese foi introduzida na literatura por Folkman (1971). Posteriormente foi demonstrado que na ausência total de neovascularização os tumores deixavam de crescer quando atingiam um volume de cerca de 1 a 2mm<sup>3</sup> (Weidner, 1991). Na ausência total de angiogênese tumoral pelo uso de drogas antiangiogênicas não deixa de haver proliferação das células neoplásicas, entretanto nestas situações não existe crescimento, ou o crescimento tumoral se faz de forma lenta em decorrência do equilíbrio que se estabelece entre a proliferação continuada de células e a apoptose (O'Reilly et al., 1996). A capacidade dos tumores de induzir angiogênese está diretamente relacionada com o crescimento tumoral e com o desenvolvimento de metástases à distância,



pois os vasos neoformados, além de fornecerem todo o suprimento metabólico e energético para o crescimento do tumor, permitem que as células malignas atravessem mais facilmente as suas paredes e caiam na circulação.

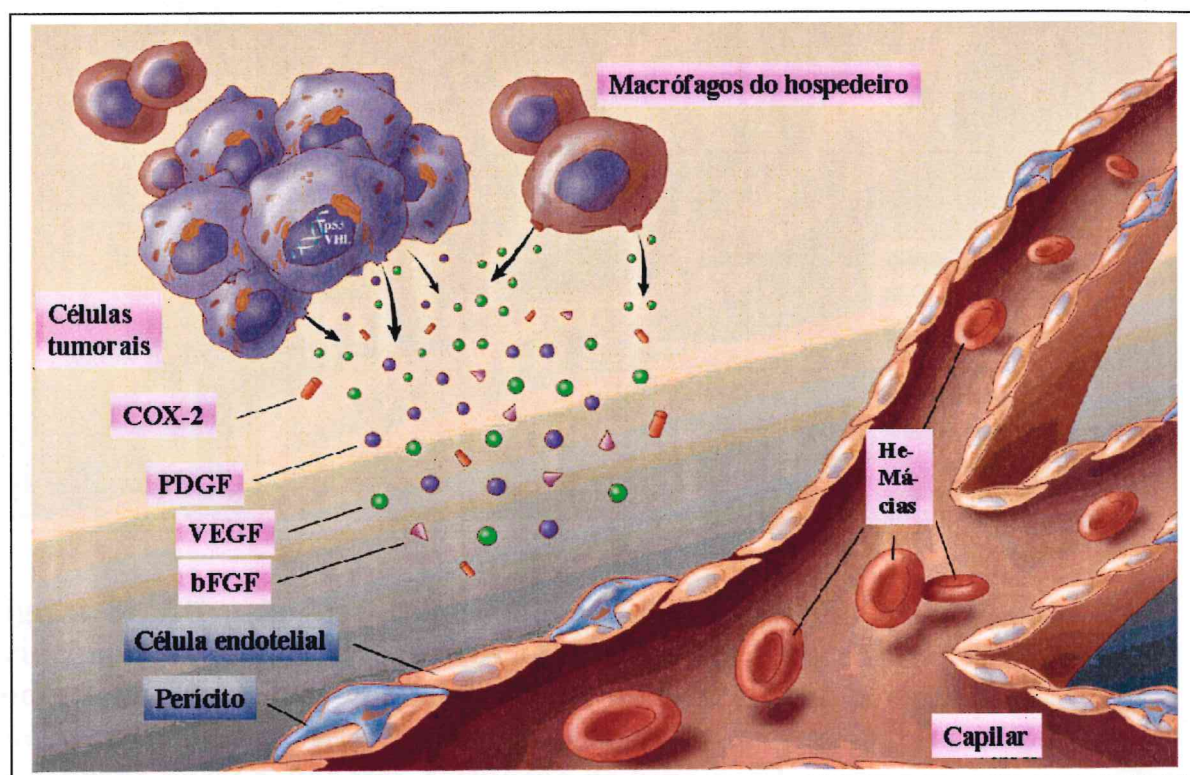
Matsuyama e colaboradores (1998), em um estudo de pacientes operados com câncer de pulmão do tipo não pequenas células, observaram que os pacientes cujos tumores apresentaram maior índice de neovascularização por área contada, desenvolveram uma quantidade significativamente maior de metástases hematogênicas. A sobrevida em 5 anos dos pacientes pertencentes ao grupo com maior percentual de neovascularização foi também significativamente menor.

A indução da angiogênese é mediada por múltiplas moléculas estimuladoras, que podem ser expressas pelas células tumorais ou por macrófagos do hospedeiro recrutados pelo tumor (Polverini & Leibovich, 1984). As **figuras 2, 3, 4 e 5** mostram uma representação esquemática do processo de angiogênese tumoral induzida pelos principais fatores angiogênicos.

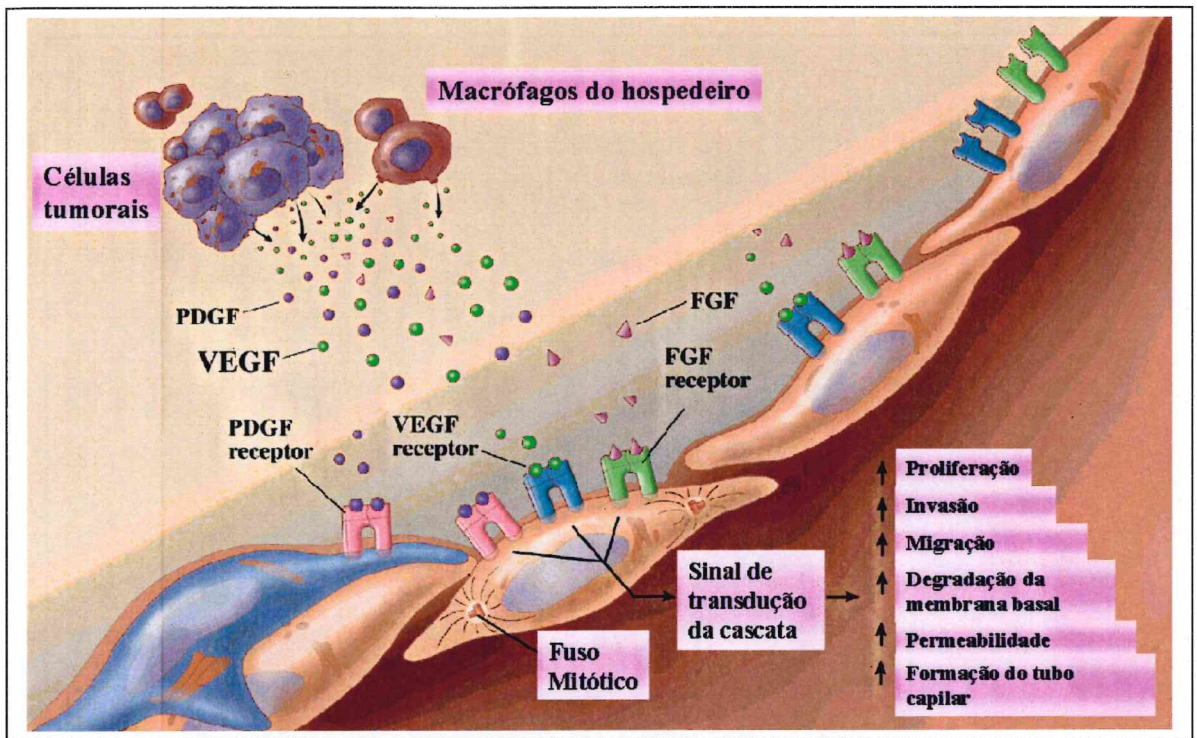
O gatilho da angiogênese tumoral é disparado de forma súbita por um desequilíbrio entre os fatores estimuladores e inibidores da angiogênese, no momento em que a “upregulation” dos fatores estimuladores predomina ou se associa à “downregulation” dos fatores inibidores (O’Reilly et al., 1996).

A neovascularização de um tumor pode ser observada, em exame microscópico, pela coloração do endotélio com marcadores específicos com anticorpos para fator von Willebrand ou para CD34 e a densidade de vasos quantificada por imunohistoquímica. Um tumor pesando 1g contém aproximadamente  $10^9$  células tumorais e  $2 \times 10^7$  células endoteliais, portanto,

para cada cem células tumorais há geralmente uma célula endotelial de suporte (Folkman, 1997).

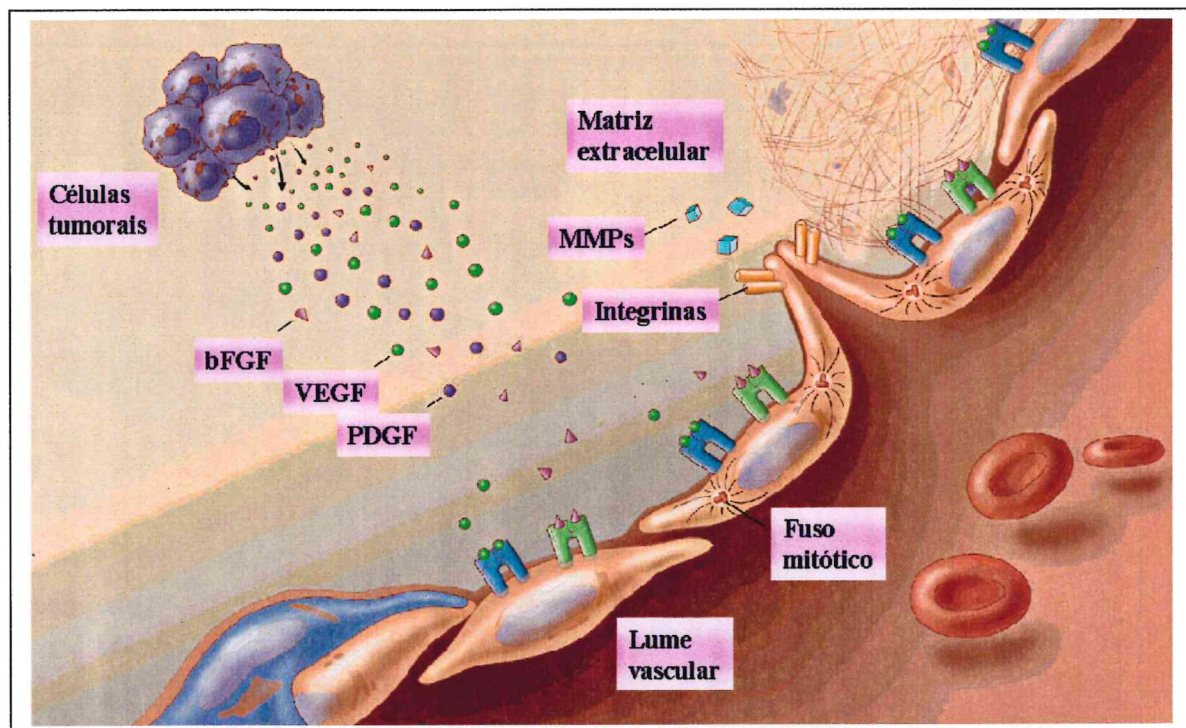


**Figura 2: Os principais fatores angiogênicos (VEGF, bFGF, PDGF e COX-2) expressos pelas células tumorais e por macrófagos do hospedeiro.**

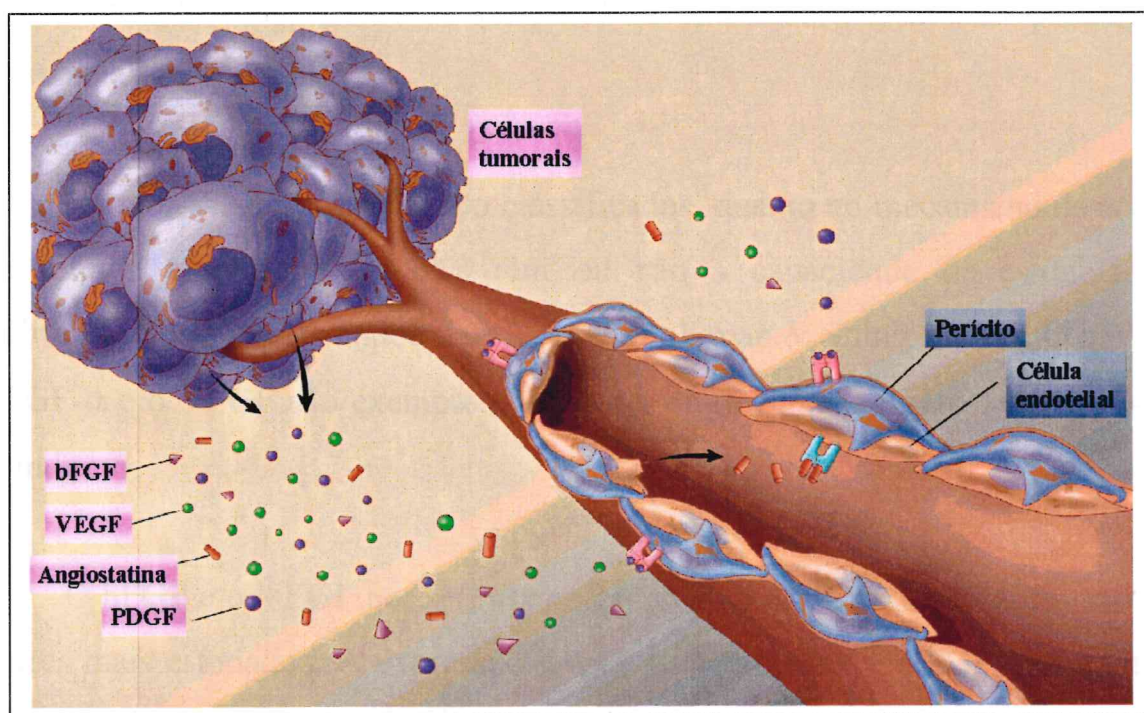


**Figura 3:** Ativação das células do endotélio vascular pela ligação dos principais fatores angiogênicos a receptores específicos nas células endoteliais. As células endoteliais ativadas recebem a sinalização para iniciar o processo de proliferação, invasão, migração, degradação da membrana basal e, por fim, formação do tubo capilar.





**Figura 4: Formação do broto vascular pela diferenciação, proliferação e migração do endotélio vascular ativado. Observa-se a presença de moléculas de adesão (integrinas) expressas pelas células endoteliais. Verifica-se também a presença de metaloproteinases (MMPs), enzimas que vão clivar o colágeno na matriz extracelular e abrir espaço para a migração das células endoteliais.**



**Figura 5:** A formação de novo vaso pelo predomínio dos fatores estimuladores (bFGF, VEGF e PDGF) sobre os inibidores (angiostatina) da angiogênese e a rápida proliferação das células tumorais, em decorrência do maior aporte nutricional necessário ao crescimento e à expansão tumoral.

#### **1.4.1. Substâncias estimuladoras da Angiogênese**

Nas últimas duas décadas foram clonados mais de 10 polipeptídeos com atividade angiogênica. Entre os principais polipeptídeos angiogênicos estão o

fator básico de crescimento fibroblástico (bFGF), o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e o fator de crescimento do endotélio derivado das plaquetas (PDGF). Existem outras substâncias angiogênicas menos específicas, destacando-se entre elas, o fator transformador de crescimento  $\alpha$  e  $\beta$  (TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ ), o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), o fator de dispersão (scatter factor – SF), o fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e a interleucina 8 (IL-8) (Temeck & Pass, 1998). A **tabela 1** mostra uma relação das principais substâncias angiogênicas.

Os fatores angiogênicos são classificados, quanto ao mecanismo de ação, em diretos e indiretos se eles têm ou não a capacidade de estimular a proliferação das células endoteliais *in vitro* (Folkman & Shing, 1992). O bFGF, o TGF- $\alpha$  e o VEGF são exemplos de fatores angiogênicos diretos, e o TNF- $\alpha$ , de indireto.

O bFGF e o VEGF por serem encontrados na maioria dos tumores são os fatores mais estudados. A expressão destes fatores (bFGF e VEGF) por alguns tipos de câncer de pulmão tem sido correlacionada com quimiorresistência e diminuição do índice de sobrevida (Pass et al., 2001).

Mais recentemente, foi demonstrada atividade angiogênica em outras moléculas como nicotinamida, adenosina, ciclooxigenase-2 (COX-2) e as prostaglandinas (PGE<sub>1</sub> e PGE<sub>2</sub>), derivadas da conversão do ácido aracdônico por esta enzima (Folkman & Shing, 1992; Masferrer et al., 2000).

**Tabela 1:** Principais substâncias estimuladoras da angiogênese

**Substâncias angiogênicas**

VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular)

bFGF (fator básico de crescimento fibroblástico)

PDGF (fator de crescimento do endotélio derivado das plaquetas)

TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  (fator transformador de crescimento  $\alpha$  e  $\beta$ )

TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral  $\alpha$ )

scatter factor – SF (fator de dispersão)

HGF (fator de crescimento de hepatócitos)

IGF (fator de crescimento insulina similar)

IL-8 (interleucina 8)

Integrinas vasculares  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_3$

MMPs (Matriz metaloproteinases)

COX-2 (ciclooxigenase-2)

PGE<sub>1</sub> e PGE<sub>2</sub> (prostaglandinas E<sub>1</sub> e E<sub>2</sub>)

Masferrer e Colaboradores (2000), demonstraram que as prostaglandinas derivadas da COX-2 contribuíam para o crescimento tumoral por induzir a formação de novos vasos. A participação da COX-2 foi confirmada por estes autores, pela capacidade do celecoxib, um inibidor seletivo da enzima COX-2, de suprimir ou retardar de maneira significativa o crescimento de tumores humanos de pulmão e cólon implantados em camundongos atímicos, além de reduzir em 50% a incidência de metástase nos animais tratados. A expressão ou a “upregulation” da COX-2 tem sido relatada também na maioria das amostras de biópsias de pacientes com câncer de estômago, cólon, mama, próstata e



pulmão (Ristimäki et al., 1997; Elder et al., 1997; Wolff et al., 1998; Masferrer et al., 2000). Nestes tumores, a COX-2 tem sido detectada nos vasos tumorais angiogênicos, mas não nas células tumorais. As evidências que a COX-2 e seus derivados têm uma participação importante na tumorigênese e que o uso de inibidores seletivos da COX-2, por inibir a angiogênese retarda o crescimento tumoral e reduz a incidência de metástases, apontam para uma nova indicação dos antiinflamatórios inibidores da COX-2 na quimioprevenção e no tratamento do câncer.

#### **1.4.2. Substâncias Inibidoras da Angiogênese**

Os fatores inibidores da angiogênese são vários, tendo sido a protamina uma das primeiras moléculas com atividade antiangiogênica identificada (Taylor & Folkman, 1982). Depois desta, uma dezena de outros inibidores da angiogênese já foram descobertos, destacando-se entre eles, os esteróides, a fumagilina e seus derivados, o interferon  $\alpha$  e  $\beta$  (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ), a Interleucina-12, a angiostatina (fragmento do plaminogênio), a endostatina (fragmento do colágeno), os inibidores do VEGF, e do bFGF e os inibidores das metaloproteinases (O'REILLY et al., 1994). Algumas drogas com ação antiinflamatória, como a talidomida e os inibidores seletivos da COX-2, têm mostrado uma potente ação antiangiogênica (Kruse et al., 1998, Masferrer et al., 2000). Entretanto, a maioria dos inibidores da angiogênese (fator plaquetário 4, prolactina, interferon  $\alpha$ , interleucina-12 e angiostatina) são proteínas endógenas que têm a função fisiológica de manter as células endoteliais com baixo poder de replicação. Algumas destas proteínas inibem também a angiogênese *in vivo*, sendo a angiostatina a mais potente delas.

A angiostatina é uma proteína de 38-kd, derivada da clivagem do plasminogênio, tendo sido purificada pela primeira vez do soro e da urina de



camundongos portadores do carcinoma pulmonar de Lewis (O'Reilly et al., 1994). A angiostatina não tem atividade anticoagulante e o plasminogênio não inibe a angiogênese. A angiostatina bloqueia especificamente a proliferação de células endoteliais, sendo um potente inibidor da angiogênese, do crescimento tumoral e das metástases, embora não tenha efeito direto sobre as células tumorais. As células tumorais são geralmente resistentes aos inibidores da angiogênese que não tenham atividade citotóxica, entretanto, alguns agentes citotóxicos como a doxorrubicina, a ciclofosfamida e o paclitaxel são também inibidores da angiogênese (Folkman, 1997).

