

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
Departamento de Fisiologia e Farmacologia

**Avaliação da Hipertermoterapia Associada ao Paclitaxel,
5-Fluorouracil e 5-Fluorouracil mais Ácido Folínico no
Tumor de Walker 256 Implantado em Estômagos de Rato**

Paulo Ferdinando de Melo Oliveira

Fortaleza-Ceará

2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
Departamento de Fisiologia e Farmacologia

**Avaliação da Hipertermoterapia Associada ao Paclitaxel,
5-Fluorouracil e 5-Fluorouracil mais Ácido Folínico no
Tumor de Walker 256 Implantado em Estômagos de Rato**

Paulo Ferdinando de Melo Oliveira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Farmacologia do Departamento de Fisiologia
e Farmacologia da Faculdade de Medicina da
Universidade Federal do Ceará para obtenção do
título de Doutor

Orientador:

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho

Fortaleza-Ceará

2003

O49a Oliveira, Paulo Ferdinando de Melo

Avaliação da hipertermoterapia associada ao paclitaxel, 5-fluorouracil e 5-fluorouracil mais ácido folínico no tumor de Walker 256 implantado em estômagos de rato / Paulo Ferdinando de Melo Oliveira. – Fortaleza, 2003.

234 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho.
Tese (Doutorado). Universidade Federal do Ceará.
Faculdade de Medicina.

1. Hipertermia induzida. 2. Quimioterapia. 3. Carcinoma 256 de Walker. 4. Modelos animais. 5. Neoplasias gástricas. 6. Linfoma de pequenas células. I. Moraes Filho, Odorico (Orient.) II. Título.

CDD 616.994.33

**Avaliação da Hipertermoterapia Associada ao Paclitaxel,
5-Fluorouracil e 5-Fluorouracil mais Ácido Folínico no
Tumor de Walker 256 Implantado em Estômagos de Rato**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Farmacologia.

Data da Aprovação: **09 de Outubro de 2003**

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho
(Orientador)

Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro
(co-Orientador)

Prof. Dr. Lusmar Veras Rodrigues

Prof. Dr. Francisco Valdeci de Almeida Ferreira

Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos

Aos meus pais

Maria Núbia (in memoriam)

e

Manoel do Nascimento

Por tudo que fizeram por mim

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por ter me dado forças e saúde a fim de conseguir terminar este trabalho.

Ao Prof. Dr. **Manoel Odorico de Moraes Filho**, meu orientador, e antes de tudo colega e amigo, o meu mais sincero agradecimento, por todo este período de boa convivência e proficiente orientação, que me enriqueceu e que levarei sempre presente na minha formação.

Ao Prof. Dr. **Ronaldo de Albuquerque Ribeiro**, meu mais sincero agradecimento não só pela co-orientação, mas por sempre dispor de seu laboratório quando necessitei além de ser uma honra tê-lo em nossa banca.

Ao Prof. Dr. **Lusmar Veras Rodrigues** que, gentilmente aceitou participar desta banca, muito nos honra, nossos melhores agradecimentos.

Ao Prof. Dr. **Francisco Valdeci de Almeida Ferreira** pela gentileza em realizar os experimentos imunohistoquímicos deste trabalho, nossos agradecimentos. Muito nos honra tê-lo como integrante de nossa banca.

Ao Prof. Dr. **Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos** por de bom grado aceitar a participação nesta banca, em muito nos honra.

À minha esposa **Cristina** e aos meus filhos **Felipe, André e Mikhail**. Aqui não só os agradeço, mas também os reverencio, além de lhes pedir as mais sinceras desculpas por todo este período de ausência e falta que causei a toda a família devido à atenção dispensada a este trabalho.

A Profª. Dra. **Cláudia do Ó Pessoa** a quem sempre recorremos para ajuda em nosso trabalho e que sempre se dispôs solícita, nosso especial agradecimento.

Ao Prof. **Paulo Roberto Carvalho de Almeida** que não mediu esforços e dedicação no estudo minucioso das 400 lâminas deste trabalho, sempre com a mesma paciência, polidez e sabedoria. Realmente me faltam palavras para expressar o meu mais sincero agradecimento. A minha profunda admiração à sua pessoa.

À Profa. Dra. **Maria Elisabete Amaral de Moraes** e ao Dr. **Fernando Antônio Frota Bezerra** por me terem aceitado na Unidade de Farmacologia Clínica interinamente enquanto realizava este trabalho.

À Dra. **Ana Paula Negreiros Nunes Alves** pela disponibilidade e presteza ao realizar a imunohistoquímica dos experimentos de nosso trabalho, nossos agradecimentos.

À Dra. **Miren Maite Uribe Arregi** pela solicitude, polidez e presteza ao nos fornecer os dados estatísticos do Instituto do Câncer do Ceará, nosso apreço e agradecimento.

Ao **Instituto do Câncer do Ceará**, na pessoa de seu Diretor, o Prof. Dr. **Sérgio Ferreira Juçaba**, por nos ter fornecido as drogas deste experimento, a fim de que pudéssemos executá-lo, nosso sincero agradecimento.

Aos estudantes de medicina **Daniel Magalhães Pereira**, **Patrícia Macedo** e **Rafael Oliveira e Rafael Cardoso** que mantiveram o tumor de Walker *in vivo*, sem o qual não poderíamos executar este trabalho.

À Profa. Dra. **Sílvia Maria de Freitas** pelos relevantes serviços estatísticos prestados a este trabalho, sem os quais seria impossível concluí-lo, nossos sinceros agradecimentos.

Aos Drs. **Felipe dos Santos Dias Soares**, **Gabriel dos Santos Dias Soares**, **Daniel Mota Moura Fé** e **Renata Gomes Picciani** que, na primeira

fase deste trabalho (até então estudantes de medicina), muito contribuíram para a realização do mesmo, nossa eterna gratidão.

Aos estudantes de medicina **Germana Lopes do Nascimento**, **Germara Lopes do Nascimento**, **Litchia Lemna Pinheiro** e **Márcia Degobi Sousa** por suas inestimáveis contribuições a este trabalho, nossos agradecimentos.

A todos os **Docentes** do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, nossa imensa gratidão.

Ao Sr. **Aronay Salmon da Cruz Lobato** e à Sra. **Maria do Perpétuo Socorro Negreiros Oliveira**, funcionários do Serviço de Quimioterapia do Instituto do Câncer do Ceará que, sempre solícitos e educados, nos atendiam e nos forneciam as drogas que necessitávamos para a execução deste trabalho. O mínimo que posso dizer é muitíssimo obrigado.

A todos os funcionários e técnicos do Laboratório de Oncologia Experimental e da Unidade de Farmacologia Clínica, em especial às secretárias **Fábria Beserra Lima** e **Flávia Martins Aguiar**, bem como à secretária do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, **Sílvia Maria Azevedo Lima**, as quais, quando necessitei de seus préstimos, sempre me atenderam com enorme atenção.

Ao colega e amigo Prof. **Rômulo Augusto Feio Farias** que nunca mediu esforços para nos ajudar em nossos experimentos, notadamente nos estudos citogenéticos que, juntamente com o estudante de biologia **Bruno Coelho Cavalcante**, muito contribuíram neste trabalho, nosso agradecimento.

À Dra. **Maria Artemiza Portela de Almeida Cardoso**, veterinária, e ao Sr. **Bento Francisco de Oliveira**, não só pela dedicação ao Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, mas também pela ajuda inestimável e presteza em nos fornecer os animais, sem os quais seria impossível realizar este trabalho, nosso respeito e gratidão.

Ao Sr. **Francisco José Oliveira de Queiroz** pelo suporte técnico-fotográfico que nos foi prestado a fim de que as imagens fotográficas deste trabalho saíssem a contento, nosso agradecimento.

À Sra. **Silvana França dos Santos** pelo preparo e execução das mais de 400 lâminas analisadas neste trabalho. Sua ajuda foi primordial, nossos sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. **Lúcio Flávio Gonzaga da Silva**, colega de graduação e pós-graduação, tanto no Mestrado como no Doutorado, por seu grande caráter, meu agradecimento por ter partilhado de seu convívio.

Ao amigo Dr. **Fernando Xavier do Nascimento** que, ao compartilharmos das cirurgias, nos favoreceu e nos deu oportunidade para melhorar meu suporte financeiro e “agüentar o barco” até aqui, nossos sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. **Carlos Maurício de Castro Costa** por ter me permitido “invadir” seu gabinete e usufruir de seu funcionário e equipamentos (computador e impressora).

Ao Sr. **Sílvio Alves Costa** por seu dedicado e prestimoso trabalho de digitação desta tese, nosso pleno agradecimento.

*“Combati o bom combate,
terminei a minha carreira,
guardei a fé”*

(Paulo, 2Tm-7)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE TABELAS	xxii
LISTA DE ABREVIACÕES	xxiii
RESUMO	xxviii
ABSTRACT	xxix
INTRODUÇÃO	1
1. Relevância do Trabalho	1
2. Generalidades sobre Câncer Gástrico	3
2.1. Epidemiologia.....	3
2.1.1. Estatística do Câncer.....	3
2.2. Etiopatogenia.....	5
2.2.1. <i>Helicobacter pylori</i>	5
2.2.2. Fatores Genéticos do Câncer Gástrico.....	9
2.2.2.1. Genes Supressores Tumoriais e Moleculares de Ade- são Celular no Câncer Gástrico.....	11
2.2.3. Fatores Ambientais.....	14
3. Classificação do Câncer Gástrico	16
3.1. Patologia.....	19
3.2. Sintomatologia.....	19
4. Tratamento	20
5. Modelo Experimental	22
5.1. Generalidades.....	22
5.2. O Carcinossarcoma 256 de Walker.....	23
5.3. Características Histopatológicas do Tumor.....	24
5.4. Transplantabilidade do Tumor.....	25
5.5. Características Gerais do Consumo Energético dos Tumores Sólidos	26

	x
6. Hipertermia	27
6.1. Histórico.....	27
6.2. Fatores Básicos da Morte Celular por Hipertermia.....	28
6.2.1. Efeito Citotóxico da Hipertermia.....	28
6.2.2. Morte Celular por Hipertermia em Diferentes Fases do Ciclo Celular.....	29
6.2.3. Termotolerância como um Antagonismo de Morte Celular por Hipertermia.....	30
6.3. Fatores Especiais da Hipertermia <i>in vivo</i>	30
6.3.1. Indução de Alterações no Fluxo Sangüíneo e Microambiente Tumerais por Hipertermia >42°C.....	30
6.3.2. A Hipertermia “Moderada” Aumenta o Fluxo Sangüíneo Tumoral.....	32
6.4. Efeito Sinérgico da Hipertermia e Radiação.....	33
6.4.1. Radiossensibilização Térmica.....	33
6.4.2. Seqüência Radiação-Calor.....	34
6.5. Interação entre Hipertermia e Drogas.....	35
6.5.1. Quimiossensibilização Térmica.....	35
6.5.2. Diferentes Modos de Interação Droga-Calor.....	35
6.5.3. Seqüência Droga-Calor.....	37
6.5.4. Farmacocinética das Drogas Aplicadas Sincronicamente à Hipertermia.....	38
6.6. Efeitos Celulares da Hipertermia.....	39
6.6.1. Membrana Celular e Citoesqueleto.....	39
6.6.2. Proteínas Celulares e Ácidos Nucléicos.....	40
6.6.3. Proteínas do Choque Térmico (HSP).....	42
6.7. Características da Morte Celular por Hipertermia.....	42

	xi
6.7.1. Diferentes Tipos de Morte Celular.....	42
6.7.2. Apoptose Induzida por Hipertermia.....	43
6.8. Mudanças na Imunoresposta Celular Induzida por Hipertermia.....	45
6.8.1. Efeitos pré-Clínicos do Calor sobre Linfócitos e Tumores Experimentais.....	45
6.8.2. Mudanças Imunológicas em Pacientes com Câncer Tratados com Hipertermia de Corpo Inteiro (WBH).....	46
6.9. Modulação de Resistência à Droga por Hipertermia.....	49
6.9.1. Reversão de Resistência à Droga Induzida por Hipertermia....	49
6.9.2. Termotolerância está Frequentemente Associada com Resis- tência à Droga.....	49
6.9.3. O Papel da Hipertermia é Reverter ou Induzir a Resistência às Drogas.....	50
7. Drogas Utilizadas em Associação com a Hipertermia.....	51
7.1. Paclitaxel (Taxol®).....	51
7.2. 5-FU (5-Fluorouracil).....	52
7.3. Ácido Folínico (Leucovorin®).....	53
8. Progressão Tumoral.....	55
OBJETIVOS.....	59
1. Gerais.....	59
2. Específicos.....	59
MATERIAIS E MÉTODOS.....	61
1. Drogas e Reagentes.....	61
2. Paclitaxel (Taxol®).....	62
2.1. Química.....	62
2.2. Mecanismo de Ação.....	62

2.3. Farmacoclinica e Farmacocinética.....	63
2.4. Dosagem e Programação.....	63
2.4.1. Quando administrado para o tratamento do câncer de ovário epitelial.....	63
2.4.2. Quando administrado em animais (ratos).....	64
3. 5-Fluorouracil (5-FU).....	64
3.1. Química.....	64
3.2. Mecanismo de Ação.....	64
3.3. Farmacoclinica e Farmacocinética.....	65
3.4. Dosagem e Programação.....	66
3.4.1. Quando administrado para o tratamento do câncer de cólon Duke C.....	66
3.4.2. Quando administrado para o tratamento do câncer cervical recorrente.....	66
3.4.3. Quando administrado em animais (ratos).....	66
4. Ácido Folínico (Leucovorin®) (fator <i>citrovorum</i>).....	66
4.1. Química.....	66
4.2. Mecanismo de Ação.....	67
4.3. Farmacoclinica e Farmacocinética.....	68
4.4. Dosagem e Programação.....	68
4.4.1. Quando administrado em seres humanos.....	68
4.4.2. Quando administrado em animais (ratos).....	68
4.5. Indicações de Uso do Ácido Folínico (Leucovorin®).....	69
5. Material Cirúrgico.....	70
6. Vidraria.....	70
7. Materiais Diversos.....	70
8. Equipamentos.....	71
9. Animais.....	72

10. Anestesia	72
11. Tumor	72
12. Preparação do Inóculo e Repicagem	73
13. Implante do Tumor no Estômago	73
14. Grupos de Tratamento	75
15. Técnica Hipertérmica	77
16. Técnica Quimioterápica	77
17. Estudos Morfológicos	78
18. Lavagem e Esterilização do Material	78
19. Técnica Citogenética para Tumor de Walker 256 Ascítico	78
19.1. Lâmina (previamente gelada em H ₂ O destilada).....	79
19.2. Adaptações.....	80
20. Contagem de Cromossomos	80
21. Documentação Fotográfica	80
22. Análise Estatística	80
22.1. Taxol®, 5-FU e Leucovorin®.....	80
22.2. Leucovorin® apenas.....	81
RESULTADOS	82
1. Paclitaxel (Taxol®)	82
1.1. Experimentais.....	82
1.2. Histopatológicos.....	87
1.3. Imunohistoquímicos.....	93
2. 5-Fluorouracil (5-FU)	94
2.1. Experimentais.....	94
2.2. Histopatológicos.....	98
2.3. Imunohistoquímicos.....	102

	xiv
3. Ácido Folínico (Leucovorin®) (LEU)	103
3.1. Experimentais.....	103
3.2. Histopatológicos.....	112
4. Progressão Tumoral	125
DISCUSSÃO	133
1. Paclitaxel (Taxol®)	133
2. 5-Fluorouracil (5-FU)	140
3. Ácido Folínico (Leucovorin®) (LEU)	142
4. Progressão Tumoral	150
CONCLUSÕES	158
1. Paclitaxel (Taxol®)	158
2. 5-Fluorouracil (5-FU)	158
3. Ácido Folínico (Leucovorin®) (LEU)	158
4. Progressão Tumoral	158
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	159
ANEXOS	203

LISTA DE FIGURAS

Figura A	Estrutura química do Paclitaxel (Taxol®).....	62
Figura B	Estrutura química do 5-Fluorouracil.....	64
Figura C	Estrutura Química do Ácido Folínico (Leucovorin®).....	67
Figura D	Metabolismo do 5-Fluorouracil + Ácido Folínico.....	69
Figura E	Inoculação e Manutenção do carcinossarcoma de Walker 256.	74
Figura 1	Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para todos os grupos (Controle e Taxol).....	83
Figura 2	Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para todos os grupos, exceto Controle e Taxol no 3º dia.....	84
Figura 3	Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para os grupos Taxol no 3º dia e Taxol no 3º dia + HT no 3º dia.....	84
Figura 4	Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para os grupos Taxol no 7º dia e Taxol no 7º dia + HT no 7º dia.....	85
Figura 5	Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para os grupos Taxol no 10º dia e Taxol no 10º dia + HT no 10º dia.....	85
Figura 6	Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para os grupos Taxol no 3º dia e Taxol no 7º dia.....	86
Figura 7	Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para os grupos Taxol no 3º dia e Taxol no 10º dia + HT no 10º dia.....	86
Figura 8	Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para os grupos Taxol no 3º dia e Taxol no 7º dia + HT no 7º dia.....	87
Figura 9	Muscular da mucosa separa nitidamente o tumor da mucosa. Tratamento com Taxol + HT no 3º dia (HE) 200X.....	88
Figura 10	Tumor infiltra a musculatura com células fusiformes (sarcoma). Tratamento com Taxol no 10º dia (HE) 200X.....	88

Figura 11	Tumor em toda a espessura da parede gástrica, áreas de necrose na mucosa. Tratamento com Taxol + HT no 3 ^o dia (HE) 40X.....	89
Figura 12	Tumor com extensas áreas de necrose e hemorragia. Tratamento com Taxol + HT no 10 ^o dia (HE) 200X.....	89
Figura 13	Tumor na submucosa, vaso hiperemiado, com linfócitos circundantes. Tratamento com Taxol (HE) 200X.....	90
Figura 14	Tumor invade o pâncreas, entremeando-se aos ácinos. Tratamento com Taxol no 3 ^o dia (HE) 200X.....	90
Figura 15	Tumor infiltra o tecido adiposo com células poligonais (epitelióide). Tratamento com Taxol + HT (HE) 100X.....	91
Figura 16	Tumor apresentando corpos apoptóticos (seta). Tratamento com Taxol + HT no 3 ^o dia (HE) 400X.....	91
Figura 17	Ninhos de células tumorais (setas) em meio à extensa hemorragia. Tratamento com Taxol + HT no 3 ^o dia (HE) 200X.....	92
Figura 18	Tumor em pequenos agrupamentos (setas) em meio à extensa hemorragia. Tratamento com Taxol + HT no 10 ^o dia (HE) 100X.	92
Figura 19	Tumor 100% vimentina positiva. Tratamento com Taxol + HT no 3 ^o dia. IHQ: vimentina.....	93
Figura 20	Tumor 100% queratina negativa. Tratamento com Taxol. IHQ: queratina.....	93
Figura 21	Tumor 40% vimentina positiva. Tratamento com Taxol + HT no 3 ^o dia. IHQ: vimentina.....	94
Figura 22	Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para todos os grupos (Controle e QT5FU).....	96
Figura 23	Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para os grupos Controle e QT5FU no 3 ^o dia.....	96
Figura 24	Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para os grupos Controle e QT5FU + HT no 7 ^o dia.....	97

Figura 25	Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para os grupos Controle e QT5FU no 10 ^o dia.....	97
Figura 26	Tumor com necrose coagulativa extensa. Contornos celulares e nucleares preservados. Tratamento com 5-FU no 3 ^o dia (HE) 100X.....	98
Figura 27	Tumor entre as glândulas da mucosa (setas), destruindo-as. Tratamento com 5-FU no 3 ^o dia (HE) 400X.....	99
Figura 28	Tumor com células poligonais (epitelióides). Presença de células fusiformes (mesenquimais) Tratamento com 5-FU no 7 ^o dia (HE) 200X.....	99
Figura 29	Tumor com extensa necrose. Há lise tumoral. Tratamento com 5-FU no 7 ^o dia (HE) 100X.....	100
Figura 30	Tumor infiltrando o pâncreas. Há pouca necrose. Tratamento com 5-FU no 7 ^o dia (HE) 200X.....	100
Figura 31	Hemorragia intratumoral. Tratamento com 5-FU + HT no 10 ^o dia (HE) 100X.....	101
Figura 32	Tumor com hemorragia à esq. Muscular da mucosa ao meio. Edema representa a mucosite focal à dir. Tratamento com 5-FU no 10 ^o dia (HE) 200X.....	101
Figura 33	Tumor 100% vimentina positiva em toda sua extensão, exceto mucosa. Tratamento com 5-FU. IHQ: vimentina.....	102
Figura 34	Tumor 100% queratina negativa, com controle queratina positiva à dir. Tratamento com 5-FU no 7 ^o dia. IHQ: queratina....	102
Figura 35	Tumor 100% vimentina positiva. Presença de célula de Langerhans (vimentina +) (seta). Tratamento com 5-FU no 7 ^o dia. IHQ: vimentina.....	103
Figura 36	Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para todos os grupos (Controle, 5FU+LEU e 5FU+LEU+HT).....	104

Figura 37	Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para os grupos Controle e (5FU) + (LEU) no 7 ^o dia.....	105
Figura 38	Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para os grupos Controle e (5FU) + (LEU) no 10 ^o dia.....	105
Figura 39	Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para os grupos Controle e (5FU+LEU) + HT no 3 ^o dia.....	106
Figura 40	Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para os grupos Controle e (5FU+LEU) + HT no 7 ^o dia.....	106
Figura 41	Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para os grupos Controle e (5FU+LEU) + HT no 10 ^o dia.....	107
Figura 42	Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para os grupos (5FU) + (LEU) no 3 ^o dia e (5FU+LEU) + HT no 3 ^o dia.....	108
Figura 43	Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para os grupos (5FU) + (LEU) no 7 ^o dia e (5FU+LEU) + HT no 7 ^o dia.....	109
Figura 44	Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para os grupos (5FU) + (LEU) no 10 ^o dia e (5FU+LEU) + HT no 10 ^o dia.....	110
Figura 45	Valores observados e valores médios da temperatura dos animais ao longo do tempo (min.) em cada grupo experimental....	111
Figura 46	Tumor com necrose da mucosa e submucosa (setas). Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 3 ^o dia (HE) 40X....	112
Figura 47	Tumor com necrose intensa. Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 3 ^o dia (HE) 100X.....	113
Figura 48	Tumor residual com reação inflamatória. Necrose na submucosa. Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 3 ^o dia (resposta parcial) (HE) 100X.....	113
Figura 49	Tumor invadindo a mucosa, submucosa e muscular, se estendendo até a JEG. Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 3 ^o dia (não houve resposta) (HE) 40X.....	114

Figura 50	Necrose na mucosa, submucosa e muscular. Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 3º dia (HE) 100X.....	114
Figura 51	Tumor não visualizado. Necrose da muscular própria e da submucosa. Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 3º dia (resposta completa) (HE) 100X.....	115
Figura 52	Vaso repleto de êmbolos tumorais (seta). Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 3º dia (HE) 200X.....	116
Figura 53	Tumor invadindo a submucosa (extensa necrose liquefativa), muscular e serosa. Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 3º dia (HE) 40X.....	116
Figura 54	Tumor invadindo essencialmente a musculatura e o tecido adiposo. Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 3º dia (HE) 100X.....	117
Figura 55	Tumor com intensa necrose. Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 7º dia (HE) 200X.....	117
Figura 56	Células tumorais no espaço porta e na luz da veia porta. Visão ducto biliar (seta). Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 7º dia (HE) 200X.....	118
Figura 57	Êmbolos tumorais em vasos na submucosa (seta). Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 7º dia (HE) 200X.....	118
Figura 58	Reação inflamatória fibrosante da submucosa. Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 7º dia (HE) 40X.....	119
Figura 59	Exudato inflamatório com predomínio de linfócitos. Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 7º dia (HE) 100X..	119
Figura 60	Presença de macrófagos (setas) e linfócitos. Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 7º dia (resposta completa) (HE) 200X.....	120

Figura 61	Necrose mínima da mucosa. Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 10º dia (HE) 200X.....	120
Figura 62	Tumor com bastante hemorragia. Tratamento com 5FU + LEU no 10º dia (HE) 100X.....	121
Figura 63	Presença de tumor na junção esôfago-gástrica. Tratamento com 5FU + LEU no 10º dia (HE) 40X.....	121
Figura 64	Junção esôfago-gástrica normal. Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 10º dia (resposta completa) (HE) 40X.....	122
Figura 65	Veia (seta) com êmbolos tumorais. Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 10º dia (HE) 200X.....	123
Figura 66	Tumor em todas as camadas. Veia com êmbolos na submucosa (seta). Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 10º dia (HE) 40X.....	123
Figura 67	Êmbolo tumoral em veia da submucosa (seta). Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 10º dia (HE) 200X.....	124
Figura 68	Infiltrado tumoral perineural (setas). Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 10º dia (HE) 100X.....	124
Figura 69	Tumor original mostra-se como neoplasia indiferenciada.....	125
Figura 70	Tumor original apresenta células indiferenciadas e pleomórficas.	126
Figura 71	Tumor original mostra-se como neoplasia de alto grau mitótico (setas).....	126
Figura 72	Tumor original apresenta células com picnose (setas).....	127
Figura 73	Tumor original apresenta células apoptóticas (setas).....	127
Figura 74	Tumor original apresenta células pleomórficas entre glândulas	128
Figura 75	Tumor original apresenta células pleomórficas e três mitoses atípicas (setas).....	128
Figura 76	Tumor original apresenta células de aspecto epitelióide e duas mitoses atípicas (setas).....	129

Figura 77	Tumor original apresenta células indiferenciadas entre glândulas	129
Figura 78	Tumor sob tratamento com 5-FU no 10 ^o dia apresenta invasão da mucosa, além de edema (mucosite focal).....	130
Figura 79	Tumor sob tratamento com 5-FU no 3 ^o dia apresenta invasão da mucosa gástrica, destruindo-a.....	130
Figura 80	Tumor sob tratamento com Taxol® + HT no 3 ^o dia apresenta invasão pancreática, além de células pleomórficas nos ácinos..	131
Figura 81	Cariótipo normal de rato (fibroblastos) com 42 cromossomos..	132
Figura 82	Cariótipo de célula tumoral (Walker 256) com 37 cromossomos.	132

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela I	Testes para a igualdade das curvas estimadas de Kaplan-Meier entre os grupos.....	82
Tabela II	Testes para a igualdade das curvas estimadas de Kaplan-Meier entre os grupos, exceto Controle e Taxol no 3 ^o dia.....	83
Tabela III	Testes para a igualdade das curvas estimadas de Kaplan-Meier entre os grupos.....	95
Tabela IV	Teste Log-Rank para a igualdade das curvas estimadas de Kaplan-Meier do Grupo Controle versus os demais grupos individualmente.....	95
Tabela V	Teste Log-Rank para a igualdade das curvas estimadas de Kaplan-Meier do Grupo Controle versus os demais grupos individualmente.....	104
Tabela VI	Teste Log-Rank para a igualdade das curvas estimadas de Kaplan-Meier do Grupo (5FU) + (LEU) no 3 ^o dia <i>versus</i> os demais grupos individualmente.....	107
Tabela VII	Teste Log-Rank para a igualdade das curvas estimadas de Kaplan-Meier do Grupo (5FU) + (LEU) no 7 ^o dia <i>versus</i> os demais grupos individualmente.....	108
Tabela VIII	Teste Log-Rank para a igualdade das curvas estimadas de Kaplan-Meier do Grupo (5FU) + (LEU) no 10 ^o dia <i>versus</i> os demais grupos individualmente.....	109
Tabela IX	Teste Log-Rank para a igualdade das curvas estimadas de Kaplan-Meier do Grupo (5FU+LEU) + HT no 3 ^o dia <i>versus</i> os demais grupos individualmente.....	110
Quadro I	Teste de Tukey para a comparação das médias ($\Delta_{5\%} = 1,16$)....	111

LISTA DE ABREVIACÕES

1p	- Braço curto do cromossomo 1
1q	- Braço longo do cromossomo 1
5,10-CH ₂ H ₄ PteGlu	- 5,10-metilenotetrahidrofolato
5-FdUMP	- 5-fluorodesoxiuridina monofosfato
5-FdUTP	- 5-fluorodesoxiuridina trifosfato
5-FU	- 5-Fluorouracil
7q	- Braço longo do cromossomo 7
ABC	- Complexo avidina-biotina-peroxidase
AJCC	- Comitê Americano Contra o Câncer
APC	- Gene supressor do câncer gástrico (<i>adenomatous polyposis coli</i>)
atm	- Atmosfera
ATP	- Adenosina trifosfato
Balb	- Raça de camundongos
bcl-2	- Oncogene relacionado à proliferação celular no câncer
bpm	- Batimentos por minuto
cagA	- Citotoxina gene A
CCNU	- Cloro-etil-ciclohexil-nitrosuréia
CD44	- Molécula de adesão celular
CDK	- Quinases dependentes de ciclina
c-erg-2	- Gene relacionado ao câncer gástrico
=CH-	- Unidade de carbono-único do grupo metenil
-CH ₂ -	- Unidade de carbono-único do grupo metileno
-CH ₃	- Unidade de carbono-único do grupo metil
CHO	- Células ovarianas de <i>hamsters</i> Chineses (<i>Chinese hamster ovary cells</i>)
-CHO	- Unidade de carbono-único do grupo formil

c-ki-ras	- Gene relacionado ao câncer gástrico
Cl ⁻	- Cloro iônico
c-met	- Gene relacionado ao câncer gástrico
c-myc	- Gene relacionado ao câncer
CSF	- Fator estimulador de colônia (<i>colony stimulating factor</i>)
D, t e T	- Variáveis Dose térmica/tempo/Temperatura
D7S95	- Locus do braço longo do cromossomo 7
DCC	- Gene supressor do câncer de cólon (<i>deleted colorectal cancer</i>)
DFP	- Departamento de Fisiologia e Farmacologia
DHFU	- Dihidrofluorouracil
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
dTMP	- Desoxitimidina monofosfato
dUMP	- Desoxiuridina monofosfato
e.g.	- Por exemplo (<i>exempla gratia</i>)
EGF	- Fator de crescimento epidérmico (<i>epidermal growth factor</i>)
EGFr	- Receptor de fator de crescimento epidérmico (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
FdUDP	- Fluorodesoxiuridina difosfato
FdUMP	- Fluorodesoxiuridina monofosfato
FdUrD	- Fluorodesoxiuridina
FGF- β	- Fator de crescimento de fibroblastos β (<i>fibroblast growth factor β</i>)
FH ₂	- Dihidrofolato
FH ₄	- Tetrahydrofolato
FRNA	- Ácido ribonucléico incorporado ao 5-FU
FUDP	- Fluorouracil difosfato
FUMP	- Fluorouracil monofosfato
FUTP	- Fluorouracil trifosfato
gl	- Graus de liberdade

Gy	- Unidade de medida de irradiação ionizante (gray)
H&E	- Hematoxilina-Eosina
<i>H. pylori</i>	- <i>Helicobacter pylori</i>
H ⁺	- Hidrogênio iônico
H ₁ e H ₂	- Tipos de bloqueadores histamínicos
H ₄ PteGlu ₁	- Tetrahydrofolato
HCO ₃ ⁻	- Bicarbonato iônico
HeLa	- Célula de colo de útero
HGF	- Fator de crescimento de hepatócitos (<i>hepatocyte growth factor</i>)
HIF	- Fator induzido por hipóxia (<i>hypoxia-inducible factor</i>)
HSF	- Fator de choque térmico (<i>heat shock factor</i>)
HSP	- Proteína de choque térmico (<i>heat shock protein</i>)
HT	- Hipertermia
i.m.	- Intramuscular
i.p.	- Intraperitoneal
i.v.	- Intravenosa
IARC	- International Agency for Research on Cancer
IFN- γ	- Interferon gama
IGF-I	- Fator de crescimento tipo insulina I (<i>insulin-like growth factor I</i>)
IGF-II	- Fator de crescimento tipo insulina II (<i>insulin-like growth factor II</i>)
IHM	- Imunohistoquímica
IL-1 α	- Interleucina 1 α
IL-10	- Interleucina 10
IL-2	- Interleucina 2
IL-6	- Interleucina 6
IL-8	- Interleucina 8
INCA	- Instituto Nacional do Câncer
JEG	- Junção esôfago-gástrica (cárdia)

JRSGC	- Japanese Research Society for Gastric Cancer
kcal/mol	- Unidade de medida de calorias (kilocaloria por mol)
kDa	- Unidade de medida de peso molecular (kilodalton)
KGF	- Fator de crescimento de queratinócitos
KM	- Teste estatístico Kaplan-Meier
k-sam	- Gene relacionado ao câncer gástrico
L-31	- Lectina ligadora de lactosídeo de 31-kd
LDH	- Lactato desidrogenase
LOE	- Laboratório de Oncologia Experimental da UFC
M, S, G1 e G2	- Fases do ciclo celular
MCF-7	- Tipo de adenocarcinoma mamário
MDR	- Multidroga-resistência
MFDU	- Monofosfato de desoxiuridilato
MFTM	- Monofosfato de timidilato
mL	- Mililitro
MS	- Ministério da Saúde
MTX	- Metotrexato
Na ⁺	- Sódio iônico
NK	- Tipo de linfócito (<i>natural killer</i>)
nm23	- Gene supressor de metástase
°C	- Grau centígrado (<i>Celsius</i>)
P388	- Tipo de célula leucêmica
P450	- Tipo de enzima hepática
p53	- Gene supressor do câncer gástrico
PABA	- Ácido para-aminobenzóico
PDGF- α	- Fator de crescimento derivado de plaquetas α (<i>platelet derived growth factor α</i>)

PET	- Tomografia por emissão de pósitrons (<i>positron emission tomography</i>)
pH	- Potencial hidrogênio-iônico
PPHC	- Perfusão peritoneal hipertérmica contínua
Pr	- Probabilidade
PVC	- Policloreto de vinila
PVPI	- Polivinilpirrolidona
R	- Constante da Dose térmica
RAT	- Razão de aumento térmico
RNA	- Ácido ribonucléico
RV	- Razão de verossimilhança
$\hat{S}(t), j, t_j, d_j$ e n_j	- Variáveis do teste Kaplan-Meier
SC(m ²)	- Superfície corporal em metros quadrados
SCID	- Raça de camundongos
SPM	- Sarcomas de partes moles
T4	- Linfócito T4
T8	- Linfócito T8
TGF- α	- Fator de crescimento transformante α (<i>transforming growth factor α</i>)
TGF- β D	- Fator de crescimento transformante β D (<i>transforming growth factor βD</i>)
TNM	- Classificação Tumor/Linfonodo/Metástase
TS	- Timidilato-sintase
UFC	- Universidade Federal do Ceará
UICC	- União Internacional Contra o Câncer
v.o.	- Via oral
vacA	- Citotoxina A vacuolada
WBH	- Hipertermia de corpo inteiro (<i>whole-body hyperthermia</i>)

RESUMO

Avaliação da hipertermoterapia associada ao paclitaxel, 5-fluorouracil e 5-fluorouracil mais ácido folínico no tumor de Walker 256 implantado em estômagos de rato. Paulo Ferdinando de Melo Oliveira. Orientador: Manoel Odorico de Moraes Filho. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará.

Introdução: As drogas quimioterápicas convencionais não têm obtido sucesso no tratamento do câncer gástrico. O paclitaxel (Taxol®) mostrou ser efetivo no tratamento dos cânceres de ovário, mama e pulmão. O 5-fluorouracil (5-FU) tem apresentado resultados promissores no tratamento do câncer de cólon. O ácido folínico (Leucovorin®) potencializa a citotoxicidade do 5-fluorouracil. Estudos desenvolvidos no Japão, Estados Unidos e Europa vêm sugerindo o uso de quimioterapia associada à hipertermia no controle da doença localmente avançada. **Objetivos:** Avaliar a influência do paclitaxel, 5-fluorouracil e 5-fluorouracil mais ácido folínico, isolados e associados à hipertermia, na sobrevida de ratos com tumor de Walker 256 implantados no estômago, e observar o comportamento do tumor de Walker 256 original implantado em estômagos de rato sem tratamento e submetidos aos tratamentos quimioterápicos propostos, associados à hipertermia. **Métodos:** Implantou-se o tumor de Walker 256 na mucosa gástrica de rato no 3^o, 7^o, e 10^o dias de inoculação do tumor. Os animais foram tratados com paclitaxel, 5-fluorouracil e 5-fluorouracil mais ácido folínico, isolados e associados à hipertermia. Foram administrados paclitaxel na dose de 25 mg/m², 5-fluorouracil na dose de 130 mg/m² e ácido folínico na dose de 7 mg/m². A Hipertermia de Corpo Inteiro foi iniciada 2 horas após a administração dos quimioterápicos, tendo duração de 1 hora. **Resultados:** Os animais inoculados com tumor apresentaram uma sobrevida de 13,25 ± 0,53. Os animais tratados com Paclitaxel isolado apresentaram sobrevida de 28,61 ± 0,82, 20,92 ± 1,77 e 20,07 ± 0,60 no 3^o, 7^o e 10^o dias, respectivamente, e aqueles tratados com Paclitaxel + hipertermia apresentaram sobrevida de 19,17 ± 1,20, 22,54 ± 1,47 e 17,92 ± 1,06 nos mesmos períodos. Os animais tratados com 5-fluorouracil isolado apresentaram sobrevida de 16,16 ± 0,52, 15,57 ± 0,57 e 17,94 ± 0,46 no 3^o, 7^o e 10^o dias, respectivamente, e aqueles tratados com 5-fluorouracil + hipertermia apresentaram sobrevida de 14,45 ± 0,36, 16,36 ± 0,81 e 18,37 ± 1,86 nos mesmos períodos. Os animais tratados com 5-fluorouracil + ácido folínico apresentaram sobrevida de 14,89 ± 0,71, 16,56 ± 0,91 e 16,11 ± 0,67 no 3^o, 7^o e 10^o dias, respectivamente, e aqueles tratados com 5-fluorouracil + ácido folínico + hipertermia apresentaram sobrevida de 17,60 ± 1,22, 15,42 ± 0,31 e 15,45 ± 0,39 nos mesmos períodos. **Conclusões:** O tumor experimental de Walker 256 é um tumor de pequenas células. A hipertermia associada à quimioterapia, com paclitaxel, 5-fluorouracil, 5-fluorouracil mais ácido folínico como tratamento do tumor de Walker experimental implantado nos estômagos de rato Wistar, não melhorou a sobrevida.

Palavras-Chave: hipertermia, quimioterapia, hipertermoterapia, tumor gástrico experimental, tumor de Walker, tumor de pequenas células.

ABSTRACT

Evaluation of the hyperthermotherapy associated with paclitaxel, 5-fluorouracil and 5-fluorouracil plus folinic acid on the Walker 256 tumor implanted in rat stomachs. Paulo Ferdinando de Melo Oliveira. Supervisor: Manoel Odorico de Moraes Filho. Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará.

Introduction: The conventional chemotherapy drugs have not obtained success on the treatment of gastric cancer. The paclitaxel (Taxol®) showed to be effective on treating lung, breast and ovarian cancer. The 5-fluorouracil (5-FU) has shown promising results on the treatment of colon cancer. The folinic acid (Leucovorin®) reinforces the 5-FU cytotoxicity. Studies developed in Japan, United States and Europe suggest the use of chemotherapy associated with hyperthermia on the control of locally advanced disease. **Objectives:** Evaluate the influence of paclitaxel, 5-fluorouracil and 5-fluorouracil plus folinic acid, isolated and associated with hyperthermia, on the survival of rats with Walker 256 tumor implanted on their stomach, and observe the behavior of the original Walker 256 tumor implanted in the stomach of rats with no treatment and with the proposed chemotherapy treatments associated with hyperthermia. **Methods:** The Walker 256 tumor was implanted on the mucous layer of the rat stomach on the 3rd, 7th and 10th day after inoculation. The animals were treated with paclitaxel, 5-fluorouracil and 5-fluorouracil plus folinic acid isolated and associated with hyperthermia. Paclitaxel 25 mg/m², 5-fluorouracil 130 mg/m² and folinic acid 7 mg/m² were used. The Whole-Body Hyperthermia was initiated 2 hours after the administration of the chemotherapeutic drugs, with 1 hour of duration. **Results:** The animals inoculated with tumor showed a survival of 13.25 ± 0.53 . The animals treated with Paclitaxel isolated showed a survival of 28.61 ± 0.82 , 20.92 ± 1.77 and 20.07 ± 0.60 in the 3rd, 7th and 10th days, respectively, and those treated with Paclitaxel + hyperthermia showed a survival of 19.17 ± 1.20 , 22.54 ± 1.47 and 17.92 ± 1.06 in the same periods. The animals treated with 5-fluorouracil isolated showed a survival of 16.16 ± 0.52 , 15.57 ± 0.57 and 17.94 ± 0.46 in the 3rd, 7th and 10th days, respectively, and those treated with 5-fluorouracil + hyperthermia showed a survival of 14.45 ± 0.36 , 16.36 ± 0.81 and 18.37 ± 1.86 in the same periods. The animals treated with 5-fluorouracil + folinic acid showed a survival of 14.89 ± 0.71 , 16.56 ± 0.91 and 16.11 ± 0.67 in the 3rd, 7th and 10th days, respectively, and those treated with 5-fluorouracil + folinic acid + hyperthermia showed a survival of 17.60 ± 1.22 , 15.42 ± 0.31 and 15.45 ± 0.39 in the same periods. **Conclusions:** The Walker 256 is a small cell tumor. The hyperthermia associated with chemotherapy using paclitaxel, 5-fluorouracil and 5-fluorouracil plus folinic acid as treatment of Walker experimental tumor implanted in Wistar rat stomachs do not improved the survival.

