

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS.
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FARMACOLOGIA

FIBROHISTIOCIOMA MALIGNO TRANSPLANTÁVEL EM RATOS WISTAR - CARACTERIZAÇÃO (histopatologia, ultraestrutura, citoquímica enzimática e imunohistoquímica); ESTUDO CINÉTICO E ASPECTOS FARMACOLÓGICOS

TESE DE MESTRADO DE
RONALDO DE ALBUQUERQUE RIBEIRO
ORIENTADOR: PROF. DR. MANASSÉS CLAUDINO FONTELES
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. SÉRGIO ZUCOLOTO (USP-RP)

FC-00002608-0

FORTALEZA, 1987

Tese
616.994
R484 f
1987

UFC	BIBLIOTECA CENTRAL
Nº. 513253	
02 1 10 1 96	

C298115

R513253


UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ	
BIBLIOTECA SETORIAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE	
Reg n:	9591
Data	08/06/87

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

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

Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

DISSERTAÇÃO APROVADA EM : 23.01.1987


Dr. Manasses Claudino Fonteles
Orientador da Dissertação

Dr. José Murilo de Carvalho Martins

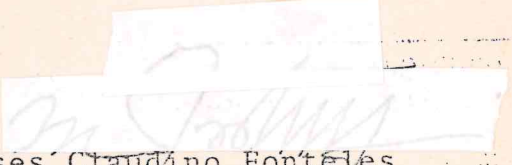
Dr. Francisco Valdeci de Almeida Ferreira

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

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

Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

DISSERTAÇÃO APROVADA EM : 23.01.1987


Dr. Manasses Claudino Fonteles
Orientador da Dissertação

Dr. José Murilo de Carvalho Martins

Dr. Francisco Valdeci de Almeida Ferreira

À memória de meu pai,
um homem como poucos.

À minha mãe e irmãos pelo
que representam na minha vida.

Este trabalho é dedicado a todos os patriotas brasileiros, vivos ou mortos, que permaneceram de pé quando o mais cômodo era ajoelhar-se.

De forma especial e, com emoção, dedico-o à memória de um destes, a amiga Profa. HELENA CARTAXO que, depois de tantas lutas incansáveis, ainda reuniu forças para com muita firmeza e lucidez enfrentar o Câncer que a matou.

É até paradoxal: Ela à morte nos deu uma lição de vida.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador deste trabalho, prof. Manassés Claudino Fonteles, pelos muitos ensinamentos e pelo exemplo que com certeza influenciou na nossa formação científica.

Ao prof. Sérgio Zucoloto (USP-RP), co-orientador, pela eficiência na orientação e pela forma amigável com que nos recebeu em seu laboratório de Proliferação Celular.

Ao prof. Carlos Eduardo Bacchi (UNESP-BOTUCATU), com quem realizamos os testes imunohistoquímicos, pela orientação segura, paciência e dedicação no transcorrer dos trabalhos.

Ao prof. Francisco Valdeci A. Ferreira (UFC) pelas valiosas sugestões e idéias que culminaram com nossa ida a Ribeirão Preto e Botucatu, tornando possível portanto, a realização de boa parte do trabalho.

Ao amigo, prof. Manoel Odorico de Moraes Filho, com quem iniciamos os primeiros passos no campo da cancerologia experimental.

Aos amigos, Drs. Luiz G. Porto Pinheiro e Gothardo F. Lima, elementos importantes na nossa formação em oncologia.

Aos dedicados Mestres Drs. José Murilo Martins e Ma

ria da Silva Pitombeira pelo muito que aprendemos no Curso de Especialização em Hematologia, o que por certo nos guiou na elaboração de parte da presente pesquisa.

Ao Prof. Marcos A. Rossi (USP-RP) pela importante ajuda no trabalho de microscopia eletrônica, inclusive documentação fotográfica.

À Profa. Dra. Therezinha F. Lorenzi (HC-USP) pelos valiosos ensinamentos e sugestões no tópico relativo a citoquímica enzimática.

Ao Prof. João Samuel M. de Oliveira (USP-RP) por sua valiosa orientação na dosagem de aminas biogênicas.

Ao Prof. Krishnamurti de Moraes Carvalho pela dedicada orientação nos ensaios enzimáticos.

Ao Prof. Francisco Ruy Capaz pela forma amigável e eficiente com que realizou os desenhos desta dissertação.

Ao Prof. Roberto Wagner Bezerra de Araújo, pelo espírito científico na observação do tumor original, sem o qual não estaríamos realizando esta pesquisa.

Ao Prof. Marcus Vale, pela sua amizade sincera, ajuda e incentivo constantes em todas as fases de realização deste trabalho.

Aos amigos do Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC, Profs. Teonas C. Cipriano, Dalgimar Bezerra de Menezes, Livino P. Junior, Paulo Roberto C. de Almeida, pela

ajuda nas discussões e documentação fotográfica.

À Sula e ao Sizenando, amigos de fê, por existirem.

À Nanã, pelo apoio e acolhida carinhosa em Ribeirão Preto.

Aos monitores Marcelo C. Leitão, Eduardo B. Rocha, e Marta M. O. Sampaio, que com dedicação e amizade, tornaram-se elementos indispensáveis na consecução dos nossos objetivos.

Aos técnicos Francisco Avelino Ferreira (UFC) e Laura Midore Kawasse (USP-RP) pela valiosa contribuição.

À Adelcir, que entendendo o verdadeiro sentido da amizade, realizou com dedicação, carinho e em tempo hábil, o trabalho datilográfico.

Aos nossos alunos, razão maior de todo nosso trabalho.

À Universidade Federal do Ceará, CNPq e FAPESP pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ANEXOS	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS	xviii
PRÓLOGO	xxi
 I - CAPÍTULO 1: CARACTERIZAÇÃO DO TUMOR TEGS-2047 (His topatologia, ultraestrutura, citoquímica enzimática, imunohistoquímica e potencial metastático)	
1.1 - INTRODUÇÃO	1
1.2 - MATERIAL	10
1.3 - MÉTODOS	14
1.4 - RESULTADOS	29
1.5 - DISCUSSÃO	42
 II - CAPÍTULO 2: ESTUDO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO TUMOR TEGS-2047 USANDO UM BLOQUEADOR DE MITOSE (Vincristina)	
2.1 - INTRODUÇÃO	51
2.2 - MATERIAL	66
2.3 - MÉTODOS	69
2.4 - RESULTADOS	78
2.5 - DISCUSSÃO	90

III - CAPÍTULO 3: ABORDAGEM FARMACOLÓGICA DO TUMOR TEGS 2047 (Estudo da hormônio-sensibilidade e detecção de substâncias biologicamente ativas no tumor)	
3.1 - INTRODUÇÃO	100
3.2 - MATERIAL	108
3.3 - MÉTODOS	112
3.4 - RESULTADOS	123
3.5 - DISCUSSÃO	147
IV - CONCLUSÕES GERAIS	162
RESUMO	164
ABSTRACT	167
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	170

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
I.1 - Resultados da citoquímica enzimática no tumor TEGS-2047	38
I.2 - Resultados da coloração para imunoperoxidase no tumor TEGS-2047	40
I.3 - Principais constituintes antigênicos dos tumores de partes moles	46
I.4 - Resultados de coloração para imunoperoxidase usando $\alpha 1$ antitripsina, $\alpha 1$ antiquimotripsina e lisozima em tumores fibrohistiocíticos e em outros sarcomas de partes moles humanos ..	48
II.1 - Valores dos índices mitóticos (médias acumuladas) de uma lâmina de cada grupo experimental para estimativa do número de campos mínimos necessários	75
II.2 - Valores médios dos volumes, diâmetros e pesos observados no tumor TEGS-2047	79
II.3 - Valores dos índices mitóticos (%) em relação ao tempo de ação da Vincristina (min.) para cada grupo experimental	86
II.4 - Dados cinéticos obtidos com o bloqueio no tumor TEGS-2047	87
II.5 - Sumário dos parâmetros cinéticos do tumor TEGS-2047	89
III.1 - Valores médios dos volumes e pesos do tumor TEGS-2047 inoculado em ratos Wistar machos e fêmeas	124

III.2 - Pesos médios do fígado, baço, próstata e vesícula seminal de animais castrados e tratados com Propionato de Testosterona (Grupo CT), animais castrados e não tratados (Grupo CNT) e animais não castrados e não tratados (Grupo C)	127
III.3 - Pesos médios do fígado e baço animais de animais castrados e tratados com MPA (Grupo CT), animais castrados e não tratados (Grupo CNT) e animais não castrados e não tratados (Grupo c) .	130
III.4 - Matriz de identificação de alguns polipeptídeos biologicamente ativos e amins biogênicas ...	155
III.5 - Resultados das dosagens de amins biogênicas em tecidos de animais portadores do tumor TEGS-2047 e tecidos de animais controle	157

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1.1 - Tumor TEGS-2047 original no 30º dia de observação quando o animal foi sacrificado	7
1.2 - Técnicas de imunoperoxidade utilizando o complexo avidina-biotina	25
1.3 - Aspecto externo do tumor TEGS-2047 em rato Wistar no 27º dia de sua evolução	30
1.4 - Aspecto macroscópico do tumor TEGS-2047 mostrado na Fig. 1.3	30
1.5 - A - Aspecto tumoral mostrando a grande predominância de células fusiformes arranjadas num padrão em "redemoinho" (HE 100XX)	31
B - Aspecto tumoral mostrando células fusiformes alongadas ou ovóides (HE 400XX)	31
C - Fibras de reticulina de distribuição irregular e aspecto grosseiro largamente distribuídos entre as células tumorais (Impregnação pela prata - 400XX)	31
D - Fibras de colágeno finamente distribuídas entre as células tumorais (Tricrômio de MASSON com azul de anilina - 400XX)	31
1.6 - Aspecto histológico de metástase pulmonar do tumor TEGS-2047	34
1.7 - A - Eletromicrografia mostrando células histiocíticas com núcleos (N) irregulares, indentados, com nucléolos (NU) evidentes e cromatina	

tina periférica (ME - 9.100XX).....	36
B - Eletromicrografia mostrando células xantomatosas típicas, com citoplasma quase totalmente preenchido por vâcuolos lipídicos(LI) e também por corpos semelhantes a lisossomos (L) (ME - 7.800XX)	36
1.8 - A - Preparação feita através de "imprint" e corada para Alfa naftil acetato esterase, mostrando forte positividade em várias células tumorais (setas) (400XX)	39
B - Preparação feita através de "imprint" e corada para fosfatase ácida, mostrando forte positividade em várias células tumorais(setas) (400XX)	39
C - Preparação feita através de "imprint" e corada para cloroacetato esterase, demonstrando total negatividade nas células tumorais (400XX)	39
1.9 - A - Coloração feita pela técnica de imunoperoxidase demonstrando impositividade na reação da Lisozima (400XX)	41
B - Coloração feita pela técnica de imunoperoxidase demonstrando imunopositividade na reação de Vimentina (400XX)	41
C - Coloração feita pela técnica de imunoperoxidase demonstrando total imunonegatividade na reação da $\alpha 1$ antiquimotripsina (A_1 ACT) (400XX)	41
D - Coloração feita pela técnica de imunoeroxidase demonstrando total imunonegatividade	

na reação da $\alpha 1$ antitripsina (A_1 ACR) (400XX)	41
2.1 - Fases da divisão celular	54
2.2 - Fases de distribuição no ciclo celular	59
2.3 - Esquema da ocular integradora de 100 pontos ZEISS KpL 10XX	73
2.4 - Aspecto tumoral após bloqueio com Vincristina..	73
2.5 - Índice mitótico acumulado de um animal de cada grupo experimental	74
2.6 - Curva de crescimento do tumor TEGS-2047	81
2.7 - Índice mitótico acumulado no 9º dia de evolução do tumor	83
2.8 - Índice mitótico acumulado no 18º dia de evolu- ção do tumor	84
2.9 - Índice mitótico acumulado no 27º dia de evolu- ção do tumor	85
2.10 - Comparação entre curvas de crescimento de 8 tu- mores experimentais, inclusive o estudado na presente pesquisa (TEGS-2047)	93
3.1 - Método de extração de material biológico a par- tir de amostras do tumor TEGS-2047	117
3.2 - Curva de crescimento comparativo do tumor TEGS- 2047 inoculado em ratos Wistar machos e fêmeas	125
3.3 - Efeitos no volume e peso tumorais de ratos ma- chos inoculados com o tumor TEGS-2047, castra- dos e tratados com Propionato de Testosterona (Grupo CT) ou, castrados sem tratamento (Grupo CNT) e não castrados e não tratados (Grupo C -	

controle)	128
3.4 - Efeitos no volume e peso tumorais de ratos machos inoculados com o tumor TEGS-2047, castrados e tratados com acetato de medroxiprogesterona (Grupo CT), castrados sem tratamento (Grupo CNT) e não castrados e não tratados (Grupo C-controle)	131
3.5 - Efeito do material biologicamente ativo presente no extrato metanólico do tumor TEGS-2047, no útero isolado de rata	133
3.6 - Efeito do material biologicamente ativo presente no extrato metanólico (ETM) e acetônico (ETA) do tumor TEGS-2047, no útero isolado de rata ..	134
3.7 - Atividade contrátil comparativa dos extratos metanólico (ETM), acetônico (ETA) e etanólico (ETE) do tumor TEGS-2047, no útero isolado de rata	135
3.8 - Efeito do material biologicamente ativo presente no extrato metanólico do tumor TEGS-2047, no útero isolado de cobaia	137
3.9 - Atividade contrátil e comparativa dos extratos metanólico (ETM), acetônico (ETA) e etanólico (ETE) do tumor TEGS-2047, no pílculo isolado de cobaia	138
3.10 - Atividade contrátil comparativa do material biologicamente ativo obtido do tumor TEGS-2047 de animais tratados com AAS (ETT) e animais controle (ETC), no útero isolado de rata	139
3.11 - Efeito do material biologicamente ativo presente no extrato acetônico do tumor TEGS-2047 de	

animais castrados e tratados com Testosterona (b), castrados e não tratados (c) e animais controle (c), no útero isolado de rata	141
3.12 - Atividade contrátil comparativa do material biologicamente ativo obtido do tumor TEGS-2047 de animais castrados e tratados com Testosterona (Grupo I), animais castrados sem tratamento (Grupo II) e animais controle (Grupo III), no útero isolado de rata	142
3.13 - Efeito do material biologicamente ativo incubado com Tripsina (TRI), Quimotripsina (QUI) e sem as enzimas (ET), no útero isolado de rata ..	143
3.14 - Atividade contrátil do material biologicamente ativo incubado com Tripsina, Quimotripsina e sem as enzimas (ET), no útero isolado de rata .	144
3.15 - Efeito da ciproheptadina nas respostas contráteis do extrato tumoral e da 5.Hidroxitriptamina, no útero isolado de rata	146

LISTA DE ANEXOS

Tabela	Página
3-A - Análise de variância dos pesos tumorais de animais castrados e tratados com propionato de <u>tes</u> tosterona, castrados e não tratados e não castrados e não tratados (controle)	158
3-B - Análise de variância dos volumes tumorais de animais castrados e tratados com propionato de testosterona, castrados e não tratados e não castrados e não tratados (controle)	159
3-C - Análise de variância dos volumes tumorais de animais castrados e tratados com MPA, castrados e não tratados e não castrados e não tratados (controle)	160
3-D - Análise de variância dos pesos tumorais de animais castrados e tratados com MPA, castrados e não tratados e não castrados e não tratados (con <u>tr</u> ole)	161

LISTA DE ABREVIATURAS

- A₁AT = Alfa-1-Antitripsina
- A₁ACT = Alfa-1-Antiquimotripsina
- AAS = Ácido Acetil Salicílico
- ABS = Albumina bovina sérica
- ACTH = Hormônio Adrenocorticotrófico
- AH = Antihistamínico
- AT = Atropina
- B = Bradicinina
- BCG = Bacillus Calmette-Guérin
- CEA = Antígeno Cármino-embriônico
- cm = Centímetro
- CP = Ciproheptadina
- CSF = Fator estimulador de colônia
- D = Diâmetro maior
- d = Diâmetro menor
- DHT = Diidrotestosterona
- DMBA = Dimetilbenzantraceno
- DNA = Ácido desoxiribonucleico
- EGE = Fator de crescimento epidérmico
- EP = Erro padrão da média
- ET = Extrato tumoral
- ETA = Extrato tumoral acetônico
- ETN = Extrato tumoral metanólico
- FHM = Fibrohistiocitoma maligno
- g = Grama
- G₀ = Estado de repouso a partir do qual as células podem retornar ao ciclo de divisão
- G₁ = Período da interfase, pré-síntese de DNA
- G₂ = Período da interfase, pós-síntese de DNA
- GF = Fração de crescimento

- GH = Hormônio do crescimento
- h = Hora
- HE = Hematoxilina-eosina
- 5HT = 5-Hidroxitriptamina
- HCG = Gonadotrofina Coriônica Humana
- IM = Índice mitótico
- IP = Índice proliferativo
- K_B = Taxa de produção celular
- kg = Quilograma
- K_G = Taxa de crescimento
- K_L = Taxa de perda celular
- Ln = Logarítmo natural
- MBA = Material biologicamente ativo
- mg = Miligrama
- min. = Minuto
- mm = Milímetro
- ml = Mililitro
- MPA = Acetato de medroxiprogesterona
- MSH = Hormônio estimulante dos melanócitos
- NC = Número total de células da população
- NGF = Fator de crescimento do nervo
- nm = Nanômetro
- NM = Número de células em mitose
- ODA = Ápice da orelha direita
- ODB = Base da orelha direita
- OEA = Ápice da orelha esquerda
- OEB = Base da orelha esquerda
- P = Compartimento proliferativo
- PAS = Ácido periódico de Schiff
- PDGF = Fator de crescimento derivado da plaqueta
- PM = Peso molecular
- Q = Compartimento de células não proliferativas
- Qui = Quimotripsina
- r^2 = Índice de correlação linear
- RNA = Ácido ribonucleico

- rpm = Rotações por minuto
- S = Período da interfase em que ocorre a síntese de DNA
- SM = Sem marca
- SST = Solução salina tamponada
- Tc(a) = Tempo do ciclo celular aparente
- TC = Tempo do ciclo celular
- T_D = Tempo de duplicação real da população
- TNF = Fator de necrose tumoral
- T_{PD} = Tempo potencial de duplicação
- TA = Temperatura ambiente
- TRH = Hormônio liberador de Tireotrofina
- Tri = Tripsina
- TSH = Hormônio Tireotrófico
- TM = Tempo de mitose
- UFC = Universidade Federal do Ceará
- µg = Micrograma
- µm = Micrômetro
- ϕ = Índice de perda celular

PRÓLOGO

A nossa pesquisa sobre CÂNCER não se traduz somente como uma inquietação de natureza acadêmica. Na verdade, ela revela também um pouco das nossas preocupações enquanto profissional da saúde, enquanto cidadão, residindo e trabalhando numa cidade, onde, entre 1978 e 1980, as neoplasias malignas ocupavam o segundo lugar entre as causas de morte, em homens e mulheres, com 978 óbitos masculinos e 1.185 óbitos no sexo feminino. A mortalidade proporcional foi de 5,8% e de 8,6, respectivamente e, as taxas de mortalidade, 55,5 por 100.000 homens e de 58,9 por 100.000 mulheres^(*).

Nesses termos, o câncer com seus níveis atuais de incidência e de mortalidade, se justifica como sério problema de saúde pública e, em termos de projeções, dada a sua tendência ascendente, a importância dessa doença se ampliará. Vãrios são os condicionantes que determinam um risco aumentado para o câncer, o que implica na necessidade de conjugação de esforços para eliminar, deter ou atenuar os efeitos desses condicionantes, no sentido de solapar o curso acessivo dessa enfermidade e inverter sua marcha.

(*) Informações retiradas do livro de Marcelo Gurgel C. da Silva, Câncer em Fortaleza: morbidade e mortalidade no período de 1978 a 1980, págs. 83/4.

Portanto, este trabalho científico para a conclusão do nosso mestrado em Farmacologia ultrapassa os limites do academicismo e pretende ser uma contribuição na tentativa mais ampla de superação de alguns dos graves problemas de saúde.

O que apresentamos aqui é o resultado de quatro anos de investigação, estudando um tumor espontâneo, surgido na região da glândula salivar de um rato Albino (Tumor TEGS-2047). Esse tumor vinha sendo mantido em nosso Departamento e já havia se constituído em objeto de estudo para outros pesquisadores.

No primeiro momento nos decidimos por uma abordagem farmacológica da neoplasia e, posteriormente, sentimos a necessidade de uma definição histológica do tumor. No final, a estruturação dos capítulos desta dissertação reflete claramente o desenrolar da nossa pesquisa.

Desse modo, no primeiro capítulo caracterizamos o tumor, do ponto de vista histológico. Para tal, lançamos mão de técnicas de histopatologia convencional, associada ao estudo de microscopia eletrônica, bem como de citoquímica enzimática e imunohistoquímica. No segundo capítulo relatamos o estudo da cinética de crescimento do tumor e, no terceiro capítulo apresentamos a abordagem farmacológica da neoplasia. Nesse caso, estudamos a influência do sexo, da gonadectomia isolada, ou associada ao tratamento com esteróides sexuais (andrógeno e progestágeno), bem como procuramos detectar a presença de substância(s) biologicamente ativa(s), produzida(s)

pelo tumor.

À medida em que desenvolvíamos a pesquisa, nos depa^{ra}ramos com uma dificuldade de ordem metodológica: na nossa Universidade não tínhamos condições de fazer a classificação histológica do tumor. Esse problema foi superado quando nos deslocamos até São Paulo e tivemos acesso ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Júlio de Mesquita (Botucatu), onde realizamos a caracterização do tumor e iniciamos o estudo cinético, que concluímos no Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC. A abordagem farmacológica foi, na sua totalidade, desenvolvida neste mesmo Departamento.

Portanto, este trabalho é fruto de um esforço conjunto, envolvendo instituições e pessoas.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO DO TUMOR TB45-1047 (HISTOPATOLOGIA, QUÍMICA, CITOQUÍMICA ENZIMÁTICA, IMUNOHISTOQUÍMICA E PATOLOGIA GERAL).

1.1 - Fibrohistiocitoma de células grandes

Os fibrohistiocitomas são tumores benignos que ocorrem com frequência em cães, sendo mais comuns em gatos. São caracterizados por células grandes, arredondadas, com citoplasma abundante e núcleo grande e hipercromático. Podem ocorrer em qualquer parte do corpo, mas são mais frequentes na cabeça e no pescoço. A maioria dos casos é diagnosticada por meio de exames histopatológicos.

A ocorrência desses tumores é mais alta em cães de raças como o Boxer e o Mastiff. Em gatos, a ocorrência é mais baixa, mas também pode ocorrer. A maioria dos casos é diagnosticada por meio de exames histopatológicos. A maioria dos casos é diagnosticada por meio de exames histopatológicos.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO DO TUMOR TEGS-2047 (Histopatologia, ultraestrutura, citoquímica enzimática, imunohistoquímica e potencial metastático).

1.1 - INTRODUÇÃO

1.1.1 - Fibrohistiocitoma maligno humano .

Os fibrohistiocitomas malignos (FHM) humanos também referidos como fibroxantossarcomas e fibroxantomas malignos, são sarcomas que ocorrem mais comumente nos tecidos moles profundos e menos frequentemente nos tecidos moles superficiais. (O'BRIAN & STOUT, 1964; MERKOW et al., 1971; KEMPSON & KIRIAKOS, 1972; WEISS & ENZINGER, 1978; ALGUACIL-GARCIA et al., 1978).

A ocorrência dessas neoplasias é hoje bastante reconhecida graças às descrições pioneiras de O'BRIAN & STOUT, em 1964, os quais introduziram o conceito de tumores fibrosos malignos diferindo do já conhecido fibrossarcoma. Posteriormente, KEMPSON & KIRIAKOS (1972) e SOULE & ENRIQUEZ (1972) dividiram esses tumores em categorias, introduzindo critérios de avaliação da agressividade dos mesmos, tais como: presença de um padrão "em redemoinho" e de células pleomórficas bizarras e frequência de mitoses.

Em 1978, WEISS & ENZINGER, baseados na análise dos achados clínico-patológicos de 200 casos de FHM, descreveram tais tumores como sendo sarcomas pleomórficos, primitivos, mostrando diferenciação parcial fibroblástica e histiocítica, indicada pela produção de colágeno e fagocitose ocasional. Des-

creveram ainda que, os FHM, em sua forma clássica, são constituídos de células fusiformes (fibroblásticas-símile) e arredondadas (histiocíticas-símile), arranjadas num padrão "em rede" e acompanhadas por células gigantes pleomórficas e células inflamatórias.

É hoje evidente que os FHM são os sarcomas de partes moles mais comuns na vida adulta tardia (SOULE & ENRIQUEZ, 1972; WEISS & ENZINGER, 1978; KEARNEY et al., 1980), tendo sido descritas várias formas distintas de apresentação dos mesmos, incluindo FHM fibroso, FHM histiocítico e FHM pleomórfico com variantes mixóide e inflamatória (SOULE & ENRIQUEZ, 1972; FU et al., 1975). Entretanto o histiocitoma maligno e o reticulossarcoma de partes moles não fazem parte do grupo dos FHM devido a ausência do componente fibroblástico (ENJOJI et al., 1979).

Devido a esse alto grau de variação no padrão morfológico, os FHM foram, e ainda têm sido, frequentemente confundidos com outros sarcomas, tais como o rabdomiossarcoma pleomórfico, o lipossarcoma e o fibrossarcoma. Como resultado a verdadeira incidência e o potencial biológico desses neoplasmas não têm sido perfeitos e definitivamente determinados (WEISS & ENZINGER, 1978; ENJOJI et al., 1979).

Embora a origem histiocítica dos FHM tenha sido considerada por alguns autores (KAUFFMAN & STOUT, 1961; KEMPSON & KYRIAKOS, 1972), outros mais recentemente têm sugerido sua origem a partir de uma célula primitiva mesenquimal (FU et

al., 1975; TAXY & BATTIFORA, 1977; LAGACE et al., 1979; ENJOJI et al., 1980). No entanto, a precisa histogênese dos FHM permanece controversa, havendo necessidade de maiores estudos (KEARNEY et al., 1980). Nesse sentido, tem-se sugerido a criação de modelos experimentais de FHM em animais de laboratório (GREAVES et al., 1985).

1.1.2 - Tumores fibrohistiocíticos em animais experimentais

O aparecimento de sarcomas de partes moles em várias cepas de ratos idosos é um fenômeno bem conhecido e registrado na literatura. Tais tumores, descritos como originários de células mesenquimais, têm recebido denominações várias como fibrossarcoma, lipossarcoma, leiomiossarcoma e sarcomas indiferenciados (CARTER, 1973; GOODMAN et al., 1979, 1980). Entretanto, apenas recentemente é que o conceito de fibrohistiocitoma maligno em cepas de ratos tem sido considerado (WARD et al., 1981; GREAVES & FACCINE, 1981).

PRADHAM e colaboradores, em 1974, demonstraram o desenvolvimento de tumores fibrohistiocitomas-símile em ratos previamente tratados com injeção subcutânea de certos extratos de plantas. Em 1980, YUMOTO & MORIMOTO reportaram experimentos com fibrohistiocitomas surgidos em camundongos inoculados com macrófagos transformados de medula óssea. Em adição, foi demonstrado que a administração subcutânea de 4 (hidroxiamino) quinolina-1-óxido em ratos também produziu fibrohistio-

citomas malignos semelhantes aos humanos (KONISHI et al., 1982). Mais recentemente, FHM em ratos surgiram nos locais de implantação de filtros de miliporo (GREAVES et al., 1985), bem como registrou-se o desenvolvimento e caracterização de um tumor da linhagem histiocítica-macrofágica transplantável intraperitonealmente em ratos Wistar (KHAR, 1986).

Além disso tem-se demonstrado a ocorrência espontânea de alguns tumores de partes moles em ratos idosos, com características biológicas, histológicas e ultraestruturais semelhantes às descritas nas neoplasias fibrohistiocíticas humanas (SQUIRE et al., 1981; BARSOUM et al., 1984).

1.1.3 - Caracterização das neoplasias fibrohistiocíticas

A base para o argumento de que esses tumores são parcialmente histiocíticos é suportada por observações à microscopia óptica convencional, incluindo entre outras, sinais de fagocitose; achados ultraestruturais, tais como atividade lisossômica intensa e estudos de histoquímica enzimática, demonstrando a presença de enzimas hidrolíticas como a fosfatase ácida e as esterases inespecíficas, α naftil acetato esterase ou α naftil butirato esterase (FU et al., 1975; TAXY & BATTIFORA, 1977; ALGUACIL-GARCIA et al., 1978; ENJOJI et al., 1980; HARRIS, 1980; TSUNEYOSHI et al., 1981).

IWASAKI e colaboradores, em 1982, utilizando cultura de células obtidas de fibrohistiocitomas malignos e benignos,

nos, caracterizaram funcionalmente os histiocíticos através da detecção de receptores de superfície para a porção Fc da imunoglobulina G, receptores de superfície para C3, imunofagocitose de eritrócitos opsonizados e enzimas lisossomais. Tais procedimentos foram usados recentemente na caracterização de um tumor da linhagem histiocítica-macrofágica em ratos (KHAR, 1986).

A utilização de técnicas de imunohistoquímica tem permitido localizar vários antígenos em histiócitos de tecidos normais. Alfa-1 Antitripsina (A_1AT) foi demonstrada em histiócitos de fígado e tecido linfóide (ISAACSON et al., 1981). Lisozima foi visualizada em células de Kupffer do fígado, nos seios histiocíticos de linfonodos e em células monócitoides de medula óssea (MASON & TAYLOR, 1975; LI et al., 1972). Alfa-1-Antiquimotripsina (A_1ACT) foi também demonstrada em tecidos linfóides, particularmente nos histiócitos da polpa e nos seios histiocíticos (MOTOI et al., 1980).

Alguns estudos recentes têm mostrado a presença de Lisozima, Alfa-1-Antitripsina e Alfa-1-Antiquimotripsina em fibrohistiocitomas humanos e em outros tumores de suposta origem fibroblástica-histiocítica, utilizando-se a técnica da imunoperoxidase (BURGDORF et al., 1981; Du BOULAY, 1982; KINDBLOM et al., 1982). Marcadores de filamentos intermediários como a Vimentina, também têm sido usados no diagnóstico de sarcomas de partes moles (GABBIANI et al., 1981).

No campo da patologia de tumores experimentais, entretanto, técnicas de imunohistoquímica não têm sido largamen

te utilizadas. Apenas recentemente um grupo de vinte sarcomas histiocíticos em ratos Wistar foi caracterizado através da técnica da imunoperoxidase (BARSOU et al., 1984).

1.1.4 - O tumor TEGS-2047

BEZERRA DE ARAÚJO e colaboradores, em 1980, descreveram o aparecimento espontâneo de um tumor na região correspondente a da glândula salivar de um rato adulto, albino, Wistar, pertencente à Colônia do Biotério do Departamento de Patologia e Medicina Legal do Curso de Medicina da UFC. O animal ficou em observação por 30 dias, quando a massa tumoral já comprometia o olho direito e estava ulcerada (Fig. 1.1). Foi então sacrificado e, após ressecção completa do tumor, fragmentos foram utilizados para estudo histopatológico e para o transplante em ratos receptores Wistar, pela técnica do trocarter. Não foram encontradas metástases. Segundo os autores, ao exame microscópico o tumor apresentava extensas áreas de necrose e era constituído basicamente de 2 tipos celulares: a) células arredondadas pequenas, hipercromáticas, com escasso citoplasma e b) células de aspecto fusiforme, com abundante citoplasma eosinofílico. Descreveram ainda, a presença de cartilagem, áreas mixóides, glandulares, e mesmo glândulas sebáceas. As mitoses eram frequentes, principalmente nas zonas de predomínio das células fusiformes.

Para os 5 primeiros transplantes, a neoplasia ficou



FIGURA 1.1 - Tumor TEGS-2047 original no 30º dia de observação quando o animal foi sacrificado. Note-se que a massa tumoral já comprometia o olho direito e estava ulcerada (Gentileza do Prof. Roberto Wagner Bezerra de Araújo).

mantida basicamente às custas das células fusiformes. Reportaram ainda que, em virtude do grande pleomorfismo histológico do neoplasma, não foi possível enquadrá-lo em nenhum dos tipos descritos na literatura e, por isso, o tumor foi denominado de TEGS-2047, significando Tumor Espontâneo na Região da Glândula Salivar e, 2047, o seu número de registro.

Após as 10 primeiras repicagens o tumor passou a ser mantido no Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Curso de Medicina da UFC, através de transplantes subcutâneos pela técnica do trocarter (HAMBURGER & FISHMAN, 1953), encontrando-se até o início desse estudo na sua 75a. passagem.

TROMPIERI, 1984 (Tese de Mestrado - UFC), descreveu características histológicas semelhantes às descritas por BEZERRA DE ARAÚJO et al, para o tumor TEGS-2047 sem, no entanto, enquadrá-lo em alguma categoria histológica ou mesmo propor alguma classificação para o mesmo.

Viu-se portanto, a necessidade de um estudo morfológico mais profundo, usando técnicas outras, além da microscopia óptica usual, na tentativa de caracterizar tal neoplasia. Supôs-se então, pelo padrão histológico descrito até agora, que o tumor original poderia ser uma neoplasia de partes moles ou mesmo um fibrohistiocitoma, que é o mais comum tumor de partes moles descrito em ratos (GREAVES & FACCINE, 1981).

1.1.5 - Objetivos

Foram objetivos deste primeiro capítulo:

- 1) Demonstrar a suposta natureza fibrohistiocítica do tumor TEGS-2047, através da microscopia óptica, microscopia eletrônica, citoquímica enzimática e imunohistoquímica.
- 2) Pesquisar o aparecimento de metástases.

1.2.2 - Soluções fisiológicas

Ringer com lactato de sódio. Química - Farmacêutica
Gasper Viana: NaCl 6g; KCl 0,3g; $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,1g; Lactato de Na 3,1g (concentração por litro).

Solução de cloreto de sódio 0,9%; Química Farmacêutica Gaspar Viana.

1.3.3 - Drogas e marcadores antigênicos

Anticorpos primários: Anti-fibroblasto, Anti-triplexina, Anti- $\alpha 1$ antitripsina, Anti- $\alpha 1$ antitripsina e Anti- $\alpha 1$ antitripsina. Laboratório, Dinamarque.

1.2 - MATERIAL

1.2.1 - Animais experimentais

Foram utilizados ratos albinos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, machos, com peso médio de 120 gramas, com 30 a 50 dias de nascidos, provenientes da Colônia do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC. Todos os animais foram mantidos em gaiolas de aço inoxidável na parte superior recebendo água "ad libitum" e ração balanceada Coelhex (CBR).

1.2.2 - Soluções fisiológicas

Ringer com lactato de sódio, Química Farmacêutica Gaspar Viana: NaCl 6g; KCl 0,3g; $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2g; lactato de sódio 3.1g (concentração por litro).

Solução de cloreto de sódio 0,9%; Química Farmacêutica Gaspar Viana.

1.2.3 - Drogas e marcadores antigênicos

Anticorpos primários: Anti-lisozima; Anti-alfa 1 antitripsina; Anti-alfa 1 anti-quimotripsina e Anti-vimentina (DAKO Laboratórios, Dinamarca).

Anticorpos secundários biotinilados (Vector Laboratories, Califórnia).

Cloranfenicol (Sintomicetina. Laboratório Lepetit).

Complexo Avidina-Biotina-Peroxidase (Vector Laboratories, Califórnia).

Tripsina (Worthington Biochemical Corp. peptides).

1.2.4 - Reagentes e Corantes

- Acetato de uranila (Merck)
- Acetato de chumbo (Merck)
- Acetato de sódio (Merck)
- Ácido clorídrico (Merck)
- Amino-etil-carbazol (Sigma Chemical Co.)
- Albumina bovina sérica (Sigma Chemical Co.)
Califórnia)
- Álcool etílico (Merck)
- Aldeído glutárico (Sigma Chemical Co.)
- Alfa naftil acetato (Biosynth Riedel de Haen)
- Azul de Trypan (Merck)
- Dietilbarbiturato de sódio (Sigma Chemical Co.)
- Dimetilformamida (Vetec Química Fina Ltda.)
- Eosina (Merck)
- Formaldeído (Herzog- sol. a 4% e 10%)
- Fosfato de potássio (Merck)
- Fosfato de sódio bifásico (Montedson Farmacêutica

Carlo Erba)

- Hematoxilina (Merck)
- Hematoxilina de Mayer (Sigma Chemical Co.)
- Naftol-ASD-Cloroacetato (Biosynth Riedel de Haen)
- Naftol AS bifosfato (Biosynth Riedel de Haen)
- Naftol AS acetato (Biosynth Riedel de Haen)
- Nitrito de sódio (Merck)
- Metanol (Reagen)
- Pararosanilina (Sigma Chemical Co.)
- Tetróxido de ósmio (Merck)

1.2.5 - Aparelhagem

- Autoclave Fabber
- Balança Mettler modelo P₃
- Banho-Maria, Soc. Fabbe Ltda.
- Estufa de Secagem e Esterilização, FANEM, modelo 315 SE
- Microscópio Binocular Zeiss Standart acoplado com câmara fotográfica Zeiss
- Microscópio Eletrônico Zeiss EM 109
- Medidor de pH, Netron
- Micrótomo Spencer 820
- Ultramicrótomo Sorval UT 5000

1.2.6 - Materiais diversos

- Agulhas hipodérmicas 25-7 BD
- Becher de 10, 50 e 100ml, PYREX
- Homogeneizador de POTTER manual
- Lâminas e lamínulas
- Luvas cirúrgicas
- Material cirúrgico: pinças, bisturi, tesoura, trocarter, fios de algodão
- Parafina para preparações histológicas, QUEEL
- Pipetas e provetas
- Placas de Petri do tipo bacteriológico; PYREX
- Seringas de 1,3 5 e 20cc - BD.

1.3 - MÉTODOS

1.3.1 - Técnica de transplante

Os animais doadores com 14 dias de evolução do tumor (TEGS-2047), foram sacrificados por inalação com éter etílico, em condições ótimas de assepsia, mediante esterilização da pele com solução de álcool iodado. A seguir, foi feita uma incisão na pele que recobre o tumor, tendo sido este completamente excisado. Após a exérese, o material foi colocado em placa de Petri contendo 19ml de Ringer lactato e 1,0ml de cloranfenicol em solução de 100mg/ml, para lavagem. Em seguida, as partes necrosadas do tumor foram retiradas e o restante, já totalmente limpo, foi transferido para outra placa de Petri com as mesmas soluções da anterior, para manutenção. Após esse procedimento, foi feito o recorte dos fragmentos com tamanho de 1,0 x 0,4cm. O ringer lactato foi usado com a finalidade de manter as células neoplásicas com vitalidade, enquanto que o cloranfenicol foi adicionado na intenção de inibir a proliferação bacteriana.

Os animais receptores foram submetidos a anestesia com éter etílico e feita assepsia da pele com álcool etílico. Por meio de um trocarter (HAMBURGER & FISHMAN, 1953) injetou-se por volta de 70-75mg de tecido tumoral na região lombar,

de cada animal receptor. Tentou-se anteriormente, obter uma suspensão de células para o transplante com uma acurada contagem de células tumorais viáveis (PAUL, 1975). Para tal utilizou-se uma enzima proteolítica, a tripsina para isolamento das células e o azul de Trypan para julgamento da viabilidade celular. Com este método conseguiu-se um índice de pega menor que 50% quando se inoculava por via subcutânea 2×10^6 células viáveis obtidas a partir de 70 a 75mg de tecido tumoral. Por esta razão o primeiro método foi o escolhido, apesar de mais grosseiro, no entanto fornecendo um índice de pega de 80 a 90%.

1.3.2 - Microscopia Óptica

Fragmentos de 10 tumores foram retirados, fixados em formaldeído a 10% com tampão fosfato de sódio durante 24 horas, incluídos em parafina e cortados ($5\mu\text{m}$) por micrótomo comum. O método de coloração utilizado foi o da Hematoxilina-Eosina, sendo que, em algumas lâminas utilizou-se o PAS (ácido periódico de Schiff), o tricrômio de Masson e a impregnação de prata para reticulina. O material foi examinado e fotografado em microscópio Zeiss standart.

1.3.3 - Microscopia eletrônica

Amostras de 2 tumores, selecionados ao acaso, foram

cortadas com bisturi em pequenos fragmentos, desengordurados e imersos em aldeído glutárico a 2,5% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,3) a temperatura de 40°C. A seguir foram recortados em blocos de 1mm³ a 40°C. Em seguida foram lavados em tampão fosfato (3 lavagens, 10 min. cada) e deixados no mesmo durante a noite. Foram então submetidos a osmicação (pós-fixação), em solução de tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,3) durante 2 horas a 4°C, desidratados em concentrações crescentes de acetona e incluídos em araldite. Foram então realizados cortes ultra-finos com navalha de diamante em ultramicrotomo, montados em grades de 200 "Mesh", duplamente corados com acetato de uranila e citrato de chumbo, examinados e fotografados em microscópio eletrônico Zeiss, a 80 KV.

1.3.4 - Citoquímica enzimática

Amostras de 2 tumores selecionados ao acaso foram utilizadas para preparações através de "Imprints" e, a seguir, coradas para verificação da atividade das seguintes enzimas: alfa-naftil acetato esterase, fosfatase ácida e naftol AS clo roacetato esterase.

1.3.4.1 - Alfa-naftil acetato esterase ou Alfa-Nae (esterase inespecífica)

1.3.4.1.1 - Princípio da reação

A esterase inespecífica hidrolisa o substrato alfa naftil acetato que dá um precipitado de grânulos azuis se o sal diazônico usado for o Fast Blue BB, e marron avermelhado se for o Fast Garnet ou a pararosanilina (LI et al., 1972; YAM et al., 1971; LORENZI et al., 1985). A atividade dessa enzima é demonstrada em monócitos e monoblastos (LI et al., 1973).

1.3.4.1.2 - Técnica

A técnica utilizada no presente estudo foi a descrita por LI et al., 1973, modificada por LORENZI et al., 1985.

a) Reativos

1 - Tampão fosfatos

Solução 1 - fosfato de potássio 0,1M

$K H_2PO_4$ PM = 136,09

$K H_2PO_4$ 6,8g

H_2O destilada 500ml

Solução 2 - fosfato de sódio bibásico 0,1M

$Na 2HPO_4 \cdot 2H_2O$ PM = 177,99

$Na 2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 8,89g

H_2O destilada 500ml

2 - Mistura substrato

- 10mg de alfa-naftil-acetato dissolvidos em

- 0,8ml de acetona (solução "stock" A)
- 25ml de tampão fosfato pH 7,5
- Pararosanilina hexazotizada (solução "stock" B)

Preparo da solução "stock" B

- Pararosanilina 4% 2 gotas
- Nitrito de sódio 4% 2 gotas
- A seguir misturados durante 60 seg. e depois diluídos em 50ml de tampão fosfato (pH 7,5).