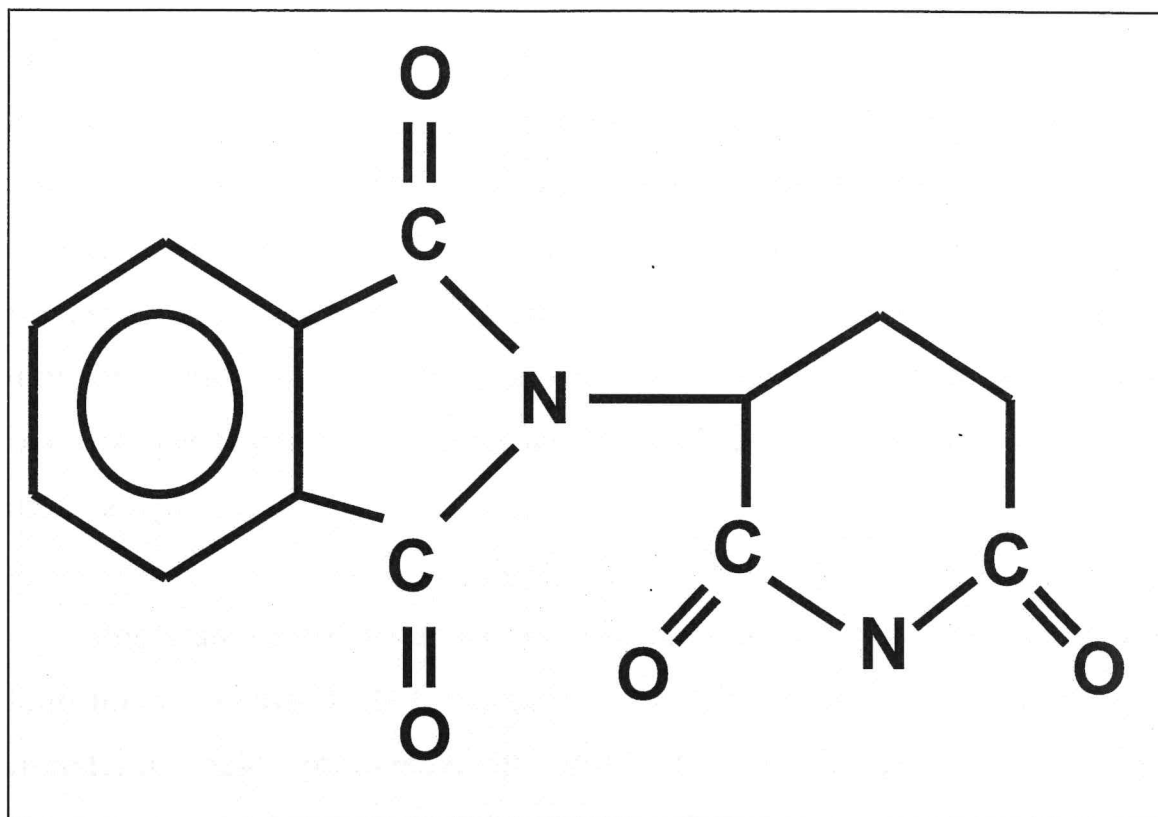
A angiostatina tem sido encontrada em muitos tumores animais e humanos. Volm e colaboradores (2000), constataram a presença de angiostatina por estudo imunohistoquímico em 24% (34/143) das peças cirúrgicas de pacientes operados de câncer de pulmão. Estes autores verificaram uma maior ( $p = 0,02$ ) sobrevida dos pacientes com câncer de pulmão e angiostatina positiva que dos pacientes com câncer e angiostatina negativa. A inibição da angiogênese tem sido uma estratégia amplamente usada, tanto a nível experimental quanto clínico, para inibir o crescimento e a disseminação de muitos tipos de tumores. Sim e colaboradores (1997), demonstraram experimentalmente uma inibição de 90% das metástases do carcinoma pulmonar de Lewis com o uso da angiostatina. A angiostatina administrada também em camundongos com tumores experimentais de mama, próstata e cólon de humanos, reduziu o tamanho dos tumores e os manteve em estado quiescente (O'Reilly et al., 1996). Foi demonstrada também inibição da angiogênese e do crescimento tumoral *in vivo* com o uso de anticorpos anti-IL-8, de IFN- $\alpha$  e dos inibidores das metaloproteinases (Arenberg et al., 1996; Shalinsky et al., 1999). A **tabela 2** mostra uma relação das principais substâncias antiangiogênicas.

**Tabela 2:** Principais substâncias inibidoras da angiogênese

Substâncias antiangiogênicas
Angiostatina
Endostatina
IL-12 (Interleucina-12)
IFN- $\alpha$ e IFN- $\beta$ (Interferon $\alpha$ e $\beta$ )
Fumagilina
Protamina
Inibidores do VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular)
Inibidores do bFGF (fator básico de crescimento fibroblástico)
Inibidores das metaloproteinases
Inibidores das integrinas vasculares $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_3$
Inibidores da COX-2 (ciclooxigenase-2)
Talidomida

**1.4.2.1 Talidomida**

A talidomida ou  $\alpha$ -N-ftalimido-glutarimida (**figura 6**) é uma substância química derivada da piperidina, inicialmente usada na clínica pelos seus efeitos hipnóticos e depois como droga antiinflamatória e imunossupressora, de baixa toxicidade sistêmica.



**Figura 6: Estrutura química da talidomida**

Os efeitos colaterais mais comuns observados com o uso da talidomida foram sonolência, tontura, ressecamento de mucosas, constipação, reações urticariformes na pele e neurite nas extremidades das mãos e pés. O fato de a talidomida ter produzido também efeitos teratogênicos graves, como o aparecimento de malformações (focomelia) em recém-nascidos de gestantes que a utilizaram nos primeiros meses de gravidez, fez com que a sua comercialização fosse proibida em 1961 (Tseng et al., 1996). A partir desta data a talidomida ficou sendo disponibilizada estritamente para pesquisa. Nos Estados Unidos, a talidomida nunca teve sua aprovação pelo FDA e portanto nunca entrou no mercado daquele país (Tseng et al., 1996). Entretanto, nos últimos anos a talidomida vem sendo muito estudada nos Estados Unidos e há uma expectativa dela ser lançada no mercado com o *status* de droga nova.

Sheskin (1965), quando a talidomida já havia sido retirada do mercado, mas ainda era disponível em seu país (Israel), usou a droga como sedativo em pacientes com reações hansenianas graves, decorrentes do eritema nodoso da lepra lepromatosa. Ele observou uma remissão rápida dos sintomas destes pacientes com o uso da talidomida na dose de 100 a 400mg por dia. Não havia uma explicação do mecanismo de ação da talidomida nestes casos, apesar de o autor saber que a melhora dos pacientes não se devia a uma ação bactericida, uma vez que a droga não tinha atividade específica sobre os bacilos, nem curava a lepra.

Vogelsang e colaboradores (1986), constataram experimentalmente um efeito imunomodulador da talidomida no modelo de doença do enxerto versus hospedeiro, pelo prolongamento dos enxertos de pele em roedores. Posteriormente, Östraat e colaboradores (1992), obtiveram também um aumento significativo de sobrevida de ratos Wistar submetidos a transplante de coração e tratados com talidomida. Estes autores não observaram diferença de sobrevida entre os grupos transplantados e tratados com ciclosporina ou talidomida.

Sampaio e colaboradores (1991), mostraram que a talidomida bloqueava seletivamente a produção de TNF- $\alpha$  por monócitos humanos estimulados com lipopolissacárides (LPS) in vitro, enquanto a produção de outras citocinas como IL-1 $\beta$  e IL-6 não era afetada por esta droga. Estes autores aventaram um possível benefício do uso da talidomida em pacientes com câncer, no sentido de aliviar a febre e amenizar a caquexia geralmente associada a níveis elevados de TNF- $\alpha$  nestes pacientes. Posteriormente, Sampaio e colaboradores (1993), constataram que pacientes com eritema nodoso da lepra apresentavam um nível

sérico elevado de TNF- $\alpha$  e que havia uma correlação positiva entre os níveis de TNF- $\alpha$  e a intensidade das reações inflamatórias dos pacientes. O tratamento destes pacientes com talidomida não só aliviava os sintomas de febre e dores articulares, como promovia a involução dos nódulos, ao mesmo tempo em que diminuía os níveis séricos de TNF- $\alpha$ . Tramontana e colaboradores (1995), constataram também que o TNF- $\alpha$  e a IL-1 estavam aumentados em pacientes com tuberculose, e que o tratamento deste pacientes com talidomida diminuía os níveis tanto do TNF- $\alpha$  como da IL-1. Ao lado disto, eles observaram um aumento de peso dos pacientes tratados com talidomida. Baseados nestes resultados, os autores presumiram que a perda de peso dos pacientes tuberculosos deveria estar associada a uma produção crônica de TNF- $\alpha$ . O TNF- $\alpha$  é uma das citocinas que tem também uma função importante na regulação da resposta imune e inflamatória do hospedeiro. A “downregulation” do TNF- $\alpha$  pela talidomida tanto *in vivo* quanto *in vitro* mostra que esta droga deve atuar como um agente imunomodulador em diversas situações clínicas ou experimentais (Klausner et al., 1996).

D’Amato e colaboradores (1994), atribuíram pela primeira vez o efeito antiangiogênico da talidomida como o mecanismo responsável pela teratogenicidade desta droga, o que nenhum pesquisador havia descoberto até então, apesar de que estudos com a talidomida vinham sendo feitos há mais de três décadas.

Os relatos de D’Amato e colaboradores (1994), e de Kruse e colaboradores (1998), mostrando a inibição pela talidomida da angiogênese induzida pelo bFGF e pelo VEGF revelaram uma nova ação da talidomida, colocando-a entre uma das principais drogas antiangiogênicas. Neste mister, faz-se necessário doravante, estudos experimentais para verificar se esta droga

inibe a angiogênese dos tumores que expressam esses fatores e também estudos para se elucidar o mecanismo pelo qual a talidomida inibe a angiogênese.

### 1.4.3 Princípios da Terapia Antiangiogênica

O principal objetivo da terapia antiangiogênica em modelos experimentais de tumor e em pacientes com câncer avançado é conter o foco de migração e proliferação das células endoteliais dos capilares, e com isto manter o tumor em estado quiescente. Nestas situações, as drogas que inibirem mais seletivamente a angiogênese, terão menores efeitos colaterais. O tratamento clínico deve ser feito por um longo período e sem intervalos, uma vez que a involução do processo de angiogênese é mais lento que a lise tumoral decorrente de efeitos de agentes citotóxicos (Folkman, 1997).

A estabilização ou diminuição do crescimento tumoral deve ser interpretada como resposta efetiva ao tratamento antiangiogênico, diferentemente do que se observa com a terapia citotóxica, onde pode haver resposta parcial (RP) ou resposta completa (RC) às drogas utilizadas. O uso combinado de inibidores da angiogênese com agentes citotóxicos em tumor (carcinoma de Lewis), implantado no s.c., foi mais efetivo no controle da doença primária e metastática que o tratamento isolado com um deles (Teicher et al., 1992 e Teicher et al., 1994), apontando a possibilidade futura de um maior controle do câncer em humanos, através do uso combinado das duas modalidades terapêuticas.

A análise de drogas com efeito antiangiogênico tem sido feita tanto *in vitro* quanto *in vivo*, entretanto, os modelos experimentais *in vivo*, utilizando córnea de coelho ou membrana corioalantóica de embrião (González et al., 2000; Nguyen et al., 1994) têm sido os de escolha, quando se quer comparar a

potência de drogas inibidoras da angiogênese aplicadas por via sistêmica. Por outro lado, se uma droga tem um grande efeito antiangiogênico em um modelo de angiogênese na córnea de coelho, não se pode antecipar que a mesma droga possa inibir a angiogênese tumoral. Por isto, se faz necessário o teste de drogas inibidoras da angiogênese em modelos experimentais de tumores com reconhecida atividade angiogênica, como o carcinoma pulmonar de Lewis, o tumor de Walker e outros, para que se possa confirmar a atividade inibitória de angiogênese tumoral.

Os estudos até o presente têm mostrado dados animadores e promissores para o tratamento do câncer de pulmão e de outros tumores sólidos, não só através do uso de inibidores dos fatores angiogênicos, mas principalmente com o uso de novas drogas com atividade antiangiogênica. Neste sentido foi que usamos a talidomida no modelo de tumor de pulmão do presente trabalho, uma vez que já havia na literatura alguns estudos relatando os efeitos imunomodulador e antiangiogênico desta droga em animais e em humanos (Östraat et al., 1992; Kruse et al., 1998; Fine et al., 2000), além de outros trabalhos relatando o efeito antiangiogênico e/ou antitumoral da talidomida em alguns tipos de tumores em roedores (Guinan et al., 1998; Kotoh et al., 1999) e em humanos (Fine et al., 2000; Eisen et al., 2000; Blade et al., 2001).

## 1.5. OBJETIVOS

Como foi relatado anteriormente, existe uma variedade de opções terapêuticas para o tratamento dos tumores sólidos, através do uso isolado ou combinado de novas drogas com ação citotóxica, imunomoduladora e antiangiogênica. Entretanto, os avanços no tratamento do câncer de pulmão em estágio avançado têm sido lentos, em parte, pela escassez de modelos experimentais de tumor de pulmão que permitam estudar ou acelerar os estudos nesta área.

O propósito deste estudo foi desenvolver um modelo de tumor pulmonar em ratos com o carcinossarcoma de Walker através da implantação das células tumorais no parênquima pulmonar por toracotomia; verificar *in vivo* a presença de tumor por meio de tomografia computadorizada; e avaliar o efeito antitumoral da talidomida no desenvolvimento do tumor e na sobrevida dos animais no modelo de tumor de pulmão.

### 1.5.1. Objetivos específicos:

- 1.1. Desenvolver um modelo de tumor pulmonar em ratos com o carcinossarcoma de Walker.
- 1.2. Usar um método de imagem (tomografia de tórax) para diagnóstico *in vivo* da presença do tumor.
- 1.3. Avaliar a ação antitumoral da talidomida no modelo de tumor de pulmão com o carcinossarcoma de Walker.



## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

## **2.1. Material Cirúrgico**

Tesoura de Metzenbaum de 14 cm (Medlight, Brasil)

Tesoura de Metzenbaum de 10cm delicada (Medlight, Brasil)

Tesoura de ponta aguda de 6 cm (Medlight, Brasil)

Pinça tipo Adson-Brown de 12 cm (Medlight, Brasil)

Pinça dente de rato de 14 cm (Medlight, Brasil)

Pinça de dissecação tipo Adson de 12 cm (Medlight, Brasil)

Pinça de dissecação longa de 30cm delicada (Medlight, Brasil)

Pinça de relojoeiro tipo Dumont reta número 5 (Medlight, Brasil)

Pinça mosquito de Halsted sem dentes (Medlight, Brasil)

Pinça mosquito de 10 e 12 cms (Medlight, Brasil)

Pinça Kelly de 14 cm (Medlight, Brasil)

Blefarostato (como afastador de costelas)

Porta-agulha tipo Hegar de 12cm

Porta-agulha tipo Hegar com ponta reforçada com Videa

Porta-agulha de Castroviejo curvo sem trava de 12cm

Cabos de bisturi números 3 e 4

Lâminas de bisturi números: 11, 15 e 21

Fios cirúrgicos: Mononylon® 4-0, Algodão 4-0, Vycril® 4-0, Prolene® 4 e 7-0.

## **2.2. Drogas e Reagentes**

Polvidine: Polivinilpirrolidona a 10% (Tecnofarma, Brasil)

Solução de Ringer com Lactato (Gaspar Viana, Brasil)

Gentamicina 10mg/mL (Gibco BRL, USA)

Éter etílico (Synth, Brasil)

Pentobarbital (Cristália)

### 2.3. Vidraria

Erlenmeyer 25 e 100mL (Pyrex, Brasil)

Becher de 100mL (Pyrex, Brasil)

Becher de 500mL (Pyrex, Brasil)

Micropipetas de 200  $\mu$ L e 1000  $\mu$ L (Cilson, Brasil)

Câmara de Neubauer (Bright-line Eppendorf Optik Labor)

### 2.4. Equipamento

Respirador de Roedores (ventilador para pequenos animais da *UGO BASILE*, Itália)

Agitador magnético (TE 089 MARCONI)

Centrífuga (Modelo 580, São Paulo, Brasil)

Estufa de esterilização (Modelo 315, São Paulo, Brasil)

Microscópio (Nikon, Japão)

Balança para animais (tara de 0 a 2,000 g, Mettler P3, USA)

Balança (Kern 430-21, USA)

Aparelho de tomografia (Siemens, somaton AR.TX)

### 2.5. Outros Materiais

Seringas de 0,5 e 1 mL com agulha 29G (BD Ind. Cirúrg. Ltda, Brasil)

Seringas de 3, 5, 10 e 20 mL (BD Ind. Cirúrg. Ltda, Brasil)

Agulhas 21 e 25G (BD Ind. Cirúrg. Ltda, Brasil)

Abocath números 14 e 16G usados como tubo traqueal e dreno de tórax (BD Ind. Cirúrg. Ltda, Brasil)

Hastes flexíveis com algodão na extremidade.

Placas de Petri (Pirex)

Peneira de metal com furos de 0,5mm

Colher de metal

Tubos Falcon de 15 e 50mL

Bala magnética

Luvas cirúrgicas (Lengruber, Brasil)

Luvas de procedimento (Blowtex, USA)

Filmes de 35 mm para Slides (Ektachrome ASA 100)

## **2.6. Animais e células neoplásicas**

No presente trabalho foram utilizados ratos Wistar fêmeas. Os animais eram provenientes do biotério central da Universidade Federal do Ceará (UFC) e mantidos no laboratório de Oncologia Experimental do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, abrigados a 24°C em ciclo luz-escuro de 12 horas e com acesso a água e alimento *ad libitum*.

A linhagem do tumor utilizado foi o carcinossarcoma de Walker, mantido em laboratório por inoculações intramusculares sucessivas na coxa direita de ratos Wistar, a cada 10 dias.

No 9º ou 10º dia de inoculação das células do tumor de Walker os animais eram sacrificados. O tumor era extraído e, após a exclusão das áreas necróticas, cortado em pequenos pedaços de aproximadamente 0,5mm em uma placa de Petri contendo 5mL de solução de ringer lactato com gentamicina (1:10). Em seguida, a preparação era agitada por aproximadamente 10 minutos em um homogeneizador de Potter. A suspensão era, a seguir, filtrada em uma peneira

de metal e mantida em temperatura de 4 °C durante todo o experimento. A viabilidade das células tumorais era examinada pelo teste de exclusão com azul de Trypan em todos os experimentos.

## 2.7. Anestesia

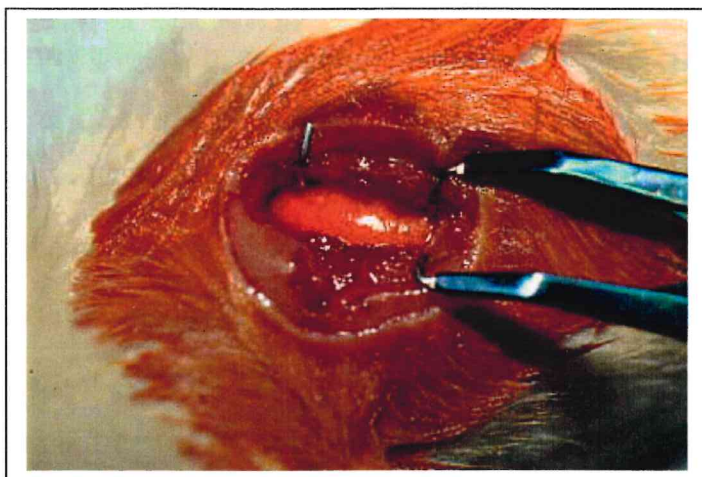
Os animais foram anestesiados com pentobarbital, 40 mg/Kg, por via intraperitoneal (i.p.) e em seguida intubados por via orotraqueal ou submetidos a traqueostomia pela técnica descrita por Schneider (1995), conforme mostra a **figura 7**. A traquéia era canulada com um cateter intravenoso, tipo abocath (16 ou 14G), conectado a um respirador de roedores (ventilador para pequenos animais da *UGO BASILE*, Itália), e os pulmões ventilados com ar ambiente, com um volume de 10 mL/Kg, e uma frequência de 75 respirações/minuto.



**Figura 7: Traquéia canulada com abocath 16G.**

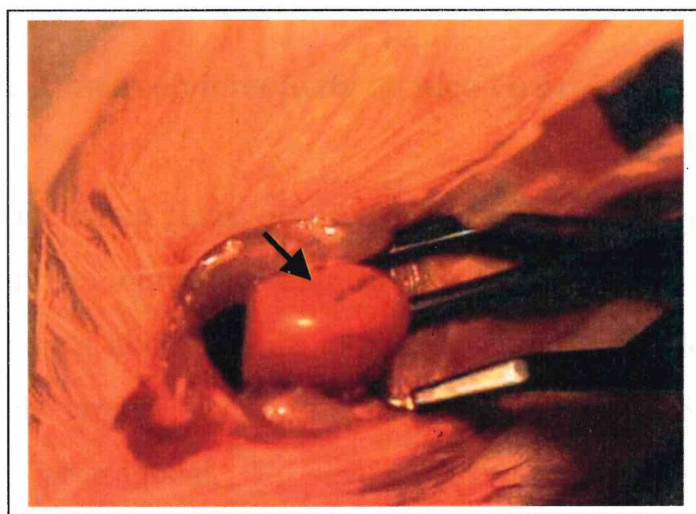
## 2.8. Técnica do implante tumoral

Os animais anestesiados eram colocados em decúbito lateral direito, o hemitórax esquerdo preparado com polvidine (polivinilpirrolidona) e, a seguir, fazia-se uma toracotomia de 1,5 a 2 cm de comprimento (**figura 8**).



**Figura 8: Toracotomia esquerda. As costelas retraídas com um blefarostato e o pulmão (lobo inferior) exposto.**

As costelas foram retraídas com um afastador palpebral (blefarostato), o lobo inferior esquerdo exposto com cotonetes e uma suspensão de células, em um volume que variou de 50 a 70  $\mu\text{L}$ , foi injetado com uma seringa de 0,5 ou 1mL e agulha 29G a uma profundidade de 0,5cm, diretamente no parênquima do lobo inferior esquerdo, segundo a técnica de Wang e colaboradores (1997), como mostra a **figura 9**.