Key-words: hyperthermia, chemotherapy, hyperthermotherapy, experimental gastric tumor, Walker tumor, small cells tumor.

INTRODUÇÃO

1. Relevância do Trabalho

O câncer gástrico é a mais freqüente das neoplasias malignas do aparelho digestivo, de tal maneira que se configura como um grave problema de saúde pública em dimensões nacionais, e porque não dizer, até mesmo em certos países, tais como Japão, Chile, Finlândia e Islândia, sendo sua incidência menor nas Filipinas, Honduras e Estados Unidos. No Japão, corresponde a 40% de todas as neoplasias malignas, e nos Estados Unidos a apenas 5% (Muraro & Mantovani, 2000).

Sua taxa de mortalidade é de 45 casos por 100 mil habitantes no Japão, e de apenas 8 casos nos Estados Unidos (Muraro & Mantovani, 2000). No Brasil, as estimativas para a taxa bruta de mortalidade foram de 12 casos por 100 mil habitantes (International Agency for Research of Cancer – IARC, 2000). O tumor é mais freqüente no homem, na proporção de 2 para 1 (Muraro & Mantovani, 2000).

Nos anos 80, a incidência de câncer gástrico em Fortaleza era de 46,8 por 100 mil habitantes nos homens e 20,1 nas mulheres (Juaçaba *et al.*, 1984). Em 2002, a estimativa para o Ceará e Fortaleza foi de 11,88/100 mil para homens e 5,14/100 mil para mulheres (Brasil, 2002).

Há muito tem-se observado este declínio na incidência mundial. O Japão e o Chile, que nos anos 70 apresentavam uma incidência de 70-80 casos por 100 mil habitantes (Crumb *et al.*, 1970), hoje apresentam uma taxa bem menor de mortalidade (IARC, 2000). Nos Estados Unidos, a taxa de incidência, que era de 10/100 mil habitantes/ano, hoje está em torno de 8/100 mil. Esta diminuição na incidência é atribuída à refrigeração dos alimentos, à diminuição do uso do sal e ao menor consumo de alimentos defumados.

O Ceará, comparado aos demais Estados brasileiros, ainda apresenta índice de mortalidade elevado, haja vista que a taxa bruta, para homens, no Ceará e Fortaleza, que é de 7,03/100 mil, está acima da taxa da região nordeste, que é de 3,97/100 mil (Brasil, 2002).

O que é preocupante é a expectativa de vida destes pacientes que apresentam-se sem nenhum incremento nos últimos 20 anos. Além disso, a qualidade de vida desses pacientes torna-se bastante comprometida pela presença de síndromes dolorosas como consequência do processo patológico.

Aproximadamente 50% dos pacientes com câncer gástrico têm na dor aguda o sintoma primário. Outras vezes, a dor aguda surge após o diagnóstico ou se acentua com a confirmação deste, associando-se de forma desvantajosa a quadro depressivo, que advém com a confirmação da doença (Bonica, 1990).

Como a doença se apresenta e acomete em grande parte a população de baixa renda, notadamente no interior do nosso Estado, o agricultor, principal fonte de renda de sua família, após o acometimento da doença, se vê incapaz de novamente trabalhar, daí advindo uma depressão ainda maior, a qual repercute sobremaneira na sua sobrevivência.

Esses dados permitem configurar o câncer de estômago no Ceará como um grave problema de saúde pública. Encontra-se, portanto, diante de uma realidade que precisa ser enfrentada nos seus mais variados aspectos. Assim, procura-se desenvolver um trabalho que, na medida do possível, forneça subsídios para uma aplicabilidade imediata de novas condutas terapêuticas que possibilitem a perspectiva de minimizar essa grave realidade. Embasados numa extensa revisão bibliográfica, e na experiência de várias pesquisas, tais como Spratt em tumores de pâncreas (Spratt *et al.*, 1980), Sugarbaker no uso da quimioterapia intraperitoneal de maneira científica (Sugarbaker *et al.*, 1985) e Fujimoto na análise da ação antitumoral da hipertermoquimioterapia com mitomicina C e completa destruição das células neoplásicas no líquido peritoneal e no peritônio

(Fujimoto *et al.*, 1988), decide-se estudar a viabilidade da implementação da hipertermoterapia associada às terapêuticas quimioterápicas convencionais em tumores experimentais implantados em estômagos de rato. Embora muitas drogas já tenham demonstrado sinergismo com a hipertermoterapia, tais como mitomicina C (Fujimoto *et al.*, 1988), agentes alcalinos como fosfamida e ifosfamida, além dos compostos *platinum* (Oliveira, 1997; Hildebrandt *et al.*, 2002), a técnica da hipertermia associada à quimioterapia ainda necessita de um estudo mais aprofundado no seu detalhamento técnico, inclusive, numa visão histopatológica, através do desenvolvimento de um modelo experimental cujas condições permitam uma posterior adaptação para o emprego imediato em seres humanos.

2. Generalidades sobre Câncer Gástrico

2.1. Epidemiologia

2.1.1. *Estatística do Câncer*

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) do Ministério da Saúde (MS) estima para o ano de 2002, em todo o Brasil, a ocorrência de 337.535 novos casos de câncer e 122.600 óbitos devidos à doença. Desse total, 165.895 (49,1%) casos e 66.060 (53,9%) óbitos serão para o sexo masculino e 171.640 (50,9%) casos e 56.540 (46,1%) óbitos para o sexo feminino. Estima-se que o principal câncer a acometer a população brasileira será o câncer de pele não-melanoma (62.190 casos – 18,4%), seguido pelas neoplasias malignas da mama feminina (36.090 casos – 10,7%), câncer de próstata (25.600 casos – 7,6%), de pulmão (21.425 casos – 6,3%) e de estômago (20.420 casos – 6,0%) (Brasil, 2002).

A análise por sexo demonstra que as maiores taxas de incidência entre os homens serão devido ao câncer de pele não-melanoma (36,57/100 mil), próstata (29,76/100 mil), pulmão (17,45/100 mil) e estômago (16,14/100 mil),

enquanto que entre as mulheres, destacam-se as neoplasias malignas da mama (40,66/100 mil), câncer de pele não-melanoma (34,56/100 mil), colo do útero (19,82/100 mil), cólon e reto (11,04/100 mil) e estômago (7,38/100 mil) (Brasil, 2002).

As maiores taxas de mortalidade por câncer no Brasil em 2002, tendo em vista a localização primária, serão de 12,99/100 mil para o câncer de pulmão, primeira causa de morte nos homens, seguido de 9,14/100 mil para o câncer de próstata e 8,47/100 mil para o de estômago. Estima-se que o câncer de mama feminino (10,25/100 mil) será a primeira causa de morte nas mulheres, seguido pelo câncer de pulmão (5,29/100 mil), cólon e reto (4,59/100 mil), colo do útero (4,49/100 mil) e estômago (4,24/100 mil) (Brasil, 2002).

De maneira semelhante, a incidência de novos casos de câncer gástrico em mulheres no Brasil está como a quinta causa, assim como na estimativa de óbito.

Já no Estado do Ceará para 2002, a análise por sexo mostra que a taxa de incidência de novos casos de câncer gástrico entre os homens é de 11,88/100 mil, enquanto que entre as mulheres é de 5,13/100 mil. Já a taxa bruta de mortalidade entre os homens é de 7,03/100 mil, e entre as mulheres é de 4,04/100 mil (Brasil, 2002).

Portanto, se observa que a incidência de novos casos de câncer gástrico no Ceará em homens está como a terceira causa, ao passo que a estimativa de óbito é a segunda, só sendo superada pelo câncer de próstata. Já no tocante às mulheres, a incidência de novos casos é a quarta causa, enquanto que a estimativa de óbito é a segunda, somente sendo superada pelo câncer de mama (Brasil, 2002).

2.2. Etiopatogenia

Os fatores hereditários têm sido muito valorizados na sua etiopatogenia. Assim, sua incidência é 3-4 vezes maior entre os membros de uma mesma família. Napoleão Bonaparte, seu pai, um irmão e duas irmãs morreram de câncer gástrico. É também mais freqüente em pessoas do grupo sanguíneo A (Yamagata & Hisamichi, 1979a).

Quanto aos fatores preponderantes, os raciais têm sido relatados como importantes. A incidência é maior na raça amarela (Japão), assim como em negros do que em brancos nos Estados Unidos. Os fatores ambientais também têm sido mencionados na etiopatogenia da moléstia. Trabalhadores rurais e de minas de carvão, fumantes e populações que ingerem alimentação de alto risco têm sido mais acometidos por este tipo de neoplasia. É considerado de alto risco a ingestão de muito amido e de poucos vegetais e frutas frescas, assim como a alimentação rica em carboidratos e/ou pobre em micronutrientes, além da ingestão de pouca quantidade de proteínas. Outros fatores dietéticos importantes na gênese do câncer gástrico são: ingestão de alimentos defumados, peixes desidratados por sal e conservas de modo geral (Yamagata & Hisamichi, 1979b).

O consumo de carnes e peixes desidratados por processos de salgamento com nitrato e nitrito, respectivamente, também é apontado como favorecedor da neoplasia. Esses aspectos constituem hoje a chamada “Teoria da Nitrosamina”, pois essas substâncias nitrogenadas, na presença de hipo ou acloridria (que permitem a formação bacteriana), são substâncias mutagênicas, teratogênicas e carcinogênicas atuando sobre a síntese de DNA e aumentando a chance de mutação (Green *et al.*, 1988; Ichiyoshi *et al.*, 1990; Rosen, 1997).

2.2.1. *Helicobacter pylori*

O *Helicobacter pylori*, uma bactéria gram negativa e microaerófila, tem sido implicada como um possível agente promotor no desenvolvimento do

carcinoma gástrico. Esta associação está baseada no aumento da incidência da infecção por *H. pylori* na China, onde há uma alta taxa de câncer gástrico, e numa elevada incidência de infecção em pacientes com câncer gástrico nos Estados Unidos (Staley, 1995).

Outro estudo analisa os dados de 13 pacientes e mostra uma associação significativa entre a soropositividade para *H. pylori* e os coeficientes de incidência e mortalidade para câncer gástrico (Forman *et al.*, 1993).

O *H. pylori* tem sido apontado como um provável fator etiológico na gênese do carcinoma gástrico, e definido por algumas entidades como um verdadeiro carcinogênico (Siegel *et al.*, 1976).

Alguns autores assinalam o papel do *H. pylori* no desenvolvimento da gastrite crônica (Tso *et al.*, 1987; Tatsuta *et al.*, 1993). Outros identificam o *H. pylori* como um fator de risco pela sua associação com lesões pré-neoplásicas gástricas (Tso *et al.*, 1987), com o adenocarcinoma (Taki & Kuwabara, 1981) e com o tipo bem diferenciado do adenocarcinoma precoce (Dixon *et al.*, 1996). Haveria também um progressivo aumento de risco com a coexistência de *H. pylori* associado à gastrite crônica atrófica antral (Tatsuta *et al.*, 1993).

Os dados epidemiológicos descritos acima correspondem a um tipo de carcinoma gástrico, e provavelmente o mais comum, o adenocarcinoma intestinal de Láuren (Iwanaga *et al.*, 1975).

O outro tipo, chamado de adenocarcinoma difuso, não mostra estas associações, e parece sofrer menos influências ambientais. Todavia, outros autores já consideram que o *H. pylori* esteja associado com ambos os tipos intestinal e difuso de câncer gástrico. Estudos epidemiológicos indicam que o *H. pylori* esteja relacionado com o câncer distal e não com o gástrico proximal (Cheung & Delcore, 2001).

Há uma forte ligação entre a infecção por *H. pylori* e o câncer gástrico em muitos países, tais como o Japão (Miwa *et al.*, 2002). Estudos estimam

que a infecção por *H. pylori* contribui com um risco acima de 60% para o câncer gástrico em uma dada população (Fendrick *et al.*, 1999).

Por outro lado, a prevalência da infecção por *H. pylori* é alta em alguns países, incluindo Índia e Bangladesh, todavia, as taxas de câncer gástrico são baixas (Miwa *et al.*, 2002). Na África, a infecção por *H. pylori* também é comum, mas o câncer gástrico é relativamente incomum (Cheung & Delcore, 2001). Alguns relatos sumarizam que estudos epidemiológicos feitos na África sugerem que a infecção por *H. pylori* nem sempre está diretamente correlacionada com o risco para doença gastrintestinal, tal como úlcera péptica e câncer gástrico (Miwa *et al.*, 2002).

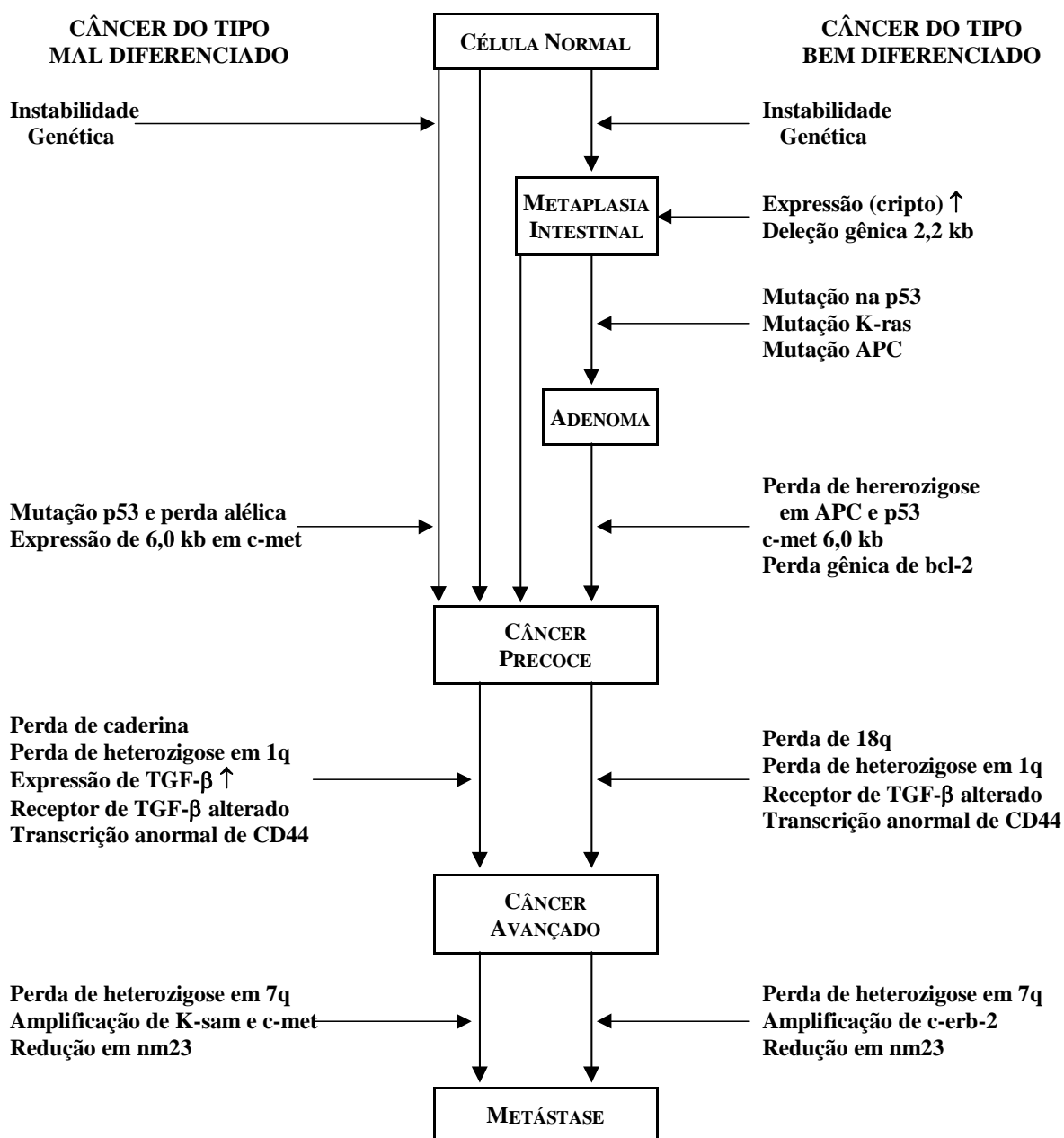
Dentre as várias citotoxinas ou proteínas citotóxicas derivadas do *H. pylori*, a citotoxina gene A (*cagA*) e a citotoxina A vacuolada (*vacA*) são reconhecidas como fatores virulentos importantes para danos de células epiteliais da mucosa gástrica (Atherton *et al.*, 1997; Slater *et al.*, 1999). Múltiplos estudos têm demonstrado que a variedade *cagA* positiva está associada com altos níveis de inflamação gástrica (Crabtree, 1996). Um estudo internacional identificou uma forte associação entre o *status cagA* e os níveis de pepsinogênio, os quais são marcadores de atrofia gástrica (Webb *et al.* 1999). Mais especificamente, uma variedade bacteriana com o gene *vacA* de seqüência de sinal tipo s1 e de seqüência do meio do gene tipo m1 é provavelmente mais virulenta, sendo frequentemente detectada em pacientes com úlcera péptica (De Gusmão *et al.*, 2000) ou câncer gástrico (Miehlke *et al.*, 2000).

Estudos clínicos isolados com *H. pylori* no Japão têm demonstrado possuir tanto *cagA* quanto *vacA*, assim como genes com *vacA* genótipo s1/m1 têm sido associados com apresentação de doença mais severa (Ito *et al.*, 1997; Maeda *et al.*, 1998). Semelhante ao Japão, muitos estudos clínicos com variedades de *H. pylori* em pacientes na Coréia são *cagA* positivos associados a *vacA* genótipo s1/m1 (Kim *et al.*, 1999). Um relato oriundo da Índia sugere que a

maioria de seus casos isolados é de seqüência de sinal tipo s1 e de seqüência do meio do gene tipo m1, embora em torno de 35% fossem do subtipo m2 (Mukhopaghyay *et al.*, 2000). Em Taiwan, as variedades vacA s1a/m2 são significativamente mais freqüentes que s1a/m1 (Wang *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2000). Há aproximadamente 80% de variantes bacterianas de *H. pylori* na Ásia que possuem o subtipo s1c (Van Doorn *et al.*, 1999). Estas diferenças no genótipo vacA devem resultar num mais baixo risco de câncer gástrico, a despeito da alta prevalência de infecção por *H. pylori* em alguns países.

Variações no rigor das gastrites têm sido explicadas pela existência de linhagens mais agressivas de *H. pylori* portadores dos genes cagA e vacA. De acordo com este conceito, linhagens cagA e vacA positivas induzem ao maior recrutamento de neutrófilos pelo aumento da produção da citocina inflamatória, interleucina-8 (IL-8), e pelas células epiteliais gástricas. Os portadores dessas linhagens teriam maior propensão ao desenvolvimento de úlcera péptica em uns, e linfoma MALT, ou carcinoma gástrico, em outros, enquanto que aqueles com gene vacA e cagA negativos permaneceriam apenas com gastrite (Mattos & Goldenzon Filho, 1996).

2.2.2. Fatores Genéticos do Câncer Gástrico



Fonte: "As duas vias genéticas do câncer gástrico (bem e mal diferenciados)".
Adaptado por Tahara (1995a)

Dentre os vários oncogenes implicados no desenvolvimento e progressão do câncer gástrico um dos mais importantes é o c-met, o qual codifica o receptor para o fator de crescimento de hepatócitos (HGF). Este gene está frequentemente amplificado no câncer gástrico, principalmente nas formas avançadas, e em especial nos carcinomas cirróticos, ocorrendo boa correlação entre a

presença da amplificação, o estágio clínico, a presença de metástases e o prognóstico. A amplificação deste gene é rara em outros cânceres gastrintestinais, tais como os esofagianos e colo-retais (Tahara, 1995a).

Estudos recentes mostram que a interação entre células tumorais que expressam quantidades aumentadas de c-met e HGF, produzidos por células estromais ativadas, esta envolvida na morfogênese e progressão do câncer gástrico. Isto é, as células estromais ativadas por fatores de crescimento tumoral ou interleucina-1 α (IL-1 α) secretam HGF, que por sua vez promove o crescimento das células tumorais. Naqueles clones celulares que mantêm a expressão de E-caderina e α -catenina, as células tumorais se organizarão em forma tubular, resultando assim em adenocarcinoma bem diferenciado. Nos clones com redução ou perda da expressão de E-caderina ou α -catenina, o HGF promove uma dispersão das células tumorais, levando assim a um adenocarcinoma pouco diferenciado, ou carcinoma cirrótico. Isto sugere que o HGF regula a adesão celular no câncer gástrico por meio das caderinas e cateninas (Tahara *et al.*, 1996).

Outros oncogenes relacionados com o câncer gástrico são: o gene k-sam, o qual codifica o receptor para fator de crescimento de queratinócitos (KGF), amplificado em cânceres pouco diferenciados e cirróticos; o gene c-erb-2, amplificado nas formas bem diferenciadas e relacionado à presença de metástases hepáticas; e o gene c-ki-ras, mutado em alguns casos de câncer bem diferenciado (Tahara, 1995a; Tahara *et al.*, 1996).

Além dos oncogenes, os cânceres gástricos podem expressar uma grande variedade de fatores de crescimento, hormônios intestinais e citocinas, tais como o fator de crescimento de transformação α (TGF- α), o fator de crescimento epidérmico (EGF), cripto e anfirregulina, encontrados em todos os tipos de câncer gástrico. Outros fatores de crescimento, tais como TGF- β D, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento tipo insulina (IGF-II) e fator de crescimento de fibroblastos β (FGF- β), apresentam frequen-

temente expressão aumentada nos tipos pouco diferenciado e cirrótico (Tahara *et al.*, 1996).

2.2.2.1. Genes Supressores Tumorais e Moleculares de Adesão Celular no Câncer Gástrico

O câncer gástrico mostra freqüentemente inativação de múltiplos genes supressores, incluindo p53, APC e DCC. A perda de alelo e as mutações, levando à inativação do gene supressor tumoral p53, são encontradas em mais de 60% de todos os tumores gástricos, independente do tipo histológico, assim como em 30% dos adenomas e em 10% das metaplasias intestinais. O gene p53 parece ser o principal alvo de mutações associadas com carcinógenos da dieta. Alguns estudos mostram que a inativação de p53 é importante tanto para a carcinogênese quanto para a progressão tumoral dos cânceres gástricos. O espectro de mutações encontrado no câncer gástrico é diferente daquele encontrado nos cânceres esofagianos e colo-retais, indicando que os carcinógenos devem ser diferentes (Nishisho *et al.*, 1991; Nakatsuru *et al.*, 1992). A perda de alelos e a mutação do gene APC são freqüentemente associadas com adenocarcinoma bem diferenciado. Mutações *missense* é dominante no câncer gástrico, enquanto mutação *non-sense* ocorre no câncer colo-retal. Além disso, o gene APC está somaticamente mutado em 25% dos adenomas gástricos e em 10% nos pólipos hiperplásticos (Tahara, 1995b). O gene supressor tumoral relacionado ao câncer gástrico é o APC (*adenomatous polyposis coli*). As mutações deste gene e a perda de alelo são encontradas em mais de 50% dos adenocarcinomas bem diferenciados e em 30% dos carcinomas com células em anel de sinete. Este gene não está relacionado com adenocarcinomas pouco diferenciados.

Os tipos de mutação p53 e APC são bastante variáveis (Poremba *et al.*, 1995; Tahara *et al.*, 1996).

A avaliação da expressão do p53 também pode ter um valor preditivo na sensibilidade do câncer à quimioterapia. Um estudo mostrou que células de adenocarcinomas gástricos e esofagianos, com boa resposta à quimioterapia, exibem uma expressão aumentada da proteína p53 selvagem (não-mutada) após o uso de drogas. Este aumento é necessário para o controle do crescimento do câncer pela indução de apoptose. As células dos cânceres resistentes à quimioterapia podem expressar ou não a proteína p53 mutada (Nabeya *et al.*, 1995; Hamada *et al.*, 1996).

Moléculas que regulam a adesão celular, tais como E-caderina, P-caderina e α -catenina, também podem funcionar como proteínas supressoras tumorais. A expressão destas moléculas está significativamente diminuída nos tipos pouco diferenciados e no câncer gástrico cirrótico, apoiando a teoria de que a expressão reduzida de caderinas e cateninas esteja envolvida no desenvolvimento e invasão destes tipos de câncer gástrico (Tahara *et al.*, 1996).

Também se observa perda de heterozigose dos genes DCC e bcl-2 nos cânceres bem diferenciados. O cromossomo 1 parece conter genes supressores tumorais, pois a perda de heterozigose de 1p (braço curto do cromossomo 1) ocorre nos cânceres pouco diferenciados, e a de 1q (braço longo do cromossomo 1) nos bem diferenciados (Tahara, 1995a).

As ciclinas, as quinases dependentes de ciclina (CDK) e seus inibidores regulam o crescimento, a diferenciação e a morte celular. Anormalidades nestes reguladores do ciclo celular estão implicadas na patogênese de cânceres gastrintestinais.

A maioria dos tecidos de carcinoma gástrico apresenta uma expressão aumentada de ciclina E e de CDK, porém, quando o gene da ciclina E está amplificado, existe um risco maior de metástases. Alterações semelhantes são encontradas nos carcinomas colo-rectais (Tahara, 1995b; Tahara *et al.*, 1996).

As mutações somáticas nas seqüências de DNA, caracterizadas como microssatélites, são conseqüência de erros de replicação do DNA, decorrentes da instabilidade genética.

As alterações de microssatélites ocorrem em grande número de cânceres gástricos, principalmente nos adenocarcinomas pouco diferenciados. Estas alterações são mais freqüentes nos tumores múltiplos, indicando assim que estas devem desempenhar um papel mais importante nestes casos do que nos tumores solitários. Erros de replicação em várias seqüências de DNA ocorrem em inúmeros cânceres primários múltiplos, sugerindo assim que mutações em genes reparados tenham sido originadas em células germinativas (Tahara, 1995a; Nakashima *et al.*, 1995; Tahara *et al.*, 1996).

Além dos erros de replicação, a redução dos telômeros pode levar à instabilidade cromossômica, à ativação da telomerase e, conseqüentemente, ao câncer. A presença da telomerase parece ser crítica para a carcinogênese, ocorrendo precocemente, pois é necessária para a imortalidade celular, característica das células neoplásicas. Observa-se redução de telômeros na metaplasia intestinal, o que pode levar à instabilidade cromossômica e rearranjos, com implicação no desenvolvimento do câncer e adenocarcinoma gástrico. A maioria das células tumorais primárias e metastáticas exibe a atividade da enzima telomerase, enquanto que a mucosa gástrica normal é sempre telomerase negativa (Tahara, 1995b; Tahara *et al.*, 1996).

Alterações em múltiplos genes e fatores celulares facilitam o desenvolvimento de metástases no câncer gástrico. Em geral, as formas bem diferenciadas mostram metástases hepáticas e as pouco diferenciadas, disseminação peritoneal.

A molécula de adesão celular CD44 é importante para a interação célula-célula. A expressão de formas variantes de CD44 é encontrada em vários tipos de câncer, sendo identificada em todos os tecidos de câncer gástrico e em

suas metástases. O padrão de variantes de CD44 difere nos tipos de câncer gástrico, sugerindo assim que existem diferentes vias genéticas atuando.

O gene nm23 é um candidato a gene supressor de metástases, ocorrendo perda de heterozigose em 8% dos casos de câncer gástrico.

A expressão da lectina ligadora de lactosídeo de 31-kd (L-31) está geralmente aumentada em tumores de cânceres gástricos bem diferenciados, sugerindo assim sua relação com estas metástases.

A invasão e disseminação peritoneal nos tipos indiferenciados parece necessitar não apenas das alterações nas moléculas de adesão celular, mas também da perda de heterozigose do braço longo do cromossomo 7 (no *locus* D7S95 de 7q). É possível que este *locus* contenha um gene supressor tumoral importante para a progressão do câncer gástrico (Tahara, 1995a; Tahara *et al.*, 1996).

2.2.3. Fatores Ambientais

Desde a década de 1960 tem-se dado grande atenção ao papel da dieta na gênese do câncer. Assim é que alterações ocorridas na incidência dos cânceres de estômago, cólon, reto, bexiga, ovário e endométrio parecem ter sido influenciadas por modificações nos padrões alimentares (Doll, 1992). Os nitratos, presentes em muitos vegetais e na água potável, quando usados em altas doses como conservantes podem provocar câncer de estômago (Tannenbaum *et al.*, 1979), bem como o sal e alimentos salgados (Tuyns, 1988).

Um grande interesse se concentra no papel da dieta que poderia fornecer uma explicação plausível para as diferenças existentes entre países. Arroz, frituras, produtos de grãos e condimentos picantes são vinculados às origens do câncer gástrico. Vale ressaltar que um alto consumo de vegetais e frutas ricas em vitamina C atuaria como protetor gástrico contra o câncer. Os compostos nitrosaminas e nitrosamidas possuem capacidade carcinogênica. Os nitritos po-

dem estar agregados quando utilizados como preservativos à dieta, especialmente de alimentos defumados, produtos de salsicharia, inclusive salsichas defumadas tipo Frankfurt (Castro & Arcuri, 1999).

O carcinoma gástrico está acompanhado, em 85-90% dos casos, de hipocloridria, tendo sido demonstrado que esta pode preceder o câncer gástrico por muitos anos. Postula-se que um pH intragástrico alto promova o crescimento de bactérias que reduzem os nitratos da dieta a nitritos e, por conseguinte, serão convertidas as aminas da dieta, na presença destes nitritos, nos compostos carcinogênicos N-nitroso (Hall *et al.*, 1986).

Embora não esteja claro que a dieta seja agente causal do câncer gástrico, tem sido demonstrado que sua alta incidência está correlacionada com alta ingestão de sal e alto consumo de conservantes, alimentos salgados, condimentos picantes, alimentos defumados e peixes, ou seja, alimentos que contenham uma alta concentração de sal, nitratos e nitritos, e que podem agir como irritantes gástricos. Os hidrocarbonatos aromáticos policíclicos nestes alimentos podem ser carcinogênicos, e ambos os nitratos e nitritos podem ser convertidos nos conhecidos carcinogênicos ativos: as nitrosaminas. O sal tem sido implicado no desenvolvimento da gastrite atrófica crônica, pode aumentar a mutagenicidade de alimentos nitrosaminados e pode agir como um co-carcinógeno. Hoje em dia, com a disponibilidade de uso comum de alimentos refrigerados, pode-se reduzir a exposição a estes carcinógenos, tendo assim a refrigeração desempenhado papel importante no declínio da incidência do câncer gástrico no mundo (Cheung & Delcore, 2001).

Outros fatores dietéticos conhecidos aumentam o risco de câncer gástrico, incluindo baixo teor de gordura, baixo consumo de proteínas e baixo consumo de vitaminas A e C. Muitos estudos sugerem que dietas ricas em vegetais não cozidos, frutas frescas, fibras e vitaminas A e C estão associadas com um baixo risco de desenvolvimento da doença. O ácido ascórbico e o β -caroteno

encontrados em frutas frescas e vegetais agem como anti-oxidantes. Além do mais, o ácido ascórbico pode prevenir a conversão de nitratos em N-nitrosaminas. O consumo de água contendo altas concentrações de nitratos ou *H. pylori* tem sido mostrado como sendo um fator de risco para o câncer gástrico (Cheung & Delcore, 2001).

Embora o tabagismo por cigarro tenha sido relatado como tendo alto risco para câncer gástrico, o consumo de álcool não parece aumentar este risco (Cheung & Delcore, 2001).

O risco de câncer gástrico está aumentado em pacientes com gastrite crônica associada à anemia perniciosa, embora este risco também pareça ter sido demonstrado no passado. A anemia perniciosa é caracterizada por uma atrofia mucosa fúndica, perda de células parietais e células principais, hipocloridria e hipergastrinemia. Isto ocorre em 3% da população idosa >60 anos. Para indivíduos nos quais anemia perniciosa tenha estado presente por mais de 5 anos, o risco de câncer gástrico é duas vezes maior do que em indivíduos controles da mesma idade. A Doença de Menetrier (gastrite hipertrófica gigante) está também associada a um alto risco de câncer gástrico. Outras condições associadas a alto risco incluem radiação de exposição prévia, ingestão de aflatoxina, antecedentes familiares, pessoas do grupo sanguíneo A (risco relativo: 1,2 comparado com grupo sanguíneo O), certos tipos de ocupações profissionais e vírus Epstein Barr (Cheung & Delcore, 2001). Os pólipos gástricos adenomatosos são mais passíveis de degeneração maligna (Hope *et al.*, 1998; Muraro, 2000) e a polipose gástrica difusa tem alto potencial de malignização (Muraro, 2000).

3. Classificação do Câncer Gástrico

Em 1988, a União Internacional Contra o Câncer (UICC) e o Comitê Americano Contra o Câncer (AJCC) propuseram a classificação TNM, onde:

T = Tumor Primário, dividindo-se em:

T_x – Tumor primário que não pode ser avaliado;

T₀ – Tumor primário não evidenciado;

T_{is} – Carcinoma *in situ* (tumor intraperitoneal sem
invasão de lâmina própria);

T₁ – Tumor invadindo a lâmina própria ou submucosa;

T₂ – Tumor invadindo a muscular própria ou submucosa;

T₃ – Tumor penetrando na serosa (peritônio visceral), mas
sem invasão de estruturas adjacentes;

T₄ – Tumor invadindo estruturas adjacentes.

N = Linfonodos Regionais, dividindo-se em:

N_x – Linfonodo regional que não pode ser avaliado;

N₀ – Linfonodo regional sem metástases;

N₁ – 1-6 linfonodos regionais com metástases;

N₂ – 7-15 linfonodos regionais com metástases;

N₃ – >15 linfonodos regionais com metástases.

M = Metástases à Distância, dividindo-se em:

M_x – Metástase à distância que não pode ser avaliada;

M₀ – Metástase à distância inexistente;

M₁ – Metástase à distância.

R = Resultado Cirúrgico, dividindo-se em:

R₀ – Tumor não residente;

R₁ – Tumor residente microscópico;

R₂ – Tumor residente macroscópico.

A classificação TNM se baseia em grau de penetração do tumor (T), disseminação ganglionar (N) e presença ou não de metástases (M) (Cheung & Delcore, 2001).

A Sociedade Japonesa para a Pesquisa do Câncer Gástrico, durante o I Congresso Mundial de Câncer Gástrico, em Kyoto, em 1995, classificou os linfonodos regionais de tal forma que o câncer gástrico poderia acomodar 16 grupos de coletores linfáticos. Estes seriam: os da arcada marginal das curvaturas do estômago (N_1), aqueles situados a mais de 3 cm da parede gástrica, como os próximos dos pedículos hepáticos e lienais (N_2) e aqueles ainda mais distantes (N_3). Estes últimos compreendem os coletores ao longo das artérias mesentérica, cólica e aórtica (Japanese Research Society for Gastric Cancer – JRSGC, 1995; Muraro & Mantovani, 2000).

Sistema de Estadiamento Cirúrgico Japonês (JRSGC, 1995)

<p>S_0 – Sem invasão da serosa; S_1 – Suspeita de invasão da serosa; S_2 – Invasão da serosa definida; S_3 – Invasão de órgãos adjacentes.</p>
<p>N_1 – Linfonodos perigástricos comprometidos; N_2 – Linfonodos comprometidos ao redor das artérias gástrica esquerda, hepática comum e esplênica, e tronco celíaco; N_3 – Linfonodos comprometidos no ligamento hépato-duodenal, face posterior do pâncreas e raiz do mesentério; N_4 – Linfonodos comprometidos na cadeia para-aórtica e cólico média</p>
<p>P_0 – Sem metástases peritoneais; P_1 – Metástases peritoneais adjacentes; P_2 – Algumas metástases espalhadas pelo peritônio; P_3 – Muitas metástases espalhadas pelo peritônio.</p>
<p>H_0 – Sem metástases hepáticas; H_1 – Metástases hepáticas limitadas a um lobo; H_2 – Algumas metástases hepáticas bilaterais; H_3 – Numerosas metástases bilaterais.</p>

3.1. Patologia

O câncer gástrico tem a seguinte distribuição topográfica: 40% distal (antro e piloro), 25% corporal e 35% proximal (fundo e cárdia).

Nos últimos 15 anos, tem sido observado um aumento na incidência de tumores proximais, o que tem repercussão direta no prognóstico do paciente. Os tumores proximais apresentam maiores índices de aneuploidia e comprometimento lifonodal.

Classificação Histopatológica de Láuren

INTESTINAL | Tumor diferenciado, com tendência à formação de glândulas, tipicamente de áreas de metaplasia intestinal.

DIFUSO | Exibe pouca coesão das células e tende a estender-se pela submucosa e metastizar precocemente (Hospital das Clínicas de Porto Alegre, 1997).

O tipo de neoplasia gástrica mais freqüente é o adenocarcinoma, responsável por quase 95% de todos os tumores incidentes no estômago. Em seguida, temos os linfomas com 3%, e os leiomiossarcomas com 2%. Outros tumores como os carcinóides e os espinocelulares também podem ocorrer, embora com certa raridade (Muir & Harvey, 1997).

3.2. Sintomatologia

Em muitos pacientes, o início da doença é caracterizado por desconforto epigástrico, evidenciado por síndrome hipostêmica, com plenitude gástrica pós-prandial, além de eructações e flatulência. Náuseas e vômitos também podem estar presentes com a evolução da neoplasia.

A hemorragia digestiva alta, em alguns casos, pode ser a primeira manifestação da doença. Pode ser através da hematêmese e melena, vindo em decorrência a anemia e em seguida o emagrecimento, que costuma ser o sintoma mais encontrado. A perda de peso vai se pronunciando a ponto de deixar o doente com astenia e adinamia. Na fase mais avançada da neoplasia, o doente apresenta-se caquético e muitas vezes com massa palpável localizada no cárdia, além de sintomas de obstrução, principalmente disfagia (Muraro, 2000).

4. Tratamento

O tratamento do câncer gástrico é cirúrgico. Na maioria das vezes, precedido de preparo pré-operatório adequado, onde se deve avaliar, caso necessário, a melhora das condições gerais do paciente. A cirurgia radical é aquela que oferece possibilidade de cura, ainda assim, é limitada pela extensão da doença na parede gástrica e pelo comprometimento dos linfonodos (Grey *et al.*, 1986). Atualmente, considerando a maior morbi-mortalidade da gastrectomia total em relação à gastrectomia subtotal, a ressecção de todo o estômago é reservada apenas para os tumores de corpo e de fundo gástricos. Para os tumores de antro, utiliza-se mais freqüentemente a ressecção subtotal. No caso de tumores de fundo, deve-se ressecar um segmento do esôfago distal (Muraro, 2000).

A cirurgia curativa esta contra-indicada em pacientes cuja ocorrência de seja $\leq 60\%$, pois esta envolve uma larga excisão do tumor, com margem de 5 cm e ressecção de linfonodos a 3 cm do mesmo (ressecção D₁). Para tumores dos 2/3 distais, a gastrectomia parcial pode ser suficiente, mas, se mais proximal, a gastrectomia total pode ser necessária. A remoção de linfonodos distantes (ressecção D₂) parece melhorar a sobrevida entre os Japoneses, mas não entre os Europeus.