Preparo da solução de pararosanilina 4%

- Pararosanilina 1,0g
- Água deionizada 20ml
- HCl concentrado 5ml
- Aquecimento, filtração após resfriamento e estocagem a 4% em frasco escuro
- A solução de nitrito de sódio a 4% é preparada imediatamente antes do uso.

A mistura substrato (solução "stock" A + solução "stock" B) é filtrada antes do início da incubação.

b) Técnica

- 1 - Os esfregaços, não submetidos a fixação, foram incubados por 30 min., à temperatura ambiente (25°C) na mistura substrato.
- 2 - Lavados delicadamente em água destilada e se

cados.

- 3 - Contracolorados com verde de metila a 1% por 1 min.
- 4 - Lavados em água, secados e montados em lamínula usando gelatina-glicerina-fenol.

A solução do verde de metila a 1% foi preparada a partir de solução a 1,0% em tampão acetato 0,1M, pH 4,0. O corante foi extraído com clorofórmio em funil de decantação.

1.3.4.2 - Naftol AS cloroacetato esterase

1.3.4.2.1 - Princípio da reação

A reação se baseia na hidrólise do substrato naftol AS cloroacetato pela enzima cloroacetato-esterase em presença de um sal diazônico, a pararosanilina, com a formação de grânulos vermelho-brilhante no citoplasma. A reação é positiva na série granulocítica neutrófila, do mielócito até o segmentado. É também fortemente positiva nos mastócitos. Nos monócitos e basófilos é fraca ou negativa, sendo negativa nas demais células (LI et al., 1972, 1973; YAM et al., 1971; LORENZI et al., 1985).

1.3.4.2.2 - Técnica

A técnica utilizada foi a descrita por LI et al.,

1973, modificada por LORENZI et al., 1985.

a) Reativos

1 - Tampão veronal-acetato pH 7,62

Dietilbarbiturato de sódio	7,357g
Acetato de sódio	4,857g
Cloreto de sódio	8,500g
Ácido clorídrico 1N	200ml
Água destilada	1250ml

2 - Mistura substrato

Solução "stock" A

- Naftol-ASD-cloroacetato	10g
- Dimetilformamida	1ml

Solução "stock" B (pararosanilina hexazotizada)

- Pararosanilina 4%	2 gotas
- Nitrito de sódio 4%	2 gotas
- A seguir misturados durante 60 seg. e depois adicionados em 60ml de tampão acetato pH 7,62.	

A pararosanilina a 4% e o nitrito de sódio a 4% foram preparados da mesma forma descrita para a reação da alfa-naftil acetato esterase.

b) Técnica

1 - Os esfregaços foram fixados em metanol- for-

mol (9:1), a frio, por 30 seg.

- 2 - Lavados com água destilada e secados ao ar
- 3 - Incubados na mistura substrato, a temperatu
ra ambiente por 60 min.
- 4 - Lavados com água corrente por 4 a 5 vezes e
secados ao ar
- 5 - Contracorados pela hematoxilina da Carazzi
por 15 min.
- 6 - Lavados, secados e montados em lâminula com
glicerina gelatinosa

1.3.4.3 - Fosfatase ácida

1.3.4.3.1 - Princípio da reação

As fosfatases ácidas constituem um grupo heterogêneo de isoenzimas que hidrolisam ésteres-fosfatos em meio ácido, liberando naftóis que se acoplam a sais diazônicos. O produto resultante é um precipitado colorido que mostra o local de atividade da enzima. O substrato utilizado é o naftol AS-B1-fosfato e o produto da reação é constituído por grânulos vermelho-vivo, quando se usa o sal Fast Garnet GBC ou a pararosanilina; e azul, quando se usa o sal Fast Blue BB. A reação é fortemente positiva nos linfócitos "T" e linfoblastos "T", moderadamente positiva nos plasmócitos, megacariócitos e monócitos, fraca na série granulocítica neutrofílica e nos eritró

blastos e fracamente positiva ou negativa nas células blásticas mielóides e eritroblastos imaturos (LI et al., 1972; JAM-
RA & LORENZI, 1983; LORENZI et al., 1985).

1.3.4.3.2 - Técnica

A técnica utilizada foi a descrita por BARKA & AN-
DERSON, 1962; YAM et al., 1970 e modificada por LORENZI et
al., 1985.

a) Reativos

1 - Tampão veronal-acetato pH 7,62

Vide preparo na reação descrita anteriormen-
te

2 - Mistura substrato

Solução "stock" A

- Naftol-AS-BI-fosfato 10mg
- Dimetilformamida 1ml

Solução "stock" B

- Pararosanilina 4% 12 gotas
- Nitrito de sódio 4% 12 gotas
- A seguir misturados durante 60 seg. e de-
pois adicionados em tampão veronal-acetato
pH 5,8, ajustado com NaHO₂N quando necessá-
rio.

Nota: A pararosanilina a 4% e o nitrito de

sódio a 4% foram preparados conforme descrição feita para as 2 reações anteriores.

b) Técnica

- 1 - Os esfregaços, não fixados foram incubados com o tampão substrato por 2 a 3 horas a 37°C.
- 2 - Lavados cuidadosamente com água destilada e secados ao ar.
- 3 - Contracolorados com verde de metila 1% (preparado conforme descrição anterior) por 1 min.
- 4 - Lavados em água, secados e montados em lâmina, com gelatina-glicerina-fenol.

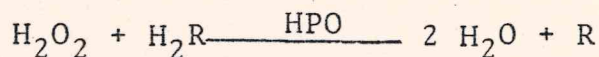
1.3.5 - Imunohistoquímica

1.3.5.1 - Princípio da reação

A técnica de imunoperoxidase é um método imunológico que tem sido usado para a demonstração de vários antígenos em tecido histológico e utiliza anticorpos marcados ou não marcados e uma enzima muito estável, a peroxidase do rabanete ("Horseradish"). A peroxidase é uma enzima de escolha devido sua facilidade, alta atividade enzimática e de conjugação, além de relativa estabilidade a temperatura ambiente e baixo custo. Como marcadores visuais da reação utilizam-se os cro-

mogenos ou doadores de elétrons, para os quais a peroxidase é ávida (HEYDERMAN, 1979).

A reação bioquímica básica da peroxidase é demonstrada como segue:



H_2O_2 = peróxido de hidrogênio

H_2R = cromogeno doador

HPO = peroxidase "Horseradish"

R = cromogeno colorido oxidado

O cromogeno é então polimerizado no sítio antigênico, na presença de peroxidase para formar um polímero instável de cor variável, dependendo da substância utilizada.

1.3.5.2 - Técnica

A técnica de imunoperoxidase empregada na presente pesquisa, foi a da AVIDINA-BIOTINA, modificada, descrita por HSU et al., 1981 (Fig. 1.2).

1 - Foram retirados cortes de 5µm de blocos de parafina de 2 tumores que haviam sido selecionados ao acaso e fixados em formaldeído a 4% tamponado com fosfato de sódio, durante 24 horas.

2 - Os cortes foram colocados sobre lâmina de histologia previamente albuminizada. A seguir os cortes sofreram desparafinização em xilol e hidratação em álcoois progressiva

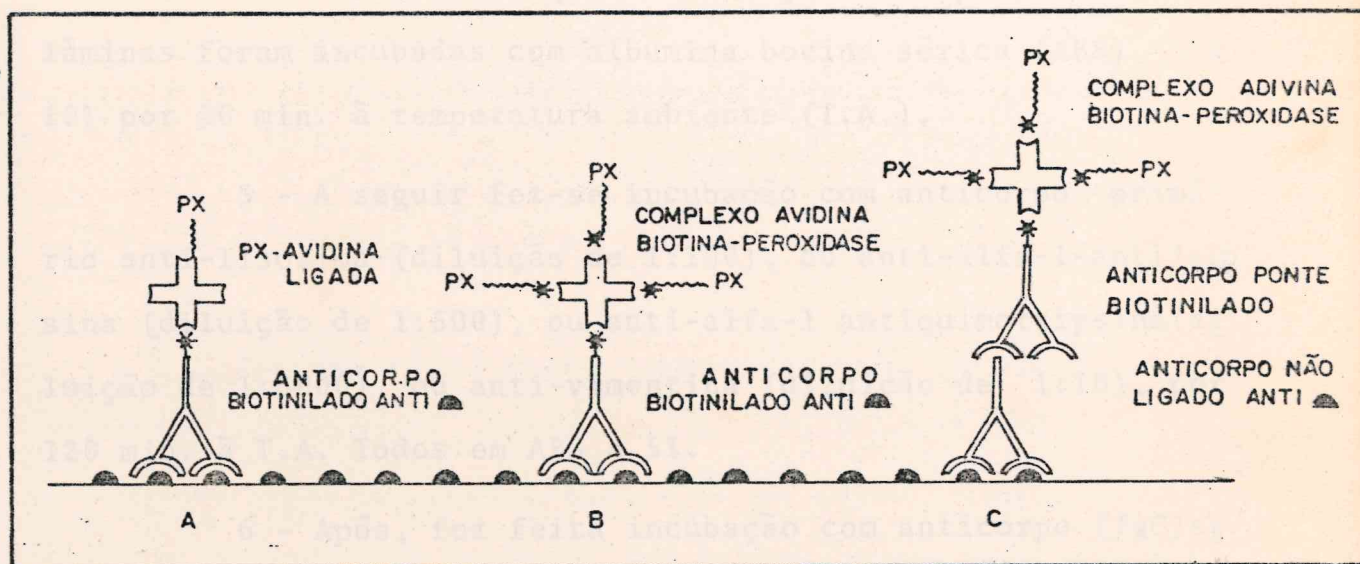


FIGURA 1.2 - Técnicas de imunoperoxidase utilizando o complexo avidina-biotina: os semi-círculos indicam os antígenos, PX indica peroxidase, asteriscos, a biotina e a cruz, avidina. A técnica empregada na presente investigação está representada na letra C.

mente mais hidratados até solução salina tamponada (SST) a 0,1M.

3 - As lâminas foram incubadas durante 5 min. com solução de peróxido de hidrogênio a 7% para bloquear a atividade da peroxidase endógena.

4 - A fim de bloquear as reações inespecíficas, as lâminas foram incubadas com albumina bovina sérica (ABS) a 10% por 20 min. à temperatura ambiente (T.A.).

5 - A seguir fez-se incubação com anticorpo primário anti-lisozima (diluição de 1:100), ou anti-alfa-1-antitripsina (diluição de 1:500), ou anti-alfa-1 antiquimotripsina (diluição de 1:5000), ou anti-vimentina (diluição de 1:10), por 120 min. à T.A. Todos em ABS a 5%.

6 - Após, foi feita incubação com anticorpo (IgG) secundário biotinilado, produzido na cabra anti-IgG de coelho no caso da pesquisa de lisozima, alfa-1-anti-tripsina (A_1AT) e alfa-1-anti-quimotripsina (A_1ACT) e anticorpo biotinilado (IgG), produzido no cavalo anti-IgG de camundongo, no caso da vimentina. A diluição foi de 1:200 e 1:25 em BSA a 5% respectivamente, por 30 min à T.A.

7 - Feita, a seguir, incubação com Complexo Avidina Biotina-Peroxidase na diluição de 1:50 em SST por 30 min. à T.A.

8 - A ligação do anticorpo primário com o antígeno em pesquisa foi visualizada, incubando-se as lâminas com solu

ção de amino-etil-carbazol (25mg deste em 1ml de SST contendo H_2O_2 a 0,3%), por 40 min. à T.A.

9 - A seguir, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Mayer por 5 min., desidratadas e montadas em Permont.

10 - Entre cada fase da reação em que foi feita incubação, os cortes foram lavados com jatos delicados de SST por 2 vezes.

1.3.5.3 - Controles positivos

Tecidos previamente conhecidos como possuidores dos antígenos pesquisados, foram corados concomitantemente com os 2 casos de tumores. Para a AlAT usou-se fígado humano com cirrose por deficiência de AlAT; rim humano normal para a AlACT, a qual está presente nos túbulos renais proximais; Sarcoma granulocítico para lisozima (muramidase) e fibrossarcoma para vimentina.

1.3.5.4 - Controle negativo

Usou-se como controle negativo a substituição do anticorpo primário específico por soro não imune da mesma espécie animal onde foi produzido o anticorpo primário. Assim é que, utilizou-se soro normal não imune de coelho e camundongo nos casos de anticorpos produzidos no coelho e camundongo, res

pectivamente.

1.3.5.5 - Avaliação microscópica

As reações examinadas foram consideradas positivas ou negativas. Somente granulações intra-citoplasmáticas de cor marron-avermelhada, foram registradas como positivas. Em áreas com necrose, uma difusa coloração marron-avermelhada no material necrótico, foi geralmente encontrada. Esta reação é inespecífica e foi registrada como negativa.

1.3.6 - Pesquisa de metástase

Foram utilizados 40 ratos Wistar inoculados com o tumor, conforme descrição anterior. Os animais foram divididos em 8 subgrupos de 5. No 9º dia, após a inoculação do tumor, 10 animais escolhidos ao acaso, foram sacrificados por deslocamento da coluna cervical. Após constatada a morte, em cada um foi feita uma incisão do púbis ao mento ^e e toda a região exposta sofreu detalhado exame macroscópico para pesquisa de metástases. Amostras selecionadas do fígado, pulmão e gânglios linfáticos foram rotineiramente processadas para exame histopatológico. O mesmo procedimento foi realizado com 10 animais no 18º e 10 animais no 27º dia, após o transplante do tumor.

1.4 - RESULTADOS

1.4.1 - Análise macroscópica

A análise macroscópica descrita é fruto de observações de 30 tumores excisados em épocas diferentes, 9º, 18º e 27º dias de evolução do tumor.

Os tumores localizavam-se no tecido celular subcutâneo, eram delimitados e de fácil exêrese. Eram tumores de formas irregulares, com tamanhos variados, boleados, pouco consistentes, de cor branco acinzentado, de superfícies externas brilhosas, revestidas por fina cápsula transparente. A vascularização externa era maior quanto mais "novo" fosse o tumor, de forma que, os tumores excisados no 9º e 18º dias eram mais vascularizados que aqueles estudados no 27º dia, com raras exceções (Figs. 1.3 e 1.4).

Ao corte, observou-se, extensas áreas de necrose, predominando sobre o tecido neoplásico não necrótico. A necrose era mais extensa, à medida em que o tumor aumentava de tamanho (Fig. 1.4).

1.4.2 - Microscopia óptica

A neoplasia mostrou-se constituída por, basicamente,



FIGURA 1.3 - Aspecto externo do tumor TEGS-2047 em rato Wistar no 27º dia de sua evolução. Note-se o aspecto caquético do hospedeiro e o grande volume da massa tumoral.

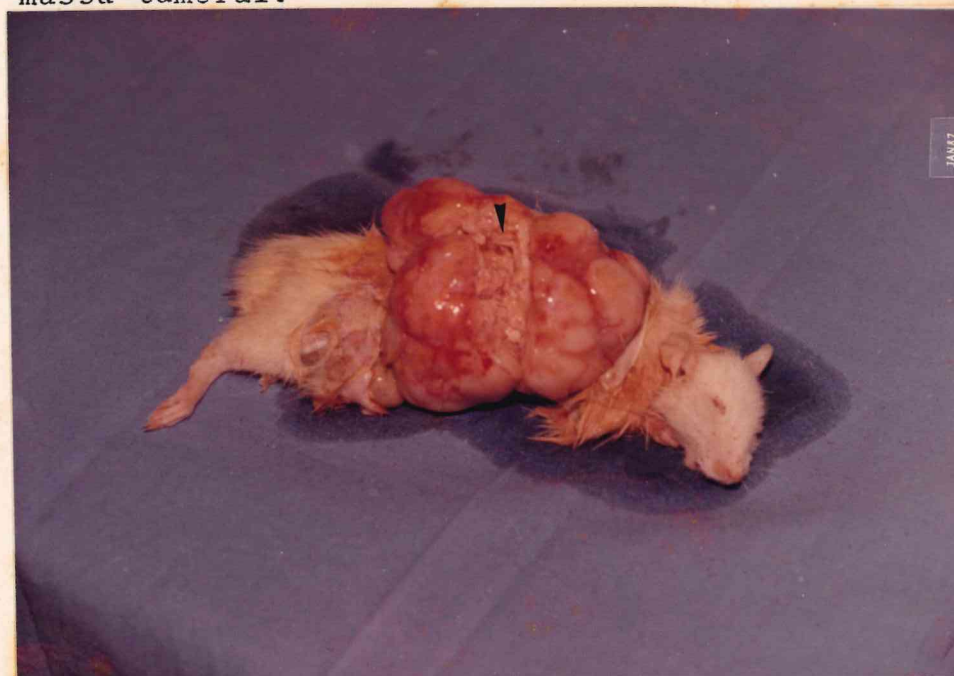


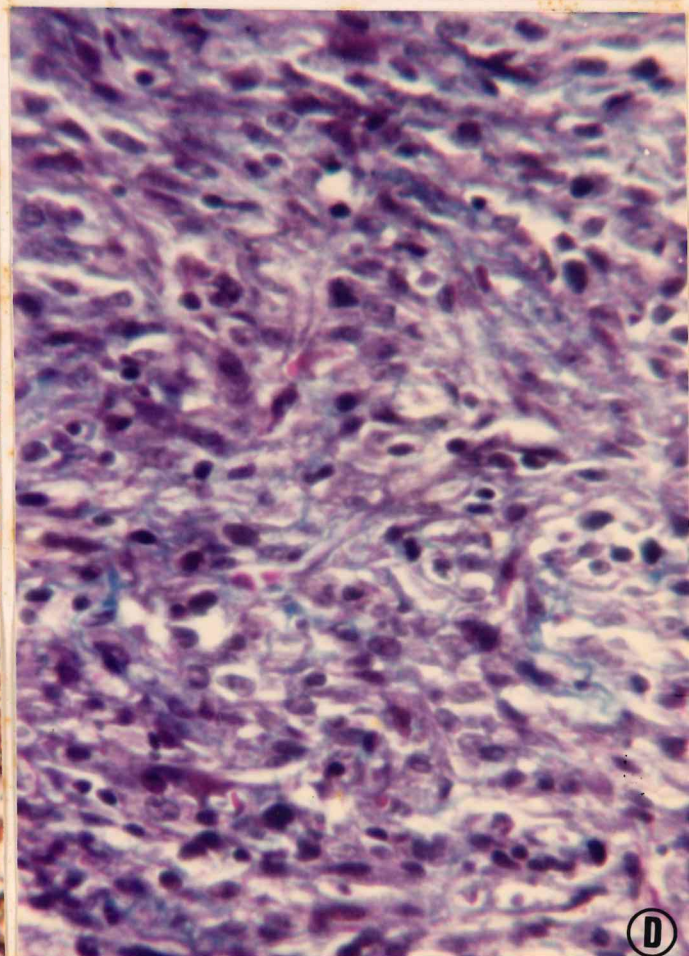
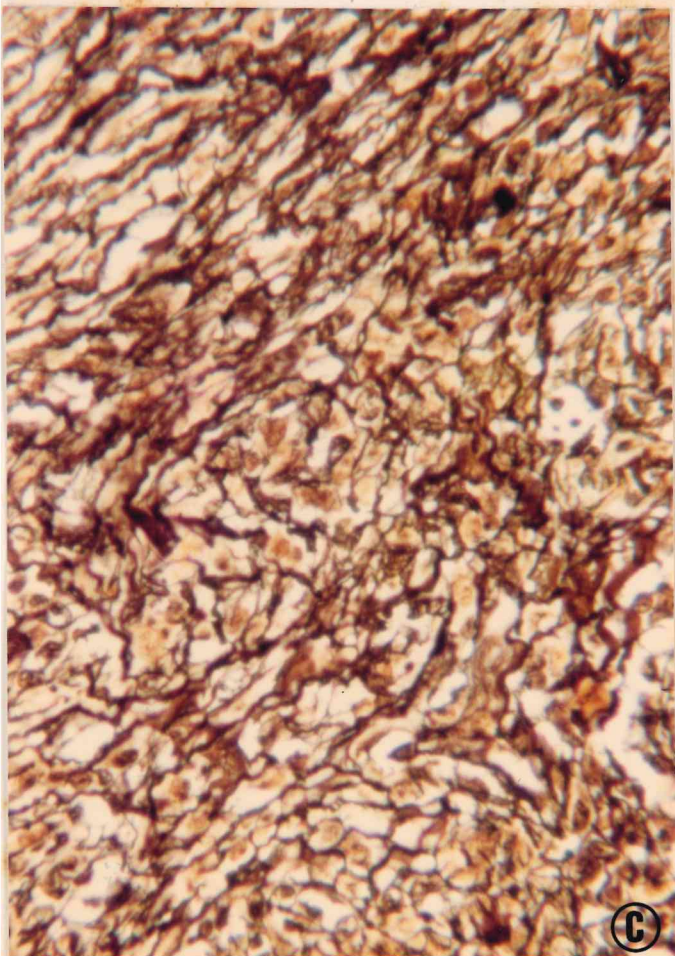
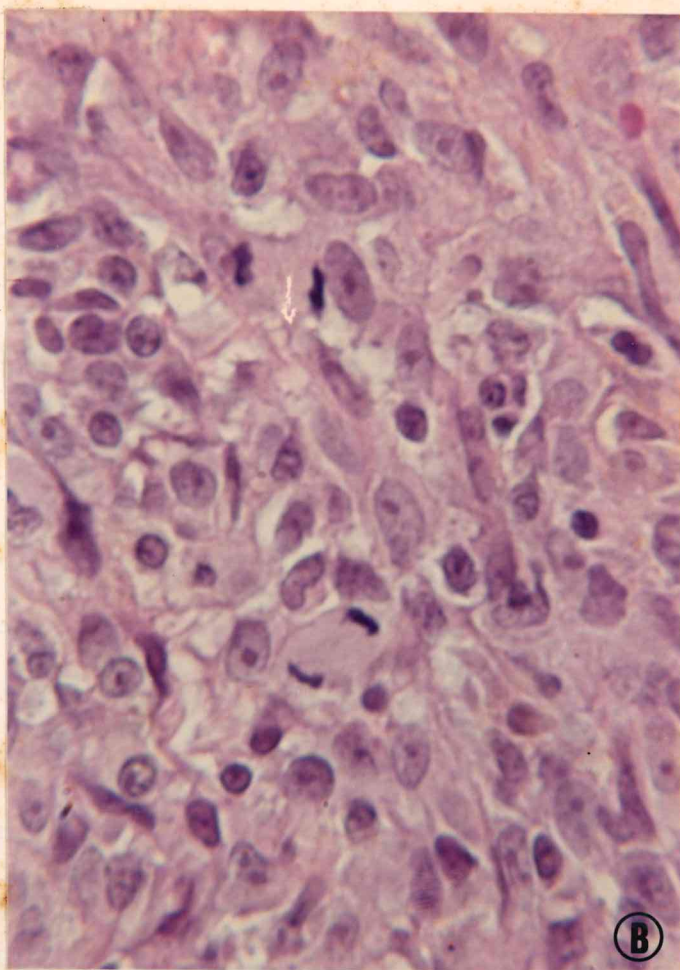
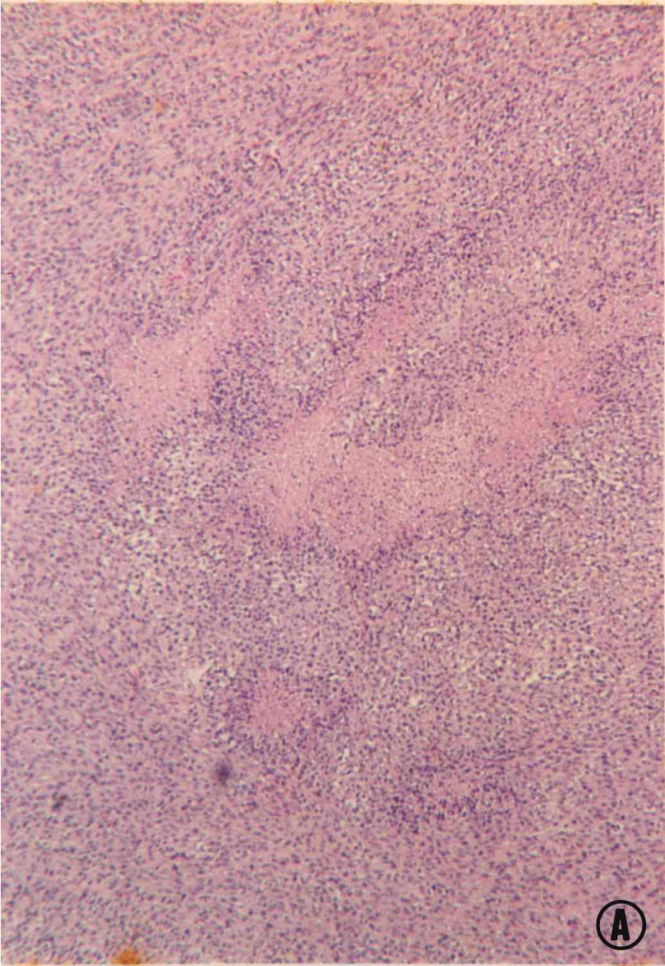
FIGURA 1.4 - Aspecto macroscópico do tumor TEGS-2047 mostrado na Fig. 1.3. Observe-se o aspecto "boleado" do tumor, a boa vascularização externa e a grande área de necrose no centro do tumor (seta).

FIGURA 1.5 - A - Aspecto tumoral mostrando a grande predominância de células fusiformes arranjadas num padrão em "redemoinho". Notam-se extensas áreas de necrose com células fusiformes em volta formando um aspecto "em palçada". Observam-se também células inflamatórias (linfócitos) próximo às áreas de necrose bem como células maiores com citoplasma vacuolizado (Foam cells) (HE 100XX).

B - Aspecto tumoral mostrando células fusiformes alongadas ou ovóides. Notam-se duas mitoses em células tumorais no centro da figura (HE 400XX).

C - Fibras de reticulina de distribuição irregular e aspecto grosseiro largamente distribuídas entre as células tumorais (Impregnação pela prata - 400XX).

D - Fibras de colágeno finamente distribuídas entre as células tumorais (Tricrômio de MASSON com azul de anilina - 400XX).



células fusiformes alongadas ou ovóides e arranjadas num padrão "Estoriforme ou em Redemoinho" característico. As células apresentavam citoplasma acidófilo, corado moderadamente pelo PAS. Os núcleos eram vesiculosos elípticos, ovóides, ou arredondados, apresentando em geral 1 a 2 nucléolos (Figuras 1.5a e 1.5b).

Fibras de colágeno e reticulina distribuídas em grande quantidade, principalmente em volta de células individuais, foram observadas. (Figuras 1.5c e 1.5d). Nenhuma estriação cruzada citoplasmática foi observada.

Extensas áreas de necrose foram visualizadas e, em volta delas, células inflamatórias, principalmente linfócitos e células fusiformes histiocíticas-símile dispostas em "palçada" (Fig. 1.5a).

Fagocitose aparente, bem como células com citoplasma espumoso ("Foam cells"), foram focalmente observadas (Fig. 1.5a).

As células fusiformes apresentavam considerável atividade mitótica, encontrando-se, na maioria dos cortes, 4 a 5 mitoses por campo (ocular 10 e objetiva 40).

A vascularização era abundante, principalmente na periferia do tumor.

1.4.3 - Metástase

Dos 30 ratos autopsiados sistematicamente no 9º, 18º e 27º dias de evolução do tumor, verificou-se em apenas um dos

animais, no 27º dia, dois nódulos localizados no pulmão D, arredondados, esbranquiçados e semi-transparentes, medindo 0,4 cm e 0,2cm de diâmetro, respectivamente.

Ao exame histopatológico, as metástases mostravam um grande predomínio de células fusiformes, com grandes núcleos e nucléolos evidentes, assumindo disposição em feixe; ocasionalmente percebiam-se grandes células com citoplasma vacuolizado lembrando histócitos, em meio a zonas de necrose (Fig. 1.6). Portanto, o mesmo padrão apresentado pelo tumor primário.

Amostras de fígado, baço e nódulos linfáticos deste animal foram processadas para estudo histopatológico e não apresentaram alterações.

1.4.4 - Achados ultraestruturais

As preparações estudadas mostraram à microscopia eletrônica apenas células fusiformes histocíticas-símile, alongadas ou amebóides, sem junções ou membrana basal, com citoplasma apresentando mitocôndrias, gotículas de lipídios, raros microfilamentos, lisossomos secundários, fagossomos e moderada quantidade de membranas de retículo endoplasmático rugoso. Fibras de colágeno e reticulina eram abundantes nos espaços intercelulares (Fig. 1.7a).

Os núcleos eram frouxos, alongados, indentados e o-

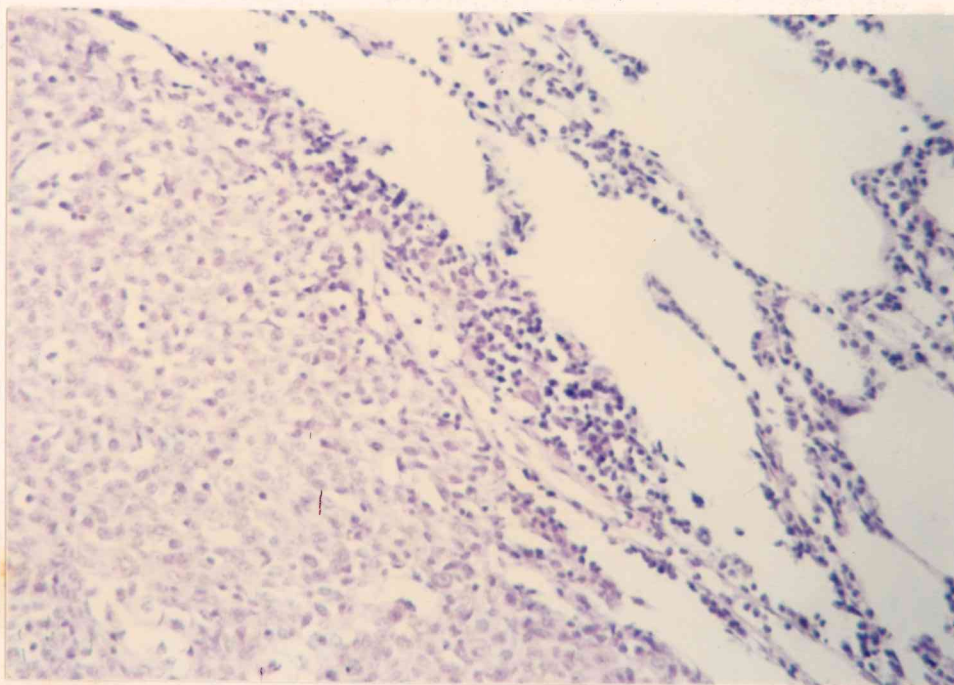


FIGURA 1.6 - Aspecto histológico de metástase pulmonar do tumor TEGS-2047. Observa-se o tecido pulmonar à-direita e à esquerda, o tecido metastático constituído por células fusiformes (HE 100XX)

casionalmente ovóides, apresentando nucléolo(s) bem evidente e cromatina com marginação periférica (Fig. 1.7a).

Foram vistas também algumas células de aspecto xantomatoso, com citoplasma totalmente preenchido por gotículas de lipídio e estruturas semelhantes a lisossomos (Fig. 1.7b).

Ocasionalmente foram encontradas células com abundante retículo endoplasmático rugoso, algumas vezes distendido por substância eletrônica-densa.

Não foi constatada existência de células gigantes nem miofibrilas nas preparações estudadas.

As células são, portanto, do conjuntivo pouco diferenciado, histiocitóides.

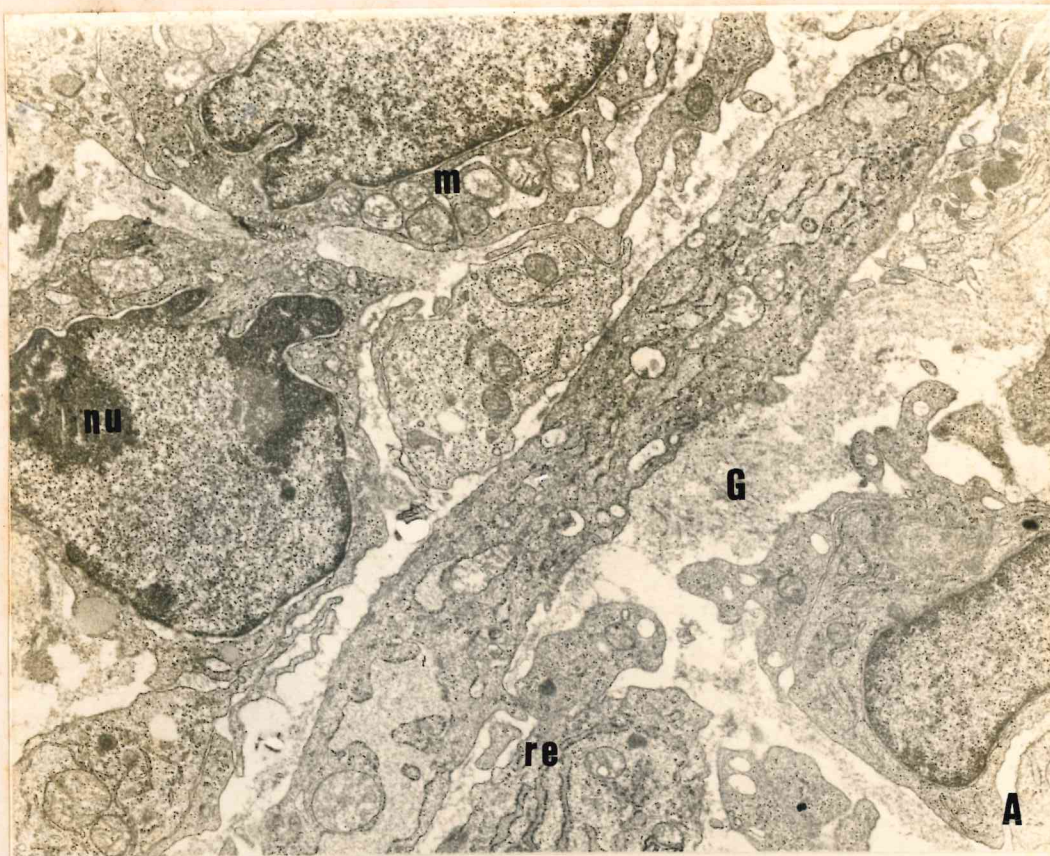
1.4.5 - Citoquímica enzimática

Os resultados da coloração citoquímica para verificação da atividade das enzimas alfa naftil acetato esterase, fosfatase ácida e cloroacetato esterase, estão sumarizados na Tabela I.1.

As reações foram fortemente positivas para a alfa-naftil acetato esterase, nas células tumorais fusiformes alongadas e ovóides (Fig. 1.8). Forte atividade para fosfatase ácida também foi demonstrada nas células tumorais (Fig. 1.8). A positividade das reações foi específica, visualizando-se grânulos grosseiramente espalhados no citoplasma e corados em

FIGURA 1.7 - A - Eletromicrografia mostrando células histiocíticas com núcleos (N) irregulares, indentedos, com nucléolos (NU) evidentes e cromatina periférica. Notam-se mitocôndrias (M) e membranas de retículo endoplasmático rugoso (RE) pouco desenvolvido e colágeno (C) intercelular (ME - 9.100XX).

B - Eletromicrografia mostrando células xantomatosas típicas, com citoplasma quase totalmente preenchido por vacúolos lipídicos (LI) e também por corpos semelhantes a lisossomos (L). - Abaixo e à direita aspecto de um núcleo irregular e fusiforme (ME - 7.800XX).



marron.

A enzima cloroacetato esterase não mostrou atividade de em nenhuma das amostras estudadas (Fig. 1.8).

1.4.6 - Imunohistoquímica

Os resultados são apresentados na Tabela 1.2.

As amostras dos 2 tumores examinados mostraram considerável positividade nas reações para Lisozima e para Vimentina. As 2 reações foram específicas apresentando granulações intracitoplasmáticas de coloração marrom-avermelhada (Figuras 1.9a e 1.9b).

As amostras dos 2 tumores apresentaram reações negativas tanto para A₁AT como para A₁ACT (Figuras 1.9c e 1.9d).

Em áreas de necrose encontraram-se em algumas lâminas, colorações avermelhadas distribuídas difusamente entre os espaços intercelulares, o que foi interpretado como reações inespecíficas.

Os controles positivos mostraram reações intensamente positivas para os antisoros específicos, isto é, A₁AT para cirrose por deficiência de A₁AT, rim normal para A₁ACT, sarcoma granulocítico para Lisozima e fibrossarcoma para Vimentina.

Os controles negativos mostraram total imunonegatividade em todas as amostras estudadas.

TABELA I.1 - Resultados da citoquímica enzimática no tumor TEGS-2047*

Material Examinado	Coloração citoquímica		
	α Naftil acetato esterase	Fosfatase ácida	Cloroacetato esterase
Tumor 1	+++	+++	0
Tumor 2	+++	+++	0

(*) A intensidade da reação, nas células tumorais, obedeceu a seguinte graduação:

- 0 - Nenhuma coloração
- + - Fracamente positiva
- ++ - Moderadamente positiva
- +++ - Fortemente positiva

FIGURA 1.8 - A - Preparação feita através de "imprint" e corada para Alfa naftil acetato esterase, mostrando forte positividade em várias células tumorais (setas) (400XX).

B - Preparação feita através de "imprint" e corada para fosfatase ácida, mostrando forte positividade em várias células tumorais (setas) (400XX).

C - Preparação feita através de "imprint" e corada para cloroacetato esterase, demonstrando total negatividade nas células tu^umorais (400XX).