**Figura 9: Injeção da suspensão de células no lobo inferior exposto (seta).**



A hemostasia foi feita por um bastão com algodão, aplicado diretamente sobre o local da injeção. Em seguida, colocou-se um dreno de tórax (Cateter intravenoso 16G) e a cavidade foi fechada, sendo as costelas aproximadas com um ponto de vycril 4-0, os músculos suturados com vycril 4-0, e a pele com mononylon 4-0. Retornou-se à pressão negativa do espaço pleural, através da drenagem e sucção com abocath 16G, conectado a uma seringa de 10mL. Quando os animais voltavam a respirar espontaneamente, o dreno e o tubo traqueal eram retirados e, após a aspiração das secreções da traquéia e orofaringe, a traquéia era fechada com um ponto simples de prolene 7-0.

## **2.9. Fases Experimentais**

Noventa e cinco ratos Wistar fêmeas, com peso médio de  $210 \pm 53$ g, foram divididos aleatoriamente em duas fases experimentais. A primeira fase (n=11), foi feita com o objetivo de desenvolver a técnica cirúrgica do implante tumoral, sendo nesta fase realizada a injeção intraparenquimatosa do veículo tumoral. A segunda fase (n=84), foi feita para o implante de células do tumor de Walker.

### **2.10. Fase 1. Desenvolvimento da técnica cirúrgica do implante tumoral**

Nesta fase foram feitos dois experimentos com o objetivo de se estabelecer a melhor via de intubação traqueal e desenvolver a técnica cirúrgica de toracotomia para a abordagem e exposição do pulmão (lobo inferior esquerdo) para o implante tumoral. No primeiro experimento (n=5), a anestesia foi feita com intubação orotraqueal. No segundo experimento (n=6), os animais foram todos submetidos a traqueostomia para canulação da traquéia e ventilação pulmonar durante o procedimento cirúrgico. Nos dois experimentos desta fase foi feita injeção intraparenquimatosa do veículo tumoral (ringer lactato + gentamicina). Após esta fase, estabeleceu-se que todos os animais seriam

anestesiados e intubados por traqueostomia, que mostrou ser um procedimento tecnicamente fácil de ser feito.

## **2.11. Fase 2. Implante de células do tumor de Walker e avaliação dos efeitos da talidomida**

Esta fase foi dividida em três etapas, sendo a etapa 1 (n=13), feita com o objetivo de se estabelecer o número de células necessárias para um bom índice de pega tumoral; a etapa 2 (n=24), para estabelecer a velocidade de crescimento tumoral e sobrevida dos animais; e a etapa 3 (n=47), para avaliar a ação antitumoral da talidomida no modelo de tumor estabelecido.

### **2.11.1. Etapa 1: Estabelecimento do número de células do implante tumoral**

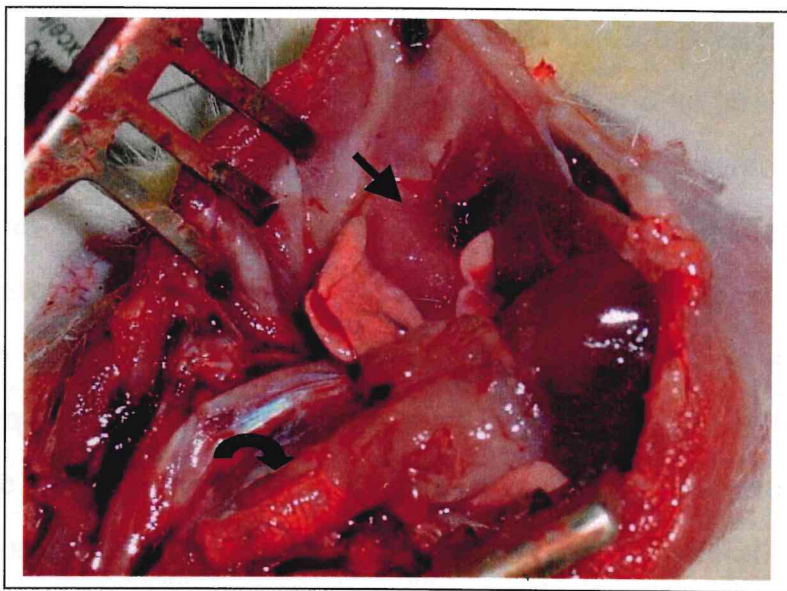
Esta etapa foi feita para se estabelecer o número de células necessárias para um bom índice de pega tumoral, sendo os animais divididos aleatoriamente em dois grupos: Grupo I (n=7), submetidos ao implante de  $5 \times 10^5$  células; e Grupo II (n=6), ao implante de  $2 \times 10^5$  células do tumor de Walker no parênquima pulmonar.

No décimo dia do implante tumoral os animais foram sacrificados e necropsiados, sendo a cavidade torácica aberta por esternotomia mediana (**figura 10**), para a retirada em bloco da traquéia, pulmões e coração. A seguir, passava-se um cateter na traquéia e injetava-se formol isotônico tamponado para fixação dos pulmões. Após 24 horas, os pulmões eram seccionados em fatias, colocados em álcool a 70% e encaminhados para estudo histopatológico.

Após esta etapa decidiu-se abreviar o dia do sacrifício dos animais, do décimo para o sexto dia, com o intuito de poder detectar o tumor em uma fase de nódulo pulmonar, quando a sua mensuração pudesse ser facilmente realizada.



Entretanto, para não sacrificar os animais às cegas, sem saber se o tumor havia ou não desenvolvido, propusemos a realização de tomografia de tórax em todos os animais no sexto dia do implante, o que foi feito em todos os experimentos a partir desta etapa.



**Figura 10: Necrópsia com exposição de todos os órgãos intratorácicos (seta reta: tumor no lobo inferior esquerdo; seta curva: traquéia) por cervico-esternotomia mediana.**

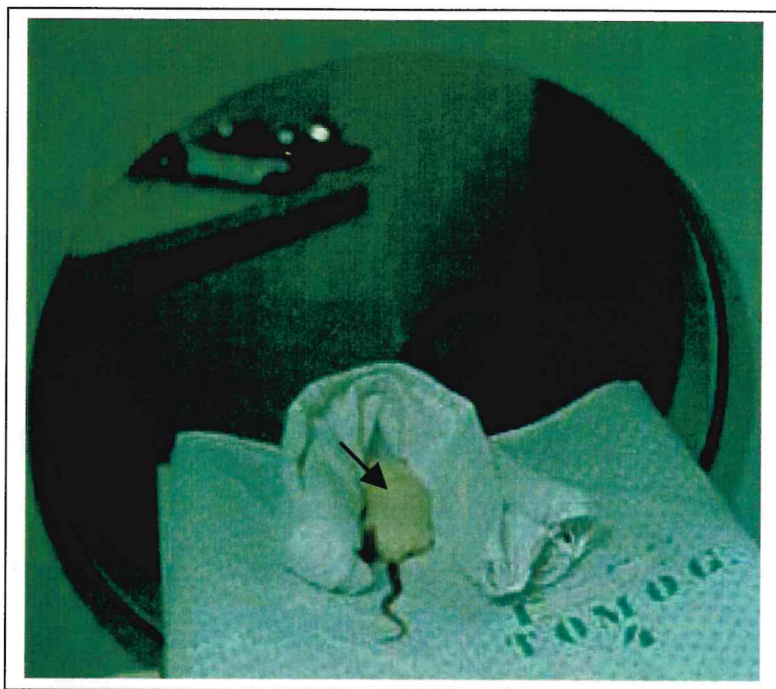
#### **2.11.2. Etapa 2. Estabelecimento da velocidade de crescimento tumoral e sobrevida dos animais**

Nesta etapa foram utilizados 24 ratos Wistar fêmeas, distribuídos aleatoriamente em dois grupos: Grupo I (n = 8); e Grupo II (n = 16). Nos animais dos dois grupos foi injetada uma suspensão contendo  $2 \times 10^5$  células do tumor de Walker no parênquima pulmonar pela técnica acima descrita. No final de cada experimento foram inoculadas  $10^6$  células nos músculos da coxa direita

de dois outros animais para se testar a viabilidade e a tumorigenicidade da suspensão de células usadas, conforme preconizado por Soares & Terra (1993).

Os animais do grupo I, no sexto dia do implante foram submetidos a tomografia computadorizada (TC) de tórax e, 12 horas depois, a necrópsia, sendo os pulmões retirados para se verificar o tamanho e a histologia do tumor. As tomografias foram realizadas em aparelho convencional da marca Siemens, somaton AR.TX, usando-se 130 KV, 50 mA, um tempo de corte de 3 segundos (150 MAS) e um FOV médio de 5 centímetros. Usou-se também um filtro de alta resolução, além de cortes com espessura de 2mm e intervalo de 2mm, iniciando-se no extremo ápice do tórax em sentido caudal até o diafragma. Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral a 10%, na dose de 0,1mL/30g de peso, por via i.p. e colocados em posição prona (**figura 11**) para serem tomografados. As imagens foram fotografadas na janela larga (1800/-800), para estudo dos pulmões, e janela estreita (400/40), para o estudo do mediastino. As medidas dos tumores foram feitas em duas dimensões (axiais e perpendiculares) usando-se a janela larga.

Na necrópsia, os tumores foram medidos manualmente (os dois diâmetros maiores), utilizando-se um paquímetro. As medidas foram inicialmente feitas em milímetros (mm), tanto na TC quanto na necrópsia, e depois convertidas em centímetros (cm) para a realização do cálculo do volume dos tumores em  $\text{cm}^3$  pela fórmula de Steel, 1977 ( $D \times d^2/2$ ), onde D e d são os diâmetros maior e menor, respectivamente.



**Figura 11:** Animal anestesiado e na posição prona (seta) para fazer tomografia.

Os animais do grupo II foram seguidos até sua morte natural, com pesagem diária, para análise da curva de peso e da sobrevivência. Após a morte foram submetidos a necrópsia e os pulmões retirados para exame histopatológico.

### **2.11.3. Etapa 3. Avaliação da ação antitumoral da talidomida, no modelo estabelecido**

Nesta etapa, para se avaliar o efeito antitumoral da talidomida no modelo estabelecido, foram utilizados 47 ratos distribuídos em quatro grupos: I ou controle (n=7); II ou Talidomida (TLD) 45mg/kg/dia/sc (n=17); III ou TLD 180mg/kg/dia/sc (n=9); IV ou TLD 45mg/kg/dia/sc (n=14). Os animais dos

grupos I, II e III foram submetidos a TC e necrópsia no sexto dia do implante tumoral, quando os tumores foram medidos manualmente (diâmetros maior e menor) utilizando-se um paquímetro e o volume dos tumores calculado em  $\text{cm}^3$  ( $D \times d^2/2$ ). Os animais do grupo IV foram seguidos até sua morte natural para análise da curva de peso e da sobrevida.

## **2.12. Análise Estatística**

Os dados de volume tumoral obtidos na TC e na necropsia foram comparados pelo teste de regressão linear simples. A comparação do volume tumoral entre os diversos grupos experimentais foi feita pela análise de variância (ANOVA) e teste “t” de Student. As taxas de sobrevida foram calculadas pelo teste de Kaplan-Meier e a diferença de sobrevida entre os grupos pelo teste de *Log-Rank*. Os dados foram analisados pelo pacote estatístico *StatView* em um computador pessoal, sendo os valores de  $p < 0,05$  considerados significativos.

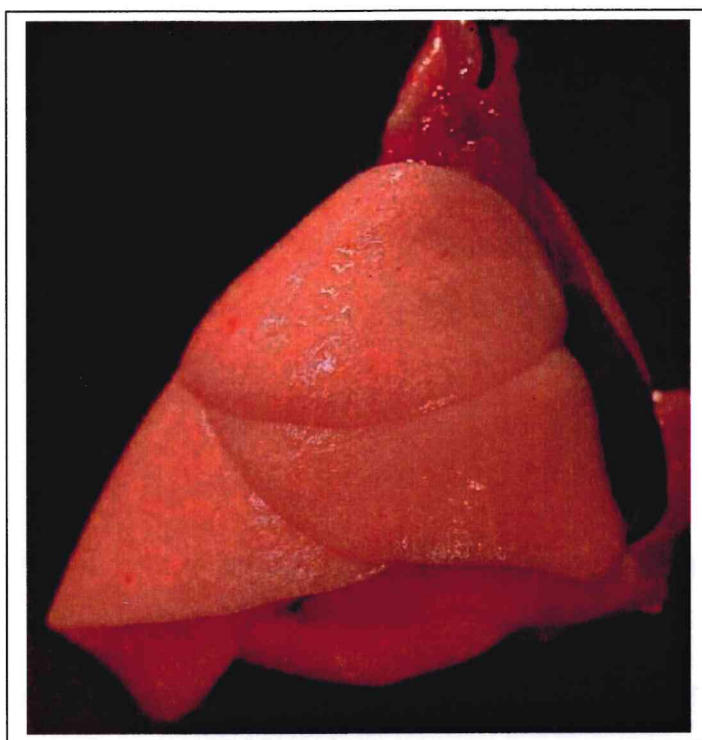
### **3. RESULTADOS**

### 3.1. Fase 1. Desenvolvimento da técnica cirúrgica do implante tumoral

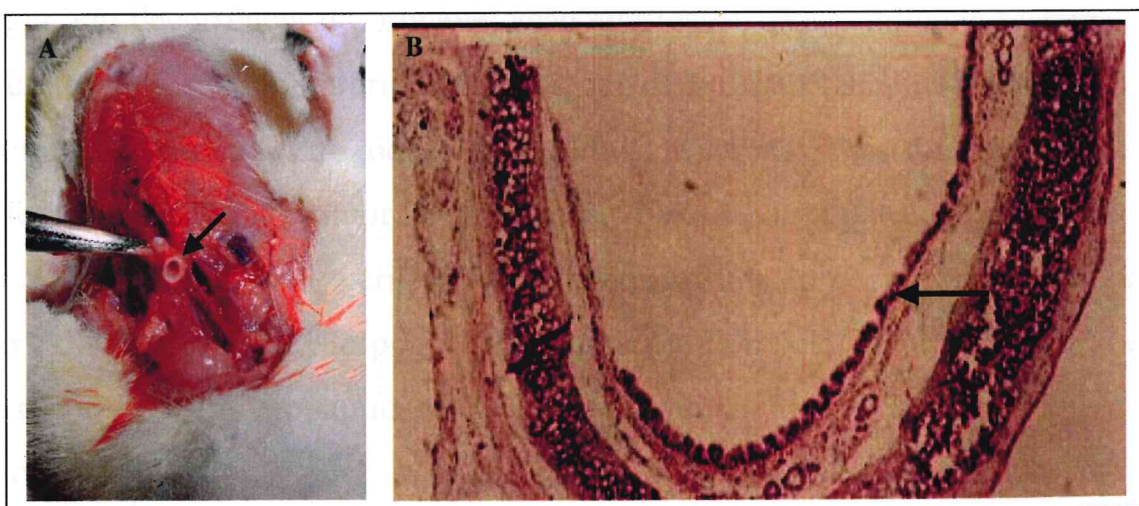
Nesta fase foram feitos dois experimentos, com uma mortalidade cirúrgica de 27,3% (3/11), sendo três óbitos no primeiro experimento e nenhum no segundo experimento. Os animais do primeiro (n=5) experimento que morreram haviam sido intubados por via orotraqueal e, em um deles, confirmou-se na necrópsia que a cânula estava no esôfago. Os outros dois animais morreram por hipóxia em decorrência de falha na ventilação atribuída a um defeito no ventilador. Os animais do segundo experimento (n=6), foram todos submetidos a traqueostomia para canulação da traquéia. Neste experimento, houve um óbito no pós-operatório imediato por insuficiência respiratória e na necrópsia encontrou-se um grande abscesso ocupando todo o pulmão direito, não tendo sido por isto, incluído nos casos de mortalidade cirúrgica. Os outros animais que foram sacrificados no décimo dia apresentaram os pulmões macro e microscopicamente normais (**figura 12**). Nenhum animal dos dois experimentos complicou com estenose traqueal pós-traqueostomia. As **figuras 13 a e b** mostram uma secção transversal da traquéia ao nível da traqueostomia vistas na necrópsia e no exame histopatológico sem nenhuma redução do lume traqueal.

Após esta fase estabeleceu-se que todos os animais seriam anestesiados e intubados por traqueostomia, que mostrou ser um procedimento tecnicamente fácil de ser feito e sem complicações imediatas ou tardias.





**Figura 12: Pulmões normais de animais sacrificados no 10º dia da toracotomia.**



**Figuras 13 a e b: Seção transversal da traquéia ao nível da traqueostomia vista na necrópsia (a) e no exame histopatológico (b), sem nenhuma redução do lume traqueal.**

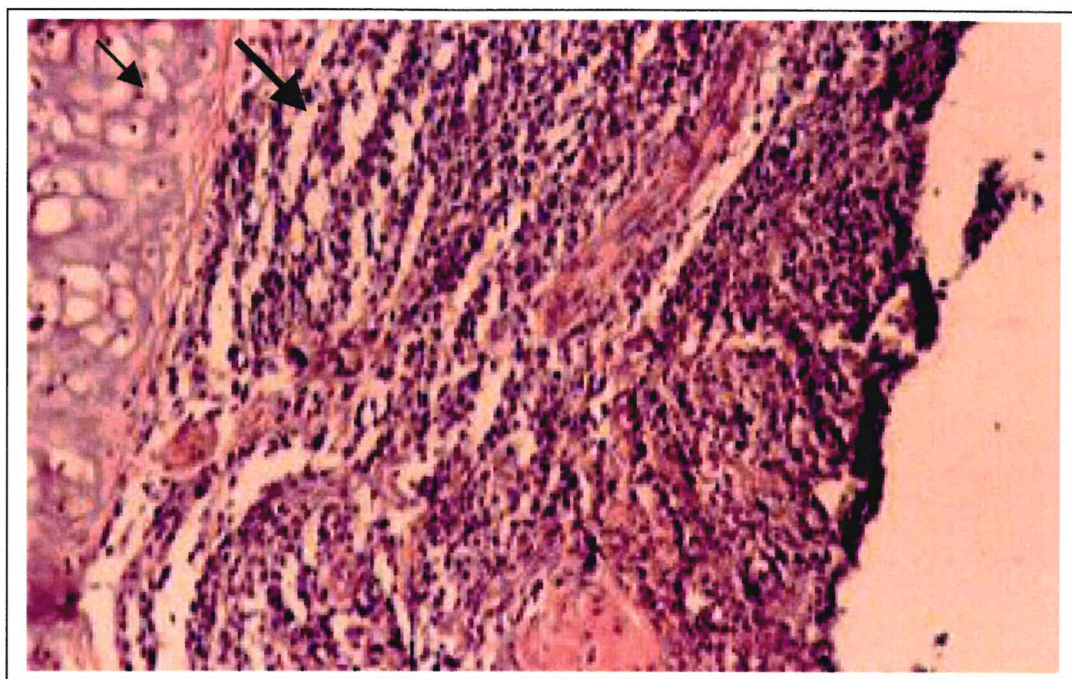
### **3.2. Fase 2. Implante de células do tumor de Walker e avaliação dos efeitos da talidomida.**

Os resultados desta fase foram divididos em três etapas. Na Etapa 1, (n=13) estabeleceu-se o número de células necessárias para um bom índice de pega tumoral; na etapa 2 (n=24), estabeleceu-se a velocidade de crescimento tumoral e sobrevida dos animais; e na etapa 3 (n=47), avaliou-se a ação antitumoral da talidomida no modelo estabelecido.

#### **3.2.1. Etapa 1: Número de células versus índice de pega tumoral.**

Nos animais do grupo I (n=7), submetidos ao implante de  $5 \times 10^5$  células do tumor de Walker no parênquima pulmonar, houve 2 óbitos cirúrgicos. O primeiro animal morreu por hipoxemia e na necrópsia foi confirmada a presença de uma perfuração da porção membranosa da traquéia ocorrida no momento da passagem da cânula traqueal. O segundo animal morreu por depressão respiratória após a cirurgia, em decorrência de provável ação anestésica. Dos 5 animais restantes, 2 morreram no 8º pós-operatório (PO) e os outros 3 foram sacrificados no 10º dia do implante tumoral. Em todos os 5 animais necropsiados, foi confirmada a proliferação maciça do tumor no pulmão pelo exame histopatológico (índice de pega: 100%). Em 2 deles verificou-se também infiltração neoplásica na traquéia (**figura 14**), provavelmente pelo extravasamento de células para a via aérea em decorrência da grande quantidade de células tumorais inoculadas no parênquima pulmonar.