A palição é freqüentemente necessária para resolver a obstrução, minorar a dor e cessar a hemorragia, e envolve judicioso uso de drogas, cirurgia e radioterapia.

A sobrevida de cinco anos é menor que 10%, mas muito melhor para o carcinoma gástrico precoce que está confinado à mucosa e submucosa (Hope *et al.*, 1998).

Em pacientes portadores de tumor avançado, com metástases à distância ou carcinomatose peritoneal, o tratamento cirúrgico tem finalidade apenas paliativa. Estes são pacientes com prognóstico bastante restrito, cuja sobrevida média sem tratamento é de aproximadamente quatro meses. A estes pacientes, portanto, devem ser oferecidas outras alternativas terapêuticas com o intuito de prolongar e melhorar sua qualidade de vida.

Em função da indisponibilidade de novas opções terapêuticas para o tratamento do câncer gástrico, a cirurgia, como mencionado acima, continua sendo o tratamento preferencial para este tipo de neoplasia, sendo aquele que oferece maiores possibilidades de cura. Ao longo do tempo, desde a descrição das gastrectomias por Billroth nos meados do século XIX, procedimentos radicais tais como a gastrectomia, a epiplectomia e o esvaziamento das cadeias regionais, têm se mostrado eficientes nos casos iniciais, principalmente na experiência Japonesa (Noguchi *et al.*, 1989).

A abordagem exclusivamente cirúrgica do câncer gástrico prevaleceu por quase um século. Somente em 1984, no estudo da *Mayo Clinic*, foi demonstrado um aumento do controle local com o uso de radioterapia e 5-fluouracil (5-FU) pós-cirurgia (Moertel *et al.*, 1984).

Embora o câncer de estômago seja considerado uma neoplasia até certo ponto sensível à quimioterapia, os esquemas terapêuticos atuais têm limitada aplicabilidade e respostas insuficientes. Portanto, a quimioterapia tem se mostrado ineficaz na tentativa de aumentar a sobrevida dos portadores desse tipo

de tumor, possivelmente devido à sua resistência às drogas antineoplásicas (Hermans *et al.*, 1993).

A radioterapia como método opcional de tratamento do tumor gástrico foi introduzida por Takasuda em 1978. As demais terapêuticas acima citadas mostraram-se também ineficientes em aumentar a sobrevida de pacientes portadores dessas neoplasias gástricas quando usadas isoladamente ou associadas à cirurgia (Hallissey *et al.*, 1994). O emprego da radioterapia adjuvante à cirurgia associado à quimioterapia tem apresentado resultados encorajadores. Há também estudos em andamento da combinação de radioterapia associada à poliquimioterapia com 5-FU, adriamicina e mitomicina C (Dubois, 1997).

5. Modelo Experimental

5.1. Generalidades

Um dos principais obstáculos enfrentados pelos pesquisadores que vêm tentando estudar os efeitos dessa associação terapêutica em tumores gástricos é a disponibilidade de um modelo experimental adequado. O desenvolvimento de tumores experimentais gástricos a partir de carcinógenos químicos tem se mostrado pouco prático em função da demora e do crescimento errático destas neoplasias (Ray *et al.*, 1961; Braghetto, 1984). Outros modelos descritos na literatura não reproduzem a biologia do tumor gástrico, pois são implantados na camada serosa (Ackerman, 1970). Assim, para se estabelecer experimentalmente a eficácia de novos fármacos e esquemas terapêuticos, necessitar-se-ia de um modelo animal com elevado índice de pega, que facilitasse o manuseio nos testes laboratoriais e que apresentasse um comportamento biológico semelhante ao do tumor gástrico espontâneo. O carcinossarcoma 256 de Walker, descrito por Earle em 1935, por suas características, parece ser o ideal para os objetivos propostos. Trata-se de um tumor bem caracterizado, facilmente mantido em labora-

tório, de crescimento rápido e uniforme, que raramente apresenta regressão espontânea, sendo de comprovada eficácia em testes laboratoriais (Moraes Filho, 1981). Baseados nestas características, desenvolveu-se um modelo experimental de tumor gástrico (Oliveira *et al.*, 1995) que foi utilizado nestes experimentos.

5.2. O Carcinossarcoma 256 de Walker

O tumor original foi descoberto em 1928 quando George Walker, em seu laboratório na Escola de Medicina da Universidade Johns Hopkins, observou uma massa tumoral situada na glândula mamária de uma rata albina preta, a qual, segundo descrição própria, regredia durante o período de lactação e logo após voltava a recrudescer. A histopatologia revelou um adenocarcinoma, e sua transplantabilidade foi comprovada pelo próprio Walker com um índice de aproximadamente 56% de pega em 16 ratos albinos (Earle, 1935).

Walker & Earle, em 1935, descreveram macroscopicamente a neoplasia como uma massa tumoral aproximadamente do tamanho de uma noz, localizada na região abdominal esquerda, aparentemente originada da mama, de tecido firme, granular, róseo acinzentado, com pequenos focos de necrose e pouco estroma.

Microscopicamente, mostrou-se como estrutura tipicamente carcinomatosa, com estroma constituído de tecido conjuntivo frouxo, às vezes invadido por epitélio glandular. As células principais apresentaram forma poligonal ou arredondada, com núcleos volumosos, arredondados ou ovalados.

Na segunda geração, desorganizou-se a estrutura glandular e as células epiteliais, embora conservando as mesmas peculiaridades do tumor original, cujas células achavam-se rodeadas de fibras e células do estroma. Estas últimas apresentavam dois tipos diversos: um de tamanho pequeno, alongado e com núcleo densamente corado, e outro bem mais volumoso, alongado e com núcleo fracamente corado (Earle, 1935).

Após sucessivos transplantes, a neoplasia apresentou variações morfológicas (Earle, 1935; Schrek & Avery, 1937; Talalay *et al.*, 1952; Stewart *et al.*, 1959; Fisher & Fisher, 1964). O tumor foi então caracterizado nas formas carcinomatosa, sarcomatosa e mista, e carcinossarcomatosa.

5.3. Características Histopatológicas do Tumor

Em uma revisão geral dos trabalhos publicados sobre o tema, Stewart e cols. (1959) e Fisher & Fisher (1961) descreveram três tipos de células do tumor de Walker. Uma célula característica da variante carcinomatosa apresentando forma poligonal ou arredondada, núcleo volumoso, esférico ou ovóide e membrana nuclear de contorno nítido com grânulos de cromatina condensados em sua periferia e nucléolo proeminente. A célula de padrão sarcomatoso é geralmente fusiforme e suas características são semelhantes as dos fibroblastos neoplásicos. Um terceiro tipo, indiferenciada, pequena e densamente corada, apresenta forma arredondada, poligonal ou alongada, com citoplasma escasso e núcleo de cromatina grumosa, intensamente corado, ocorrendo isoladamente ou em grupos, e encontrada freqüentemente entre as células de padrão carcinomatoso.

Iwana de Mattos & Franco (1971), pesquisando ratos Wistar inoculados por via intramuscular com o carcinossarcoma 256 de Walker, chamaram a atenção para a freqüência com que observaram metástase nos rins, supra-renais, coração e gânglios linfáticos. Em outro trabalho, Iwana de Mattos e cols. (1980) constataram envolvimento tumoral do tipo infiltrativo nos rins (53%), baço (50%), pulmões (46,5%), fígado (45%) supra-renais (10,3%), medula óssea (44,8%), sangue circulante (55,2%), e ocasionalmente no coração (5%) e língua (1,6%).

5.4. Transplantabilidade do Tumor

O tumor de Walker pode ser perpetuado através das mais variadas técnicas. Walker realizou pela primeira vez o transplante usando fragmentos do tecido tumoral. Posteriormente, Earle (1935), Schrek (1935) e Agostino (1968) inocularam suspensões de células tumorais, obtidas da forma sólida do tumor, por via intramuscular, e conseguiram o desenvolvimento tumoral no local da inoculação. Outras formas de transplante, tais como a inoculação de células tumorais mantidas em cultura *in vitro* (Earle, 1935; Leighton *et al.*, 1967) ou a inoculação de suspensão de células da forma ascítica do tumor (Agostino, 1968), também podem ser usadas. As diversas vias utilizadas para a inoculação se mostraram eficazes: subcutânea (Earle, 1935; Schrek, 1935; Talalay *et al.*, 1952; Fisher & Fisher, 1961; Fonteles *et al.*, 1966; Jensen & Muntzing, 1970), intramuscular (Earle, 1935; Schrek, 1935; Talalay *et al.*, 1952; Iwana de Mattos & Franco, 1971; Sampaio & Oliveira, 1975; Fonteles *et al.*, 1978; Moraes Filho *et al.*, 1980), intraperitoneal (Agostino, 1968; Iwana de Mattos & Franco, 1971), intrapleural (Iwana de Mattos & Franco, 1971) e sangüínea (Talalay *et al.*, 1952; Agostino *et al.*, 1961; Fisher & Fisher, 1965). Após estudo dos diferentes locais de inoculação intramuscular, Iwana de Mattos & Franco (1971) concluíram que o músculo da coxa era o local ideal para o transplante do tumor devido à sua melhor vascularização e ao crescimento uniforme e simétrico do tumor.

O uso do carcinossarcoma 256 de Walker como modelo experimental para estudo da biologia tumoral despertou o interesse de vários pesquisadores para o esclarecimento de suas peculiaridades. Schrek (1935) verificou que o crescimento tumoral e o tempo decorrido entre a sua inoculação e o aparecimento do tumor estavam diretamente proporcionais ao número de células injetadas por via intramuscular.

O sexo também pode influenciar o crescimento tumoral. Caldarola e cols. (1968) citaram em seu trabalho que o tumor se desenvolvia melhor em ratos machos do que em fêmeas, relacionando o fato à influência hormonal.

Embora tenha sido constatado o bom desenvolvimento do tumor em várias linhagens de ratos (Earle, 1935; Talalay *et al.*, 1952; Fisher & Fisher, 1961), Jensen & Muntzing (1970) relataram um melhor crescimento em animais da linhagem Sprague-Dawley do que nos da linhagem Wistar. Em contrapartida, observações feitas por Fonteles e cols. (1979) e Moraes Filho e cols. (1980) mostraram que o índice de pega em ratos Wistar inoculados por via intramuscular com 10^6 células era de 100%.

Constitui-se também significativo o fator idade em relação ao crescimento tumoral, que é mais lento em animais muito jovens ou muito idosos (Katona, 1972). Oliveira Filho e cols. (1997) obtiveram excelentes resultados com animais inoculados entre 70 e 80 dias de nascido.

Baseados nos estudos exaustivos da biologia do tumor de Walker, e principalmente nos achados anteriormente descritos por Bröyn (1974), levou-se a inferir que o tumor de Walker também poderia ser inoculado, através da mucosa gástrica, na junção esôfago-gástrica, corpo do estômago e pequena curvatura, o que permitiu o desenvolvimento do modelo de tumor gástrico usado nesse trabalho (Oliveira *et al.*, 1995).

5.5. Características Gerais do Consumo Energético dos Tumores Sólidos

Devido à necessidade de geração de energia por parte dos tumores sólidos, o catabolismo da glicose aumenta, enquanto que a síntese de glicose diminui. Há maior consumo de glicose na superfície de tumores sólidos, com níveis elevados de hexoquinase e níveis reduzidos de glicose-6-fosfatase (utilização em PET – tomografia por emissão de pósitrons). O alto grau de glicólise no tumor é feito, em geral, por meio de metabolismo aeróbico. No núcleo dos tumores sólidos

dos, onde há áreas de hipóxia, ocorre glicólise anaeróbica, com produção de altas taxas de ácido láctico, advindas da transformação de piruvato pela enzima LDH, a qual se encontra elevada no sangue de pacientes oncológicos. Há hipóteses de que fatores de transcrição como c-myc e HIF-1 (fator induzido por hipóxia) ligam-se ao promotor do gene LDH-A, aumentando assim a síntese de isoenzimas LDH-específicas, as quais ativam a glicólise anaeróbica. As fosfatases também apresentam-se elevadas por estarem envolvidas na síntese de glicogênio, além de participarem da sinalização celular, desfosforilando proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular. Como no câncer não existe um fenótipo universal, nem todos os tumores apresentam as mesmas alterações enzimáticas, estas não podem ser consideradas exclusivas da condição neoplásica, já que intensa atividade metabólica pode ocorrer em infecções e no pós-trauma (Castro, 2005).

6. Hipertermia

6.1. Histórico

A elevação de apenas alguns graus na temperatura tecidual pode trazer profundas alterações no funcionamento da célula e do organismo como um todo. O conhecimento sobre o aquecimento de tumores é tão antigo quanto os textos escritos sobre medicina. Assim, nos papiros cirúrgicos de Edwin Smith que remontam há mais de 5.000 anos, e que se encontram, provavelmente, entre os primeiros escritos médicos, faz-se a descrição de uma paciente com um tumor de mama tratada com o calor (Overgaard, 1985). Semelhantes procedimentos têm sido relatados em muitos outros registros históricos. Entretanto, os primeiros ensinamentos práticos sobre o uso da hipertermia só foram realmente iniciados por Hipócrates, o qual recomendava a seus discípulos o uso desse tipo de tratamento para os tumores malignos (Seegenschmiedt & Vernon, 1995).

Posteriormente, esse tipo de terapêutica caiu no desuso. Somente no final do século XIX o fato foi redescoberto quando observou-se que pacientes portadores de tumores malignos que tinham febre ocasionada por infecções bacterianas às vezes apresentavam diminuição do tamanho do tumor e ocasionalmente até regressão total. Baseado nessas observações, Coley-Nauts e cols. (1953) deliberadamente induziram febre em pacientes portadores de neoplasias malignas, usando toxinas bacterianas pirogênicas, e observaram algumas respostas parciais (Coley-Nauts *et al.*, 1953).

Mais recentemente, Crile (1963) apontou novos rumos para o moderno estudo quantitativo dos efeitos da hipertermia no câncer. Posteriormente, outros investigadores vêm relatando resultados encorajadores sobre o uso de novas técnicas de indução de hipertermia no tratamento de pacientes portadores de diversos tipos de neoplasias (Hill & Hunt, 1987; Oleson *et al.*, 1988; Fujimura, 1990; Fujimoto & Takahashi, 1992; Sugarbaker, 1995).

6.2. Fatores Básicos da Morte Celular por Hipertermia

6.2.1. *Efeito Citotóxico da Hipertermia*

Quando uma cultura de células cresce exponencialmente (*e.g.*, células ovarianas de *hamsters* chineses (CHO)) e são expostas a uma temperatura entre 41 e 47°C, uma curva dose-efeito pode ser definida pelo planejamento da taxa de morte celular contra a duração da hipertermia. A curva de sobrevivência correspondente mostra um típico limiar, o qual reflete os dois passos do processo de morte celular. Isto é marcado por uma interrupção do crescimento linear no início da exposição ao calor, que é seguido pela morte celular exponencial. Uma observação fundamental é que a capacidade para induzir morte celular a temperaturas <42-43°C (abaixo de um certo ponto de interrupção (*breakpoint*)) é acentuadamente menor que acima de 43°C. Portanto, uma definição comum de dose térmica (D) obtida a partir de uma exposição num determinado tempo (t) a uma

determinada temperatura (T) é de $D = tR^{T - 43}$, com $R = 2$ para temperaturas $\geq 43^\circ\text{C}$ e $R = 4$ para temperaturas $< 43^\circ\text{C}$, ou, nos casos de variação de T, uma somação de fração da dose e duração ($t + T$).

A dose térmica requerida para induzir morte celular hipertérmica varia de acordo com o fator 10 entre diferentes tipos de linhagem celular. Contudo, há uma variação particular da dose térmica na curva de sobrevivência desde o início da fase exponencial. A dose de energia térmica requerida para induzir morte celular exponencial está intimamente relacionada àquela que é requerida para a desnaturação de proteínas celulares, sendo a quantidade *in vitro* de 140 kcal/mol, assim como em tumores experimentais. Isto leva à hipótese de que o efeito citotóxico da hipertermia está principalmente baseado na desnaturação de proteínas membranares e citoplasmáticas, embora a correspondência de relação não tenha sido elaborada para fenômenos sensíveis à radiação e/ou a drogas citostáticas (Westra & Dewey, 1971; Dewey *et al.*, 1977a; Gerner, 1985; Sapareto, 1987).

6.2.2. *Morte Celular por Hipertermia em Diferentes Fases do Ciclo Celular*

Culturas de células sincronizadas exibem variação em sua susceptibilidade ao calor de acordo com sua fase no ciclo celular. Em geral, a maior sensibilidade ao calor pode ser observada durante a fase mitótica. O exame microscópico das células na fase M sujeitas à hipertermia mostrou dano em seu aparelho mitótico, levando a uma ineficiente mitose e conseqüente poliploidia. As células na fase S são também sensíveis à hipertermia, onde danos cromossômicos são observados. As células nas fases S e M sofrem “um lento modo de morte celular” após a hipertermia, enquanto que aquelas expostas ao calor durante a fase G1 são relativamente resistentes e não mostram nenhum dano microscópico. As células durante a fase G1 podem seguir “um rápido modo de

morte celular” imediatamente após a hipertermia. Estas variações existem entre as diferentes fases do ciclo celular indicando a possível diversidade de mecanismos moleculares de morte celular que se segue à hipertermia (Westra & Dewey, 1971; Coss *et al.*, 1982; Vidair & Dewey, 1988).

6.2.3. *Termotolerância como um Antagonismo de Morte Celular por Hipertermia*

Células malignas expostas a temperaturas <43°C, ou resfriadas a 37°C, entre dois tratamentos de choque térmico >43°C, mostram um prejuízo na sua susceptibilidade citotóxica induzida pelo calor, o qual resulta no aplanamento de inativação da curva. Este fenômeno de termotolerância é essencialmente reversível, e de origem multifatorial, não sendo herdado em cultura de células. É um fenômeno parcialmente baseado na indução de proteínas de choque térmico (HSP) e outros processos de adaptação pós-transição (*e.g.*, ciclo celular, parada na fase G2 do ciclo, mudanças no metabolismo celular). A capacidade para expressar tolerância térmica deve ser atenuada sob algumas condições ambientais (*e.g.*, redução inesperada do pH intracelular) e pode também ocorrer junto com alguma forma adquirida, ou herdada, de resistência à droga (Chin *et al.*, 1990; Wachsberger *et al.*, 1997).

6.3. Fatores Especiais da Hipertermia *in vivo*

6.3.1. *Indução de Alterações no Fluxo Sangüíneo e Microambiente Tumerais por Hipertermia >42°C*

O microambiente de tumores malignos é caracterizado pela redução do fluxo sangüíneo e pela densidade dos vasos que favorecem a hipóxia, a acidose e a necessidade energética. A hipertermia em temperaturas >42°C, além de seus efeitos citotóxicos, tem demonstrado diminuir o fluxo sangüíneo tumoral em estudos fundamentais realizados nas décadas de 1970 e 1980, prejudicando

assim o oxigênio e o suprimento de nutrientes e induzindo a acidose. A dose térmica necessária para alterar o suprimento sangüíneo tumoral varia entre tumores individuais e seus diferentes tipos. Isto parece, na maioria das vezes, depender da percentagem de vasos responsivos que têm mantido sua capacidade de regulação térmica. Além do mais, o dano induzido pelo calor na vascularização tumoral pode ocorrer em temperaturas que podem alterar, mas não danificar, a vascularização do tecido normal. Em alguns casos, mudanças de microcirculação induzidas pela hipertermia foram relatadas como irreversíveis, e em outros, colapsos da circulação foram evidenciados mesmo após o término da exposição ao calor. Extraordinário, a considerável não homogeneidade do suprimento sangüíneo dentro do mesmo tumor persiste após tratamento com temperatura $>42^{\circ}\text{C}$. As mudanças morfológicas associadas com hipertermia incluem edema endotelial, mudança do fluido plasmático intestinal, microtrombose devido à ativação da homeostase, e mudanças da viscosidade de membranas celulares do sangue. Todos estes fatores também promovem a redução do oxigênio e do suprimento de nutrientes, tanto quanto a acidose intratumoral (Von Ardenne & Reitnauer, 1982; Folkman, 1990).

Os efeitos da hipertermia isolada ou em combinação com outros agentes *in vivo* têm sido estudados em roedores, grandes animais e humanos. Muitas variáveis podem influenciar os efeitos da hipertermia *in vivo* (Urano *et al.*, 1980). O mais importante, a circulação sangüínea, que é um mecanismo para o transporte de calor, afeta a temperatura do corpo, produzindo assim o aquecimento nos tecidos por alguns meios (Jain & Ward-Hartley, 1984). A quantidade e a dependência do fluxo sangüíneo da temperatura influenciam intrinsecamente na distribuição de nutrientes às células e no *status* metabólico e no pH (Streffer, 1985).

Os vasos do tumor assemelham-se a capilares porosos e a sinusóides venosos sem a musculatura vascular lisa, a qual permite vasoatividade nor-

mal, tal como indução térmica da vasodilatação (Reinhold & Endrich, 1986). A estase do fluxo sanguíneo e a destruição vascular podem ocorrer na microcirculação do tumor sob condições que somente produzam mudanças reativas reversíveis em tecidos normais, criando assim uma das mais importantes e racionais vantagens de efeitos diferenciais da hipertermia entre tumores e tecidos normais. Áreas de baixa perfusão sanguínea tumoral podem atingir, preferencialmente, temperaturas mais elevadas do que em tecidos normais, aumentando assim os efeitos diferenciais do calor.

6.3.2. A Hipertermia “Moderada” Aumenta o Fluxo Sanguíneo Tumoral

Ao contrário dos estudos mais recentes sobre mudanças microambientais em tumores tratados com hipertermia “convencional” ($>42^{\circ}\text{C}$), a hipertermia “moderada” ($<42^{\circ}\text{C}$), que é muito mais fácil de ser aplicada *in vivo* e oferece uma melhor comparação para situações clínicas, tem demonstrado melhorar o fluxo sanguíneo tumoral e desta maneira satisfazer a necessidade de oxigênio. Deste modo, isto pode aumentar a efetividade da radioterapia (que é mais efetiva em tumores com mais alto suprimento de oxigênio) assim como da quimioterapia (cuja distribuição pode ser favorecida pelo aumento do fluxo sanguíneo tumoral). Além disso, esta hipótese daria uma boa explanação para a correlação de dose térmica e resultado clínico, como foi observado em ensaios clínicos sobre hipertermia local/regional, onde as temperaturas intratumorais não excediam 42°C durante a maior parte do tempo de tratamento. Contudo, a situação em pacientes com câncer parece ser muito mais complexa do que em sistemas experimentais, e o comportamento da vascularização tumoral, sob condições hipertérmicas, pode também depender do método de aplicação da hipertermia, contanto que a efetividade clínica de certas aplicações hipertérmicas seja realmente baseada no insucesso da vascularização tumoral, o que pode ser útil no futuro tendo

em vista combinar este efeito com outros agentes anti-angiogênicos (alguns dos quais têm sido recentemente introduzidos dentro da terapia anticâncer).

Se na visão de outros investigadores a hipertermia age por incremento do suprimento sangüíneo tumoral, uma possível conseqüência seria combinar a hipertermia com drogas antineoplásicas (\pm radiação) em tumores com baixo suprimento sangüíneo que não foram tratados adequadamente por modalidades convencionais de tratamento e sofreram recorrência do tumor (*e.g.*, recorrência local de câncer cervical pré-irradiado, recorrência de câncer retal ou recidiva de câncer mamário). Ainda há um número mínimo de incertezas acerca do efeito da hipertermia sobre o fluxo sangüíneo tumoral e, portanto, mais investigações se fazem necessárias nesta área (Vaupel *et al.*, 1989; Folkman, 1990; Iwata *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1997).

6.4. Efeito Sinérgico da Hipertermia e Radiação

6.4.1. *Radiossensibilização Térmica*

Uma das mais importantes observações em estudos *in vitro* sobre a ação do calor foi que a hipertermia e a radiação agem em sinergia. Este sinergismo induz a um aumento na morte celular mesmo em baixas temperaturas. Isto ocorre de maneira mais pronunciada na fase S, onde as células são usualmente resistentes à radiação isolada. A extensão da radiossensibilização térmica pode ser quantificada pelo quociente da fração de sobrevivência de células tratadas com radiação isolada e aquelas tratadas com radiação associada ao calor (razão de aumento térmico (RAT)) (Westra & Dewey, 1971; Kim *et al.*, 1976; Schlag & Lucke-Huhle, 1976; Dewey *et al.*, 1977b; Dewhurst *et al.*, 1980; Dewey, 1994).

6.4.2. Seqüência Radiação-Calor

A extensão do sinergismo entre calor e radiação depende da temperatura aplicada, do intervalo de tempo entre calor e radiação, e da seqüência do tratamento. Isto é mais distinto quando ambas as modalidades são aplicadas de maneira sincronizada. *In vitro*, um efeito supra-aditivo de calor e radiação pode ocorrer por 8 horas (ou período de tempo mais longo) quando células CHO são tratadas numa temperatura $>43^{\circ}\text{C}$ antes da radiação. Usando uma seqüência inversa, um efeito similar é freqüentemente observado por um curto período de tempo (2-4 horas), mas este efeito também é visto em temperaturas $<42^{\circ}\text{C}$. Um efeito sinérgico de calor e radiação também pode ser observado em células termotolerantes quando uma dose isolada de radiação de 2-4 Gy é aplicada; mas este efeito pode ser alterado dependendo do tipo de célula e do seu grau de tolerância. Células sob hipóxia, assim como células com suprimento de nutrientes deficiente e/ou pH ácido, têm demonstrado reagir muito sensivelmente ao tratamento combinado de calor e radiação (Westra & Dewey, 1971; Kim *et al.*, 1976; Dewey *et al.*, 1977a; Mills & Meyn, 1983; Streffer *et al.*, 1984; Dewey, 1994).

Aplicações sincronizadas de calor e radiação não são ainda possíveis na prática clínica, mesmo que os respectivos aparelhos já tenham sido desenhados e estejam sob avaliação. Uma vez que instruções claras sobre uma ótima seqüência radiação-calor não podem ser derivadas a partir de dados experimentais, a recomendação geral e a prática diária atuais são devido a estas razões, onde calor e radiação têm que ser aplicados dentro de um pequeno espaço de tempo. Alguns investigadores preferem um intervalo de tempo de 2-4 horas entre radiação e calor para aumentar a razão terapêutica. Outras aplicações de calor antes da irradiação podem ser vantajosas devido à prevenção da estase vascular, mas com possibilidade de promover radioresistência. Outro aspecto importante é que algumas frações de radioterapia antes do primeiro curso de hipertermia podem ser benéficas por razões radiobiológicas. Contudo, todas estas estratégias

não estão comprovadas por dados clínicos, e pelo menos a ótima seqüência radiação-calor na clínica hipertérmica carece de clarividência (Hildebrandt *et al.*, 2002).

6.5. Interação entre Hipertermia e Drogas

6.5.1. *Quimiossensibilização Térmica*

Análoga à radiosensibilização térmica, a hipertermia também aumenta a citotoxicidade de vários agentes antineoplásicos (quimiossensibilização térmica). Aplicações adicionais de drogas quimioterápicas específicas têm demonstrado aumentar a inibição do crescimento de clones genéticos celulares em elevadas temperaturas, tanto *in vitro* como *in vivo*. A extensão da quimiossensibilização térmica das drogas também pode ser expressa pela RAT, que basicamente é a razão de sobrevivência da célula exposta a elevadas temperaturas a uma temperatura normal para um certo nível de droga. Isto representa principalmente os fatores farmacodinâmicos da interação droga-calor (*e.g.*, mudanças da cinética do modo primário de ação da droga), mas, além da atenção, deve-se enfatizar a farmacocinética clínica e a modulação de para-efeitos. Em hipertermia, interações adicionais entre drogas e altas temperaturas têm sido descritas. Por exemplo, como algumas drogas perdem sua estabilidade química em altas temperaturas, ou como tornam-se prejudiciais em contato com o vidro ou plástico. Isto também tem que ser considerado, uma vez que solventes ou aditivos podem interagir com o calor e então induzir tanto termotolerância como termossensibilização (Hahn, 1982; Bull, 1984; Dahl, 1988).

6.5.2. *Diferentes Modos de Interação Droga-Calor*

A interação do calor com drogas quimioterápicas tem sido classificada por termos como aditivo ou superaditivo (aumento linear com o aumento da temperatura), limiar de comportamento (pouco ou nenhum aumento da cito-

toxicidade em baixas temperaturas, ou acentuado aumento com distinto limiar de temperatura) ou “independente” (Hahn, 1982; Bull, 1984).

É geralmente aceito que muitos agentes alcalinos (*e.g.*, ciclofosfamida e ifosfamida) e compostos *platinum* aumentam linearmente seus efeitos citotóxicos quando temperaturas são elevadas a partir de 37°C até acima de 40,5°C. A doxorubicina, ao contrário, possui um limiar de temperatura, enquanto que muitos antimetabólitos (*e.g.*, 5-fluorouracil), assim como os alcalóides da vinca e taxanos, não mostram dependência à hipertermia. Além disso, um determinado grupo de drogas (chamadas termossensíveis) age no caminho citotóxico somente em elevadas temperaturas. Algumas drogas bem conhecidas, como é o caso do anestésico local lidocaína, ou do antifúngico anfotericina B, têm demonstrado agir como drogas termossensíveis (Bull, 1984; Dahl, 1988; Issels, 1999).

Revisões de dados publicados na literatura sobre a interação droga-calor fazem voltar a atenção para discussões controversas sobre os achados do modo de interação de várias drogas e o calor, principalmente porque dados sobre a quimiossensibilização térmica freqüentemente referem-se a estudos *in vitro* nos quais a temperatura >43°C foi a utilizada e, portanto, não podem ser utilizados na hipertermia clínica. Além disso, tumores experimentais variam em sua susceptibilidade a certos agentes citostáticos (tanto em temperatura ambiente a 37°C, quanto em elevadas temperaturas). Além do mais, é fato conhecido que drogas mais efetivas em temperaturas normais não têm necessariamente alta capacidade de sensibilização em temperaturas mais altas. Indo mais além, a extensão da quimiossensibilização térmica de uma droga em um dado sistema experimental varia entre diferentes modos de administração e dosagem. É interessante notar que certos modos de aquecimento podem promover termotolerância e/ou resistência à droga, e que mais aspectos farmacocinéticos não podem ser simulados em modelos experimentais. Pelo menos, a perda de demonstração da

quimiossensibilização térmica pode ser devido a um inadequado intervalo entre a administração da droga e a exposição ao calor para vários agentes (Hahn, 1982; Dahl, 1988; Urano *et al.*, 1999).

6.5.3. Seqüência Droga-Calor

Dados disponíveis na literatura sugerem que a quimiossensibilidade térmica pode ter melhor rendimento pela administração sincronizada dentro de um pequeno intervalo de tempo para muitas drogas, mas deve haver algumas exceções. As oxacefalosporinas, ciclofosfamida e ifosfamida, por exemplo, sofrem um extensivo metabolismo hepático e, portanto, devem ser aplicadas algumas horas antes da hipertermia. Ao contrário, resultados clínicos favoráveis têm também sido alcançados por aplicação da hipertermia regional em conjugação com ifosfamida dentro de um pequeno intervalo de tempo (Issels *et al.*, 1990; Wiedemann *et al.*, 1993; Urano *et al.*, 1999). Outro exemplo é o antimetabólito gemcitabina, onde o tempo de intervalo de 24 horas entre a aplicação da droga e o calor foi o necessário para atingir um efeito sinérgico *in vitro* em um modelo em ratos. A correlação com dados clínicos ainda não foi concluída (Van Bree *et al.*, 1999). Por outro lado, mostrou-se que aplicações simultâneas de etoposide e calor levam a uma diminuição da atividade citostática *in vitro*, enquanto que aplicações desta droga levam a resultados satisfatórios quando feitas em combinação com outros agentes em hipertermia regional ou de corpo inteiro (Wiedemann *et al.*, 1996; Hildebrandt *et al.*, 2001). Em conclusão, além dos estudos farmacológicos, será necessário otimizar a aplicação de agentes citostáticos em conjugação com diferentes abordagens de hipertermia na prática clínica. A continuação de pesquisas pré-clínicas pode apresentar contratempo com relação a importantes fatores acerca da interação droga-calor, mas será útil na avaliação de novas drogas para a quimioterapia hipertérmica.

6.5.4. *Farmacocinética das Drogas Aplicadas Sincronicamente à Hipertermia*

A quimiossensibilização térmica reflete preferencialmente aspectos farmacodinâmicos de ação da droga durante a hipertermia, apesar de não considerar mudanças complexas na farmacocinética da droga sob condições hipertérmicas. Infelizmente, os dados disponíveis na literatura sobre as bases da terapia citostática sob condições hipertérmicas ainda são muito pouco entendidos. No geral, espera-se que mudanças no suprimento sangüíneo do tumor ocorram, e que estas afetem a distribuição das drogas citostáticas nos tecidos neoplásicos. Presume-se também que mudanças no fluido e balanço eletrolíticos, assim como mudanças de pH, possam resultar em mudanças da solubilidade e volume de distribuição das drogas. A hipercloridria gástrica e/ou fluido de seqüestro gastrointestinal pode representar fontes adicionais de problemas de distribuição, mas, pelo menos, as drogas antineoplásicas serão principalmente administradas por via intravenosa durante a hipertermia. Ao menos os metabolismos hepático e renal e a excreção podem mostrar mudanças relevantes sob várias modalidades de tratamento hipertérmico (Vanakoski & Seppälä, 1998).

Num estudo clínico de fase I sobre WBH, uma leve diminuição na eliminação renal de carboplatina foi detectada, o que levou a se supor que isto deveria ser a razão para um aumento na nefrotoxicidade da carboplatina enquanto combinada à hipertermia (Robins *et al.*, 1993; Gerke *et al.*, 2000).

Em outras investigações com carboplatina e estudos farmacológicos com WBH, a ocorrência de nefrotoxicidade foi principalmente devido ao uso de uma hemodiálise extracorpórea (sistema para induzir WBH), um método que pensou-se produzir uma relevante taxa de nefrotoxicidade por si só (Wiedemann *et al.*, 1994; Gerke *et al.*, 2000).

Em hipertermia regional da pélvis, uma tendência na direção a um mais alto *clearance* peritoneal, pós-aplicação de carboplatina, foi detectada em pacientes com câncer de ovário (Formenti *et al.*, 1996).

Contudo, somente muito poucos estudos em farmacologia clínica com drogas sob condições de hipertermia têm sido publicados. Os dados sugerem que pelo menos uma mais duradoura exposição sistêmica ao calor, de maiores partes do corpo (*e.g.*, em WBH), pode influenciar especialmente na farmacocinética de drogas citotóxicas administradas sincronicamente com a hipertermia devido a mudanças na circulação do órgão (*e.g.* do fígado ou rim), na taxa de metabolismo dependente da temperatura, ou na mudança do fluido. Em geral, a interação droga-calor em pacientes com câncer parece ser muito mais dependente de fatores ambientais (*e.g.*, suprimento sangüíneo, equilíbrio do fluido, ou valor do pH) do que daqueles com radiação e calor. Como esses fatores usualmente não podem ser simulados por experimentos pré-clínicos de maneira convincente, dados correspondentes sobre a interação droga-calor e quimiossensibilização térmica devem ser interpretados com grande cautela. Além do mais, pesquisas no âmbito de ensaios clínicos são ainda necessárias.

6.6. Efeitos Celulares da Hipertermia

6.6.1. *Membrana Celular e Citoesqueleto*

A hipertermia afeta a fluidez e estabilidade das membranas celulares e impede a função de transporte de proteínas transmembrana e a de receptores de superfície celular *in vitro*. Um aumento da fluidez das membranas celulares foi observado em células termossensíveis, mas não em células termotolerantes. Isto sugere que as alterações de membrana representam um importante alvo na morte celular hipertérmica (Stevenson *et al.*, 1981; Calderwood & Hahn, 1983). Estas observações dão lugar a numerosos relatos sobre mudanças no potencial de membrana, elevação do sódio intracelular e conteúdo de cálcio, assim

como elevação do efluxo de potássio sob hipertermia. Contudo, nenhum destes fenômenos parece estar correlacionado com a taxa de morte celular *in vitro*, mesmo que um único fenômeno possa assumir um efeito da hipertermia sobre o transporte de íons transmembrana (Na^+/H^+ , $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ ATP-transporte, respectivamente) e o pH intracelular a partir destes dados (Calderwood & Hahn, 1983; Vidair & Dewey, 1986; Song *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1996).

Além do mais, a hipertermia tem demonstrado induzir várias mudanças de organização cito-esquelética (*e.g.*, forma da célula, aparelho mitótico, membranas intraplasmáticas tais como as do retículo endoplasmático e dos lisossomos), mas, novamente, não foi encontrada correlação clara entre estas mudanças e a termossensibilidade de várias linhagens celulares (Von Ardenne *et al.*, 1969; Overgaard, 1976; Hahn, 1982; Coss *et al.*, 1982). Neste contexto, o esfacelamento da membrana de células em cultura expostas ao calor foi descrito primeiro, e foi notado que as células que exibem este fenômeno sofreram morte celular após uma única dose de calor (Borrelli *et al.*, 1986).

A partir dos mais recentes pontos de vista, o esfacelamento membranar não representa um dano primário da membrana celular, mas é um típico fator de morte celular programada (apoptose). Até hoje, vários autores têm demonstrado que a hipertermia é capaz de induzir apoptose tanto *in vitro* quanto em animais experimentais.

6.6.2. *Proteínas Celulares e Ácidos Nucléicos*

A síntese intracelular *de novo* e a polimerização de moléculas de RNA e DNA durante a síntese de proteínas estão diminuídas *in vitro* em temperaturas entre 42 e 45°C de maneira dose-dependente. Ao passo que o RNA e a síntese de proteínas se recuperam rapidamente após o término da exposição ao calor, a síntese de DNA é inibida por um longo período (Henle & Leeper, 1979; Hahn, 1982; Streffer, 1988).

O choque térmico leva a uma agregação de desnaturação de proteínas na matriz nuclear. Isto ocorre principalmente devido à insolubilidade das proteínas celulares após seu desdobramento, acarretando assim um aumento da concentração de proteínas nucleares. Recentemente, elevadas ligações de afinidade e redistribuição em direção a estruturas nucleares têm sido descritas para mais de 100 diferentes proteínas celulares, incluindo as HSP.

O aumento da quantidade de proteínas nucleares pelo aquecimento consecutivo afeta diversas funções moleculares (inclusive a síntese e o reparo do DNA) quando uma certa dose térmica é excedida. Esta dose limite é diversa entre distintas linhas celulares. As células HeLa, que entram na fase S do ciclo celular em 41,5°C, a despeito de um prejuízo das enzimas nucleares, sofrem conseqüente morte na fase M após conclusão da síntese de DNA. Sob outros meios, as células CHO, que exibem um acentuado prejuízo de replicação do DNA nas mesmas condições experimentais retidas em G1, tornam-se termotolerantes. Tanto o caráter limiar quanto a susceptibilidade distinta ao calor entre diferentes linhagens celulares podem ser melhor explicados pelas diferenças na recuperação a partir do choque térmico, e não pela extensão do dano celular intrínseco induzido pelo calor (Higashikubo *et al.*, 1993; Roti Roti *et al.*, 1998).

Na década de 1960, supunha-se que a hipertermia agia de maneira semelhante à radiação por induzir dano direto ao DNA e quebra da dupla hélice. Mais tarde, tornou-se evidente que o calor não era capaz de causar severo dano intrínseco ao DNA, mas, ao invés de impedir o reparo do DNA induzido pela radiação, o dano celular é subtotal e, portanto, ajuda na fragmentação do DNA induzida pela radiação. A partir dos recentes pontos de vista, isto pode ser causado pela inibição de enzimas reparadoras do DNA dependentes da temperatura. De fato, tem sido demonstrada pela hipertermia a inibição da DNA-polimerase α e da DNA-polimerase β (Hildebrandt *et al.*, 2002).