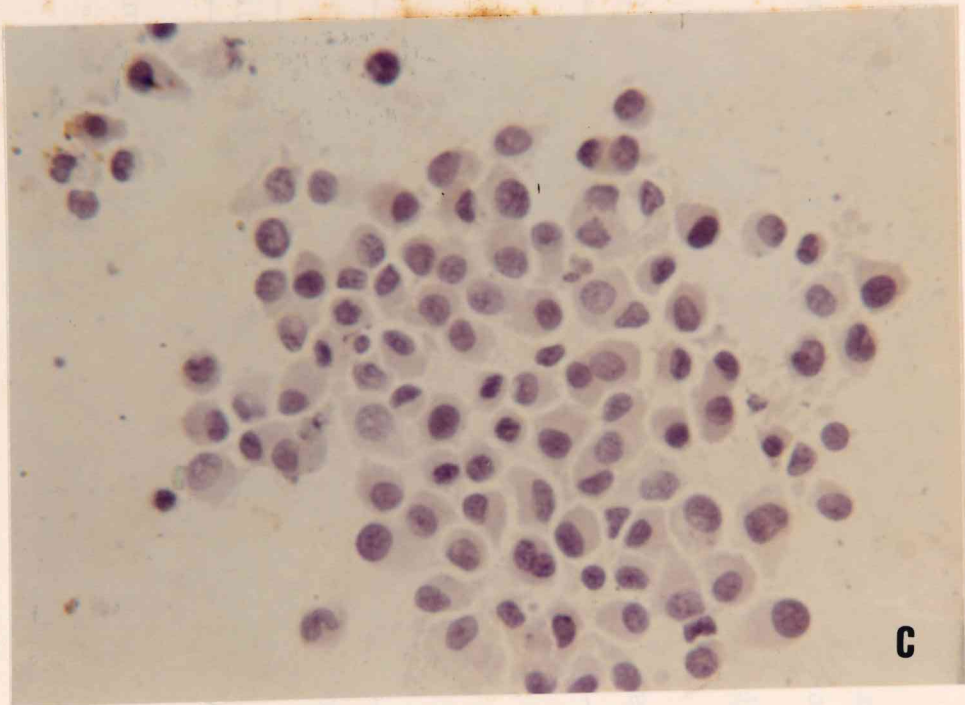
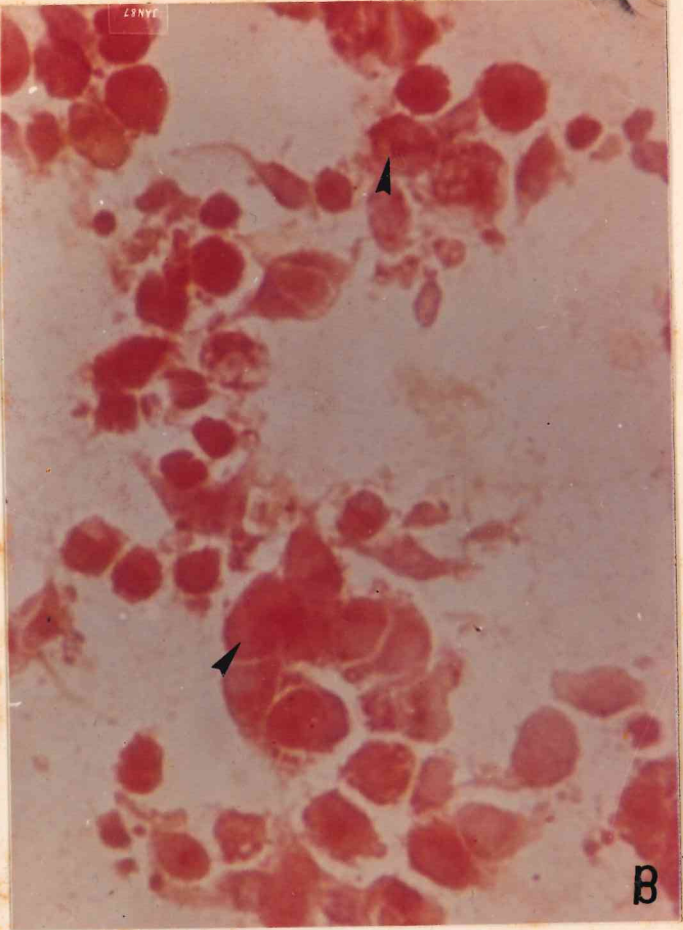
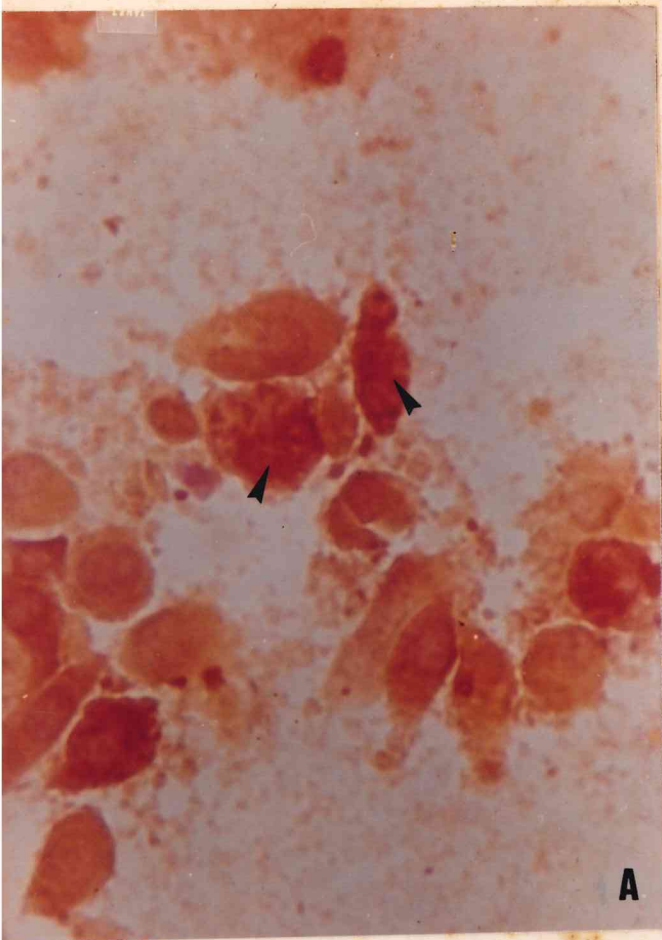


TABELA I.2 - Resultados da coloração para imunoperoxidase no tumor TEGS-2047*

Material Examinado	Marcador utilizado		
	Lisozima (muramidase)	A ₁ AT	A ₁ ACT Vimentina
Tumor 1	+	-	+
Tumor 2	+	-	+

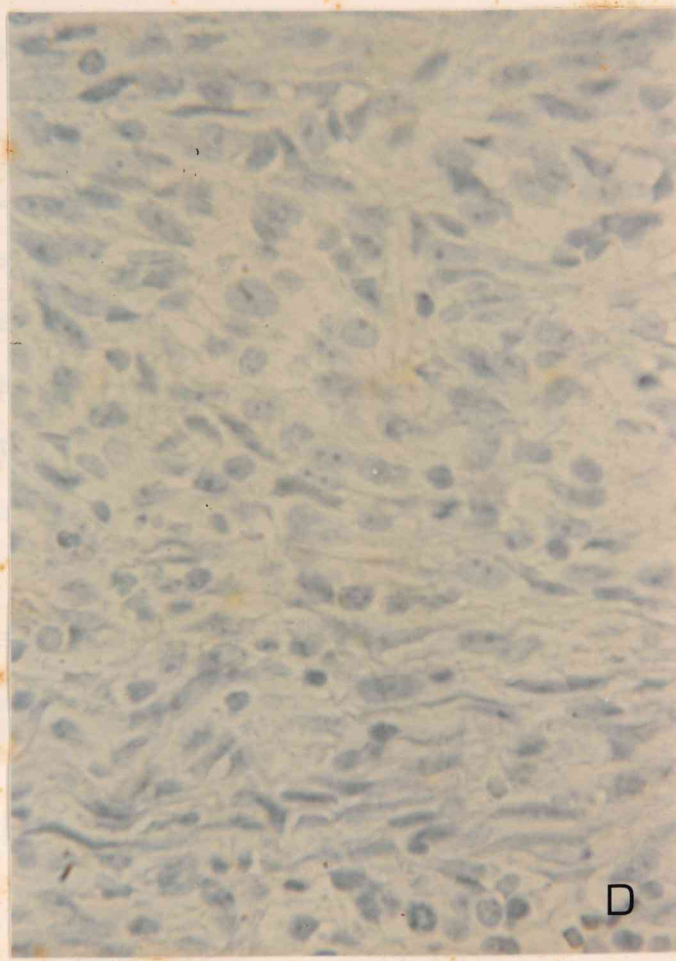
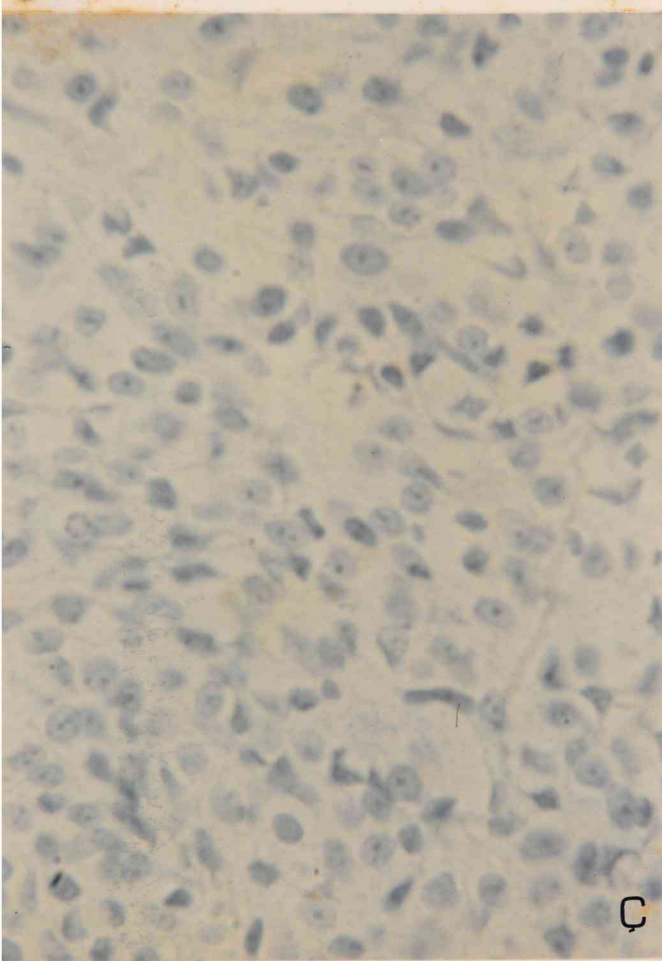
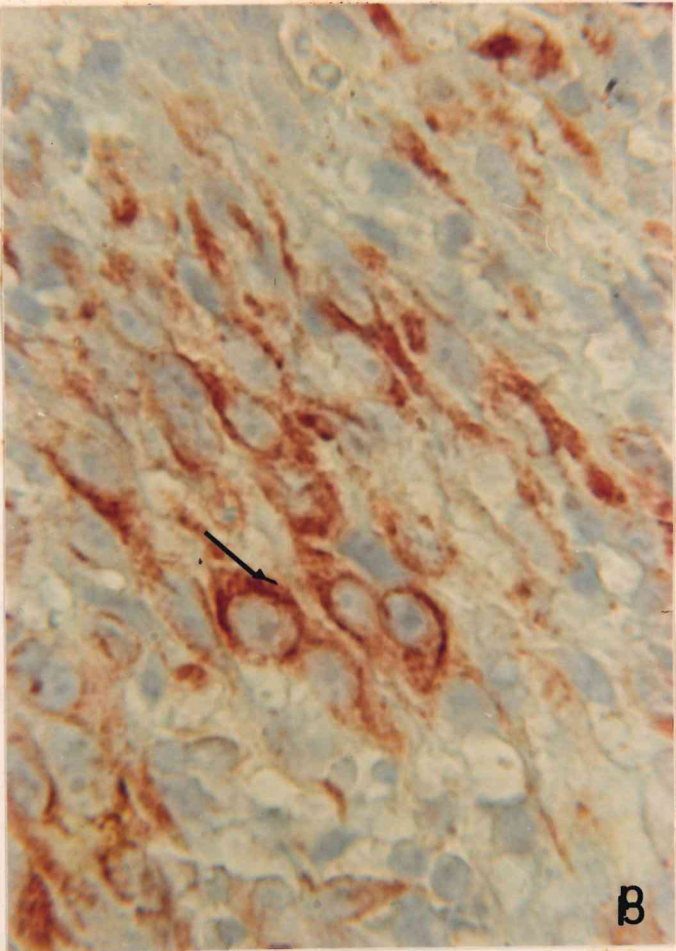
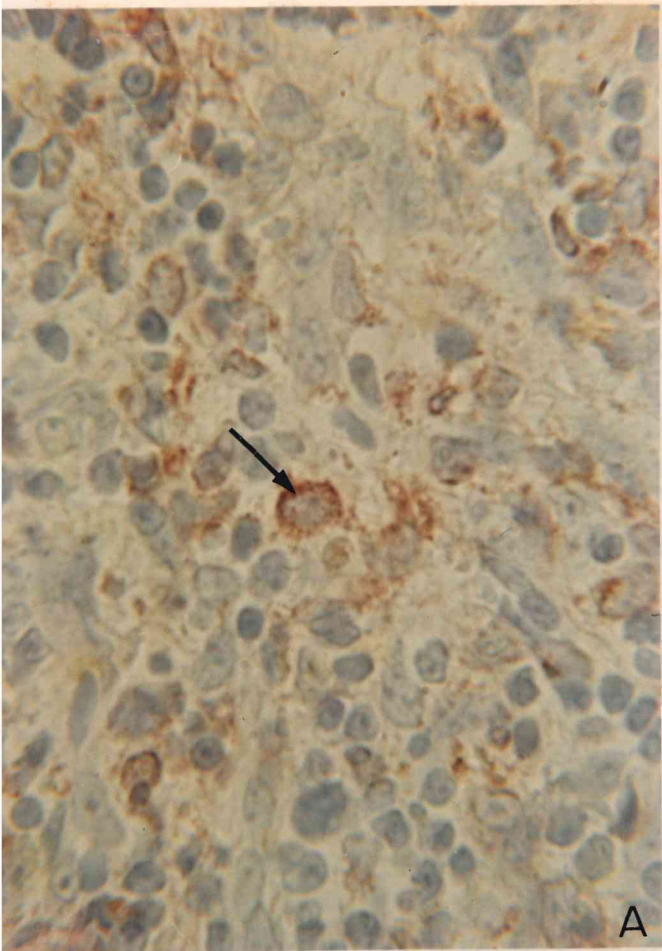
(*) A reação foi considerada positiva (+) ou negativa (-)

A₁AT - Alfa 1 antitripsina

A₁ACT - Alfa 1 antiqumotripsina

Os controles positivos para cada tipo de marcador resultaram positivos, conforme referido no texto.

- FIGURA 1.9 - A - Coloração feita pela técnica de imunoperoxidase demonstrando imunopositividade na reação da Lisozima (setas) (400XX).
- B - Coloração feita pela técnica de imunoperoxidase demonstrando imunopositividade na reação da Vimentina (setas) (400XX).
- C - Coloração feita pela técnica de imunoperoxidase demonstrando total imunonegatividade na reação da Alfa 1 antitripsina (A_1AT) (400XX).
- D - Coloração feita pela técnica de imunoperoxidase demonstrando total imunonegatividade na reação da Alfa 1 antitripsina (A_1ACT) (400XX).



1.5 - DISCUSSÃO

O tumor transplantável descrito no presente estudo mostrou características celulares de ambos, fibroblastos e histiócitos, justificando, portanto, a sua inclusão na categoria das neoplasias designadas como Fibrohistiocitomas.

As características macroscópicas, a grande variação no tamanho dos tumores, bem como a sua forma de crescimento, são achados comuns a outros tumores de partes moles experimentais, fibrohistiocíticos ou não, espontâneos ou induzidos, descritos na literatura (FRINDEL, et al., 1967; GOODMAN et al., 1979, 1980; GREAVES & FACCINE, 1981; SQUIRE et al., 1981; STEEL, 1977).

GREAVES & FACCINI, em 1981, avaliando 85 fibrohistiocitomas espontâneos em ratos Sprague-Dawley, reconheceram, de acordo com o tipo celular predominante, 4 tipos histológicos: histiocítico (17%), pleomórfico (33%), celular (células fusiformes) (17%) e muito fibroso (33%). Os tumores histiocíticos eram altamente malignos e a maioria produziu metástases. Os tipos pleomórfico e celular ocasionalmente levaram ao aparecimento de metástases, sendo reconhecidos como potencialmente malignos. As lesões muito fibrosas eram essencialmente benignas.

A aparência histológica geral do tumor em estudo

mostrou uma estreita semelhança com o tipo celular descrito por GREAVES & FACCINE e também com o seu correspondente humano. O grande predomínio de células fusiformes alongadas ou ovóides, o padrão "em redemoinho", uma marcada fibrose, extensas áreas de necrose, e presença de colágeno, reticulina e células inflamatórias crônicas, são características comuns a ambos fibrohistiocitomas, humano (KEARNEY et al., 1980; SOULE & ENRIQUEZ, 1972; WEISS & ENZINGER, 1978) e de rato (WARD et al., 1981; GREAVES & FACCINE, 1981); GREAVES et al., 1985.

A presença de células gigantes multinucleadas ou em formas bizarras e o aparecimento frequente de metástases, comumente descritos nos FHM humanos (FU et al., 1975; KEARNEY et al., 1980; SOULE & ENRIQUEZ, 1972; WEISS & ENZINGER, 1978), em FHM do tipo histiocítico em ratos (WARD et al., 1981; GREAVES & FACCINE, 1981; GREAVES et al., 1985) e em sarcomas histiocíticos de ratos (BARSOON et al., 1984; JOHNSON et al., 1973; SQUIRE et al., 1981), foram achados extremamente raros no tumor em estudo, estando de acordo com a descrição de GREAVES & FACCINE para os FHM do tipo celular.

As características ultraestruturais dos FHM descritos no homem estão, hoje, bem estabelecidas. FU et al. (1975) demonstraram a presença de células histiocíticas-símile, fibroblásticas-símile e células indiferenciadas em 4 FHM. TAXY et al. (1977), ALGUACIL-GARCIA et al. (1978) e TSUNEYOSHI et al. (1981), posteriormente e com maior número de casos, 15, 6 e 17 respectivamente, confirmaram estes achados. Algumas características celulares, como filamentos intracitoplasmáticos, co-

lâgeno intercelular, lisossomos, gotículas de lipídio e células tipicamente xantomatosas. observadas por aqueles pesquisadores, foram também encontradas neste estudo. No entanto, material lembrando membrana basal foi demonstrado naqueles estudos, o que não ocorreu na presente investigação.

Os estudo de microscopia eletrônica realizados por outros pesquisadores (BARSOUN et al, 1984; GREAVES et al 1982, 1985; JOHNSON et al., 1973; SQUIRE et al., 1981) em tumores fibrohistiocíticos de ratos, em muito se assemelham aos descritos no parágrafo anterior.

A presença de forte atividade das enzimas alfa naf-til acetato esterase e fosfatase ácida, bem como a ausência de atividade para a cloroacetato esterase, são achados compatíveis com os encontrados por outros autores em FHM humanos (FU et al., 1975; IWASAKI et al., 1982) e de ratos (GREAVES et al., 1985; KHAR, 1986) e representam mais um dado a favor da natureza fibrohistiocítica do tumor em questão.

Nos últimos anos, um número crescente de estudos imunohistoquímicos vêm sendo realizados na caracterização e diferenciação de vários tumores de suposta natureza fibrohistiocítica e de outros sarcomas de partes moles. Uma série de marcadores antigênicos incluindo proteínas estruturais, enzimas, inibidores enzimáticos, filamentos citoplasmáticos e outros, vêm sendo utilizados com esse objetivo (BROOKS, 1982) (Tabela I.3).

A natureza fibrohistiocítica do tumor TEGS-2047 foi

confirmada pela positividade encontrada nas reações de imuno-
peroxidase para a Lisozima e Vimentina, embora com negativ-
dade para A₁AT e A₁ACT. Estes achados diferem dos publicados
por alguns pesquisadores com FHM humanos (BROOKS, 1982; BURG-
DORF et al., 1981; Du BOULAY, 1982; KINDBLON et al., 1982) (Ta-
bela I.4), nos quais a A₁AT e principalmente a A₁ACT mostram-
se como melhores marcadores da diferenciação histiocítica que
a Lisozima. No entanto, BARSOUN et al (1984) encontraram resul-
tados semelhantes aos desta pesquisa, ao estudar um grupo de 20
sarcomas histiocíticos em ratos Wistar.

A histogênese dos fibrohistiocitomas malignos e de
outros tumores histiocíticos de partes moles, tem sido motivo
de controvérsia nos últimos anos.

Com base em estudos em cultura de tecidos, OZELLO
e colaboradores propuseram que histiócitos neoplásicos poderi-
am comportar-se como "fibroblastos facultativos", levando en-
tão ao surgimento de histiocitomas, fibrohistiocitomas ou der-
matofibrosarcoma protuberans (OZELLO et al., 1963, OZELLO &
HAMELS, 1976). YUMOTO & MORRIMOTO (1980) demonstraram que uma
linhagem induzida de células macrofágicas-símile obtidas a
partir da medula óssea de camundongos, produziu tumores
transplantáveis semelhantes ao FHM humanos. Com base nestes
achados tais pesquisadores concluíram que fibrohistiocito-
mas eram derivados de histiócitos e que as células fusiformes
tumoriais representavam "fibroblastos facultativos". Por outro
lado, os estudos detalhados de FU e colaboradores, atra-

TABELA I.3- Principais constituintes antígenicos dos tumores de partes moles (modificado, de BROOKS, 1982)

ANTÍGENO	COMENTÁRIOS
<u>PROTEÍNAS</u>	
Fator de crescimento insulina-símile	Expresso em alguns sarcomas
Fibronectina	Presente provavelmente numa larga variedade de sarcomas
Colágeno	Vários tipos podem ajudar na classificação dos sarcomas
Fator VIII	Marcador específico para a diferenciação celular endotelial
Mioglobina	Marcador específico na diferenciação de musculatura estriada
Proteína básica mielínica	Marcador específico potencial na diferenciação dos nervos periféricos
<u>ENZIMAS</u>	
Colagenase	Marcador fibroblástico(?) Fator relacionado a não invasão
Lisozima	Marcador específico para certos tipos de diferenciação histiocítica
Lipoproteína lipase	Marcador de células endoteliais(?)
Fosfatase ácida e alcalina	Marcadores específicos potenciais para a diferenciação condro-óssea

TABELA I.3 -Principais constituintes antigênicos dos tumores de partes moles (modificado, de BROOKS, 1982) - Continuação

ANTÍGENO	COMENTÁRIOS
<u>INIBIDORES ENZIMÁTICOS</u>	
α 1-Antitripsina	Presente em certos sarcomas
α 1-Antiquimiotripsina	Marcador específico para certos tipos de diferenciação histiocítica
<u>MICROFILAMENTOS</u>	
Prequeratina	Marcador específico para a diferenciação epitelial e mioepitelial
Vimentina	Marcador específico para a diferenciação mesenquimal(?) e de células em divisão
Desmina	Marcador específico para a diferenciação muscular
Actina e miosina	Presente em muitos tipos celulares
Tubulina, esqueletina, filamina e α -actina	Presente em muitos tipos celulares; de utilidade potencial, dependendo de maiores estudos

TABELA I.4 - Resultados de coloração para imunoperoxidase usando $\alpha 1$ antitripsina, $\alpha 1$ antitriomotripsina e lisozima em tumores fibrohistiocíticos e em outros sarcomas de partes moles humanos, segundo diversos autores

Tipo histológico	Autor	nº casos estudados	nº casos positivos		
			A ₁ AT	A ₁ ACT	Lisozima
Fibrohistiocitoma	du Boulay, 1982	23	23	23	03
	Brooks, 1982	09	NR*	08	NR
	Burgdorf, 1981	05	NR	NR	0
	Kindblon, 1982				
	Tipo pleomórfico	22	18	12	03
	Tipo fusiforme	05	0	03	01
	Tipo mixóide	04	0	0	0
Dermatofibrossarcoma	du Boulay, 1982	6	3	3	0
	Burgdorf, 1981	5	NR	NR	0
	Kindblon, 1982	4	3	3	3
Dermatofibroma	du Boulay, 1982	22	NR	NR	0
	Burgdorf, 1982	5			
Fibrossarcoma	du Boulay, 1982	4	0	0	0
	Kindblon, 1982	4	1	1	0
Lipossarcoma	du Boulay, 1982	3	0	0	0
	Kindblon, 1982				
Raddomiossarcoma	du Boulay, 1982	1	0	0	0
	Kindblon, 1982	2	0	0	0
Leiomiiossarcoma	du Boulay, 1982	4	0	0	0
	Kindblon, 1982	3	0	0	0

(*) NR - Não realizado A₁AT = $\alpha 1$ antitripsina A₁ACT = $\alpha 1$ antiqumotripsina.

vés de microscopia eletrônica e cultura de tecidos, postulam que nos FHM as células histiocíticas-símile, fibroblásticas-símile e as intermediárias, derivam todas de células primitivas mesenquimais indiferenciadas (FU et al., 1975). Outros pesquisadores têm corroborado com estes achados (TAXY & BATTIFORA, 1977; LAGACE et al., 1979; ENJOJI et al., 1980).

IWASAKI e colaboradores, mais recentemente, demonstraram que nos FHM tanto as células fibroblásticas-símile como as histiocíticas-símile, apresentam marcadores funcionais de histiócitos assim como fagocitam eritrócitos opsonizados. Portanto, as células fibroblásticas-símile podem ser interpretadas como "fibroblastos facultativos" derivados de células histiocíticas-símile que, possivelmente, apresentam uma íntima relação com macrofágos residentes. Entretanto, para estes pesquisadores, é também possível que, fibroblastos neoplásicos possam comportar-se como "histiócitos facultativos", em condições apropriadas, já que alguns estudos têm demonstrado receptores Fc, receptores C₃ e/ou enzimas lisossomais em vários tipos de células, tais como: fibroblastos humanos infectados por vírus, fibroblastos humanos diplóides e células neoplásicas humanas de origem não fagocítica (IWASAKI et al., 1982).

Três classes de estruturas filamentosas são encontradas na maioria das células dos vertebrados: i) microfilamentos contendo actina; ii) microtúbulos contendo tubulina, e iii) filamentos de tamanho intermediário, com 7 a 11nm de diâmetro (LAZARIDES, 1980). Células mesenquimais, a maioria das

células vasculares dos músculos lisos e algumas células que crescem em cultura, contêm filamentos intermediários indistinguíveis pela microscopia eletrônica e pela difração com Raio X, os quais são compostos por apenas uma proteína chamada Vimentina (GABBIANI et al., 1981).

Tem-se proposto que, em geral, as características imunológicas de filamentos intermediários de células tumorais são as mesmas presentes nos seus tecidos de origem e que, por conseguinte, durante a transformação neoplásica não há maiores alterações na síntese de proteínas filamentosas do tipo intermediário quando comparada com os tecidos normais (GABBIANI et al., 1981). Portanto, a utilização, na presente investigação, da Vimentina, cuja positividade na reação imunohistoquímica assegura a diferenciação mesenquimal de algumas células tumorais, sugere fortemente a origem dos fibrohistiocitomas a partir de uma célula primitiva mesenquimal, conforme o postulado discutido nos parágrafos anteriores.

CAPÍTULO 2

ESTUDO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO TUMOR T3047

UM BLOQUEADOR DE MITOSE (Vimentina)

CAPÍTULO 2

ESTUDO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO TUMOR TEGS-2047 USANDO
UM BLOQUEADOR DE MITOSE (Vincristina)

2.1 - INTRODUÇÃO

2.1.1 - Introdução à cinética celular

A vida e a perpetuação da espécie animal e vegetal são mantidas graças à proliferação de células. A vida é mantida por processos dinâmicos e a maioria dos tecidos dos organismos multicelulares sofre considerável renovação da população celular. Células são constantemente produzidas por divisão e perdidas na população por morte ou migração.

A proliferação, a migração, a diferenciação e a perda de células que ocorrem em tecidos normais e patológicos, são processos que podem ser avaliados pelos estudos de cinética celular, usando técnicas desenvolvidas para essa finalidade, o que tem acrescentado muito ao conhecimento do mecanismo patogênético de diversas doenças.

Os principais marcos na história do estudo da proliferação celular foram: as descrições pioneira das principais fases do período intermitótico, realizadas por HOWARD & PELC, em 1953; o desenvolvimento da timidina tritiada por TAYLOR, WOODS & HUGHES, em 1957 e sua primeira aplicação no estudo de populações celulares "in vivo", realizada por QUASTLER & SHERMAN, em 1959.

Ao longo dos anos, os conhecimentos prático e teórico da cinética celular têm sido quase que exclusivamente dependentes de pesquisas em animais de laboratório. Nesse sentido, o epitélio do intestino delgado é um dos tecidos que mais tem atraído pesquisadores para o estudo da proliferação celular (CAIRNIE et al., 1965a, 1965b; AHERNE et al., 1977; WRIGHT et al., 1972, 1973; WRIGHT, 1980; ZUCOLOTO, 1982; CIPRIANO, 1984; ZUCOLOTO et al., 1985). Entretanto, o estudo da cinética celular em tumores experimentais tem aumentado muito nos últimos anos, o que tem permitido um melhor conhecimento do comportamento proliferativo e padrão de crescimento de diversas neoplasias, bem como, suas alterações em exposição a drogas citotóxicas (MENDELSON et al., 1960; BASERGA & KISIELESKI, 1962; BERTALANFFY & LAU, 1962; REISKIN & MENDELSON, 1964; LAIRD, 1964, 1965; FRINDEL et al., 1967; STEEL & HANES, 1966; 1971; TANNOCK, 1968, 1969, 1970; SIMPSON-HERREN et al., 1968; 1973; MCCREDIE et al., 1971; LALA, 1972; STEEL, 1977; CAMPLEJOHN, 1980; KLEIN, 1980; FEAUX DE LACROIX et al., 1981, 1984).

Os poucos estudos de citocinética no homem têm sido realizados em indivíduos com neoplasias, em cultura de tecidos e em alguns delineamentos experimentais que fornecem dados indiretos, como é o caso do efeito de substâncias como: hormônios, sobrecarga de gluten, etc., seguidos de biópsias (PAINTER & DREW, 1959; BRUNSEN et al., 1966, 1968; STEEL & LA MERTON, 1966; SHIRAKAWA et al., 1970; TRIER & BROWING, 1970;

YOUNG & DE VITA, 1970; IVERSON et al., 1974; MUGGIA et al., 1974; MURPHY et al., 1975).

2.1.2 - Ciclo celular

Ciclo celular é o termo usado para descrever o período entre uma mitose e a próxima, em uma ou ambas as células filhas. É caracterizado por uma sequência de eventos classicamente agrupados em 4 fases: G_1 , o período entre a mitose e o início da síntese de DNA; S, o período da síntese de DNA; G_2 , o período entre o término da síntese de DNA e a mitose, e M, mitose propriamente dita (HOWARD & PELC, 1953) (Fig. 2.1).

2.1.2.1 - Mitose

É o processo de separação física dos cromossomos em duas novas células. As diferentes subfases da fase mitótica podem ser reconhecidas por algumas características morfológicas: a prófase é caracterizada pelo condensamento da cromatina nuclear e pelo desaparecimento da membrana nuclear; a metáfase é marcada pela formação dos cromossomos e pelo seu arranjo no plano equatorial da célula; na anáfase há separação das cromátides e se inicia o movimento das mesmas para os polos opostos da célula; na telófase há o reaparecimento da membrana nuclear e o núcleo é formado por grânulos dispersos; a mitose se completa com a citocinese, surgindo, então, duas células.

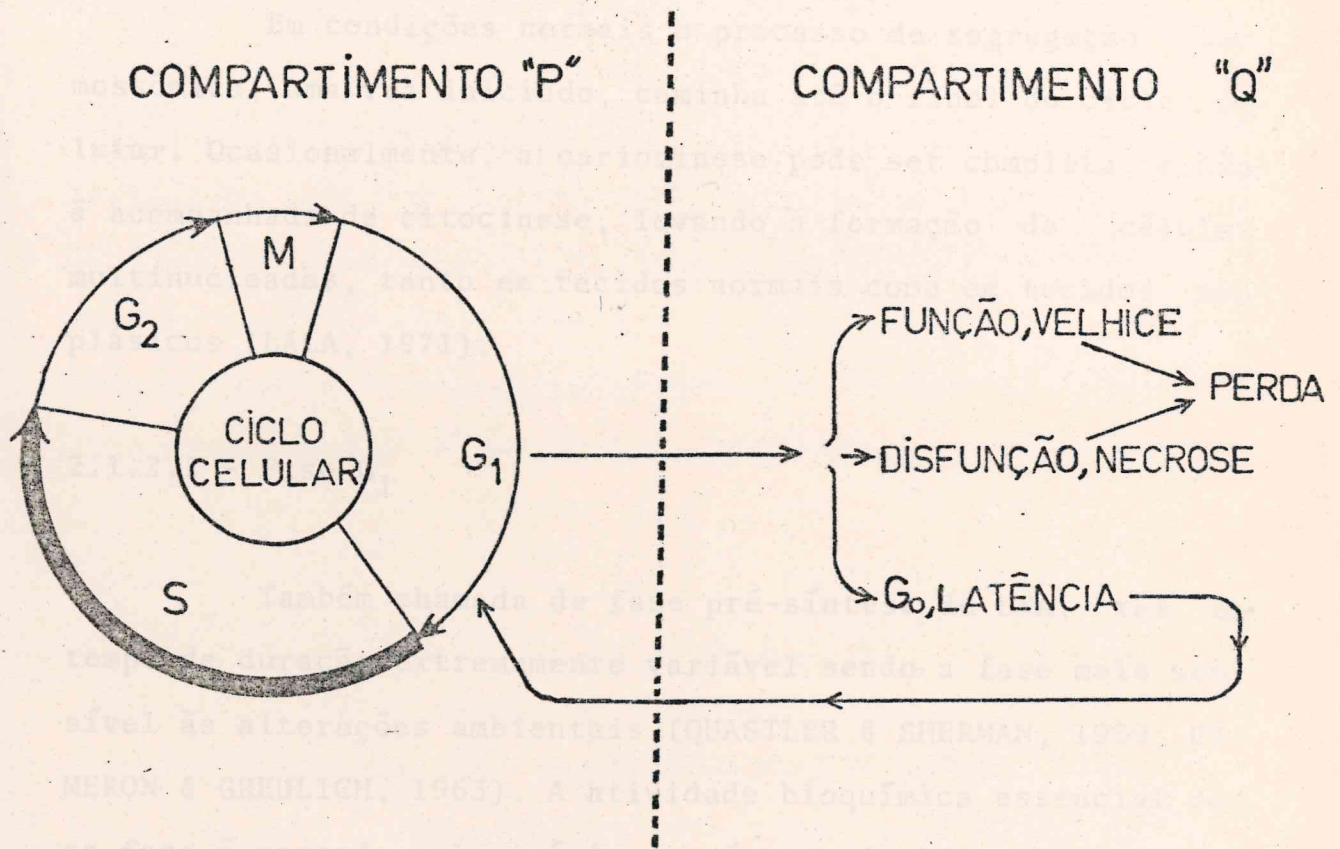


FIGURA 2.1 - Fases da divisão celular mostrando que a população celular é composta de células em proliferação (P) e células não proliferativas (Q). Note-se que células em G₀ podem voltar a circular a partir de G₁ (modificado de AHERNE et al, 1977).

las filhas. O início da prófase e o término da telófase são difíceis de serem reconhecidos (MAZIA, 1961; THOMAS, 1974). Pela dificuldade na identificação nos extremos da mitose usa se contar células em mitose nas subfases, metáfase e anáfase.

Em condições normais o processo de segregação cromossômica, uma vez iniciado, caminha até o final do ciclo celular. Ocasionalmente, a cariocinese pode ser completa e não é acompanhada de citocinese, levando à formação de células multinucleadas, tanto em tecidos normais como em tecidos neoplásicos (LALA, 1971).

2.1.2.2 - Fase G_1

Também chamada de fase pré-síntese de DNA, tem um tempo de duração extremamente variável sendo a fase mais sensível às alterações ambientais (QUASTLER & SHERMAN, 1959; CAMERON & GREULICH, 1963). A atividade bioquímica essencial dessa fase é marcada pelo início da síntese do DNA, RNA e proteinas (BASERGA, 1968). Pode, essa fase ser considerada como de controle celular em que a atividade de pré-síntese pode, ou não, ocorrer, ou mesmo determinar se a célula entra em período de latência ou continua a replicação. Em algumas células, o controle do ciclo pode-se fazer na Fase G_2 (GELFANT, 1962, 1963, 1966).

2.1.2.3 - Fase S

Essa é a fase de síntese do DNA, durante a qual os cromossomos duplicam o seu conteúdo. É nessa fase que se dá a incorporação de isótopos radiativos (e.g. a timidina marcada), quando estes entram na síntese do DNA. Este fenômeno de incorporação é extremamente importante nas estimativas dos diversos tempos das fases do ciclo celular. O tempo de duração dessa fase é de 6 a 8 horas nas células dos mamíferos (TRANSHER & GREULICH, 1965a; 1965b. Tem-se referido que a síntese de proteínas pela célula é um pré-requisito importante para a síntese do DNA de forma que, ao bloqueá-la, ocorre parada da síntese de DNA (BASERGA, 1968; PRESCOTT, 1968).

2.1.2.4 - Fase G₂

É também chamada de fase pós síntese de DNA e tem seu início marcado pelo término da síntese de DNA. Nenhum evento bioquímico específico é detectado nessa fase. Todavia, sabe-se que as sínteses de RNA e proteínas são essenciais para o início da mitose. Há evidências de que algumas células do organismo entram em repouso proliferativo na Fase G₂, indicando a existência de um ponto transicional específico nesta fase. Outros investigadores são adeptos da hipótese das Calonas, controladoras do crescimento celular, que atuariam nesse período do ciclo celular (BULLOUGH, 1965).

2.1.2.5 - Sub-período Go

O conceito de que células normais, numa alternativa à proliferação, podem deixar o ciclo e tornarem-se latentes por períodos de tempo prolongados, foi introduzido inicialmente por LAJTHA em 1963. Ele designou esse estado de repouso de Go e propôs que nesta fase as células mantinham as suas potencialidades, podendo, sob condições apropriadas, voltar ao ciclo proliferativo. Acrescenta ainda que, as células entrariam em Go deixando o ciclo a partir do período G_1 . Subsequentemente demonstrou-se a existência de células Go latentes deixando o ciclo a partir de G_2 , porém, representando uma proporção muito pequena do total de células Go. (GELFANT 1966). Exemplos típicos de população Go induzida a reentrar no ciclo celular são os tecidos da próstata e vesícula seminal de animais castrados e tratados com testosterona (MORLEY et al., 1973; APPLETON et al., 1973). Na porção basal da cripta de LIEBERKUHN há células em Go, que deixam o ciclo celular na Fase G_1 (CAIRNIE et al., 1965a; 1965b; WRIGHT et al., 1972) e/ou na G_2 (CLARKE, 1973). A maioria das células hepáticas está normalmente em Go e podem reciclar se parte do fígado é removida (FUJIOKA et al., 1963).

2.1.3 - Fase de distribuição do ciclo celular

Na análise do ciclo celular é muito importante co-

Conhecer o tipo da fase de distribuição de uma população de células vivas, visto que, em cada distribuição usam-se modelos matemáticos diferentes para expressá-la. Em geral, dois tipos de distribuição são úteis para o entendimento de proliferação celular: a distribuição em equilíbrio dinâmico e a distribuição exponencial. Na primeira, a taxa de células perdidas por migração ou por morte é igual à taxa de células produzidas num determinado compartimento. Sob estas condições, o número de células numa fase é proporcional à duração da mesma formando um diagrama de distribuição retangular (Fig. 2.2). Na distribuição exponencial o número total de células na população aumenta de forma exponencial, sendo necessário que todas as células estejam proliferando ao mesmo tempo e que não haja célula perdida na população (Fig. 2.2). O verdadeiro crescimento exponencial é fenômeno raro em biologia e pode acontecer nas células em cultura, e no início do crescimento tumoral (LALA, 1971).

2.1.4 - Cinética tumoral

A taxa com que um tumor cresce é um dado muito importante em oncologia, já que é através dela que se tem idéia do tempo que uma lesão leva para alcançar o horizonte clínico. Quando medidas clínicas são possíveis, o período de atraso com que os tumores se apresentam clinicamente, por si só já limita o tempo de medida das lesões. Dessa forma, os está

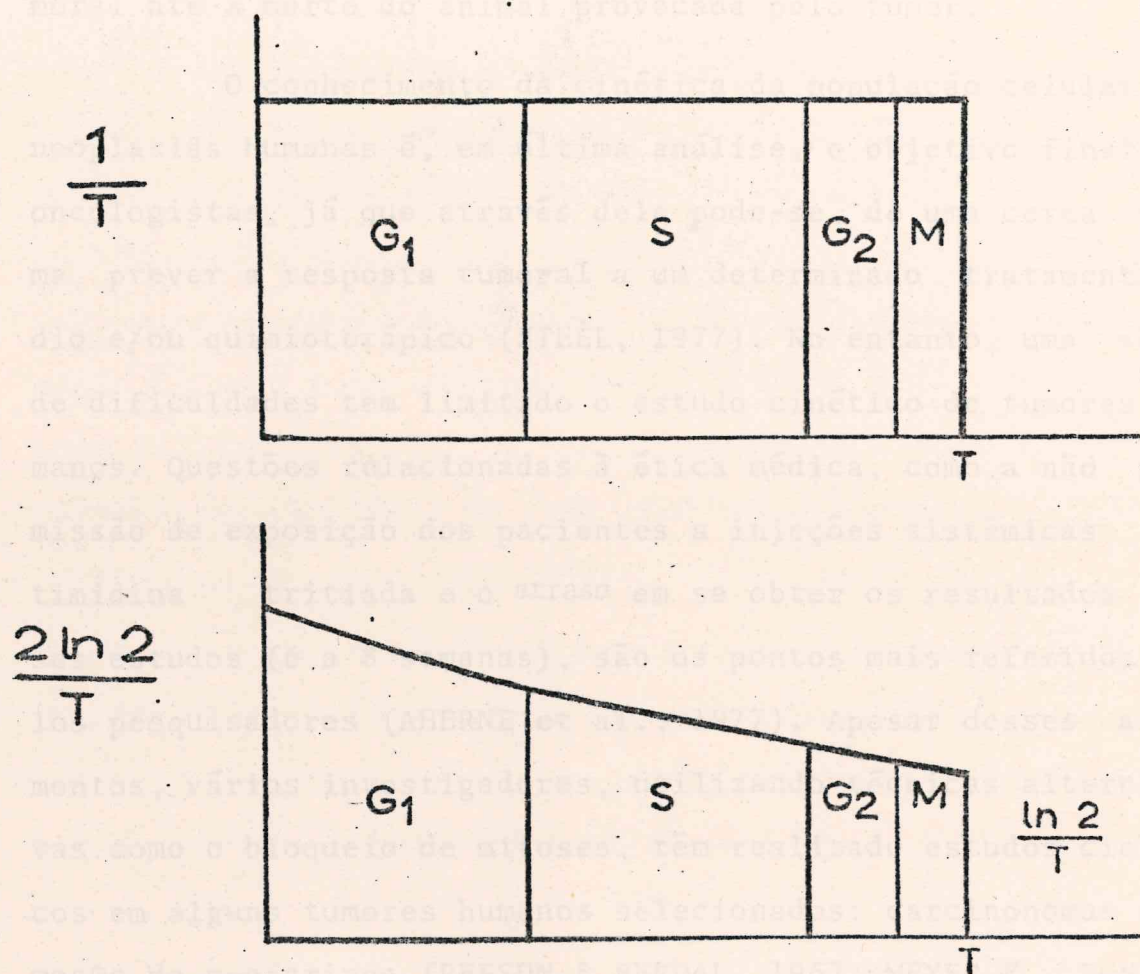


FIGURA 2.2 - Fases de distribuição no ciclo celular: condição no estado de equilíbrio dinâmico (acima), comparado com a condição exponencial (abaixo).

gios iniciais de crescimento dos tumores só podem ser mensurados aplicando-se uma equação teórica. Em tumores experimentais, entretanto, tais dificuldades desaparecem, pois pode-se obter medidas das lesões desde a introdução do inóculo tumoral até a morte do animal provocada pelo tumor.

O conhecimento da cinética da população celular em neoplasias humanas é, em última análise, o objetivo final dos oncologistas, já que através dele pode-se, de uma certa forma, prever a resposta tumoral a um determinado tratamento rádio e/ou quimioterápico (STEEL, 1977). No entanto, uma série de dificuldades tem limitado o estudo cinético de tumores humanos. Questões relacionadas à ética médica, como a não permissão de exposição dos pacientes a injeções sistêmicas de timidina tritiada e o atraso em se obter os resultados desses estudos (6 a 8 semanas), são os pontos mais referidos pelos pesquisadores (AHERNE et al., 1977). Apesar desses argumentos, vários investigadores, utilizando técnicas alternativas como o bloqueio de mitoses, têm realizado estudos cinéticos em alguns tumores humanos selecionados: carcinomas escamosos da orofaringe (REFSUN & BERDAL, 1967; MEYER & DONALDSON, 1969), carcinomas de bexiga (FULKER, COOPER & TANAKA, 1971), nefroblastomas (AHERNE & BULK, 1971), carcinomas de reto (CAMPLEJOHN, BONE & AHERNE, 1973), entre outros.

Os estudos de cinética celular realizados em muitos tumores experimentais, entretanto, têm permitido uma melhor compreensão do comportamento proliferativo e do padrão de

crescimento de diversas neoplasias, bem como as alterações destas frente a drogas citotóxicas. Nesse sentido vários são os tumores experimentais cujo comportamento cinético já tem sido bem estabelecido: fibrossarcoma (BICR/A₂) de rato (FIN-KEL et al., 1961), fibrossarcoma (NCTC 2472) de camundongo, fibroadenoma (BICR/A8) de rato (STEEL, 1977), osteossarcoma primário (BICR/A₃) de rato (STEEL, 1977), carcinoma 256 de Walker em rato (McCREDIE et al., 1965), sarcoma KHJJ e EMT6 de camundongo (ROCKWELL & KALLMAN, 1976), carcinoma mamário C₃H de camundongo (McCREDIE et al., 1965), adenocarcinoma mamário de rato induzido por DMBA (DURBIN et al., 1967), carcinoma sólido de EHRLICH em camundongo (TANNOCK, 1969), rabdomyossarcoma (BA 1112) de rato (HERMENS & BARENDSEN, 1967), melanoma B₁₆ em camundongo (STEEL, 1977), entre outros.

Entretanto não há na literatura registro de estudos cinéticos em tumores de natureza fibrohistiocítica, uma vez que, como foi visto no primeiro capítulo, a descrição desses tumores é um fato recente.

2.1.4.1 - Definição de alguns parâmetros utilizados no estudo de cinética tumoral

2.1.4.1.1 - Tempo do ciclo celular

O tempo do ciclo celular (T_c) é o tempo gasto para uma célula atravessar todas as fases do mesmo. A taxa de pro-

dução celular nos tecidos é dependente de alterações no tempo do ciclo celular (AHERNE et al., 1977).