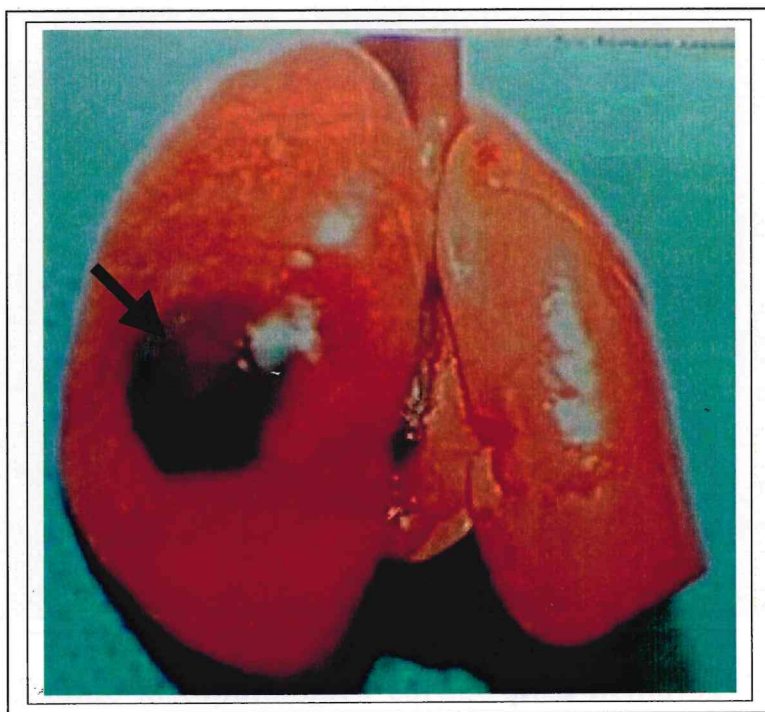




**Figura 14: Traquéia com cartilagem normal (seta fina) e com tumor infiltrando a submucosa e mucosa traqueal (seta grossa).**

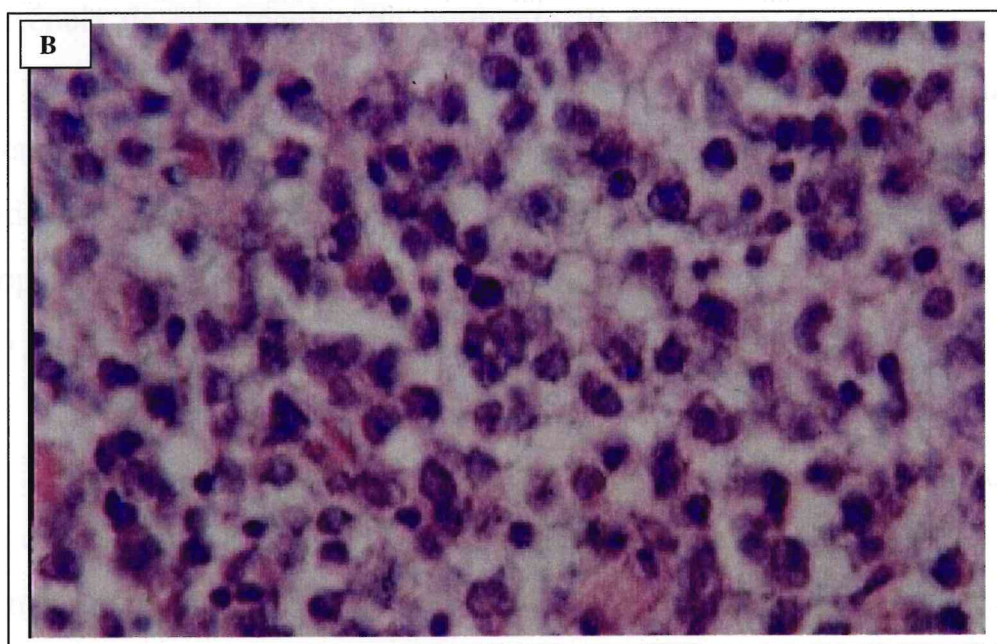
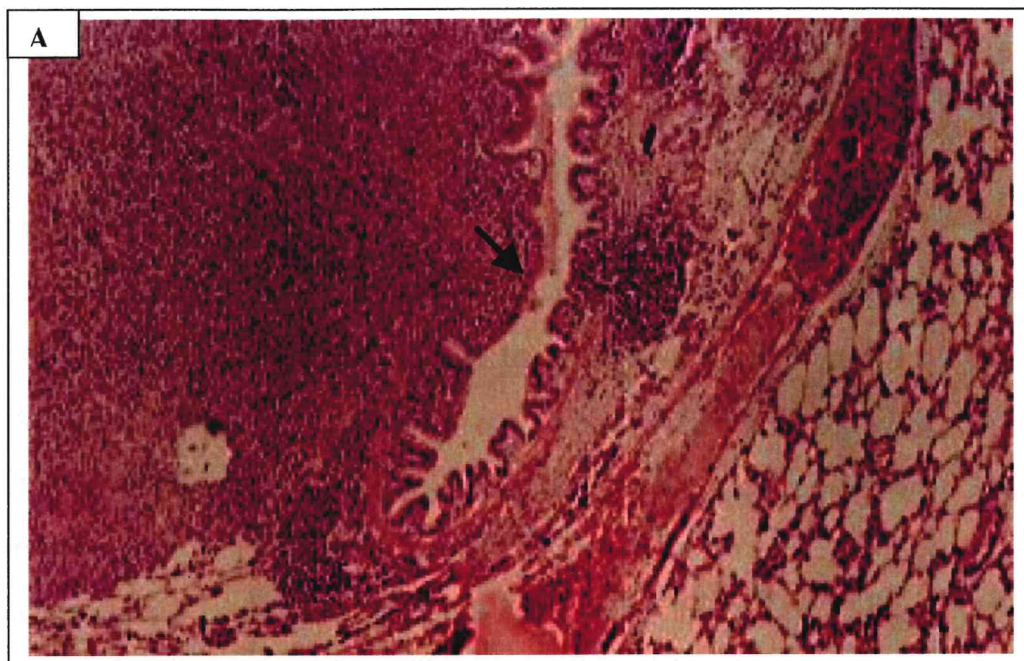
Nos animais do grupo II (n=6), submetidos ao implante de  $2 \times 10^5$  células do tumor de Walker no parênquima pulmonar, não houve óbito operatório. Entretanto, morreram 2 animais (8º e 9º dia do implante) por hemotórax maciço, verificado na necrópsia. Os 4 animais restantes foram sacrificados no décimo dia, tendo sido confirmada a presença de tumor em todos eles. O índice de pega neste grupo foi de 66,7% (4/6), sendo confirmada a presença de tumor na necrópsia (**figura 15**), e no exame histopatológico (**figura 16 a e b**). Especula-se a possibilidade de ter havido um erro técnico, como provável causa das complicações pleurais (hemotórax) e da ausência de implante tumoral nos dois animais que morreram no oitavo e nono dia do implante. Nenhum animal desta etapa evoluiu com estenose traqueal pós-traqueostomia. O índice geral de pega do tumor nesta etapa foi de 81,8% (9/11) e a mortalidade cirúrgica de 15,4% (2/13).

Com base nos resultados observados nos dois grupos de experimentos, decidiu-se, a partir desta etapa, usar uma quantidade menor de células (200.000 células), uma vez que os animais submetidos ao implante de 500.000 células ( $5 \times 10^5$ ), apresentaram uma proliferação maciça do tumor em todo o pulmão, impossibilitando assim, a mensuração do tumor para comparação com outros grupos experimentais. Decidiu-se também abreviar o dia do sacrifício dos animais, do décimo para o sexto dia, com o intuito de poder detectar o tumor em uma fase de nódulo pulmonar, quando a sua mensuração pudesse ser facilmente realizada. Entretanto, para não sacrificar os animais às cegas, sem saber se o tumor havia ou não desenvolvido, propusemos a realização de tomografia de tórax em todos os animais no sexto dia do implante, o que foi feito a partir desta etapa.



**Figura 15: Tumor no pulmão (seta) de animal sacrificado no décimo dia do implante de  $2 \times 10^5$  células do tumor de Walker.**





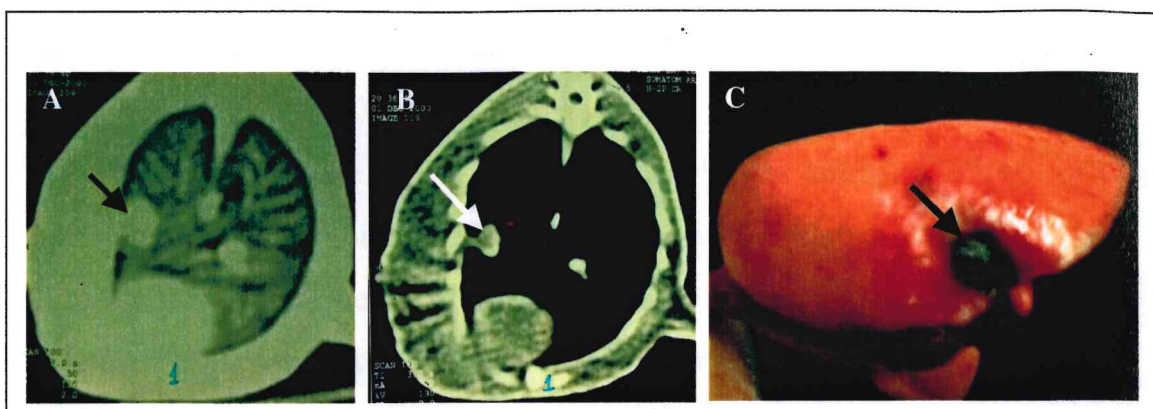
**Figura 16: Exame histopatológico corado pela hematoxilina-eosina (HE). A) Tumor infiltrando a parede de brônquio segmentar (seta). B) Grande aumento (200X) mostrando as células tumorais com forma poligonal ou arredondada com núcleos volumosos, substituindo todo o parênquima pulmonar nesta área.**

### 3.2.2. Etapa 2. Crescimento tumoral e sobrevida dos animais.

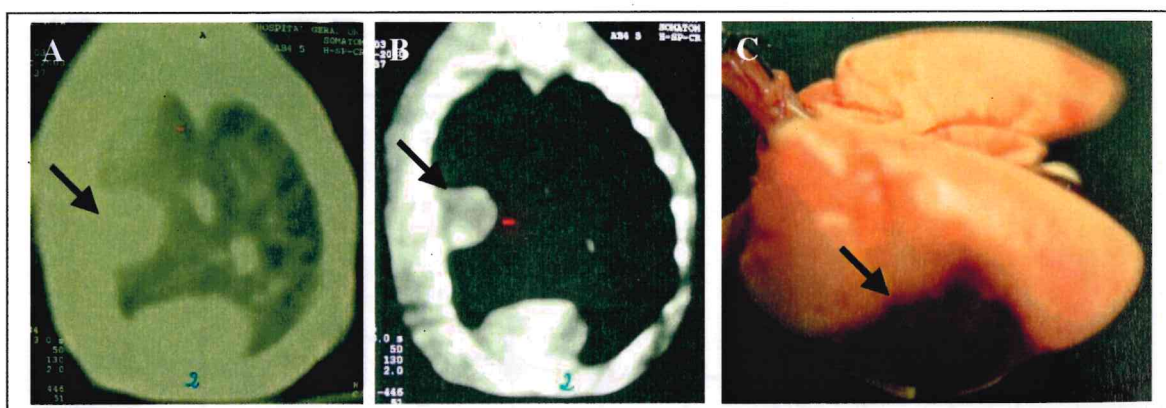
A mortalidade cirúrgica nesta etapa foi de 12,5% (3/24). No grupo I (n=8), morreu um animal por insuficiência ventilatória obstrutiva no pós-operatório imediato (POI). O animal respirou espontaneamente após o fechamento da toracotomia, entretanto, imediatamente após o fechamento da traquéia (traqueorrafia) entrou em apnéia. Na tentativa de reanimá-lo, liberou-se o ponto da traquéia e o animal começou a respirar novamente. Isto foi feito por três vezes, mas o animal finalmente morreu. Neste caso foi verificado na necropsia que a traqueostomia havia sido feita ao nível da região cricotraqueal que por se tratar de uma região de estreitamento da via aérea, o animal não suportou o fechamento da traquéia, o que o levou ao óbito. No grupo II (n=16), houve dois óbitos, tendo sido um por perfuração da porção membranosa da traquéia, em decorrência de erro técnico no momento da passagem da cânula traqueal, e o outro por depressão respiratória após a cirurgia, por provável ação anestésica. Foi também excluído um rato do grupo II que morreu no nono PO e que, quando foi visto, já se encontrava em estado de putrefação, não tendo sido necropsiado. Restaram, portanto, 20 animais, sendo 7 pertencentes ao grupo I e 13 ao grupo II.

Todos os animais do grupo I, submetidos a TC de tórax e a necrópsia no sexto dia (exemplos: **figura 17 e 18**), apresentaram tumor no pulmão visto pelos dois métodos diagnósticos. Os diâmetros médios (maior e menor) dos tumores foram respectivamente, 0,643cm e 0,471cm. A presença de tumor no pulmão foi confirmada pelo exame histopatológico em todos os animais. Observou-se também muitos focos de necrose em todas as peças examinadas.





**Figura 17:** TC de tórax (A = janela de pulmão, B = janela de mediastino) e peça de necrópsia (C) do animal 1, no 6º dia de implante tumoral, mostrando o tumor (seta).



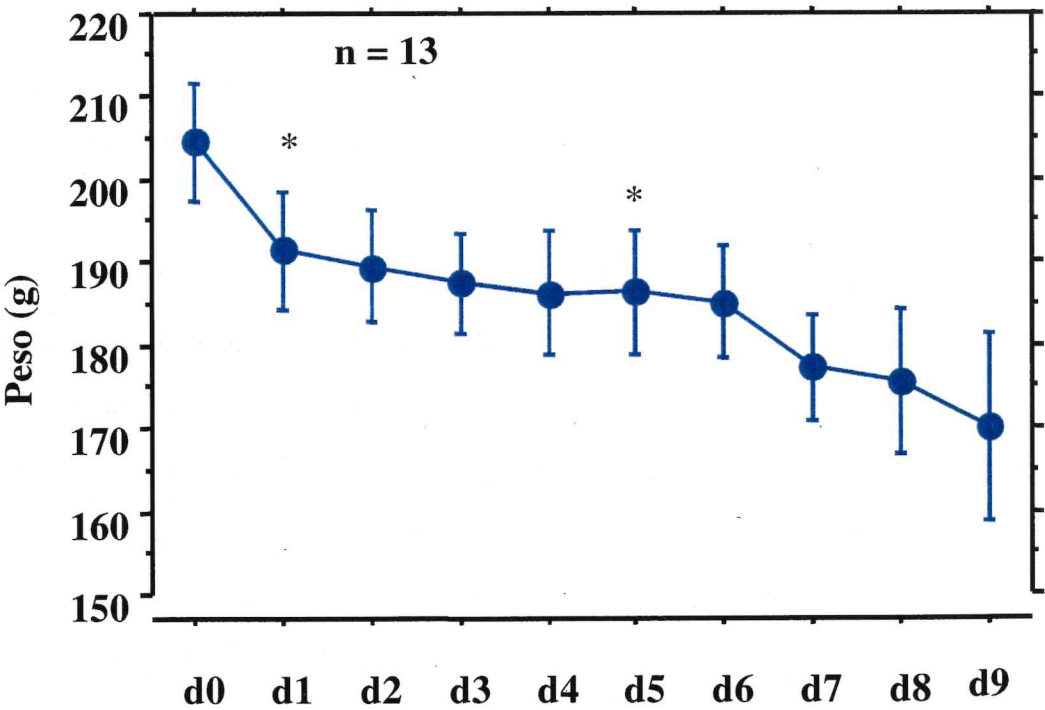
**Figura 18.** TC de tórax (A = janela de pulmão, B = janela de mediastino) e peça de necrópsia (C) do animal 2, no 6º dia de implante tumoral, mostrando o tumor (seta).

Os animais do grupo II apresentaram perda de peso progressiva (**figura 19**), a partir do dia do implante tumoral e morreram todos por insuficiência respiratória, em decorrência da proliferação maciça do tumor em todo o pulmão. No sexto dia do implante tumoral (d5), os animais já apresentavam perda de peso significativa ( $p < 0,04$ ) em relação ao 1º. PO (d1). A sobrevida média foi de 10,1 dias e a mediana de 10 dias. A presença de tumor no pulmão foi também

confirmada pelo exame histopatológico em todos os animais deste grupo, obtendo-se portanto, um índice de pega de 100% (20/20), nos dois grupos.

Houve invasão de parede torácica em 10% dos animais (2/20), sendo um animal do grupo I, e o outro do grupo II. As invasões de parede foram vistas na TC e confirmadas na necrópsia e pelo estudo histopatológico. Houve também metástase para a região cervical em um dos animais do grupo II.

Dos animais que foram submetidos ao implante de  $10^6$  células nos músculos da coxa para se testar a viabilidade e a tumorigenicidade das células usadas nos experimentos, constatou-se no oitavo dia, o desenvolvimento macroscópico e microscópico de tumor em todos eles.



**Figura 19.** Curva de peso diário dos animais, do dia do implante (d0) de  $2 \times 10^5$  células do tumor de Walker no parênquima pulmonar, ao nono dia (d9). Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão (EP). D5 versus D1: (p=0,09).

### 3.2.3. Etapa 3. Avaliação da ação antitumoral da talidomida, no modelo estabelecido.

A mortalidade cirúrgica nesta etapa foi de 14,9% (7/47), e dois ratos foram excluídos do estudo: o primeiro por ter apresentado nódulos pulmonares metastáticos bilaterais, por provável punção de um vaso sanguíneo no momento do implante das células tumorais; e o segundo que morreu no 1º. PO de causa desconhecida. Dos 38 animais seguidos até o final do experimento, 35 desenvolveram tumor (índice de pega = 92,1%). Em três destes animais constatou-se, além de tumor, a presença de atelectasia e consolidação pulmonar na TC e na necropsia, impossibilitando a medida exata dos diâmetros tumorais, sendo por isto excluídos também do estudo.

Finalmente, 32 animais foram incluídos no estudo para fins de análise e comparação dos resultados: Grupo I (controle), n=6; Grupo II (TLD-45), n=9; Grupo III (TLD-180), n=6; e Grupo IV (TLD-45, n=11).

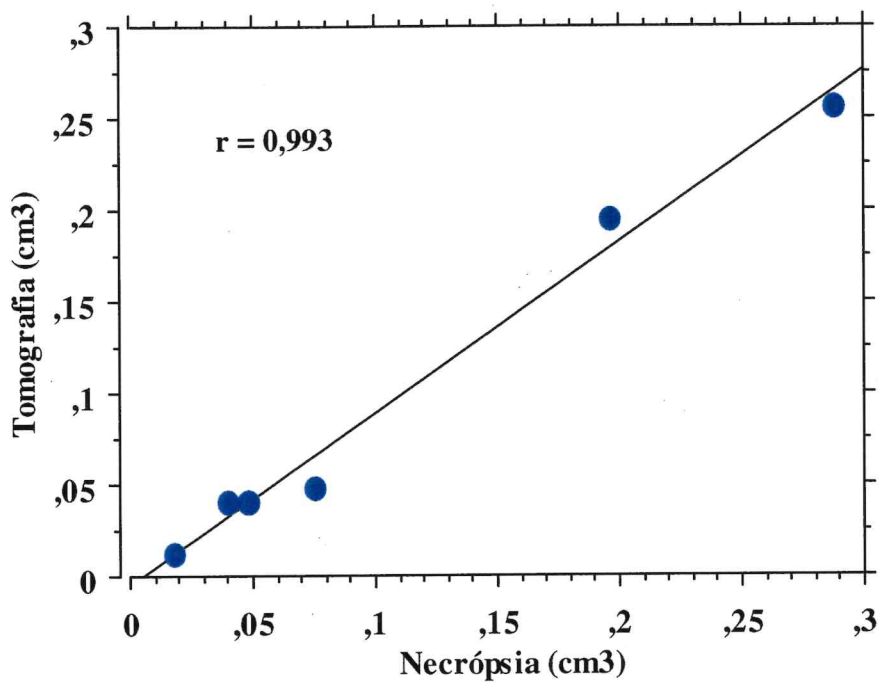
No sexto dia, foi realizada TC e necropsia nos animais do Grupo I, II e III, quando os tumores foram medidos manualmente (diâmetros maior e menor) utilizando-se um paquímetro e o volume dos tumores calculado em  $\text{cm}^3$  ( $D \times d^2/2$ ). As **tabelas 3, 4 e 5** mostram as medidas dos diâmetros e volumes tumorais obtidos na TC e na necropsia e a **figura 20** mostra uma correlação positiva entre os dois métodos ( $r=0,993$ ,  $p < 0,0001$ ). A TLD-45 e a TLD-180 reduziu de maneira significativa em 76,6% e 77,5% respectivamente o volume tumoral ( $p < 0,05$ ), comparado com o controle (**figura 21**). Entretanto, não houve redução significativa do volume tumoral entre os grupos da TLD-45 e TLD-180. Os volumes tumorais (média±erro padrão) dos grupos controle, TLD-45 e TLD-180 estão expressos na **tabela 6**. No exame histológico verificou-se a presença de menos focos de necrose tumoral nos grupos da TLD-45 e TLD-180 que no

controle. O cálculo dos volumes tumorais foi feito a partir das medidas obtidas dos diâmetros tumorais na necrópsia. Não foram usadas as medidas feitas na TC porque nem todos os animais dos três grupos experimentais realizaram tomografia de tórax. As **figuras 22 e 23** mostram imagens de tomografia e de peça cirúrgica de animais do grupo controle e de animais tratados com talidomida.

**Tabela 3:** Valores médios dos diâmetros e volumes tumorais de animais do grupo controle medidos na tomografia e na necrópsia, no dia do sacrifício dos animais (d6).