6.6.3. *Proteínas do Choque Térmico (HSP)*

Enquanto a síntese de muitas proteínas celulares está prejudicada sob condições hipertérmicas, o mesmo não pode ser dito sobre as HSP. Elas representam um grupo heterogêneo de proteínas chaperones (Beviláqua, 1999), consistindo de pelo menos cinco subgrupos com massa molecular e variando parcialmente sua função biológica. Estão usualmente divididas dentro das pequenas HSP (massa molecular <40 kDa) e as famílias HSP60, HSP70, HSP90 e HSP100. Todas as famílias HSP distribuem suas funções chaperones, isto é, elas ligam-se não seletivamente à proteína hidrofóbica e as seqüências são liberadas por desnaturação. Então, elas impedem a interação irreversível com proteínas vizinhas (*e.g.*, na matriz nuclear), o que resulta em perda de função. Contudo, expressão elevada de funções chaperones das HSP não são restritas a elevadas temperaturas. Elas podem também ser observadas sob várias condições de *stress*, e algumas HSP realizam funções semelhantes durante a síntese de proteínas regulares, contanto que alguns aminoácidos não tenham ainda desenvolvido estruturas complexas. A síntese de HSP pode ser induzida dentro de minutos por ativação do assim chamado “fator de choque térmico” (HSF). Esse fator liga-se rapidamente e ativa a região promotora de vários genes do choque térmico após trimerização, em particular aquela envolvida na síntese de HSP70. Hoje supõe-se que pelo menos as famílias HSP27 e HSP70 representam “as proteínas da sobrevivência geral”, as quais são capazes de defender as células contra uma variedade de estímulos potencialmente letais (pró-apoptóticos) (Morimoto, 1993; Agashe & Hartl, 2000).

6.7. Características da Morte Celular por Hipertermia

6.7.1. *Diferentes Tipos de Morte Celular*

Hoje parece estar provado que as propriedades antineoplásicas das drogas e radiação são principalmente baseadas nas suas capacidades (no cami-

nho direto ou indireto) de induzir tanto apoptose (sinônimo de programação) quanto necrose (morte celular). Enquanto que a necrose é marcada por um dano celular patológico passivo, seguido por uma resposta inflamatória originada a partir do tecido circunjacente, a apoptose representa um controle geneticamente programado; uma morte ativa programada. Isto pode ser ativado por dano celular, ou fisiologicamente, pela presente contribuição para manter a homeostase tecidual, assim como prevenir severo dano celular, o que pode levar a sustentar uma infecção viral ou câncer. Na visão de outros autores, o excesso de apoptose pode levar a prejuízo no desenvolvimento celular e à doença degenerativa em um dado tecido ou organismo. Vale ressaltar ainda que muitos estímulos que ativam a apoptose são também capazes de induzir necrose em exposições prolongadas ao calor e intensas (White, 1996).

Na apoptose, o estímulo potencial letal semelhante a drogas citotóxicas, radiação, viroses ou inativação celular, ativa a cascata de proteases cisteína-específica; são as chamadas “caspases” em diferentes caminhos. Cada uma destas sinalizações pode ser estimulada na mitocôndria. A regulação da programação da apoptose é controlada através da exposição de um número de genes com ativação (*e.g.*, família de genes *bax*) ou inibição (*e.g.*, gene da família *bcl*, *p53*) de propriedades. Como as alterações genéticas destes genes foram encontradas no intuito de contribuir para as transformações malignas e progressão de várias doenças malignas sólidas e hematológicas, pesquisas básicas sobre apoptose foram estimuladas durante as últimas décadas (White, 1996; Neubauer *et al.*, 1996; Jaattelä, 1999).

6.7.2. Apoptose Induzida por Hipertermia

A hipertermia é suficientemente capaz de induzir tanto necrose como apoptose *in vitro* de maneira temperatura-dependente (Harmon *et al.*, 1990). A susceptibilidade da cultura de células à apoptose poderia ser demonstrada em

um número particular de experimentos usando linhas celulares hematológicas (Harmon *et al.*, 1990; Gabai *et al.*, 1995). Yonezawa e cols. (1996), em estudos usando várias linhagens celulares de osteossarcoma e tecidos de partes moles, relataram explicitamente que a apoptose poderia ser somente induzida por aquecimento acima de 43°C em uma cultura isolada de histiocitoma fibroso maligno. Parece que pelo menos alguns tipos de células exibem susceptibilidade diferente à apoptose induzida pelo calor. Acima de uma distinta temperatura, é muito mais provável induzir necrose.

Considerando experimentos *in vivo*, um significativo retardo do crescimento do tumor devido à apoptose foi observado em um xenotransplante de carcinoma de cólon *ward*, mas não em fibrossarcoma exposto por longo período de tempo à moderada hipertermia. Além do mais, análises de tecidos hospedeiros revelam a ocorrência de apoptose em vários tecidos linfáticos (especialmente timo). Taxas de apoptose moderadamente aumentadas foram também estabelecidas dentro do intestino delgado, o mesmo não ocorrendo em nenhum outro órgão (Sakaguchi *et al.*, 1995; Yonezawa *et al.*, 1996).

Num empreendimento conjunto, a apoptose parece representar um importante efector de ação do calor. De qualquer modo, o que deve ser levado em consideração aqui é que muitos dos dados pré-clínicos referem-se a temperaturas mais elevadas do que aquelas que possam ser efetivamente aplicadas em tratamentos hipertérmicos de pacientes com câncer. Como a hipertermia é sempre aplicada em combinação com radiação e/ou drogas antineoplásicas na prática clínica, é concebível que pelo menos um efeito pró-apoptótico aditivo possa tornar-se relevante no âmbito das estratégias multimodais. Além do mais, isto deve servir de suporte para adicionais mudanças vasculares, nutricionais e imunológicas (Hildebrandt *et al.*, 2002).

6.8. Mudanças na Imunoresposta Celular Induzida por Hipertermia

6.8.1. *Efeitos pré-Clínicos do Calor sobre Linfócitos e Tumores Experimentais*

O termo hipertermia tem que ser claramente distinto do termo febre. Enquanto que o primeiro refere-se à indução artificial de calor, quer seja externa ou interna, localizada ou sistêmica, o segundo diz respeito a um fenômeno patofisiológico internamente induzido, o qual pode ser causado por anormalidades do cérebro ou agentes tóxicos (*e.g.*, pirógenos: viroses, toxinas bacterianas, drogas, colapso tecidual, proteínas estranhas), os quais afetam os centros termoreguladores no hipotálamo e levam a um aumento sistêmico na temperatura do corpo (Seegenschmiedt & Vernon, 1995).

Uma aparente reação imunológica provocou vários estudos *in vitro* sobre o efeito do calor sobre linfócitos humanos desde o início da década de 1980, principalmente focalizando funções imunológicas de linfócitos não migratórios (Amaning & Olszewski, 1994).

Neste contexto, muitos investigadores têm observado prejuízo da função dos linfócitos após aplicação não fisiológica em altas temperaturas (>42°C) *in vitro*, e especialmente os linfócitos NK têm demonstrado reagir mais sensivelmente ao calor. A partir de recentes pontos de vista, constatou-se ser muito difícil se chegar a uma conclusão por comparação destes estudos, uma vez que diferentes testes e cálculos foram utilizados para mensurar a atividade lítica das células NK, algumas vezes sem considerar a quantidade total de linfócitos NK. Contudo, Shen e cols. (1994) demonstraram, de maneira persuasiva, que a função das células NK está aumentada em temperaturas em torno de 40°C, mas prejudicada em temperaturas acima de 42°C. Mais recentemente, achados referindo-se a temperaturas *in vitro* <41°C revelaram um aumento na proliferação das células NK, as quais foram acompanhadas com resposta ao choque térmico tão bem quanto à secreção de selectina. A relevância clínica destes achados

permanece clara (Azocar *et al.*, 1982; Kappel *et al.*, 1991; Shen *et al.*, 1994; Di *et al.*, 1997).

A influência do calor sobre a resposta imune celular manifesta-se a partir de recentes estudos animais feitos por Burd e cols. (1998). Aqui, um retardo de crescimento de um xenotransplante em câncer de mama de camundongos SCID e Balb foi observado após longo período de tempo de exposição sob moderada hipertermia. As doses térmicas aqui aplicadas foram muito baixas para induzir mudanças em algum tecido hospedeiro, mas, em um determinado sítio do tumor, o acúmulo de linfócitos hospedeiros e de células NK adotivamente transferidas foram responsáveis por uma acentuada taxa de células tumorais em apoptose, observada em ambos os modelos animais pós-hipertermia. Este efeito foi inibido por seletivo bloqueio da função das células NK. Portanto, as células NK medeiam a lise celular e podem representar um importante mecanismo citotóxico induzido por moderada hipertermia (Burd *et al.*, 1998).

6.8.2. *Mudanças Imunológicas em Pacientes com Câncer Tratados com Hipertermia de Corpo Inteiro (WBH)*

Muitos dados publicados na literatura sobre mudanças imunológicas em seres humanos expostos a aquecimento sistêmico referem-se a investigações de subpopulações de linfócitos e/ou citocinas no soro de pessoas saudáveis cuja temperatura corporal central foi moderadamente elevada de 39°C para 39,5°C em banho-maria (Downing *et al.*, 1988; Kappel *et al.*, 1991; Kappel *et al.*, 1998). Existem também relatos sobre mudanças imunológicas em pacientes após um derrame cerebral decorrente do calor (Hammami *et al.*, 1998). Além disso, poucas publicações estão disponíveis sobre mudanças em exposição ao calor por pequeno período de tempo em níveis de citocina no soro de pacientes tratados tanto por calor de radiação como por WBH extracorporeal a 42°C (Robins *et al.*, 1995).

No tocante à subpopulação de linfócitos, foi observada uma significativa redução na quantidade de células T4, e na razão T4/T8, tanto em pessoas saudáveis como em pessoas que sofreram moderada hipertermia em banho-maria, assim como em pacientes que sofreram derrame cerebral a partir do aquecimento. Por outro lado, as células T8 e NK foram elevadas significativamente, resultando então em um leve aumento da quantidade de linfócitos totais, a despeito da diminuição das supracitadas células T4 (Downing & Taylor, 1987; Kappel *et al.*, 1998). Como recentemente demonstrado, uma diminuição de células T4 também ocorreu em pacientes tratados com WBH, mas uma redução de células T8 não foi detectada neste contexto (Ahlers *et al.*, 1998; Hegewisch-Becker *et al.*, 1998).

Mudanças na resposta imune celular observadas em indivíduos expostos a aquecimento sistêmico são relativamente inespecíficas e podem ser interpretadas como parte de uma resposta geral ao *stress* fisiológico maior, cuja presença reflete-se claramente pela significativa elevação da frequência e débito cardíacos em pacientes submetidos a WBH (Faithfull *et al.*, 1984; Kerner *et al.*, 1999). Mudanças semelhantes, incluindo uma elevação das células NK, também podem ser induzidas pela infusão de adrenalina ou por exercício físico moderado, enquanto que exercício físico mais pesado pode implicar em prejuízo da atividade dessas células (Hoffman-Goetz & Pedersen, 1994; Kappel *et al.*, 1998).

Moderados níveis de catecolaminas no plasma resultam na estimulação da função das células NK, enquanto que prejuízo na atividade dessas células foi encontrado na presença de altos níveis de catecolaminas. Numa maneira de ver, as catecolaminas podem exercer sua influência sobre os linfócitos sanguíneos por uma estimulação direta, e noutro aspecto, através da inervação simpática dos tecidos linfáticos (Benschop *et al.*, 1997; Maes *et al.*, 1999).

Investigações de níveis de citocinas no soro em pacientes que sofreram WBH têm sido realizadas por Robins e cols. (1995). Estes autores relataram

alterações em pacientes tratados com WBH, compreendendo uma elevação das interleucinas anti-inflamatórias IL-6 e IL-10, enquanto que a IL-2 e o interferon gama (IFN- γ) permaneceram inalterados. Estes achados foram recentemente confirmados por outros autores, notadamente por Hildebrandt e cols. (2002). Extraordinário, ambas as mudanças nos níveis de citocinas em pacientes submetidos a WBH, assim como aquelas em subpopulações de linfócitos, reverteram espontaneamente. Além disso, um aumento de citocinas anti-inflamatórias pode também ser induzido por *stress* fisiológico em modelos animais, algumas vezes chegando mesmo a induzir diminuição de níveis séricos de IL-2 e IFN- γ (Robins *et al.*, 1995; Ahlers *et al.*, 1999; Iwakabe *et al.*, 1998).

A WBH induz a liberação endógena de citocinas mielo-estimulatórias que agem para compensar a mielosupressão induzida pelas drogas e pela radiação (D'Oleire *et al.*, 1993; Neta & Oppenheim, 1991; Shen *et al.* 1991). Estes sinais endógenos estimulam a produção de TNF, além de estimularem outras citocinas inflamatórias: interleucinas IL-1, IL-6, IL-8, fator estimulador de colônia (CSF), interferon (IFN), fator de crescimento de transformação β (TGF- β). Além disso, o TNF intrinsecamente estimula a produção de citocinas mielo-estimulatórias (Neta *et al.*, 1992).

Com relação aos fatos mencionados acima, a WBH e outras formas de exposição sistêmica ao calor $>41^{\circ}\text{C}$ têm demonstrado induzir severas alterações na circulação de linfócitos sangüíneos, resultando mais na supressão do que na estimulação do sistema imune. Contudo, futuras pesquisas revelarão se estes achados apenas representam parafenômenos, ou se há uma conexão entre mudanças nos linfócitos sangüíneos e aumento na migração de linfócitos e a atividade das células NK no sítio tumoral, como foi demonstrado em tumores experimentais (Hildebrandt *et al.*, 2002).

6.9. Modulação de Resistência à Droga por Hipertermia

6.9.1. *Reversão de Resistência à Droga Induzida por Hipertermia*

Resistência à droga representa a maior causa de falha do tratamento em doenças malignas humanas e pode ser induzida por diferentes mecanismos, dos quais, o pleiótupo “multidroga-resistência” (MDR), mediado pela glicoproteína transmembrana p170 e fluxo de bomba, tem ganho particular interesse (Hegewisch-Becker, 1996; Filipts *et al.*, 1996). Dados pré-clínicos sugerem que a hipertermia é um fenômeno com possibilidade de superar vários modos de resistência à droga, o que tem sido particularmente demonstrado pelos derivados *platinum* (*e.g.*, cisplatina). A cisplatina supera a resistência através da hipertermia de maneira exemplar, pois suas causas são multifatoriais (*e.g.*, mudanças na condutividade transmembrana, atividade da sódio-potássio ATPase, metabolismo da glutathione, reparo do DNA). Portanto, isto possibilita investigar o efeito da hipertermia sobre a resistência às drogas em diferentes níveis celulares (mas é interessante notar que o fenótipo MDR não está envolvido na resistência à cisplatina). Contudo, o que se deve ter em mente aqui é que temperaturas em doses térmicas foram significativamente maiores nestes estudos *in vitro* do que naqueles que usualmente se tem atingido na prática clínica (Hettinga *et al.*, 1997). Ao contrário, o curso de pacientes individuais previamente refratários aos compostos *platinum*, os quais responderam à terapia pós-adição da hipertermia, é fortemente oposto à reversão de resistência à droga induzida pela hipertermia (Hildebrandt *et al.*, 1998).

6.9.2. *Termotolerância está Frequentemente Associada com Resistência à Droga*

Uma moderada exposição ao calor tem demonstrado induzir expressão de HSP em cultura de células, e níveis elevados de HSP70 intracelular têm mostrado estar associado com termotolerância. Ao contrário, a transfecção de

HSP70 para dentro de culturas de fibroblastos resultou em uma pronunciada diminuição de termossensibilidade, com semelhantes achados obtidos por outros membros da família HSP. A termotolerância pode estar associada com diferentes formas de resistência à droga (*e.g.*, MDR), e a hipertermia tem mostrado induzir várias formas de resistência à droga, incluindo MDR ou a inativação da enzima topoisomerase II dependente de calor. A ocorrência de um calor induzível e de simultânea resistência ao calor e a drogas (termotolerância + MDR) têm ocorrido sob certas condições (Lindquist & Craig, 1988; Li *et al.*, 1990; Chin *et al.*, 1990; Ciocca *et al.*, 1993; Kampinga, 1995; Oh *et al.*, 1997).

6.9.3. O Papel da Hipertermia é Reverter ou Induzir a Resistência às Drogas

Parece curioso que a hipertermia tenha sido mostrada com dupla finalidade: reverter ou induzir resistência a drogas *in vitro*. A reversão da resistência tem sido particularmente demonstrada para compostos *platinum* em temperaturas $>42^{\circ}\text{C}$, enquanto que a indução desta (isolada ou em conjunto com termotolerância e acúmulo de HSP) pode aparecer quando baixas temperaturas são aplicadas. Apesar destas observações pré-clínicas, um efeito favorável de diferentes abordagens da hipertermia sobre a sensibilidade das drogas tem sido relatado no âmbito de ensaios clínicos. Aqui, pacientes quimiossensíveis, principalmente, mas também aqueles com doenças refratárias (*e.g.*, tumores de células germinativas e sarcomas), foram sucessivamente tratados com hipertermia adicional para um dado esquema quimioterápico (Wiedemann *et al.*, 1996; Rietbroek *et al.*, 1997; Wessalowski *et al.*, 1998; Hildebrandt *et al.*, 2001).

Além do mais, há um estudo disponível na literatura no qual espécimes de tumor oriundo de pacientes participando em ensaios clínicos com hipertermia foram investigados, com relatos para a modulação de resistência à droga ao nível molecular. Aqui, foi excluída uma indução de resistência à droga

(MDR) por hipertermia regional da pélvis em conjunto com radioterapia e quimioterapia (Stein *et al.*, 1999). Em conclusão, dados disponíveis na literatura sobre hipertermia e resistência à droga sugerem o efeito positivo (reversão da resistência) e o excesso de desvantagens (indução de resistência) na prática clínica. Contudo, o que se deve ter em mente aqui é que a resistência à droga poderia ser induzida por hipertermia como princípio, particularmente em temperatura moderada (Hildebrandt *et al.*, 2002).

7. Drogas Utilizadas em Associação com a Hipertermia

7.1. Paclitaxel (Taxol®)

A administração de agentes citotóxicos tem sido terapia corriqueira em doenças neoplásicas notadamente confinada à cavidade peritoneal (Dedrick *et al.*, 1978; Markman *et al.*, 1992; Markman, 1993). É grande o interesse e o uso do Paclitaxel (Taxol®), e se tem obtido bons resultados em pacientes com câncer de ovário refratário ao tratamento com derivados *platinum* (McGuire *et al.*, 1989, 1993). Por outro lado, tem-se demonstrado, em estudos experimentais, bons resultados com derivados *platinum*, no caso, específico com tumores de Walker 256 implantados nos estômagos de rato. O uso da carboplatina isolada e associada à hipertermia mostrou bons resultados (Oliveira, 1997).

A interação da hipertermia e Paclitaxel (Taxol®) em estudos *in vitro* em câncer de mama humano e em adenocarcinoma MCF-7 mostrou que a hipertermia pode diminuir, ou parar, a progressão de células tratadas com paclitaxel através da fase S e dentro do G2/M (Leal *et al.*, 1999).

Paclitaxel (Taxol®) usado em duas diferentes doses intraperitoneais associado à hipertermia a 43°C, em adenocarcinoma murino mamário, demonstrou alta efetividade (Cividalli *et al.*, 2000).

Nem a vincristina (Rose *et al.*, 1979; Mizuno *et al.*, 1980) nem a vimblastina (Giovanella *et al.*, 1970; Neumann *et al.*, 1985) têm demonstrado que o calor aumenta a citotoxicidade, tanto *in vitro* como *in vivo*, em hipertermia de corpo inteiro (WBH) a temperaturas de 41,5 a 42°C. Como nos casos de uso clínico dos alcalóides da vinca, a interação de etoposide, taxol e calor não tem sido suficientemente testada para descrever suas atividades com hipertermia *in vitro* ou *in vivo*, embora estudos preliminares *in vitro* sugiram que o taxol, quando administrado concomitantemente com o calor, não é interativo em variações relevantes de temperatura em WBH (Sakaguchi *et al.*, 1993a, 1993b).

É neste contexto que se propõe verificar o taxol experimentalmente sobre o carcinossarcoma 256 de Walker, implantado em estômagos de rato, sob condições de hipertermia peritoneal contínua de corpo inteiro.

7.2. 5-FU (5-Fluorouracil)

Dentre os agentes quimioterápicos existentes, o 5-FU é aquele usado por excelência, tanto isolado como associado ao tratamento adjuvante do câncer colo-retal (Barone *et al.*, 1979; Santos & Santos, 1997), sendo também aquele mais extensamente usado nos cânceres gástrico e de cólon, e largamente usado em combinação com outras drogas no tratamento do câncer de mama (Ansfield *et al.*, 1971).

A combinação de 1 hora de hipertermia a 42°C com adriamicina, vincristina ou 5-FU resultou em efeito sinérgico contra células leucêmicas P388 (Adwankar & Chitnis, 1984).

O 5-FU é de inestimável valor no tratamento do câncer de cólon (Ansfield *et al.*, 1962; Curreri *et al.*, 1958). Em mais de 2000 casos, o 5-FU ofereceu uma resposta de 21% (Carter & Friedman, 1974).

O fluorouracil, em metástases por câncer de cólon, mostrou boa resposta isoladamente (22%) e em associação com metil-CCNU e vincristina

(37%) (Falkson & Falkson, 1976). Moertel e cols. (1975), em estudo controlado e randomizado com 80 pacientes portadores de carcinoma colo-retal avançado, usaram o 5-FU isolado e em combinação com metil-1,3-cis(2-cloretil)-1-nitrosourea e vincristina, e observaram que o grau de toxicidade da combinação era comparável ao 5-FU isolado. Em 10 semanas de tratamento, eles observaram ainda que com esta associação de três drogas a taxa de resposta objetiva foi de 43,5% quando comparada com a do 5-FU isolado, que foi de apenas 19,5% (Moertel *et al.*, 1975).

A combinação da infusão de 5-FU via artéria hepática comum associada à radioterapia em metástases hepáticas por carcinoma de cólon, apesar de controversa, mostrou somente uma boa palição em muitos casos (Barone *et al.*, 1979).

Estudos feitos em leucemia humana da linhagem T linfoblástica onde se usou 5-FU associado à hipertermia mostraram sinergismo sobre os efeitos citotóxicos nesta linhagem (Mini *et al.*, 1986). Experimentos feitos *in vitro* com células leucêmicas P388 expostas à hipertermia associada à adriamicina, vincristina ou 5-FU resultaram em sinergismo de ação com conseqüente morte celular (Adwankar & Chitnis, 1984).

Dispõe-se, portanto, verificar o 5-FU experimentalmente sobre o carcinossarcoma 256 de Walker, um tumor sólido, implantado em estômagos de rato, ora isolado ou sob condições de hipertermia peritoneal contínua de corpo inteiro.

7.3. Ácido Folínico (Leucovorin®)

O ácido folínico (Leucovorin®), um conhecido modulador dos efeitos do 5-FU, aumenta, tanto *in vitro* como *in vivo*, a citotoxicidade do 5-FU em muitos, mas não em todos, os tipos de câncer, de uma maneira, concentração e tempo dependente (Ullman *et al.*, 1978). Diversos estudos pré-clínicos sugerem

que é importante administrar o leucovorin antes, ou pelo menos concomitantemente, à fluoropirimidina para permitir o metabolismo do leucovorin ao 5,10-CH₂FH₄ poliglutamatos, que são mais efetivos em promover formação de complexos ternários (Houghton *et al.*, 1986; Cao *et al.*, 1996).

Projetos pilotos em desenvolvimento no Japão e Estados Unidos vêm sugerindo o emprego de outros tipos de terapêutica associando a quimioterapia e hipertermia à cirurgia no controle da doença localmente avançada (Fujimoto *et al.*, 1990). O aumento dos efeitos citotóxicos de muitos antibióticos antineoplásicos, alcalóides e agentes alquilantes devido o aumento de temperatura tem sido observado em sistemas *in vivo* e *in vitro* (Bull, 1984). Até o presente momento, somente informações incompletas estão disponíveis na literatura a respeito da interação de temperaturas elevadas e antimetabólitos citotóxicos de células tumorais (Herman *et al.*, 1981; Giovanella *et al.*, 1970). Raras informações experimentais têm sido relatadas envolvendo interação do 5-FU e hipertermia (Mizuno *et al.*, 1980; Rose *et al.*, 1979). A hipertermoterapia isolada não se mostrou eficaz no tratamento do tumor de Walker implantado em estômago de rato. Já sua associação à quimioterapia com carboplatina apresentou bons resultados (Oliveira, 1997). O uso clínico do 5-FU associado ao calor pode ser relevante, especialmente para o tratamento de pacientes com tumores sólidos sensíveis a esta droga (Costanzzi *et al.*, 1979).

Tenciona-se, assim, verificar o leucovorin associado ao 5-FU experimentalmente sobre o carcinossarcoma 256 de Walker, um tumor sólido, implantado em estômagos de rato, ora isoladamente ora sob condições de hipertermia peritoneal contínua de corpo inteiro.

8. Progressão Tumoral

Em estudos com carcinógenos em animais experimentais, têm-se confirmado que pelo menos dois passos – iniciação e promoção – são requeridos para produzir tumores (Friedewald & Rous, 1944). O primeiro passo (iniciação) acredita-se envolver a conversão do interior de uma célula normal em uma célula latente de tumor. O segundo passo (promoção) parece ser um evento no qual as células latentes tumorais estimulam-se a se dividir (Heidelberger, 1977; Isaacs *et al.*, 1982; Farber, 1984; Berenblum, 1985). Juntamente com estas mudanças iniciais, estas anormalidades e divisões celulares excessivas, são gerados novos fenótipos (Nowell, 1976) e as células que sofrem seleção clonal são afetadas (Steel, 1984). Algumas células agressivas e transformadas continuam no terceiro passo, o qual leva à invasão e metástase (Nicolson, 1984). Tudo isto sustenta o conceito de que a promoção é também um processo de múltiplos estágios, os quais levam à progressão.

Certas características biomorfológicas do estágio de progressão foram delineadas a partir de estudos em neoplasias experimentais e humanas durante a carcinogênese, a saber:

- a) Invertibilidade;
- b) Alterações discerníveis no genoma celular, moleculares e morfológicas;
- c) Desenvolvimento de instabilidade cariotípica;
- d) Crescimento de células no estágio de progressão, sensíveis a fatores ambientais durante a fase precoce deste estágio;
- e) Agente “progressor”, o qual age para induzir a transição de células no estágio de promoção àquele de progressão;
- f) Indução espontânea (fortuita) ao estágio de progressão a partir do estágio de promoção.

A invertibilidade deste estágio é enfatizada pela demonstrável alteração no genoma celular (*e.g.*, translocação cromossomal) (Wolman, 1983), deleção cromossomal (Sato *et al.*, 1991), amplificação gênica (Tlsty, 1996) e outras alterações estruturais do DNA (Malins *et al.*, 1996) que são encontradas dentro deste estágio. Tais mudanças genômicas claramente distinguem o estágio de progressão (irreversível) do estágio de promoção (reversível) que o precede (Balaban *et al.*, 1986; Aldaz *et al.*, 1987; Sargent *et al.*, 1989). Embora as células no estágio de progressão não estejam completamente dependentes da presença continuada do agente promotor para sua existência, os agentes promotores e outros fatores ambientais podem aumentar o crescimento e a expressão genética de células no estágio de progressão. E como o crescimento da neoplasia continua, e desenvolve instabilidade cariotípica, a resposta a fatores ambientais pode ser alterada ou mesmo perdida (Noble, 1977; Welch & Tomasovic, 1985).

As populações de células malignas são caracterizadas por uma instabilidade genética, a qual leva à geração espontânea de variadas formas, surgindo assim diferentes fenótipos e propriedades genotípicas (Goldie & Coldman, 1985). Tais alterações genéticas incluem mutações, deleções, amplificações gênicas e translocações, dentre outras (Bellamy *et al.*, 1990).

A demonstração experimental do estágio de progressão é um tanto mais complexa do que a iniciação e a promoção. Em sistemas experimentais, o mais efetivo desenvolvimento de neoplasia implica na administração continuada do agente promotor, mesmo que a aplicação do agente promotor tenha cessado. Isto deve ser esperado, pois as células em estágio precoce de progressão respondem ao agente promotor, e assim continuam a responder proliferativamente. Desta maneira, o agente promotor produz um aumento nas lesões neoplásicas iniciais em sistemas experimentais.

O estágio de progressão usualmente se desenvolve a partir de células no estágio de promoção, mas pode também desenvolver-se diretamente a

partir de células normais como resultado da administração relativamente alta de doses citotóxicas de agentes carcinogênicos completos, capazes de induzir iniciação e progressão. Além disso, a incorporação de informação genética dentro do genoma tais como viroses oncogênicas, material genético de transfecção estável, ou alterações cromossômicas espontâneas, pode realçar a transição dentro do estágio de progressão. Como tem sido assinalado, mudanças cariotípicas são comuns se não onipresentes em células neoplásicas no estágio de progressão (Harris, 1991). Alguns estudos têm enfatizado o aumento da amplificação gênica em células neoplásicas (Sager *et al.*, 1985; Mäkelä & Alitalo, 1986; Tlsty *et al.*, 1993). Tlsty *et al.* (1989) demonstraram que a taxa espontânea da amplificação gênica, em um número de linhagem celular neoplásica, foi quase 100 vezes a taxa mensurada em células não neoplásicas. O impacto dos últimos achados de mutações microssatélites é suavizado pela demonstração de que a frequência de suas mutações em tecidos normais é da ordem de $1-5 \times 10^{-2}$, enquanto que a variação em seqüências minissatélites pode ser tão alta quanto 10^{-1} em tecidos humanos normais (Simpson, 1997).

Enquanto muitas, mas nem todas, mutações em proto-oncogenes podem ser vistas em muitas lesões precoces, as mutações no gene supressor p53 em uma variedade de situações, tanto em animais quanto em humanos, estão prontas para se identificar durante o estágio de progressão (Tamura *et al.*, 1991; Donghi *et al.*, 1993; Navone *et al.*, 1993; Tanaka *et al.*, 1993). O estágio de progressão tem como função não somente envolver a instabilidade cariotípica, mas também selecionar as células que mais convêm para sua agressiva replicação e continuado crescimento. Mecanismos associados com a instabilidade cariotípica são numerosos e incluem a interrupção do aparelho mitótico, alterações na função telomere (Ledbetter, 1992; Blackburn, 1994), inibição da função da topoisomerase (Cortés *et al.*, 1993), hipometilação de DNA (Smith, 1998), recombinação genética e de DNA (Chorazy, 1985; Murnane, 1990; Sengstag, 1994),

amplificação gênica (Istvy *et al.*, 1993), conversão gênica (Taghian & Nickoloff, 1997) e transposição gênica (Cheng & Loeb, 1993). Por causa de seu papel único como “guardião do genoma”, as anormalidades no gene supressor p53 podem também contribuir para o envolvimento na instabilidade cariotípica (Sood *et al.*, 1997).

OBJETIVOS

1. Gerais

- 1) Avaliar a sobrevivência de ratos portadores de tumores experimentais (carcinossarcomas de Walker 256) implantados em seus estômagos submetidos à hipertermia associada à quimioterapia com Paclitaxel (Taxol®), 5-FU (Fluorouracil) e 5-FU + ácido folínico (Leucovorin®);
- 2) Analisar, através de estudos histopatológicos (H&E) e imunohistoquímica (IHM), o comportamento dos tumores experimentais (carcinossarcomas de Walker 256) implantados em estômagos de ratos com ou sem tratamento quimioterápico (Paclitaxel, 5-FU e 5-FU + ácido folínico) associado ou não à hipertermia.

2. Específicos

- 1) Avaliar a sobrevivência de ratos portadores de tumores experimentais (carcinossarcomas de Walker 256) implantados em seus estômagos e submetidos à hipertermia associada à quimioterapia com Paclitaxel (Taxol®);
- 2) Avaliar a sobrevivência de ratos portadores de tumores experimentais (carcinossarcomas de Walker 256) implantados em seus estômagos e submetidos à hipertermia associada à quimioterapia com 5-FU (Fluorouracil);
- 3) Avaliar a sobrevivência de ratos portadores de tumores experimentais (carcinossarcomas de Walker 256) implantados em seus estômagos e submetidos à hipertermia associada à quimioterapia com 5-FU + ácido folínico (Leucovorin®);

- 4) Analisar, através de estudos histopatológicos (H&E), o comportamento dos tumores experimentais (carcinossarcomas de Walker 256) implantados em estômagos de ratos com ou sem tratamento quimioterápico (Paclitaxel, 5-FU e 5-FU + ácido folínico) associado ou não à hipertermia;
- 5) Analisar, através de estudos imunohistoquímicos (IHM), o comportamento dos tumores experimentais (carcinossarcomas de Walker 256) implantados em estômagos de ratos com ou sem tratamento quimioterápico (Paclitaxel, 5-FU e 5-FU + ácido folínico) associado ou não à hipertermia;
- 6) Analisar, por técnica citogenética, o cariótipo do tumor carcinossarcoma de Walker 256, para o estudo da progressão tumoral.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Drogas e Reagentes

Paclitaxel (Bristol-Myers Squibb, Brasil): frasco-ampola de 5 mL com 30 mg.

5-Fluorouracil (ICN Farmacêutica Ltda., Brasil): frasco-ampola de 10 mL com 250 mg.

Ácido Folínico (Biosintética, Brasil): frasco-ampola de pó liofilizado injetável com 54 mg de folinato cálcico, equivalendo a 50 mg de ácido folínico.

Ketalar (Aché, Brasil): cloridrato de cetamina (frasco-ampola de 10 mL com 50 mg/mL).

Rompun (Bayer, Brasil): cloridrato de xilazina (frasco-ampola de 10 mL com 2 mg/mL).

Cloranfenicol (Prodotti, Brasil): succinato de cloranfenicol (frasco-ampola com 1 g).

Solução de Ringer-Lactato (Gaspar Viana, Brasil): frasco de 500 mL com 3 g de cloreto de sódio, 0,15 g de cloreto de potássio, 0,10 g de cloreto de Cálcio 2(H₂O) e 1,55 g lactato de sódio.

Telebrix hystero (Guerbet, Brasil): toxitalamato de meglumina + polividona (frasco-ampola de 20 ml com 5 g de iodo).

Anticorpos monoclonais (Laboratório Dako, EUA): anti-vimentina e anti-queratina.

Formalina em pastilhas (Tayuyna, São Paulo): 0,475 g de paraformaldeído.

Povidine (Tecnofarma, Brasil): polivinilpirrolidona (PVPI) a 10%.

Éter dietílico (Hoechst, Brasil).

2. Paclitaxel (Taxol®)

2.1. Química

O paclitaxel tem uma estrutura química complexa, consistindo de um sistema de 15 anéis taxanos associados e um éster preso ao carbono da cadeia na posição 13. Sua estrutura química é mostrada na figura abaixo.

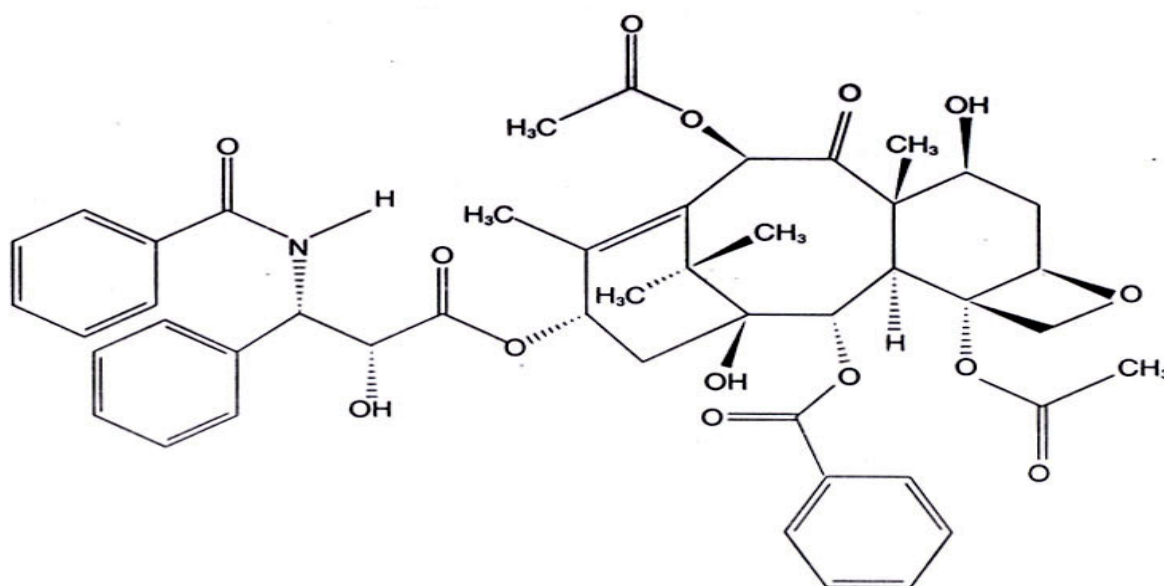


Figura A. Estrutura química do Paclitaxel (Taxol®)

2.2. Mecanismo de Ação

O paclitaxel é um extrato oriundo da casca do teixo ocidental (*Taxus brevifolia*). Ele mostrou ter atividade antitumoral primeiramente na década de 1960. Acredita-se que a cadeia éster ligada ao carbono 13 é essencial para esta atividade. Ele liga-se covalentemente, de preferência, à subunidade β da tubulina (Rao *et al.*, 1992) e estabiliza os microtúbulos intracelulares. Estudos anteriores demonstraram que os locais de ligação do paclitaxel são diferentes daqueles da colchicina e dos alcalinóides da vinca (Kumar, 1981). O efeito estabilizador ocorre sobre os microtúbulos *in vitro* em concentrações tão baixas

quanto 0,05 $\mu\text{mol/L}$. Ao nível celular, a exposição ao paclitaxel induz à formação anormal do fuso, o qual, provavelmente, leva ao efeito citotóxico.

2.3. Farmacoclinica e Farmacocinética

O paclitaxel é muito pouco solúvel em solução aquosa. Portanto, requer *Cremophor* EL e álcool desidratado USP como solventes. Mesmo em *Cremophor* EL, pode ainda estar presente precipitado, necessitando assim do uso de um filtro na linha intravenosa. Durante uma infusão intravenosa contínua de 3 a 6 horas em doses padrão, tem-se atingido concentrações plasmáticas de 1,3 a 13,0 μmol . Acima de 95% de paclitaxel circulante está ligado às proteínas plasmáticas. A eliminação do paclitaxel, seguindo uma cinética não linear com sobretudo uma meia-vida de eliminação, estende-se entre 5 e 52 horas após 24 horas de infusão. Caso a cisplatina seja administrada imediatamente anterior ao paclitaxel, em regime de combinação, a meia-vida de eliminação é prolongada. Enquanto que o exato mecanismo para o *clearance* do paclitaxel não está completamente elucidado, o mecanismo hepático pela enzima P450 e a excreção biliar são importantes. Estudos em animais têm demonstrado que mais de 42% de uma dose injetada é eliminada como metabólito e como substância inalterada pela bile.

2.4. Dosagem e Programação

2.4.1. *Quando administrado para o tratamento do câncer de ovário epitelial*

- Regime de 3 horas:

175 a 250 mg/m^2 de paclitaxel durante 3 horas por 3 semanas.

- Regime de 24 horas:

135 a 175 mg/m^2 de paclitaxel durante 24 horas por 3 semanas.

- Regime de 96 horas:

120 a 140 mg/m² de paclitaxel durante 96 horas por 3 semanas.

2.4.2. *Quando administrado em animais (ratos)*

25 mg/m² de paclitaxel i.p.

Obs.) Para se calcular a área corporal do animal (rato), utiliza-se a fórmula $SC(m^2) = 0,01672 \sqrt{P(Kg) h(cm)}$, onde h é a altura mas no rato utiliza-se o comprimento desprezando-se a cauda (Wernicke, 1949).

3. 5-Fluorouracil (5-FU)

3.1. Química

O 5-FU é uma fluoropirimidina, cujo nome químico é 5-fluoro-2,4(1H,3H) pirimidina dione. Ele é sensível à luz e pode precipitar-se em temperatura ambiente. Sua estrutura química é mostrada na figura abaixo.