2.1.4.1.2 - Índice mitótico

O índice mitótico (IM) representa a fração de células em mitose num dado tempo. Quando a população celular se distribui num estado de equilíbrio dinâmico, o IM pode ser representado pela equação (AHERNE et al., 1977):

$$IM = \frac{NM}{NC} = \frac{TM}{TC}$$

NM = número de células em mitose
 NC = número total de células
 TM = tempo de mitose
 TC = tempo do ciclo celular

2.1.4.1.3 - Fração de crescimento

A fração de crescimento (GF) representa a quantidade de células que está proliferando em uma dada população celular, em relação ao total de células desta população. É muitas vezes definida como índice proliferativo (IP) e, neste caso, pode ser expressa da seguinte maneira (AHERNE et al., 1977):

$$IP = \frac{N}{NC}$$

IP = índice proliferativo
 N = número de células em proliferação
 NC = nº total de células da população

2.1.4.1.4 - Taxa média de nascimento ou taxa de produção celular (K_B)

A taxa média de nascimento é a quantidade de novas células produzidas num determinado período, podendo ser calculada como se segue (AHERNE et al., 1977):

$$K_B = \frac{IP}{TC}, \text{ em condições de equilíbrio dinâmico}$$

ou

$$K_B = \frac{\text{Ln } (1 + IP)}{TC}, \text{ em condições de crescimento exponencial}$$

Segundo STEEL (1977) a K_B pode ser expressa como "novas células por célula por hora, ou seja, o tempo aparente requerido para uma população celular duplicar o número, podendo ser expressa assim:

$$K_B = \frac{1}{T_c(a)}, \text{ em condições de equilíbrio dinâmico}$$

ou

$$K_B = \frac{\text{Ln } 2}{T_c(a)}, \text{ em condições de crescimento exponencial}$$

$T_c(a)$ = tempo do ciclo celular aparente, o qual é igual ao tempo do ciclo celular quando a fração de crescimento (GF) é igual à unidade e igual ao tempo de duplicação real (TD), se não houver perda celular. É também chamado tempo de duplicação celular aparente (T_{PD})

2.1.4.1.5 - Taxa de crescimento

A taxa de crescimento (K_G) representa a taxa de aumento no número de células de uma população e, como a K_B , é expressa como "novas células por célula por hora". Na ausência de perda celular, a K_G e K_B são iguais. Se a perda celular está ocorrendo, a K_G será menor que a K_B e a discrepância entre as duas é uma medida da perda celular (K_L) (AHERNE et al., 1977):

$$K_G = K_B - K_L$$

A K_G também pode ser estimada pelo método da tangente (AHERNE et al., 1977), a partir das curvas de crescimento do tumor.

2.1.4.1.6 - Tempo de duplicação da população

Um parâmetro geralmente usado na cinética do crescimento tumoral é o tempo real de duplicação da população (TD). Em condições de crescimento exponencial, o TD pode ser relacionado com a taxa de crescimento (AHERNE et al., 1977; STEEL, 1977):

$$TD = \frac{\ln 2}{K_G}$$

2.1.4.1.7 - Índice de perda celular

A perda celular é geralmente expressa como uma fração percentual do total de células nascidas por unidade de tempo. O índice de perda celular pode ser simbolizado por ϕ (STEEL, 1978) e denota a magnitude da perda celular, podendo ser calculado como se segue:

$$\phi = \frac{K_L}{K_B} = \frac{T_c (a)}{T_D}$$

2.1.5 - Objetivos

O presente capítulo teve como objetivos:

- 1) Avaliar o comportamento cinético do tumor TEGS-2047, uma neoplasia espontânea, transplantável e conforme o estudo anterior, de natureza fibrohistiocítica;
- 2) Comparar os resultados com os obtidos com outros tumores, principalmente aqueles de partes moles, descritos na literatura; e, finalmente;
- 3) Discutir as possíveis causas que levam ao declínio do crescimento no tumor, algum tempo após o transplante, fato este bastante polêmico na literatura.

2.2 - MATERIAL

2.2.1 - Animais experimentais

Foram utilizados ratos albinos (*Rattus norvegicus*) variedade Wistar, de ambos os sexos, com peso médio de 120 gramas, com 30 a 50 dias de nascidos, provenientes da Colônia do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC. Todos os ratos foram mantidos em gaiolas de plástico, com grade de arame de aço inoxidável na parte superior recebendo água "ad libitum" e ração balanceada Coelhex - CBR.

2.2.2 - Soluções fisiológicas

Ringer com lactato de sódio, Química Farmacêutica Gaspar Viana: NaCl 6g; KCl 0,39g; $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2g; lactato de sódio 3,1g (concentração por litro).

Solução de cloreto de sódio 0,9%, Química Farmacêutica Gaspar Viana.

2.2.3 - Drogas, reagentes e corantes

- Ácido acético glacial (Reagen)
- Alcool absoluto (Merck)

- Azul de Trypan (Sigma Chemical Co.)
- Cloranfenicol (Sintomicetina - Laboratório Lepe_{tit})
- Clorofórmio (Merck)
- Eosina (Merck)
- Formaldeído (Herzog - sol. a 10%)
- Hematoxilina (Merck)
- Sulfato de vincristina (Oncovin - Laboratório Eli Lilly)
- Tripsina (Worthington Biochemical Corp. Peptides)

2.2.4 - Aparelhagem

- Autoclave Fabber
- Balança Mettler modelo P₃
- Calculadora SHARP EL-540
- Estufa de secagem e esterilização, IANEM - modelo 315 SE
- Microscópio binocular Zeiss acoplado com câmera fotográfica Zeiss e ocular integradora Zeiss KPL
- Micrótomo Spencer 820

2.2.5 - Materiais diversos

- Agulhas hipodérmicas 25-7, BD
- Lâminas e lamínulas

- Luvas cirúrgicas
- Material cirúrgico: pinças, bisturi, tesoura, trocarter, fios de algodão
- Parafina para preparação histológica, QUEEL
- Placas de Petri do tipo bacteriológico, PYREX
- Seringas de 1, 3, 5 e 20cc, BD

2.3 - MÉTODOS

2.3.1 - Uso do bloqueador de mitose

Foram utilizados 40 ratos Wistar, machos, inoculados com o tumor TEGS-2047, de acordo com a descrição feita no capítulo anterior (item 1.3.1). Os animais foram divididos em 8 subgrupos de 5, os quais eram identificados de acordo com o seguinte código: ODA (ápice da orelha direita); OEA (ápice da orelha esquerda); OEB (base da orelha esquerda); SM (sem marca) e ODB (base da orelha direita).

Todos os animais foram acompanhados por 27 dias, sendo pesados de 3 em 3 dias e os diâmetros maiores e menores dos seus respectivos tumores mensurados com paquímetro, para cálculo dos volumes tumorais.

Os animais foram estudados no 9º, 18º e 27º dias após o inóculo tumoral. Em cada um dos dias experimentais, 10 animais escolhidos ao acaso entre os 8 subgrupos, foram inoculados por via intraperitoneal com 1mg de sulfato de vincristina por quilo de peso corporal, sendo que tais injeções eram sempre realizadas às 9 horas da manhã. Após trinta minutos da injeção de vincristina, foi iniciado o sacrifício dos animais em intervalos de 15 minutos, durante 2 horas e 45 minutos, tempo em que há boa correlação entre o acúmulo de mitoses e o

tempo de ação da vincristina (WRIGHT et al., 1972; WRIGHT, 1980).

Após o sacrifício dos animais por deslocamento da coluna cervical seus respectivos tumores foram excisados, mensurados com paquímetro e pesados, sendo 4 amostras de regiões distintas retiradas para processamento do índice mitótico.

As amostras tumorais foram rotineiramente fixadas em fluido de Carnoy (60% de álcool absoluto; 30% de clorofórmio e 10% de ácido acético glacial) durante 5 horas e, depois estocadas em álcool a 70%. Após inclusão em parafina, cortes de 5 micrômetros (5µm) foram obtidos e corados com hematoxilina e eosina (HE).

2.3.2 - Volumes tumorais e curva de crescimento

Para os cálculos dos volumes tumorais usou-se o procedimento descrito por STEEL, 1977, no qual os diâmetros maiores (D) e menores (d) correspondentes, respectivamente, aos comprimentos e larguras dos tumores são medidos, sendo a espessura desprezada. Sendo assim, os volumes tumorais (em cm³) foram calculados pela seguinte fórmula:

$$V = \frac{\pi D \times (d^2)}{6}, \text{ considerando } \pi = 3$$

Em seguida, a curva de crescimento do tumor foi preparada, plotando-se, em escala semilogaritmica, os volumes tumorais contra o tempo após o transplante do tumor.

2.3.3 - Taxa de crescimento

A taxa de crescimento do tumor (K_G) para cada um dos dias experimentados foi calculada a partir da sua curva de crescimento, obtida conforme descrição anterior, utilizando-se o método da tangente. Desse modo, a declividade da curva correspondente a cada dia experimental forneceu a taxa de crescimento através do cálculo da tangente em cada ponto desejado, levando-se em consideração a diferença dos volumes tumorais expressos em logaritmo.

2.3.4 - Taxa de produção celular

A taxa de produção celular (K_B) foi calculada a partir do índice mitótico acumulado por hora, utilizando-se cortes semiseriados de 5 μ m de espessura, provindos de fragmentos de tumores incluídos em parafina. Avaliou-se o índice mitótico (IM) do tumor nos 10 animais de cada grupo experimental, mediante a seguinte fórmula:

$$IM = \frac{NM}{NC} \times 100, \quad NM = \text{número de células em mitose}$$

$$NC = \text{número total de células}$$

A contagem das células tumorais foi realizada através da microscopia óptica com objetiva NEOFLUAR CARL ZEISS 63 XX, adaptando-se ao microscópio uma ocular integradora (ZEISS KPL) com tela de 100 pontos (Fig. 2.3). Os limites externos desta tela definem um quadrilátero de área fixa que foi adota

do como unidade de campo.

Na determinação do número mínimo de campos necessários para a estimativa do índice mitótico, utilizou-se a técnica da média acumulada (WILLIAMS, 1977). Para tanto, usando cortes semiseriados de tumores de um animal de cada grupo, foram contadas células tumorais em fase mitótica e em fase não mitótica (Fig. 2.4); num total de 100 campos sucessivos. A seguir foram verificados os valores da média acumulada a cada 10 campos, até obter-se a média dos 100 campos, cujo valor correspondeu a 100%. Após verificar o valor de cada média acumulada correspondente ao estimado para os 100 campos, pode-se determinar que as mesmas se estabilizaram aproximadamente após 60 campos, com variação de 10% (Fig. 2.5). Portanto, 60 foi o número de campos escolhido para a contagem de células nos demais animais. Os valores numéricos dos dados obtidos estão registrados na Tabela II.1.

O índice mitótico acumulado foi então plotado contra o tempo após injeção de vincristina. A declividade obtida (B) na análise da linha de regressão forneceu a taxa de produção celular do tumor (K_P), para cada grupo experimental.

2.3.5 - Taxa de perda celular e índice de perda celular

A taxa de perda celular do tumor (K_L) foi calculada, a partir do conhecimento das taxas de crescimento (K_G) e de produção celular (K_P), utilizando-se a seguinte fórmula

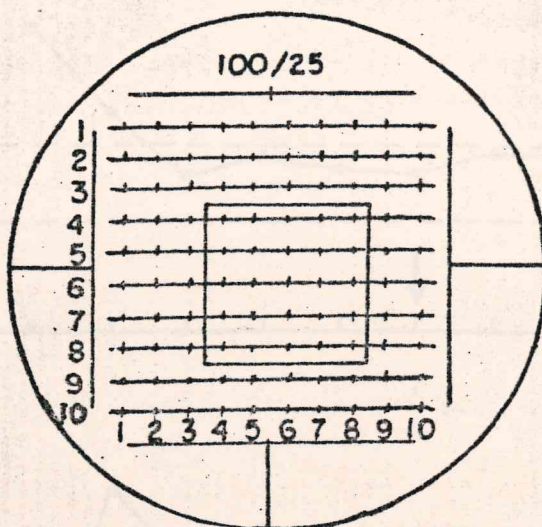


FIGURA 2.3 - Esquema da ocular integradora de 100 pontos Zeiss KpL 10XX

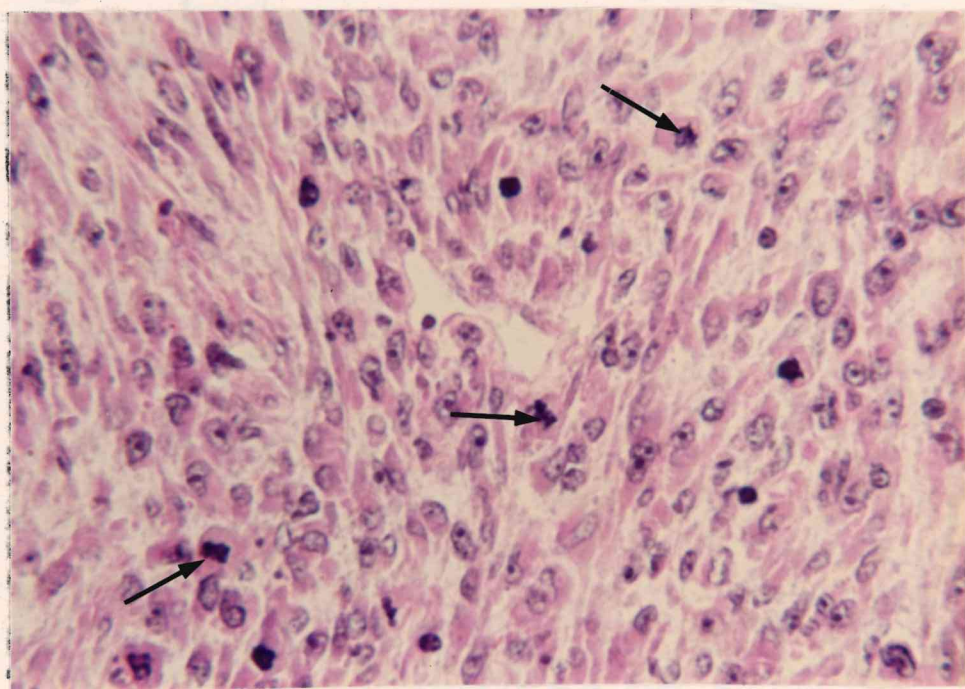


FIGURA 2.4 - Aspecto tumoral após bloqueio com vincristina. Observe células tumorais em fase mitótica (setas) e fase não mitótica. O material foi incluído em parafina e corado em H.E. (600XX).

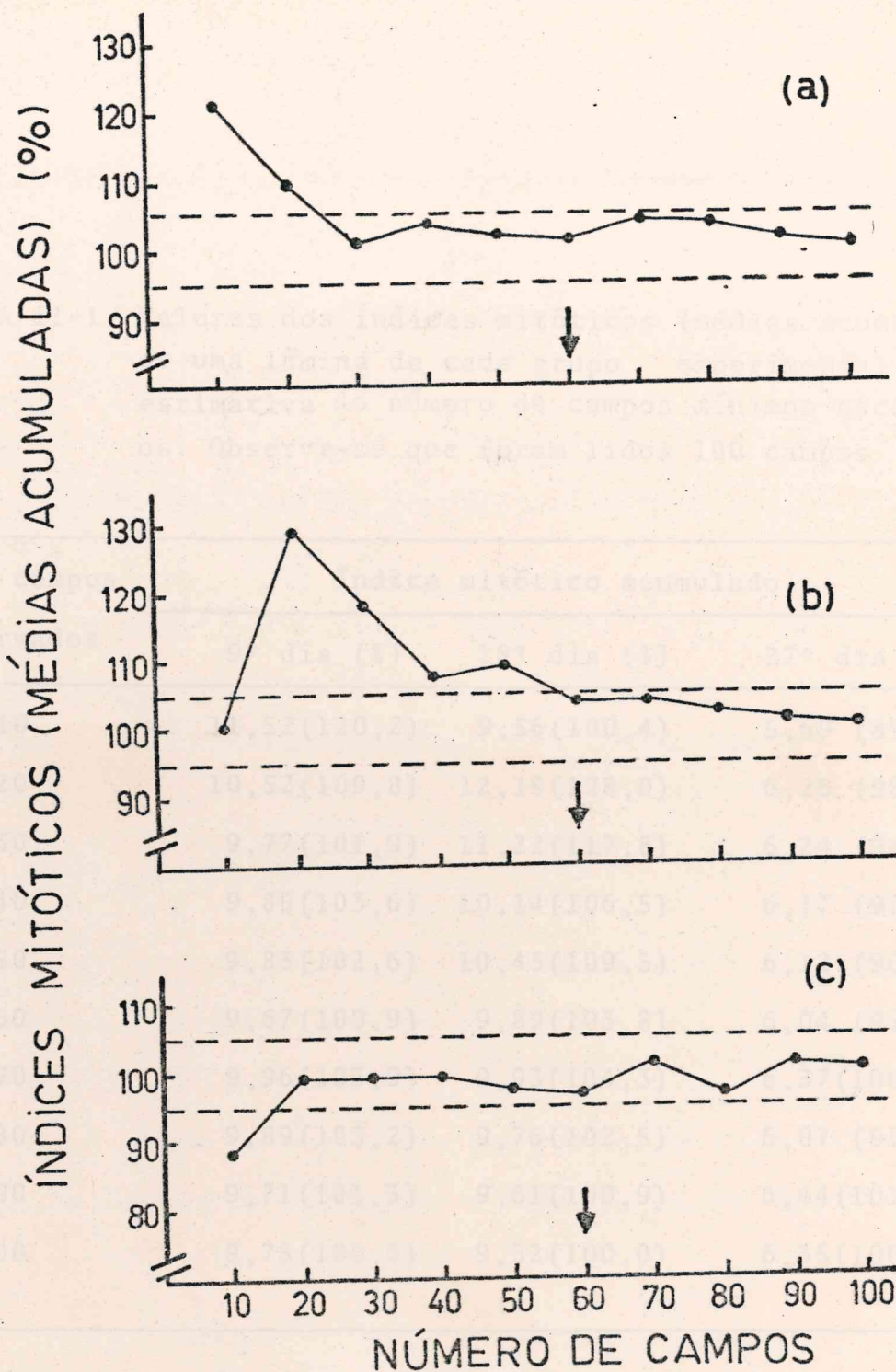


FIGURA 2.5 - Índice mitótico acumulado de um animal de cada grupo experimental (9º dia-A; 18º dia-B e 27º dia-C. Note-se que foram lidos 100 campos; as médias se estabilizaram em 60 com variação de 10%. Portanto este foi o nº de campos escolhido para a determinação dos índices mitóticos dos demais animais.

TABELA II-1 - Valores dos índices mitóticos (médias acumuladas) de uma lâmina de cada grupo experimental para estimativa do número de campos mínimos necessários. Observe-se que foram lidos 100 campos

Nº de campos observados	Índice mitótico acumulado		
	9º dia (%)	18º dia (%)	27º dia (%)
10	11,52(120,2)	9,56(100,4)	5,69 (89,6)
20	10,52(109,8)	12,19(128,0)	6,23 (98,1)
30	9,77(101,9)	11,22(117,8)	6 24 (98,2)
40	9,85(103,6)	10,14(106,5)	6,17 (97,1)
50	9,83(102,6)	10,43(109,5)	6,12 (96,3)
60	9,67(100,9)	9,89(103,8)	6,04 (95,1)
70	9,96(103,9)	9,93(104,3)	6,37(100,3)
80	9,89(103,2)	9,76(102,5)	6,07 (95,5)
90	9,71(101,3)	9,61(100,9)	6,44(101,4)
100	9,78(100,0)	9,52(100,0)	6,35(100,0)

(AHERNE et al., 1977):

$$K_L = K_G - K_B$$

O índice de perda celular (ϕ) foi determinado como se segue (STEEL, 1978):

$$\phi = \frac{K_L}{K_B}$$

2.3.6 - Tempo potencial de duplicação

O tempo potencial de duplicação (T_{PD}), ou tempo aparente do ciclo celular ($T_c(a)$), foi calculado assumindo-se um crescimento exponencial do tumor e de acordo com a fórmula (STEEL, 1977):

$$T_{PD} = \frac{\ln 2}{K_B}$$

2.3.7 - Tempo de duplicação da população

O tempo de duplicação da população (T_D) foi determinado assumindo-se um crescimento exponencial do tumor e de acordo com a fórmula (STEEL, 1977):

$$T_D = \frac{\ln 2}{K_G}$$

2.3.8 - Análise estatística

Na avaliação dos volumes tumorais calcularam-se a

média \pm erro padrão da média (SNEDECOR & COCHRAN, 1973).

Na determinação do número mínimo de campos necessários para a estimativa do índice mitótico, utilizou-se a técnica da média acumulada (WILLIAMS, 1977).

Na análise das taxas de produção celular utilizou-se o teste do paralelismo entre 2 retas através de comparações entre linhas de regressão dos grupos I (9º dia) e III (27º dia) (BROWNEE, 1960; SNEDECOR & COCHRAN, 1973).

2.4 - RESULTADOS

2.4.1 - Crescimento do tumor e índice de pega

Em 33 dos 40 ratos transplantados, o tumor tornou-se palpável no 3º dia após a introdução do inóculo tumoral, dando um índice de pega de 82,5%. No 6º e 9º dias, o índice de pega permaneceu o mesmo. No 12º, no entanto, observou-se regressão quase total de 2 tumores, razão pela qual passou-se a ter um índice de pega menor (77,5%), o qual permaneceu até o final do experimento (Tabela II.2).

Os tumores cresceram como massas subcutâneas, ovóides ou esféricas, de dimensões bastante variáveis: no 9º dia, o diâmetro maior variou de 1,0 a 3,6cm; no 18º dia de 2,3 a 5,8 cm e no 27º dia de 4,6 a 8,9cm. Os dados referentes aos volumes médios, diâmetros maiores e menores e pesos dos tumores, mensurados ao longo do experimento, encontram-se na Tabela II.2. Nota-se que, mesmo com um número considerável de animais usados para cada média, os erros padrões mostram valores muito altos, particularmente nas últimas medidas, indicando uma variação considerável nas taxas individuais de crescimento dos tumores.

A curva de crescimento do tumor TEGS-2047, mostrada na Fig. 2.6, demonstra que, aparentemente, o volume tumoral au-

TABELA II.2 - Valores médios dos volumes, diâmetros e pesos observados no tumor TEGS-2047. Os dados dos volumes tumorais foram utilizados para a obtenção da curva de crescimento do tumor^(*)

Dias após o transplante	Parâmetro observado				
	Volume (cm ³)	Diâmetro maior (cm)	Diâmetro menor (cm)	Peso (g)	Nº de Animais
3	0,647 ±0,094	1,53 ±0,505	0,918 ±0,27	-	33
6	±2,40 ±0,336	±2,33 ±0,618	±1,433 ±0,424	-	33
9	0,47 ±0,932	3,08 ±0,716	2,21 ±0,474	3,01 ±0,378	33 33
12	13,57 ±1,62	3,46 ±0,846	2,80 ±0,573	-	21
15	19,56 ±2,27	4,08 ±0,98	3,096 ±0,637	-	21
18	37,46 ±6,31	4,98 ±1,06	3,87 ±0,79	17,8 1,78	21
21	45,98 ±9,12	5,13 ±1,28	4,23 ±0,82	-	11
24	54,51 ±9,52	5,96 ±1,32	4,27 ±0,89		
27	60,85 ±9,83	6,54 ±1,42	4,21 ±0,815	44,3 ±7,02	11

(*) Resultados expressos em média ± erro padrão

menta linearmente até o 9º ou 10º dias; a partir desse ponto, parece crescer exponencialmente até por volta do 21º dia, quando se nota uma marcada diminuição no crescimento, principalmente depois do 24º dia. A curva de crescimento do tumor é compatível com um padrão que segue a função de GOMPERTZ (STEEL, 1977).

2.4.2 - Parâmetros cinéticos

Os dados cinéticos obtidos com o uso do bloqueador de mitose (Vincristina) são mostrados nas Figuras 2.7, 2.8, 2.9 e nas Tabelas II.3, II.4 e II.5.

2.4.2.1 - Taxa de produção celular e tempo potencial de duplicação

No 9º dia, a taxa de produção celular (K_B) foi de 0,0402 cels./cel/h (ou 40,2 cels./1000 cels./h). No 18º dia constatou-se uma queda da K_B para 0,0288 cels./cel./h (ou 28,8 cels./1000 cels./h). Uma queda ainda maior na taxa de produção celular foi observada no 27º dia, onde a K_B foi de 0,0222 cels./cel./h (ou 22,2 cels./1000 cels./h). As diferenças entre os valores de K_B não foram tão marcantes, embora tenha se encontrado uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as K_B dos dias 9 e 27. Os valores dos índices mitóticos (IM) para cada dia experimental (Tabela II.3) mostram claramente que há uma diminui

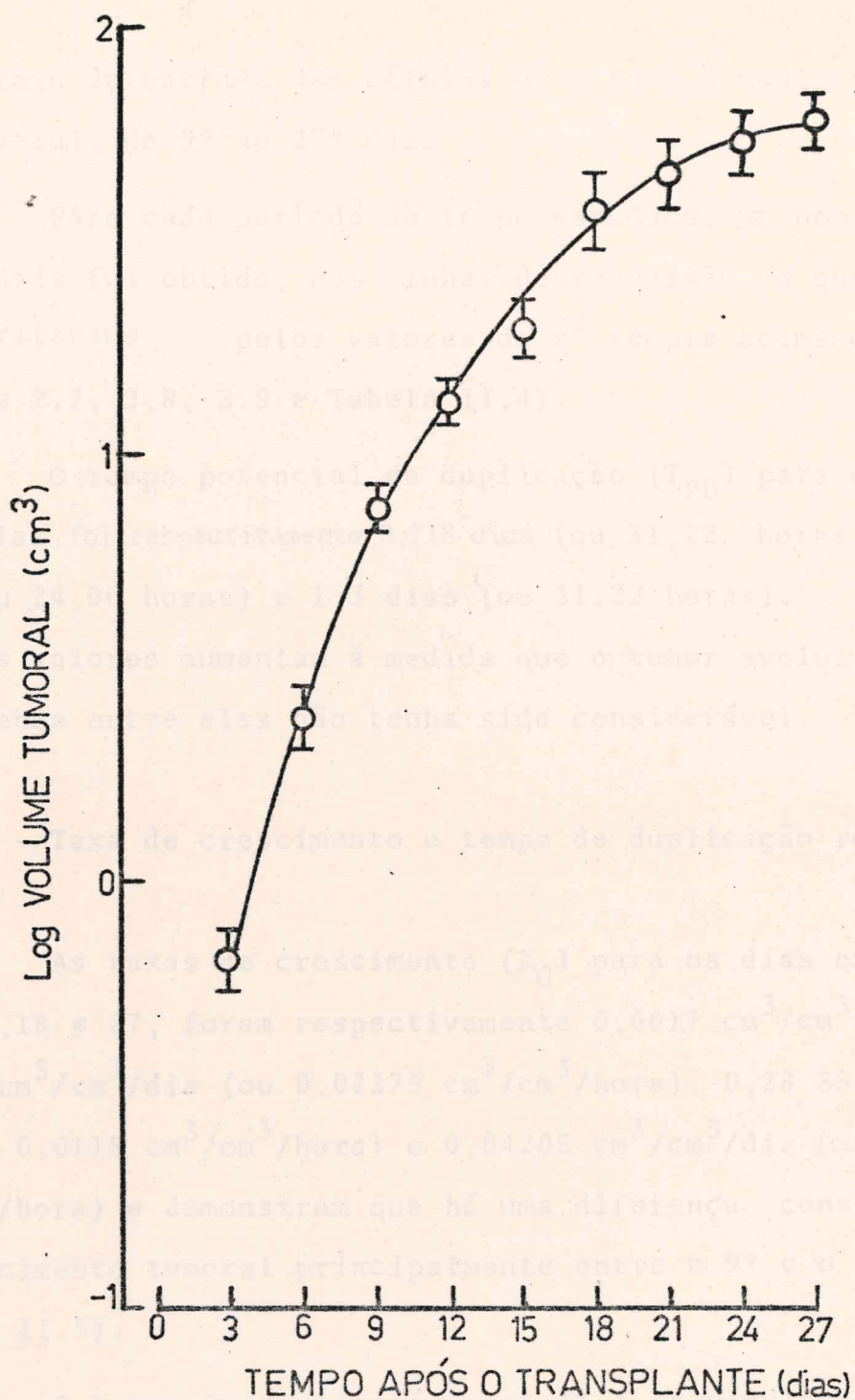


FIGURA 2.6 - Curva de crescimento do tumor TEGS-2047. Os pontos experimentais indicam média \pm erro padrão da média. Note-se que os dados foram colocados em escala semi-logaritmica. O tumor demonstra um típico crescimento Gompertziano.

ção da taxa de entrada das células em mitose, à medida que o tumor evolui, do 9º ao 27º dia.

Para cada período de tempo estudado, um bom grau de linearidade foi obtido, nas linhas de regressão, o que pode ser verificado pelos valores de r^2 sempre acima de 0,80 (Figuras 2.7, 2.8, 2.9 e Tabela II.4).

O tempo potencial de duplicação (T_{PD}) para o 9º, 18º e 27º dias foi, respectivamente 0,718 dias (ou 31,22 horas), 1,002 dias (ou 24,06 horas) e 1,3 dias (ou 31,22 horas). Nota-se que tais valores aumentam à medida que o tumor evolui, embora a diferença entre eles não tenha sido considerável.

2.4.2.2 - Taxa de crescimento e tempo de duplicação real

As taxas de crescimento (K_G) para os dias experimentais, 9, 18 e 27, foram respectivamente 0,6617 $\text{cm}^3/\text{cm}^3/\text{dia}$ (ou 0,0275 $\text{cm}^3/\text{cm}^3/\text{dia}$ (ou 0,02275 $\text{cm}^3/\text{cm}^3/\text{hora}$), 0,2833 $\text{cm}^3/\text{cm}^3/\text{dia}$ (ou 0,0118 $\text{cm}^3/\text{cm}^3/\text{hora}$) e 0,04205 $\text{cm}^3/\text{cm}^3/\text{dia}$ (ou 0,00175 $\text{cm}^3/\text{cm}^3/\text{hora}$) e demonstram que há uma diferença considerável do crescimento tumoral, principalmente entre o 9º e o 27º dias (Tabela II.5).

O tempo de duplicação real (T_D) da população tumoral aumentou consideravelmente (16 vezes), à medida que o tumor evoluiu, de forma que passou de 1,047 dias (ou 27,13 horas) no 9º dia, para 2,44 dias (ou 58,73 horas) no 18º dia e, depois, para 16,5 dias (ou 396,05 horas) no 27º dia após o inó

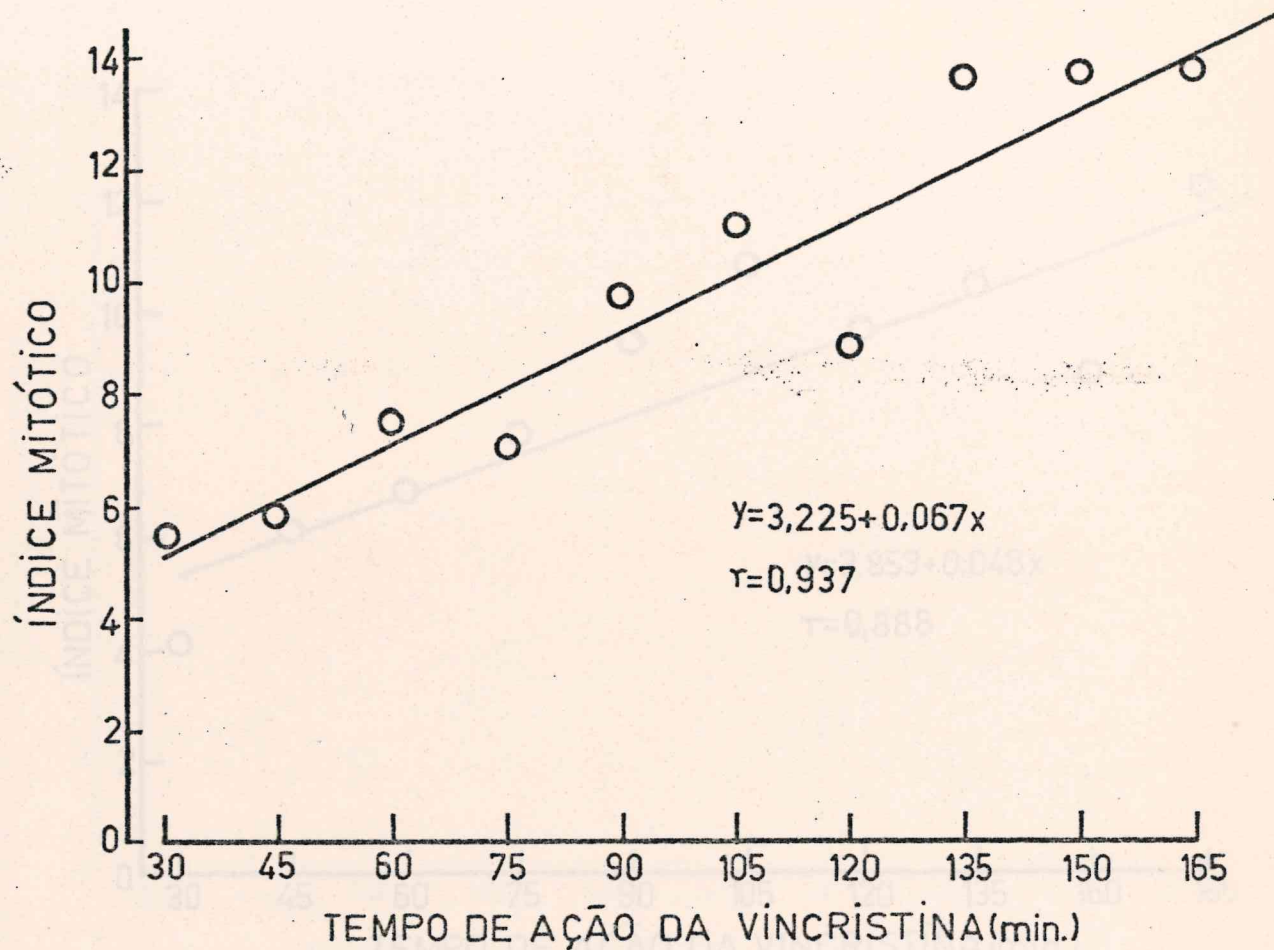


FIGURA 2.7 - Índice mitótico acumulado no 9º dia de evolução do tumor. A taxa de produção celular (K_B) neste dia foi obtida a partir da análise da declividade da linha de regressão.

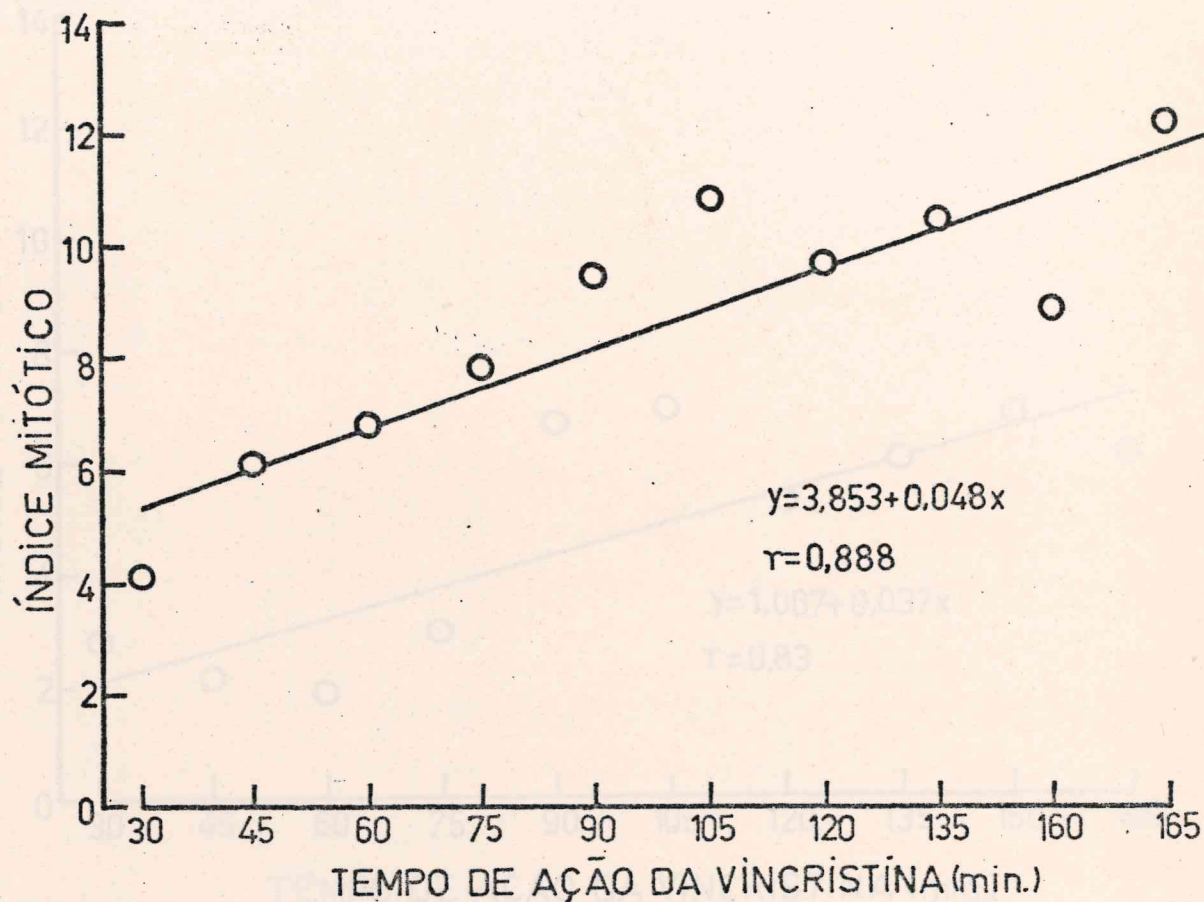


FIGURA 2.8 - Índice mitótico acumulado no 18º dia de evolução do tumor. A taxa de produção celular (K_p) neste dia foi obtida a partir da análise da declividade da linha de regressão.

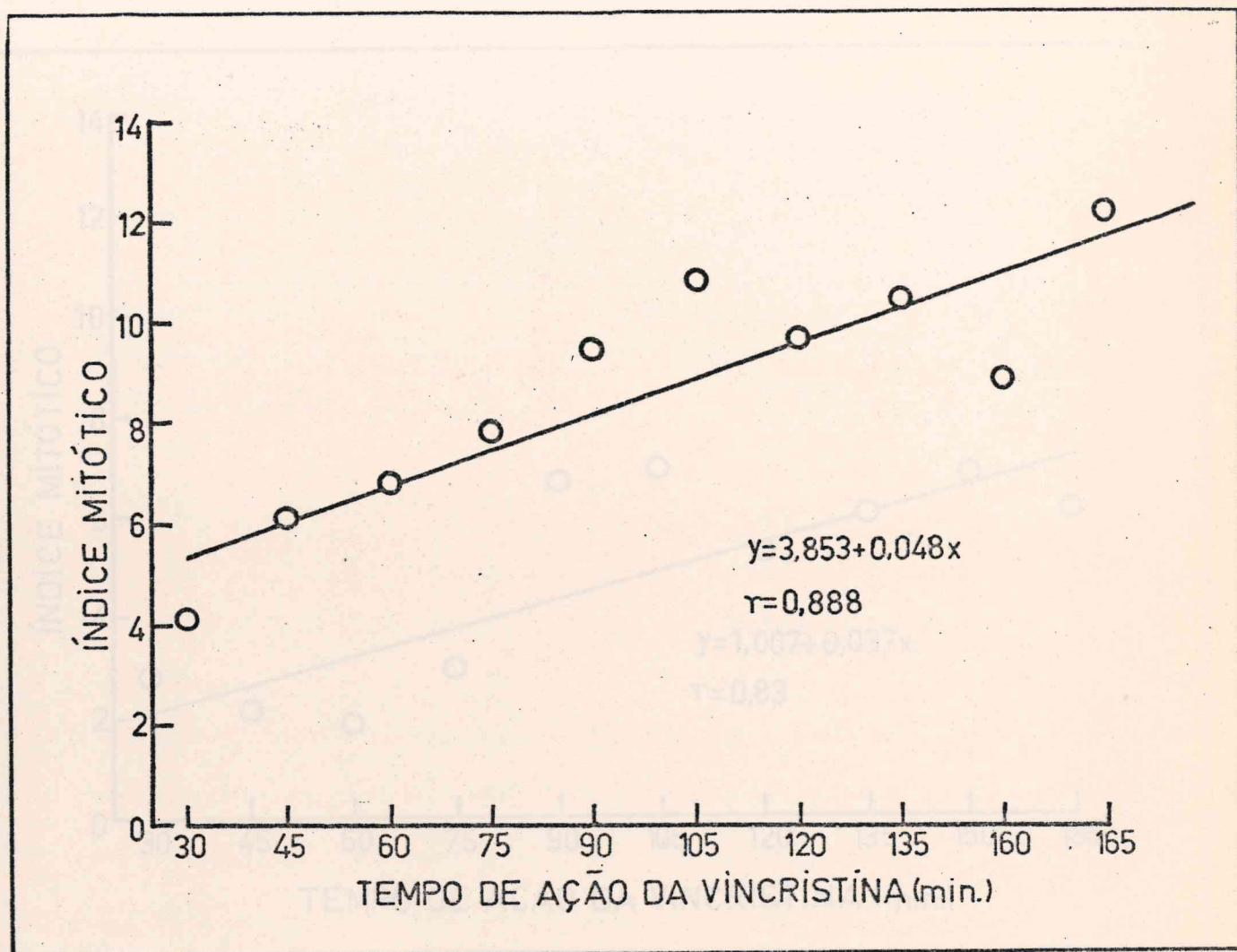


FIGURA 2.8 - Índice mitótico acumulado no 18º dia de evolução do tumor. A taxa de produção celular (K_B) neste dia foi obtida a partir da análise da declividade da linha de regressão.

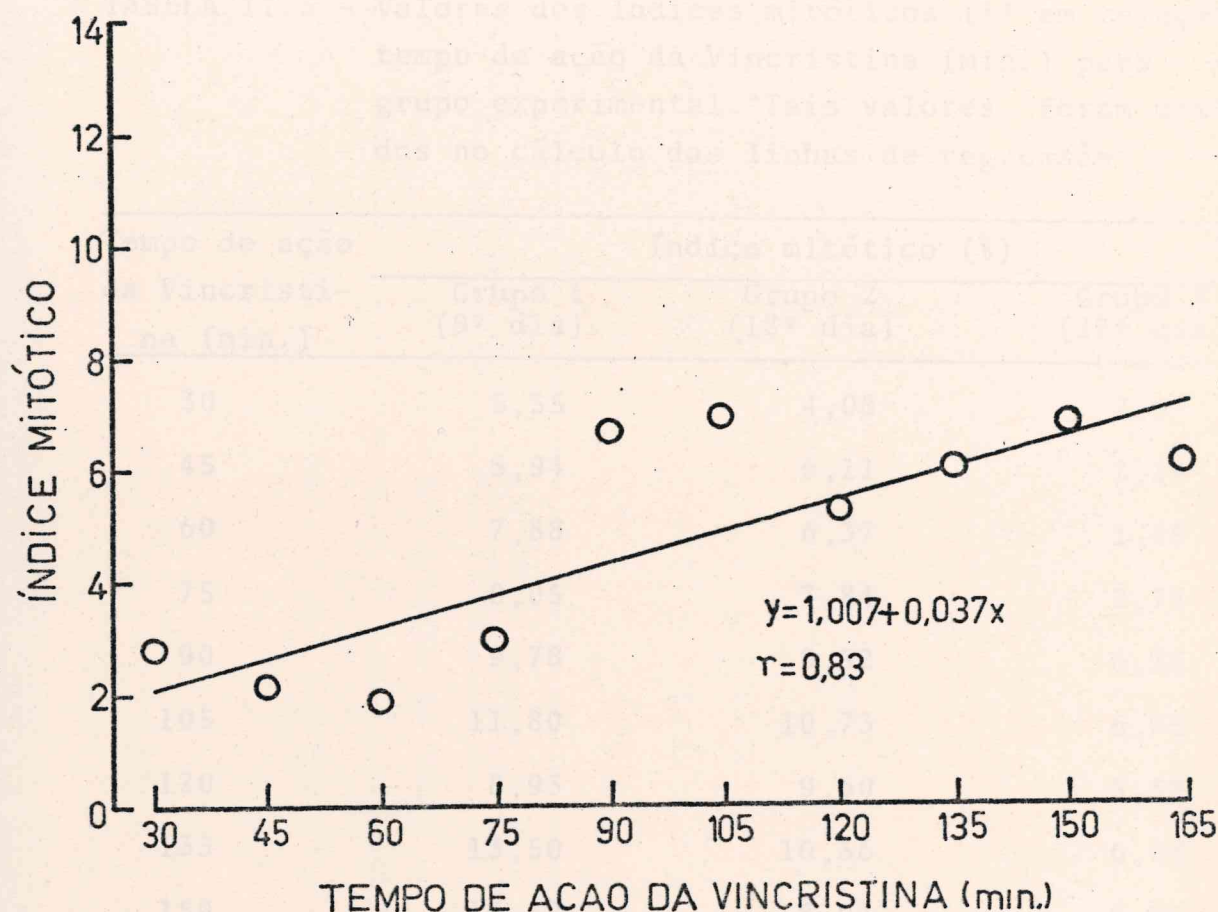


FIGURA 2.9 - Índice mitótico acumulado no 27º dia de evolução do tumor. A taxa de produção celular (K_p) neste dia foi obtida a partir de análise da declividade da linha de regressão.