Rato	Tomografia (TC)		Necropsia (NEC)		TC	NEC
	Diâmetro maior (cm)	Diâmetro menor (cm)	Diâmetro maior (cm)	Diâmetro menor (cm)	V (cm <sup>3</sup> )	V (cm <sup>3</sup> )
1	0,5	0,4	0,5	0,400	0,040	0,040
2	0,8	0,80	0,9	0,800	0,256	0,288
3	0,5	0,4	0,6	0,400	0,040	0,048
4	0,6	0,2	0,4	0,300	0,012	0,018
5	0,6	0,4	0,6	0,500	0,048	0,075
6	0,8	0,70	0,8	0,700	0,196	0,196
Média	0,633	0,483	0,633	0,517	0,099	0,111
± EP	± 0,056	± 0,091	± 0,076	± 0,079	± 0,041	± 0,044





**Figura 20: Teste de regressão linear simples mostrando correlação positiva dos dados (volume tumoral em  $\text{cm}^3$ ) de tomografia com os de necrópsia dos animais do grupo controle.  $p < 0,0001$ .**

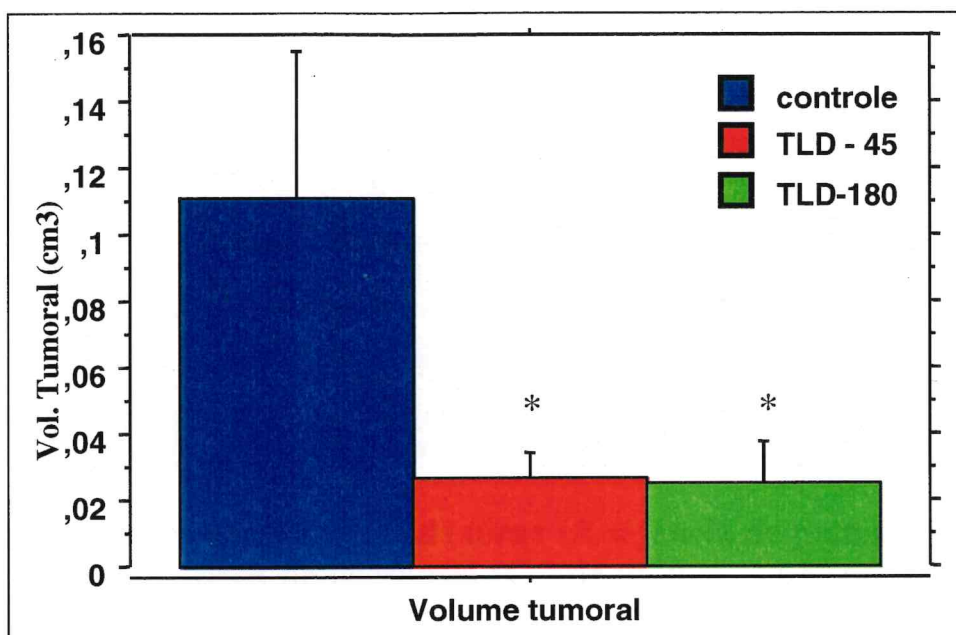
**Tabela 4:** Valores médios dos diâmetros e volumes tumorais de animais do grupo II (TLD-45) medidos na tomografia e na necrópsia, no dia do sacrifício dos animais (d6).

Tomografia (TC)			Necropsia (NEC)		TC	NEC
Rato	Diâmetro maior (cm)	Diâmetro menor (cm)	Diâmetro maior (cm)	Diâmetro menor (cm)	V (cm³)	V (cm³)
1	.	.	0,50	0,30	.	0,022
2	.	.	0,60	0,40	.	0,048
3	.	.	0,20	0,10	.	0,001
4	.	.	0,15	0,15	.	0,002
5	.	.	0,50	0,40	.	0,040
6	0,5	0,3	0,50	0,35	0,022	0,030
7	0,7	0,6	0,60	0,50	0,126	0,075
8	0,4	0,2	0,40	0,25	0,008	0,013
9	0,4	0,4	0,30	0,20	0,032	0,006
Média			0,417	0,294		0,026
± EP			± 0,055	± 0,044		± 0,008

(.) Animais que não foram submetidos a tomografia de tórax.

**Tabela 5:** Valores médios dos diâmetros e volumes tumorais de animais do grupo III (TLD-180) medidos na tomografia e na necrópsia, no dia do sacrifício dos animais (d6).

	Tomografia (TC)		Necrópsia (NEC)		TC	NEC
Rato	Diâmetro maior (cm)	Diâmetro menor (cm)	Diâmetro maior (cm)	Diâmetro menor (cm)	V (cm³)	V (cm³)
1	0,4	0,2	0,3	0,2	0,008	0,006
2	0,5	0,3	0,4	0,2	0,022	0,008
3	0,4	0,2	0,40	0,2	0,008	0,008
4	0,6	0,5	0,5	0,3	0,075	0,022
5	0,6	0,6	0,7	0,5	0,108	0,087
6	0,45	0,3	0,4	0,3	0,020	0,018
Média	0,492	0,35	0,450	0,283	0,040	0,025
± EP	± 0,037	± 0,067	± 0,056	± 0,048	± 0,017	± 0,013

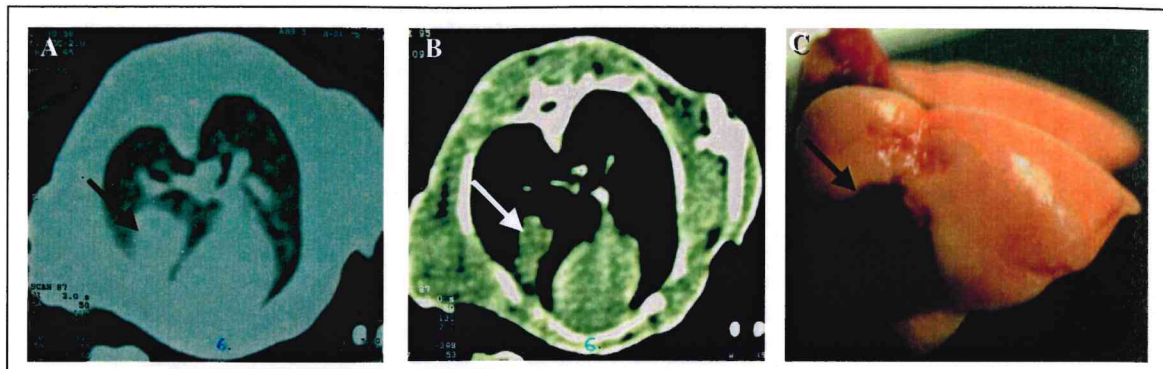


**Figura 21:** Gráfico do volume tumoral (média  $\pm$  erro padrão) dos animais submetidos ao implante de  $2 \times 10^5$  células de tumor de Walker e sacrificados no 6º dia do implante. (\*)  $p < 0,05$ , comparado ao controle.

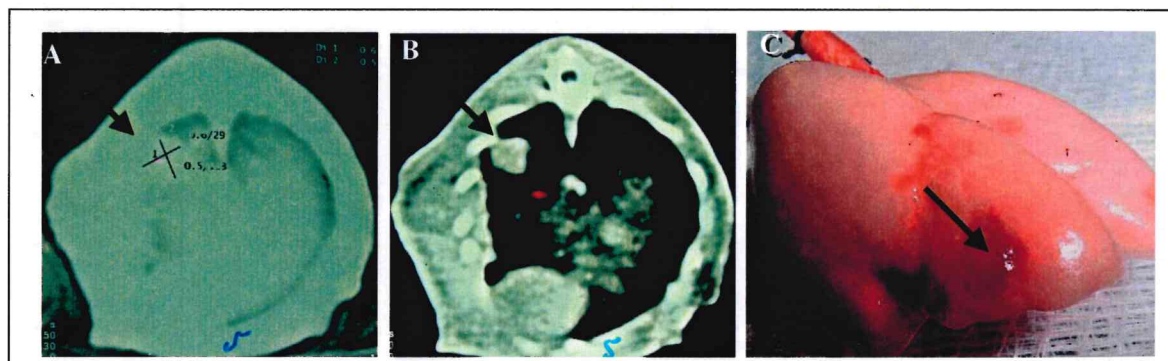
**Tabela 6:** Diâmetros e volumes tumorais dos três grupos de animais submetidos ao implante de  $2 \times 10^5$  células do tumor de Walker, medidos na necrópsia no dia do sacrifício (d6).

Grupos	Número de animais	Diâmetro maior (cm)	Diâmetro menor (cm)	V (cm <sup>3</sup> )
Controle	6	0,633 $\pm 0,076$	0,517 $\pm 0,079$	0,111 $\pm 0,044$
TLD - 45	9	0,417 $\pm 0,055$	0,294 $\pm 0,044$	0,026* $\pm 0,008$
TLD - 180	6	0,450 $\pm 0,056$	0,283 $\pm 0,048$	0,025* $\pm 0,013$

\*Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão. (\*)  $p < 0,05$ , comparado ao controle.



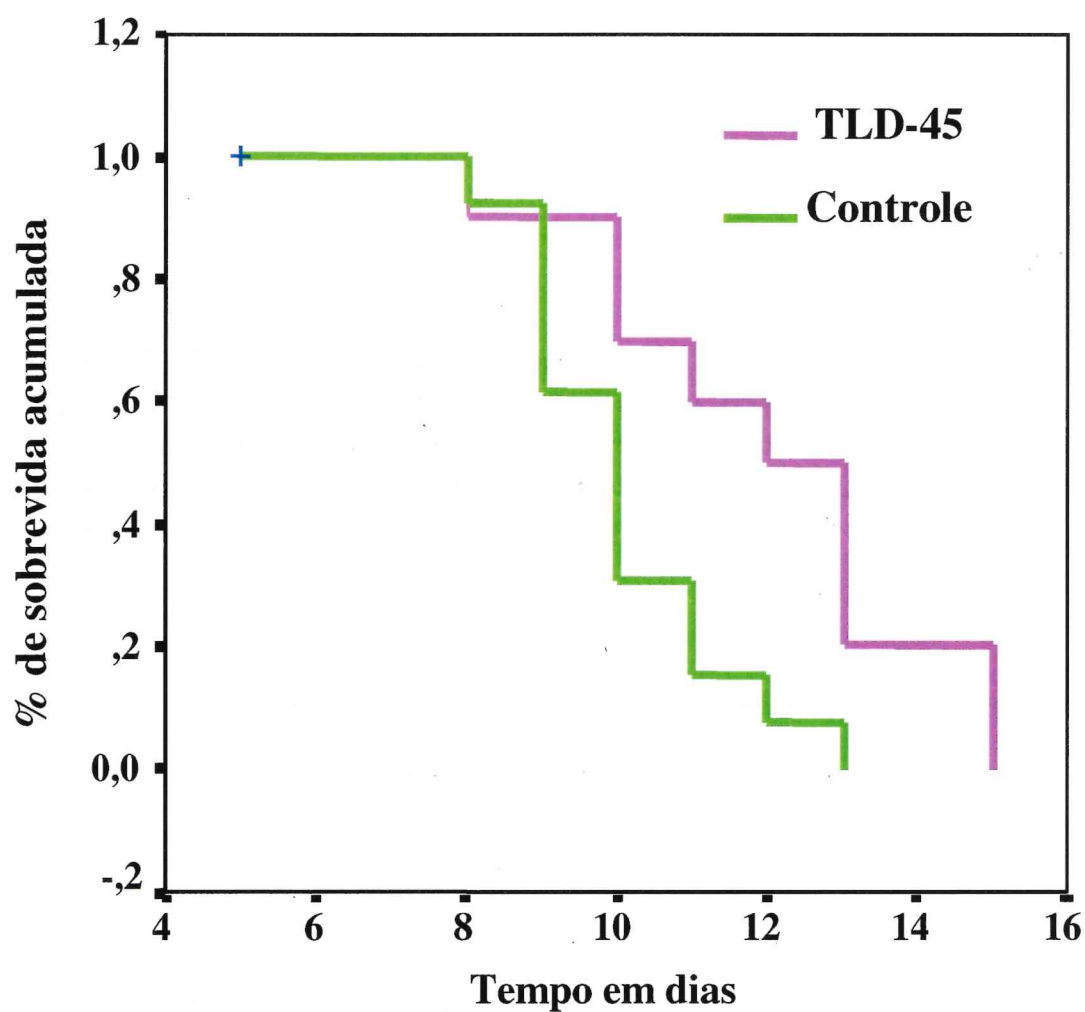
**Figura 22. Grupo controle. TC de tórax (A = janela de pulmão, B = janela de mediastino) e peça de necrópsia (C ) de animal, no 6º dia de implante tumoral, mostrando o tumor (seta).**



**Figura 23: Grupo TLD-180. TC de tórax (A = janela de pulmão, B = janela de mediastino) e peça de necrópsia (C ) de animal, no 60 dia de implante tumoral, mostrando o tumor (seta).**

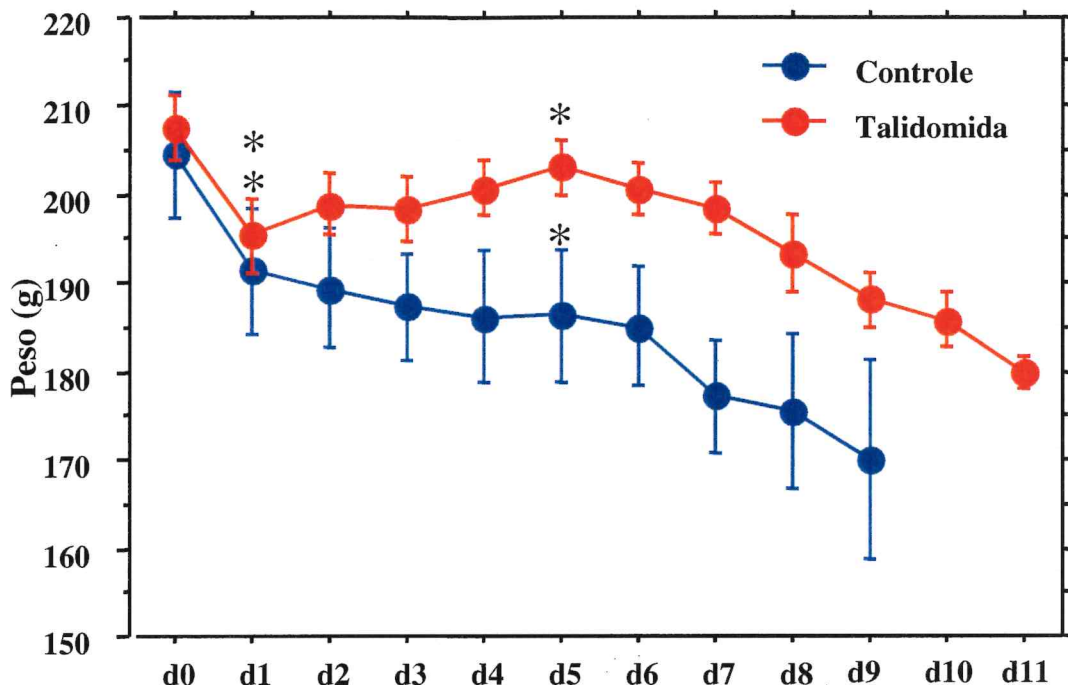
Na análise de sobrevida dos animais, verificou-se no grupo tratado com talidomida, na dose de 45mg/kg/dia (grupo IV), um aumento significativo da sobrevida (Teste de *Log Rank*:  $p=0,015$ ), quando comparado com o controle (grupo II da etapa 2). A sobrevida mediana dos animais do grupo controle foi de 10 dias, e a do grupo da TLD-45 foi de 12 dias (**figura 24**).

Verificou-se inibição inicial da caquexia no grupo da TLD-45, em relação ao controle. Os animais do grupo da talidomida apresentaram ganho de peso até o d5, enquanto os animais do grupo controle evoluíram com perda de peso progressiva a partir do dia do implante tumoral (**figura 25**).



**Figura 24: Sobrevida mediana: grupo controle: = 10 dias; grupo TLD-45 = 12 dias. Teste de Log Rank:  $p = 0,015$ .**





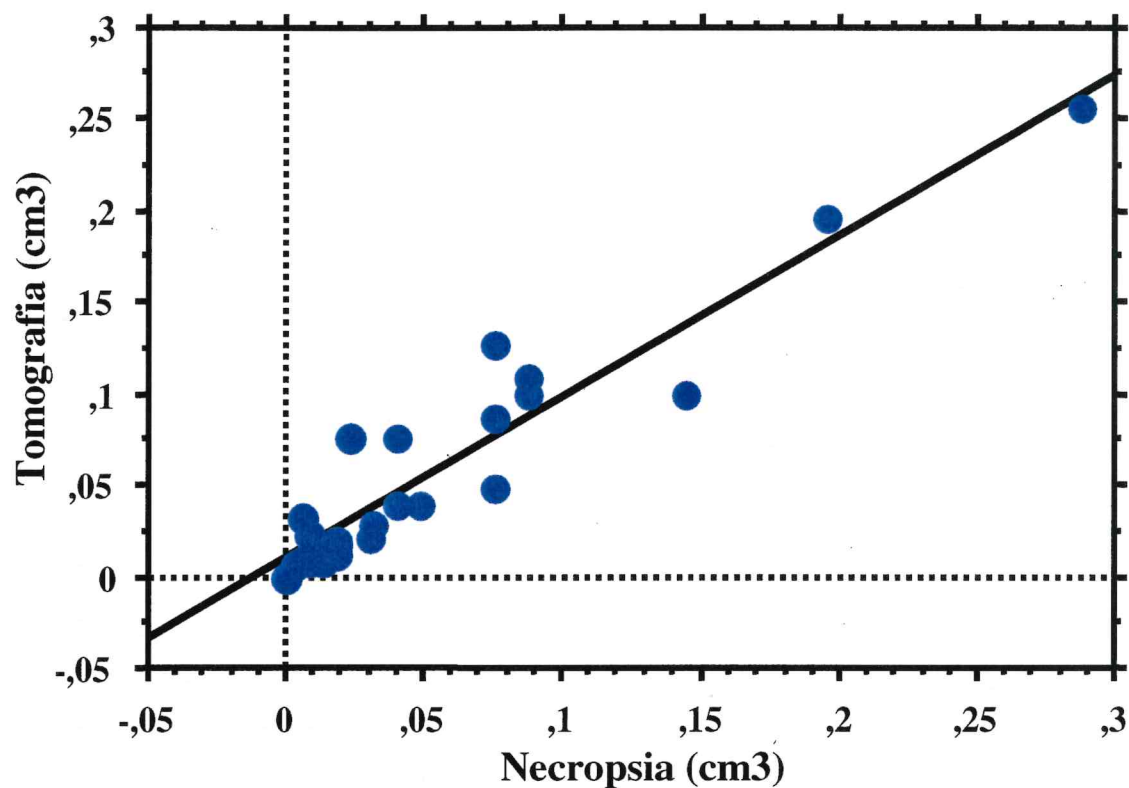
**Figura 25:** Curva de peso dos animais do 1º ao 12º dia. Os animais do grupo da talidomida ganharam peso até o d5 e os do grupo controle apresentaram perda de peso progressiva desde o d0. Teste t pareado (d5 em relação a d1): grupo controle ( $p=0,09$ ); grupo talidomida ( $p=0,04$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão.

### 3.3. Avaliação da eficácia da tomografia computadorizada no modelo de tumor de pulmão em rato.

Vinte e cinco animais foram submetidos a TC de tórax e a necrópsia no sexto dia do implante tumoral, sendo sete animais da etapa 2 (grupo I) e dezoito da etapa 3 (controle = 6, TLD-45 = 5 e TLD-180 = 7). A média de volume dos tumores em  $\text{cm}^3$  ( $D \times d^2/2$ ) obtida pelos dois métodos foi comparada. A TC mostrou tumor em 92% (23/25) dos animais e nos dois animais que não apresentaram tumor na tomografia, também não foi encontrado tumor no exame de necrópsia nem no histopatológico. Em todos os



outros animais, os dados da TC foram confirmados pelo exame dos pulmões na necrópsia e pelo exame histopatológico. Constatou-se também uma correlação positiva ( $r = 0,946$ ,  $p < 0,0001$ ) entre as medidas do tumor feitas na TC e na necropsia (**Figura 26 e Tabela 7**)



**Figura 26:** Comparação dos volumes tumorais (n=25) pelo teste de regressão simples.  $p < 0,0001$ ,  $r = 0,946$  e  $R^2 = 0,895$ .

**Tabela 7:** Valores médios dos volumes tumorais de 25 animais submetidos a tomografia e a necrópsia, no 6º dia do implante de  $2 \times 10^5$  células do tumor de Walker

No. de animais	Necropsia (V = cm³)	Tomografia (V = cm³)
1	0,087	0,100
2	0,075	0,087
3	0,040	0,075
4	0,004	0,006
5	0,018	0,018
6	0,032	0,029
7	0,144	0,100
8	0,040	0,040
9	0,288	0,256
10	0,048	0,040
11	0,018	0,012
12	0,075	0,048
13	0,196	0,196
14	0,030	0,022
15	0,075	0,126
16	0,000	0,000
17	0,013	0,008
18	0,006	0,032
19	0,006	0,008
20	0,000	0,000
21	0,008	0,022
22	0,008	0,008
23	0,022	0,075
24	0,087	0,108
25	0,018	0,020
<b>Média ± DP</b>	<b>0,54±0,68</b>	<b>0,57±0,64</b>

**3.4. Mortalidade cirúrgica e índice geral de pega tumoral.**

A mortalidade cirúrgica global foi de 15,8% (15/95), sendo 27,3% (3/11) na fase 1 e 14,3% (12/84) na fase 2 (**Tabela 8**), não havendo diferença significativa entre as diversas etapas experimentais.

O exame histopatológico confirmou a presença de tumor no lobo inferior do pulmão esquerdo em 64 dos 69 espécimes examinados, perfazendo um índice geral de pega em todos os grupos de 92,8% (**Tabela 9**).

Houve infiltração neoplásica da parede torácica em 10,1% dos animais (7/69), sendo todas as invasões da parede evidenciadas pela TC e confirmadas na necropsia e pelo exame histopatológico (exemplo: **figura 27 a, b,c e d**).