Figura B. Estrutura química do 5-Fluorouracil

3.2. Mecanismo de Ação

Em 1957, Heidelberger sintetizou 5-FU com a intenção de desenvolver um novo agente citotóxico. As bases teóricas para este desenvolvimento originaram-se de observações onde células tumorais utilizavam uracil mais eficientemente que as células normais da mucosa intestinal. O 5-FU permanece

inativo até ser convertido pelo tecido-alvo em um de seus muitos metabólitos citotóxicos. Enquanto que o exato mecanismo de ação do 5-FU permanece indeterminado, este se apresenta como inibidor da timidilato-sintase (TS) por ativação do metabólito 5-FdUMP (5-fluorodesoxiuridina monofosfato) e como redutor do folato, levando assim à formação de um complexo ternário inativo, o que pode ser aumentado pela co-administração de ácido folínico. A inibição da TS leva à inibição da síntese de DNA através da depleção do *pool* de timidina. A seqüência dependente da interação 5-FU e metotrexato (MTX) está bem estabelecida. O MTX e o 5-FU são sinérgicos ao máximo quando o MTX é administrado 24 horas antes do 5-FU, inibindo assim a produção dos precursores normais da purina. Como um mecanismo alternativo de ação, o FUTP (fluorouracil trifosfato) incorpora-se ao RNA, com subsequente prejuízo de sua função. A incorporação do 5-FdUTP (5-fluorodesoxiuridina trifosfato) ao DNA como um precursor fraudulento da timidina pode induzir à quebra de uma única hélice e produzir assim efeitos citotóxicos.

3.3. Farmacoclinica e Farmacocinética

O 5-FU é usualmente administrado intravenosamente. A biodisponibilidade seguida à administração oral é altamente variável por causa de uma absorção inconsistente a partir do trato gastrintestinal e do metabolismo de primeira passagem, onde o fígado inativa compostos. A injeção intravenosa típica de 10 a 15 mg/kg resulta no pico de concentração plasmática de 0,1 a 1,0 mM. É incerto se o 5-FU é removido mediante duas ou três fases de eliminação. Menos de 10% dele está ligado a proteínas do soro. Sua meia-vida é pequena (6 a 20 min.) devido a seu rápido metabolismo pelo fígado e por outros tecidos. Mais de 80% dele é metabolizado em DHFU (dihidrofluorouracil), que por sua vez é metabolizado e excretado na urina. Aproximadamente 15% do 5-FU administrado é excretado inalterado na urina. A detoxicação hepática do 5-FU permite a admi-

nistração, pela veia-porta, em altas doses, para o tratamento de metástases hepáticas com toxicidade sistêmica mínima.

3.4. Dosagem e Programação

3.4.1. *Quando administrado para o tratamento do câncer de cólon Duke C*

Após ressecção cirúrgica com margens livres (T₁₋₄ N₀ M₀), devem ser submetidos a tratamento adjuvante por 6 ciclos:

- D1 a D5
450 mg/m² de 5-FU i.v. em bolo
- Semanalmente por 48 semanas a partir do 28^o dia após o 1^o ciclo:
450 mg/m² de 5-FU i.v. em bolo
- A cada 2 semanas, iniciando concomitante ao 5-FU semanal:
50 mg de Levamisole v.o. a cada 8 horas por 3 dias

3.4.2. *Quando administrado para o tratamento do câncer cervical recorrente*

- Dose usual:
750 a 1000 mg/m²/dia de 5-FU durante 4 ou 5 dias em infusão i.v. contínua. Este curso é repetido no intervalo de 28 dias.

3.4.3. *Quando administrado em animais (ratos)*

130 mg/m² de 5-FU i.p.

4. Ácido Folínico (Leucovorin®) (fator *citrovorum*)

4.1. Química

O ácido folínico (ácido pteroilglutâmico) consiste de anel pteridina, ácido para-aminobenzóico (PABA) e ácido glutâmico.

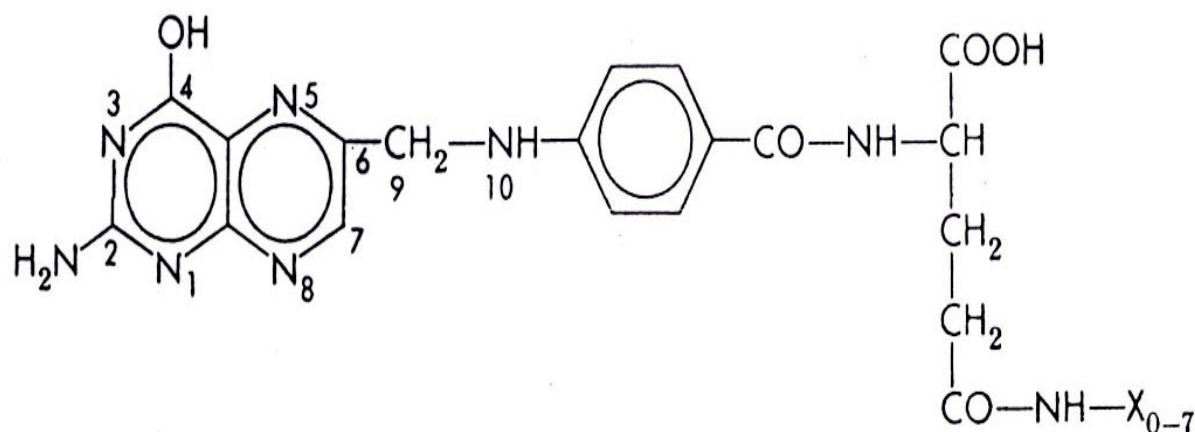


Figura C. Estrutura Química do Ácido Folínico (Leucovorin®)

Os folatos também podem conter: (1) hidrôgenos extra nas posições 7 e 8 (dihidrofolato) ou 5, 6, 7 e 8 (tetraidrofolato); (2) unidades de carbono-único tais como o grupo metil ($-\text{CH}_3$) em N^5 , o grupo formil ($-\text{CHO}$) em N^5 ou N^{10} , um grupo metileno ($-\text{CH}_2-$) ou um metenil ($=\text{CH}-$) entre N^5 e N^{10} ; (3) resíduos adicionais de ácido glutâmico ligados à porção γ -carboxil do glutamato.

4.2. Mecanismo de Ação

Os folatos são essenciais para a síntese de DNA por serem cofatores na síntese das purinas e pirimidinas. Também são necessários para as reações envolvidas no metabolismo dos amino-ácidos. Em todas as reações, os poliglutamatos são consideravelmente mais ativos que os monoglutamatos. Para que haja atividade, o folato deve estar na forma tetraidro, sendo assim mantido pela enzima diidrofolato-redutase. Esta enzima reduz o ácido folínico da dieta em tetraidrofolato (FH_4) numa reação de duas etapas, assim como o diidrofolato (FH_2) produzido a partir do FH_4 durante a síntese de timidilato. Os antagonistas do folato atuam através da inibição da diidrofolato-redutase.

A nova síntese de purinas requer duas reações de transferência de um carbono folato-dependente para a inserção de átomos de carbono nas posições 2 e 8.

Os folatos são particularmente importantes para a conversão do monofosfato de desoxiuridilato (MFDU) em monofosfato de timidilato (MFTM), que é catalisado pela enzima timidilato-sintase (TS). Esta é uma reação de metilação na qual um folato atua como doador de $-CH_3$. Ao contrário das outras reações folato-dependentes, durante esta reação, o FH_4 é oxidado em FH_2 , devendo portanto ser reduzido antes que possa atuar novamente. A reação da TS limita a velocidade de síntese de DNA nos mamíferos.

4.3. Farmacoclinica e Farmacocinética

O ácido folínico é geralmente administrado por via oral, mas há preparações disponíveis para uso parenteral. No intestino, ele é transportado através da mucosa inalterada. Os folatos são captados pelas células do fígado e medula óssea por transporte ativo, havendo mecanismos transportadores distintos para o ácido folínico e para os folatos reduzidos e metotrexato. A captação do folato reduzido mediada pelo transporte é consideravelmente mais eficaz que aquela do ácido folínico. No interior das células, o ácido folínico é reduzido e metilado, ou formilado, antes de ser convertido pela poliglutamato-sintase na forma poliglutamato mediante a adição seqüencial de 2 a 5 porções de glutamato. O ácido folínico (um ácido tetrahidrofólico sintético) é convertido de forma muito mais rápida na forma poliglutamato.

4.4. Dosagem e Programação

4.4.1. *Quando administrado em seres humanos*

- Dose semanal:

20 mg/m² i.v. em bolo (para 425 mg/m² no reto, i.v. em bolo no homem).

4.4.2. *Quando administrado em animais (ratos)*

- Dose única (no rato):

7 mg/m² de ácido folínico i.p. (para 130 mg/m² de 5-FU)

Obs.) Há uma relação de compensação de agentes anticancerosos em diferentes animais com sua toxicidade (Freireich et al., 1966).

4.5. Indicações de Uso do Ácido Folínico (Leucovorin®)

Existem indicações de uso do ácido folínico como uma nova terapêutica auxiliar ao 5-FU na potencialização de sua ação em inibir a síntese de DNA. O 5-FU bloqueia a enzima TS, que normalmente converte o ácido desoxiuridílico em ácido timidílico (um passo essencial na pirimidina), daí ocorrendo a síntese do DNA. O 5-FU também bloqueia a síntese do RNA por substituição pelo uracil. O ácido folínico aumenta o *pool* de folato e estabiliza o complexo ternário formado entre 5-FdUMP e TS, reduzindo então a atividade desta enzima. Dessa maneira, a TS desempenha papel importante na progressão a partir de G1 para dentro da Fase S. O ácido folínico potencializa o efeito do 5-FU sobre a síntese de DNA aumentando assim as taxas de reposta clínica em pacientes com câncer colo-retal de 10% com apenas 5-FU para 35% com 5-FU associado ao ácido folínico (Leucovorin®) (Guillou, 1996).

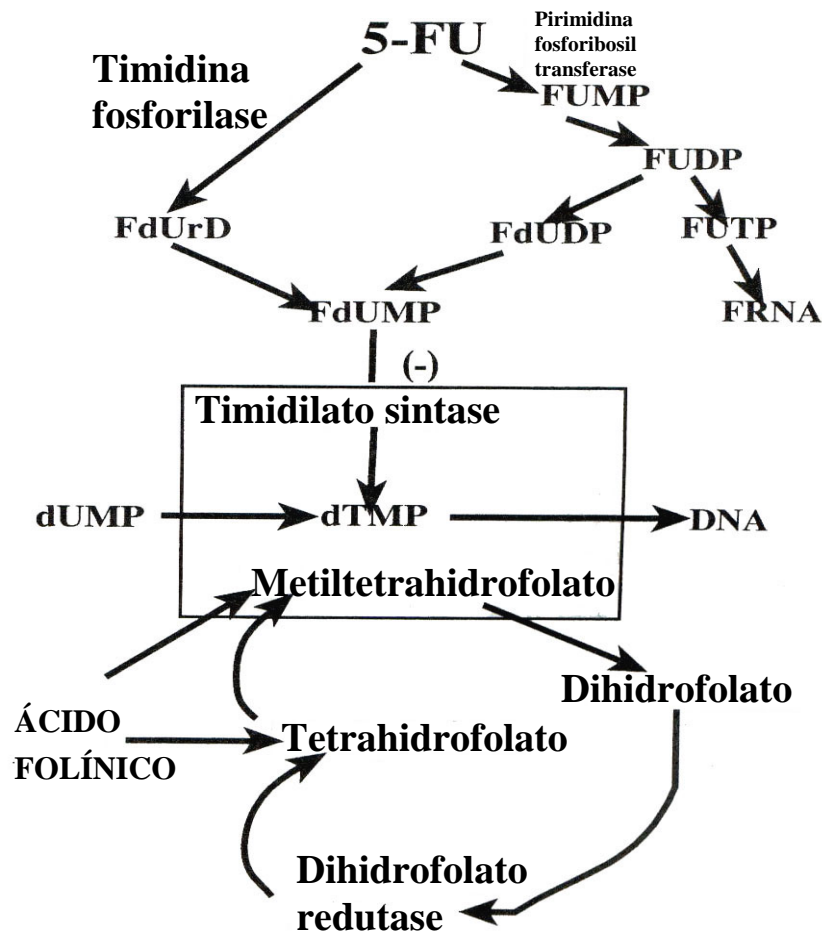


Figura D. Metabolismo do 5-Fluorouracil + Ácido Folínico

5. Material Cirúrgico

Tesoura Mayo-Stille de 14 cm (Medlight, Brasil).

Tesoura Metzenbaum de 14 cm (Medlight, Brasil).

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

Pinça Adison-Brown de 12 cm (Medlight, Brasil).

Pinça de dissecação de 12 cm (Medlight, Brasil).

Pinça Kelly de 14 cm (Medlight, Brasil).

Pinça mosquito de 10 e 12 cm (Medlight, Brasil).

Pinça Crille de 16 cm (Medlight, Brasil).

Porta-Agulha Derf de 12 cm (Medlight, Brasil).

Caixa cirúrgica de 20 x 10 x 8 cm (Medlight, Brasil).

Afastador Desmares de 6,5 cm (Martin).

Lâminas de bisturi nº 10, 11 e 15 (Kramer, Brasil).

Fios cirúrgicos de *mononylon* 4-0 e 5-0 (Ethicon, Brasil).

Agulha fenestrada (projetada especificamente para este experimento) de 40 x 12 cm, com 3 e 5 fenestras, e com a ponta romba em sua extremidade.

6. Vidraria

Becher de 100 mL (Pyrex, Brasil).

Becher de 500 mL (Pyrex, Brasil).

Proveta graduada de 1000 mL (Pyrex, Brasil).

Erlenmeyer de 25 e 100 mL (Pyrex, Brasil).

7. Materiais Diversos

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

Agulhas descartáveis de 13 x 4,5 cm e de 25 x 7 cm (BD, Brasil).

Equipo de soro (Sondaplast, Brasil).
Equipo para bomba de infusão enteral/parenteral (B. Braun, Brasil).
Escalpes Nº 19 ou 21 (Venesalp, Brasil).
Luvas cirúrgicas Nº 7,5 e 8 (Lengruher, Brasil).
Luvas de procedimento (Blowtex, EUA).
Filmes para Raio-X (Kodak, Brasil).
Filmes de 35 mm para fotos em papel Fujifilm ASA 200.
Filmes de 35 mm para fotos em papel Kodak Gold ASA 100.
Filmes de 35 mm para slides Ektachrome ASA 100.
Serpentina de polietileno de 0,5 cm de diâmetro interno e com 8 voltas de 7,5 cm de diâmetro externo.

8. Equipamentos

Banho-Maria modelo 100 (FANEM, Brasil).
Bomba de infusão (B. Braun, Brasil).
Termômetro digital *Thermometer* MT-520 Mimipa-APPA
Termômetro clínico de 35 a 42°C (BD, Brasil).
Balança para animais com tara de 0 a 2000 g (Mettler P3, EUA).
Balança de precisão modelo ID-1500 (Filizola, Brasil).
Aparelho de Raio-X Diagnost 92/500 mA (Philips, Holanda).
Microscópio (Nikon, Japão).
Câmera fotográfica monoreflex SLR de 35 mm (Nikon, Japão).
Câmera fotográfica monoreflex SLR de 35 mm (Canon, Japão).
Micrótomo.
Estufa de esterilização.
Autoclave.
Hemocitômetro (Herka, Alemanha).
Agitador magnético.

Mesa cirúrgica (confeccionada de madeira compensada, revestida de laminado plástico) de 34,5 x 29,5 x 21,5 cm, contendo, na superfície superior, um recipiente de poliestireno para conservar melhor o calor repassado para o animal. A mesa foi desenvolvida especialmente para o emprego na hipertermia em ratos, e a sua altura, a mesma do banho-maria, evita a perda de calor pela solução de perfusão após o seu aquecimento. Sua superfície superior permite angulações para facilitar a drenagem da solução infundida na cavidade peritoneal.

9. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com 8 a 12 semanas de vida, pesando entre 160 e 300 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram então divididos aleatoriamente em grupos de 6 a 12 ratos para inoculação do tumor de Walker 256 e abrigados a 24°C em ciclos luz/escuro de 12 horas, com alimento (ração Fri-Ribe Ratos) e água *ad libitum*, no Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da UFC.

10. Anestesia

Para os transplantes de manutenção do tumor e implantes no estômago, foi utilizada anestesia com éter dietílico, administrado através de uma câmara anestésica de PVC. Nos experimentos de hipertermia, os animais foram anestesiados através de uma associação entre a cetamina (90 mg/kg) e a xilazina (10 mg/kg), administradas simultaneamente por via i.p.

11. Tumor

Foi utilizado o carcinossarcoma 256 de Walker, obtido do Laboratório de Fisiologia Metabólica (Prof. Rui Curi) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, o qual vem sendo mantido no Laboratório de Oncolo-

gia Experimental do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, através de implantes i.m. sucessivos a cada 7 dias.

12. Preparação do Inóculo e Repicagem

Após 7 a 8 dias de evolução, o tumor é retirado do animal doador e colocado em uma placa de Petri contendo 8 mL de Ringer-Lactato e 2 mL de cloranfenicol (100 mg/mL). Em seguida, transfere-se o tecido sem focos necróticos para outra placa de Petri contendo também Ringer-Lactato e cloranfenicol na mesma concentração, onde então este é triturado em pequenos fragmentos de aproximadamente 2 mm³, e aí permanece incubado por 5 min. Os fragmentos são então colocados no homogeneizador de Potter, ou agitador magnético, e macerados na mesma solução anteriormente mencionada, sendo o homogenato inoculado por via i.m. na coxa direita do animal (1 mL contendo cerca de 10⁶ células). Uma suspensão de células preparadas com a mesma metodologia foi também utilizada para o implante do tumor no estômago.

13. Implante do Tumor no Estômago

Os ratos, mantidos em jejum por 12 horas com água *ad libitum*, foram anestesiados por via inalatória com éter dietílico. Após antiseptia da parede abdominal do animal com povidine (polivinilpirrolidona), foi realizada uma incisão mediana, com elevação de 5 cm do estômago para fora da incisão. Um catéter de 2 mm de diâmetro foi então introduzido através da boca, orofaringe e esôfago, chegando até o estômago (Figura E). Através deste tubo, foi injetado 1 mL da suspensão do inóculo tumoral em 2 sítios gástricos: 0,5 mL da suspensão na grande curvatura e 0,5 mL na pequena curvatura. Foi então realizado o pinçamento (clampeadura) gástrico com uma pinça hemostática concomitantemente à introdução da suspensão do tumor nos sítios previamente referidos (Figura E). A sutura da parede foi executada com fio *mononylon* 4-0. Desde o pós-operatório imediato, os animais ficaram sob dieta *ad libitum*, tanto para água como para alimentos sólidos.

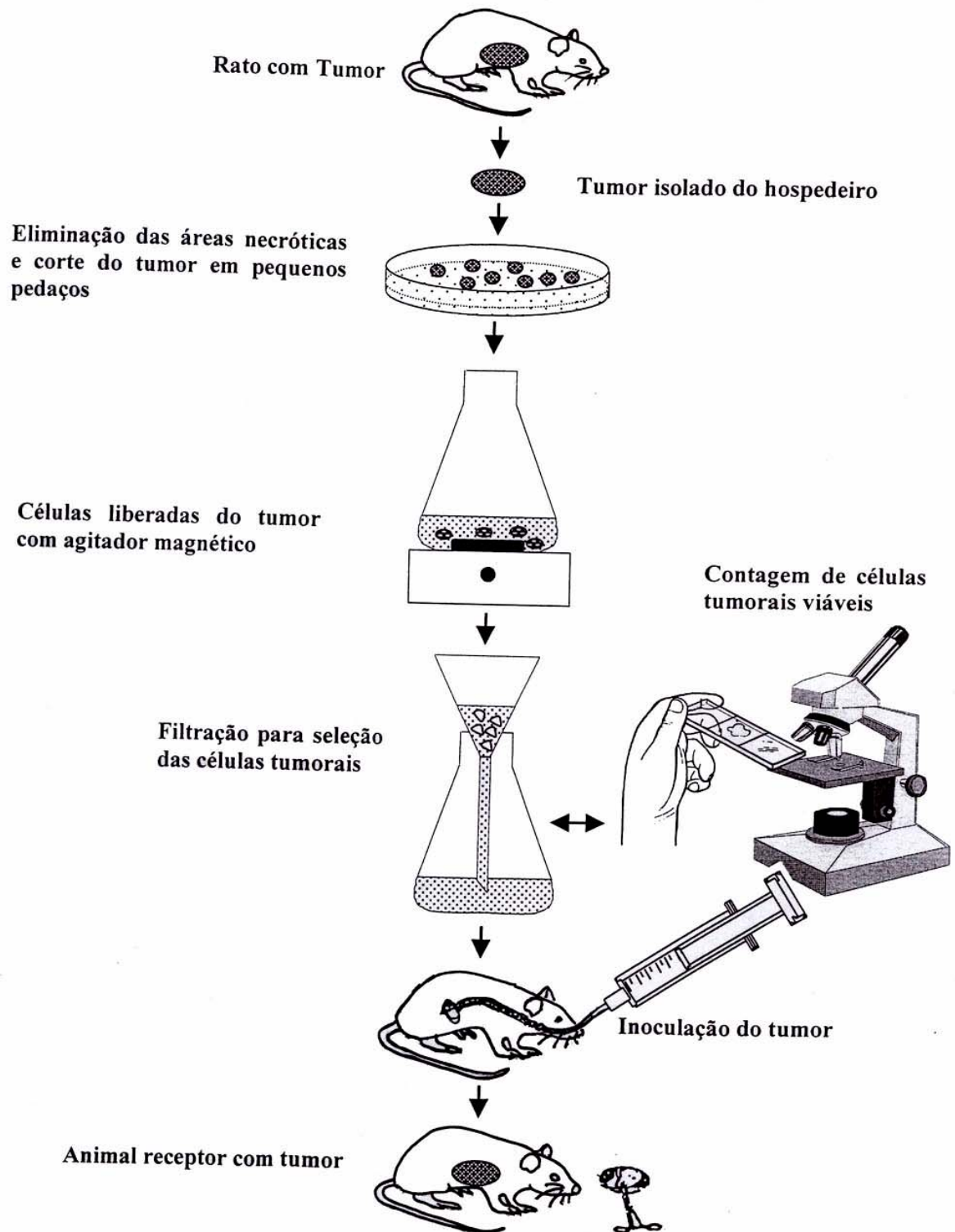


Figura E. Inoculação e Manutenção do carcinossarcoma de Walker 256

14. Grupos de Tratamento

Para o estabelecimento da metodologia do implante do tumor no estômago, e para a avaliação da efetividade do tratamento com a quimioterapia isolada, hipertermia associada à quimioterapia ou um imunomodulador + quimioterapia isolada ou em associação com a hipertermia, os animais foram divididos em 3 grupos de 6 sub-grupos cada, de acordo com a droga utilizada (Taxol®, 5-FU e 5-FU + Leucovorin), tendo os 3 grupos o mesmo Grupo Controle, conforme pode ser visto abaixo. Todos os animais foram observados diariamente até o dia de sua morte espontânea ou por sacrifício no 90º dia pós-implante.

Grupo Controle: 12 animais inoculados com o tumor para avaliação do índice de pega e da sobrevida.

Grupo 1 Taxol® (Paclitaxel):

Sub-Grupo TAX-1: 07 animais submetidos à quimioterapia isolada 3 dias após o implante do tumor;

Sub-Grupo TAX-2: 06 animais submetidos à quimioterapia + hipertermia 3 dias após o implante do tumor;

Sub-Grupo TAX-3: 10 animais submetidos à quimioterapia isolada 7 dias após o implante do tumor;

Sub-Grupo TAX-4: 07 animais submetidos à quimioterapia + hipertermia 7 dias após o implante do tumor;

Sub-Grupo TAX-5: 09 animais submetidos à quimioterapia isolada 10 dias após o implante do tumor;

Sub-Grupo TAX-6: 09 animais submetidos à quimioterapia + hipertermia 10 dias após o implante do tumor.

Grupo 2 5-FU (5-Fluorouracil):

Sub-Grupo 5FU-1: 09 animais submetidos à quimioterapia isolada 3 dias após o implante do tumor;

Sub-Grupo 5FU-2: 11 animais submetidos à quimioterapia + hipertermia 3 dias após o implante do tumor;

Sub-Grupo 5FU-3: 07 animais submetidos à quimioterapia isolada 7 dias após o implante do tumor;

Sub-Grupo 5FU-4: 10 animais submetidos à quimioterapia + hipertermia 7 dias após o implante do tumor;

Sub-Grupo 5FU-5: 06 animais submetidos à quimioterapia isolada 10 dias após o implante do tumor;

Sub-Grupo 5FU-6: 08 animais submetidos à quimioterapia + hipertermia 10 dias após o implante do tumor.

Grupo 3 5-FU + Leucovorin® (5-Fluorouracil + Ácido Folínico):

Sub-Grupo 5FL-1: 09 animais submetidos à quimioterapia isolada 3 dias após o implante do tumor;

Sub-Grupo 5FL-2: 10 animais submetidos à quimioterapia + hipertermia 3 dias após o implante do tumor;

Sub-Grupo 5FL-3: 09 animais submetidos à quimioterapia isolada 7 dias após o implante do tumor;

Sub-Grupo 5FL-4: 12 animais submetidos à quimioterapia + hipertermia 7 dias após o implante do tumor;

Sub-Grupo 5FL-5: 09 animais submetidos à quimioterapia isolada 10 dias após o implante do tumor;

Sub-Grupo 5FL-6: 11 animais submetidos à quimioterapia + hipertermia 10 dias após o implante do tumor.

15. Técnica Hipertérmica

A hipertermia de corpo inteiro utilizada nesses experimentos foi obtida através de uma perfusão peritoneal, por um período de 1 hora, de uma solução de Ringer-Lactato previamente aquecida em banho-maria, denominada de perfusão peritoneal hipertérmica contínua (PPHC). Inicialmente, a solução foi impulsionada, por bomba de fluxo contínuo, através de um equipo de polietileno conectado a uma serpentina, que por sua vez foi mantida dentro de um banho-maria a 49°C. Daí, a solução caminhava através de outro tubo de polietileno conectado a um escalpe N^o 19 ou 21, introduzido no quadrante inferior esquerdo do abdome do animal (fossa ilíaca esquerda). A bomba foi programada para um fluxo de infusão de 8,3 mL/min. O animal foi mantido na posição de Trendelenburg, numa angulação de 6°, sendo a drenagem realizada pela gravidade através de uma agulha fenestrada de 40 x 12 cm, de ponta romba, introduzida por meio de um guia no quadrante superior direito do abdome (hipocôndrio direito) e conectada a um tubo de polietileno. A temperatura do animal foi mensurada durante todo o experimento através de termômetros colocados na cavidade peritoneal e no reto. O animal foi contido e mantido sob anestesia dentro de um recipiente de poliestireno aberto na parte superior.

16. Técnica Quimioterápica

A quimioterapia foi realizada usando-se 3 diferentes drogas: 1) Paclitaxel (Taxol®), em dose única de 25 mg/m², por via i.p., 2 horas antes de iniciar a hipertermia; 2) 5-FU (5-Fluorouracil), em dose única de 130 mg/m², por via i.p., 2 horas antes de iniciar a hipertermia; e 3) Ácido Folínico (Leucovorin®), em dose única de 7 mg/m², por via i.p., 15 min. antes de iniciar a quimioterapia com 5-FU.

17. Estudos Morfológicos

As preparações tanto em H&E como em IHM foram oportunamente estudadas pelo pesquisador bem como pelo patologista. Todos os animais mortos espontaneamente ou sacrificados foram submetidos a detalhado estudo necroscópico, e análises macro e microscópicas. Fragmentos do tumor dos animais foram fixados em formol a 10%, incluídos em parafina, cortados em micrótomo na espessura de 4 a 6 μ e corados pela técnica da Hematoxilina-Eosina (H&E). As preparações de imunohistoquímica foram realizadas através da técnica imunoenzimática, cuja reação utiliza o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC), como descrito por Hsu e cols. (1981).

18. Lavagem e Esterilização do Material

O material cirúrgico foi lavado em água destilada e esterilizado em autoclave a 110°C por 2 horas a 2 atm. A vidraria foi lavada com água destilada e esterilizada em estufa a 110°C por 2 horas.

19. Técnica Citogenética para Tumor de Walker 256 Ascítico

- 1) Em rato Wistar com tumor ascítico de Walker 256 implantado há 10 dias, introduz-se 1 mL de colchicina no abdome e aguarda-se por 2 horas;
- 2) Aspira-se 5 mL de ascite hemática, transfere-se para um tubo *falcon* e centrifuga-se por 9 minutos a 1000 rpm (velocidade 2);
- 3) Despreza-se o sobrenadante, restando as células e 0,5 mL de meio;
- 4) Com uma pipeta *Pasteur*, homogeniza-se o *pellet* em pequenos volumes, lentamente;

- 5) Recolhe-se o material total com a pipeta e adiciona-se 5 mL de hipotônica KCl no tubo *falcon*, previamente aquecida a 37°C;
- 6) Goteja-se o material na hipotônica, homogeneizando lentamente (retira-se do fundo pelas paredes e aplica-se no fundo novamente com bastante cuidado);
- 7) Leva-se ao banho-maria por 25 minutos. Neste intervalo, homogeneizar 2 a 3 vezes. Adiciona-se 0,5 mL de fixador. Lisar hemácias e parar hipotônica;
- 8) Centrifuga-se por 9 minutos a 1000 rpm (velocidade 2). Despreza-se o sobrenadante, restando 0,5 mL de meio. Homogeneizar pelas paredes;
- 9) Recolhe-se todo o material na pipeta e acrescenta-se 5 mL de fixador no tubo;
- 10) Goteja-se o material no fixador e homogeneiza-o novamente;
- 11) Centrifuga-se por 9 minutos a 1000 rpm (velocidade 2). Repete-se todo o procedimento (9-11 minutos) por mais 2 vezes;
- 12) Na última centrifugação, deixa-se 1 mL com o *pellet*;

19.1. Lâmina (previamente gelada em H₂O destilada)

- 13) Segura-se a lâmina com uma pinça e goteja-se o material a aproximadamente 30 cm;
- 14) Deixa-se a lâmina secar inclinada. Cora-se com giemsa por 4-5 minutos. Deixa-se secar, depois de lavada com H₂O destilada;
- 15) Caso ainda haja citoplasma, prepara-se novo fixador (2:1 – metanol : ácido acético) e faz-se mais uma lavagem.

19.2. Adaptações

Hipotônica = 1 KCl 0,075 M : 1 citrato de sódio 0,4%.

Fixador = 2,5 metanol : 1 ácido acético.

Lavagem com fixador: no mínimo 8 vezes.

20. **Contagem de Cromossomos**

A contagem de cromossomos foi realizada pela análise visual quantitativa.

21. **Documentação Fotográfica**

As microfotografias foram obtidas através de equipamento fotográfico Nikon acoplado a microscópio óptico comum Nikon com aumentos de 100 e 400x. As demais fotos em papel foram obtidas com câmeras fotográficas monoreflex Canon e Nikon, munidas de objetivas de 35 a 105 e 35 a 70 mm, respectivamente.

22. **Análise Estatística**

22.1. Paclitaxel (Taxol®), 5-FU (5-Fluorouracil) e Ácido Folínico (Leucovorin®)

O teste Kaplan-Meier (KM) é um estimador não-paramétrico utilizado para a estimação da curva de sobrevivência,

$$\hat{S}(t) = \prod_{j:t_j \leq t} \left[1 - \frac{d_j}{n_j} \right]$$

até a ocorrência de algum evento de interesse (morte, por exemplo), onde d_j é o número de indivíduos que apresentaram o evento ou foram censurados no tempo t_j , n_j é o número de indivíduos em risco e $\hat{S}(t)$ é a probabilidade de que o tempo de ocorrência de um evento seja maior do que um tempo t , $P[T > t]$, $t \geq 0$ (Soares & Colosimo, 1995).

A variável $\hat{S}(t)$ descreve a probabilidade estimada de que um indivíduo sobreviva até o tempo t ou mais. A censura é a observação parcial da resposta. Para este estudo, foram considerados censurados os dados que apresentaram tempo de sobrevivência >90 dias.

Para comparar as curvas de sobrevivência entre os grupos de tratamento, foram utilizados os testes Log-Rank (Mantel, 1966), Wilcoxon e Razão de Verossimilhança (Cox & Oakes, 1984).

As medidas de mediana para a variável tempo (dias) foram calculadas por interpolação utilizando-se as informações das estimativas da sobrevivência.

22.2. Ácido Folínico (Leucovorin®) + 5-FU (5-Fluorouracil)

A metodologia estatística utilizada para a análise do estudo longitudinal da temperatura dos ratos foi baseada nos modelos para medidas repetidas no tempo (Singer & Andrade, 1986). Esta modelagem adotada é equivalente à de parcelas subdivididas (ou *split-plot*), sendo que nesta situação, o tempo (min) é o fator considerado na sub-parcela. Tal abordagem é também conhecida como parcela subdividida no tempo (Montgomery, 1991).

A análise é feita da forma usual através da Análise de Variância, sendo que, para a sub-parcela (tempo), e na interação Tempo *versus* Tratamento, são utilizadas, em algumas situações, uma correção para os graus de liberdade desses efeitos e do resíduo 2. As correções utilizadas foram baseadas no teste F-Conservativo (Singer & Andrade, 1986). Para os testes de comparação de médias *a posteriori*, foi utilizado o teste de Tukey (Winer, 1971).

RESULTADOS

1. Paclitaxel (Taxol®)

1.1. Resultados Experimentais

O Grupo Controle, constituído por doze (12) animais sem tratamento, obteve uma sobrevida média igual a $13,25 \pm 0,53$.

Todos os Grupos Experimentais Taxol, isolados ou associados à hipertermia (HT) no 3^o, 7^o e 10^o dias, mostraram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$ – Teste Log-Rank) quando comparados ao Grupo Controle (Tabela I).

Tabela I. Testes para a igualdade das curvas estimadas de Kaplan-Meier entre os grupos

Teste	Qui-Quadrado	g. l.	Pr > Qui-Quadrado
Log-Rank	75,5954	6	< ,0001
Wilcoxon	77,7887	6	< ,0001
-2Log (RV)	33,5838	6	< ,0001

g.l. = graus de liberdade; Pr = probabilidade; RV = Razão de verossimilhança

Para a curva de sobrevivência de Kaplan-Meier, todos os Grupos Experimentais mostraram maior probabilidade de sobrevida que o Grupo Controle, com especial destaque para os grupos no 3^o dia com Taxol isolado e Taxol associado à hipertermia. Os grupos no 7^o dia mostraram que a probabilidade de sobrevida relativa ao tratamento com Taxol associado à hipertermia superou o Taxol isolado. Os grupos no 10^o dia mostraram que a probabilidade de sobrevida relativa ao tratamento com Taxol associado à hipertermia foi ligeiramente maior que o Taxol isolado (Figura 1).

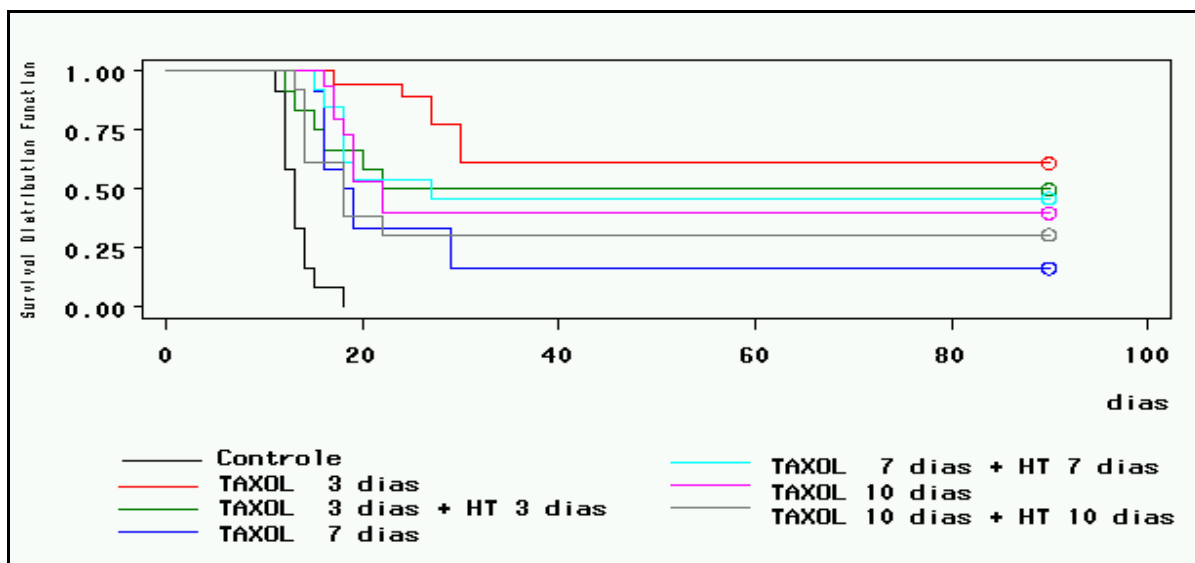


Figura 1. Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para todos os grupos (Controle e Taxol)

Todos os Grupos Experimentais, exceto Controle e Taxol no 3^o dia, isolados ou associados à hipertermia no 3^o, 7^o e 10^o dias, não mostraram diferença estatisticamente significante ($p < 0,4402$ – Teste Log-Rank) quando comparados entre si (Tabela II).

Tabela II. Testes para a igualdade das curvas estimadas de Kaplan-Meier entre os grupos, exceto Controle e Taxol no 3^o dia

Teste	Qui-Quadrado	g. l.	Pr > Qui-Quadrado
Log-Rank	3,7549	4	< ,4402
Wilcoxon	4,2795	4	< ,3695
-2Log (RV)	5,7659	4	< ,2173

g.l. = graus de liberdade; Pr = probabilidade; RV = Razão de verossimilhança

Para a curva de sobrevivência de Kaplan-Meier, excetuando-se os grupos Controle e Taxol no 3^o dia, observa-se que os grupos nos 3^o e 7^o dias com Taxol associado à hipertermia mostraram uma probabilidade de sobrevida de 50% (Figura 2).

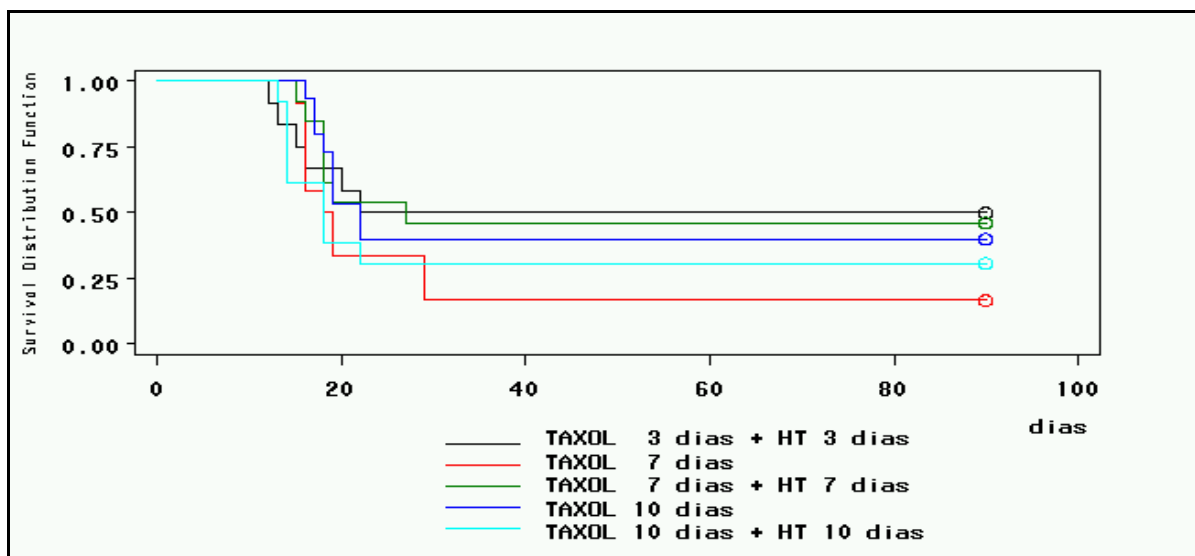


Figura 2. Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para todos os grupos, exceto Controle e Taxol no 3^o dia

O Grupo Experimental Taxol isolado no 3^o dia, em relação ao grupo associado à hipertermia no 3^o dia, não mostrou diferença estatisticamente significativa (Figura 3).