TABELA II.3 - Valores dos índices mitóticos (%) em relação ao tempo de ação da Vincristina (min.) para cada grupo experimental. Tais valores foram utilizados no cálculo das linhas de regressão

Tempo de ação da Vincristina (min.)	Índice mitótico (%)		
	Grupo 1 (9º dia)	Grupo 2 (18º dia)	Grupo 3 (27º dia)
30	5,55	4,08	2,67
45	5,94	6,11	2,10
60	7,88	6,37	1,88
75	0,05	7,84	2,75
90	9,78	9,52	6,35
105	11,80	10,73	6,75
120	8,93	9,60	5,35
135	13,50	10,36	6,08
150	13,57	8,94	6,76
165	13,91	12,28	6,18

TABELA II.4 - Dados cinéticos obtidos com o bloqueio de mitoses no tumor TEGS-2047

Tempo após o transplan- te (dias)	r^2 *	Taxa de entrada em mitose (K_B)		Tempo potencial de du- plicação (T_{PD})	
		(cels/cel/h)	(cels/100 cels/h)	(dias)	(horas)
9	0,93	0,0402**	4,02	0,718	17,24
18	0,88	0,0288	2,88	1,002	24,06
27	0,83	0,0222**	2,22	1,30	31,22

(*) Valores obtidos a partir das linhas de regressão

(**) $p < 0,05$

culo tumoral (Tabela II.5).

2.4.2.3 - Perda celular

Os valores das taxas de perda celular (K_L) e dos índices de perda celular (ϕ) encontram-se na Tabela II.5. Observa-se que há um aumento significativo da perda celular à medida que o tumor se desenvolve. Assim, no 9º dia ($\phi = 0,3134$), para cada 100 células nascidas, aproximadamente 32 são perdidas; no 18º dia ($\phi = 0,5902$) cerca de 60 células são perdidas e, no 27º dia ($\phi = 0,9189$), o tumor chega a perder quase 92 células para cada 100 produzidas. Nota-se, portanto, que o aumento da perda celular, muito mais que a diminuição da produção celular, é um fator decisivo para a redução da taxa de crescimento nos últimos dias de evolução do tumor.

TABELA II.5 - Sumário dos parâmetros cinéticos do tumor TEGS-2047

Tempo após o transplante (dias)	Parâmetro observado				
	T_{PD} (dias)	T_D (dias)	K_B^*	K_G^*	K_L^*
9	0,718	1,04	0,0402	0,02757	0,012
18	1,002	2,44	0,0288	0,0118	0,017
27	1,30	16,5	0,0222	0,00175	0,0204
					0,3134
					0,5902
					0,9189

(*) CELS/CEL/HORA

T_{PD} - Tempo potencial de duplicação
 T_D - Tempo de duplicação real
 K_B - Taxa de produção celular
 K_G - Taxa de crescimento
 K_L - Taxa de perda celular
 ϕ - Índice de perda celular

2.5 - DISCUSSÃO

2.5.1 - Transplantabilidade e padrão de crescimento do tumor

PEYRILHE em 1773, ao transplantar, embora com insucesso, tecidos neoplásicos humanos para animais, abriu campo para estudos biológicos e terapêuticos em cancerologia (STEWART et al., 1959). Entretanto, coube a CORNILL em 1891, descrever a primeira experiência bem sucedida de transplante de câncer em animais experimentais.

A determinação da existência de tumores malignos espontâneos em animais, favoreceu o desenvolvimento de experiências que, a partir de então, passaram a ser feitas entre animais de uma mesma espécie de forma que alguns parâmetros como idade, sexo e duração do implante, passaram a ser controlados (OBERLING, 1961).

A aplicação repetida de alcatrão na orelha de coelhos levou, pela primeira vez, à indução de um carcinoma por agente químico (YAMAGIWA & ICHIKAWA, 1918). Posteriormente atribuiu-se ao benzopireno e dibenzoantraceno, componentes do alcatrão, a ação carcinogênica deste último (SHIMKIN & TRIOCO, 1969). A partir daí uma grande variedade de agentes químicos têm sido identificados como possuidores de ação carcinogênica.

Algumas neoplasias espontâneas em animais, tais como a leucemia bovina e de gatos, doença de Marek em pintos, adenocarcinomas mamários de camundongos e outras, têm sido relacionadas etiologicamente com vírus como oncornavirus, papovavírus, adenovirus e vírus do grupo herpes (RAPP & O'CONNOR, 1982).

As descobertas sobre a indução de neoplasias malignas por vírus ou agentes químicos carcinogênicos, bem como a possibilidade de transplante de tais tumores em laboratórios, deram origem à existência, hoje, de uma grande variedade de tumores. Estes, mantidos por transplantes sucessivos ou em meios de cultura, têm permitido um maior número de estudos experimentais em oncologia.

A descrição de tumores fibrohistiocíticos espontâneos ou induzidos em animais experimentais, é um fato recente (YOMOTO & MORIMOTO, 1980; GREAVES et al., 1980, 1981, 1985; WARD et al., 1981; KONISHI et al., 1982; KHAR, 1986). Por essa razão tem-se dado importância à criação de modelos experimentais de FHM em animais de laboratório (GREAVES, 1985).

No presente estudo, o tumor TEGS-2047 — definido como um fibrohistiocitoma maligno de ratos, conforme demonstrado no capítulo 1 — mostrou um índice de pega em ratos Wistar jovens aceitável (em torno de 80%) ao longo dos experimentos. Isso credencia o TEGS-2047 a fazer parte do extenso rol de tumores experimentais atualmente disponíveis, além do fato de, pelo seu padrão histológico, recentemente descrito, con-

tribuir como modelo experimental estabelecido, para um maior conhecimento dos fibrohistiocitomas malignos humanos.

A técnica de transplante utilizada na presente investigação, está, obviamente, distante da ideal, já que não sabemos a fração de células viáveis e possivelmente férteis que foram inoculadas. Entretanto, as variações, embora consideráveis, no crescimento individual dos tumores, refletidas nos valores dos volumes e pesos, não são maiores que aquelas descritas em outros experimentos onde se contou o número de células viáveis injetadas (LALA, 1972; TANNOCK, 1968). Resultados semelhantes aos do presente estudo, foram publicados p/ AHERNE et al (1977) com o Balbsarcoma de camundongos.

O padrão de crescimento do tumor TEGS-2047, mostrou-se compatível com aquele obedecido pela função de GOMPERTZ. Nesse sentido em muito se assemelha aos muitos outros tumores de partes moles descritos na literatura (STEEL, 1977) (Figura 2.10).

2.5.2 - Cinética de crescimento tumoral

A taxa de crescimento de um tumor geralmente diminui com o aumento do seu tamanho, provavelmente devido ao estroma de suporte não poder manter uma taxa de crescimento igual à taxa máxima de proliferação das células do parênquima (LAIRD, 1964; STEEL & LAMERTON, 1966). A maioria dos tumores sólidos experimentais que crescem nos tecidos subcutâneos,

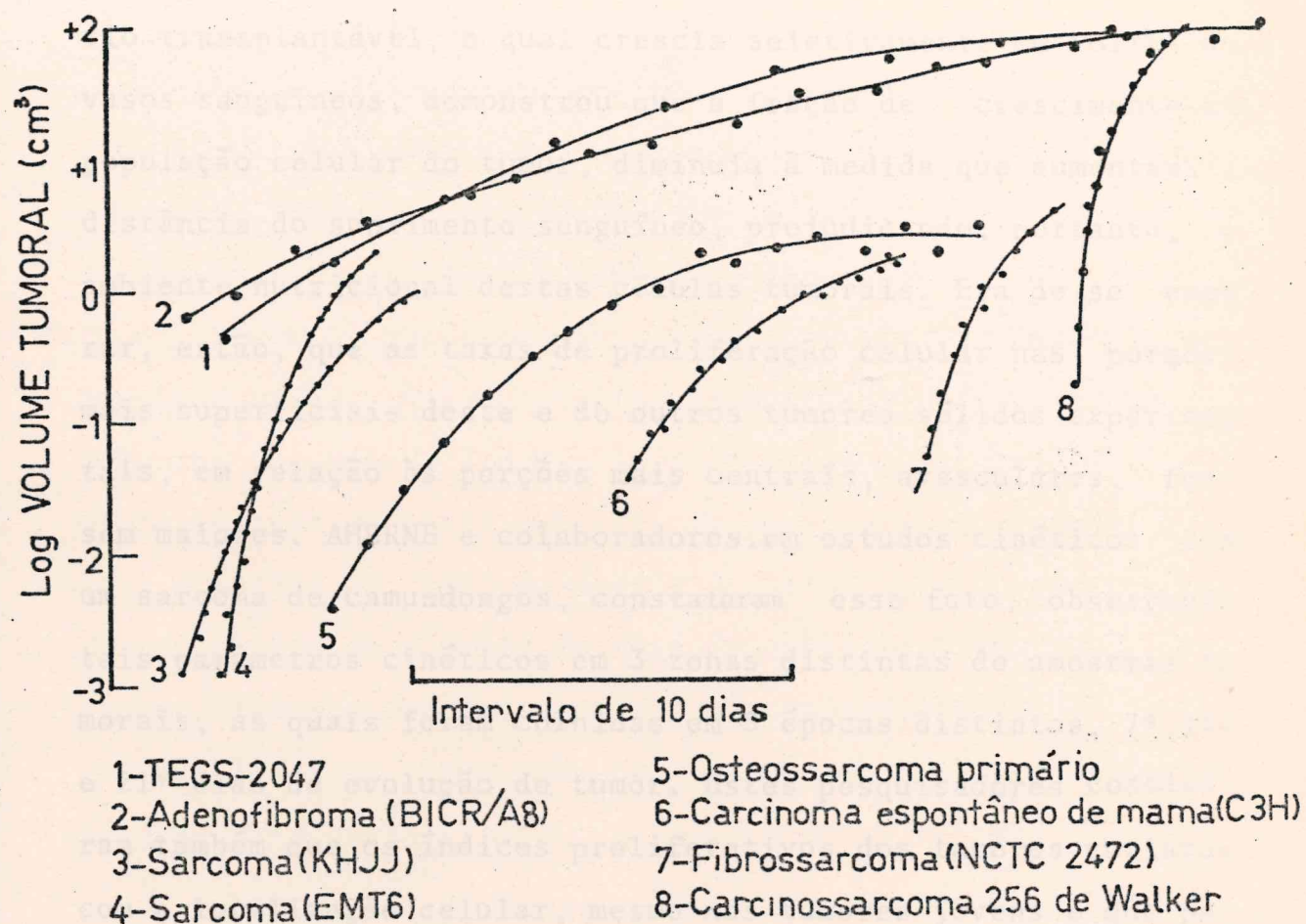


FIGURA 2.10 - Comparação entre curvas de crescimento de 8 tumores experimentais, inclusive o estudado na presente pesquisa (TEGS-2047). Os dados foram plotados em escala semi-logarítmica. Observe o crescimento Gompertziano de todos os tumores (Adaptado de STEEL, 1977).

possui um centro necrótico mesmo nos estágios iniciais; o suprimento de sangue entra no tumor, portanto, de fora para dentro (STEEL, 1982).

TANNOCK (1968, 1969), estudando um carcinoma mamário transplantável, o qual crescia seletivamente em volta de vasos sanguíneos, demonstrou que a fração de crescimento da população celular do tumor, diminuía à medida que aumentava a distância do suprimento sanguíneo, prejudicando, portanto, o ambiente nutricional destas células tumorais. Era de se esperar, então, que as taxas de proliferação celular nas porções mais superficiais deste e de outros tumores sólidos experimentais, em relação às porções mais centrais, avasculares, fossem maiores. AHERNE e colaboradores, em estudos cinéticos com um sarcoma de camundongos, constataram esse fato, observando tais parâmetros cinéticos em 3 zonas distintas de amostras tumorais, as quais foram colhidas em 3 épocas distintas, 7º, 14º e 21º dias de evolução do tumor. Estes pesquisadores concluíram também que os índices proliferativos dos tumores variaram com a localização celular, mesmo nos tumores jovens e que parte da fração não proliferativa dos tumores mais velhos, era formada por um grande número de células poliplóides e aneuplóides (AHERNE et al., 1977).

Tumores sólidos e ascíticos possuem diferentes ambientes nutricionais e a comparação dos parâmetros cinéticos em tumores sólidos e ascíticos derivados de um mesmo tipo histológico celular proporcionou a compreensão de alguns possíveis

fatores influenciadores da proliferação celular. A primeira investigação deste tipo foi realizada por FRINDEL et al(1967), num fibrossarcoma de camundongo. Nesse estudo mostrou-se que a desaceleração do crescimento ascítico foi provocada, em grande escala, por um aumento no tempo médio do ciclo celular, ao passo que mudanças na taxa de crescimento dos tumores sólidos foram resultantes de um aumento na taxa de morte celular e de uma diminuição na fração de crescimento. Um segundo estudo, realizado por TANNOCK (1969) nos tumores ascítico e sólido de EHRLICH, constatou que a desaceleração do crescimento no tumor na sua forma ascítica, foi causada parcialmente por aumentos nas fases do ciclo celular e parcialmente por um aumento na taxa de perda celular, ao passo que nos tumores sólidos, a principal razão para essa desaceleração do crescimento foi atribuída ao aumento da taxa de perda celular. Neste estudo verificou-se uma certa manutenção da produção celular nos grandes tumores, mesmo após constatação de um decréscimo na taxa de crescimento.

Na presente investigação, verificou-se um decréscimo nas taxas de produção celular (K_B), proporcional ao aumento da idade tumoral. As diferenças, embora estatisticamente significativas ($p < 0,05$), foram pequenas para os dois extremos comparados, 9 e 27 dias. As taxas de perda celular (K_L) e índices de perda celular (ϕ), entretanto, aumentaram consideravelmente com a evolução do tumor, muito embora já no 9º dia haja sido constatada uma perda de 36 células para cada 100

produzidas pelo tumor ($\phi = 0,36$), demonstrando que não só no final do crescimento ($\phi=0,92$), mas também no início, a perda celular é expressiva. Tais observações levam a crer que o crescente aumento da perda celular é a principal causa para a diminuição da taxa de crescimento do tumor TEGS-2047, mesmo a despeito da constatação de um decréscimo das taxas de produção celular.

A grande necrose tumoral observada nas porções centrais do tumor, mesmo nos primeiros dias de evolução, leva à conclusão que presumivelmente, foi este o local de ocorrência da maior parte da perda celular constatada, provavelmente devido a restrição no suprimento de oxigênio e nutrientes.

Achados semelhantes aos descritos acima e com outros tumores sólidos experimentais foram reportados por FRINDEL et al (1967), HERMANS & BARENDSEN (1967 e 1969), TANNOCK (1968), TANNOCK & STEEL (1970) e AHERNE et al (1977).

TANNOCK (1968) defende a hipótese de que o oxigênio pode ter um papel importante no controle da taxa de proliferação celular, em relação à fração de crescimento. Sua influência, no entanto, no tempo médio do ciclo celular parece ser pequena, e, se aquelas células em contato com os vasos sanguíneos, têm tempo de ciclo celular curto, fatores outros, além do oxigênio, estão provavelmente envolvidos. Com base na hipótese acima pode-se supor haver uma correlação entre a diminuição da fração de crescimento e o volume necrótico relativo do tumor pesquisado, já que há evidências de que ambos podem ser influenciados pelas limitações na difusão do oxigênio.

A proliferação celular pode ser inibida por mudanças da respiração para glicólise anaeróbica, desde que, esta última, é provavelmente importante nas áreas hipóxicas do tumor. A mudança causa uma redução na taxa de síntese de ATP e poderia, portanto, inibir a divisão celular pela diminuição da energia disponível (TANNOCK, 1968, 1970). Entretanto, os resultados de GULLINO et al (1966) sugerem que ambos, respiração e glicólise anaeróbica, podem ocorrer em todas as partes viáveis do tumor, já que tanto o consumo de glicose como a produção de lactato aumentam em proporção direta com o oxigênio utilizado e que a falta deste bloqueia os 2 processos.

Há evidências de que células nos tumores ascíticos parecem ser mais resistentes a anóxia do que em muitos tumores sólidos, onde, para alguns autores, elas morrem tão logo tornam-se anóxicas (THOMLINSON & GRAY, 1955; GOLDACRE & SYLVEN, 1962; TANNOCK, 1968).

Existe um número razoável de explicações para este paradoxo. A ação peristáltica do intestino provavelmente causa um movimento das células ascíticas dentro do peritônio, permitindo uma oxigenação permanente nas membranas vascularizadas, em volta, por curtos períodos do seu ciclo e isto pode ser suficiente para prevenir a morte celular (TANNOCK, 1969). Portanto, condições mais favoráveis existem, nos tumores sólidos, para a morte celular. De DUVE (1963) constatou que a retirada de oxigênio de uma célula pode levar à ruptura de membranas lisossomais, portanto, a probabilidade de morte ce-

lular pode aumentar quando as células tornam-se anóxicas, in dependente do fato de elas pertencerem a tumores sólidos ou ascíticos (TANNOCK, 1969). Há também evidências de que células mortas liberem enzimas lisossomais e outras substâncias tóxicas (SYLVEN & HOLMBERG, 1965). Altas concentrações de tais agentes, nos tumores sólidos, como o estudado na presente pesquisa, poderia levar à morte celular e necrose, enquanto que agentes similares nos tumores ascíticos poderiam rapidamente se diluir e se dispersar quando liberados no líquido ascítico, como foi descrito por TANNOCK (1969).

Mais recentemente tem-se demonstrado a presença no soro humano e de coelhos de uma proteína, já purificada, a qual foi denominada FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF), por suas propriedades de causar necrose hemorrágica em vários tumores experimentais "in vivo", bem como ter efeito citotóxico em vários tumores "in vitro" (AGGARWAL et al., 1985; ABE et al., 1985). Agentes usados para estimular a produção de TNF em camundongos causam hiperplasia de macrófagos no fígado e baço, sugerindo que tais células funcionem como fontes celulares de TNF (MATTHEWS, 1978; MATTHEWS & WATKINS, 1978). Além disso, recentemente AGGARWAL e colaboradores demonstraram a produção de um fator de necrose tumoral por células de linhagem monocitóide-símile bem como a sua purificação e caracterização (AGGARWAL et al., 1985). Pode-se supor, portanto, que células do tumor em estudo da linhagem fibrohistiocítica, portanto também monocitóide, possam ser responsáveis pela produção

de um fator de necrose ou fator-símile, o qual poderia estar contribuindo para a grande taxa de perda celular e necrose observada no tumor TEGS-2047 ao longo de sua evolução.

3.1.1. INTRODUÇÃO

3.1.1.1. Dependência-dependência em neoplasias malignas

A ideia da dependência hormonal em tumores malignos vem com as observações pioneiras experimentais e clínicas de HUGGINS e seus colaboradores em 1941, em neoplasias de próstata. Esses autores postularam que o metabolismo e proliferação das células tumorais, assim como das células normais, estão sob o controle de uma substância denominada "hormônio" de um órgão. Na prática, eles demonstraram que a remoção do hormônio de tumor, tanto pela remoção de glândulas endócrinas, como pela interferência hormonal (quando hormônios são dados ou retirados), causava regressão temporalmente dependente da proporção de cânceres de próstata (HUGGINS & HODGES, 1941; HUGGINS et al., 1941b).

Um grande número de pesquisas subsequentes confirmou essas ideias, e partir de então, a correlação significativa entre a resposta clínica de tumores com cânceres de próstata e a remoção de hormônios tornou-se evidente.

CAPÍTULO 3

ABORDAGEM FARMACOLÓGICA DO TUMOR TEGS-2047 (Estudo da hormônio-sensibilidade e detecção de substâncias biologicamente ativas no tumor)

Os receptores de androgênio (AR) são proteínas que se ligam a hormônios androgênicos e regulam a expressão gênica. Eles são encontrados em células de próstata e em outros tecidos. A presença de AR em tumores de próstata é um indicador de sensibilidade aos hormônios androgênicos.

3.1 - INTRODUÇÃO

3.1.1 - Hormônio-dependência em neoplasias malignas

A idéia da dependência hormonal em tumores surgiu com as observações pioneiras, experimentais e clínicas de HUGGINS e seus colaboradores em 1941, em neoplasias de próstata. Esses autores postularam que o metabolismo e proliferação das células tumorais, assim como das células normais, das quais elas se originam, dependiam da atividade de um ou mais de um hormônio. Na prática, eles demonstraram que a supressão hormonal do tumor, tanto pela remoção de glândulas endócrinas, como pela interferência hormonal (usando hormônios esteróides ou correlatos), causava regressão temporária numa certa proporção de cânceres de próstata (HUGGINS & HODGES, 1941a; HUGGINS et al., 1941b).

Um grande número de pesquisas semelhantes foram realizadas, a partir de então. A correlação significativa observada entre a resposta clínica das pacientes com câncer de mama à terapêutica endócrina e o conteúdo dos receptores de estrógenos em amostras de seus tumores (McGUIRE et al., 1978) inspirou estudos semelhantes com receptores de andrógenos em neoplasia de próstata (MAINWARING, 1979), receptores de progestágenos em tumores malignos de endométrio (EHRlich et al.,

1978) e receptores de glicocorticóides em várias doenças malignas hematológicas (LIPPMAN et al., 1973). A influência que hormônios esteróides podem exercer sobre a incidência e o prognóstico do melanoma maligno humano, tem também sido pesquisada nos últimos anos (SADDOFF et al., 1973; BELIZÁRIO, 1982).

Mais recentemente demonstrou-se a presença de receptores esteróides androgênicos e de glicocorticóides em alguns sarcomas de partes moles humanos incluindo tumores de natureza fibrosa (CHAUDHURI et al., 1980). No entanto a influência que os hormônios esteróides podem exercer no crescimento desses tumores não tem sido relatada na literatura.

Os vários modelos laboratoriais disponíveis para o estudo da hormônio-dependência no câncer são representados por exemplos de tumores situados, em sua maioria, nos tecidos naturalmente alvo de hormônios (mama, endométrio, hipófise, próstata). Estes tumores vêm sendo mantidos em diferentes espécies de animais de laboratório ou meios de cultura, com diferentes linhagens celulares e alguns são derivados de neoplasias hormônio-dependentes humanas. Nesse sentido, tem-se como importantes os seguintes: i) câncer mamário de rato induzido pelos carcinógenos Dimetilbenzantraceno (DMBA) e 3-metilclorantreno (HUGGINS et al., 1959); ii) câncer mamário transplantável de rato-R-3230AC (HILF et al., 1965; MCGUIRE et al., 1971); iii) câncer mamário de camundongos (RICHARDS et al., 1974; SHYAMALA, 1972); iv) câncer endometrial de rato e

camundongo induzido por DMBA (SEKIYA et al., 1972); v) câncer da hipófise dependente de estrógeno (QUADRI, LU & MAITES, 1972; JORDAN, 1980); vi) adenocarcinoma prostático transplantável de rato (SMOLEV et al., 1977; MARKLAND et al., 1978); vii) câncer renal de hamster (LI, CUTHBERTSON & LI, 1980) e viii) câncer de mama de linhagem celular humana (ex.: MCF7) (ENGEL & YOUNG, 1978).

3.1.2 - Hormônios e outras substâncias humorais produzidas por tumores

Além dos sintomas devidos a massa tumoral ou a invasão, as neoplasias malignas produzem sintomas mediados por hormônios ou outras substâncias humorais. Nos últimos vinte a nos uma grande diversidade de síndromes paraneoplásicas descritas na literatura, tem servido de suporte para esse conceito.

Originalmente, a produção de mediadores químicos por tumores malignos foi considerada rara e se postulou que a sua causa era uma desrepressão da informação genética (LIPSETT et al., 1964). Mais recentemente, tem-se sugerido que to dos os cânceres elaboram proteínas "ectópicas" as quais apenas quando biologicamente ativas são capazes de levar a síndromes reconhecidas (ODELL & WOLFSEN, 1980). Exemplos de substâncias humorais produzidas por tumores malignos incluem hormônios peptídicos, como o Hormônio Liberador de Tireotrofi

na (TRH), a Somatostatina, Vasopressina, Ocitocina, Neurofisina, Adrenocorticotrofina (ACTH), Hormônio Estimulante dos Melanócitos (α -MSH), Tireotrofina (TSH), Hormônio do Crescimento (GH), Bombesina, Neurotensina, Gonadotrofina Coriônica Humana (HCG), Calcitonina, Substância Paratormônio-símile; precursores de hormônios peptídicos como Pro-opiomelanocortina, β -Lipotropina; proteínas fetais como o Antígeno Carcino-Embriônico (CEA) e a alfa-feto-proteína; enzimas tipo a isoenzima fetal da fosfatase alcalina e a timidino-quinase (ODELL & WOLFSEN, 1980, MAURER, 1985). Todos estes fatores humorais têm sido encontrados em indivíduos portadores do carcinoma de pequenas células do pulmão (MAURER, 1985).

Por outro lado, são numerosas as evidências existentes, relacionando prostaglandinas com câncer. Prostaglandinas da série PGE têm sido encontradas em vários tumores experimentais espontâneos ou induzidos, sólidos ou ascíticos (SYKES & MADDOX, 1972). TASHJIAM e colaboradores estudando dois tumores experimentais, o fibrossarcoma transplantável de camundongos (HSDM1) e o carcinoma VX2 de coelhos, verificaram uma relação direta entre a hipercalcemia detectada nos animais e um aumento da concentração plasmática de prostaglandinas, a qual era detectada após o implante do tumor (TASHJIAM et al., 1978). Produção de prostaglandinas tem também sido demonstrada em vários tumores humanos, incluindo, adenocarcinomas pulmonares, tumores de esôfago, cervicais e de parótida (ROBERTSON et al., 1976), bem como tumores malignos e benignos da ma-

ma (MALACHI et al., 1981).

A presença de ácidos graxos saturados e insaturados, bem como de prostaglandinas das séries E e F no tumor fibrohistiocítico (tumor TEGS-2047), descrito nos capítulos anteriores, foi demonstrada recentemente em nosso laboratório (TROMPIERI, 1984).

Em adição, tem-se mostrado a associação de síndrome carcinóide com hiperserotoninemia e/ou aumento da excreção urinária de ácido 5-hidroxi-indol acético em pacientes portadores de neoplasia pulmonar do tipo "Oat cell carcinoma" (MENGEL, 1982; HORAI et al., 1973).

3.3.3 - Fatores endógenos reguladores do crescimento de células normais e/ou malignas

Segundo IVERSON, os reguladores endógenos do crescimento celular podem ser classificados em estimulatórios, inibitórios e moduladores (IVERSON, 1985). Exemplos típicos de fatores reguladores estimulatórios são os hormônios tróficos (hormônio tireoidiano, cortisona, estrôgeno, etc.), o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de crescimento do nervo (NGF) (KOROLY & YOUNG, 1981; CARPENTER, 1981; IVERSON, 1985). Alguns pesquisadores têm referido a existência de outros estimuladores como o fator de crescimento derivado da plaqueta (PDGF) (ROSS, 1981) e os fatores estimuladores de colônia (CSF) para granulócitos, eosinófilos e células da linha

gem eritrocitária e megacariocítica (METCALF, 1981). Em alguns tecidos, e especialmente em tumores, registra-se a presença de fatores angiogênicos (FOLKMAN et al., 1971; GULLINO, 1981) que estimulam o crescimento de células endoteliais e capilares.

BULLOUCH, em 1967 deu o nome de "Chalons" aos reguladores endógenos inibitórios do crescimento celular. No entanto, tal conceito não parece ter aceitação universal (IVERSON, 1985). No sistema hematopoético, por exemplo, muitas substâncias (prostaglandinas, fator inibidor de colônia derivado do neutrófilo, inibidores séricos, inibidores leucêmicos, supressores imunes e lactoferrina) embora tidas como inibidoras da proliferação celular não, têm sido reconhecidas como chalons por alguns pesquisadores (FITCHE, 1981). Mais de vinte anos de pesquisa de chalons não tem levado, entretanto à síntese e purificação de substâncias deste tipo. Apenas recentemente registrou-se a provável purificação de uma chalona granulocítica composta de cinco aminoácidos (IVERSON, 1985).

Com relação aos fatores endógenos de regulação do crescimento tidos como moduladores, tem-se sugerido que alguns hormônios, especialmente os glicocorticóides, podem possivelmente receber tal denominação (IVERSON, 1985).

CARSWELL e colaboradores, em 1975, reportaram que o soro de camundongos, ratos e coelhos previamente infectados com *Mycobacterium bovis* cepa Bacillus Calmette-Guérin (BCG) e

subsequentemente tratados com endotoxina, causou necrose hemorrágica de vários tumores em camundongos sem efeito aparente sobre o hospedeiro. O composto responsável por essa atividade do soro foi chamado de Fator de Necrose Tumoral (TNF) (AGGARWAL et al., 1985). Posteriormente foi demonstrado que tal fator apresenta atividade citostática e citocida em várias linhagens de células malignas em cultura, porém sem nenhuma atividade em células normais humanas, de coelho e galinha, nas mesmas condições (AGGARWAL et al., 1985; ABE et al., 1985).

A purificação desses fatores de necrose, a partir de tecidos humanos e de coelhos, tem demonstrado que eles são de natureza protéica e que apresentam grande semelhança estrutural com outras linfocinas e linfotoxinas já descritas (AGGARWALL et al., 1985).

Tem sido proposto que os macrófagos são a principal fonte de produção desses fatores de necrose. Tal observação tem sido confirmada por estudos "in vitro", usando populações celulares enriquecidas com macrófagos (MATTHEWS, 1978), bem como pela detecção da produção do fator por células malignas de linhagem monocitóide (AGGARWALL et al., 1985). Pode-se supor, portanto, que tumores sólidos da linhagem histiocítica podem também ser produtores de fator de necrose tumoral (TNF) ou de outros fatores de natureza protéica.

3.1.4 - Objetivos

Tendo como base algumas das observações descritas a cima, procurou-se neste capítulo abordar do ponto de vista farmacológico, o tumor TEGS-2047 de natureza fibro-histiocítica, conforme demonstrado no capítulo 1. Para tanto resolveu-se estudar dois aspectos:

- 1) A influência do sexo, da gonadectomia e do tratamento com hormônios esteróides no desenvolvimento do citado tumor e,
- 2) Detectar a presença de substâncias biologicamente ativas na neoplasia.

3.2 - MATERIAL

3.2.1 - Animais experimentais

Foram usados:

- Ratos albinos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, de ambos os sexos, com peso médio de 120 gramas, com 30 a 50 dias de nascidos, provenientes da colônia do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Todos os ratos foram mantidos em gaiolas de plástico com grade de arame de aço inoxidável na parte superior, recebendo água "ad libitum" e ração balanceada coelhex-CBR.

- Cobaias albinos (*Cavia porcellus*), de ambos os sexos, com peso variável entre 300 e 400 gramas, provenientes do Biotério do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

3.2.2 - Soluções fisiológicas

Os sais utilizados no preparo das soluções fisiológicas foram de pureza analítica (MERCK). Todas as concentrações foram expressas em "milimolar".

- Solução salina: NaCl 154

- Solução Tampão Tris- HCl 0,05M, pH 7,5
- Solução de Tyrode: NaCl 136; KCl 2,68; CaCl_2 1,8; MgCl_2 0,92; NaH_2PO_4 0,36; NaHCO_3 11,9; glicose 5,5
- Solução de Jalon: NaCl 154; KCl 5,3; CaCl_2 0,6; NaH_2PO_4 0,3; NaHCO_3 6,9; glicose 2,7

3.2.3 - Drogas

- Acetato de Medroxiprogesterona (FARLUTAL-AD 500).
Farmitalia Carlo Erba S/A
- Ácido acetil salicílico (ENDOSPRIN)-Lab. anila.
Solução a 200mg/ml
- Bradicinina - sintetizada pelo Prof. A.C.M.Paiva.
Escola Paulista de Medicina - SP
- Benzoato de Estradiol - (BENZOGINOESTRIL AP) -
Lab. Sarsa)
- Cloranfenicol (SINTOMICETINA-Lepetit-Sol.100mg/ml
- Cloreto de acetilcolina - Sigma Chemical Co.
- Cloridrato de ciproheptadina - Sandoz - Brazileia
- Cloridrato de Difenidramina (BENADRYL) - Sigma
Chemical Co.
- Diidrocloreto de Histamina - Sigma Chemical Co.
- Dietilestilbrestrol - Sigma Chemical Co.
- 5.Hidroxitriptamina (5HT) - Sigma Chemical Co.
- Propionato de Testosterona - (DURATESTON) - Lab.

ORGANON DO BRASIL LTDA.

- Sulfato de Atropina - Sigma Chemical Co.
- Tripsina e Quimotripsina - Worthington Biochemical Corp. Peptides.

3.2.4 - Reagentes e corantes

- Acetona - MERCK
- Ácido clorídrico - MERCK
- Álcool etílico - HERZOG
- Éter etílico - REAGEN
- Metanol - REAGEN

3.2.5 - Aparelhagem

- Balança, Metler modelo P₃
- Medidor de pH, Metron
- Autoclave - Fabber
- Centrífuga - BECKMAN modelo J-21C
- Fisiógrafo Desk modelo DMP-4B
- Quimógrafo E Zimmermann - Leipzig
- Banho-Maria, SOC - Fabber Ltda.
- Estufa de secagem e esterilização, FANEM, modelo 315 SE

3.2.6 - Materiais diversos

- Homogeneizador manual de POTTER
- Pipetas e provetas, PYREX
- Placas de Petri do tipo bacteriológico, PYREX
- Becher de 10,50 e 100ml, PYREX
- Material cirúrgico: pinça, bisturi, tesoura, trocarter
- Luvas cirúrgicas
- Lâminas e lamínulas

3.3 - MÉTODOS

3.3.1 - Estudo da dependência hormonal

3.3.1.1 - Influência do sexo

Utilizaram-se 40 ratos Wistar com peso médio de 120g de ambos os sexos. Os animais foram divididos em 2 grupos de 20.

O grupo I, formado por ratos machos e o Grupo II, por fêmeas, receberam o inóculo tumoral, de acordo com a descrição do capítulo 1. Fêz-se o acompanhamento desses animais durante 27 dias. Assim, a cada 3 dias eles eram pesados e os diâmetros dos seus respectivos tumores eram medidos com paquímetro, para cálculo dos volumes tumorais de acordo com a fórmula descrita por STEEL, 1977. Após o sacrifício dos animais foram retirados o fígado, o baço e o tumor, os quais foram pesados em balança analítica. Curvas de crescimento foram preparadas colocando-se os volumes tumorais, em escala semilogarítmica, contra o tempo após o transplante.

3.3.1.2 - Influência da gonadectomia e do tratamento com hormônios esteróides

a) Castração dos animais (Orquidectomia)

Os ratos foram anestesiados com éter etílico e colocados em decúbito dorsal com as patas presas numa mesa cirúrgica. Após a localização dos testículos na bolsa escrotal, foi feita uma incisão, com tesoura, na pele entre os dois testículos. A seguir, os tecidos que envolvem os testículos foram divulsionados com tesoura até atingir a túnica vaginalis. Por compressão, os testículos e os cordões espermáticos, de cada lado, foram expostos totalmente e a seguir após ligadura no cordão espermático com fio de algodão, foram removidos. A pele da bolsa escrotal foi suturada com fio de algodão.

b) Tratamento com Testosterona

Trinta ratos Wistar machos foram inoculados com o tumor pela técnica já descrita (Ver capítulo 1) e divididos em 3 grupos de 10, assim distribuídos:

Grupo C T₁: Animais castrados e tratados diariamente com propionato de testosterona, 300 µg/100g de peso, em solução oleosa, por via subcutânea, durante 14 dias.

Grupo CN T₁: Animais castrados e injetados diariamente com 0,2ml de óleo de algodão, por via subcutânea, por 14 dias.

Grupo C₁: Animais controle, não castrados e também injetados com 0,2ml de óleo de algodão por via subcutânea, diariamente durante 14 dias.

Os animais foram pesados de 3 em 3 dias e sacrificados, por deslocamento da coluna cervical, no 15º dia e seus respectivos tumores excisados, pesados e mensurados com paquímetro. Os volumes tumorais foram calculados de acordo com a fórmula proposta por STEEL, 1977. Os animais foram castrados 30 dias antes do transplante tumoral. De cada animal, retirou-se a próstata, a vesícula seminal o fígado e o baço os quais foram avaliados quanto aos seus pesos.

c) Tratamento com Acetato de medroxiprogesterona (MPA)

Trinta ratos Wistar machos foram inoculados com o tumor conforme descrição anterior (Ver capítulo 1) e divididos em 3 grupos de 10, assim distribuídos:

Grupo C T₂: Animais castrados e inoculados diariamente com MPA, 100mg/kg/peso, em solução aquosa, por via intraperitoneal durante 21 dias. Os animais deste grupo receberam tratamento prévio com Benzoato de Estradiol (100µg/100g de peso) por via subcutânea, diariamente por 04 dias, para estímulo da síntese de receptores progestínicos (FORMELLI et al., 1982).

Grupo CN T₂: Animais castrados e inoculados diariamente com 0,2ml de solução salina, por via intraperitoneal durante 21 dias.

Grupo C₂: Animais controle, não castrados e também

inoculados com 0,2ml de solução salina por via intraperitoneal durante 21 dias.

Os animais foram acompanhados por 21 dias, sendo pesados a cada 3 dias. Foram sacrificados no 22º dia por deslocamento da coluna cervical e a seguir avaliados conforme a descrição do item anterior. Entretanto, não avaliou-se neste experimento os pesos das próstatas e vesículas seminais dos animais experimentais.

3.3.2 - Detecção de substâncias biologicamente ativas no tumor

3.3.2.1 - Método de extração

O método de extração inicial tentado, visou o uso de solventes menos e mais polares. Para tanto, escolheu-se o procedimento descrito por LEEMAN & HAMMERSCHLAG na extração da substância P (CHANG & LEEMAN, 1970), como referencial, introduzindo algumas modificações (Ver Fig. 3.1). A sequência, para cada extração foi a seguinte:

1) Dois animais portadores do tumor TEGS-2047 com 14 dias de evolução, eram sacrificados por deslocamento da coluna cervical, sendo seus tumores excisados e colocados em placa de Petri sobre uma bandeja de aço inoxidável contendo gelo.

2) A seguir, as amostras tumorais eram fragmentadas com auxílio de pinça e tesoura e pesadas. O material era então homogeneizado por 30 minutos em acetona, ou metanol ou eta

nol na proporção de 9ml para cada grama de tumor.

3) Utilizou-se, neste procedimento, um homogeneizador manual de Potter, o qual durante o processo permanecia em uma caixa de isopor contendo gelo picado.

4) A seguir, o homogenato resultante, era deixado em repouso por 1 hora ou 24 horas e, em seguida, submetido a centrifugação, a 15.000 rpm por 30 minutos, a 4°C.

5) Ao final da centrifugação, recolhia-se a fração sobrenadante solúvel, desprezando-se a fração precipitada. O material recolhido era, imediatamente, transferido para placas de Petri, previamente pesadas, e secadas a vapor frio, utilizando-se secador de cabelos convencional.

6) Após a total evaporação do solvente, as placas eram novamente pesadas. A diferença dos pesos correspondia, portanto, à quantidade de material extraído, o qual era resuspenso em solução Tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,5 (1ml de tampão para cada 3mg de material).

7) A seguir, o material extraído era ensaiado nas preparações biológicas descritas abaixo.