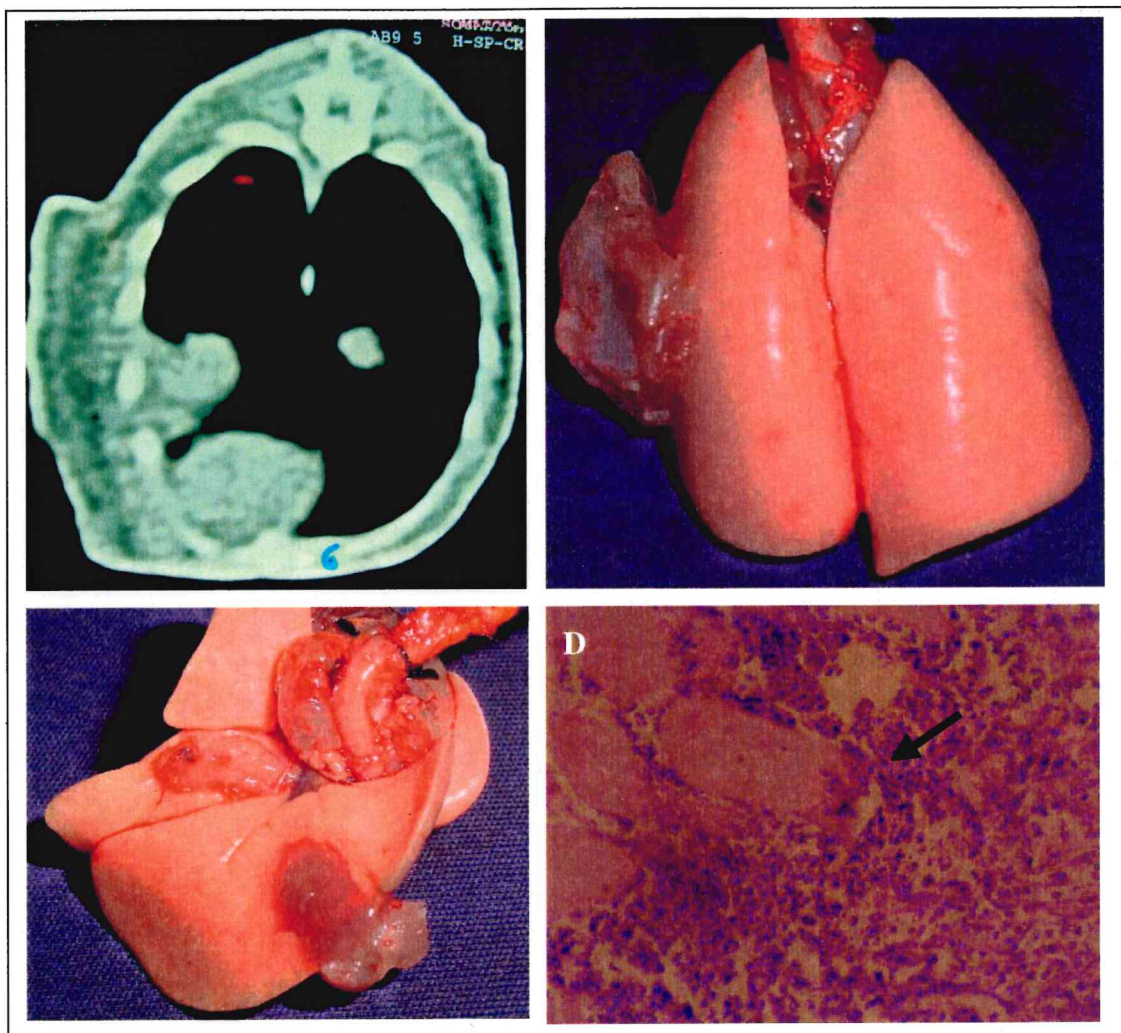
**Tabela 8:** Mortalidade cirúrgica dos animais submetidos a toracotomia e implante de células do tumor de Walker nas três etapas experimentais.

<b>Etapas</b>	<b>Nº de animais submetidos ao implante do tumor</b>	<b>Nº de animais que morreram</b>	<b>Mortalidade</b>
1	13	2	15,4%
2	24	3	12,5%
3	47	7	14,9%
Total	84	12	14,3%

**Tabela 9:** Índice geral de pega dos tumores nos animais submetidos a toracotomia e ao implante de células do tumor de Walker. Na etapa 1 foram implantadas  $5 \times 10^5$  (grupo I) ou  $2 \times 10^5$  (grupo II), e nas etapas 2 e 3 implantadas  $2 \times 10^5$  células.

Etapas	Nº de animais submetidos ao implante do tumor	Nº de animais que desenvolveram tumor	Índice de Pega tumoral
1	11	9	81,8%
2			
Grupo I	7	7	100%
Grupo II*	13	13	100%
3			
Controle	7	7	100%
TLD-45	13	11	84,6%
TLD-180	7	6	85,7%
TLD-45*	11	11	100%

\* Grupos de animais que evoluíram até a morte espontânea e foram submetidos à análise de sobrevida. Os animais dos outros grupos foram sacrificados no 6º. dia de implante tumoral.



**Figuras 27 A, B, C e D: Rato 6 do grupo do grupo controle (fase 2), apresentando infiltração tumoral da parede torácica. A). A tomografia mostra ausência de plano de clivagem do tumor com a parede torácica (seta). B e C). Pulmão esquerdo ressecado em bloco com o segmento infiltrado da parede torácica (seta). Observa-se a face posterior dos pulmões na figura B e a face anterior na figura C. D) Exame histopatológico corado pela HE, mostrando infiltração tumoral da musculatura estriada da parede torácica (seta).**

## **4. DISCUSSÃO**

#### **4.1. Estabelecimento de modelo experimental de tumor de pulmão com o carcinosarcoma de Walker**

McLemore e colaboradores (1987) e Wang e colaboradores (1997) descreveram modelos de tumor localizado de pulmão, os primeiros, em camundongos atímicos e os segundos, em ratos Fisher, utilizando a via endobrônquica para implante das células tumorais. Estes autores implantaram as células no pulmão (lobo inferior direito) por cateter passado através de punção da traquéia cervical, introduzindo-o pelo brônquio principal direito até o lobo inferior. Wang e colaboradores (1997) fizeram também a implantação de células tumorais por punção direta do parênquima pulmonar através de toracotomia, tendo ocorrido maior índice de pega nesta via que na via traqueal (100% versus 95%).

No modelo do presente trabalho optou-se por ratos ao invés de camundongos, pela toracotomia para inoculação de células diretamente no parênquima pulmonar, e pela traqueostomia para ventilação dos animais. O experimento em ratos permite a realização de procedimentos ou coletas de amostras repetidas de sangue, e o animal tolera maiores volumes tumorais. Além disso, o maior tamanho dos pulmões do rato permite a perfusão isolada do órgão com altas doses de quimioterápicos no tratamento de metástases e facilita a monitorização do crescimento tumoral por métodos de imagem em modelos de tumor localizado de pulmão (Abolhoda et al., 1997; Howard et al., 1991). O implante do tumor por toracotomia foi de fácil realização e as traqueostomias foram também feitas sem dificuldades técnicas, exceto pelas complicações e óbitos ocorridos no transoperatório inerentes às técnicas utilizadas, não tendo ocorrido complicações no pós-operatório imediato ou tardio. O tumor desenvolveu-se em 81,8% dos casos da etapa 1 e em 100% dos



casos na etapa 2 dos experimentos. O menor índice de pega na etapa 1 pode ser atribuído a provável erro técnico no momento da inoculação do tumor, em decorrência da curva de aprendizagem na implantação do modelo, visto que a partir desta etapa o índice de pega foi de 100% nos animais dos grupos-controle.

A importância de se criar um modelo experimental de tumor de pulmão se deveu inicialmente ao fato de se poder estudar o comportamento biológico do tumor, uma vez que, para uma mesma linhagem tumoral, o comportamento biológico não é o mesmo, quando ele é implantado em diferentes órgãos (Naito et al., 1986; Mclemore et al., 1987), de acordo com o conceito de Paget (1889). No modelo de tumor de pulmão descrito por McLemore e colaboradores (1987), a tumorigenicidade foi melhor e foi necessário o implante de uma quantidade menor de células ( $10^6$ ) no pulmão que no subcutâneo ( $10^7$ ) para ocorrer um bom desenvolvimento tumoral.

No presente modelo, foi necessária a inoculação de uma menor quantidade de células ( $2 \times 10^5$ ) do tumor de Walker que no modelo de tumor gástrico ( $10^6$ ) de Oliveira e colaboradores (1998), utilizando-se a mesma linhagem tumoral para se obter índices semelhantes de pega. É importante destacar também que o volume da suspensão do tumor a ser injetado no pulmão deve ser pequeno ( $<100 \mu\text{L}$ ) porque os animais não toleram a injeção de grandes volumes no parênquima pulmonar (Wang et al., 1997). Nesse modelo foram injetados no pulmão cerca de 50 a 70  $\mu\text{L}$  da suspensão do tumor, enquanto em outros modelos (Soares & Terra, 1993; Oliveira et al., 1998) a média de injeção foi de 1 mL.

O crescimento do tumor de Walker no pulmão foi muito rápido e no sexto dia do implante já havia um nódulo no pulmão, diagnosticado por TC e confirmado por necropsia e histopatologia. Wang e colaboradores (1997), usando uma técnica de implante semelhante, mas com outra linhagem tumoral, confirmaram a presença de nódulo pulmonar nos animais sacrificados no 7º dia do Implante. Howard e colaboradores (1991), usando a via endobrônquica em modelo de tumor em rato, para inoculação no pulmão de células de diferentes linhagens tumorais, observaram o desenvolvimento de tumor no pulmão somente a partir da terceira semana do implante. A presença de tumor no pulmão dos animais do presente modelo já no sexto dia do implante confirma não só o alto grau de agressividade do tumor de Walker, mas também o “microambiente” propício encontrado para o seu desenvolvimento.

Em outros modelos, utilizando o tumor de Walker e ratos Wistar, Iwama de Matos e colaboradores (1980), observaram uma tumoração na coxa dos animais no sétimo dia do implante intramuscular e Oliveira e colaboradores (1998), mostraram a presença de tumor no estômago no 10º dia do implante. Soares & Terra (1993), com a inoculação traqueal de  $2,5 \times 10^6$  células do tumor de Walker em ratos Wistar, produziu uma linfangite carcinomatosa em 40% dos animais sacrificados após o vigésimo primeiro dia, mas em nenhum dos animais sacrificados até o décimo quarto dia do implante. Neste caso, não houve desenvolvimento de nódulo tumoral nos pulmões. Eles supõem que o pequeno número de células injetadas ou a integridade do epitélio traqueal tenha impedido ou retardado o surgimento da linfangite carcinomatosa e das metástases linfonodais no modelo usado. Neste mister, Chalmer e colaboradores (1975), haviam demonstrado que o dano epitelial da traquéia de camundongos cronicamente expostos a fumaça de cigarro, facilitaria a disseminação e o desenvolvimento de tumor inoculado através da traquéia.

Entretanto, neste e em outros modelos de tumor de pulmão induzidos pela exposição a agentes carcinógenos (Paladugo et al., 1980; Reznik-Shüller & Gregg, 1981), os tumores desenvolveram-se de forma errática e geralmente eram difusos ou multicêntricos.

O índice de pega na etapa 2 dos nossos experimentos com a implantação de  $2 \times 10^5$  células do tumor foi de 100% (20/20), igual ao índice obtido por Wang e colaboradores (1997) com a implantação de  $1,5 \times 10^6$  células feita também por toracotomia, embora usando outra linhagem tumoral. O diferente número de células necessárias para o desenvolvimento do tumor no pulmão em modelos similares, se deveu ao uso de linhagens tumorais com características biológicas distintas. O índice de pega tumoral com o implante de células feito através da via endobrônquica nos relatos da literatura variou de 83 a 95% (Howard et al., 1991; Wang et al., 1997), portanto, sendo menor que no implante pulmonar por toracotomia. O índice de pega na etapa 3 foi de 92,1% (35 em 38 animais), entretanto, mesmo não tendo havido diferença estatisticamente significativa comparado ao da etapa 2, a discreta redução verificada nesta etapa, pode ter sido tanto decorrente de falha no implante, quanto atribuído ao efeito antitumoral da talidomida usada nesta etapa do trabalho.

A mortalidade cirúrgica no presente modelo foi de 27,3% (3/11) na fase 1 e de 14,3% (12/84) na fase 2. A menor taxa de mortalidade observada nos experimentos da fase 2 pode ser atribuída à melhor desenvoltura técnica da equipe, na medida em que se avançou nas etapas experimentais. Entretanto, essa mortalidade ainda está ligeiramente acima dos índices da literatura que variam de 5 a 10% (Howard et al., 1991; Wang et al., 1997).

No modelo do presente estudo observou-se 10,1% de invasão da parede torácica nos animais da fase 2, inicialmente atribuída a provável extravasamento das células tumorais para a cavidade torácica por erros técnicos no momento da implantação do tumor. Todavia, o fato de termos verificado um índice constante de invasão de parede em todas as etapas experimentais, nos levou a supor que isto possa ter sido pela progressão natural e a maior agressividade do tumor, que por ser periférico, tem geralmente a parede torácica como a primeira estrutura a ser invadida. Wang e colaboradores (1997) não observaram invasão tumoral de mediastino ou de parede torácica em modelo similar ao nosso, porém feito com linhagem tumoral diferente.

A sobrevida média dos animais no nosso modelo foi de 10,1 dias e no modelo de Wang e colaboradores (1997) foi de 24 dias, demonstrando mais uma vez, a maior agressividade do tumor de Walker em relação ao sarcoma induzido pelo metilcolantreno. Oliveira e colaboradores (1998) relataram uma sobrevida média de 13,2 dias, usando o mesmo tipo de tumor do nosso modelo, porém em órgão diferente. A variação do tempo de sobrevida dos ratos inoculados com o mesmo tipo de tumor, porém em órgãos diferentes, poderia ser explicada tanto pela teoria de Paget (1889), quanto pelo fato de o pulmão ser um órgão vital, onde o crescimento maciço do tumor provocaria insuficiência respiratória e morte dos animais, antes que se instalassem as manifestações da disseminação sistêmica da doença.

A boa correlação dos dados de tomografia com os de necropsia observada no modelo estudado ( $r=0,946$ ,  $p<0,0001$ ), oferece a possibilidade do uso de um procedimento não invasivo (TC), para um monitoramento periódico e acurado do crescimento tumoral e, conseqüentemente, para a avaliação da resposta terapêutica de novas drogas anti-neoplásicas. Na literatura há poucos

relatos do uso de TC em modelos experimentais (Palus et al., 2000), embora a radiografia já tenha sido usada em modelo de tumor de pulmão e em outros modelos (Mclemore et al., 1987; Howard et al., 1991; Oliveira et al., 1998; Le Pimpec-Barthes et al., 1999), porém com objetivos demonstrativos e não de mensuração da lesão. As tomografias foram feitas com um intervalo de corte de 2mm e permitiram detectar o tumor no pulmão até 2mm de diâmetro, quando na necropsia só podia ser encontrado pela palpação delicada do pulmão. A TC foi também precisa na localização da lesão no parênquima pulmonar e na invasão da parede torácica, o que seguramente não seria revelado por radiografia convencional de tórax. Por fim, ressalta-se que não houve dificuldade para se realizar as tomografias nos animais, embora eles tivessem que ser anestesiados para serem submetidos ao exame, conforme foi descrito na metodologia deste trabalho. Vale lembrar que, em humanos, principalmente crianças, e adultos em situações especiais como distúrbios neuropsiquiátricos, também necessitam ser anestesiados para que as tomografias possam ser adequadamente realizadas.

O modelo de tumor de pulmão descrito neste trabalho oferece também a possibilidade de testes *in vivo* de novas drogas com ação antitumoral, além de permitir o estudo da farmacocinética, farmacodinâmica e da biologia tumoral que, certamente, no pulmão é diferente dos outros órgãos.

#### **4.2. Avaliação do efeito antitumoral da talidomida no modelo de tumor de pulmão.**

D'Amato e colaboradores (1994) mostraram pela primeira vez o efeito antiangiogênico da talidomida em modelo de angiogênese induzido pelo bFGF implantado na forma de “pellet” em córnea de coelho. Neste modelo, a

talidomida administrada na dose de 200mg/kg inibiu em 36% a neovascularização da córnea. Os autores postularam que a inibição da formação de novos vasos a partir dos brotos vasculares pré-existentes na córnea pela talidomida, ocorreria também durante o desenvolvimento fetal, sendo responsável pelo bloqueio do crescimento dos membros. Posteriormente, Kruse e colaboradores (1998), demonstraram também inibição da neovascularização pela talidomida em modelo de angiogênese induzido pelo VEGF implantado na forma de “pellet” em córnea de coelho.

A inibição da angiogênese de córnea pela talidomida ocorre por duas vias diferentes, através do bloqueio da expressão de  $\alpha_v\alpha_3$  integrina induzida pelo bFGF e de  $\alpha_v\alpha_5$  integrina pelo VEGF (D’Amato et al., 1994; Kruse et al., 1998), embora o mecanismo exato do efeito antiangiogênico desta droga ainda seja desconhecido. Os autores não observaram efeitos colaterais tipo sedação, neurotoxicidade ou perda de peso nos animais tratados com talidomida.

Os resultados obtidos no presente trabalho apontam um efeito da talidomida sobre o crescimento tumoral e a sobrevivência dos animais. Foi observada uma inibição do crescimento do tumor que pode ser traduzido como um retardo no crescimento tumoral nos animais tratados com talidomida na dose de 45mg/kg/dia e 180mg/kg/dia, e sacrificados no sexto dia do implante tumoral. Houve uma redução de maneira significativa em 76,6% e 77,5% do volume tumoral ( $p < 0,05$ ), respectivamente, nos animais tratados como TLD-45 e TLD-180, em relação ao controle. O volume tumoral foi reduzido de  $0,111 \pm 0,044 \text{ cm}^3$  no grupo controle para  $0,026 \pm 0,008 \text{ cm}^3$  e  $0,025 \pm 0,013 \text{ cm}^3$ , no grupo da TLD-45 e TLD-180, respectivamente.

No exame histopatológico verificou-se de forma qualitativa uma diminuição das áreas de necrose tumoral nos animais tratados com talidomida em comparação ao controle que geralmente apresentava extensas áreas de necrose tumoral. A inibição da angiogênese não deve ser a única causa da diminuição da necrose tumoral nos animais tratados pela talidomida, uma vez que a inibição da angiogênese nos tumores sólidos geralmente aumenta a necrose tumoral, conforme demonstrado por Shalinsky e colaboradores (1999). Entretanto, estes autores observaram aumento da necrose tumoral de uma linhagem celular do câncer de pulmão não pequenas células humano, implantada no subcutâneo de camundongos atímicos, iniciando-se o tratamento dos animais com um inibidor seletivo da metaloproteinase, com comprovada ação antiangiogênica, a partir do quinto dia de implante, quando o tumor já havia se desenvolvido. No presente estudo, o tratamento dos animais com talidomida foi iniciado 12 horas antes do implante tumoral e continuado até o dia do sacrifício dos animais (sexto dia). A presença de necrose mais extensa nos animais do grupo controle pode ser explicada pelo rápido crescimento do tumor que no sexto dia já apresentava um diâmetro maior de  $0,633 \pm 0,056$  cm, sendo o crescimento rápido decorrente provavelmente do comportamento biológico agressivo do tumor de Walker (Iwama de Matos et al., 1980). Howard e colaboradores (1991), observaram que o grau de necrose tumoral estava diretamente relacionado com a taxa de crescimento tumoral. Eles constataram que a linhagem tumoral de crescimento rápido exibiu mais necrose que a linhagem de crescimento tumoral lento. O pequeno tamanho que o tumor alcançou no 6º dia, com um diâmetro maior de  $0,417 \pm 0,055$  cm e  $0,45 \pm 0,056$  nos animais tratados respectivamente, com TLD-45 e TLD-180, mostra que o tumor teve um crescimento mais lento, o que poderia explicar a menor incidência de necrose tumoral nos animais do presente estudo.



A redução do crescimento tumoral nos animais tratados com talidomida pode não ter ocorrido pela inibição da angiogênese, embora um efeito antiangiogênico, por si só, possa ter sido suficiente para retardar o crescimento tumoral dos animais tratados. Bauer e colaboradores (1998), demonstraram que a talidomida não tinha efeito antiangiogênico em roedores, uma vez que estes animais não têm nos seus microssomos hepáticos a enzima citocromo P450 que metaboliza a talidomida no seu metabólito com ação antiangiogênica. Entretanto, esta demonstração foi feita em um modelo de angiogênese *in vitro*, usando secções de aorta torácica de rato, incubadas em meio de cultura com um fator de crescimento. A ausência de inibição de angiogênese pela talidomida no modelo *in vitro* não pode ser extrapolado para o modelo *in vivo*, nem o resultado da inibição ou ausência de inibição da angiogênese para um tipo de tumor pode ser extrapolado para outro tumor, ou para linhagens celulares diferentes de um mesmo tumor, por inúmeras razões que citaremos a seguir. Em primeiro lugar, no modelo de angiogênese *in vitro* ou *in vivo*, geralmente se usa somente uma substância angiogênica, como foi feito no modelo acima referido (Bauer et al., 1998). Além do mais, Belo e colaboradores (2001), demonstraram em roedores que a talidomida inibiu a angiogênese induzida por “esponja” injetada no s.c., mas não bloqueou a angiogênese do tumor de Ehrlich implantado também no s.c. do mesmo grupo de animais. Estes autores revelaram uma ação seletiva da talidomida na mesma espécie de animal e levantaram a hipótese de que, mais do que espécie-específica, a talidomida é tecido-específica. Em segundo lugar, no processo de angiogênese tumoral, embora em alguns casos possa estar envolvido somente um fator angiogênico (Arenberg et al., 1996), na maioria das vezes múltiplos fatores angiogênicos diretos ou indiretos, liberados pelo tumor ou pelas células do hospedeiro estão implicados no processo de angiogênese. Em terceiro lugar, em duas linhagens de células tumorais oriundas de um mesmo tumor, cada uma pode expressar

fatores angiogênicos diferentes, ou até mesmo uma delas não expressar qualquer substância angiogênica (Kotoh et al., 1999). Isto pode explicar porque tanto em modelos experimentais quanto na clínica, animais ou pacientes com o mesmo tipo de tumor apresentam respostas antitumorais diversas, ou nenhuma resposta à terapia antiangiogênica com a talidomida (Kotoh et al., 1999; Belo et al., 2001; Blade et al., 2001). Por fim, existem alguns trabalhos na literatura relatando o efeito antiangiogênico e/ou antitumoral da talidomida em alguns tipos de tumores em roedores (Guinan et al., 1998; Kotoh et al., 1999) e em humanos (Fine et al., 2000; Eisen et al., 2000; Blade et al., 2001). Os pacientes com astrocitoma, carcinoma de células renais e mieloma múltiplo têm obtido resultados satisfatórios com o uso da talidomida. Os pacientes com mieloma múltiplo, além da estabilização da doença, têm obtido controle da dor, o que tem concorrido para uma melhora da qualidade de vida destes pacientes. Por isto, apesar da talidomida ser uma droga proscrita devido ao seu efeito teratogênico (focomelia), ela vem sendo seletivamente reintroduzida na oncologia para o tratamento dos tumores acima citados, bem como na prática clínica como uma droga de escolha para o tratamento de várias desordens, que incluem o eritema nodoso da lepra, a doença do enxerto versus hospedeiro, a estomatite aftosa e o lupus eritematoso discóide (Sheskin, 1965; Vogelsang et al., 1986; Östraat et al., 1992 e Tseng et al., 1996).