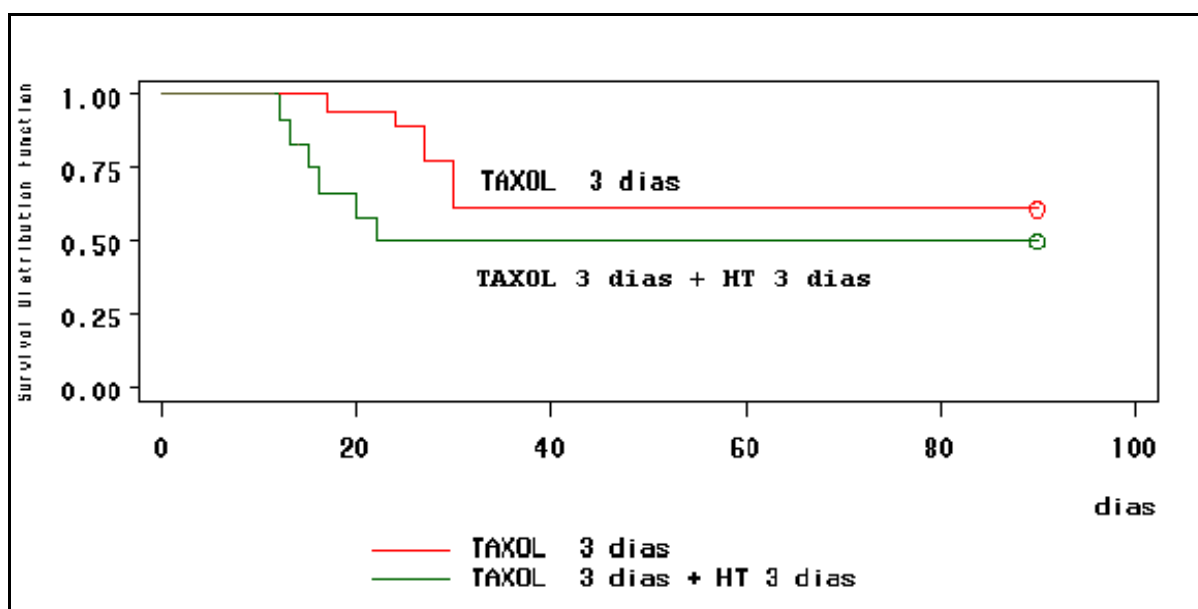


Figura 3. Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para os grupos Taxol no 3^o dia e Taxol no 3^o dia + HT no 3^o dia

O Grupo Experimental Taxol isolado no 7º dia, em relação ao grupo associado à hipertermia no 7º dia, mostrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$ – Teste Log-Rank) (Figura 4).

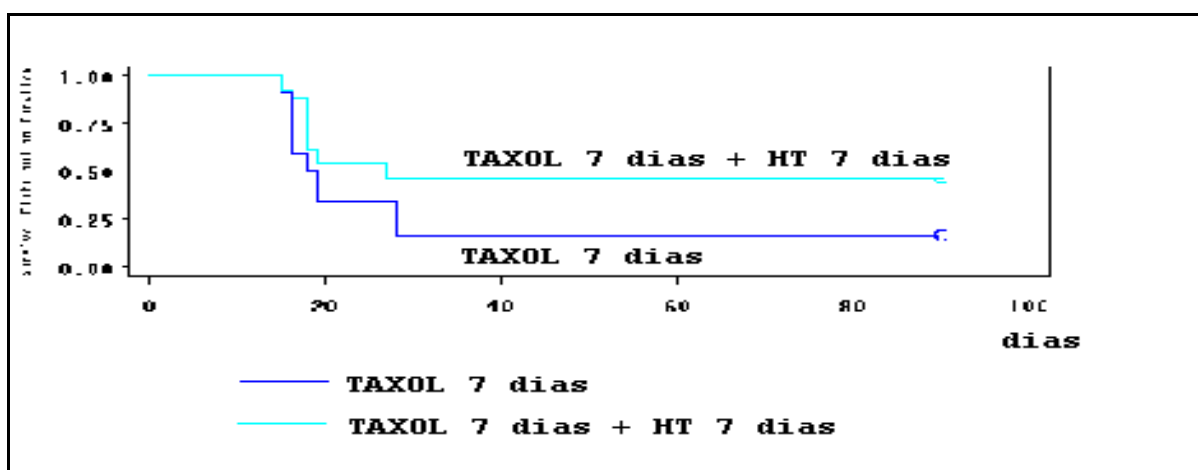


Figura 4. Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para os grupos Taxol no 7º dia e Taxol no 7º dia + HT no 7º dia

O Grupo Experimental Taxol isolado no 10º dia, em relação ao grupo associado à hipertermia no 10º dia, não mostrou diferença estatisticamente significativa (Figura 5).

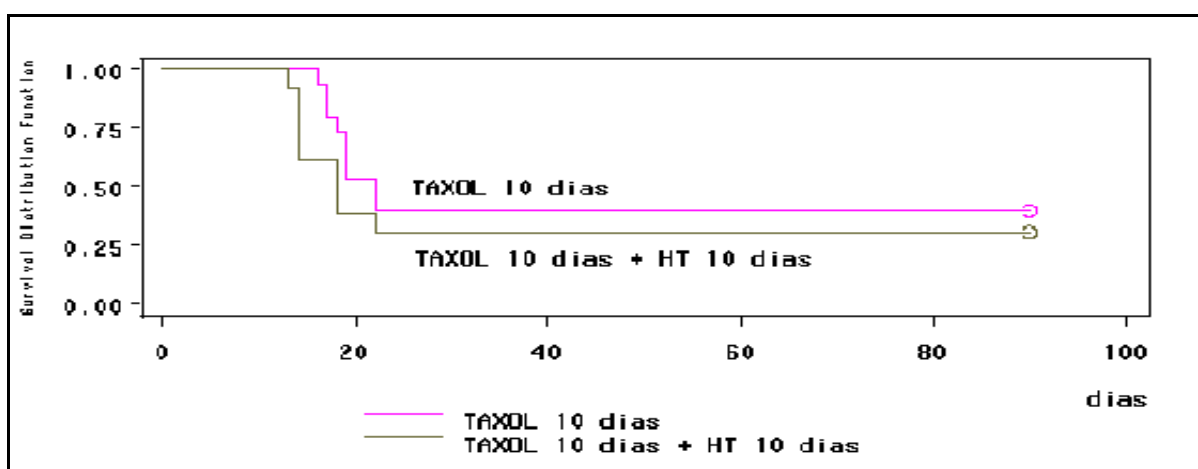


Figura 5. Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para os grupos Taxol no 10º dia e Taxol no 10º dia + HT no 10º dia

O Grupo Experimental Taxol isolado no 3º dia, em relação ao grupo isolado no 7º dia, mostrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$ – Teste Log-Rank) (Figura 6).

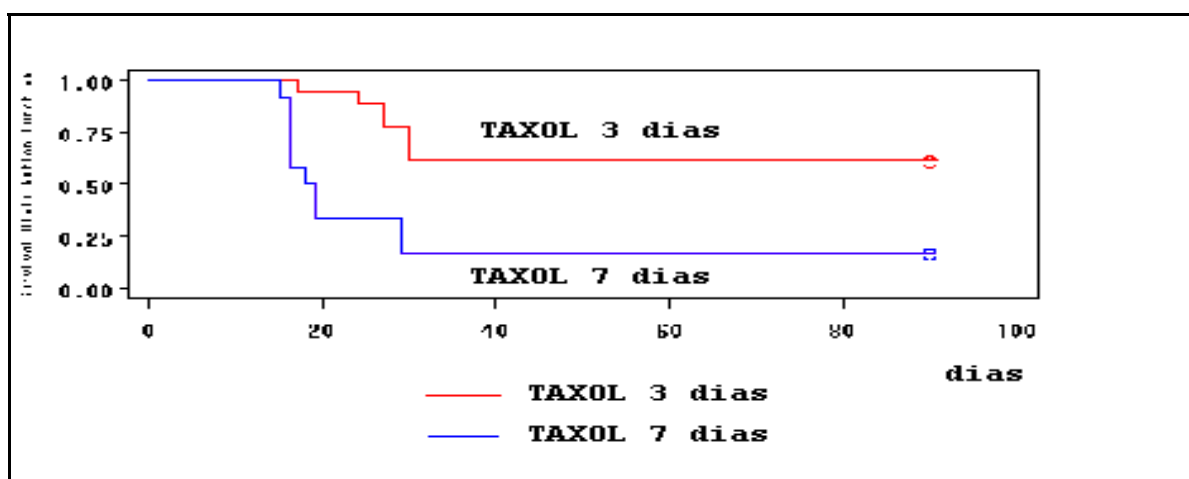


Figura 6. Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para os grupos Taxol no 3º dia e Taxol no 7º dia

O Grupo Experimental Taxol isolado no 3º dia, em relação ao grupo associado à hipertermia no 10º dia, mostrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$ – Teste Log-Rank) (Figura 7).

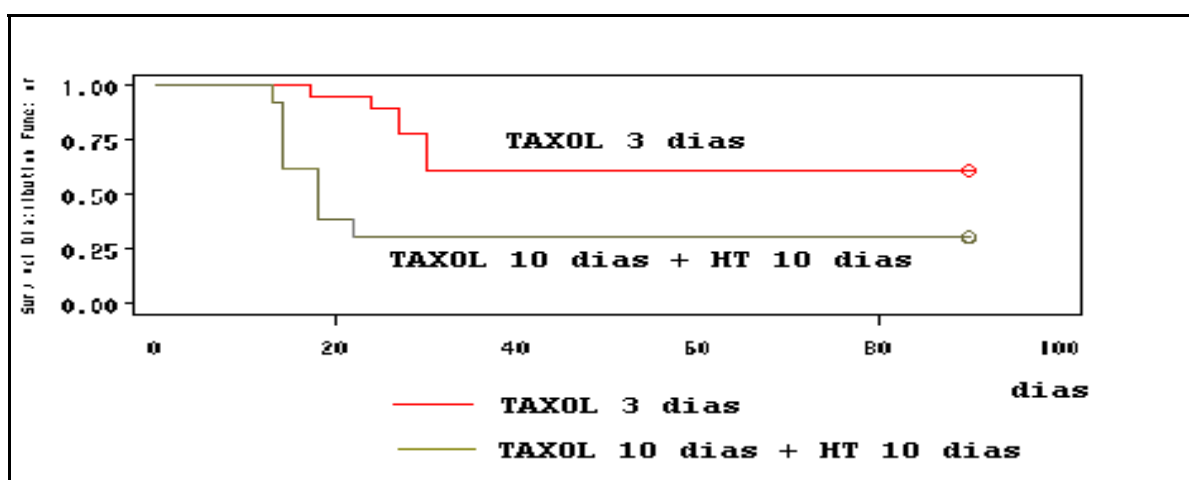


Figura 7. Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para os grupos Taxol no 3º dia e Taxol no 10º dia + HT no 10º dia

O Grupo Experimental Taxol isolado no 3º dia, em relação ao grupo associado à hipertermia no 7º dia, não mostrou diferença estatisticamente significativa (Figura 8).

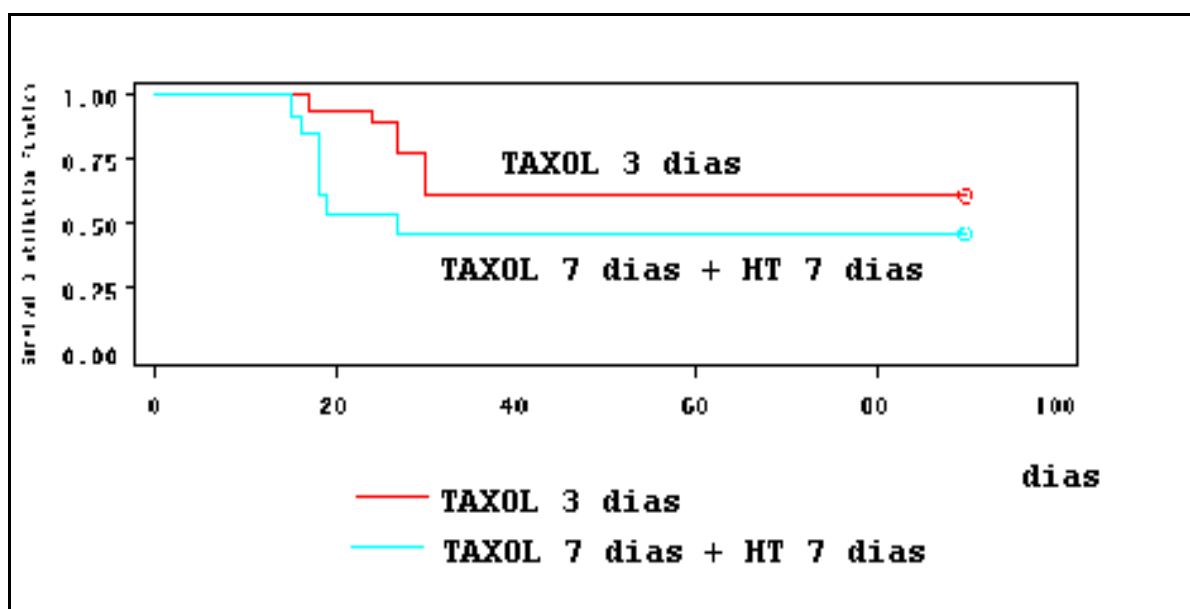
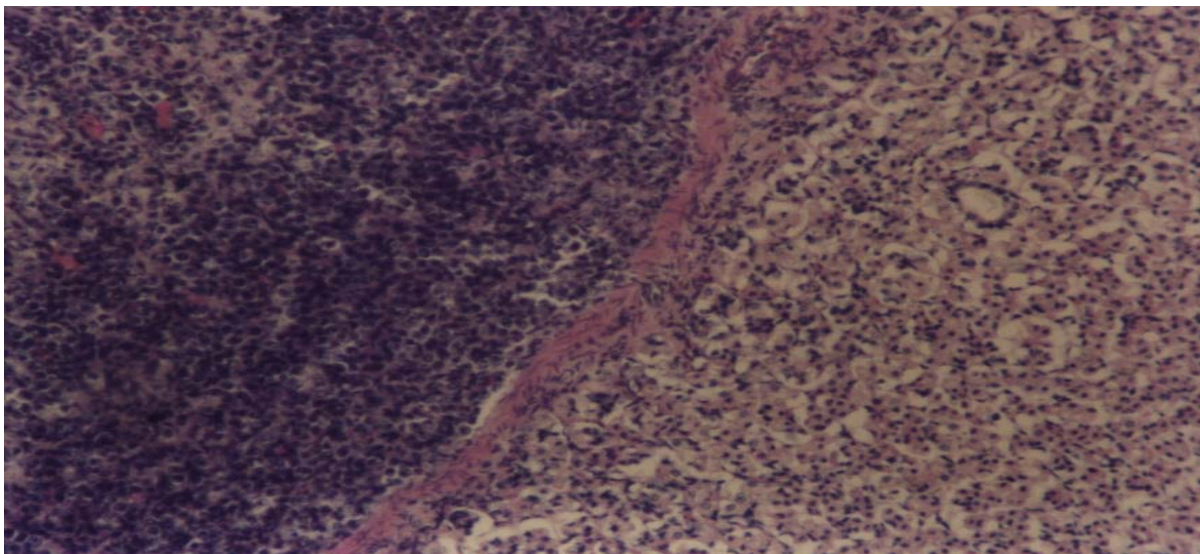


Figura 8. Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para os grupos Taxol no 3º dia e Taxol no 7º dia + HT no 7º dia

O Grupo Experimental Taxol isolado no 3º dia, em relação ao grupo isolado no 10º dia, não mostrou diferença estatisticamente significativa.

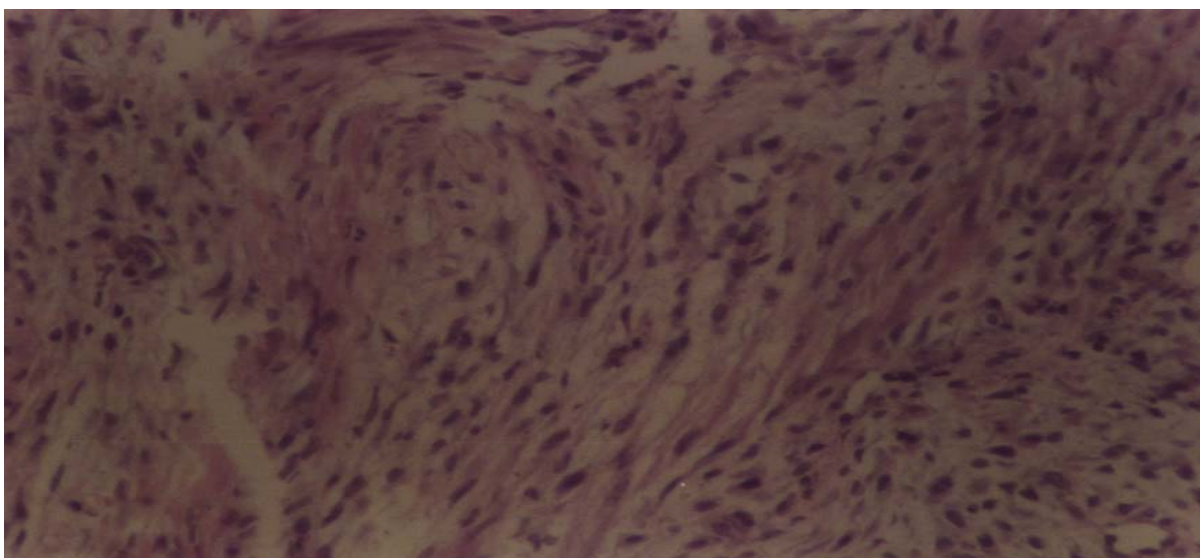
1.2. Exames Histopatológicos (H&E)

O tumor de Walker 256, em sua fase evolutiva inicial de 3 dias, está presente na submucosa dos animais experimentais, com células poligonais dispostas em mosaico, não atingindo a mucosa, e estando separada desta pela muscular da mucosa (Figura 9). Nesta fase, o tumor foi submetido a tratamento com Taxol associado à hipertermia.



**Figura 9. Muscular da mucosa separa nitidamente o tumor da mucosa.
Tratamento com Taxol + HT no 3^o dia (HE) 200X**

O carcinosarcoma 256 de Walker, em sua fase evolutiva avançada de 10 dias, infiltra a musculatura com células fusiformes, sugerindo assim, diferenciação sarcomatosa. Nesta fase, utilizou-se o Taxol isoladamente e as células tumorais estavam bem preservadas, não sendo observada hemorragia (Figura 10).



**Figura 10. Tumor infiltra a musculatura com células fusiformes (sarcoma).
Tratamento com Taxol no 10^o dia (HE) 200X**

Em fase evolutiva inicial de 3 dias, o tumor evidencia-se em toda a espessura da parede gástrica, inclusive na mucosa, onde observam-se áreas de necrose (Figura 11). Em fase evolutiva avançada de 10 dias, o tumor foi submetido a tratamento com Taxol associado à hipertermia. O tumor encontra-se com extensas áreas de necrose e hemorragia (Figura 12).

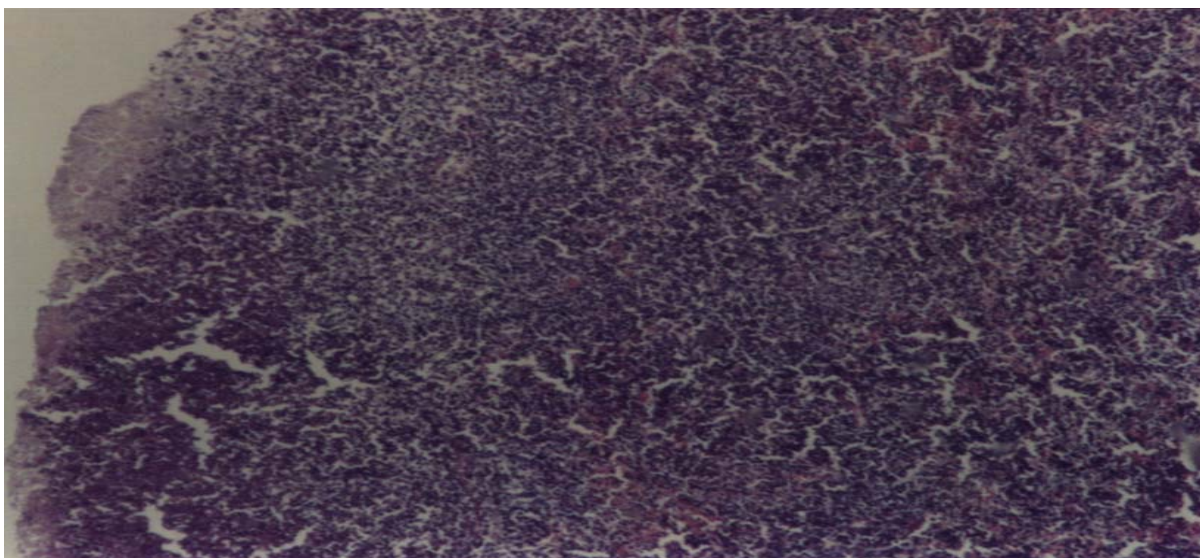


Figura 11. Tumor em toda a espessura da parede gástrica, áreas de necrose na mucosa. Tratamento com Taxol + HT no 3^o dia (HE) 40X

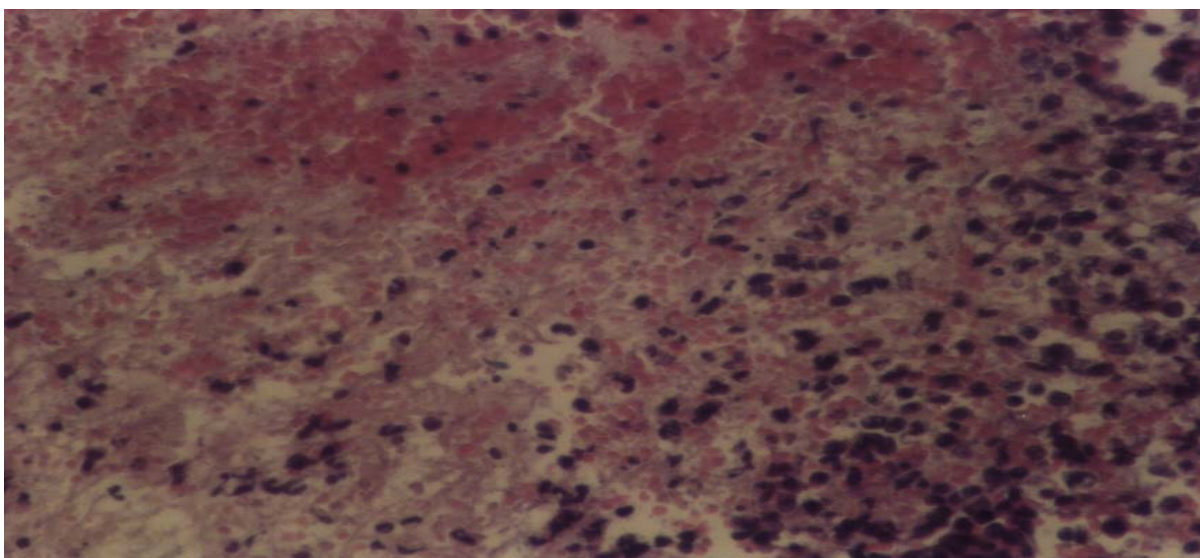


Figura 12. Tumor com extensas áreas de necrose e hemorragia. Tratamento com Taxol + HT no 10^o dia (HE) 200X

Tumor na submucosa, em torno de vaso hiperemiado, com linfócitos circundantes (Figura 13).

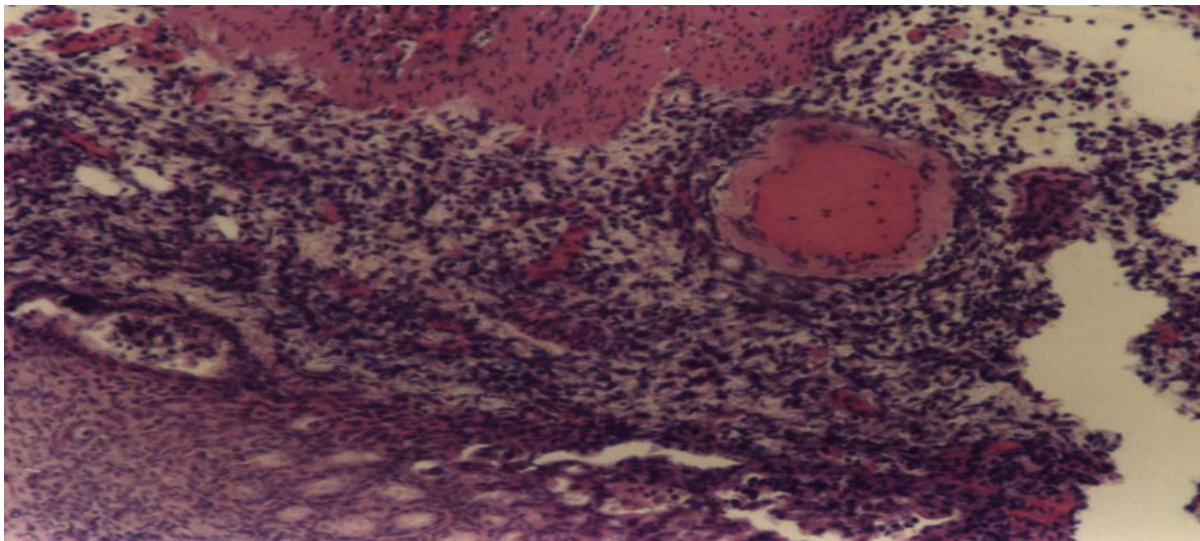


Figura 13. Tumor na submucosa, vaso hiperemiado, com linfócitos circundantes. Tratamento com Taxol (HE) 200X

O tumor invade o pâncreas, entremeando-se aos ácinos pancreáticos (Figura 14) e infiltra o tecido adiposo com células poligonais e aspecto de tumor epitelióide (Figura 15).

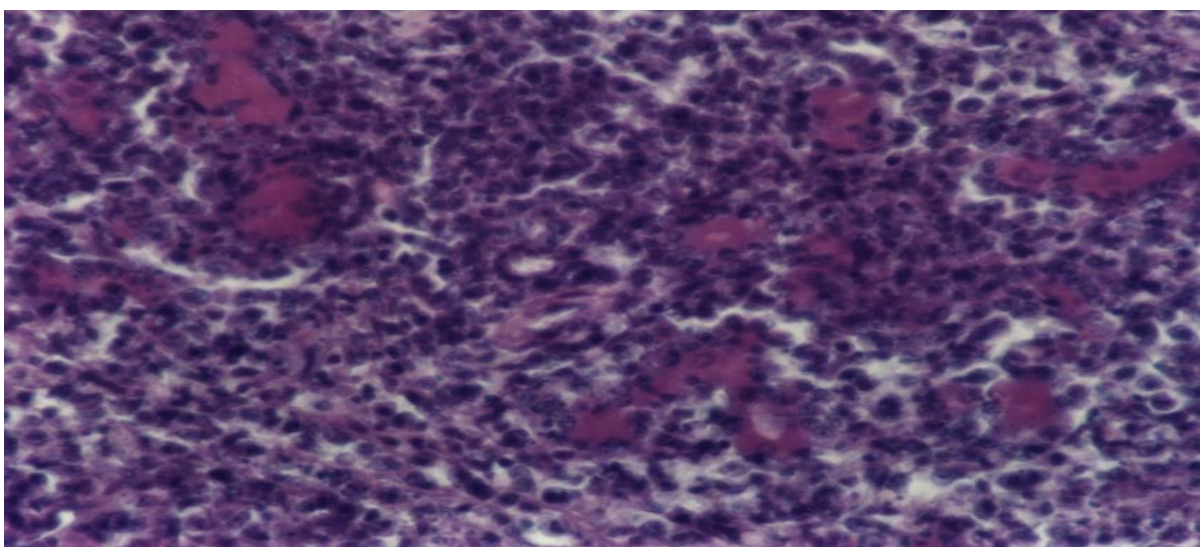


Figura 14. Tumor invade o pâncreas, entremeando-se aos ácinos. Tratamento com Taxol no 3^o dia (HE) 200X

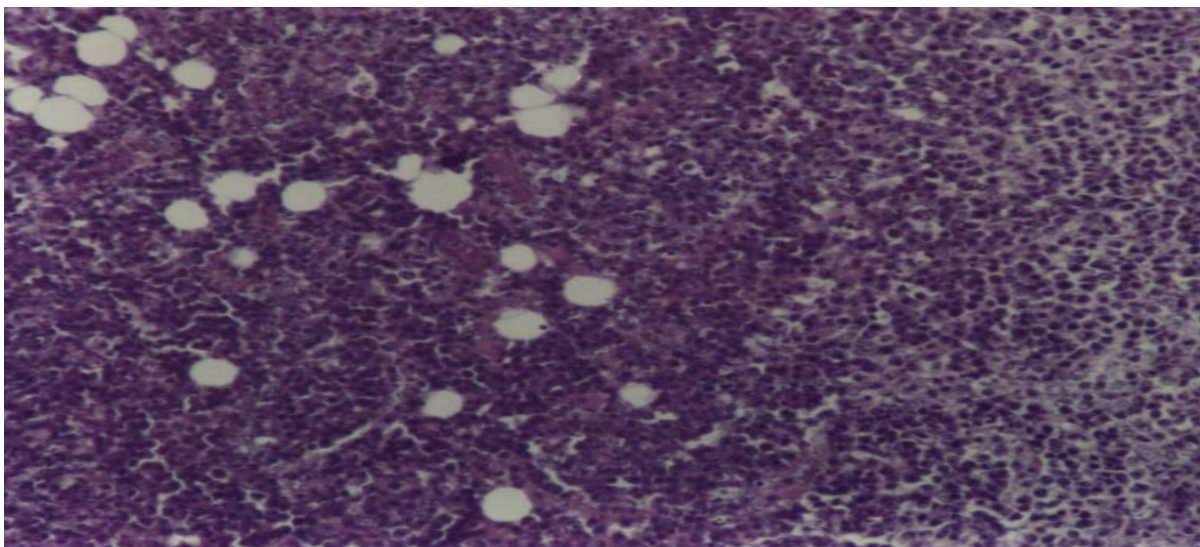


Figura 15. Tumor infiltra o tecido adiposo com células poligonais (epitelióide). Tratamento com Taxol + HT (HE) 100X

Após tratamento combinado de Taxol com hipertermia, o tumor apresentou corpos apoptóticos (Figura 16).

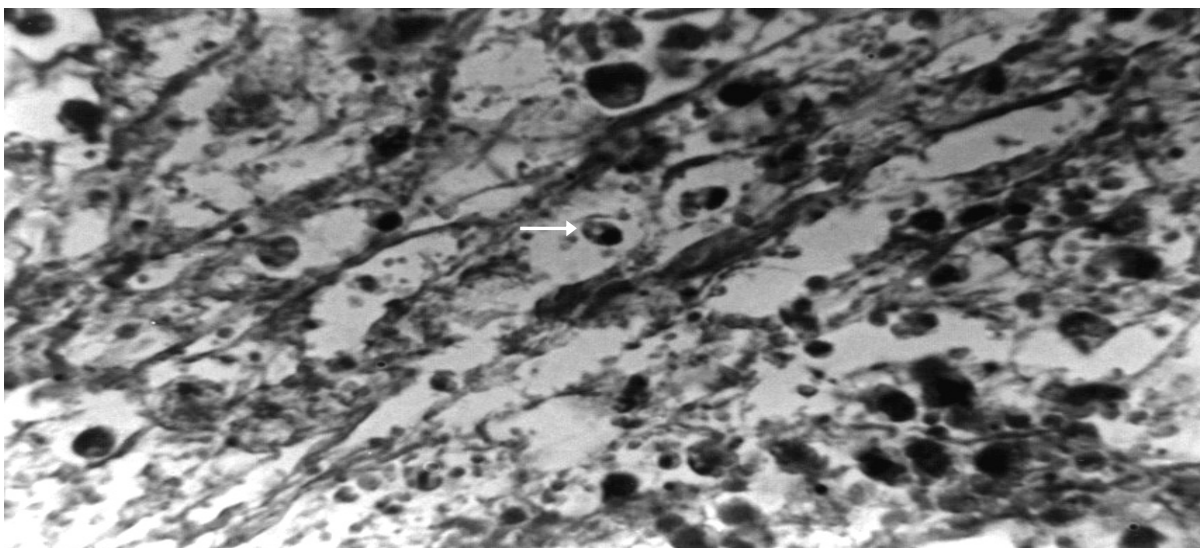
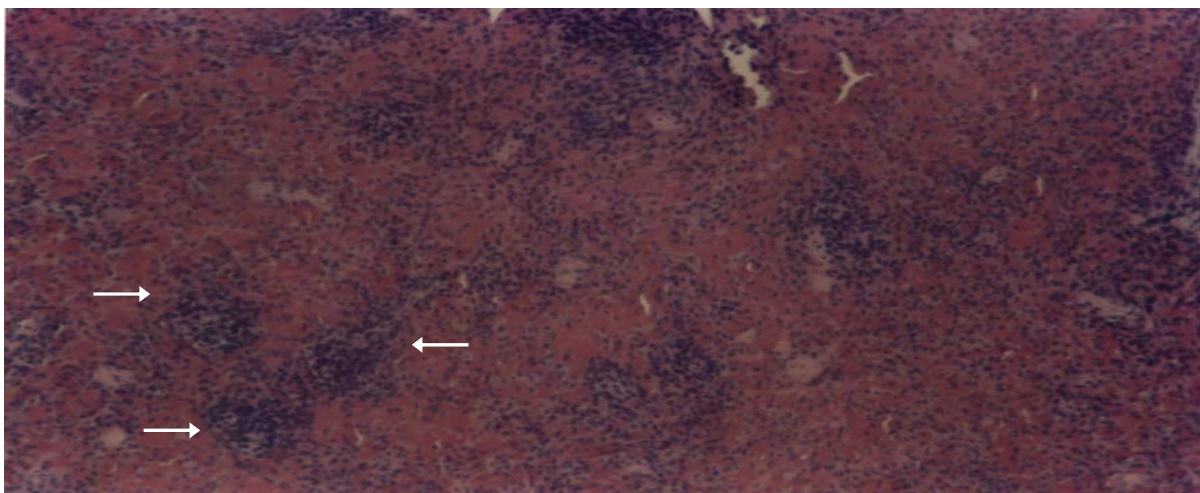


Figura 16. Tumor apresentando corpos apoptóticos (seta). Tratamento com Taxol + HT no 3^o dia (HE) 400X

Nos casos com sobrevida de 108 dias ($n = 2$) submetidos a tratamento com Taxol associado à hipertermia, evidenciaram-se ninhos de células tumorais em meio à extensa hemorragia (Figura 17).



**Figura 17. Ninhos de células tumorais (setas) em meio à extensa hemorragia-
a. Tratamento com Taxol + HT no 3^o dia (HE) 200X**

Em fase evolutiva avançada de 10 dias, o carcinossarcoma 256 de Walker submetido a tratamento com Taxol associado à hipertermia, apresenta resposta terapêutica parcial, com sobrevida de 1 ano, 3 meses e 5 dias. O tumor apresenta-se em pequenos agrupamentos em meio à extensa hemorragia (Figura 18).

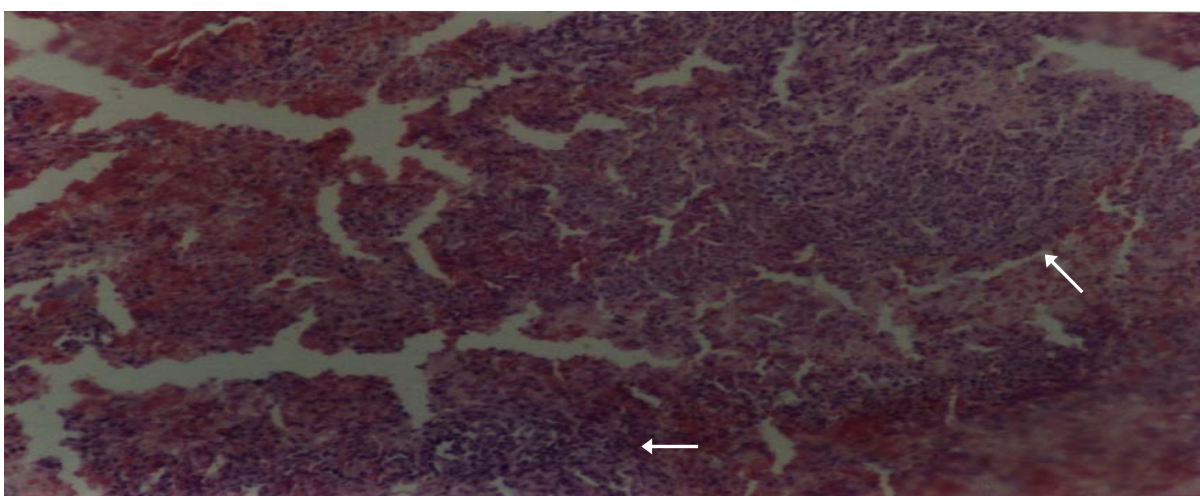


Figura 18. Tumor em pequenos agrupamentos (setas) em meio à extensa hemorragia. Tratamento com Taxol + HT no 10^o dia (HE) 100X

1.3. Exames Imunohistoquímicos (IHM)

O tumor de Walker 256 utilizado neste trabalho apresenta-se essencialmente sarcomatoso, uma vez que, à luz da imunohistoquímica, pelo método ABC, a grande maioria dos casos apresenta 100% de células vimentinas positivas (Figura 19), assim como 100% de células queratinas negativas (Figura 20).

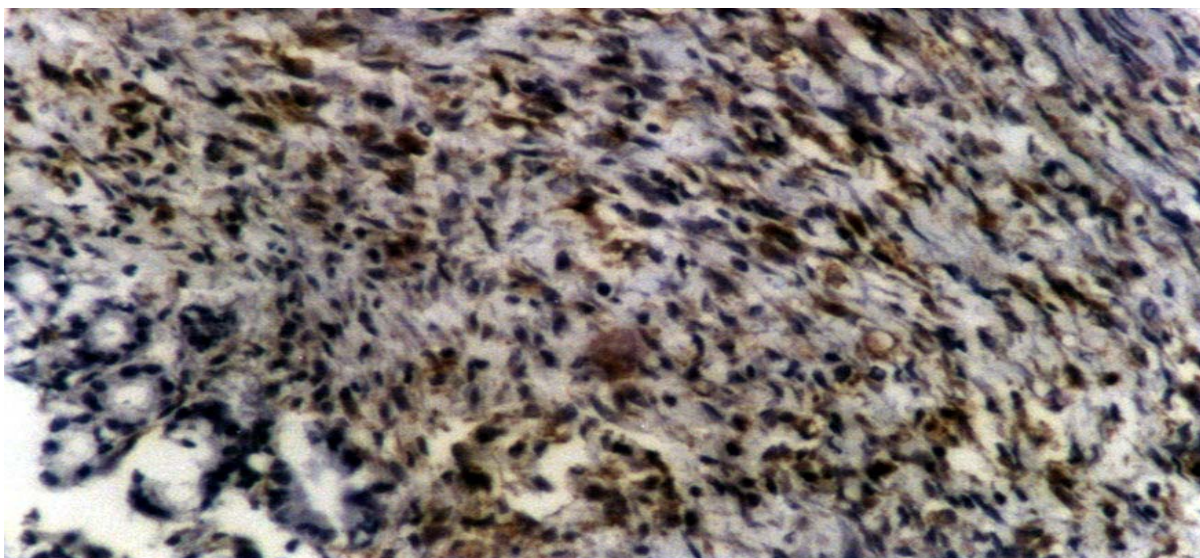


Figura 19. Tumor 100% vimentina positiva. Tratamento com Taxol + HT no 3^o dia. IHQ: vimentina

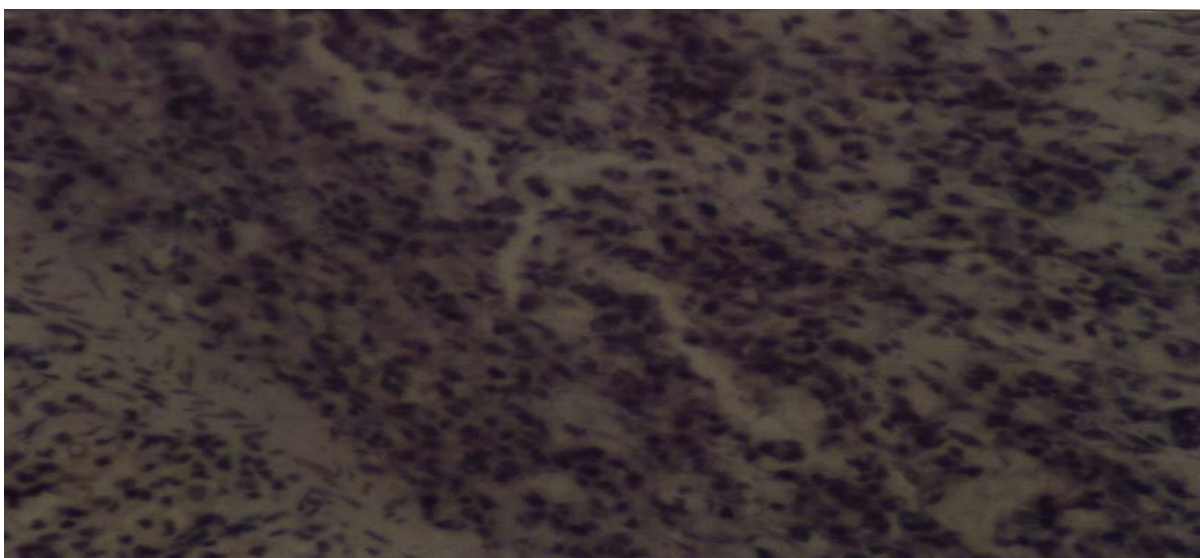


Figura 20. Tumor 100% queratina negativa. Tratamento com Taxol. IHQ: queratina

Quando o carcinossarcoma de Walker 256 foi submetido ao tratamento com Taxol associado à hipertermia, a expressão sarcomatosa continha vimentina positiva em 100% das células da maioria dos grupos. Já em outros grupos, esta expressão se atenua e a marcação vimentina positiva é de apenas 40% (Figura 21).