3.3.2.2 - Atividade do material biológico em preparações biológicas

3.3.2.2.1 - Útero isolado de rata

Foi utilizado o método de HOLTON (1948). Ratas vir

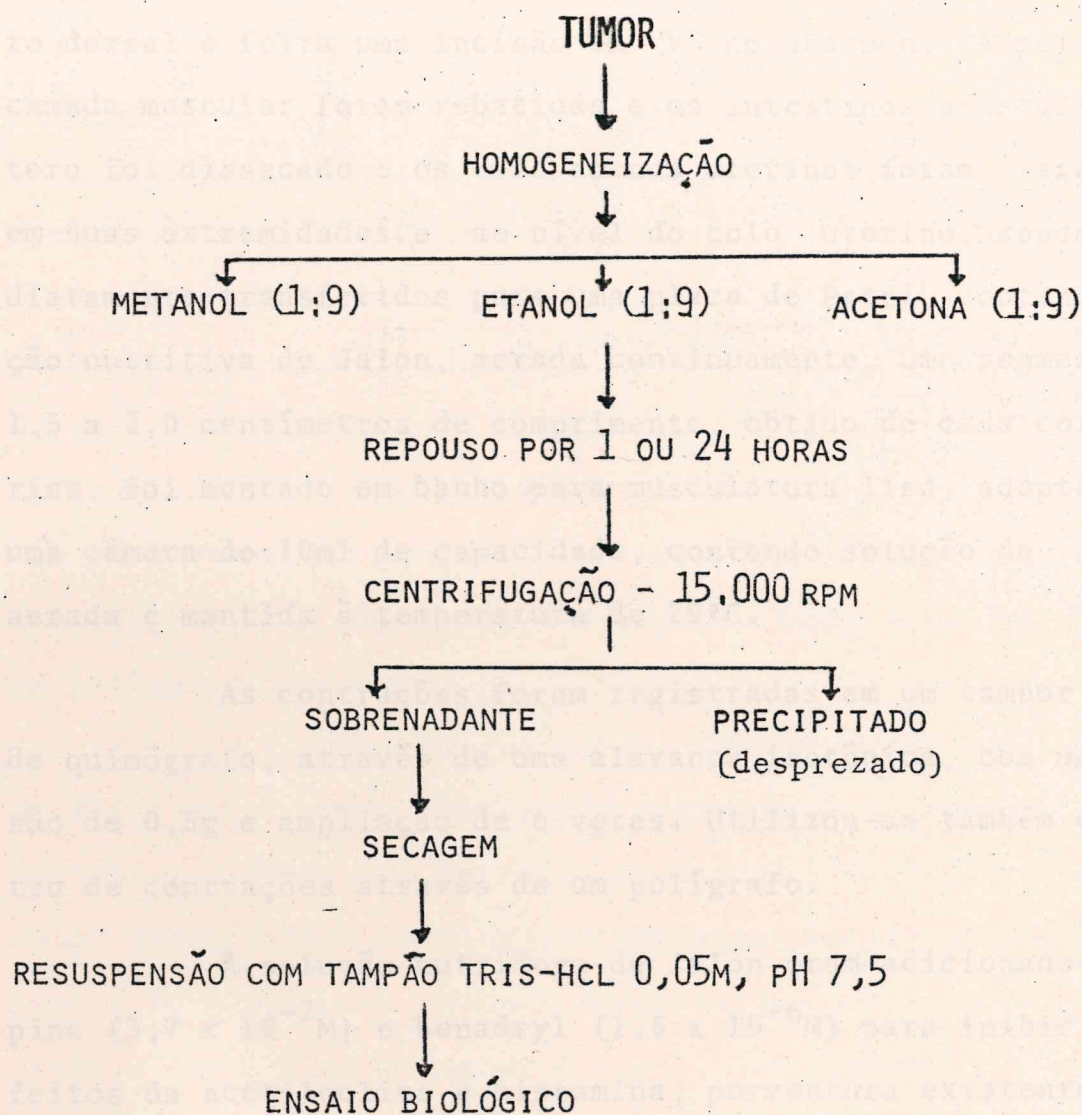


FIGURA 3.1 - Método de extração de material biológico a partir de amostras do tumor TEGS-2047

gens, com peso em torno de 150g, estrogenizadas 18 horas antes com Dietilestilbestrol (0,1mg/100g de peso), por via intraperitoneal, foram sacrificadas e colocadas em posição de decúbito dorsal e feita uma incisão em "V" no abdomen. A pele e a camada muscular foram rebatidas e os intestinos afastados. O útero foi dissecado e os dois cornos uterinos foram afastados em suas extremidades e ao nível do colo uterino, sendo imediatamente transferidos para uma placa de Petri, contendo solução nutritiva de Jalon, aerada continuamente. Um segmento de 1,5 a 2,0 centímetros de comprimento, obtido de cada corno uterino, foi montado em banho para musculatura lisa, adaptado a uma câmara de 10ml de capacidade, contendo solução de Jalon, aerada e mantida à temperatura de 29°C.

As contrações foram registradas em um tambor móvel de quimógrafo, através de uma alavanca isotônica, com uma tensão de 0,5g e ampliação de 6 vezes. Utilizou-se também o registro de contrações através de um polígrafo.

A solução nutritiva de Jalon eram adicionados atropina ($3,7 \times 10^{-7}M$) e benadryl ($1,5 \times 10^{-6}M$) para inibir os efeitos da acetilcolina e histamina, porventura existentes no "material biológico" a ser testado.

O tecido permaneceu em repouso por 30 minutos para estabilização, sendo, em seguida, registradas respostas contráteis para o "material extraído do tumor" e demais drogas ensaiadas (Bradicinina, 5-Hidroxitriptamina, Ciproheptadina).

3.3.2.2.2 - Íleo isolado de cobaia

Nesta preparação utilizou-se o método de MAGNUS (1904). Cobaias de ambos os sexos (300-400g) foram privadas de alimentos por 48 horas. Para cada ensaio, um animal era sacrificado e colocado em posição de decúbito dorsal e feita uma incisão no abdomen. A porção terminal do íleo foi retirada, lavada com solução de Tyrode e montada em um banho para musculatura lisa, onde foi adaptada uma cânula de vidro contendo 10ml de solução Tyrode, aerada continuamente à temperatura de 37°C. As contrações foram registradas em um tambor móvel de quimógrafo, através de uma alavanca isotônica, com uma tensão de 0,5g e ampliação de 6 vezes. As contrações também foram registradas em polígrafo, em alguns experimentos.

O tecido permaneceu em repouso por 30 minutos para estabilização, sendo em seguida registradas respostas contraísseis para o "material extraído do tumor" e demais drogas utilizadas (Bradicinina, 5-Hidroxitriptamina, Ciproheptadina). Atropina e Benadryl, nas mesmas concentrações descritas no item anterior, foram acrescentadas à solução de Tyrode.

3.3.2.3 - Caracterização farmacológica do material biológico

3.3.2.3.1 - Tratamento com Ácido-Acetil-Salicílico (AAS)

Seis animais machos, inoculados com o tumor conforme descrição anterior, foram tratados, a partir do primeiro

dia do inóculo tumoral, com injeções intraperitoneais diárias de AAS (Endosprin), na dose de 10mg/kg/peso corporal, por 14 dias. No 15º dia, os animais foram sacrificados para extração de material biológico, a partir dos seus tumores (Ver item 3.3.3.). O tratamento objetivou inibir a síntese de prostaglandinas pelo tumor. O material extraído era então testado nas preparações biológicas já descritas.

3.3.2.3.2 - Tratamento com Testosterona

Dezoito ratos Wistar machos foram inoculados com o tumor pela técnica já descrita (Ver capítulo 1) e divididos em 3 grupos de 6, assim distribuídos:

Grupo I: Animais castrados 30 dias antes do início do experimento e tratados diariamente com pro-pionato de testosterona, 300µg/100g de peso, em solução oleosa, por via subcutânea, durante 14 dias.

Grupo II: Animais castrados e injetados diariamente com 0,2ml de óleo de algodão, por via subcutânea, por 14 dias.

Grupo III: Animais controle, não castrados e também inoculados com 0,2ml de óleo de algodão, por via subcutânea, diariamente, durante 14 dias.

Os animais foram sacrificados no 15º dia, por deslo

camento da coluna cervical e seus respectivos tumores excisados e pesados. A seguir, procedeu-se a extração de substâncias biologicamente ativas conforme descrição anterior (Ver item 3.3.2), para em seguida realizar-se os testes nas preparações biológicas escolhidas (Ver item 3.3.3).

3.3.2.3.3 - Determinação da atividade de enzimas proteolíticas sobre o material biológico extraído do tumor
TEGS-2047

Realizaram-se ensaios enzimáticos utilizando preparações biológicas para medida de atividade residual dos incubados contendo o material biologicamente ativo e a enzima. Nesse sentido, as enzimas empregadas foram: tripsina e quimotripsina, ambas na dose de 400 μ g (3mg/ml). As condições de incubação foram as mesmas para as duas enzimas, isto é, Tampão Tris-HCl 0,05M pH 7,5 contendo 0,1M de NaCl e temperatura mantida a 37°C. Alíquotas de 0,4ml do incubado foram retiradas aos 15, 30 e 60 minutos de incubação e ensaiadas em útero isolado de rata.

3.3.7 - Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm E.P. A significância estatística dos dados foi calculada aplicando-se o teste "t" de Student não pareado. Quando necessário os

valores eram submetidos a análise de variância (SNEDECOR & COCHRAN, 1973). As diferenças eram consideradas significantes a $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,005$.

3.4.1 - Estudo da dependência hormonal do tumor

3.4.1.1 - Efeito do sexo

Os valores relativos aos volumes tumorais de ratos machos e fêmeas, obtidos ao longo dos 27 dias experimentais, bem como os pesos finais dos tumores no dia do sacrifício dos mesmos, encontram-se na Tabela III.1. A curva de crescimento do tumor, construída a partir destas dados e apresentada na Fig. 3.2.

Observa-se que, nos machos, os volumes tumorais apresentam valores maiores em todos os dias experimentais, entanto, a significância estatística ($p < 0,05$) foi demonstrada em apenas 4 dias (9º, 9º, 11º e 24º). Os pesos tumorais observados no último dia de experimento (27º dia) foram significativamente superiores ($p < 0,01$) nos animais machos em relação às fêmeas.

3.4.1.2 - Efeito da gonadectomia

Antes da realização da gonadectomia, os animais foram tratados com Propionato de Testosterona.

Os resultados obtidos no dia 27º de experimento são apresentados na Tabela III.2.

3.4 - RESULTADOS

3.4.1 - Estudo da dependência hormonal do tumor TEGS-2047

3.4.1.1 - Efeito do sexo

Os valores relativos aos volumes tumorais de ratos machos e fêmeas, obtidos ao longo dos 27 dias experimentais, bem como os pesos finais dos tumores no dia do sacrifício dos mesmos, encontram-se na Tabela III.1. A curva de crescimento do tumor construída a partir destes dados é apresentada na Fig. 3.2.

Observa-se que, nos machos, os volumes tumorais apresentam valores maiores em todos os dias experimentais. No entanto, significância estatística ($p < 0,01$) foi demonstrada em apenas 4 dias (6º, 9º, 12º e 24º). Os pesos tumorais, observados no último dia do experimento (27º dia) foram significativamente superiores ($p < 0,01$) nos animais machos em relação às fêmeas.

3.4.1.2 - Efeito da gonadectomia associada ou não ao tratamento com Propionato de Testosterona

Os resultados encontram-se na Fig. 3.3 e na Tabela

TABELA III.1 - Valores médios dos volumes e pesos do tumor TEGS-2047 inoculado em ratos Wistar machos e fêmeas. Os dados dos volumes tumorais foram utilizados para a obtenção da curva de crescimento do tumor. Os resultados estão expressos em média \pm E.P.

Dias após o transplante	Volume tumoral (cm ³)		Peso final do tumor (g)		Nº de animais	
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
3	0,714 $\pm 0,106$	0,524 $\pm 0,119$	-	-	19	17
6	2,906 ^{**} $\pm 0,367$	1,58 $\pm 0,178$	-	-	20	17
9	4,97 ^{**} $\pm 0,549$	2,638 $\pm 0,25$	-	-	18	17
12	10,056 ^{**} $\pm 0,978$	6,729 $\pm 0,86$	-	-	18	15
15	17,89 $\pm 3,114$	13,07 $\pm 1,83$	-	-	18	15
18	23,22 $\pm 3,925$	16,548 $\pm 2,139$	-	-	18	15
21	38,98 $\pm 4,468$	27,34 $\pm 7,31$	-	-	17	14
24	51,1 ^{**} $\pm 6,79$	30,98 $\pm 3,89$	-	-	15	14
27	52,75 $\pm 7,10$	39,37 $\pm 6,07$	44,3 ^{**} $\pm 7,35$	37,8 $\pm 4,58$	14	13

Teste "t" de Student

(**) $p < 0,01$

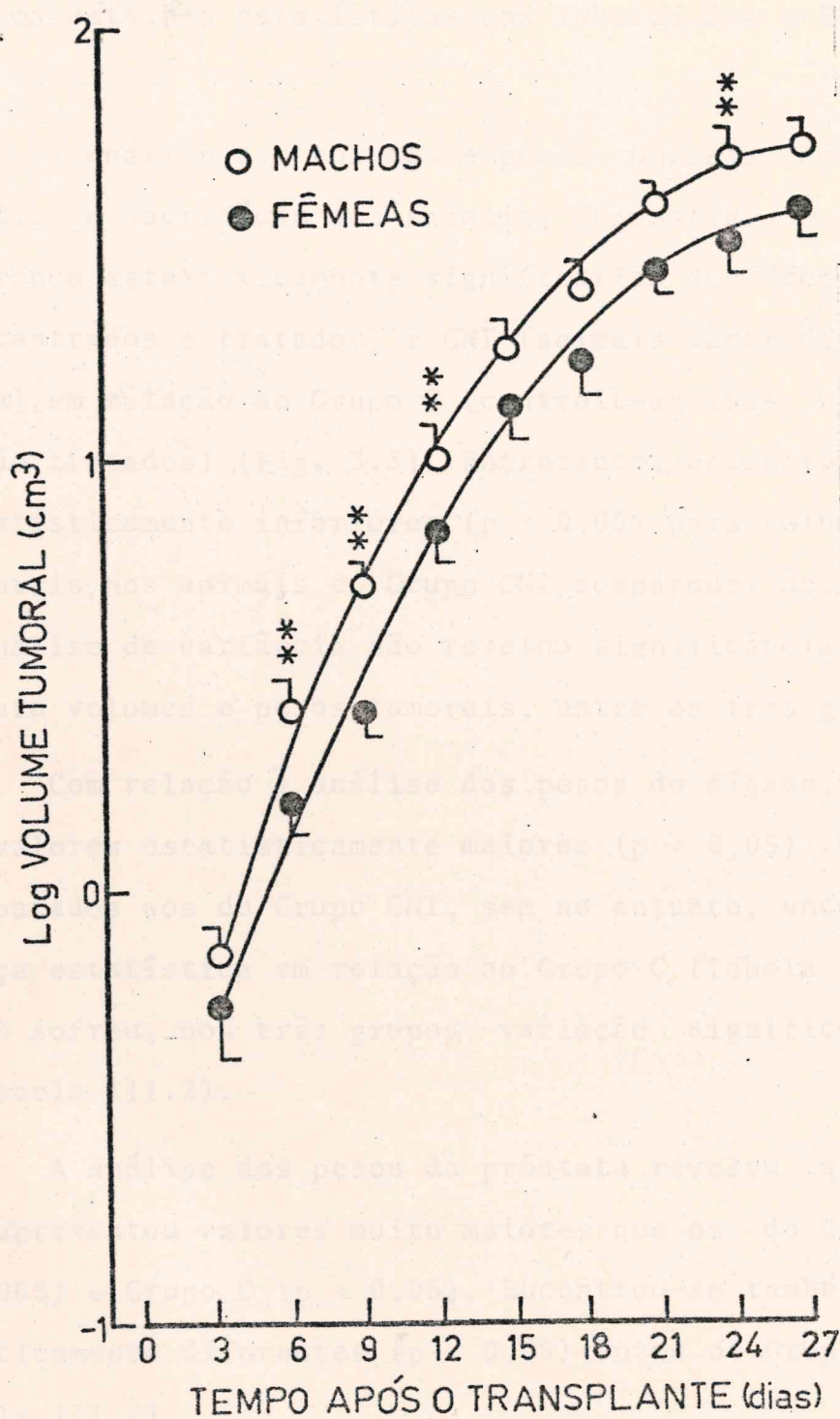


FIGURA 3.2. - Curva de crescimento comparativo do tumor TEGS-2047 inoculados em ratos Wistar machos e fêmeas. (**) $p < 0,01$ - Teste "t" de Student. Os dados relativos a cada ponto encontram-se na Tabela III.1.

III.2 e os detalhes estatísticos nas Tabelas 3-A e 3-B (anexo).

A análise dos volumes e pesos tumorais, ambos medidos no dia do sacrifício dos animais, demonstra que não houve diferença estatisticamente significativa dos Grupos CT (animais castrados e tratados) e CNT (animais castrados e não tratados), em relação ao Grupo C (controle-animais não castrados e não tratados) (Fig. 3.3). Entretanto, encontrou-se valores estatisticamente inferiores ($p < 0,05$) para volumes e pesos tumorais, nos animais do Grupo CNT comparados aos do Grupo CT. A análise de variância não revelou significância estatística, para volumes e pesos tumorais, entre os três grupos.

Com relação à análise dos pesos do fígado, verificou-se valores estatisticamente maiores ($p < 0,05$) no Grupo CT, comparados aos do Grupo CNT, sem no entanto, encontrar-se diferença estatística em relação ao Grupo C (Tabela III.2). O baço não sofreu, nos três grupos, variação significativa de peso (Tabela III.2).

A análise dos pesos da próstata revelou que o Grupo CT apresentou valores muito maiores que os do Grupos CNT ($p < 0,005$) e Grupo C ($p < 0,05$). Encontrou-se também valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$), entre os Grupos CNT e C (Tabela III.2).

Quanto à vesícula seminal, observou-se que, à semelhança da próstata, no Grupo CT houve aumento significativo

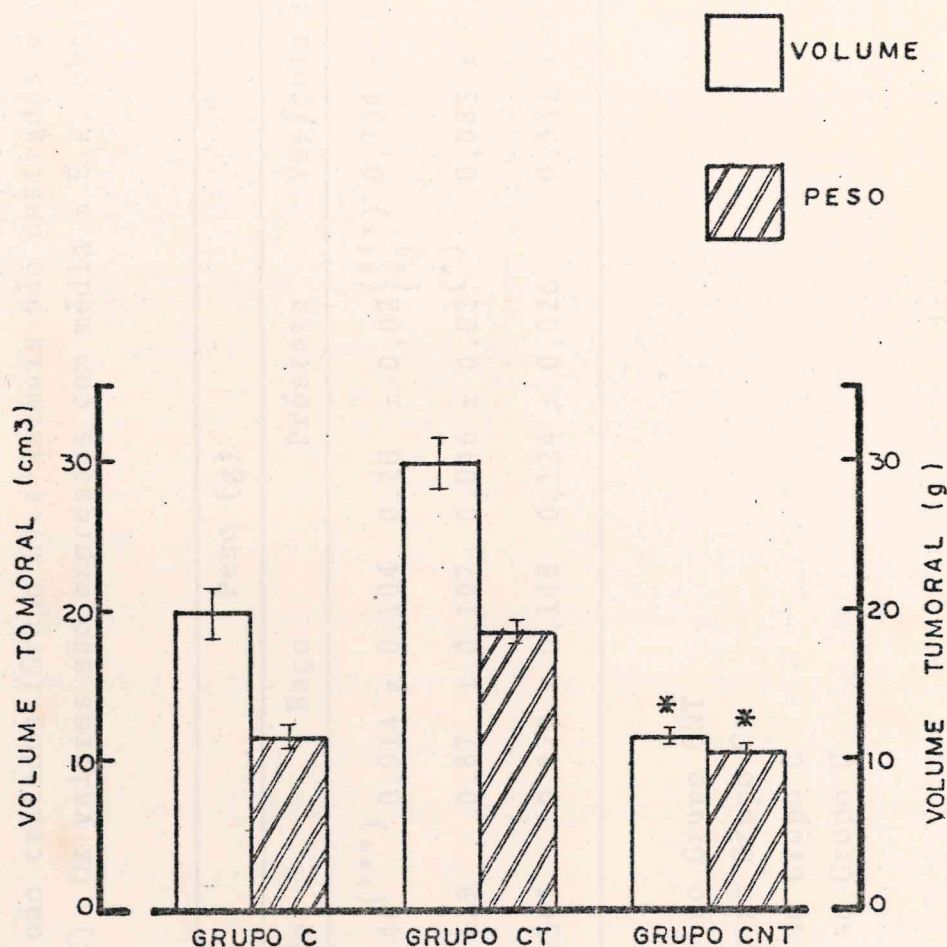


FIGURA 3.3 - Efeitos no volume e peso tumorais de ratos machos inoculados com o tumor TEGS-2047, castrados e tratados com Propionato de Testosterona (Grupo CT) ou, castrados sem tratamento (Grupo CNT) e não castrados e não tratados (Grupo C - controle). Os resultados estão expressos em média \pm E.P.

(*) Teste "t" de Student - $p < 0,05$, em relação ao Grupo CT.

TABELA III.2 - Pesos médios do fígado, baço, próstata e vesícula seminal de animais castrados e tratados com Propionato de Testosterona (Grupo CT), animais castrados e não tratados (Grupo C) e animais não castrados e não tratados (Grupo C). Os valores são expressos com média \pm E.P. obtidos de 8 animais

Grupo observado	Peso (g)			
	Fígado	Baço	Próstata	Vesícula seminal
GRUPO CT	$8,37 \pm 0,48^{(***)}$	$0,914 \pm 0,104$	$0,20 \pm 0,02^{(***)}$	$0,734 \pm 0,076^{(***)}$
GRUPO CNT	$6,58 \pm 0,129$	$0,87 \pm 0,107$	$0,046 \pm 0,02^{(*)}$	$0,085 \pm 0,049^{(**)}$
GRUPO C	$7,002 \pm 0,303$	$0,879 \pm 0,148$	$0,124 \pm 0,026$	$0,331 \pm 0,07$

Teste "t" de Student

(***) $p < 0,005$, em relação ao Grupo CNT

{***} $p < 0,005$, em relação ao Grupo C

(**) $p < 0,01$, em relação ao Grupo C

(*) $p < 0,05$, em relação ao Grupo C

de peso em relação aos grupos C ($p < 0,005$) e CNT ($p < 0,005$), bem como diferença estatística ($p < 0,01$) destes dois últimos entre si (Tabela III.2).

3.4.1.3 - Efeito da gonadectomia associada ou não ao tratamento com Acetato de Medroxiprogesterona (MPA)

Os resultados são mostrados na Fig. 3.4 e na Tabela III.3 e os detalhes estatísticos nas Tabelas 3-C e 3-D (anexo).

A análise dos volumes e pesos dos tumores mensurados no dia do sacrifício dos animais, mostra que não houve diferença estatisticamente significativa dos grupos CT (animais castrados e tratados) e CNT (animais castrados e não tratados), em relação ao Grupo C (controle-animais não castrados e não tratados). (Fig. 3.4). Entretanto, encontrou-se valores estatisticamente inferiores para volumes ($p < 0,05$) e pesos ($p < 0,01$) tumorais, nos animais do Grupo CNT comparados aos do Grupo CT. A análise de variância não revelou significância estatística para volumes e pesos tumorais, entre os três grupos estudados (Tabelas 3-C e 3-D - anexo).

Os pesos do fígado e baço dos animais do Grupo CT, mostraram valores significantemente maiores ($p < 0,05$) que os do Grupo C, sem no entanto, revelarem diferenças detectáveis estatisticamente, com relação ao Grupo CNT (Tabela III.3).

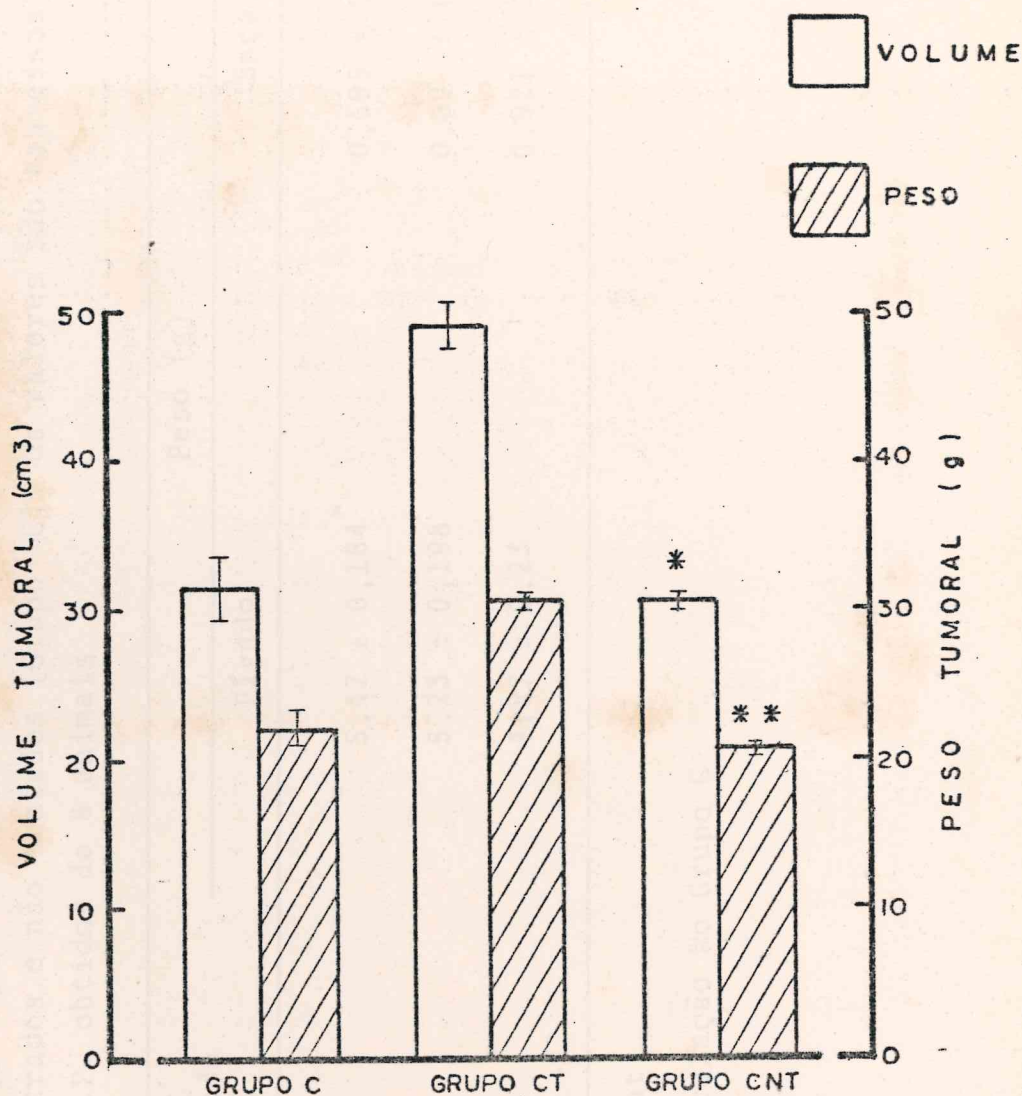


FIGURA 3.4 - Efeitos no volume e peso tumorais de ratos machos inoculados com o tumor TEGS-2047, castrados e tratados com acetato de medroxiprogesterona (Grupo CT), castrados sem tratamento (Grupo CNT) e não castrados e não tratados (Grupo C - controle). Os resultados estão expressos em média \pm E.P. obtidos de 8 animais. Teste "t" de Student. (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$.

TABELA III.3 - Pesos médios do fígado e baço de animais castrados e tratados com MPA (Grupo CT), animais castrados e não tratados (Grupo CNT) e animais não castrados e não tratados (Grupo C). Os valores são expressos como média \pm E.P. obtidos de 8 animais

Grupo observado	Peso (g)	
	Fígado	Baço
GRUPO CT	5,47 \pm 0,184 [*]	0,595 \pm 0,075 [*]
GRUPO CNT	5,23 \pm 0,198	0,69 \pm 0,058
GRUPO C	4,87 \pm 0,23	0,921 \pm 0,119

Teste "t" de Student

(*) $p < 0,05$, em relação ao Grupo C

2.4.2 - Efeito do extrato tumoral em preparações biológicas "in vitro"

3.4.2.1 - Útero isolado de rata

A adição dos extratos metanólicos e/ou acetônicos obtidos do tumor TEGS-2047 (0,3 ou 0,6 ou 1,2 mg/ml) produziu respostas contráteis dose dependentes no útero isolado de rata, em todos os ensaios realizados (Gigs. 3.5, 3,6 e 3.7). Entretanto, a adição do extrato etanólico obtido do tumor, não produziu contrações no útero isolado de rata em alguns ensaios e em outros levou a respostas contráteis insignificantes e estatisticamente inferiores às aquelas provocadas pelos extratos metanólicos e acetônicos ($p < 0,005$). Estes últimos não apresentaram diferenças significativas entre si. As respostas contráteis foram comparáveis às provocadas pela bradicinina ($1,15 \times 10^{-5}M$, $2,3 \times 10^{-5}M$ e $4,6 \times 10^{-5}M$) nesta mesma preparação biológica.

3.4.2.2 - Íleo isolado de cobaia

Os resultados encontram-se nas Figs. 3.8 e 3.9.

No íleo isolado de cobaia, a incubação do extrato metanólico ou acetônico (0,3 a 1,2 mg/ml) no líquido do banho, levou a respostas contráteis proporcionais à dose utilizada e comparáveis às provocadas pela bradicinina ($2,3 \times 10^{-5}M$, $4,6 \times$

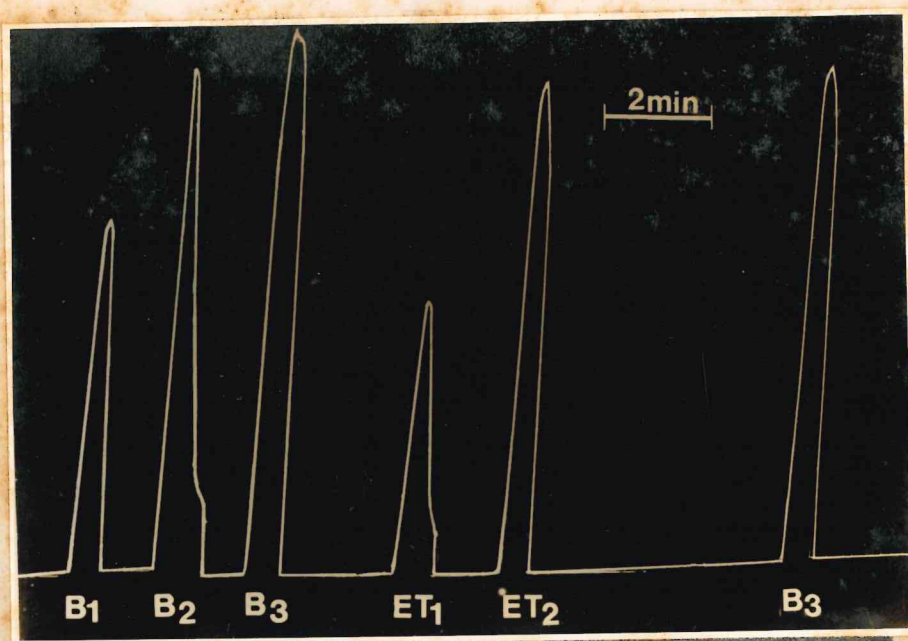


FIGURA 3.5 - Efeito do material biologicamente ativo presente no extrato metanólico do tumor TEGS-2047, no útero isolado de rata.

B₁ - Bradicinina ($1,15 \times 10^{-5} \text{M}$)

B₂ - Bradicinina ($2,3 \times 10^{-5} \text{M}$)

B₃ - Bradicinina ($4,6 \times 10^{-5} \text{M}$)

ET₁ - Extrato tumoral (0,3 mg/ml)

ET₂ - Extrato tumoral (0,6 mg/ml)

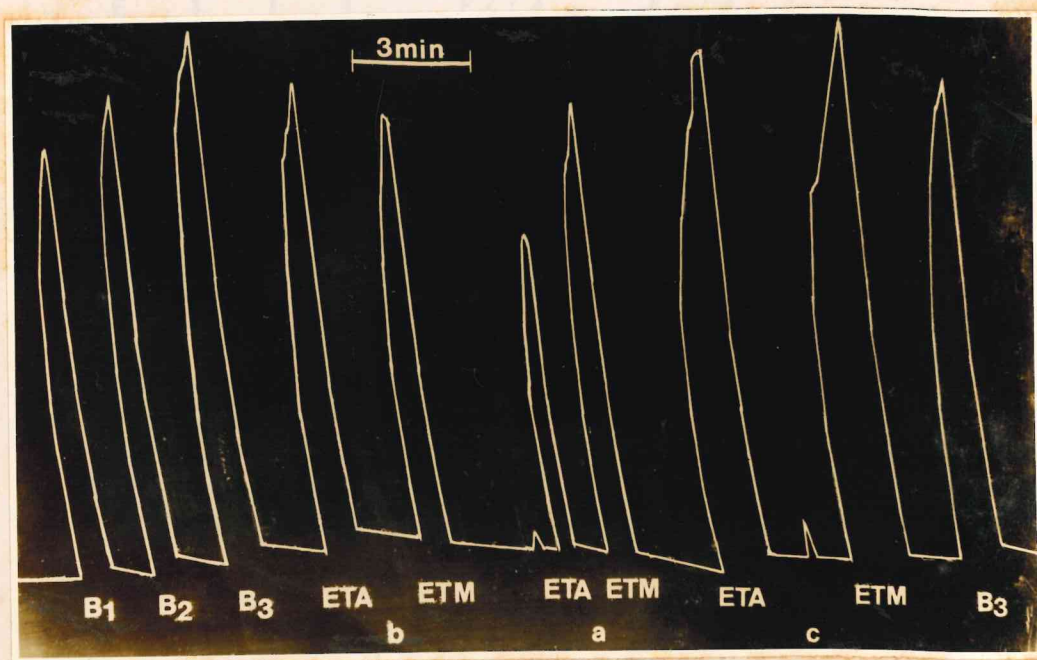


FIGURA 3.6 - Efeito do material biologicamente ativo presente no extrato metanólico (ETM) e acetônico (ETA) do tumor TEGS-2047, no útero isolado de rata.

B_1 - Bradicinina ($1,15 \times 10^{-5}M$)

B_2 - Bradicinina ($2,3 \times 10^{-5}M$)

B_3 - Bradicinina ($4,6 \times 10^{-5}M$)

ETA e ETM - Extrato tumoral acetônico e metanólico, respectivamente a - $0,3mg/ml$; b - $0,6 mg/ml$ e c - $1,2 mg/ml$.

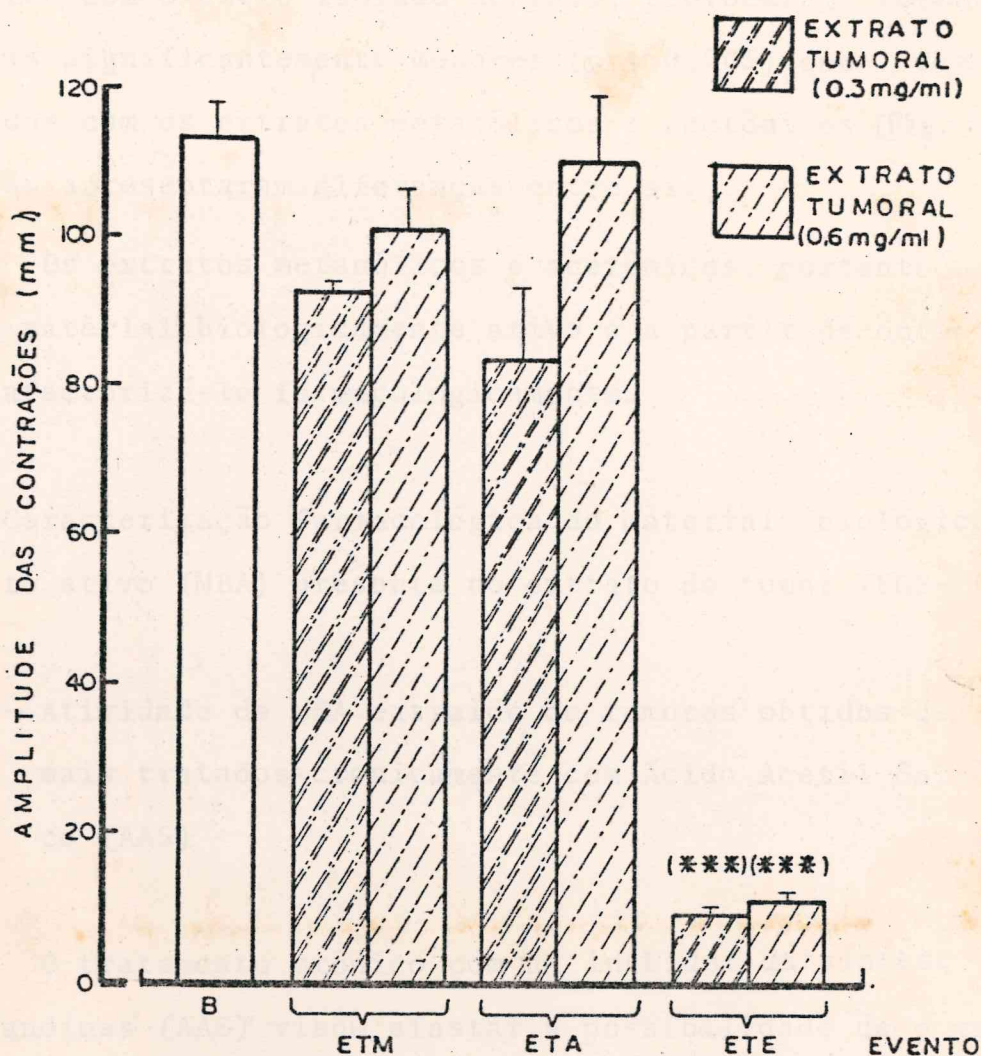


FIGURA 3.7 - Atividade contrátil comparativa dos extratos metanólico (ETM), acetônico (ETA) e etanólico (ETE) do tumor TEGS-2047, no útero isolado de rata. Os resultados correspondem à média de 4 experimentos. As barras verticais representam o E.P.

(***) p < 0,005 - Teste "t" de Student.

$10^{-5}M$ e $1,2 \times 10^{-5}M$). Os extratos etanólicos, a semelhança do que ocorreu com o útero isolado de rata, provocaram respostas contráteis significativamente menores ($p < 0,005$) que aquelas verificadas com os extratos metanólicos e acetônicos (Fig. 3.9). Estes, não apresentaram diferenças entre si.

Os extratos metanólicos e acetônicos, portanto, continham um material biologicamente ativo e a partir de então tentou-se caracterizá-lo farmacologicamente.

3.4.3 - Caracterização farmacológica do material biologicamente ativo (MBA) presente no extrato do tumor TEGS-2047

3.4.3.1 - Atividade de MBA extraído de tumores obtidos de animais mais tratados cronicamente com Ácido Acetil Salicílico (AAS)

O tratamento crônico com um inibidor da síntese de prostaglandinas (AAS) visou afastar a possibilidade de o material biologicamente extraído ser prostaglandina ou substância-símile.

Os extratos tumorais de animais tratados com AAS (10mg/kg/14 dias) demonstraram atividade contrátil semelhante aos extratos de animais controle, nas duas preparações ensaiadas, útero isolado de rata e íleo isolado de cobaia (Fig.3.10). O tratamento portanto, não inibiu a atividade contrátil da substância biologicamente ativa presente no extrato.

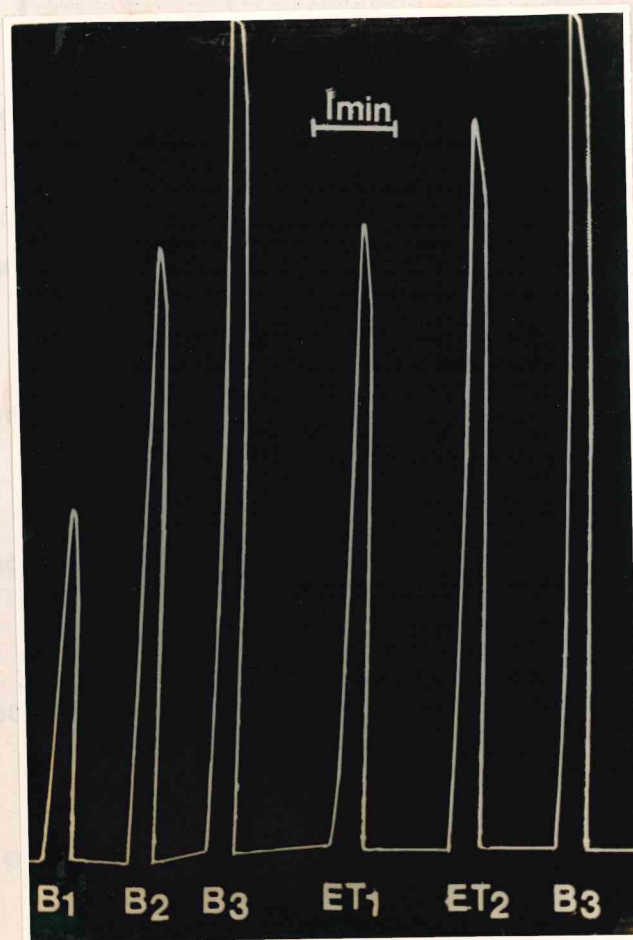


FIGURA 3.8 - Efeito do material biologicamente ativo presente no extrato metanólico do tumor TEGS-2047, no íleo isolado de cobaia.

B₁ - Bradicinina ($2,3 \times 10^{-5} \text{M}$)

B₂ - Bradicinina ($4,6 \times 10^{-5} \text{M}$)

B₃ - Bradicinina ($1,2 \times 10^{-5} \text{M}$)

ET₁ - Extrato tumoral (0,6 mg/ml)

ET₂ - Extrato tumoral (1,2 mg/ml)

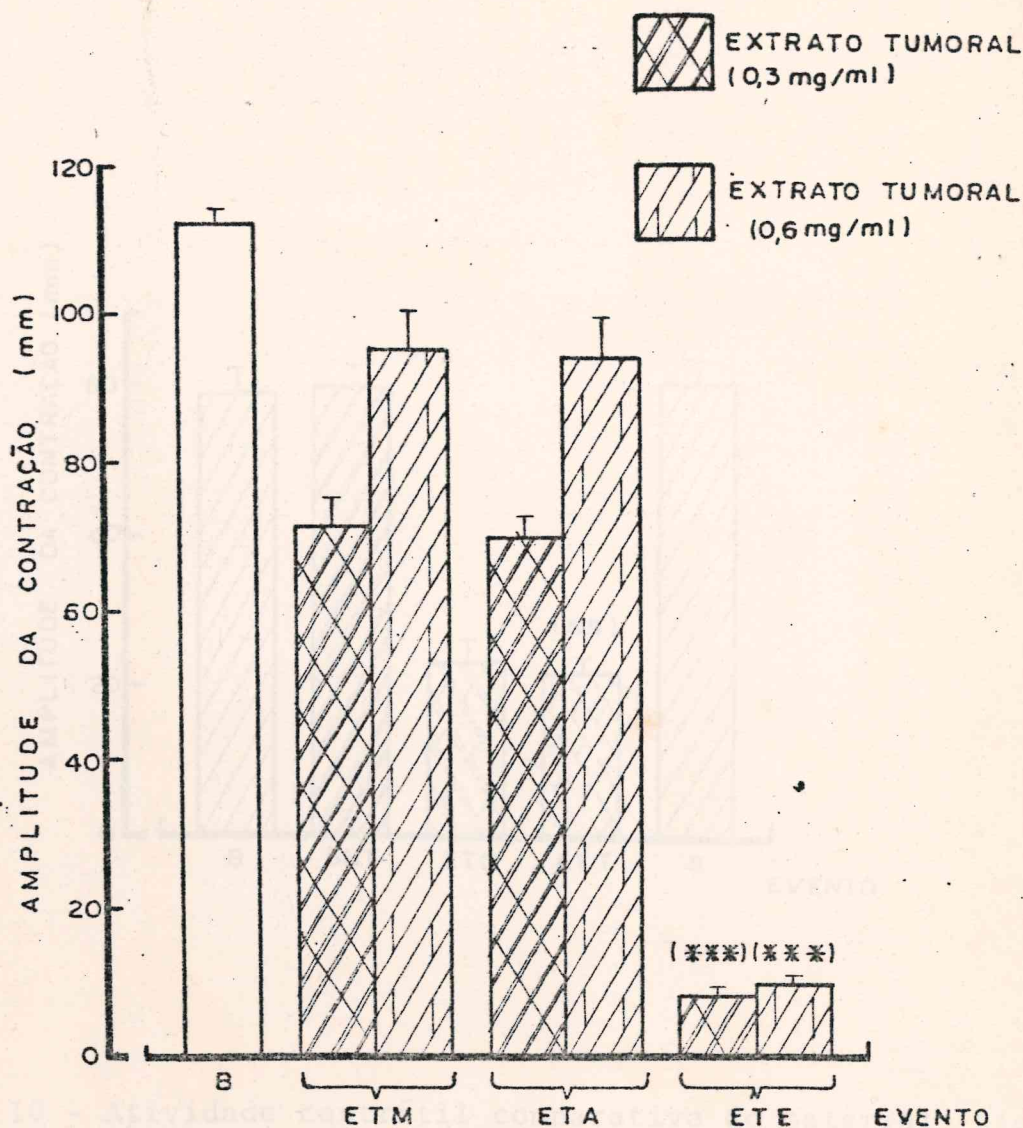


FIGURA 3.9 - Atividade contrátil e comparativa dos extratos metanólico (ETM), acetônico (ETA) e etanólico (ETE) do tumor TEGS-2047, no íleo isolado de cobaia. Os resultados correspondem à média de 4 experimentos. As barras verticais representam o E.P.