Embora o mecanismo de ação da maioria dos agentes antiangiogênicos durante o processo de tumorigênese seja conhecido, muitos deles agem por mecanismos ainda não completamente elucidados. A talidomida bloqueia a produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos (Sampaio et al., 1991), e modula a síntese de outras citocinas associadas com a neovascularização. Foi mostrado *in vitro* que a talidomida inibe a síntese de interferon- $\gamma$  pelas células mononucleares do sangue periférico e aumenta a síntese de interleucina 4 e 5

(Mchugh et al., 1995). Nogueira e colaboradores (1994), relataram que a expressão de moléculas de adesão (especialmente ICAM-1 e selectina-E, que têm uma função importante na indução da angiogênese pelo recrutamento de células inflamatórias) é também modulada pela talidomida. Além disso, os leucócitos e principalmente os macrófagos, juntamente com as células tumorais, liberam fatores que ativam e estimulam as células endoteliais. Estas células, uma vez ativadas, induzem a síntese de mediadores inflamatórios como prostaglandinas e óxido nítrico (NO), responsáveis pela vasodilatação, etapa inicial, que precede a angiogênese tumoral (Fukumura & Jain, 1998). A talidomida inibe seletivamente a síntese de TNF $\alpha$  por aumentar a degradação do seu RNAm e reduz a produção de NO em ratos (Lopez-Talavera et al., 1996). Baseado nisso, especula-se que no modelo de tumor de pulmão do nosso trabalho, a talidomida possa ter inibido a angiogênese e retardado o crescimento tumoral, modulando a expressão de citocinas e de mediadores inflamatórios, atuando portanto, por mecanismos diferentes daqueles envolvidos no modelo de angiogênese *in vitro* relatado por Bauer e colaboradores (1998), que afirmaram não ter a talidomida qualquer ação antiangiogênica em roedores.

Por outro lado, supondo-se que a talidomida não tenha inibido a angiogênese no nosso modelo, pois, na verdade, não temos dados para comprovar ou descartar esta hipótese, haveria outras ações da talidomida que justificariam o retardo do crescimento tumoral. Sabe-se que algumas citocinas expressas pelas células tumorais podem atuar como fatores de crescimento autócrino, aumentando ou estimulando a proliferação das próprias células tumorais, ou de forma parácrina, como fator angiogênico. Citocinas expressas por células do hospedeiro também podem estimular as células tumorais, concorrendo para o aumento da proliferação das células tumorais. A interleucina 8 (IL-8), é exemplo de uma citocina pró-inflamatória, que atua

como fator de crescimento autócrino para as células do melanoma (Schadendorf et al., 1993), e como fator angiogênico para as células do adenocarcinoma de pulmão humano (Arenberg et al., 1996). A talidomida pode ter interferido na tumorigênese inibindo ou bloqueando a expressão de citocinas pró-inflamatórias, e/ou fatores de crescimento tumoral com ação autócrina ou parácrina (Sampaio et al., 1991), inibindo assim a proliferação das células neoplásicas e, com isto, retardando o crescimento tumoral. O efeito antitumoral da talidomida no presente trabalho pode ainda ter sido pela modulação do sistema imune, como já foi demonstrado experimentalmente em ratos Wistar (Vogelsang et al., 1986; Östraat et al., 1992), pela “downregulation” do TNF- $\alpha$  (Klausner et al., 1996), ou ainda, por mecanismos desconhecidos. Na literatura não há relatos do uso da talidomida em modelos de tumor com o carcinossarcoma de Walker, embora já tenha sido demonstrada redução do crescimento tumoral e diminuição da incidência de metástases pulmonares em ratos inoculados com outras linhagens de células tumorais e tratados com talidomida (Guinan et al., 1998; Minchinton et al., 1996).

Muito embora o aumento do tempo de sobrevida ocorrido no grupo de animais tratados com TLD-45 no presente modelo, tenha sido pequeno, com um incremento de somente dois dias na sobrevida mediana dos animais tratados, ainda assim a diferença em relação ao grupo controle foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). É importante salientar que dois dias de vida em roedores corresponde a dois meses no ser humano, o que não deixa de ser um aumento pequeno, mas que reflete também uma ação antitumoral da talidomida.

O uso clínico da talidomida em pacientes com astrocitomas ou gliomas recorrentes e refratários à radioterapia e a pelo menos dois regimes de

como fator de crescimento autócrino para as células do melanoma (Schadendorf et al., 1993), e como fator angiogênico para as células do adenocarcinoma de pulmão humano (Arenberg et al., 1996). A talidomida pode ter interferido na tumorigênese inibindo ou bloqueando a expressão de citocinas pró-inflamatórias, e/ou fatores de crescimento tumoral com ação autócrina ou parácrina (Sampaio et al., 1991), inibindo assim a proliferação das células neoplásicas e, com isto, retardando o crescimento tumoral. O efeito antitumoral da talidomida no presente trabalho pode ainda ter sido pela modulação do sistema imune, como já foi demonstrado experimentalmente em ratos Wistar (Vogelsang et al., 1986; Östraat et al., 1992), pela “downregulation” do TNF- $\alpha$  (Klausner et al., 1996), ou ainda, por mecanismos desconhecidos. Na literatura não há relatos do uso da talidomida em modelos de tumor com o carcinossarcoma de Walker, embora já tenha sido demonstrada redução do crescimento tumoral e diminuição da incidência de metástases pulmonares em ratos inoculados com outras linhagens de células tumorais e tratados com talidomida (Guinan et al., 1998; Minchinton et al., 1996).

Muito embora o aumento do tempo de sobrevida ocorrido no grupo de animais tratados com TLD-45 no presente modelo, tenha sido pequeno, com um incremento de somente dois dias na sobrevida mediana dos animais tratados, ainda assim a diferença em relação ao grupo controle foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). É importante salientar que dois dias de vida em roedores corresponde a dois meses no ser humano, o que não deixa de ser um aumento pequeno, mas que reflete também uma ação antitumoral da talidomida.

O uso clínico da talidomida em pacientes com astrocitomas ou gliomas recorrentes e refratários à radioterapia e a pelo menos dois regimes de

quimioterapia, resultou em resposta parcial ou estabilização do tumor por no mínimo oito semanas, em 44% dos pacientes (Fine et al., 2000). Os pacientes que tiveram estabilização do tumor apresentaram um pequeno aumento na sobrevida (mediana de 30 semanas) em relação aos que apresentaram progressão da doença (mediana de 22 semanas). Os autores atribuíram o efeito antitumoral da talidomida a uma ação antiangiogênica ou imunomoduladora, uma vez que eles não encontraram atividade citotóxica *in vitro* ou *in vivo* da droga. Há também relatos de uso clínico da talidomida em pacientes com mieloma múltiplo refratário à quimioterapia convencional (Blade et al., 2001), e em pacientes com carcinoma de células renais em estágios avançados, com percentuais variáveis de respostas parciais e estabilização da doença (Eisen et al., 2000).

No presente trabalho, verificou-se também uma inibição inicial da caquexia. Os animais tratados com TLD-45 evoluíram com ganho de peso até o quinto dia, enquanto o grupo controle apresentou perda de peso progressiva a partir do dia do implante tumoral. Alguns estudos clínicos têm demonstrado que o uso da talidomida em pacientes com tuberculose e HIV positivo ou negativo, reduz significativamente o TNF $\alpha$  e acelera o ganho de peso dos pacientes (Tramontana et al., 1995; Haslett 1998). Entretanto, não há trabalhos na literatura mostrando inibição da caquexia pela talidomida em modelos experimentais de tumor com o carcinosarcoma de Walker, embora existam muitos relatos do uso de antiinflamatórios não esteroidais (AINES) inibindo a caquexia em modelos experimentais com outros tumores (Gelin et al., 1991; Cahlin et al., 2000). As citocinas com ação comprovada na indução da caquexia são o TNF $\alpha$ , a IL-1 $\alpha$  e a IL-6, produzidas pelas células tumorais ou pelas do hospedeiro, que tanto podem promover a caquexia de forma direta, quanto indiretamente, atuando como fatores de crescimento tumoral (Lönnroth et al.,

1990; Strassmann et al., 1992; Strassmann et al., 1993). O mecanismo de ação da talidomida e dos AINES na inibição da caquexia é, provavelmente, dependente da inibição da síntese dessas citocinas pró-inflamatórias, embora os mecanismos envolvidos na melhora do balanço metabólico entre o tumor e o hospedeiro ainda estejam por ser determinados (Cahlin et al., 2000).

Por fim, achamos que os efeitos sedativos ou hipnóticos e analgésicos da talidomida devem ser considerados no presente modelo. Sabe-se que a toracotomia provoca dor intensa no pós-operatório em decorrência da retração das costelas e do estiramento dos nervos intercostais (Katz et al., 1996). Sabe-se também que o trauma ou estresse cirúrgico compromete e enfraquece temporariamente o sistema imunológico (Freire-Garabal et al., 1998). Nestas circunstâncias, ocorre perda ou inativação das células T ou de outros elementos de defesa, tornando a vigilância do hospedeiro fragilizada e com menor capacidade para destruir as células malignas. Neste mister, Freire-Garabal e colaboradores (1998), demonstraram que a fluoxetine, um antidepressivo e inibidor seletivo da captação neural da serotonina, reverteu parcialmente a vulnerabilidade ou o efeito imunossupressor causado pelo estresse cirúrgico de uma laparotomia feita em roedores. Os animais pré-tratados com fluoxetine, submetidos a laparotomia e inoculados com  $10^4$  células do tumor de Walker na veia da cauda, apresentaram aumento da sobrevida e redução do número de metástases pulmonares em relação ao grupo controle não tratado.

A talidomida administrada em ratos reduz a hiperalgesia e a dor inflamatória na fase aguda decorrente da injeção intraplantar de carragenina, pela inibição da síntese do TNF $\alpha$  e pelo aumento da degradação do seu RNAm (Ribeiro et al., 2000). Além disso, a talidomida usada preemptivamente em ratos reduz também a alodinia e a dor neuropática na fase crônica (Sommer et



al., 1998). No presente trabalho, especula-se a possibilidade de que a ação sedativa e analgésica da talidomida administrada doze horas antes da toracotomia e do implante tumoral, possa ter concorrido para minimizar a dor e reduzir o efeito imunossupressor do estresse cirúrgico e, desta forma, ter também contribuído para o retardo do crescimento tumoral e o aumento da sobrevida dos animais.

Os resultados obtidos no nosso trabalho corroboram os da literatura, mostrando que o efeito antitumoral da talidomida usada como monoterapia é fugaz, e que finalmente o tumor retoma o seu crescimento em um ritmo dependente do comportamento biológico de cada linhagem tumoral, culminando inexoravelmente com a morte de todos animais em um curto período de tempo.

A demonstração na literatura de um efeito sinérgico ou da potencialização dos efeitos de drogas citotóxicas com o uso associado de agentes antiangiogênicos em tumores sólidos (Teicher et al., 1994), nos permite sugerir que doravante sejam feitos estudos no sentido de se avaliar a ação da talidomida combinada com esquemas de quimioterapia. Neste mister, Shalinsky e colaboradores (1999), demonstraram que o efeito antitumoral de inibidores seletivos das metaloproteinases com reconhecida ação antiangiogênica, foi potencializado com o uso combinado de agente citotóxico (carboplatina). Estes autores observaram também que o uso do paclitaxel quando feito isoladamente em animais com linhagens de células do câncer de pulmão não pequenas células resistentes à quimioterapia, não afetou o crescimento tumoral; entretanto, o fez de forma significativa, quando associado ao inibidor da angiogênese. Nessa circunstância, o paclitaxel potencializou o efeito inibitório sobre o crescimento tumoral do agente antiangiogênico,

embora o efeito inibitório sobre a angiogênese tenha sido similar ao uso isolado do agente antiangiogênico. Estes resultados confirmam a hipótese de O'Reilley e colaboradores (1996), corroborada depois por Boehm e colaboradores (1997), de que as células endoteliais do tumor e do hospedeiro não desenvolvem resistência a agentes antiangiogênicos.

Com base nos nossos resultados e amparados nos dados de literatura, podemos afirmar que a talidomida é uma droga de ação “pleiotrópica” por apresentar, além do efeito hipnótico originalmente descrito, efeito antiangiogênico, antitumoral, anticaquético, antiinflamatório e analgésico. Isso abre uma perspectiva futura promissora do uso amplo da talidomida, principalmente de seus análogos destituídos de efeito teratogênico, como droga “adjuvante”, combinada com agentes citotóxicos, com grandes possibilidades de sucesso, no tratamento dos tumores sólidos avançados resistentes ou não à quimioterapia.

## 5. CONCLUSÕES

1. O trabalho mostrou a eficiência da técnica de implantação direta do tumor de Walker no pulmão, com as vantagens da necessidade de pequeno intervalo de tempo para o desenvolvimento tumoral, e a possibilidade da reprodução do modelo com altos índices de pega.

2. A tumorigenicidade das células do câncinossarcoma de Walker no pulmão foi excelente, constatada pela presença precoce de tumor no sexto dia do implante de uma pequena quantidade de células tumorais, provavelmente pelo bom “microambiente” encontrado para o seu desenvolvimento.

3. A TC foi um método de imagem de alta acurácia no diagnóstico, na localização e na mensuração das lesões tumorais, confirmada pela boa correlação dos dados de tomografia com os de necropsia, podendo ser usada como um método não invasivo de monitoramento periódico e acurado do crescimento tumoral em modelos experimentais de tumor de pulmão.

4. A talidomida mostrou um efeito antitumoral significativo e não dose dependente, caracterizado pelo retardo do crescimento tumoral e pelo aumento da sobrevida dos animais. Este efeito antitumoral pode ter decorrido de uma ação imunomoduladora e antiinflamatória local e sistêmica, por bloquear a expressão de fatores de crescimento tumoral ou inibir a síntese de citocinas pró-inflamatórias, ou ainda, por mecanismos desconhecidos.

5. A talidomida mostrou um efeito anticaquético, inibindo a perda de peso dos animais

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABOLHODA, A.; BROOKS, A.; NAWATA, S.; KANEDA, Y.; CHENG, H.; BURT, M. E. Isolated lung perfusion with doxorubicin prolongs survival in rodent model of pulmonary metastases. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 64. p. 181-184, 1997.

ARENBERG, D. A.; KUNKEL, S. L.; POLVERINI, P. J. Inhibition of interleukin-8 reduces tumorigenesis of human non-small cell lung cancer in SCID mice. **J. Clin. Invest.**, v. 97, p. 2792-2802, 1996.

BAUER, K. S.; DIXON, S. C.; FIGG, W. D. Inhibition of angiogenesis by thalidomide requires metabolic activation, which is species-dependent. **Biochem. Pharmacol.**, v. 55, p. 1827-1834, 1998.

BELO, A.V.; FERREIRA, M. A.; BOSCO, A. A.; MACHADO, R. D.; ANDRADE, S. P. Differential effects of thalidomide on angiogenesis and tumor growth in mice. **Inflammation**, v. 25, n. 2, p. 91-96, 2001.

BEHRENS, J., BICHMEIER, W. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junction and the prevention of invasiveness. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1198, n. 1, p. 11-26, 1994.

BLADE, J.; PERALES, M.; ROSINOL, L.; TUSET, M.; MONTOTO, S.; ESTEVE, J.; COBO, F.; VILLELA, L.; RAFEL, M.; NOMDEDEU, B.; MONTSERRAT, E. Thalidomide in multiple myeloma: lack of response of soft-tissue plasmacytomas. **Br. J. Haematol.**, v. 113, n. 2, p. 422-424, 2001.

BOEHM, T.; FOLKMAN, J.; BROWDER, T.; O'REILLY, M. S. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired resistance. **Nature**, v. 390, p. 404-407, 1997.

BUNN, P. A.; KELLY, K. New chemotherapeutic agents prolongs survival and improve quality of live in non-small cell lung cancer: a review of the literature and future directions. **Clin. Cancer Res.**, v. 5, p. 1087-1100, 1998.

CAHLIN, C.; KÖRNER, A.; AXELSON, H.; WANG, W.; LUNDHOLM.; VANBERG, E. Experimental cancer cachexia: The role of host-derived cytokines interleukin (IL)-6, IL-12, Interferon- $\gamma$ , and tumor necrosis factor  $\square$  evaluated in gene knockout, tumor-bearing mice on C57 Bl background and eicosanoid-dependent cachexia. **Cancer Res.**, v. 60, p. 5488-5493, 2000.

CALDAROLA, L.; POLI, G.; POLI, M.; BIGLIANI, S. Walker sarcoma: "taking" and metastasis. **Minerva Chir.**, v. 8, n. 23, p. 74-77, 1986.

CHALMER, J.; HOLT, P. G.; KEAST, D. Cell-mediated immune responses to transplanted tumors in mice chronically exposed to cigarette smoke. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 55, n. 5, p. 1129-1134, 1975.

D'AMATO, R. J.; LOUGHNAN, M. S.; FLYNN, E.; FOLKMAN, J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. **Med. Sci.**, v. 91, p. 4082-4085, 1994.

DOMINIONI, L.; STRAUS, G. M.; IMPERATORI, A.; ROVERA, F.; DIONIGI, G. Screening for lung cancer. **Chest Surg. Clin. N. Am.**, v. 10, n. 4, p. 729-736, 2000.

EARLE, W. R. A study of the Walker rat mammary carcinoma 256, in vivo and in vitro. **Am. J. Cancer**, v. 24, p.556-612, 1935.

EISEN, T.; BOSHOF, C.; MAK, I.; SAPUNAR, F.; VAUGHAN, M. M.; PYLE, L.; JOHNSTON, S. R.; AHERN, R.; SMITH, I. E.; GORE, M. E . Continuous low dose Thalidomide: a phase II study in advanced melanoma,

BUNN, P. A.; KELLY, K. New chemotherapeutic agents prolongs survival and improve quality of live in non-small cell lung cancer: a review of the literature and future directions. **Clin. Cancer Res.**, v. 5, p. 1087-1100, 1998.

CAHLIN, C.; KÖRNER, A.; AXELSON, H.; WANG, W.; LUNDHOLM.; VANBERG, E. Experimental cancer cachexia: The role of host-derived cytokines interleukin (IL)-6, IL-12, Interferon- $\gamma$ , and tumor necrosis factor  $\alpha$  evaluated in gene knockout, tumor-bearing mice on C57 Bl background and eicosanoid-dependent cachexia. **Cancer Res.**, v. 60, p. 5488-5493, 2000.

CALDAROLA, L.; POLI, G.; POLI, M.; BIGLIANI, S. Walker sarcoma: “taking” and metastasis. **Minerva Chir.**, v. 8, n. 23, p. 74-77, 1986.

CHALMER, J.; HOLT, P. G.; KEAST, D. Cell-mediated immune responses to transplanted tumors in mice chronically exposed to cigarette smoke. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 55, n. 5, p. 1129-1134, 1975.

D’AMATO, R. J.; LOUGHNAN, M. S.; FLYNN, E.; FOLKMAN, J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. **Med. Sci.**, v. 91, p. 4082-4085, 1994.

DOMINIONI, L.; STRAUS, G. M.; IMPERATORI, A.; ROVERA, F.; DIONIGI, G. Screening for lung cancer. **Chest Surg. Clin. N. Am.**, v. 10, n. 4, p. 729-736, 2000.

EARLE, W. R. A study of the Walker rat mammary carcinoma 256, in vivo and in vitro. **Am. J. Cancer**, v. 24, p.556-612, 1935.

EISEN, T.; BOSHOF, C.; MAK, I.; SAPUNAR, F.; VAUGHAN, M. M.; PYLE, L.; JOHNSTON, S. R.; AHERN, R.; SMITH, I. E.; GORE, M. E . Continuous low dose Thalidomide: a phase II study in advanced melanoma,



renal cell, ovarian and breast cancer. **Br. J. Cancer**, v. 82, n. 4, p. 812-817, 2000.