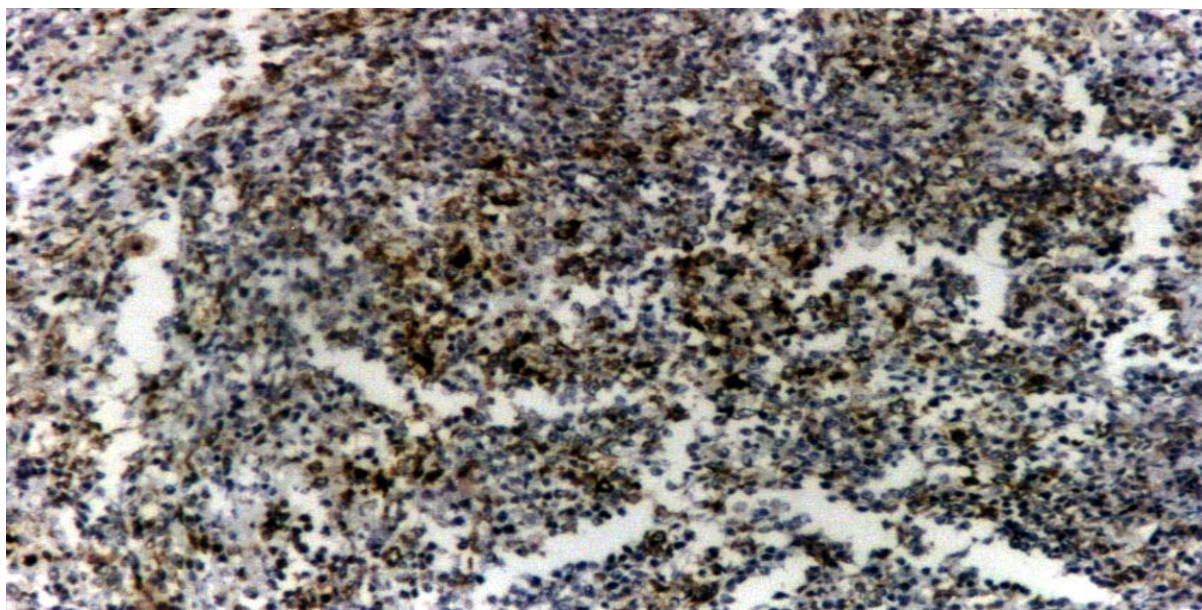


Figura 21. Tumor 40% vimentina positiva. Tratamento com Taxol + HT no 3º dia. IHQ: vimentina

2. 5-Fluorouracil (5-FU)

2.1. Resultados Experimentais

O Grupo Controle, constituído por doze (12) animais sem tratamento, obteve uma sobrevida média igual a $13,25 \pm 0,53$.

Os resultados dos testes apresentados na Tabela III foram unânimes ao mostrarem que, para um nível de significância $p < 0,01$, pelo menos um dos grupos de tratamento apresentou uma estimativa diferente para a curva estimada de Kaplan-Meier.

Tabela III. Testes para a igualdade das curvas estimadas de Kaplan-Meier entre o grupos

Teste	Qui-Quadrado	g. l.	Pr > Qui-Quadrado
Log-Rank	52,7220	6	< ,0001
Wilcoxon	49,7220	6	< ,0001
-2Log (RV)	56,5731	6	< ,0001

g.l. = graus de liberdade; Pr = probabilidade; RV = Razão de verossimilhança

Utilizando-se o teste Log-Rank para comparar o Grupo Controle com os demais Grupos Experimentais, concluiu-se que os grupos QT5FU no 3^o e 10^o dias e QT5FU associado à hipertermia no 7^o e 10^o dias mostraram diferença estatisticamente significante ($p < 0,002$ e $p < 0,003$, respectivamente). Já os grupos QT5FU associado à hipertermia no 3^o dia e QT5FU no 7^o dia não mostraram diferença estatisticamente significante em relação ao Grupo Controle pelo mesmo teste ($p < 0,12$ e $p < 0,14$, respectivamente).

Tabela IV. Teste Log-Rank para a igualdade das curvas estimadas de Kaplan-Meier do Grupo Controle *versus* os demais grupos individualmente

Tratamento	Qui-Quadrado	g. l.	Pr > Qui-Quadrado
QT5FU 3 dias	9,4159	1	0,0022
QT5FU 3 dias + HT 3 dias	2,4132	1	0,1203 (ns)
QT5FU 7 dias	3,9967	1	0,1456 (ns)
QT5FU 7 dias + HT 7 dias	9,2752	1	0,0023
QT5FU 10 dias	26,0059	1	< ,0001
QT5FU 10 dias + HT 10 dias	8,6714	1	0,0032

g.l. = graus de liberdade; Pr = probabilidade; ns = não significativo

Para a curva de sobrevivência de Kaplan-Meier, os grupos QT5FU no 3^o e 10^o dias mostraram maior probabilidade de sobrevida em relação ao Grupo Controle, enquanto que apenas o grupo QT5FU associado à hipertermia no 7^o dia mostrou pequena probabilidade de sobrevida em relação ao Grupo Controle (Figura 22).

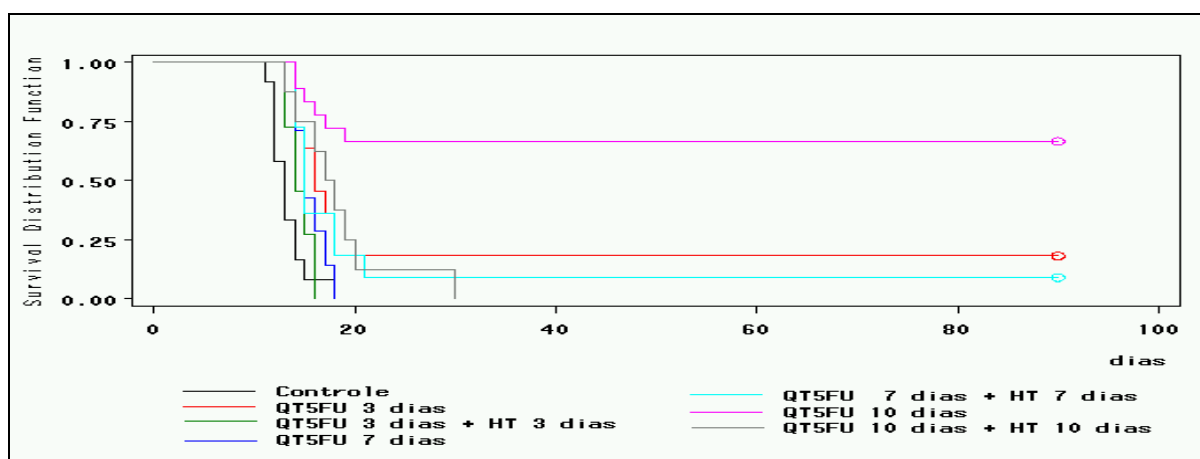


Figura 22. Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para todos os grupos (Controle e QT5FU)

Para a curva de sobrevivência de Kaplan-Meier, o grupo QT5FU no 3^o dia mostrou pequena probabilidade de sobrevida (25%) em relação ao Grupo Controle (Figura 23).

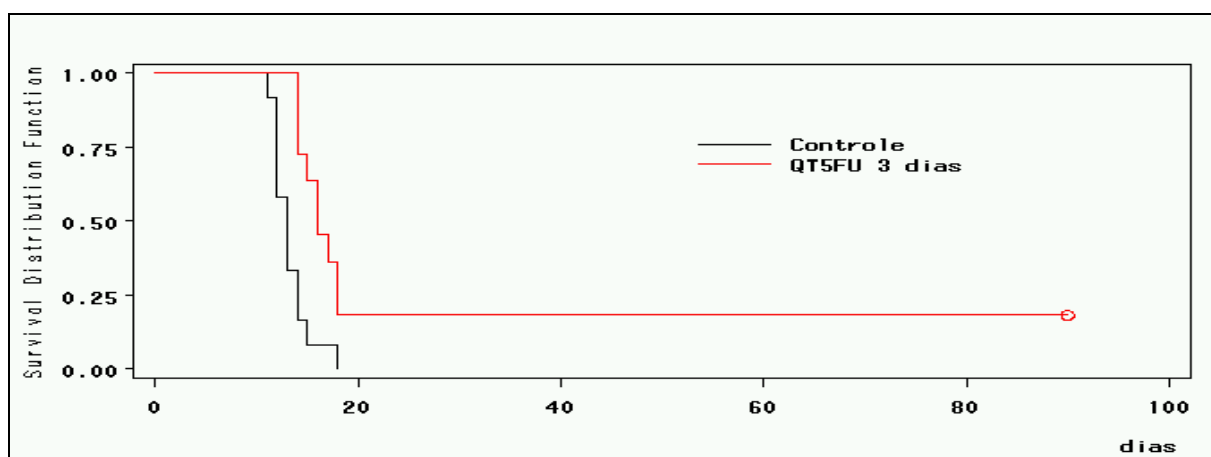


Figura 23. Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para os grupos Controle e QT5FU no 3^o dia

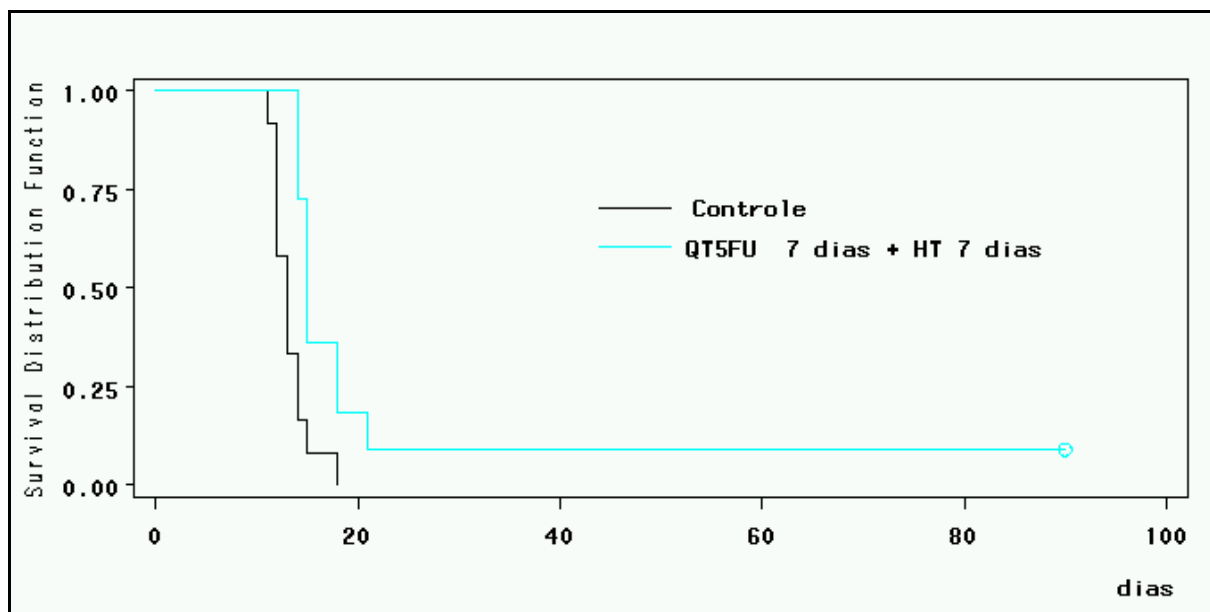


Figura 24. Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para os grupos Controle e QT5FU + HT no 7^o dia

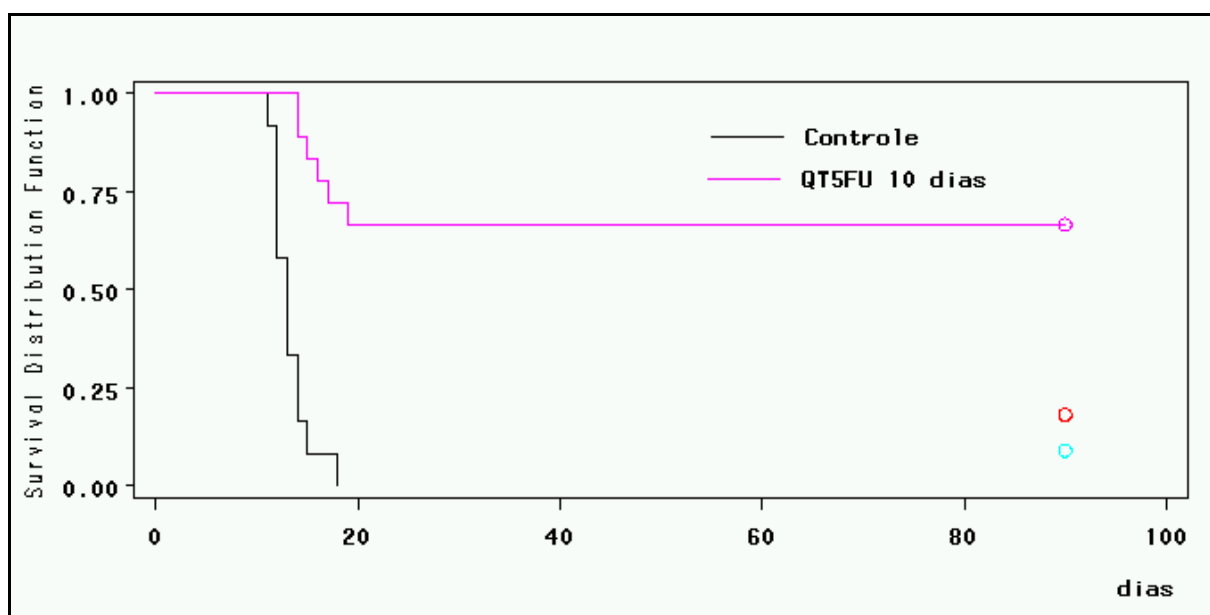


Figura 25. Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para os grupos Controle e QT5FU no 10^o dia

Utilizando-se o teste Log-Rank para comparar o grupo QT5FU no 3^o dia com o grupo QT5FU associado à hipertermia no 3^o dia, concluiu-se que a curva de Kaplan-Meier dos dois grupos é significativamente diferente ($p = 0,0113$) uma da outra.

Utilizando-se o teste Log-Rank para comparar o grupo QT5FU no 7^o dia com o grupo QT5FU associado à hipertermia no 7^o dia, concluiu-se que a curva de Kaplan-Meier dos dois grupos não é significativamente diferente ($p = 0,3753$) uma da outra.

Utilizando-se o teste Log-Rank para comparar o grupo QT5FU no 10^o dia com o grupo QT5FU associado à hipertermia no 10^o dia, concluiu-se que a curva de Kaplan-Meier dos dois grupos é significativamente diferente ($p = 0,0026$) uma da outra.

2.2. Exames Histopatológicos (H&E)

O carcinossarcoma de Walker 256, em sua fase evolutiva inicial de 3 dias, apresentou uma extensa área de necrose coagulativa, onde se preservam os contornos das células e dos núcleos, não ocorrendo lise celular. Nesta fase, o tumor foi submetido a tratamento com 5-FU isolado (Figura 26), e as células preservaram sua forma.

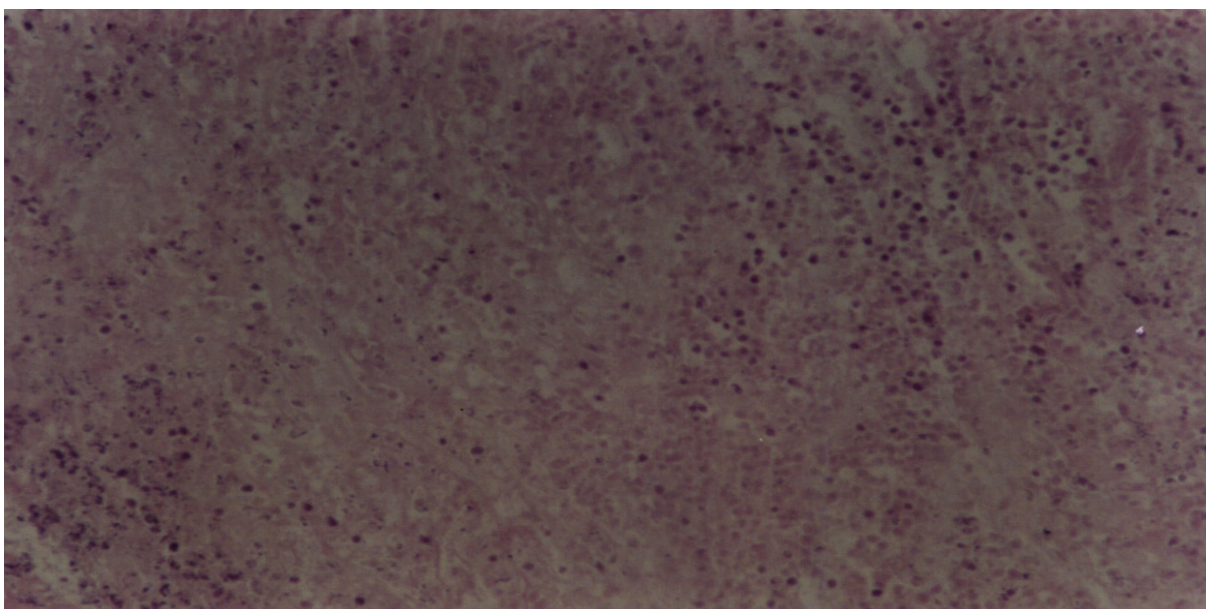


Figura 26. Tumor com necrose coagulativa extensa. Contornos celulares e nucleares preservados. Tratamento com 5-FU no 3^o dia (HE) 100X

Nesta mesma fase evolutiva inicial de 3 dias, as células do tumor de Walker 256 entremeiam-se às glândulas na mucosa gástrica, destruindo-as. Nesta fase, o tumor foi tratado com 5-FU isolado (Figura 27).

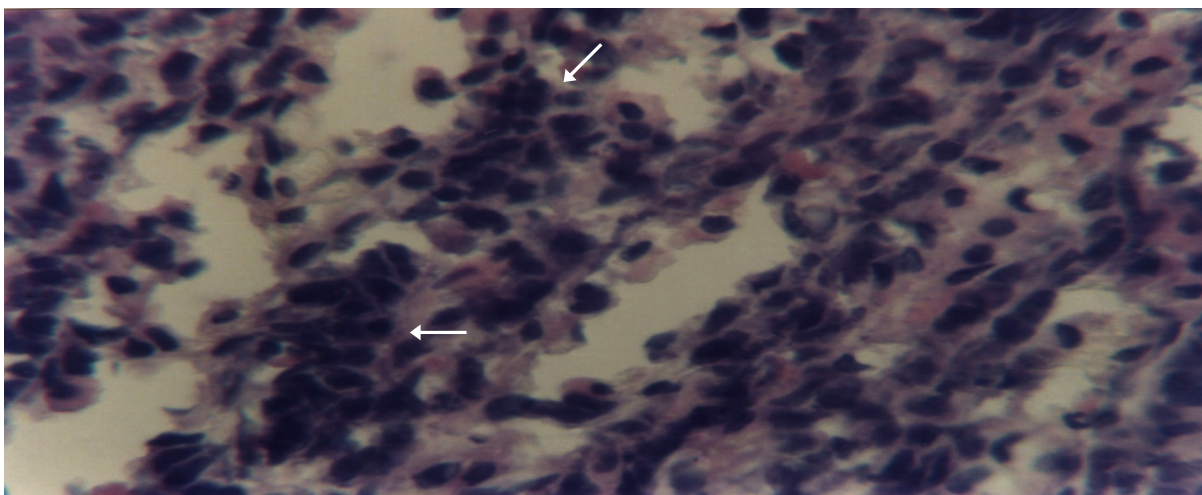


Figura 27. Tumor entre as glândulas da mucosa (setas), destruindo-as. Tratamento com 5-FU no 3º dia (HE) 400X

Em fase evolutiva intermediária de 7 dias, o tumor de Walker 256 manifesta-se com células poligonais tipicamente epitelióides, além de células fusiformes tipicamente sarcomatosas (Figura 28). Nesta fase, o tratamento foi à base de 5-FU isolado.

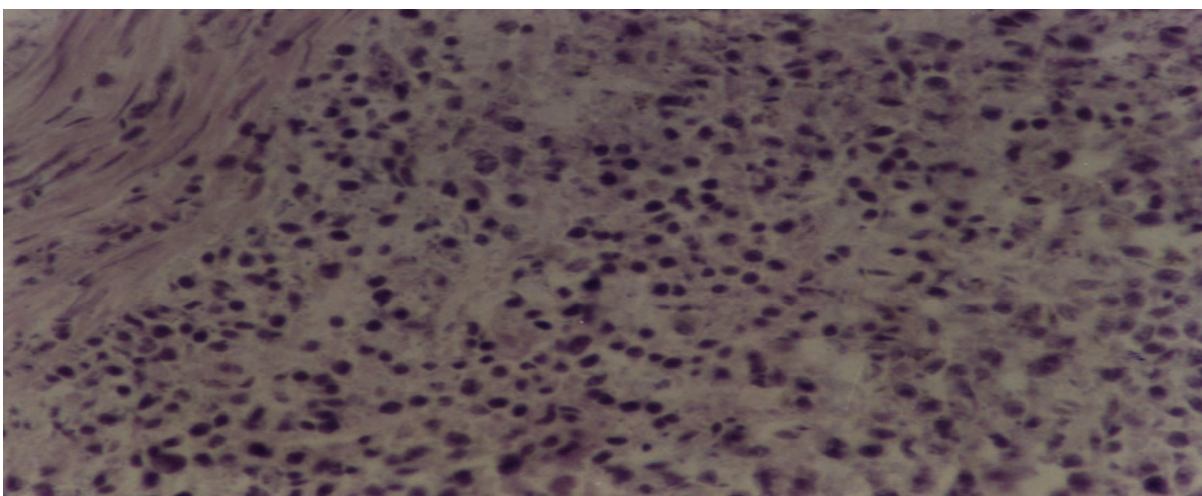


Figura 28. Tumor com células poligonais (epitelióides). Presença de células fusiformes (mesenquimais) Tratamento com 5-FU no 7º dia (HE) 200X

O tumor em estudo, quando tratado com 5-FU isolado, aos 7 dias de evolução, apresenta-se com extensa área de necrose (Figura 29).

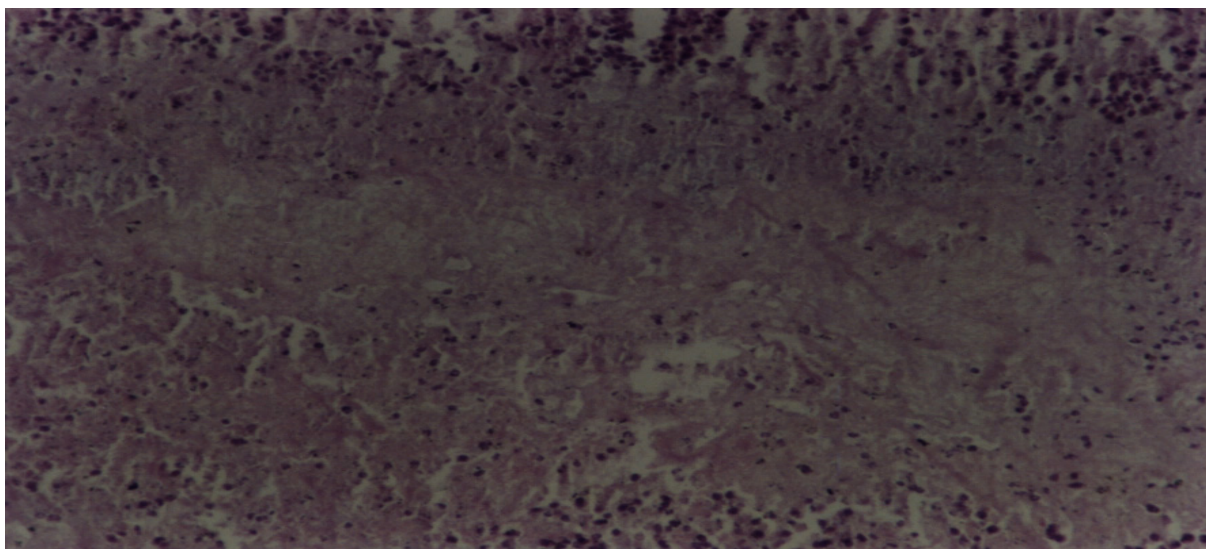


Figura 29. Tumor com extensa necrose. Há lise tumoral. Tratamento com 5-FU no 7^o dia (HE) 100X

O tumor em sua fase evolutiva de 7 dias, ao ser tratado com 5-FU isolado, apresenta-se infiltrando o pâncreas e com pequena área de necrose (Figura 30).

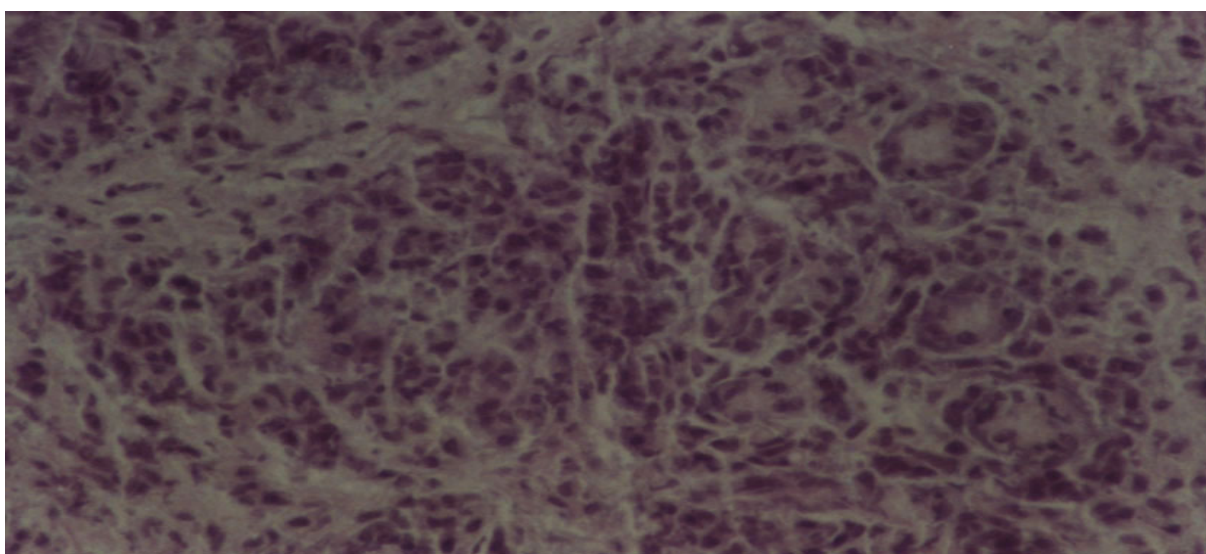


Figura 30. Tumor infiltrando o pâncreas. Há pouca necrose. Tratamento com 5-FU no 7^o dia (HE) 200X

O tumor de Walker 256, na sua fase evolutiva avançada de 10 dias, apresenta bastante hemorragia intratumoral ao ser tratado com 5-FU associado à hipertermia (Figura 31).

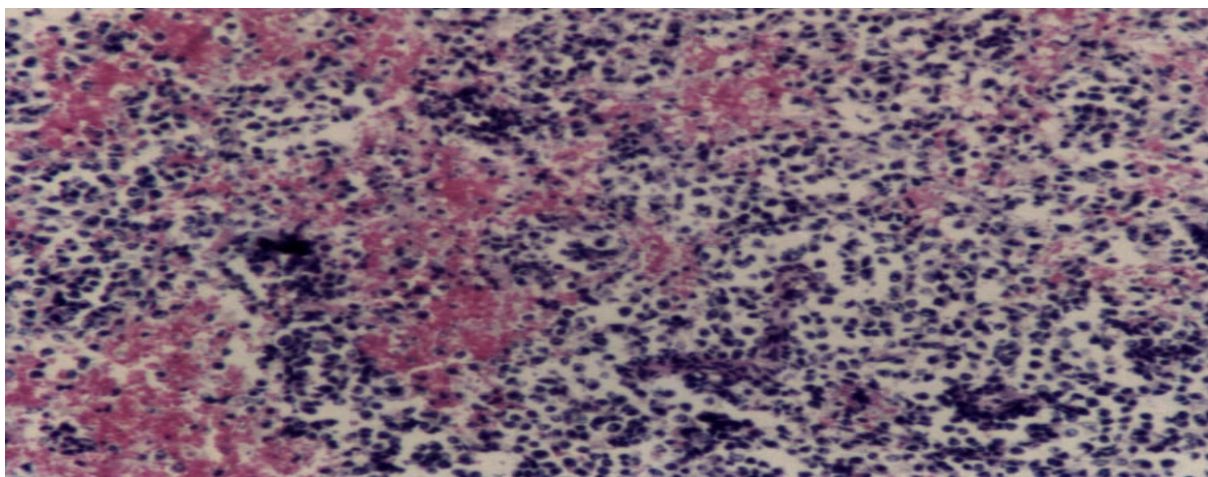


Figura 31. Hemorragia intratumoral. Tratamento com 5-FU + HT no 10^o dia (HE) 100X

Observa-se ainda que o carcinossarcoma de Walker 256, na sua fase evolutiva avançada de 10 dias, sob tratamento com 5-FU isolado, evidencia bastante tecido tumoral, com considerável hemorragia e acentuado edema (áreas esbranquiçadas), correspondendo ao que se denomina mucosite focal (Figura 32).

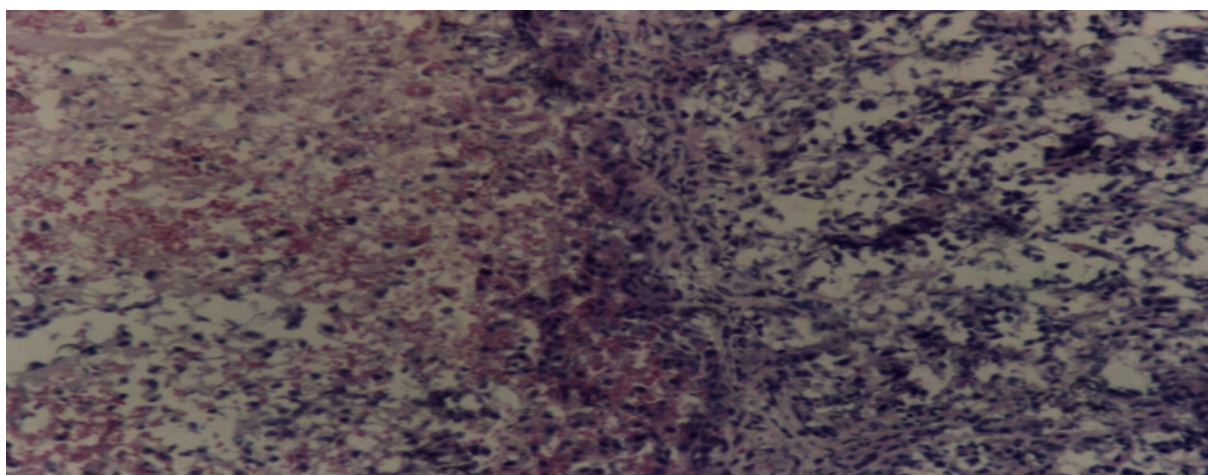


Figura 32. Tumor com hemorragia à esq. Muscular da mucosa ao meio. Edema representa a mucosite focal à dir. Tratamento com 5-FU no 10^o dia (HE) 200X

2.3. Exames Imunohistoquímicos (IHM)

O tumor de Walker 256 utilizado neste trabalho mostrou ser essencialmente sarcomatoso, uma vez que, à luz da imunohistoquímica pelo método ABC, apresenta-se em 100% das células vimentina positivas (Figura 33), assim como, nas queratinas negativas (Figura 34).

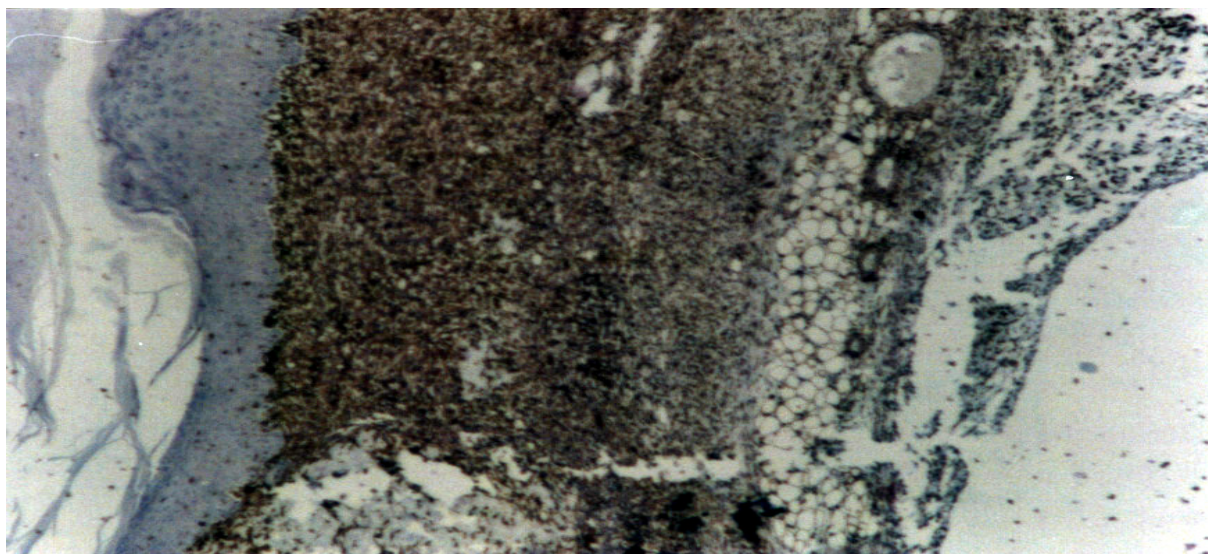


Figura 33. Tumor 100% vimentina positiva em toda sua extensão, exceto mucosa. Tratamento com 5-FU no 7º dia. IHQ: vimentina

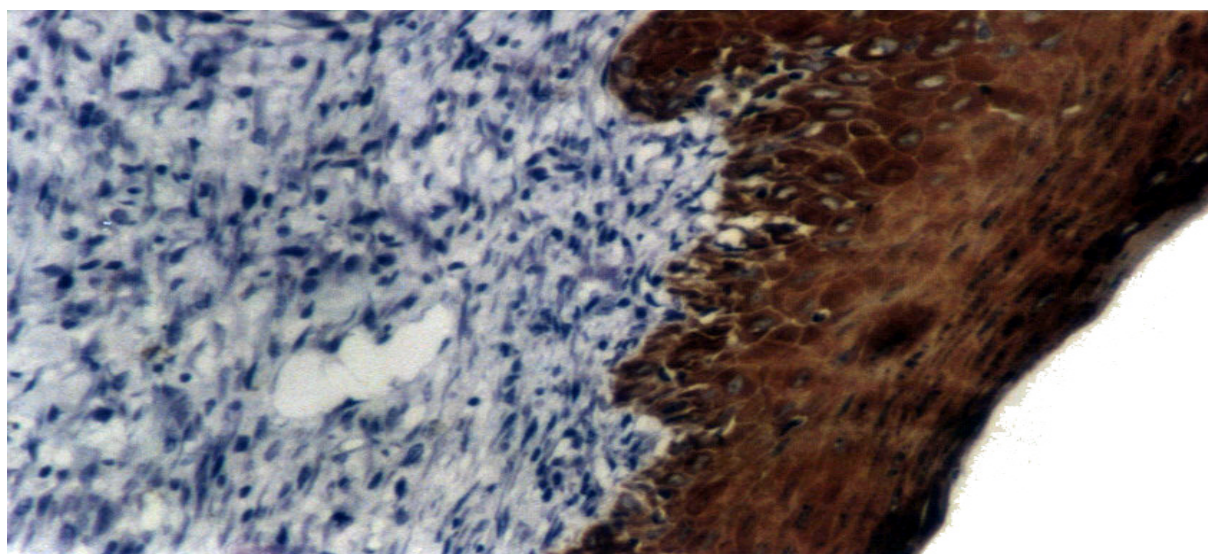


Figura 34. Tumor 100% queratina negativa, com controle queratina positiva à dir. Tratamento com 5-FU no 7º dia. IHQ: queratina

Os estudos imunohistoquímicos do tumor de Walker 256 implantado nos estômagos de rato, neste trabalho, revelaram ser o tumor essencialmente sarcomatoso, com 100% de positividade para a vimentina. Todavia, no epitélio que apresenta vimentina negativa, há uma célula vimentina positiva isolada – a chamada célula de Langherans – que são células intra-epiteliais apresentadoras de antígenos (Figura 35).

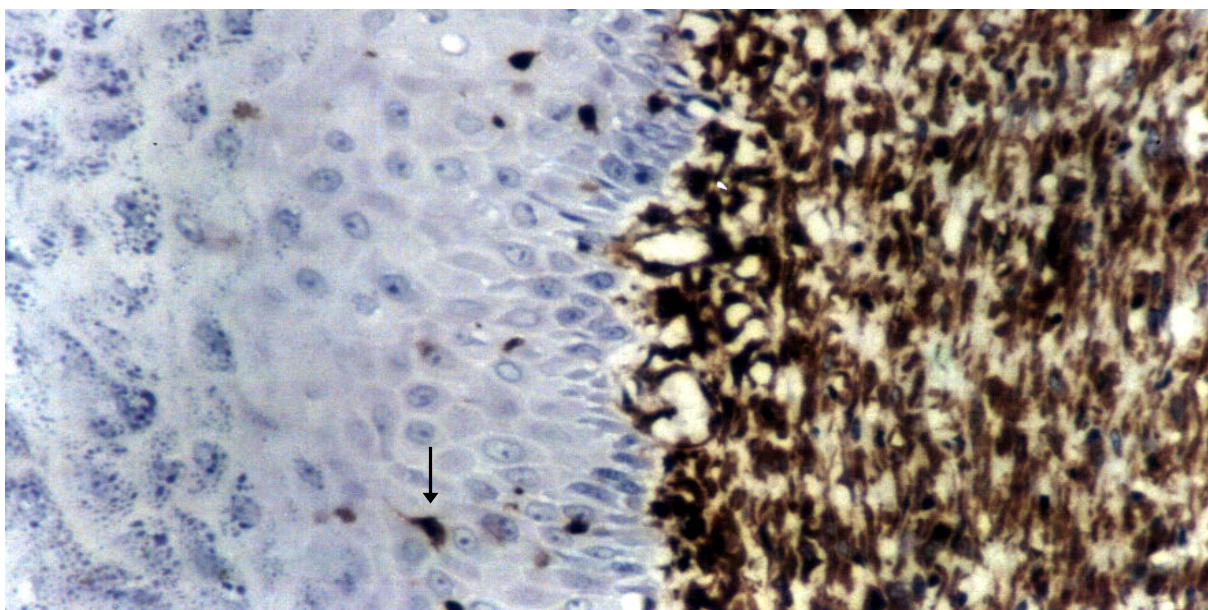


Figura 35. Tumor 100% vimentina positiva. Presença de célula de Langherans (vimentina +) (seta). Tratamento com 5-FU no 7^o dia. IHQ: vimentina

3. Ácido Folínico (Leucovorin®) (LEU)

3.1. Resultados Experimentais

Os resultados dos testes Log-Rank e Wilcoxon apresentados na Tabela V mostraram que, para um nível de significância $p < 0,01$, pelo menos um dos Grupos Experimentais apresenta uma estimativa diferente para a curva de Kaplan-Meier. Resultado este também observado pela análise da Figura 36.