(***) $p < 0,005$ - Teste "t" de Student.

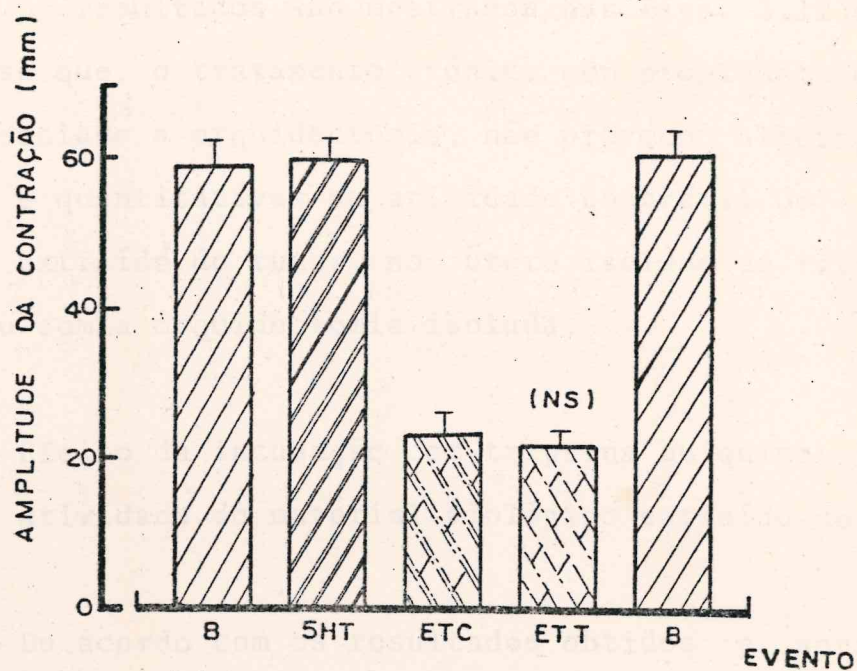


FIGURA 3.10 - Atividade contrátil comparativa do material biologicamente ativo obtido do tumor TEGS-2047 de animais tratados com AAS (ETT) e animais controle (ETC), no útero isolado de rata. Os resultados correspondem à média de 3 experimentos. As barras verticais indicam o E.P.
(ns) não significativo - Teste "t" de Student.

3.4.3.2 - Atividade do material biológico extraído de tumores de animais gonatectomizados tratados ou não com propionato de testosterona

Os resultados são mostrados nas Figs. 3.11 e 3.12. Verifica-se que, o tratamento crônico com propionato de testosterona associado a orquidectomia, não provocou alterações qualitativas e quantitativas na atividade contrátil do material biológico extraído do tumor, no útero isolado de rata. O mesmo sucedeu com a orquidectomia isolada.

3.4.3.3 - Efeito da incubação com tripsina ou quimotripsina na atividade do material biológico extraído do tumor

De acordo com os resultados obtidos e apresentados nas Figs. 3.13 e 3.14, não houve hidrólise do material biologicamente ativo por ação das enzimas proteolíticas ensaiadas, tripsina e quimotripsina. Observou-se, no entanto, um pequeno aumento da atividade do material aos 15 e 30 minutos de incubação, com a quimotripsina e aos 15, 30 e 60 minutos de incubação, com a tripsina. Tais alterações, entretanto, não apresentaram significância estatística.

3.4.3.4 - Efeitos da Ciproheptadina na atividade contrátil do material biológico extraído do tumor, no útero isolado de rata

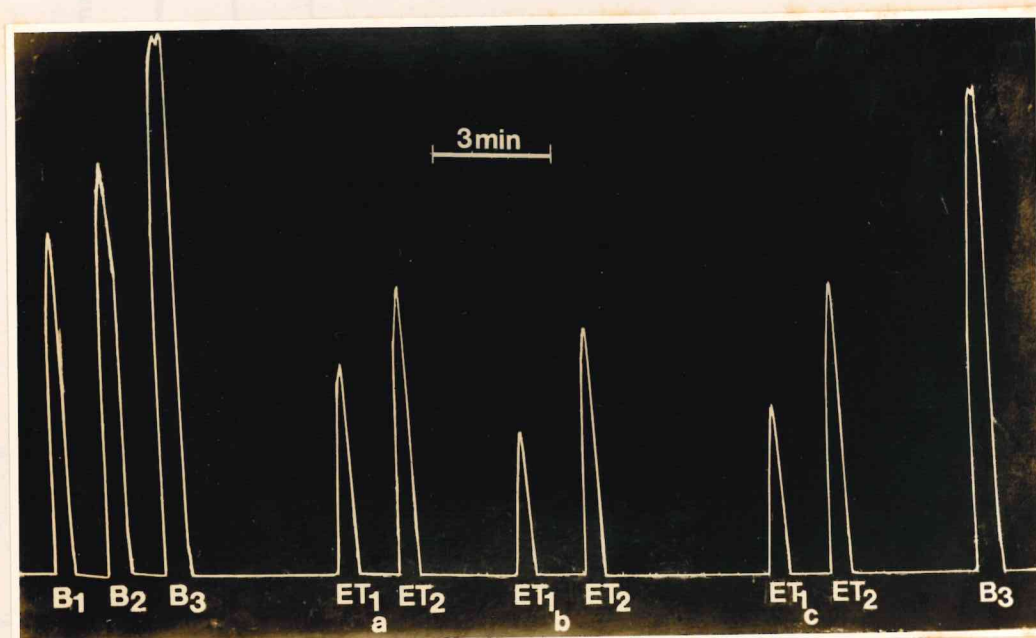


FIGURA 3.11 - Efeito do material biologicamente ativo presente no extrato acetônico do tumor TEGS-2047 de a animais castrados e tratados com Testosterona(b), castrados e não tratados (c) e animais controle (a), no útero isolado de rata.

B₁ - Bradicinina ($1,15 \times 10^{-5}M$)

B₂ - Bradicinina ($2,3 \times 10^{-5}M$)

B₃ - Bradicinina ($4,6 \times 10^{-5}M$)

ET₁ - Extrato tumoral (0,3 mg/ml)

ET₂ - Extrato tumoral (0,6 mg/ml)

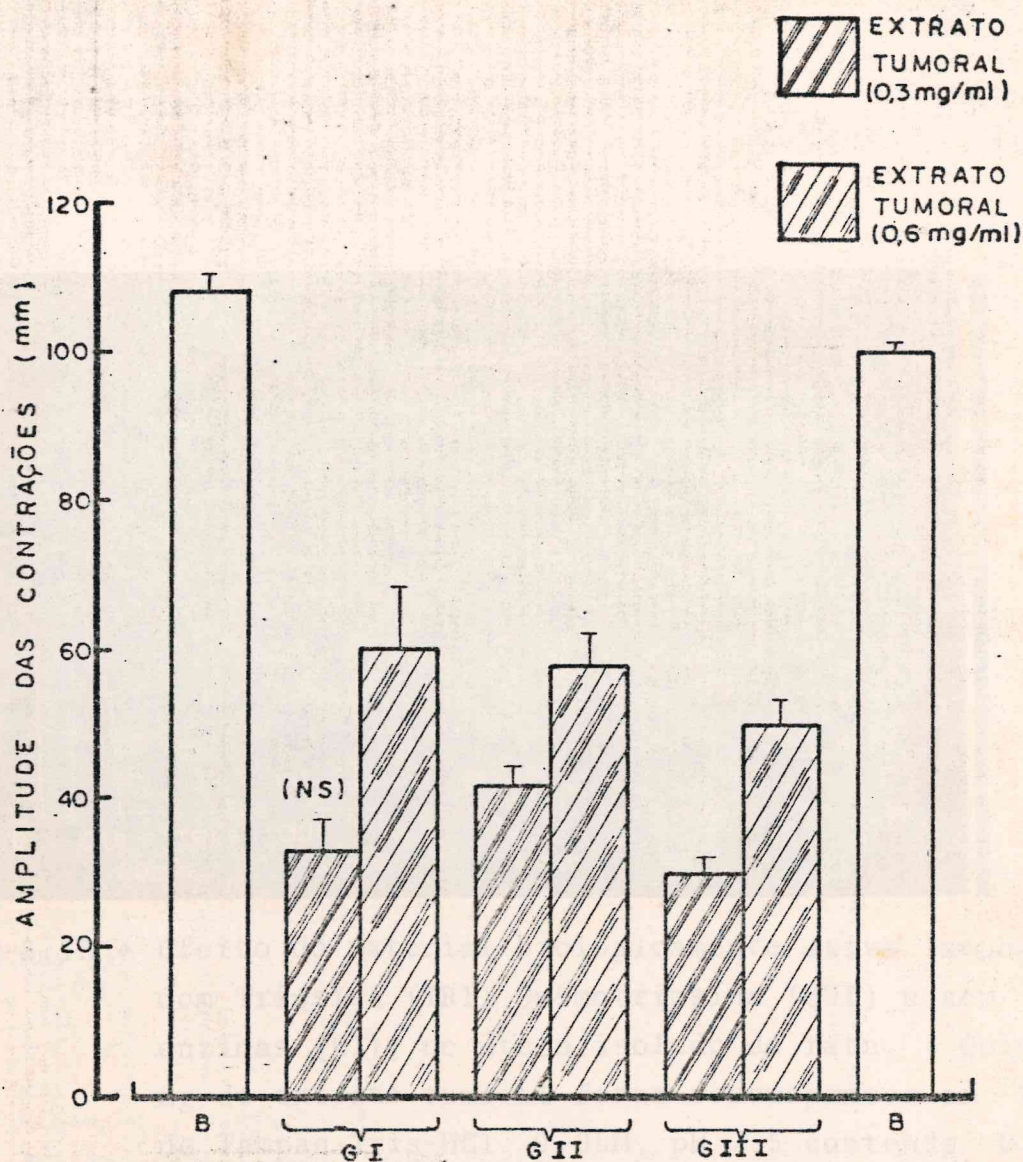


FIGURA 3.12 - Atividade contrátil comparativa do material biologicamente ativo obtido do tumor TEGS-2047 de animais castrados e tratados com Testosterona - (Grupo I), animais castrados sem tratamento (Grupo II) e animais controle (Grupo III), no útero isolado de rata. Os resultados correspondem à média de 4 experimentos. As barras verticais indicam o E.P.

(ns) não significativo - Teste "t" de Student.

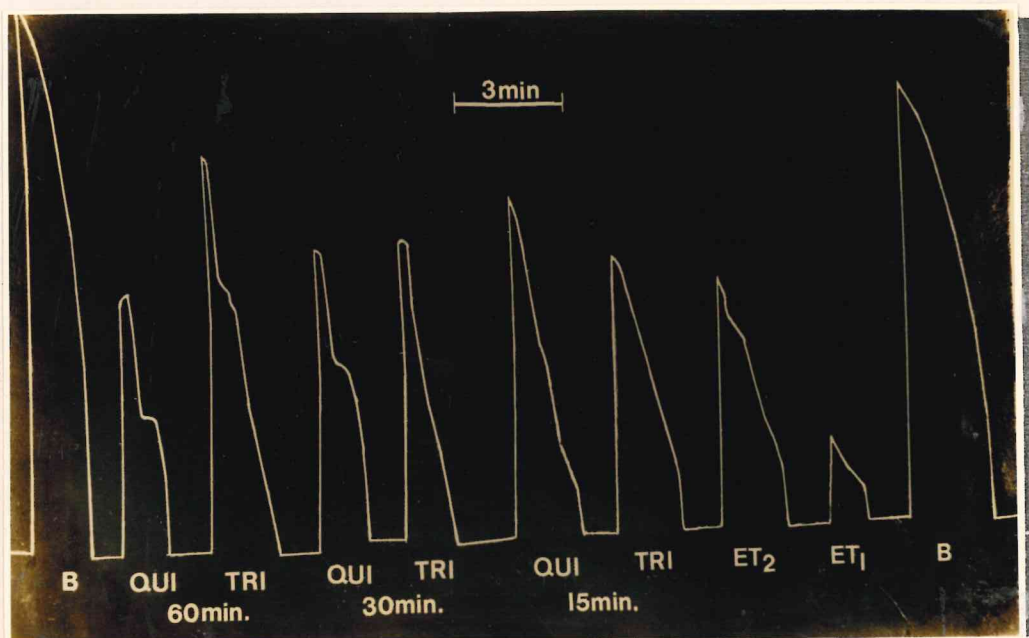


FIGURA 3.13 - Efeito do material biologicamente ativo incubado com Tripsina (TRI), Quimotripsina (QUI) e sem as enzimas (ET), no útero isolado de rata. Quinze mg do extrato tumoral foram ressuspensos em 5ml de Tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,5 contendo 0,1M de NaCl e incubados a 37°C com 400 µg de Tripsina ou Quimotripsina (3mg/ml). Alíquotas de 0,4ml dos incubados foram retiradas aos 15, 30 e 60 min. de incubação e testadas.

B - Bradicinina ($4,6 \times 10^{-5}M$)

ET₁ e ET₂ - Extrato controle (0,6 e 1,2 mg/ml).

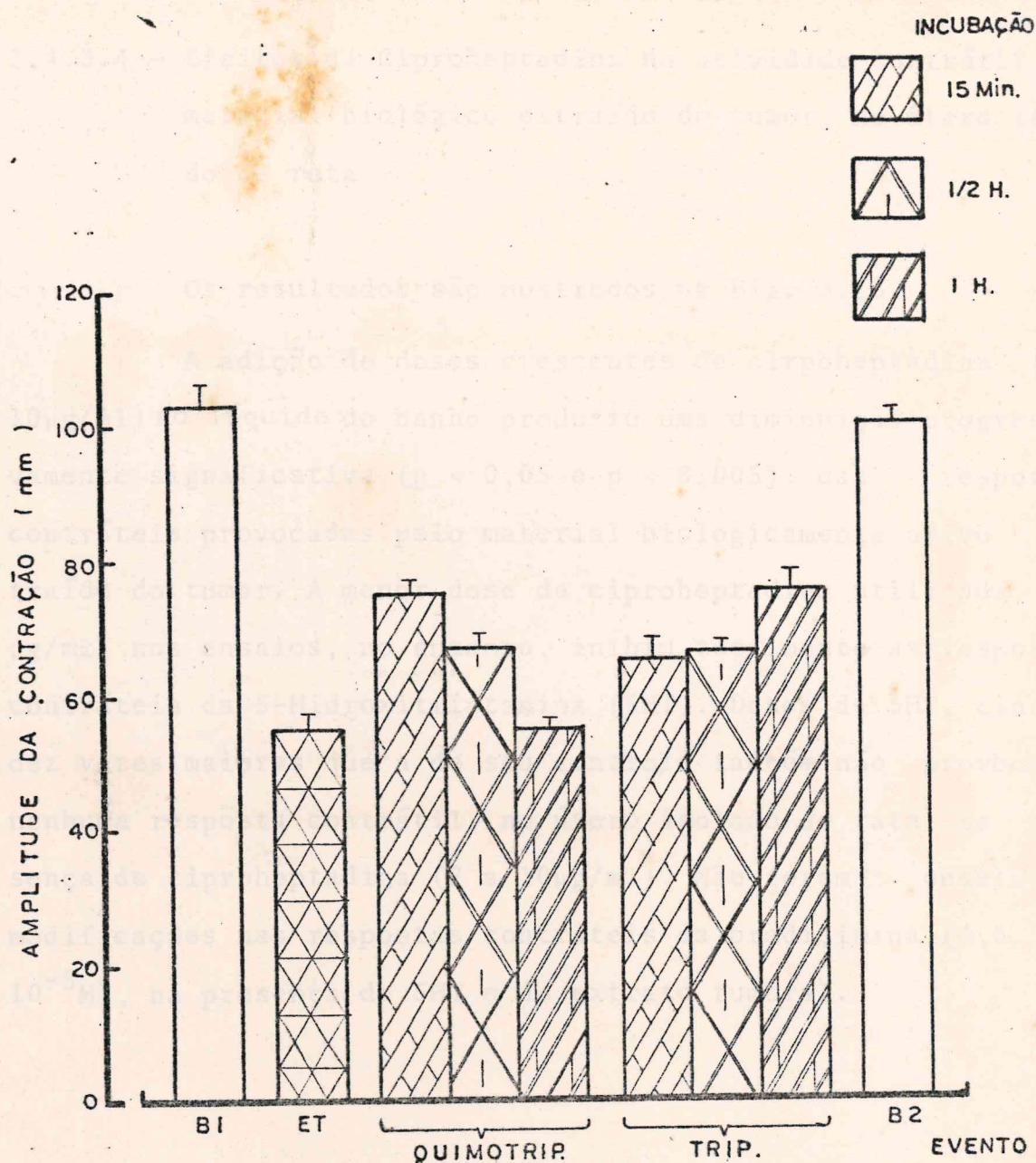


FIGURA 3.14 - Atividade contrátil do material biologicamente a tivo incubado com Tripsina, Quimotripsina e sem as enzimas (ET), no útero isolado de rata. As condições de incubação foram as mesmas da Fig. 3.13. Os resultados representam a média \pm E.P. de 3 experimentos.

B₁ e B₂ - Bradicinina ($4,6 \times 10^{-5}$ M).

3.4.3.4 - Efeitos da Ciproheptadina na atividade contrátil do material biológico extraído do tumor, no útero isolado de rata

Os resultados são mostrados na Fig. 3.15.

A adição de doses crescentes de ciproheptadina (2 a 10 $\mu\text{g/ml}$) no líquido do banho produziu uma diminuição progressivamente significativa ($p < 0,05$ e $p < 0,005$), das respostas contráteis provocadas pelo material biologicamente ativo extraído do tumor. A menor dose de ciproheptadina utilizada (2 $\mu\text{g/ml}$) nos ensaios, no entanto, inibiu totalmente as respostas contráteis da 5-Hidroxitriptamina (5HT). Doses de 5HT, cinco a dez vezes maiores que a do seu controle também não provocaram nenhuma resposta contrátil, no útero isolado de rata, na presença de ciproheptadina (2 a 10 $\mu\text{g/ml}$). Não foram observadas modificações nas respostas contráteis da bradicinina ($4,6 \times 10^{-5}\text{M}$), na presença de 5HT e do extrato tumoral.

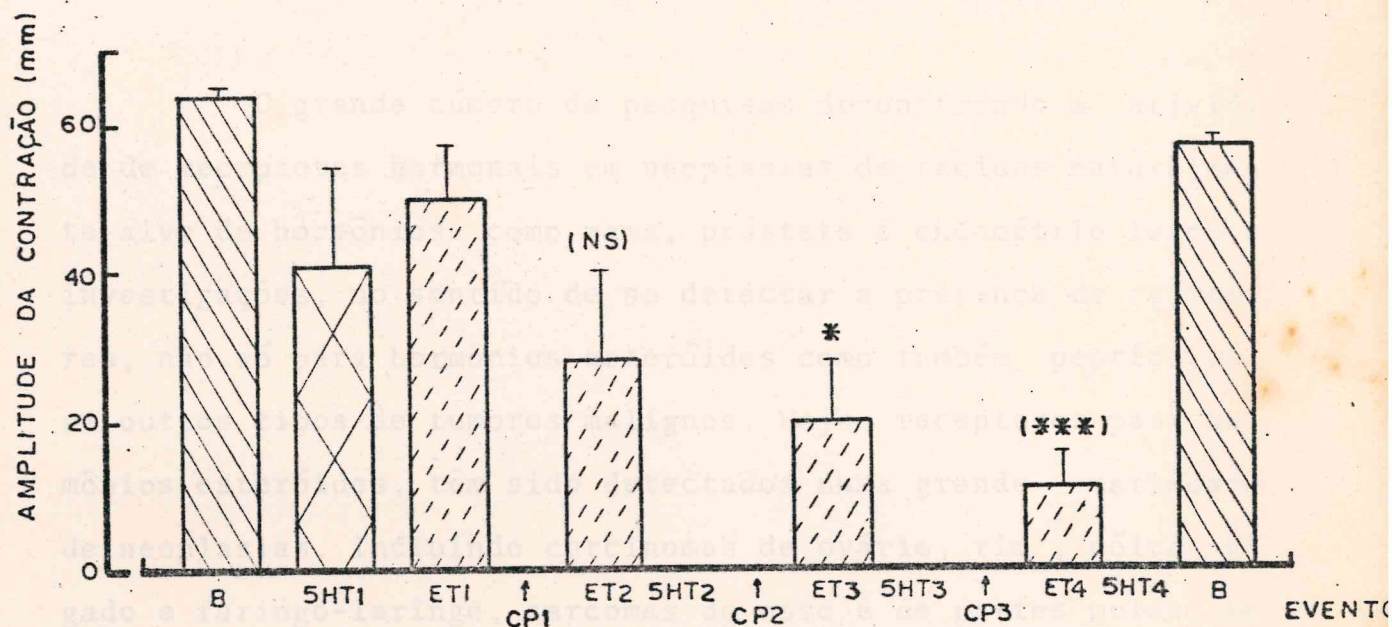


FIGURA 3.15 - Efeito da ciproheptadina (CP_1 - $3\mu\text{g/ml}$; C_2 - $5\mu\text{g/ml}$ e P_3 - $10\mu\text{g/ml}$) nas respostas contráteis do extra_t tumoral (ET_1 , ET_2 , ET_3 e ET_4 - $0,6\text{mg/ml}$) e da 5-Hidroxitriptamina ($5HT_1$, $5HT_2$ - $2\mu\text{g/ml}$; $5HT_3$ - $10\mu\text{g/ml}$ e $5HT_4$ - $20\mu\text{g/ml}$), no útero isolado de rata. B (Bradicinina - $4,6 \times 10^{-5}\text{M}$). Os resultados representam a média \pm E.P. de 3 experimen_tos.

(*) $p < 0,05$

(***) $p < 0,005$ - Teste "t" de Student.

3.5 - DISCUSSÃO

3.5.1 - Estudo do hormônio-sensibilidade no tumor TEGS-2047

O grande número de pesquisas demonstrando a atividade de receptores hormonais em neoplasias de tecidos naturalmente alvo de hormônios como mama, próstata e endométrio levou a investigações, no sentido de se detectar a presença de receptores, não só para hormônios esteróides como também peptídicos, em outros tipos de tumores malignos. Hoje, receptores para hormônios esteróides, têm sido detectados numa grande variedade de neoplasias, incluindo carcinomas de ovário, rim, cólon, fígado e faringo-laringe, sarcomas do osso e de partes moles, melanoma maligno e leucemia linfóide aguda (LEAKE, 1981; STOLL, 1982).

Torna-se claro, entretanto, que enquanto a presença de tais receptores indica que a síntese de DNA na célula tumoral, pode ser manipulada por hormônios, isso, necessariamente, não prediz que uma inibição no crescimento tumoral será resultante de alterações nos níveis de hormônios específicos (STOLL, 1982).

A demonstração da presença de receptores esteróides androgênicos e de glicocorticóides em sarcomas ósseos e de partes moles, inclusive os de natureza fibrosa (CHAUDHURI et al.,

1980), foi o principal argumento para se pesquisar, no presente estudo, a influência do sexo, da gonatectomia e do tratamento com esteróides sexuais, no crescimento do tumor TEGS - 2047, uma neoplasia de partes moles, de comprovada natureza fibrohistiocítica, conforme demonstrado no capítulo 1. Afora este fato, havia-se verificado ao longo do manuseio do tumor, que o mesmo, aparentemente, parecia se desenvolver em maior escala, quando transplantado para ratos machos, em comparação a recipientes fêmeas. O índice de pega nos machos também, parecia ser maior.

A curva de crescimento comparativa do tumor, apresentado na Fig. 3.2, demonstra claramente que a neoplasia tem um maior desenvolvimento nos animais machos embora, nem todos os pontos da referida curva apresentem significância estatística. A análise dos pesos finais dos tumores dos dois grupos experimentais (machos x fêmeas), entretanto, demonstra valores estatisticamente superiores, a um nível de significância de 5%, nos animais machos (Tabela III.1). Tais fatos reforçam a idéia de um maior crescimento tumoral no grupo dos animais machos, em relação às fêmeas. Observa-se ainda na Tabela III.1 que o índice de pega do transplante tumoral, no primeiro grupo, também foi superior, ao longo de todos os dias experimentais, o que corrobora com os dados anteriores.

O termo "sensibilidade hormonal" tem sido usado, em oncologia, para referir respostas clínicas ou biológicas a determinada manipulação hormonal. Em bases pragmáticas, a hormô-

hormônio-sensibilidade pode ser subdividida em duas categorias: a "hormônio-dependência, aplicada a tumores cujo crescimento é influenciado pela ablação de glândulas endócrinas e a "hormônio-responsividade", termo relacionado aos tumores que podem sofrer modificações no seu crescimento na presença de hormônios sexuais ou seus antagonistas (STOLL, 1982).

Deve-se observar, entretanto, que a resposta biológica à manipulação hormonal pode ser tanto inibição como estimulação do crescimento tumoral. No caso de tumores heterogêneos, efeitos opostos podem ocorrer simultaneamente em diferentes clones e o resultado observado, clinicamente, dependerá do tipo de clone predominante. No caso do câncer de próstata, por exemplo, a administração de hormônios androgênicos pode causar estimulação ou regressão do tumor, em diferentes circunstâncias (FERGUSON, 1972). Também no câncer de mama, efeitos contraditórios têm sido mostrados pelo mesmo hormônio, em diferentes sítios, metastáticos ou em variadas etapas do tratamento, no mesmo paciente (STOLL, 1981).

Na presente investigação, verificou-se um estímulo no crescimento tumoral, demonstrado pelo aumento dos volumes e pesos tumorais dos animais castrados e tratados cronicamente com testosterona (14 dias) ou com o acetato de medroxiprogesterona (21 dias) (Figs. 3.4 e 3.5). No entanto, estatisticamente não se verificou significância estatística (nível mínimo de 5%), em relação ao grupo de animais controle; ou seja, não castrados e não manipulados hormonalmente. Porém, a orquidecto-

mia isolada provocou regressão significativa ($p < 0,05$ a $p < 0,01$) dos volumes e pesos tumorais em relação à orquidectomia associada ao tratamento hormonal.

Os dados acima, portanto, demonstram que houve um certo estímulo do crescimento tumoral, frente à administração de um ester da testosterona ou de um progestínico, o acetato de medroxiprogesterona, bem como mostra que a diminuição dos níveis hormonais de esteróides sexuais, principalmente testosterona, resultante da orquidectomia não associada à terapêutica substitutiva, levou a uma considerável redução do crescimento tumoral.

A testosterona é o principal andrógeno circulante influenciador da atividade secretória, crescimento e multiplicação, de células tanto da próstata normal como da próstata acometida de câncer (HUGGINS & HODGES, 1941). Na glândula, este hormônio, é convertido ao seu metabólito mais ativo, a diidrotestosterona (DHT), sendo que as células prostáticas, em menor extensão, podem ser influenciadas por andrógenos (androstenediona e diidroepiandrosterona) produzidos pelo córtex da adrenal. Comparados com a testosterona e a DHT, estes são fracos estimulantes da atividade celular. Perifericamente, entretanto, em órgãos alvo, incluindo próstata, eles são convertidos em testosterona e DHT (ROBINSON, 1982).

Portanto, os efeitos estimuladores do propionato de testosterona no crescimento do tumor TEGS-2047, ora apresentados, se assemelham àqueles verificados no câncer de próstata

bem como na próstata normal.

O aumento significativo nos pesos da próstata e vesícula seminal dos animais submetidos ao tratamento androgênico, confirmam os dados referidos por ROBINSON, 1982, no parágrafo anterior.

O acetato de medroxiprogesterona e o acetato de megestrol, são dois agentes progestínicos que competem com o receptor androgênico no citosol da célula e também bloqueiam a atividade da enzima 5- α -redutase, que converte a testosterona em DHT. Além disso, tem-se referido que estes hormônios suprimem a testosterona plasmática circulante e inibem a produção de andrôgeno pela adrenal (GELLER et al., 1978; ROBINSON, 1982). Por estas razões, tais hormônios têm sido usados na terapêutica hormonal do câncer de próstata (CHISHOLMON & BEYNON, 1982; ROBINSON, 1982).

Os efeitos estimuladores do acetato de medroxiprogesterona no tumor TEGS-2047, aqui demonstrados, são, portanto, contraditórios em relação aos encontrados por alguns pesquisadores, no câncer de próstata. Tal estímulo pode, entretanto, ser simplesmente o resultado de um maior aumento de síntese protéica. Esta hipótese foi reforçada pela verificação de aumento significativo no peso do fígado, no grupo de animais tratados com o acetato de medroxiprogesterona ou com testosterona.

Os dados acima, portanto, sugerem uma provável hormônio-dependência e em menor escala, uma hormônio-responsividade,

no tumor fibrohistiocítico estudado. Tornam-se necessários, entre tanto, estudos pormenorizados a nível estrutural e bioquímico para que se confirme tal tumor, como mais um modelo experimental de neoplasia hormônio-sensível.

3.5.2 - Material biologicamente ativo detectado no tumor TEGS-2047

Ao longo dos anos, vários foram os mediadores químicos detectados em tumores experimentais e humanos. Nesse contexto, os tumores carcinóides de diversos sítios, têm se destacado como produtores de várias substâncias tumorais, entre elas 5-hidroxitriptamina (serotonina), histamina, cininas, prostaglandinas, catecolaminas, ACTH e alguns outros hormônios peptídicos, conforme referido na Introdução.

A detecção da presença de prostaglandinas e substâncias símile no tumor TEGS-2047, em estudo (TROMPIERI, 1984), tornou-se um grande incentivo para a pesquisa de outros mediadores porventura existentes na neoplasia.

Verificou-se na presente investigação a ocorrência de um material biologicamente ativo (MBA), obtido a partir do homogenato do tumor TEGS-2047, utilizando-se métodos de extração geralmente empregados para a detecção de hormônios peptídicos, tais como a substância P, neurotensina e outros (CHANG & LEEMAN, 1970).

Dos solventes empregados, o metanol e a acetona demonstraram-se mais efetivos na extração do MBA, ao passo que o étanol não apresentou eficácia para este propósito. Tal fato foi comprovado pela verificação em útero de rata e íleo de co-baia, de maior atividade contrátil do MBA, extraído com metanol ou acetona, em relação àquele obtido com o uso do etanol ($p < 0,005$).

A atividade do MBA foi comprovada até 30 dias após a sua extração e estoque do pó em placa de Petri siliconizada a -20°C .

Andrôgenos são reconhecidamente estimuladores da síntese de um grande número de proteínas em numerosos tecidos, tais como fígado, rim, próstata e vesícula seminal (LIAO & CHEN, 1982). No presente estudo, o tratamento crônico com testosterona ($300\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso/14 dias) de animais gonadectomizados e inoculados com o tumor TEGS-2047, não provocou alterações quantitativas ou qualitativas, na atividade contrátil do MBA presente nos extratos tumorais. A gonadectomia isolada também não modificou as respostas contráteis do MBA. Portanto, provavelmente a síntese do MBA pelo tumor, não sofre alterações frente à administração ou supressão do hormônio androgênico, o que diminui a possibilidade de sua natureza proteica.

A incubação do MBA com as enzimas proteolíticas, tripsina e quimotripsina, não levou à hidrólise do mesmo, o que de antemão, afasta a possibilidade da presença de alguns poli-

peptídeos neste material, inclusive bradicinina.

Na Tabela III.4 é apresentada a matriz de identificação de prováveis polipeptídeos e aminas biogênicas que poderiam ocorrer no extrato tumoral.

Observando-se a matriz e os dados apresentados nas Figs. 3.5 a 3.14 bem como levando-se em consideração que, em quase todos os banhos, adicionou-se um anti-histamínico e um anticolinérgico muscarínico, afastou-se a ocorrência, no extrato tumoral, de uma série de mediadores químicos, entre os quais: bradicinina, angiotensina, substância P, histamina, acetilcolina, ocitocina, vasopressina e catecolaminas.

A ciproheptadina é um composto cuja fórmula estrutural lembra em muito a dos antagonistas de receptores H_1 , tipo a fenotiazina, sendo por isso um efetivo bloqueador desses receptores. Possui uma proeminente atividade bloqueadora de 5-hidroxitriptamina em vários músculos lisos, incluindo íleo de cobaia e útero de rata, além de demonstrar uma certa atividade anticolinérgica (DOUGLAS, 1985).

A adição de ciproheptadina, conforme verificada na Fig. 3.15 inibiu totalmente as respostas contráteis devidas a 5HT e parcialmente aquelas produzidas pela adição do MBA, nos banhos das preparações. O bloqueio, neste último caso, foi progressivo com o aumento das doses de ciproheptadina. Estes dados sugerem a presença, no extrato tumoral, de um composto triptamínico-símile que, pode, não necessariamente, tra-

TABELA III.4 - Matriz de identificação de alguns polipeptídeos biologicamente ativos e aminas biogênicas (modificado de ROCHA & SILVA, 1970)

Agentes	Testes biológicos	Útero de rata		Íleo de cobaia		Destruição por	
		com AH [*] e/ou AT ^{**}	sem AH e/ou AT	com AH e/ou AT	sem AH e/ou AT	Tripsina	Quimo trip-sina
Bradicinina e cininas relacionadas		+	+	+	+	0	+
Angiotensina		+	+	+	+	+	+
Substância P		+	+	+	+	+	+
Histamina		0	-	0	+	0	0
Acetilcolina		0	+	0	+	0	0
5-HT		NR	+	± ou 0	+	0	0
Ocitocina		NR	+	0	0	0	0
Vasopressiva		NR	+	0	0	0	0
Catecolaminas		0 ou -	0 ou -	NR	-	0	0

(*) Anti-histamínico

(**) Atropina

+ significa: contração e destruição por enzimas

- significa: relaxamento

0 significa: sem efeito e insensível a enzima

tar-se de 5-hidroxitriptamina.

Dosagens de aminas biogênicas realizadas muito recentemente, através da espectrofotofluorimetria, em um número reduzido de animais portadores do tumor TEGS-2047 são apresentadas na Tabela III.5. Verifica-se que o tecido tumoral não demonstra níveis de 5-HT suficientes para se pensar na produção ectópica desde mediador pelo tumor fibrohistiocítico, ora estudado. Entretanto, um número bem maior de amostras é necessário para a obtenção de resultados conclusivos a este respeito.

A possibilidade da ocorrência, no MBA, de prostaglandina foi afastada, logo de início pelo próprio método de extração deste material e, a seguir, confirmada pelo tratamento prévio dos animais portadores do tumor, com um inibidor da síntese de prostaglandinas (AAS), o qual não modificou em nada a atividade contrátil do MBA, no útero de rata e íleo de cobaia.

Faz-se necessário, diante dos dados apresentados neste estudo, um maior número de ensaios farmacológicos, "in vivo" e "in vitro", para se concluir acerca da natureza do material biologicamente ativo extraído do tumor TEGS-2047.

TABELA III.5 - Resultados das dosagens de amins biogênicas em tecidos de animais portadores do tumor TEGS-2047 e tecidos de animais controle. Os valores representam a média de 2 animais de cada grupo^(*)

Dosagem de aminas biogênicas	Grupo observado			
	Com tumor		Sem tumor (controle)	
	Tecido tumoral ($\mu\text{g/g}$)	Tec.subcutâneo ($\mu\text{g/g}$)	Rim ($\mu\text{g/g}$)	Rim ($\mu\text{g/g}$)
Noradrenalina	0,005	0,053	0,241	0,204
Adrenalina	0,019	0,015	-	0,002
5-Hidroxitriptamina	0,151	0,438	0,261	0,105

(*) Dosagens realizadas através da espectrofotofluorimetria, de acordo com técnica padronizada pelo Prof. Dr. João Samuel de Oliveira, no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - SP.

TABELA 1.4 - Análise de variância dos pesos lunais de animais capturados e matados
 com propósito de testar a hipótese de que os animais capturados e matados
 são diferentes (t-test)

Origem de amostras	Graus de liberdade	Soma de quadrados		Quadrado média	F _{tab}
		entre grupos	dentro grupos		
1. Animais capturados	2	125,161	62,6984	62,5802	2,25 (10%)
2. Animais matados	15	817,72	27,846		
Total	17	1,242,88			

ANEXOS

TABELA 3-A - Análise de variância dos pesos tumorais de animais castrados e tratados com propionato de testosterona, castrados e não tratados e não castrados e não tratados (controle)

Origem da variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	Fobs	Fα
Entre amostra	2	125,381	62,6904	2,251 (ns)	F5% = 3,68
Dentro das amostras	15	417,72	27,848		F1% = 6,36
T o t a l	17	3.284,45			

(ns) não significativo

TABELA 3-B - Análise de variância dos volumes tumorais de animais castrados e tratados com propionato de testosterona, castrados e não tratados e não castrados e não tratados (controle)

Origem da variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	Fobs	Fa
Entre amostras	2	806,858	403,429	2,197 (ns)	F5% = 3,68
Dentro das amostras	15	2.754,5	183,633		F1% = 6,36
T o t a l	17	7.707,44			

(ns) não significativo

TABELA 3-C - Análise de variância dos volumes tumorais de animais castrados e tratados com MPA, castrados e não tratados e não castrados e não tratados (controle)

Origem da variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	Fobs	Fα
Entre amostras	2	1.344,65	672,324	1,9718 (ns)	Fs% = 3,47
Dentro das amostras	21	1.160,14	340,959		Fs% = 5,78
T o t a l	23	32879,1			

(ns) não significativo

TABELA 3-D - Análise de variância dos pesos tumorais de animais castrados e tratados com MPA, castrados e não tratados e não castrados e não tratados (controle)

Origem da variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	Fobs	F _α
Entre amostras	2	343,722	171,861	3,0523 (ns)	F5% = 3,47
Dentro das amostras	21	1.182,41	56,3053		F1% = 5,78
T o t a l	23	15.255,8			

(ns) não significativo

IV - CONCLUSÕES GERAIS

- 1 - À microscopia óptica e eletrônica, o tumor TEGS-2047, mostrou-se constituído por células histiocíticas-símile, principalmente, fibroblásticas-símile e células indiferenciadas.
- 2 - A citoquímica enzimática foi fortemente positiva para a α -naftil acetato esterase e fosfatase ácida, indicando a natureza histiocítica do tumor.
- 3 - O estudo imunohistoquímico no tecido tumoral revelou positividade nas reações para Lisozima e Vimentina, confirmando a sua natureza fibrohistiocítica e portanto, indicando a sua inclusão na categoria dos Fibrohistiocitomas Malignos.
- 4 - A incidência de metástase foi muito pequena (3,3%), demonstrando um menor potencial agressivo quando comparado com outros tumores de partes moles, fibrohistiocíticos ou não, descritos na literatura.
- 5 - A curva de crescimento do tumor mostrou um padrão compatível com um crescimento do tipo GOMPERTZIANO.
- 6 - A análise dos parâmetros cinéticos estudados (K_B , T_{PD} , T_D , K_G , K_L e \emptyset) no tumor sugerem que o progressivo aumento da perda celular, muito mais que a também progressiva redução

da produção celular, é um fator decisivo a contribuir para a diminuição da taxa de crescimento nos últimos dias de evolução do tumor.

- 7 - A curva de crescimento do tumor em animais machos e fêmeas revelou um maior desenvolvimento tumoral nos animais machos.
- 8 - O tratamento de animais castrados, portadores do tumor, com hormônios esteróides (testosterona ou acetato de medroxi-progesterona) levou a um aumento nos volumes e pesos tumorais, sugerindo um estímulo no crescimento tumoral.
- 9 - A gonadectomia não associada ao tratamento hormonal provocou redução nos volumes e pesos tumorais, afetando portanto, o crescimento do tumor.
- 10 - Sugere-se, portanto, a existência de uma possível hormônio-dependência e/ou hormônio-responsividade no tumor TEGS-2047.
- 11 - Comprovou-se a ocorrência de um material com atividade biológica nos extratos tumorais metanólicos ou acetônicos.
- 12 - Os ensaios farmacológicos sugerem a presença neste material de um composto triptamínico-símile, o qual pode, não necessariamente, tratar-se de 5-Hidroxitriptamina.