ELDER, D. J.; HALTON, D. E.; HAGUE, A.; PARASKEVA, C. Induction of apoptotic cell death in human colorectal carcinoma cell lines by cyclooxygenase-2 (COX-2) selective nonsteroidal anti-inflammatory drug: independence from COX-2 protein expression. **Clin. Cancer Res.**, v. 3, p. 1679-1683, 1997.

FEINSTEIN, M. B.; BACH, P. B. Epidemiology of lung cancer. **Chest Surg. Clin. N Am.**, v. 10, n. 4, p. 653-661, 2000.

FINE, H. A.; FIGG, W. D.; JAECKLE, K.; PATRICK, Y. W.; KYRITSIS, A. P.; LOEFFLER, J. A. Phase II trial of the antiangiogenic agent thalidomide in patients with recurrent high-grade gliomas. **J. Clin. Oncol.** v. 18, n. 4, p. 708-715, 2000.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **N. Engl. J. Med.**, v. 285, p. 1182, 1971.

FOLKMAN, J. Antiangiogenic therapy. In: DEVITA, V. T. Jr.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. **Cancer: principles & practice of oncology**. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: JB Lippincott, 1997. p. 3075-3085.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 16, p. 1931-1934, 1992.

FREIRE-GARABAL, M.; NUÑEZ, M. J.; PEREIRO, D.; RIVEIRO, P.; LOSADA, C.; FERNÁNDEZ, J. C.; GARCÍA-IGLESIAS, E. G.; PRIZMIC, J.; MAYÁN, J. M.; REY-MÉNDEZ, M. R. Effects of fluoxetine on the

development of lung metastases induced by operative stress in rats. **Life Sci.**, v. 63, n. 2, p. 31-38, 1998.

FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Role of nitric oxide in angiogenesis and microcirculation in tumors. **Cancer Metast. Rev.**, v. 17. p. 77-98, 1998.

GELIN, J.; ANDERSSÓN, C.; LUNDHOLM, K. Effects of indomethacin, cytokines, and cyclosporin A on tumor growth and the subsequent development of cancer cachexia. **Cancer Res.**, v. 51. p. 880-885, 1991.

GONZÁLEZ, R. P.; LEYVA, A.; MELO, R. A. B.; MOREIRA, R. D. M.; PESSOA, C.; FARIAS, R. F.; MORAES, M. O. Método para o estudo *in vivo* da angiogênese: indução de neovascularização na córnea de coelho. **Acta Cir. Bras.**, v. 15, n. 3, p. 168-173, 2000.

GREENBLATT, M. S.; REDDEL, R. R.; HARRIS, C. C. Carcinogenesis, and cellular and molecular biology of lung cancer. In: ROTH, J. A.; RUCKDESCHEL, J. C.; WEISENBURGER, T. H. **Thoracic oncology**. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995. chapt. 2, p. 5-25.

GUINAN P; SHAW M; MIROCHNIK Y; SLOBODSKOY L; RAY V; RUBENSTEIN M. Paclitaxel is more effective than thalidomide in inhibiting LNCaP tumor growth in a prostate cancer model. Methods find. **Exp. Clin. Pharmacol.**, v. 20, n. 9, p. 739-742, 1998.

GUTMAN, M.; SZOLD, A.; RAVID, A.; LAZZAUSKAS, T.; MARIMSKY, O.; KLAUSNER, J. M. Failure of thalidomide to inhibit tumor growth and angiogenesis in vivo. **Anticancer Res.**, v. 16, p. 3673-3678, 1996.

HASLETT, P. A .Anticytokine approaches to the treatment of anorexia and cachexia. **Semin. Oncol.**, v. 25, n. 2 suppl. 6, p. 53-57, 1998.

HOWARD, R. B.; CHU, H.; ZELIGMAN, B. E.; MARCELL, T.; BUNN, P. A.; MCLEMORE, T. L.; ET AL. Irradiated nude rat model for orthotopic lung cancers. **Cancer Res.**, v. 51, p. 3274-3280, 1991.

Instituto Nacional Do Cancer. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro. **INCA/MS**, 2001.

IWAMA DE MATOS, M. C. F.; MONTENEGRO, M. R.; SILVA, C. R. V. Walker 256 carcinosarcoma: pathology, microscopic and ultrastructural features of the tumoral circulating cells. **Ciênc. Cult.**, v. 32, p. 849-857, 1980.

KATZ, J.; JAKSON, M.; KAVANAGH, B. P.; SANDLER, A. N. Acute pain after thoracic surgery predicts long-term post-thoracotomy pain. **Clin. J. Pain**, v. 12, p. 50-55, 1996.

KLAUSNER, J. D.; FREEDMAN, V. H.; KAPLAN, G. Thalidomide as an anti-TNF- $\alpha$  inhibitor: implications for clinical use. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 81, n. 3, p. 219-223, 1996.

KOTOH, T.; DHAR, D. K.; MASUNAGA, R.; TABARA, H.; TACHIBANA, M.; KUBOTA, H.; KOHNO, H.; NAGASUE, N. Antiangiogenic therapy of human esophageal cancers with thalidomide in nude mice. **Surgery**, v. 125, n. 5, p. 536-544, 1999.

KRUSE, F. E.; JOUSSEN, A. M.; ROHRSCHEIDER, K.; BECKER, M. D.; VÖLCKER, H. E. Thalidomide inhibits angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor. **Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.**, v. 236, p. 461-466, 1998.

LE PIMPEC-BARTHES, F.; BENARD, I.; ABD ALSAMAD, I.; RENIER, A.; KHEUAN, L.; FLEURY-FEITH, J.; DEVAUCHELLE, P.; QUINTIN

COLONA F, RIQUET, M.; JURAND, M. C. Pleuro-pulmonary tumours detected by clinical and chest X-ray analyses in rats transplanted with mesothelioma cells. **Br. J. Cancer**, v. 81, n. 8, p. 1344-1350, 1999.

LIOTTA, L. A. Cancer cell invasion and metastasis. **Sci. Am.**, v. 266, n. 2, p. 34-41, 1992.

LÖNNROTH, C.; MOLDAWER, L. L.; GELIN, J.; KINDBLOM, L.; SHERRY, B.; LUNDHOLM, K. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\alpha$  production in cachectic, tumor-bearing mice. **Int. J. Cancer**, v. 46. p. 889-896, 1990.

LOPEZ-TALavera, J. C.; CADELINA, G.; OLCHOWSKI, J.; MERRILL, W.; GROSZMANN, R. J. Thalidomide inhibits tumor necrosis factor alpha, decreases nitric oxide synthesis, and ameliorates the hyperdynamic circulatory syndrome in portal-hypertensive rats. **Hepatology**, v. 23, n. 6, p. 1616-1621, 1996.

MASFERRER, J. L.; LEAHY, K. M.; KOKI, A. T.; ZWEIFEL, B. S.; SETTLE, S. L.; WOERNER, B. M.; EDWARDS, D. A.; FLICKINGER, A. G.; MOORE, R. J.; SEIBERT, K. Antiantigenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. **Cancer Res.**, v. 60, p. 1306-1311, 2000.

MATSUYAMA, K.; CHIBA, Y.; SASAKI, M.; TANAKA, H.; MURAOKA, R.; TANIGAWA, N. Tumor angiogenesis as a prognostic marker in operable non-small cell lung cancer. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 65, p. 1405-1409, 1998.

MCHUGH, S. M.; RIFKIN, I. R.; DEIGHTON, J.; WILSON, A. B.; LACHMANN, P. J.; LOCKWOOD, C. M.; EWAN, P. W. The immunosuppressive drug thalidomide induces T helper cells in mitogen and

antigen-stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 99, p. 160-167, 1995.

MCLEMORE, T. L.; LIU, M. C.; BLAKER, P. C.; GREGG, M.; ALLEY, M. C.; ABBOTT, B. J.; SHOMAKER, R. H.; BOHLMAN, M. E.; LITTERST, C. C.; HUBBARD, W. C.; BRENNAN, R. H.; MCMAHON, J. ; FINE, D. L.; EGGLESTON, J. C.; MAYO, J. G.; BOYD, M. R. Novel intrapulmonary model for orthotopic propagation of human lung cancers in athymic nude mice. **Cancer Res.**, v. 47, p. 5132-5140, 1987.

MINCHINTON, A. I.; FRYER, K. H.; WENDT, K. R.; CLOW, K. A.; HAYES, M. M. The effect of thalidomide on experimental tumors and metastasis. **Anticancer Drugs**, v. 7, n. 3, p. 339-343, 1996.

NAITO, S.; ESCHENBACH, A. C.; FIDLER, I. J. Growth and metastasis of tumor cells isolated from a human renal cell carcinoma implanted into different organs of nude mice. **Cancer Res.**, v. 46, p. 4109-4115, 1986.

NGUYEN, M.; SHING, Y.; FOLKMAN, J. Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane. **Microvasc. Res.**, v. 47, p. 31, 1994.

NOGUEIRA, A. C.; NEUBERT, R.; HELGE, H.; NEUBERT, D. Thalidomide and the immune system. 3. Simultaneous up- and down-regulation of different integrin receptors on human white cells. **Life Sci.**, v. 55, p. 77-92, 1994.

OLIVEIRA, P. F. M.; HENRIQUES, I. A.; RODRIGUES FILHO, F.; ALMEIDA, P. R. C.; MORAES, M. O. Estabelecimento de um modelo de tumor experimental pela inoculação do tumor de Walker em estômago de rato. **Acta Cir. Bras.**, v. 13, n. 4, p. 243-248, 1998.

O'REILLY, M. S.; HOLMGREN, L.; SHING, Y.; CHEN, C.; ROSENTHAL, R. A.; MOSES, M.; LANE, W. S.; CAO, Y.; SAGE, E. H.; FOLKMAN, J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. **Cell**, v. 79, p. 315-328, 1994.

O'REILLY, M. S.; HOLMGREN, L.; CHEN, C.; FOLKMAN, J. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. **Nature Med.**, v. 2, p. 689, 1996.

ÖSTRAAT, O.; EKBERG, H.; SCHATZ, H.; RISBECK, K.; ERIKSON, T. Thalidomide prolongs graft survival in rat cardiac transplants. **Transplant. Proc.**, v. 24, n. 6, p. 2624-2625, 1992.

PAGET, S. Secondary growths of cancer of breast. **Lancet**, v. 1, p. 571-573, 1889.

PALADUGO, R. R.; SHORS, E. C.; COHEN, A. H.; MATSUMURA, K.; BENFIELD, J. R. Induction of lung cancers in preselected, localized sites in the dog. **JNCI**, v. 65, n. 5, p. 921-927, 1980.

PALUS, M. J.; GLEASON, S. S.; KENNEL, S. J.; HUNSICKER, P. R.; JOHNSON, D. K. High resolution X-ray computed tomography: an emerging tool for small animal cancer research. **Neoplasia**, v. 2, n. 1-2, p. 62-70, 2000.

PASS, H.; KALEMKERIAN, G.; BRIGHT, R. K. Novel molecular and immunotherapeutic strategies for lung cancer. **Chest. Surg. Clin. N. Am.**, v. 11, n. 1, p. 189-212, 2001.

POLVERINI, P. J. The pathophysiology of angiogenesis. **Crit Rev. Oral Biol. Med.**, v. 6, p. 230-247, 1995.



POLVERINI, P.; LEIBOVICH, J. S. Induction of neovascularization in vivo and endothelial proliferation in vitro by tumor-associated macrophages. **Lab. Invest.**, v. 51, p. 635, 1984.

REDDY, B. S.; HIROSE, Y.; LUBET, R.; STEELE, V.; KELLOF, G.; PAULSON, S.; SEIBET, K.; RAO, C. V. Chemoprevention of colon cancer by specific cyclooxygenase-2 inhibitor, celocoxib, administered during different stages of carcinogenesis. **Cancer Res.**, v. 60, p. 293-297, 2000.

REZNIK-SCHÜLLER, H. M.; GREGG, M. Pathogenesis of lung tumors induced by N-nitrosoheptamethyleneimine in F344 rats. **Virchows Arch. Pathol. Anat.**, v. 393, p. 333-341, 1981.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Analgesic effect of thalidomide on inflammatory pain. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 391, n. 1-2, p. 97-103, 2000.

RISTIMÄKI, A.; HONKANEN, N.; JÄNKÄLÄ, H.; SIPPONEN, P.; HÄRKÖNEN, M. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. **Cancer Res.**, v. 57, p. 1276-1280, 1997.

SAMPAIO, E. P.; SARNO, E. N.; GALILLY, R.; CHON, Z. A.; KAPLAN, G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. **J. Exp. Med.**, v. 173, p. 699-703, 1991.

SAMPAIO, E. P.; KAPLAN, G.; MIRANDA, A. The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum. Colaboradores. **J. Infect. Dis.**, v. 168, p. 408-414, 1993.

SCHADENDORF, D.; MOLLER, A.; ALGERMISSSEN, B.; WORM, M.; STICHERLING, M.; CZARNETZKI, B. M. IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor. **J. Immunol.**, v. 153, n. 7, p. 2667-2675, 1993.

SCHNEIDER, A. **Estudo comparativo de diferentes formas de proteção em modelo de fístula brônquica em ratos**. Porto Alegre, 1995. Tese (Doutorado)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 8-15.

SHALINSKY, D. R.; BREKKEN, J.; ZOU, H. Marked antiangiogenic and antitumor efficacy of AG3340 in chemoresistent human non-small cell cancer tumor: Single agent and combination chemotherapy studies. **Clin. Cancer Res.**, v. 5, p. 1905-1917, 1999.

SHESKIN, J. Thalidomide in the treatment of lepra reactions. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 6, n. 3, p. 303-306, 1965.

SHIELDS, T. W. Pathology of carcinoma of the lung. In: SHIELDS, T. W.; LOCICERO, J.; PONN, R. B. **General thoracic surgery**. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott, 2000. v. 1, chapt. 95, p. 1249-1268.

SIM, B. K.; O'REILLY, M. S.; LIANG, H. A recombinant human angiostatin protein inhibits experimental primary and metastatic cancer. **Cancer Res.**, v. 57, p. 1329-1334, 1997.

SOARES, F. A.; TERRA, V. C. Thoracic lymph node metastasis and carcinomatous lymphangitis after inoculation of Walker 256 tumor through the trachea. **Braz. J. Méd. Biol. Res.**, v. 26, n. 2, p. 191-201, 1993.

SOMMER, C.; MARZINIAK, M.; MYERS, R. R. The effect of thalidomide treatment on vascular pathology and hyperalgesia caused by chronic constriction injury of rat nerve. **Pain**, v. 74, n. 1, p. 83-91, 1998.

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

STRASSMANN, G.; FONG, M.; KENNEY, J. S.; JACOB, C. O. Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia. **J. Clin. Invest.**, v. 89, p. 1681-1684, 1992.

STRASSMANN, G.; MASUI, Y.; CHIZZONITE, R.; FONG, M. Mechanisms of experimental cancer cachexia. **J. Immunol.**, v. 150, n. 6, p. 2341-2345, 1993.

TAYLOR, S.; FOLKMAN, J. Protamine is an inhibitor of angiogenesis. **Nature**, v. 297, p. 307, 1982.

TEICHER, B. A.; HOLDEN, S. A.; GULSHAN, A.; ALVAREZ, SOTOMAYER, E. A.; HUANG, Z. D.; CHEN, Y-N.; BREM, H. Potentiation of cytotoxic cancer therapies by TNP-470 alone and with other anti-angiogenic agents. **Int. J. Cancer**, v. 57, p. 920, 1994.

TEICHER, B. A.; SOTOMAYER, E. A.; HUANG, Z. D. Antiangiogenic agents potentiate cytotoxic cancer therapies against primary and metastatic disease. **Cancer Res.**, v. 52, p. 6702-6704, 1992.

TEMECK, B. A.; PASS, H. I. Biology of metastatic disease. **Chest. Surg. Clin. N. Am.**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 1998.

TOCKMAN, M. S.; MULSHINE, J. L. The early detection of occult lung cancer. **Chest. Surg. Clin. N. Am.**, v. 10, n. 4, p. 737-750, 2000.

TRAMONTANA, J. M.; UTAIPAT, U.; MOLLOY, A.; AKARASEWI, P.; BURROUGHS, M.; MAKONKAWKEYOON, S.; JOHNSON, B.; KLAUSNER, J. D.; ROM, W.; KAPLAN, G. Thalidomide treatment reduces tumor necrosis factor alpha production and enhances weight gain in patients with pulmonary tuberculosis. **Mol. Med.**, v. 1, n. 4, p. 384-397, 1995.

TSENG, S.; PAK, G.; WASHENIK, K.; POMERANZ, M. K.; SHUPACK, J. L. Rediscovering thalidomide: a review of its mechanism of action, side effects, and potencial uses. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 35, n. 6, p. 969-979, 1996.

TWARDOWSKI, P. W.; BRENIN, C. M.; KIES, M. S. Principles of chemotherapy. In: SHIELDS, T. W.; LOCICERO, J.; PONN, R. B. **General thoracic surgery**. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott, 2000. v. 1, chapt. 104, p. 1389-1400.

VOGELSANG, G. B.; HESS, A. D.; GORDON, G.; SANTOS, G. W. Treatment and prevention of acute graft-versus-host disease with thalidomide in a rat model. **Transplantation**, v. 41, p. 644-647, 1986.

VOLM, M.; MATTERN, J.; KOOMÄGI, R. Angiostatin expression in non-small cell lung cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 6, p. 3236-3240, 2000.

WAGNER, D. D.; FRENETTE, P. S. Adhesion molecules. Part 1. **N. Engl. J. Med.**, v. 334, n. 23, p. 1526-1529, 1996.

WANG, H. Y.; ROSS, H. M.; NG, B.; BURT, M. E. Establishment of an experimental intrapulmonary tumor nodule model. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 64, n. 1, p. 216-219, 1997.

WEIDNER, N.; SEMPLE, J. P.; WELCH, W. R.; FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive breast carcinoma. **N. Engl. J. Med.**, v. 324, p. 1, 1991.

WOLFF, H.; SAUKKONEN, K.; ANTTILA, S.; KARJALAINEN, A.; VAINIO, H.; RISTIMÄKI, A. Expression of cicloxygenase-2 in human lung carcinoma. **Cancer Res.**, v. 58, p. 4997-5001, 1998.



SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O DESENVOLVIMENTO  
DA PESQUISA EM CIRURGIA  
(SOBRADPEC)

CONSELHO DIRETOR

DIRETOR PRESIDENTE

Saul Goldenberg

DIRETOR SECRETÁRIO

Alberto Goldenberg

DIRETOR TESOUREIRO

Paulo de Oliveira Gomes

CONSELHEIROS

Alcino Lázaro da Silva

Páblio S. Gotfr

Zacarias Alves de Souza F.

REGIONAIS

TRIÂNGULO MINEIRO

PARANÁ

BAHIA

RIO DE JANEIRO

RIO GRANDE DO SUL

MINAS GERAIS

BRASÍLIA

RIO GRANDE DO NORTE

PERNAMBUCO

ESPÍRITO SANTO

SANTA CATARINA

MARANHÃO

SÃO PAULO

SUL MINEIRA

PARÁ

AMAZÔNIA

RIBEIRÃO PRETO

CENTRO OESTE

CEARÁ

PIAUÍ

DECLARAÇÃO

DECLARO, para os devidos fins, que o artigo intitulado  
"Modelo de tumor de pulmão em rato com o  
carcinossarcoma de Walker" de autoria de Antero Gomes  
Neto, Breno Bezerra Gomes de Pinho Pessoa, Silvana  
Arnijo de Aguiar, Bruno Machado Furtado, Manoel  
Odorico Moraes e Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, foi  
aceito para ser publicado na Revista ACTA CIRÚRGICA  
BRASILEIRA.

São Paulo, 04 de julho de 2001.

Prof. Dr. Saul Goldenberg  
Editor Científico Responsável

XII CONGRESSO BRASILEIRO  
DE CIRURGIA TORÁCICA

V CONGRESSO BRASILEIRO DE  
ENDOSCOPIA RESPIRATÓRIA

III CONGRESSO GAÚCHO DE  
PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA

I SIMPÓSIO BRASILEIRO  
DE ONCOLOGIA TORÁCICA

**TÔRAX**  
2001

**Certificado**

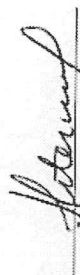
Conferimos o presente certificado a


Gomes Neto, A. Pessoa, B.B.G.P., Aguiar, S.A., Furtado, B.M., Moraes, M.O., Ribeiro, R.A.

pela sua participação, na qualidade de


Ganhadores de Menção Honrosa como autores do melhor trabalho apresentado no dia 23 de Junho  
EFEITO ANTITUMORAL DA TALIDOMIDA NO MODELO DE TUMOR DE PULMÃO EM RATO COM O  
CARCINOSSARCOMA DE WALKER

Gramado, 24 de junho de 2001.

  
**Dra. Jussara Fierman**  
Presidente da Sociedade de  
Pneumologia e Tisiologia do RS  
Presidente do III Congresso Gaúcho  
de Pneumologia e Tisiologia

  
**Dr. Nilton Haertel Gomes**  
Presidente da Sociedade de  
Cirurgia Torácica do RS  
Presidente do XII Congresso  
Brasileiro de Cirurgia Torácica

  
**Dr. Hugo Oliveira**  
Presidente do V Congresso  
Brasileiro de Endoscopia Respiratória

  
**Dr. Nelson Kalil**  
Coordenador do I Simpósio  
Brasileiro de Oncologia Torácica