RESUMO

Um tumor espontâneo surgido na região da glândula salivar (TEGS-2047) de um rato albino Wistar e logo depois transplantado com Trocarter, foi estudado quanto a vários aspectos: (a) caracterização histológica (histopatologia, ultra estrutura, citoquímica enzimática e imunohistoquímica); (b) potencial metatastático; (c) cinética de crescimento, usando um bloqueador de mitoses (Vincristina); (d) hormônio-sensibilidade e (e) pesquisa de substâncias biologicamente ativas, produzidas no tumor. Os resultados revelaram que:

(a) À microscopia óptica (MO) e eletrônica (ME), o tumor apresentou-se constituído por células histiocíticas-símile, principalmente, células fibroblásticas-símile e células indiferenciadas. A citoquímica enzimática foi fortemente positiva para a α -naftil acetato esterase e fosfatase ácida, sugerindo, juntamente com a M.O. e M.E., a natureza histiocítica da neoplasia. O estudo imunohistoquímico, usando marcadores histiocíticos (Lisozima, α_1 Antitripsina e α_1 Antiquimotripsina) e de filamentos intermediários (Vimentina), mostrou-se positivo para a Lisozima e Vimentina, confirmando a natureza fibrohistiocítica do tumor e indicando, portanto, a sua inclusão na categoria dos Fibrohistiocitomas Malignos (FHM);

(b) A incidência de metástase foi baixa (3,3%);

c) A curva de crescimento do tumor foi compatível com um padrão que segue a função de GOMPERTZ. As diferenças entre os valores das taxas de produção celular (K_B), calculadas no 9º, 18º e 27º dias, não foram tão marcantes, embora tenha se encontrado diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre as K_B do 9º e 27º dias. Os valores dos índices mitóticos (IM) para cada um desses dias, demonstrou haver uma diminuição progressiva das mitoses, à medida que o tumor evolui. O tempo potencial de duplicação (T_{PD}) foi progressivamente maior com a evolução do tumor, embora a diferença entre seus valores não tenha sido considerável. Já o tempo de duplicação real (T_D) aumentou consideravelmente com o tempo. Os valores das taxas de crescimento (K_G) para os dias experimentais, 9, 18 e 27, revelaram uma diferença marcante no crescimento tumoral, principalmente entre o 9º e 27º dias. Os valores das taxas de perda celular (K_L) e dos índices de perda celular (ϕ), nestes dias, demonstraram um aumento significativo da perda celular, proporcional ao tempo de evolução do tumor. No 27º dia, o tumor chegou a perder quase 92 células para cada 100 que produziu. Concluiu-se que, o aumento da perda celular, muito mais que a diminuição da produção celular, é um fator decisivo para redução da taxa de crescimento nos últimos dias de evolução do tumor;

(d) Houve um estímulo no crescimento tumoral, demonstrado pelo aumento dos volumes e pesos tumorais, de animais gonadectomizados e tratados com testosterona (14 dias)

ou acetato de medroxiprogesterona (21 dias). A gonadectomia isolada provocou regressão significativa ($p < 0,05$ a $p < 0,005$) dos volumes e pesos tumorais;

(e) Detectou-se a presença de um material biologicamente ativo (MBA), obtido a partir do extrato tumoral metanólico ou acetônico. O MBA provocou respostas contráteis (0,3 a 1,2mg/ml) dose-dependentes no útero de rata e íleo isolado de cobaia, comparáveis às provocadas por bradicinina ($2,3 \cdot 10^{-5}M$; $4,6 \times 10^{-5}M$ e $1,2 \times 10^{-5}M$) nestas preparações. O MBA não sofreu alterações em sua atividade contrátil frente ao tratamento crônico de animais inoculados com o tumor, com AAS ou propionato de testosterona. O MBA não sofreu hidrólise enzimática quando incubado com tripsina ou quimotripsina. Doses crescentes de ciproheptadina produziram um bloqueio progressivamente significativo ($p < 0,05$ e $p < 0,005$) das respostas contráteis do MBA, no útero isolado de rata. Sugeriu-se, então a ocorrência no MBA extraído do tumor TEGS-2047, de um composto Triptamínico-símile, que pode, não necessariamente, tratar-se de 5-Hidroxitriptamina.

ABSTRACT

A spontaneous tumor arised on the ragion of salivar gland (TEGS-2047) of a Wistar rat and transplanted with trocarter was studied under several aspects: (a) histologycal characterization(histopathology, ultrastructure, enzimatic cytochemistry and immunohistochemistry); (b) metastitic potential; (c) stathmokinetic study using Vincristine; (d) Hormonal sensitivity and (e) search for bioactive substances produced by the tumor. The results showed:

(a) Optical and eletron microscopy studies(OM and EM) revealed that the tumor is mainly constituted by histiocytic-like cells and also fibroblastic-like cells and undifferentiated celss. The enzymatic cytochemistry was strongly positive for an α -naphthyl acetate esterase and acid phosphatase, suggesting the histiocytic nature of this neoplasm. Immunohistochemistry study using histiocytic (Lisozyme, α -1-Antitrypsin and α -1-Antichymotrypsin)and intermediate-sized filaments (Vimentin) markers showed activity only for Lisozyme and Vimentin confirming the fibrohistiocytic nature of the tumor and suggesting that it may be considered as a malignant fibrous histipcytoma (MFH);

(b) The incidence of metastasis was low (3,3%);

(c) The tumor growth curve was consistent with the pattern of

GOMPERTZ function. The variation in the birth rate of new cells (K_B) calculated on the 9th, 18th and 27th were not large although it was found they were statistically significative ($p < 0,05$) for the K_B on the 9th and 27th days. The mitotic index values (MI) for each of these days demonstrated a progressive decrease in the mitosis during the tumor evolution. The potential population doubling time (T_{PD}) increased with the tumor age although it had been expected to be longes. However population doubling time (T_D) did increase markedly with the tumor age. The growth rate (K_G) values on the 9th, 18th and 27th days exhibited a large difference in the tumor growth mainly between the 9th and 27th days. The rate of cell loss (K_L) and cell loss factor (ϕ) in those days showed a significant increase in cellular loss which was proportional to the time of tumor evolution. On the 27th day the tumor has even lost 92 out of 100 cells produced. It was concluded that the increase of cellular loss, which was more than the decrease in the cellular production is a strong factor for the reduction of the growth rate in the last days of the tumor evolution;

(d) There was a stimulus for the tumor growth in castrated animals treated with testosterone (14 days) or medroxyprogesterone acetate (21 days) as shown by the increase of the tumor volumes and tumor weights. Castration only provoked a significant decrease ($p < 0,05$) to $p < 0,005$) in the tumor

volumes and tumor weights;

(e) It was detected the presence of a biologically active material (BAM) obtained from the tumor methanol or acetone extracts. The BAM (0,3 to 1,2mg/ml) was able to contract isolated rat uterus and isolated guinea pig ileum in a dose-dependent manner which could be compared to bradykinin responses ($2,3 \times 10^{-5}M$, $4,6 \times 10^{-5}$ and $1,2 \times 10^{-5}M$). The activity of the BAM was not modified when the animals were cronically treated with AAS or testosterone propionate. Trypsin and Chymotrypsin did cause hydrolisis of the Bam. The responses of the BAM in rat isolated uterus were blocked by cyproheptadine in a dose-dependent manner ($p < 0,05$ and $p < 0,005$). It was suggested then the presence of a tryptamine-like substance in the tumor TEGS-2047.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, S., GATANAGA, T., YAMAZAKI, M., SOMA, G. & MIZUMO, D.
Purification of rabbit tumor necrosis factor. FEBS, 180:
203-206, 1985.
- AGGARWAL, B.B., KOHR, W.J., HASS, P.E., MOFFAT, B., SPENCER, S.
A., HENZEL, W.J., BRINGMAN, T.S., NEDWIN, G.E., GOEDDEL, D.
V., HARKINS, R.N. Human Tumor Necrosis Factor -Production,
purification and characterization. J. Biol. Chem. 260:2345-
2354, 1985.
- AHERNE, W.A. & BUCK, P. The potencial cell population doubling
time in neuroblastoma and nephroblastoma. Br. J. Cancer. 25:
691-696, 1971.
- AHERNE, W.A., CAMPLEJOHN, R.S., WRIGHT, N.A. An introduction
to cell population kinetics. London, Edward Arnold Ltd, 1977.
p. 3-80.
- ALGUACIL-GARCIA, A., UNNI, K.K. & GOELLINER, J.R. Malignant
fibrous histiocyoma: An ultrastructural study of six cases.
Am. J. Clin. Pathol., 69: 121-129, 1978.
- APPLETON, D., MORLEY, A.R. & WRIGHT, N.A. Cell proliferation
in the castrate mouse seminal vesicle in response to testos
terona propionate. II. Theoretical observations. Cell Tiss.
Kinet. 6: 247-258, 1973.
- BARKA, T. & ANDERSON, P.J. Histochemical methods for acid phos

- phatase using hexazonium pararosanilin as coupler. J. Histochem. Cytochem. 10: 741-753, 1962.
- BASERGA, R. Biochemistry of the cell cycle: a review. Cell Tiss. Kinet. 1: 167-191, 1968.
- BASERGA, R. & KISIELESKI, W.E. Comparative study of the kinetics of cellular proliferation in normal and tumours tissues with the use of tritiated thymidine. J. Natl. Cancer Inst. 28: 331-339, 1962.
- BARSOUM, N.J., HANNA, W., GOUGH, A.W., SMITH, G.S., STURGESS, J.M., De La IGLESIA, F.A. Histiocytic sarcoma in Wistar rats - A light microscopic, immunohistochemical and ultrastructural study. Arch. Pathol. Lab. Med., 8: 802-807, 1984.
- BELIZÁRIO, J.E. A dosagem de receptores de estrogênios, progestágenos e glicocorticóides como um método de avaliação da hormônio-dependência de melanoma maligno. São Paulo, 1982. Tese (Mestrado) - Escola Paulista de Medicina.
- BERTALANFFY, F.D. & LAU, C. Rates of cell division of transplantable malignant rat tumors. Cancer. Res. 22:627-631, 1962.
- BEZERRA DE ARAÚJO, R.W., PAULA, L.K.C. de A., MENEZES, D.B., POMPEU, M.N.L., FERREIRA, F.V.A., FONTELES, M.C. A propósito de um tumor espontâneo na região da glândula salivar de rato albino. Observações preliminares. Histologia e transplante. Rev. Med. Univ. Fed. do Ceará. 20 (1/2): 21-24, 1980.
- BROOKS, J.F. Immunohistochemistry of soft tissue tumours: progress and prospects. Hum. Pathol. 13: 969-974, 1982.
- BROWNLEE, K.A. Statistical theory and methodology in science

and engineering, New York, London, John Wiley and Sons, London, 1960.

- BRUNSEN, O., REID, A., MONCKEBERG, F., MACCIONI, A. & CONTRE RAS, I. Jejunal biopsies in infant malnutrition; with special reference to mitotic index. Pediatrics. 38: 605-610, 1966.
- BRUNSEN, O., REID, A., MONCKERBERG, F., MACCIONI, A. & CONTRE RAS, I. Jejunal mucose in infantile malnutrition. Am. J. Clin. Nutr. 21: 976-982, 1968.
- BULLOUGHT, W.S. Mitotic and functional homeostasis. Cancer Res. 25: 1683-1727, 1965.
- BURGDORF, W.H.C., DURAY, P., ROSAI, J. Immunohistochemical identification of lysozyme in cutaneous lesions of alleged histiocytic nature. Am. J. Clin. Pathol. 75: 162-167, 1981.
- CAIRNIE, A.B., LAMERTON, L.F. & STEEL, G.G. Cell proliferation studies in the intestinal epithelium of the rat. I-Determination of the kinetics parameters. Exp. Cell. Res. 39: 528-538, 1965a.
- CAIRNIE, A.B., LAMERTON, L.F. & STEEL, G.G. Cell proliferation studies in the intestinal epithelium of the rat. II-Theoretical aspects. Exp. Cell. Res. 39: 539-553, 1965b.
- CAMERON, I.L. & GREULICH, R.C. Evidence for essentially constant duration of DNA synthesis in renewing epithelial of the adult mouse. J. Cell. Biol. 18; 44, 1963.
- CAMPLEJOHN, R.S. A critical review of the use of Vincristine (VCR) as a tumour cell synchronizing agent in cancer therapy. Cell. Tissue Kinet. 13: 327-335, 1980.

- CAMPLEJOHN, R.S., BONE, G. & AHERNE, W.A. Cell proliferation in human rectal carcinoma and rectal mucosa: a stathmokinetic study. Eur. J. Cancer. 9: 577-581, 1973.
- CARPENTER, G. Epidermal growth factor, In: BASERGA, R. ed. Tissue Growth Factors. Handb. Exp. Pharm. Berlin - Heidelberg - New York, Springer-Verlag, 1981, v. 57, p. 89-132.
- CARTER, R.L. Tumors of the rat. In: TUTUSOV, V.S. ed. Pathology of tumors in laboratory animals. Lyons, France, International Agency for Research in Cancer, 1973, vol.1, p.151.
- CIPRIANO, T.C. Estudos morfométrico e cinético do epitélio jejunal proximal de ratos com deficiência aguda de tiamina. Ribeirão Preto, 1984. Tese (Mestrado). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina.
- CORNILL, M.V. Sur les greffes et inoculation de cancer. Semaine Med. 11: 259, 1981.
- CHAUDHURI, P. WALKER, M. & BEATTIE, C. Presence of steroid receptors in human soft tissue sarcomas of diverse histological origin. Cancer Res. 40: 861-869, 1980.
- CHANG, M.M. & LEEMAN, S.E. Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as substance P. J. Biol. Chem. 245: 4784-4793, 1970.
- CHISHOLM, G.D. & BEYNON, L.L. The response of the malignant prostate to endocrine treatment. In: GHANADIAN, R. ed. The Endocrinology of Prostate Tumours. Boston MTP Press Limited, International Medical Publishers, 1982, cap. 9, p. 241-262.
- CLARKE, R.M. Progress in measuring epithelial turnover on the villus in the small intestine. Digestion 8:161-165, 1973.

- DURBIN, P.W., JEUNG. N., WILLIAMS. M.H. & ARNOLD, J.S. Construction of a growth curve for mammary tumors. Cancer Res. 27: 1341-1347, 1967.
- DOUGLAS, W.W. Histamine and 5-hydroxytryptamine (serotonin) and their antagonists. In: GOODMAN, L.S. & GILMANS, A. ed. The Pharmacological Basis of Therapeutics. New York - Macmillan Publishing Company, 1985, p. 605.
- Du BOULAY, C.E.H. Demonstration of alpha-1-antitrypsin and alpha-1-antichymotrypsin in fibrous histiocytomas using the immunoperoxidase technique. Am. J. Surg. Pathol. 6: 599-564, 1982.
- ENJOJI, M., HASHIMOTO, H., TSUNEYOSHI, M. & IWASAKI, H. Malignant fibrous histiocytoma - A clinicopathologic study of 130 cases. Acta Pathol. Jpn. 30: 727-741, 1980.
- EHRlich, C.E., CLEARY, R.E. & YOUNG, P.C.M. The use of progesterone receptors in the management of recurrent endometrial cancer. In: BRUSH, M.G., King, R.J.B. & TAYLOR, R.W. ed. Endometrial Cancer. London. Belliere Tindall, 1978, p. 258-264.
- ENGEL, L.W. & YOUNG, N.A. Human breast carcinoma cells in continuous culture: a review. Cancer Res. 38: 4327-4339, 1978.
- FEAUX DE LACROIX, W. & LENNARTZ, K.J. Changes in the proliferation characteristics of a solid transplantable tumour of the mouse with time after transplantation. Cell Tissue Kinet. 14: 135-142, 1981.
- FÉAUX DE LACROIX, W. & MALLMANN, H. Comparative investiga-

- tions on the effect of different dose schedules of the phase-specific drug vincristine (VCR) on the proliferation kinetics of a solid experimental tumour. Cell Tissue Kinet. 17: 583-591, 1984.
- FERGUSON, J.D. Secondary endocrine therapy in prostate cancer. In: STOLL, B.A. ed. Endocrine Therapy in Malignant Disease. Philadelphia, W.B. Saunders Co., 1972; p. 263-272.
- FINKEL, M.P., BERGSTRAND, P.J. & BISKIS, B.O. The latent period, incidence and growth of ^{90}Sr -induced osteosarcomas in CF_1 and CBA mice. Radiology 77: 269-281, 1961.
- FITCHEN, J.H. & CLINE, M.J. Inhibition of hematopoietic cell proliferation. In: BASERGA, R. ed. Tissue Growth Factors. Handb. Exp. Pharm. Berlin - Heidelberg. New York. Springer-Verlag, 1981. v. 386-404.
- FOLKMAN, J., MERLER, E., ABERNATHY, C. & WILLIAMS, G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. J. Exp. Med. 133: 275-288, 1971.
- FORMELLI, F. ZACCHEO, T. & CASAZZA, A.M. Effect of medroxyprogesterone acetate and doxorubicin on sublines of 13762, mammary adenocarcinoma in rats. Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 17: 1211-1218, 1981.
- FRINDEL, E., MALAISE, E.P., ALPEN, E. & TUBIANA, M. Kinetics of cell proliferation of an experimental tumour. Cancer Res. 27: 1122-1131, 1967.
- FU, V.S. GABBIANE, G. KAYE, G.I. & LATTES, R. Malignant soft tissue tumors of probable histiocytic origin (Malignant

- fibrous histiocytoomas). General considerations and electromicroscopic and tissue culture studies. Cancer, 35: 176-198, 1975.
- FUJIOKA, M., KOGA, M. & LIEBERMAN, I. Metabolism of ribonucleic acid after partial hepatectomy. J. Biol. Chem. 238: 3401-3408, 1963.
- FULKER, M.J., COOPER, E.H. & TANAKA, T. Proliferation and ultrastructure of papillary transitional epithelium of the human bladder. Cancer, 27: 71-82, 1971.
- GABBIANI, G., KAPINCI, Y., BARAZZONE, P. & FRANKE, W.W. Immunohistochemical identification of intermediate-sized filaments in human neoplastic cells: a diagnostic aid for the surgical pathologist. Am. J. Pathol. 104: 206-216, 1981.
- GELFANT, S. Initiation of mitosis in relation to the cell division cycle. Exp. Cell. Res. 26: 395-403, 1962.
- GELFANT, S. Patterns of epidermal cell division. Exp. Cell. Res. 32: 521-528, 1963.
- GELFANT, S. Patterns of cell division: The demonstration of discrete cell population. In: PRESCOTT, D.M. ed. The Methods in Cell Physiology. New York. Academic Press, 1966. v.2, p. 359-367.
- GELLER, J., ALBERT, J. & YEN, S.S.C. Treatment of advanced cancer of the prostate with megestrol acetate. Urology. 12: 537-541, 1978.
- GOLDACRE, R.J. & SYLVEN, B. On the access of blood-borne dyes to various tumor regions. Br. J. Cancer. 16: 306-322, 1962.

- GOODMAN, D.G., WARD, J.M., SQUIRE, R.A., CHU, .C. LINHART, M. S. Neoplastic and nonneoplastic lesions in aging F344 rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 48: 237-248, 1979.
- GOODMAN, D.G., WARD, J.M., SQUIRE, R.A., PAXTON, M. B., CHU, K. C. & LINHART, M.S. Neoplastic and nonneoplastic lesions in aging Osborne-Mendel rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 55: 433-447, 1980.
- GREAVES, P. & FACCINE, J.M. Spontaneous histiocytic neoplasms in rats. Br. J. Cancer. 43: 402-411, 1981.
- GREAVES, P., MARTIN, J.M. & MASSON, M.T. Spontaneous rat malignant tumors of fibrohistiocytic origin an ultrastructural study. Vet. Pathol., 19: 497-505, 1982.
- GREAVES, P., MARTIN, J.M. & RABEMAMPIANINA, Y. Malignant fibrous histiocytoma in rats at sites if implanted millipore filters, Am. J. Pathol., 120: 207-214, 1985.
- GULLINO, P.M. The Internal Milieu of Tumors. Prog. Exptl. Tumor Res. 8: 1-25, 1966.
- GULLINO, P.M. Angiogenesis factor(s). In: BASERGA, R. ed. Tissue Growth Factors. Handb. Exp. Pharm. Berlin - Heidelberg - New York. Springer-Verlag, 1981. v. 57, p. 427-450.
- HAMBURGER, F. & FISHMAN, W.H. The physiopathology of cancer. New York, A. Hoeber Harper Book, 1953.
- HARRIS, M. The ultrastecture of benign and malignant fibrous histiocytomas. Histopathology, 4: 29-44, 1980.
- HERMANS, A.F. & BARENDSEN, G.W. Cellular proliferation patterns in an experimental rhabdomyosarcoma in the rat. Eur.

J. Cancer. 3: 361-369, 1967.

HERMANS, A.F. & BARENDSEN, G.W. Changes of cell proliferation characteristics in a rat rhabdomyosarcoma before and after X-irradiation. Eur. J. Cancer. 5: 173-189, 1969.

HOLTON, P.W. A modification of the method of Dale and Laidlaw for standartization of posterior pituitary extract. Br. J. Pharmac. Chemoter. 3: 328, 1948.

HORAI, T. NISHIHARA, H., TATEISHI, R., MATSUDA, M. & HATTORI, S. Oat-cell carcinoma of the lung simultaneously producing ACTH and serotonin. J. Clin. Endocrinol. Metab. 37: 212-219, 1973.

HOWARD, A. & PELC, S. Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. Heredity (suppl.) 6: 261-273, 1953.

HILF, R., MICHEL, J., BELL, J.J. & BORMAN, A. Biochemical and morphological properties of a new lactating mammary tumor line in the rat. Cancer Res. 25: 286-299, 1965.

HUGGINS, C., BRIZIARELLI, G. & SUTTON, H. Rapid induction of mammary carcinoma in the rat and the influence of hormones on the tumors. J. Exp. Med. 104: 25-41, 1959.

HUGGINS, C. & HODGES, C.V. Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, estrogen and androgen infection on serum phosphatase in metastatic carcinoma of the prostate. Cancer Res. 1: 293-297, 1941.

HUGGINS, C., SCOTT, W.E., HOSGES, C.V. Studies on prostatic cancer. III. The effects of fever of desoxycorticosterone

- and of estrogen on clinical patients with metastatic carcinoma of the prostate. J. Urol. 46: 997-1006, 1941.
- HSU, S.M., RAINE, L. & FANGER, H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. Am. J. Clin. Pathol. 75: 816-821, 1981.
- ISAACSON, P., JONES, D.B., MILLWARD-SADLER, G.H., JUDD, M.A. & PAYNE, S. Alpha-1-antitrypsin in human macrophages. J. Clin. Pathol. 34: 982-990, 1981.
- IVERSEN, O.H. What is new in endogenous growth stimulators and inhibitors (chalcones). Path. Res. Pract. 180: 77-80, 1985.
- IVERSEN, O.H., IVERSEN, V., ZIEGLER, J.L. & BLUMING, A. Cell kinetics in Burkitt lymphoma. Eur. J. Cancer. 10: 155-163, 1974.
- IWASAKI, H., KIKUCHI, M. TAKII, M. & INJOJI, M. Benign and malignant fibrous histiocyctomas of the soft tissue: functional characterization of the cultured cells. Cancer. 50: 520-530, 1982.
- JAMRA, M. & LORENZI, T.F. Leucócitos, leucemias, linfomas, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan p. 8-24, 1983.
- JOHNSON, K.H., GHOBRIAL, H.K.G., BUOEN, L.C., BRAND, I. & BRAND, K.G. Nafibroblastic origin of foreign body sarcomas implicated of histological and electron microscopic. Cancer. Res. 33: 3139-3154, 1973.
- JORDAN, V.C., ALLEN, K.E. & DIX, C.J. The pharmacology of tamoxifen in laboratory animals. Cancer Treat. Rep. 64: 745-759, 1980.

- KEARNEY, M.M., SOULE, E.H. & IVINS, J.C. Malignant fibrous histiocytoma: A retrospective study of 167 cases. Cancer. 45: 167-178, 1980.
- KAUFFMAN, S.L. & STOUT, A.P. Histiocytic tumors (Fibrous xanthoma and histiocytoma) in children. Cancer. 14:469-482, 1961.
- KEMPSON, R.L. & KYRIAKOS, M. Fibroxanthosarcoma of the soft tissues. A type of malignant fibrous histiocytoma. Cancer. 29: 961-976, 1972.
- KINDBLOM, L.G., JACOBSEN, G.K. & JACOBSEN, M. Immunohistochemical investigations origin. Hum. Pathol., 13: 834-840, 1982.
- KONISHI, Y., MARUYAMA, H., MII, Y., MIYAUCHI, Y., YOKOSE, Y. & MASUHARA, K. Malignant fibrous histiocytomas induced by 4 - (hydroxyamino) quinoline-1-oxide in rats. J. Natl. Cancer Inst. 68: 859-865, 1982.
- KOROLY, M.J. & YOUNG, M. Nerve growth factor. In: BASERGA, R. ed. Tissue Growth Factors. Handb Exp. Pharm. Berlin - Heidelberg - New York. Springer-Verlag, 1981, v. 57, p. 249-277.
- KHAR, A. Development and characterization of a rat histiocyte - macrophage tumor line. J. Natl. Cancer Inst. 76(5). 871-878, 1986.
- KLEIN, H.O. Cell kinetic alterations in normal and neoplastic cell populations "in vitro" and "in vivo" following Vincristine. Cell Tissue Kinet. 13: 425-434, 1980.

LAGACE, R., DELAGE, C. & SEEMAYER, T.A. Myxoid variant of malignant fibrous histiocytoma. Ultrastructure observations. Cancer. 43: 526-534, 1979.

LAIRD, A.K. Dynamics of tumors growth. Br. J. Cancer. 18: 490-502, 1964.

LAIRD, A.K. Dynamics of tumour growth: comparison of growth rates and extrapolation of growth curve to one cell. Br. J. Cancer. 19: 278-291, 1965.

LAJTHA, L.G. On the concep of the cell cycle. J. Cell. Comp. Physiol. 62 (suppl.1): 143-145, 1963.

LALA, P.K. Studies on tumor cell population kinetics. In: BUSCH, H. ed. Methods in Research. New York. Academic Press, 1971. v.6, p. 3-95.

LALA, P.K. Age-specific changes in the proliferation of Ehrlich ascites tumour cells grown as solid tumours. Cancer. Res. 32: 628-636, 1972.

LAZARIDES, E. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. Nature, 283: 249-256, 1980.

LEAKE, R. Steroid receptores in normal and cancer tissue. In: STOLL, B.A. ed. Hormonal Managment of Endocrine Related Cancer. London. Lloyd Luke, 1981, p. 3-12.

LI, J.J., CUTHBERTSON, T.L. & LI, S.A. Inhibition of estrogen tumorigenesis in the Syrian golden hamster kidney by anti-estrogen. J. Natl. Cancer Inst. 64: 795-800, 1980.

LI, C.Y., LAM, K.W. & YAM, L.T. Esterases in human leukocytes. J. Histochem. Cytochem. 21(1): 1-12, 1973.

- LIAO, S. & CHEN, C. Mechanism of action of androgens in the prostate. In: GHANADIAN, R. ed. The Endocrinology of Prostate Tumours. Boston. MTP Press Limited, International Medical Publishers, 1982, cap. 7. p. 143-169.
- LIPPMAN, M.E., HALTERMAN, R.H., LEVENTHAL, B.G. PERRY, S. & THOMPSON, E.B. Glucocorticoid binding protein in human acute lymphoblastic leukemic blast cells. J. Clin. Invest. 52: 1716-1725, 1973.
- LIPSETT, M.B., ODELL, W.D., ROSENBERG, L.E. & WALDMANN, T.A. Humoral syndromes associated with nonendocrine tumors. Ann. Intern. Med. 61: 733, 1964.
- LORENZI, T.F., PEREIRA, E.S. & GENTER, G. Métodos de coloração das células do sangue e da medula óssea. São Paulo, Fundação Maria Cecília Souto Vidigal - Instituto de Hematologia, 1985.
- MAGNUS, R. Versuche an Überleben den Dunndarm von Säugetieren I. Mitterlung. Arch. F.D. Gr. Physiol. 102: 123, 1904.
- MAINWARRING, W.I.P. Androgen receptors in the future management of carcinoma of carcinoma of the prostate. In: THOMPSON, E.B. & LIPPMAN, M.E. ed. Steroid Receptors and the Management of Cancer. Boca Raton, CRC. Press, 1979. v.1, p. 99-111.
- MALACHI, T., CHAIMOFF, C.H., FELLER, N. & HALBRECI, I. Prostaglandin E_2 and cyclic AMP in tumor and plasma of breast cancer patients. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 102: 71-79, 1981.

- MARKLAND, F.S., CHOPP, R.T., COSGROVE, M.D. & HOWARD, E. B.
 Characterization of steroid hormone receptors in the
 Dunning R-3327 rat prostatic adenocarcinoma. Cancer Res.
38: 2818-2826, 1978.
- MASON, D.Y. & TAYLOR, C.R. The distribution of muramidase
 (lysozyme) in human tissues. J. Clin. Pathol., 28:124-132,
 1975.
- MATTHEWS, N. Tumour-necrosis factor from the rabbit. II.
 Production by monocytes. Br. J. Cancer 38(2): 310-315, 1978.
- MATTHEWS, N. & WATKINS, J.F. Tumour-necrosis factor from the
 rabbit. I. Mode of action, specificity and physicochemical
 properties. Br. J. Cancer. 38(2): 302-309, 1978.
- MAURER, L.H. Ectopic hormone syndromes in small carcinoma of
 the lung. In: SPIRO, S.G. ed. Small Lung Cell Carcinoma.
 Clinics In Oncology. London-Philadelphia - Toronto, W. B.
 Saunders Co., 1985. v. 4(1), p. 67-83.
- MAZIA, D. Mitosis and the physiology of cell division. In:
 BRACHET, J. and MIRSKY, A.E. ed. The Cell. London, New
 York, Academic Press, 1961. v. III.
- MCCREDIE, J.A., INCH, W.R., KRUUV, J. & WATSON, T.A. The rate
 of growth of tumours in animals. Growth, 29: 331-347, 1965.
- MCCREDIE, J.A. & SUTHERLAND, R.M. Differences in growth and
 morphology between spontaneous (3H mammary carcinoma and
 its syngeneic transplants. Cancer. 27: 635-642, 1971.
- MENDELSON, M.L. The growth fraction: a new concept applied
 to tumors. Science 132: 1496, 1960.

- MCGUIRE, W.L., HORWITZ, K.B., ZAVA, D.T. GAROLA, R.E. & CHAMNESS, G.C. Hormones in Breast Cancer: update 1978. Metabolism, 27; 487-501, 1978).
- MCGUIRE, W.L., JULIAN, J.A. & CHAMNESS, G.C. A dissociation between ovarian dependent growth and estrogen sensitivity in mammary carcinoma. Endocrinology 89: 969-980, 1971.
- MENGEL, C.E. The carcinoid syndrome. In: HOLLAND, J.F. & FREI, III. E. ed. Cancer Medicine. Philadelphia, Lea and Febiger, 1982, p. 1818-1827.
- MERKOW, L.P., FRICH, J.C., SLIFKIN, M., KYREAGES, C.G. & PARDO, M. Ultrastructure of a fibroxanthosarcoma (malignant fibroxanthoma). Cancer. 28: 372-383, 1971.
- METCALF, D., Hemopoietic colony stimulating factors. In: BASERGA, R. ed. Tissue Growth Factors. Handb. Exp. Pharm. Berlin - Heidelberg. New York, Springer-Verlag, 1981, v. 57, p. 343-384.
- MEYER, J.S. & DONALDSON, R.C. Growth kinetics of squamous cell carcinoma in man. Arch. Pathol. 87: 479-490, 1969.
- MORLEY, A.R., WRIGHT, N.A. & APPLETON, D. Cell proliferation in the castrate mouse seminal vesicle in response to testosterone proprionate. Cell Tissue Kinet. 6: 239-246, 1973.
- MOTOI, M., STEIN, H. & LENNERT, K. Demonstration of lysozyme, alpha-1-antichymotrypsin, alpha-1-antitrypsin, albumin, and transferrin with the immunoperoxidase method in lymph nodes cells. Virchows Arch. B. Cell. Pathol. 35: 73-82, 1980.

- MUGGIA, F.M., KREZOSKI, S.K. & HANSEN, H.H. Cell kinetic studies in patients with small cell carcinoma of the lung. Cancer. 34: 1683-1690, 1974.
- MURPHY, W.K., LIVINGSTON, R.B., RUIZ, V.G., GERCOVICH, F.G., GEORGE, S.L., HART, J. S. & FREIREICH, E.J. Serial labelling index determination as a predictor of response in human solid tumors. Cancer Res. 35: 1438-1444, 1975.
- OBERLING, C. El cancer, Buenos Aires, Ed. Universitária de Buenos Aires, 1961.
- O'BRIEN, J.E. & STOUT, A.P. Malignant fibrous xanthomas. Cancer. 17: 1445-1455, 1964.
- ODELL, W.D. & WOLFSEN, A.R. Hormones from tumors: are they ubiquitous ? Am. J. Med. 68: 317-318, 1980.
- OZELLO, L., STOUT, A.P. & MURRAY, M.R. Cultural characteristics of malignant histiocytomas and fibrous xanthomas. Cancer. 16: 331-344, 1963.
- OZELLO, L. & HAMELS, J. The histiocytic nature of dermatofibrosarcoma protuberans: Tissue culture and electron microscopic study. Am. J. Clin. Pathol. 65: 136-148, 1976.
- PAINTER, R.B. & DREW, R.N. Studies on desoxyribonucleic acid metabolism in human cancer cultures. (He La). Lab. Invest. 8: 278-285, 1959.
- PAUL, F. Cell and tissue culture. New York, Churchill Livingstone, 1975, cap. 18, p. 306-321.
- PRADHAN, S.N. CHUNG, E.B., GHOSH, B., PAUL, B.D. & KAPADIA, G.J. Potencial carcinogens I. Carcinogenicity of some

- plant extracts and their Tannin-containing fractions in rats. J. Natl. Cancer Inst. 52: 1579-1582, 1974.
- PRESCOTT, D.M. Regulation of cell reproduction. Cancer Res. 38: 1815-1820, 1968.
- QUADRI, S.K., LU, K.H. & MEITES, J. Ergot-induced inhibition of pituitary tumour growth in rats. Science. 176: 417-418, 1972.
- QUASTLER, H. & SHERMAN, F.G. Cell proliferation kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. Exp. Cell. Res. 17: 420-438, 1959.
- RAPP, F., O'CONNOR, T.E. Virology. In: HOLLAND, J.F. & FREI, III. E. ed. Cancer Medicine. Philadelphia. Lea and Febiger, 1982, p. 13-42.
- REFSUN, S.B. & BERDAL, P. Cell loss in malignant tumours in man. Eur. J. Cancer. 3: 235-236, 1967.
- REISKIN, A.B. & MENDELSON, M.L. A comparison of DNA synthesis in induced carcinoma and their normal counterpart. Cancer Res. 24: 1131-1136, 1964.
- RICHARDS, J.E., SHYMALA, G. & NANDI, S. Estrogen receptor in normal and neoplastic mouse mammary tissues. Cancer Res. 34: 2762-2772, 1974.
- ROBERTSON, P.R., BAYLINK, D.J., METZ, S.A. & CUMMINGS, K. B. Plasma prostaglandin E in patients with cancer with and without hypercalcemia. J. Clin. End. Metab. 43: 1330-1335, 1976.
- ROBINSON, M.R.G. Carcinoma of the prostate - Hormonal thera

py. In: FURR, B.J.A. ed. Hormone Therapy: Clinics in Oncology. London. Philadelphia, - Toronto, W.B. Saunders Co., 1982. v. 1(1), p. 233-243.

ROCHA E SILVA, M. Kinin Hormones, with a special reference to bradykinin and related kinins. Kugelmass, N.F. ed. Charles C. Thomas publisher, Springfield. Illinois - USA, 1970.

ROCKWELL, S., FRINDEL, E. & TUBIANA, M. A technique for determining the proportion of clonogenic cells in S phase in EMT6 cell cultures and tumors. Cell Tissue Kinet. 9: 313-324, 1976.

ROSS, R. The Platelet derived growth factor. In: BASERGA, R. ed. Tissue Growth Factors. Handb. Exp. Oharm. Berlin - Heidelberg - New York, Springer-Verlag, 1981, v. 57, p. 133-160.

SADDOFF, L., WINKLEY, J. & TYSON, S. Is malignant melanoma an endocrine dependent tumor ? Oncology. 27: 244-257, 1973.

SEKIYA, S., TAKAMIZAWA, H., WANG, F., TAKANE, T. & KUWATA, T. In vivo and in vitro studies on uterine adenocarcinoma of the rat induced by 7,12-dimethybenz (a) anthracene. Am. J. Obst. Gyn. 113: 691-695, 1972.

SHIMKIN, M.B. & TRIOLO, V.A. Hystory of chemicals carcinogenesis some prospectives remarks. Prog. Exp. Tumor Res. 11:1, 1969.

SHIRAKAWA, S., LUCE, J.K., TANNOCK, I. & FREI, E. III. Cell proliferation in human melanoma. J. Clin. Invest. 49:1188-

1199, 1970.

SHYAMALA. G. Estradiol receptors in mouse mammary tumors: absence of the transfer of bound estradiol from the cytoplasm to the nucleus. Bioch. Bioph. Res. Comm. 46: 1123-1629, 1972.

SIMPSON-HERREN, L. BLOW, J.G. & BROWN, P.A. The mitotic cycle of sarcoma 180. Cancer Res. 28: 724-726, 1968.

SIMPSON-HERREN, L. & GRISWOLD, D.P. Studies of the cell population kinetics of induced and transplanted mammary adenocarcinomas in rats. Cancer Res. 33: 2415-2424, 1973.

SMOLEV, J.K., HESTON, W.D.W., SCOTT, W.W. & COFFEY, D.S. Characterization of the Dunninf R-3327H prostatic adenocarcinoma: an appropriate animal model for prostatic cancer. Cancer Treat. Rep. 61: 273-287, 1977.

SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. Statistical methods. The Iowa University Press. Iowa U.S.A. Sixth edition (1973).

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

SQUIRE, R.A., BRINKHOUS, K.M., PEIPER, S.C., FIRMINER, H.I., MANN, R.B. & STRANDBERG, J.D. Histiocytic sarcoma with a granuloma-like component occurring in a large colony of Sprague-Dawley rats. Am. J. Pathol. 105: 21-30, 1981.

STEEL, G.G. Growth Kinetics of Tumours - cell population kinetics in relation to the growth and treatment of cancer. Oxford, Clarendon Press, 1977, p. 5-55.

- STEEL, G.G. Cytokinetics of neoplasia. In: HOLLAND, J.F. & FREI, III. E. ed. Cancer Medicine, Philadelphia, Lea Febiger, 1982, p. 177-189.
- STEEL, G.G. & HANES, S. The technique of labelled mitosis: analysis by automatic curva-fitting, Cell Tissue Kinet. 4: 93-105, 1971.
- STELL, G.G. & LAMERTON, The growth rat of human tumours. Br. J. Cancer. 20: 74-86, 1966.
- STEWART, H.L. SNELL, K.C., DUNHAM, L.J. SCILYEN. M.S. Trans plantable and transmissible tumours of animal. Washington, Armed Forces Institute of Pathology, 1959.
- STOLL, B.A. Breast Cancer: rationale for endocrine therapy. In: STOLL, B.A. ed. Hormonal Managment of Endrocine Related Cancer. London, Lloyd, 1981, p. 77-91.
- STOLL, B.A. Perspectives on Hormonal Therapy in Cancer. In: FURR, B.J.A. ed. Hormone Therapy. Clinics in Oncology. London. Philadelphia. TORONTO, W.B. Saunders Co., 1982, v. 1(1), p. 3-19.
- SYKES, J.A.C. & MADDOX, J.S. Prostaglandin production by experimental tumors and effects of antiinflammatory compounds. Nature New Biology, 237(71):59-61, 1972.
- SYLVEN, B. & HOLMBERG, B. On the structure and biological effects of a newly-discovered cytotoxic polypeptide in tumour fluid. Eur. J. Cancer. 1: 199-202, 1965.
- TANNOCK, I.F. The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumour.

Br. J. Cancer. 22: 258-273, 1968.

TANNOCK, I.F. A comparison of cell proliferation parameters in solid and ascites Ehrlich tumors. Cancer Res. 29: 1527-1534, 1969.

TANNOCK, I.F. Population kinetics of carcinoma cells. capillary endothelial cells, and fibroblasts in a transplanted mouse mammary tumor. Cancer Res. 30: 2470-2476, 1970.

TANNOCK, I.F. & STEEL, G.G. Tumor growth and cell kinetics in chronically hypoxic animals. J. Natl. Cancer Inst. 45: 123-133, 1970.

TASHJIAN, A.H. Role of prostaglandin in the production of hypercalcemia by tumors. Cancer Res. 38: 4141-4144, 1978.

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

TAYLOR, J.H., WOODS, P.S., HUGHES, W.L. The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium labelled thymidine. Proc. Natl. Acad. Sci. 43: 122-128, 1957.

THRASCHER, J.D. & GREULICH, R.C. The duodenal progenitor population. I. Age-related increase in the duration in the cryptal progenitor cycle. J. Exp. Zool. 159: 39-44, 1965a.

THRASCHER, J.D. & GREULICH, R.C. The duodenal progenitor population. II. Age-related changes in size and distribution. J. Exp. Zool. 159: 385-393, 1965b.

THOMAS, D.B. The kinetics of cell population. In: BECK, F. &

- LLOYD, J.B. ed. The Cell in Medical Science. London. New York, Academic Press, 1974.
- THOMLINSON, R.H. & GRAY, L.H. The histological atructure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. Br. J. Cancer. 9: 539-549, 1955.
- TRIER, J.S. & BROWING, Th.D Epithelial cell renewal in cultured duodenal biopsies in celliac sprue. New Eng. J. Med. 283: 1245, 1970.
- TROMPIERI, N.M. Um estudo morfo-farmacológico do tumor TEGS-2047, sob o efeito de substâncias antiinflamatórias não esteróides. Fortaleza, 1984. Tese (Mestrado). Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina.
- TSUNEYOSHI, M., ENJOJI, M. & SHINOHARA, N. Malignant fibrous histiocyoma: An electron microscopic study of 17 cases. Virchows Arch. (Pathol.Anat.), 392: 135-145, 1981.
- WARD, J.M., KULWICH, B.A., REZNIK, G. & BERMAN, J.J. Malignant fibrous histiocyoma. An un usual neoplasm of soft-tissue origin in the rat that is different from the humancounterpart. Arch. Pathol. Lab. Med. 105: 313-316, 1981.
- WEISS, S.W. & ENZINGER, F.M. Malignant fibrous histiocyoma: An analysis of 220 cases. Cancer. 41: 2250-2266, 1978.
- WILLIAMS. M.A. Quantitative methods in biology. Pratical methods in electron microscopy. ed. GLAUERT, M.A. North - Holland Publishing Company. Amsterdan. New York - Oxford 6: 35, 1981.
- WRIGHT, N.A. Cell proliferation in the normal gastrointestinal

tract - Implications for proliferative responses. In APPLETON, D.R., SUNTER, J.P., WATSON, A.J. ed. Cell proliferation in the gastrointestinal tract. Pitman Medical, 1980.

WRIGHT, N.A., MORLEY, A.R. & APPLETON, D.R. Variation in the duration of mitosis in the crypts of Lieberkuhn of the rat; a cytokinetic study using Vincristine. Cell Tissue Kinet. 5: 351-364, 1972.

WRIGHT, N.A., WATSON, A.J., MORLEY, A.R., APPLETON, D.R. MARKS, J. & DOUGLAS, A.P. The cell cycle time in flat (avillous) mucosa of the human small intestine. GUT. 14: 603-606, 1973.

YAM, L.T., LI, C.Y. & CROSBY, W.H. Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. Am. J. Clin. Pathol. 55: 283-290, 1971.

YAMAGIWA, K. & ICHIKAWA, K. Experimental study of the pathogenesis of carcinoma. J. Cancer Res. 3: 1, 1918.

YOUNG, R.C. & De VITA, V.T. Cell cycle characteristics of human solid tumors in vivo. Cell Tissue Kinet. 3: 285-290, 1970.

YUMOTO, T., MORIMOTO, K. Experimental approach to fibrous histiocytoma. Acta. Pathol. Jpn. 30: 767-778, 1980.

ZUCOLOTO, S. Ruptura do mecanismo de controle da unidade cripta-vilosidade do epitélio do intestino delgado induzido pelo álcool em ratos alimentados com dieta sólida e em ratos alimentados com dieta líquida. Ribeirão Preto, 1982.

Tese (Livre-Docência). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina.

ZUCOLOTO, S., MUCCILO, G., WRIGHT, N.A. & ALISON, M.R. Chronic effects of alcohol on the epithelium of the small intestine using experimental models. Virchows Arch. (Cell Pathol). 49: 365-373, 1985.