Tabela V. Teste Log-Rank para a igualdade das curvas estimadas de Kaplan-Meier do Grupo Controle *versus* os demais grupos individualmente

Tratamento	Qui-Quadrado	g. l.	Pr > Qui-Quadrado
(5FU) 3 dias + (LEU) 3 dias	3,5334	1	0,0601 (ns)
(5FU) 7 dias + (LEU) 7 dias	7,5747	1	0,0059 (*)
(5FU) 10 dias + (LEU) 10 dias	8,1178	1	0,0044 (*)
(5FU+LEU) 3 dias + HT 3 dias	10,8085	1	0,0010 (*)
(5FU+LEU) 7 dias + HT 7 dias	6,1031	1	0,0135 (**)
(5FU+LEU) 10 dias + HT 10 dias	10,3414	1	0,0013 (*)

g.l. = graus de liberdade; Pr = probabilidade; ns = não significativo; * = significativo a 1%; ** = significativo a 5%

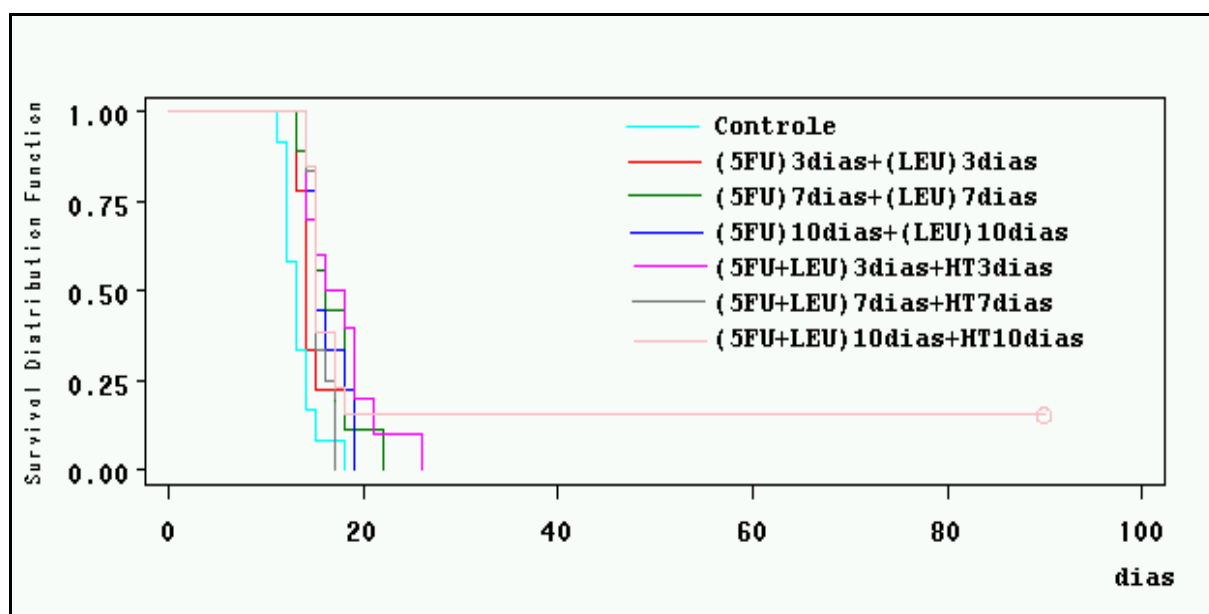


Figura 36. Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para todos os grupos (Controle, 5FU+LEU e 5FU+LEU+HT)

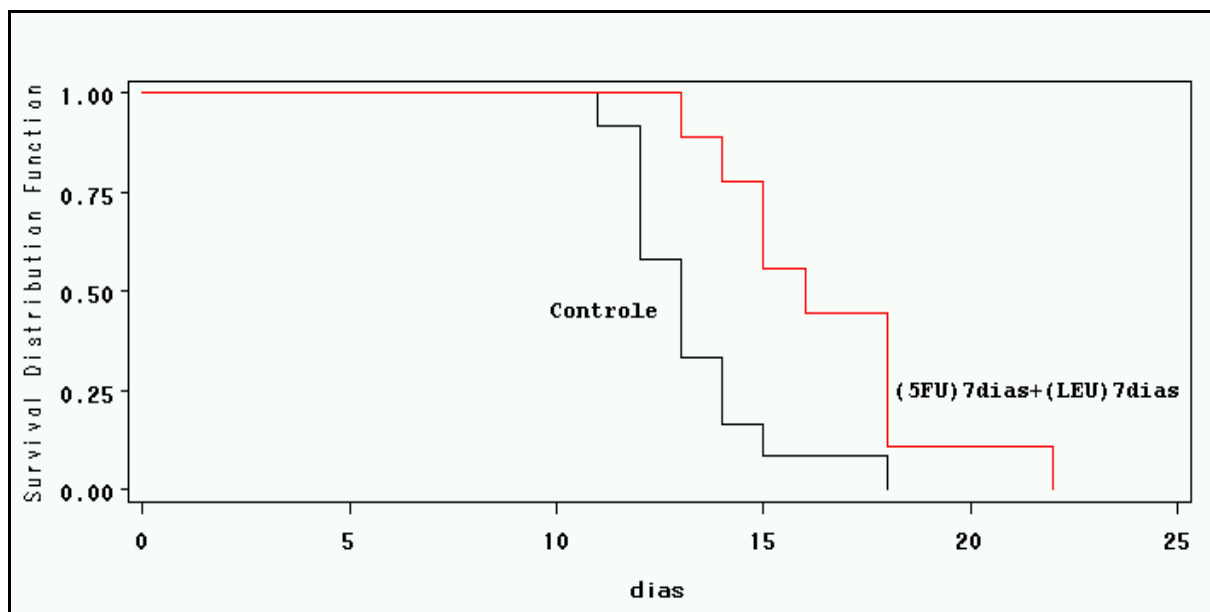


Figura 37. Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para os grupos Controle e (5FU) + (LEU) no 7^o dia

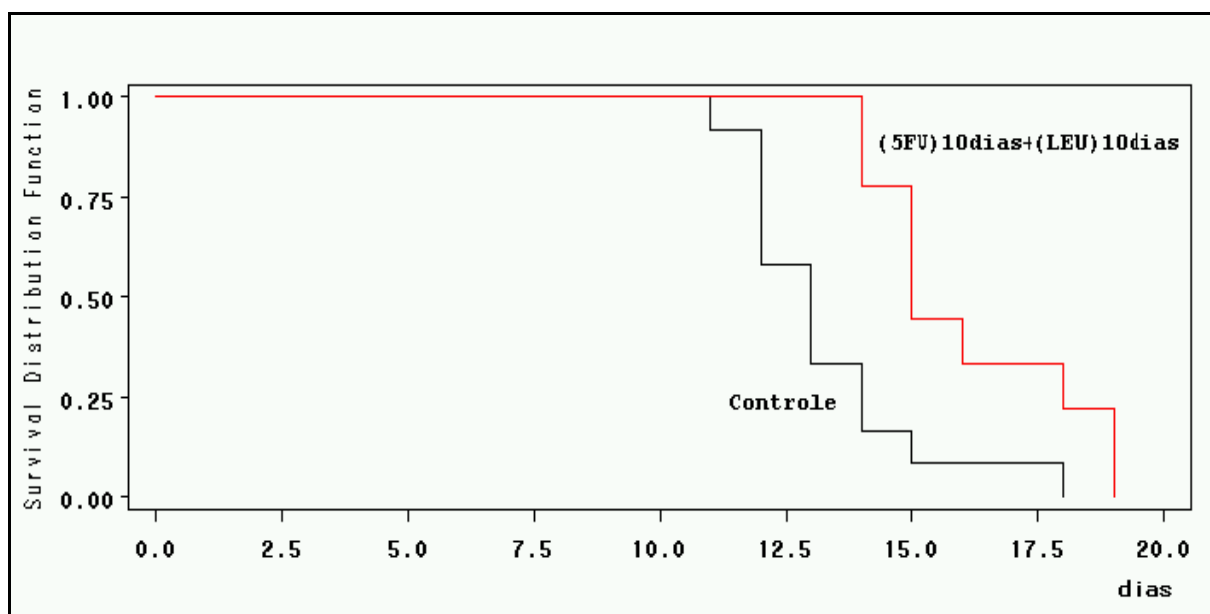


Figura 38. Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para os grupos Controle e (5FU) + (LEU) no 10^o dia

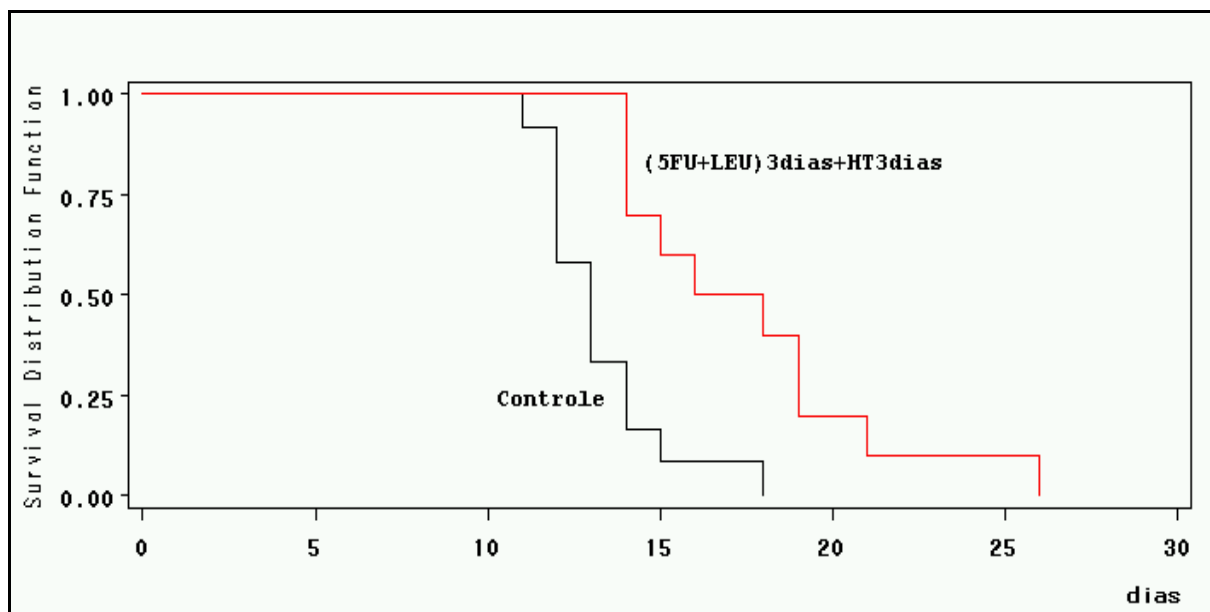


Figura 39. Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para os grupos Controle e (5FU+LEU) + HT no 3^o dia

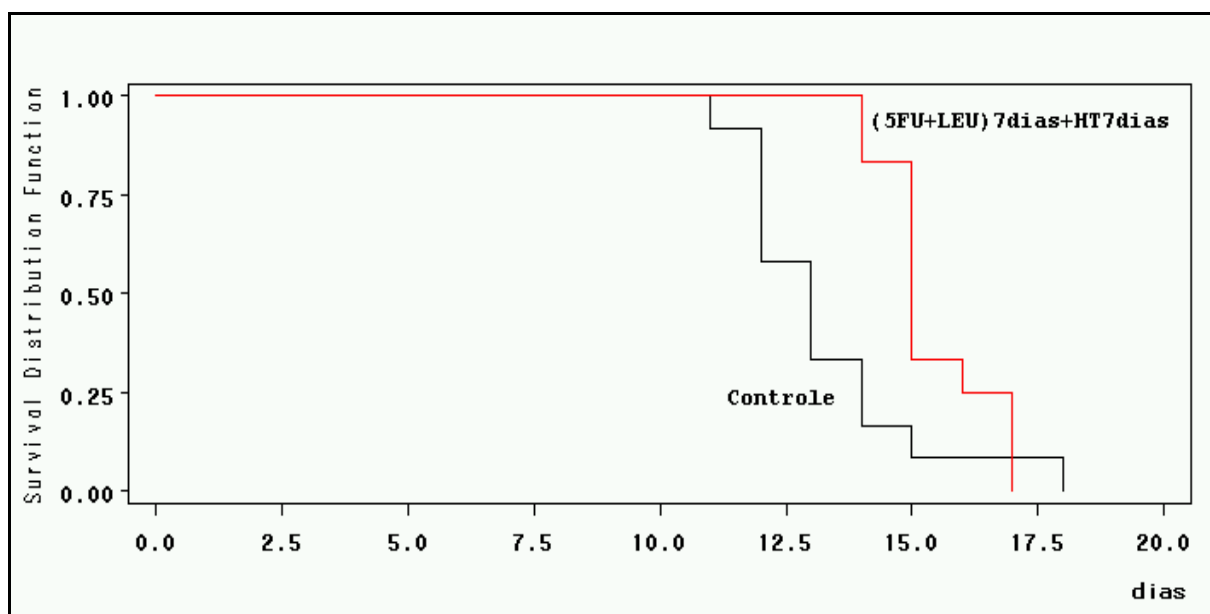


Figura 40. Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para os grupos Controle e (5FU+LEU) + HT no 7^o dia

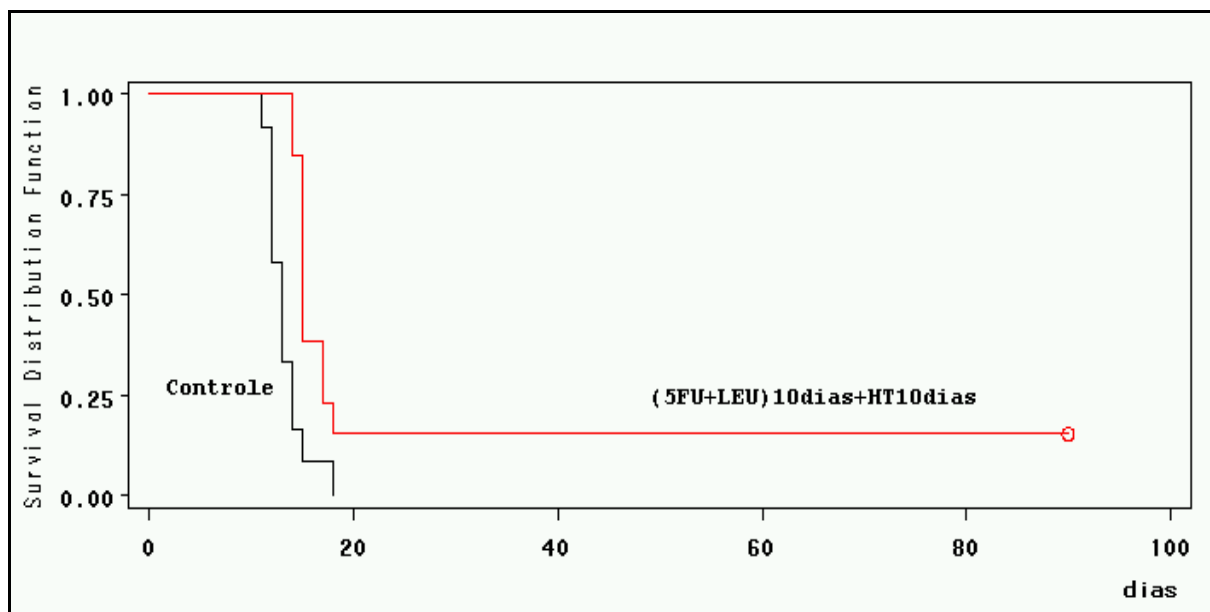


Figura 41. Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para os grupos Controle e (5FU+LEU) + HT no 10^o dia

Tabela VI. Teste Log-Rank para a igualdade das curvas estimadas de Kaplan-Meier do Grupo (5FU) + (LEU) no 3^o dia versus os demais grupos individualmente

Tratamento	Qui-Quadrado	g. l.	Pr > Qui-Quadrado
(5FU) 7 dias + (LEU) 7 dias	1,6182	1	0,2033 (ns)
(5FU) 10 dias + (LEU) 10 dias	1,6050	1	0,2052 (ns)
(5FU+LEU) 3 dias + HT 3 dias	3,7114	1	0,0540 (*)
(5FU+LEU) 7 dias + HT 7 dias	0,2294	1	0,6320 (ns)
(5FU+LEU) 10 dias + HT 10 dias	2,7380	1	0,0980 (ns)

g.l. = graus de liberdade; Pr = probabilidade; ns = não significativo; * = significativo a 5%

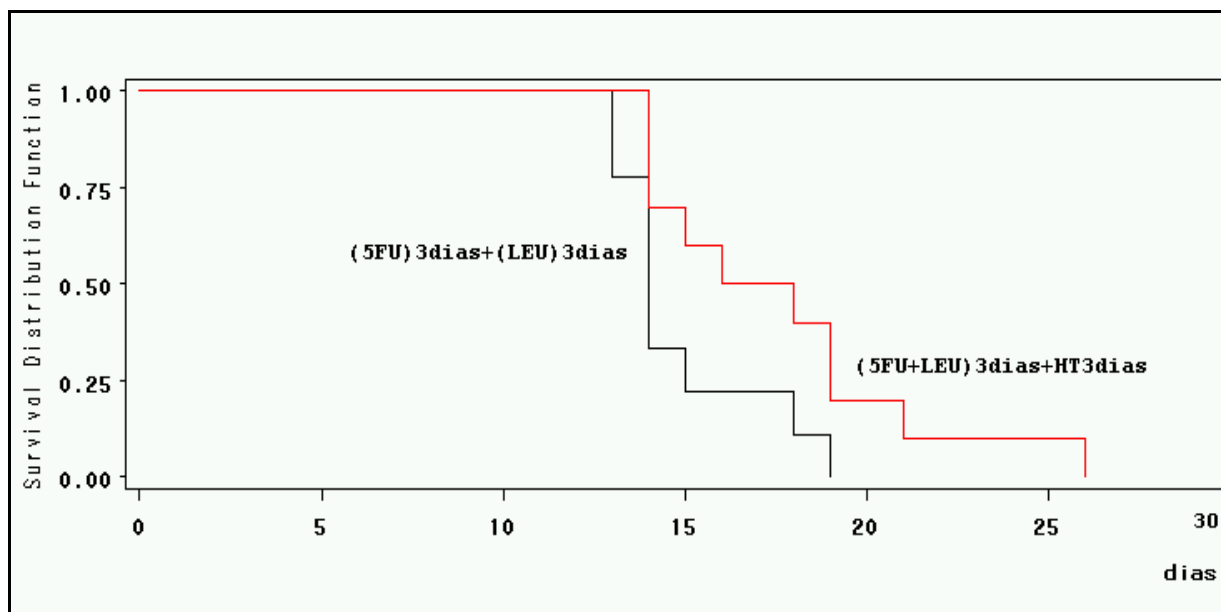


Figura 42. Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para os grupos (5FU) + (LEU) no 3^o dia e (5FU+LEU) + HT no 3^o dia

Tabela VII. Teste Log-Rank para a igualdade das curvas estimadas de Kaplan-Meier do Grupo (5FU) + (LEU) no 7^o dia *versus* os demais grupos individualmente

Tratamento	Qui-Quadrado	g. l.	Pr > Qui-Quadrado
(5FU) 10 dias + (LEU) 10 dias	0,0775	1	0,7807 (ns)
(5FU+LEU) 3 dias + HT 3 dias	0,5080	1	0,4760 (ns)
(5FU+LEU) 7 dias + HT 7 dias	2,6033	1	0,1066 (ns)
(5FU+LEU) 10 dias + HT 10 dias	0,0319	1	0,8582 (ns)

g.l. = graus de liberdade; Pr = probabilidade; ns = não significativo

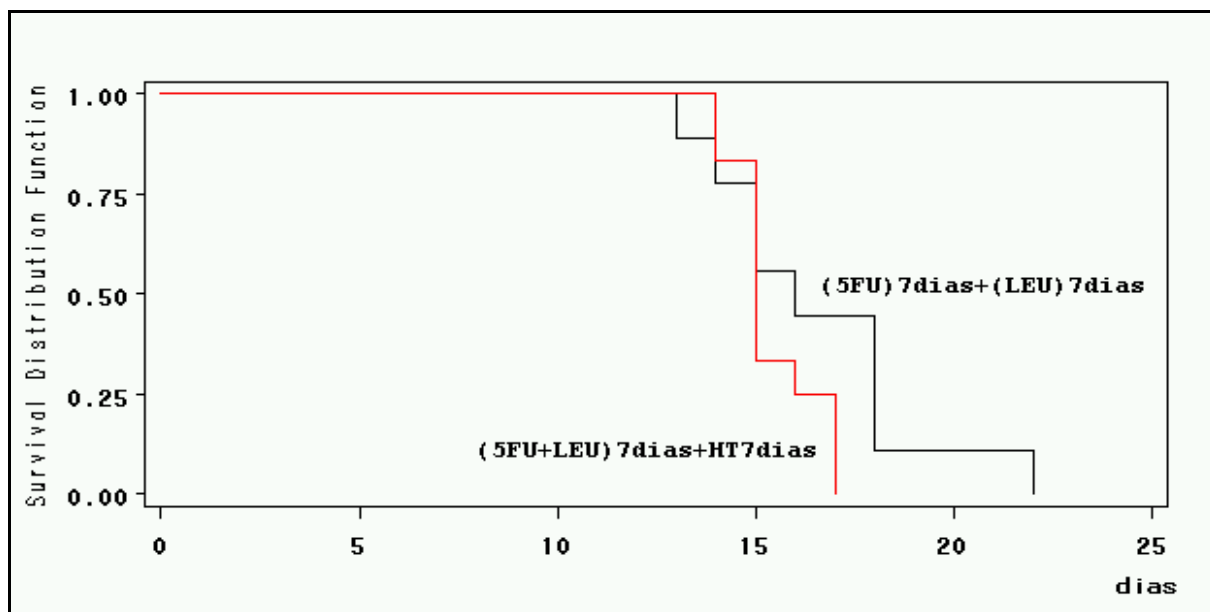


Figura 43. Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para os grupos (5FU) + (LEU) no 7^o dia e (5FU+LEU) + HT no 7^o dia

Tabela VIII. Teste Log-Rank para a igualdade das curvas estimadas de Kaplan-Meier do Grupo (5FU) + (LEU) no 10^o dia *versus* os demais grupos individualmente

Tratamento	Qui-Quadrado	g. l.	Pr > Qui-Quadrado
(5FU+LEU) 3 dias + HT 3 dias	1,0457	1	0,3065 (ns)
(5FU+LEU) 7 dias + HT 7 dias	1,3162	1	0,2513 (ns)
(5FU+LEU) 10 dias + HT 10 dias	0,1339	1	0,7144 (ns)

g.l. = graus de liberdade; Pr = probabilidade; ns = não significativo

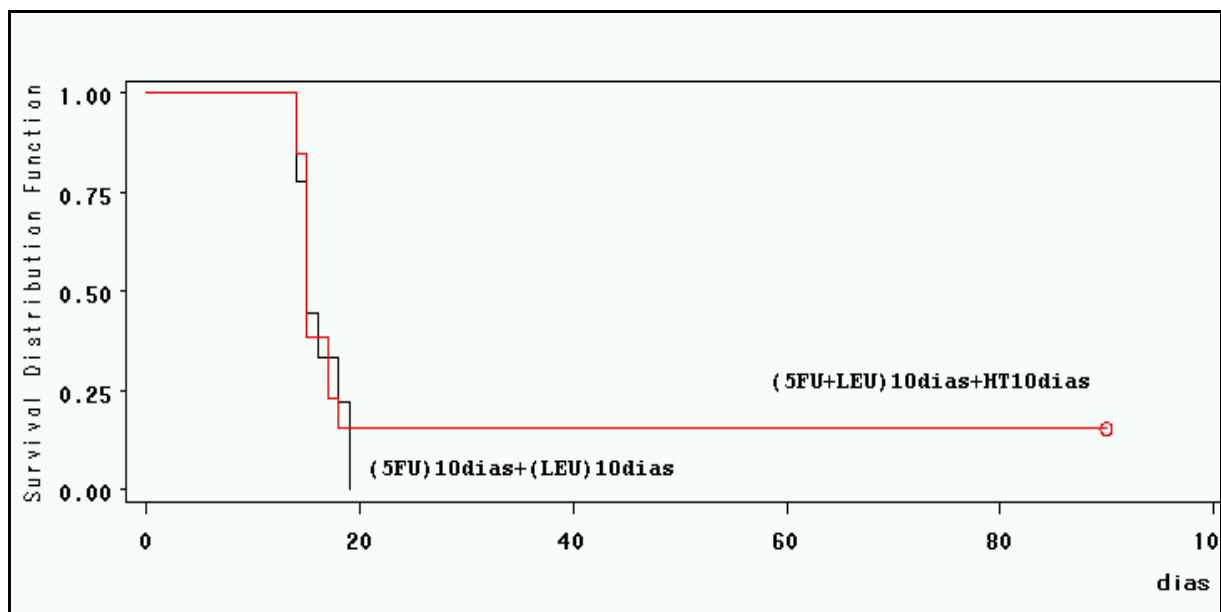


Figura 44. Estimativas das curvas de Kaplan-Meier para os grupos (5FU) + (LEU) no 10^o dia e (5FU+LEU) + HT no 10^o dia

Tabela IX. Teste Log-Rank para a igualdade das curvas estimadas de Kaplan-Meier do Grupo (5FU+LEU) + HT no 3^o dia *versus* os demais grupos individualmente

Tratamento	Qui-Quadrado	g. l.	Pr > Qui-Quadrado
(5FU+LEU) 7 dias + HT 7 dias	3,4870	1	0,0619 (ns)
(5FU+LEU) 10 dias + HT 10 dias	0,0050	1	0,9435 (ns)

g.l. = graus de liberdade; Pr = probabilidade; ns = não significativo

As médias no tempo 0 (quando se inicia o tratamento com hipertermia) não diferem tanto para os grupos 5FU associado à HT quanto para os grupos 5FU + LEU associado à HT. Em todos os outros tempos (20, 30, 40, 50 e 60 minutos), as médias de temperatura dos grupos 5FU associado à HT superaram as dos grupos 5FU + LEU associado à HT (Quadro 1).

Quadro 1. Teste de Tukey para a comparação das médias ($\Delta_{5\%} = 1,16$)

Tempo (min.)	Tratamento	Média (n = 25)	Desvio-padrão	Comparação*
0	5FU+HT	36,70	0,49	a
	(5FU+LEU) +HT	37,22	0,69	a
20	5FU+HT	38,59	1,06	a
	(5FU+LEU) +HT	37,76	1,68	b
30	5FU+HT	39,02	1,36	a
	(5FU+LEU) +HT	37,80	1,96	b
40	5FU+HT	39,25	1,47	a
	(5FU+LEU) +HT	37,73	2,01	b
50	5FU+HT	39,23	1,57	a
	(5FU+LEU) +HT	37,78	1,75	b
60	5FU+HT	39,19	1,50	a
	(5FU+LEU) +HT	37,75	1,79	b

*Médias com letras iguais não diferem estatisticamente

As curvas observadas na Figura 45 mostram nitidamente que os grupos tratados com 5FU associado à HT mantêm uma média de temperatura maior que os grupos tratados com 5FU + LEU associado à HT.

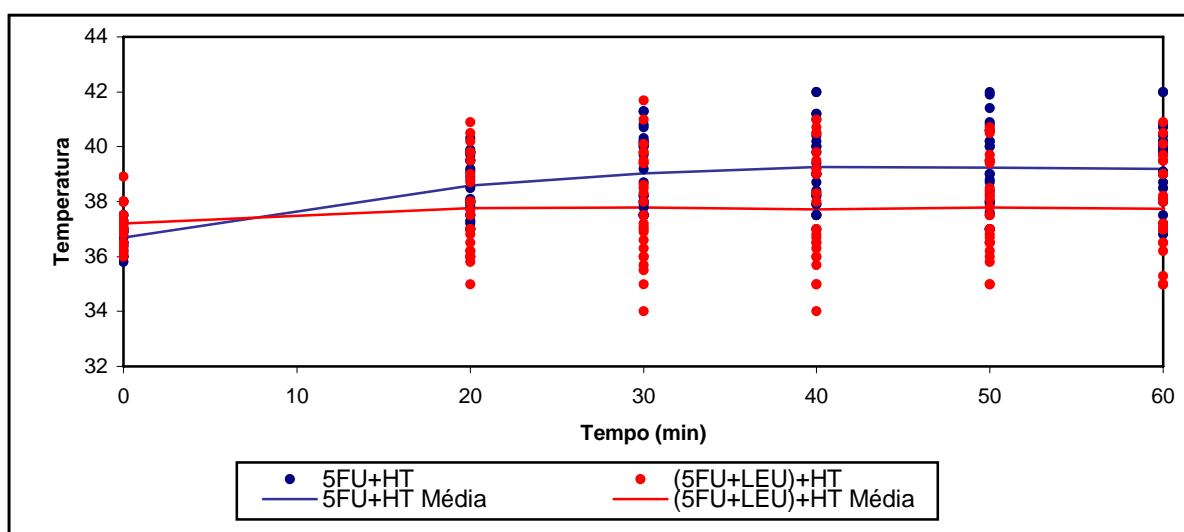


Figura 45. Valores observados e valores médios da temperatura dos animais ao longo do tempo (min.) em cada grupo experimental

A plotagem das temperaturas nos tempos 20, 30, 40, 50 e 60, referente à Figura 45 acima, foi construída segundo a experimentação mostrada nos Anexos 1 e 2.

3.2. Exames Histopatológicos (H&E)

O tumor de Walker 256 implantado no estômago de rato engloba todas as camadas, inclusive a mucosa, onde se observa área de necrose. Há também presença de intensa necrose na submucosa objeto do tratamento com 5FU + LEU associado à HT sobre o tumor na sua fase evolutiva inicial de 3 dias (Figuras 46 e 47).

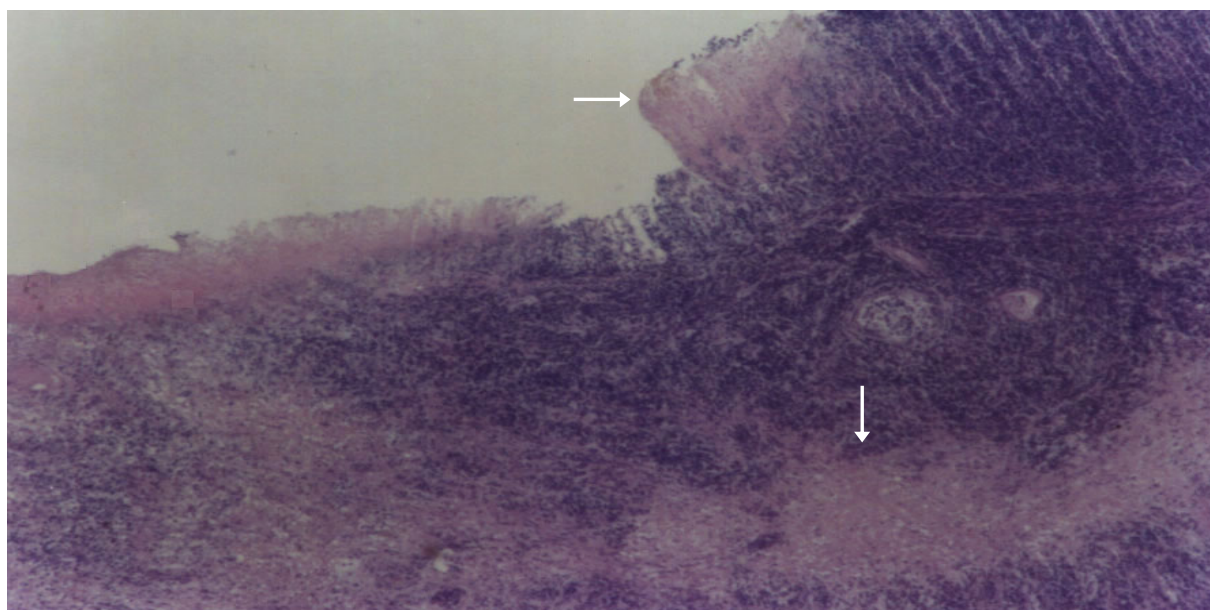


Figura 46. Tumor com necrose da mucosa e submucosa (setas). Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 3º dia (HE) 40X

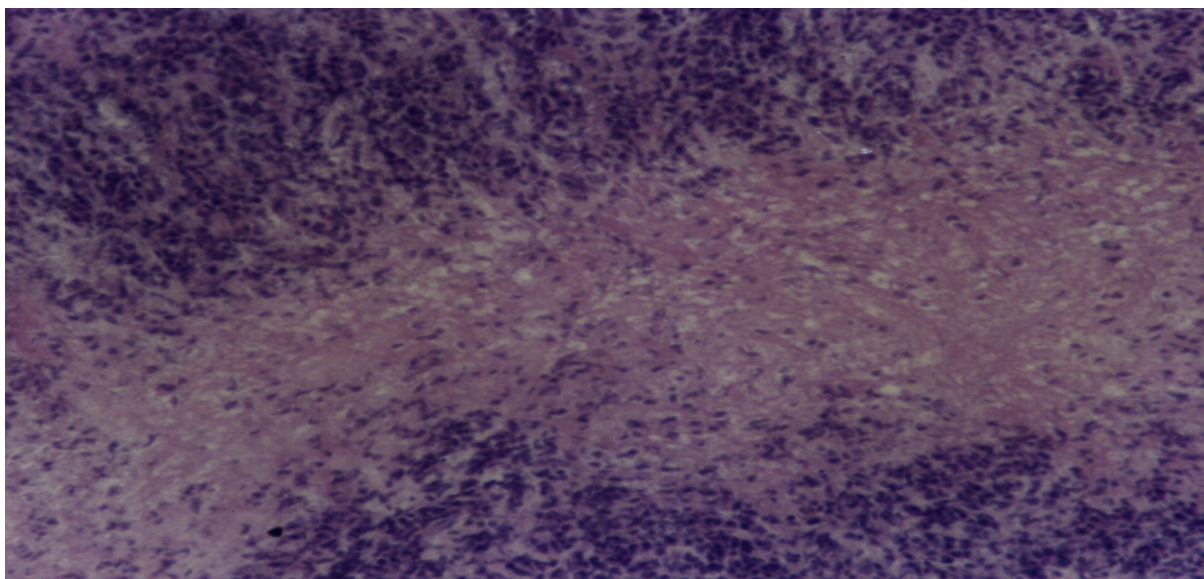


Figura 47. Tumor com necrose intensa. Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 3º dia (HE) 100X

Em outro animal, observa-se tumor residual com reação inflamatória e área de necrose na submucosa, quando o animal foi submetido a tratamento com 5FU + LEU associado à HT em tumor em fase evolutiva inicial de 3 dias (Figura 48).

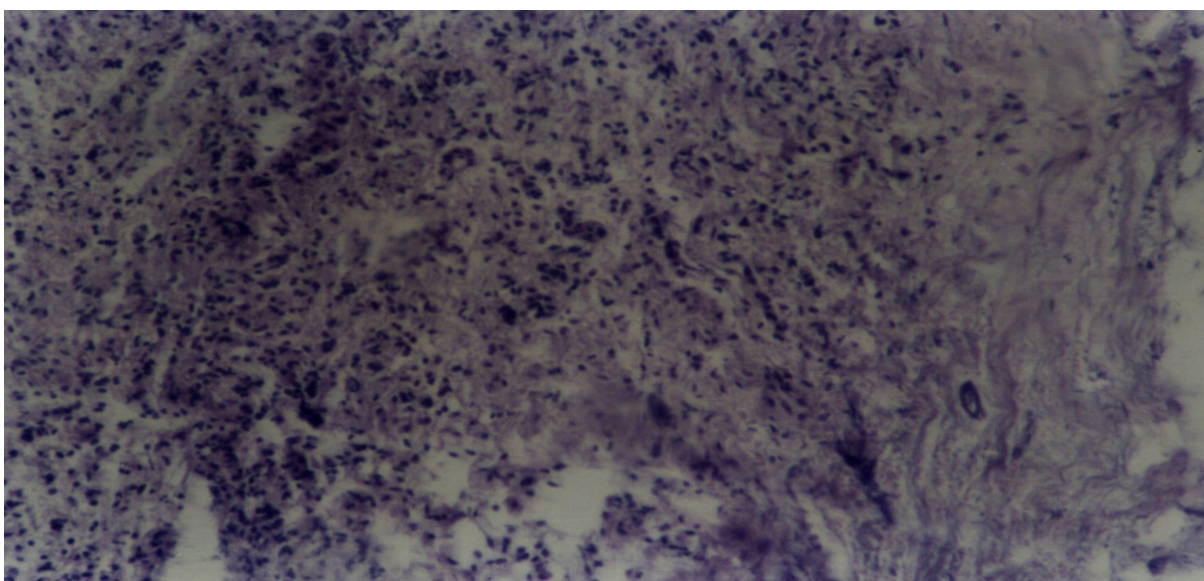


Figura 48. Tumor residual com reação inflamatória. Necrose na submucosa. Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 3º dia (resposta parcial) (HE) 100X

Pode-se observar bem a junção esôfago-gástrica (JEG) e o tumor invadindo a mucosa, submucosa e muscular gástricas, mesmo sob tratamento com 5FU + LEU associado à HT em tumor em fase evolutiva inicial de 3 dias (Figura 49).

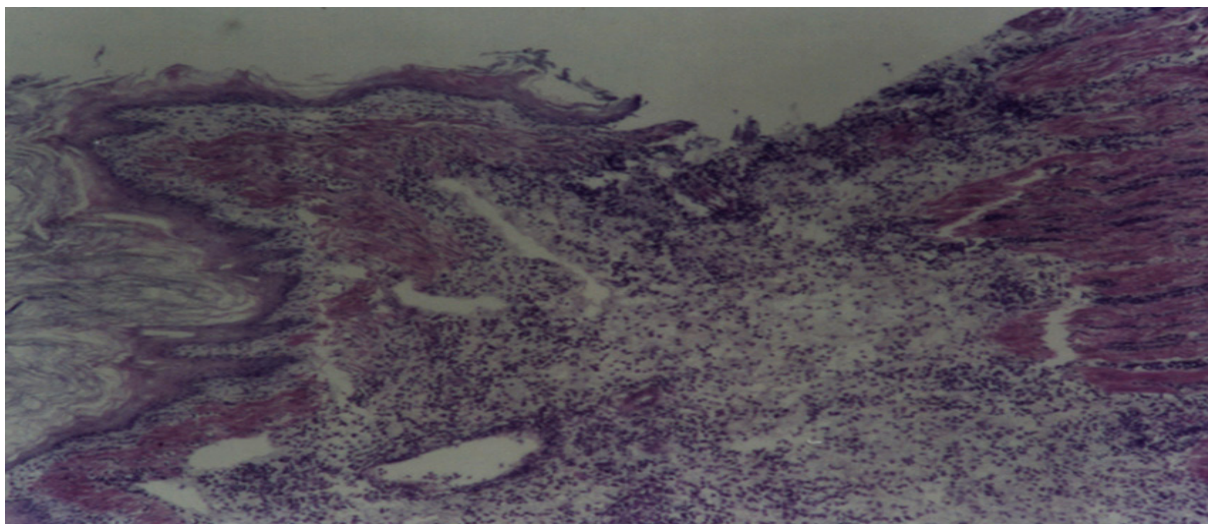


Figura 49. Tumor invadindo a mucosa, submucosa e muscular, se estendendo até a JEG. Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 3^o dia (não houve resposta) (HE) 40X

Num animal com tumor em fase evolutiva inicial de 3 dias, o tratamento com 5FU + LEU associado à HT obteve como resposta necrose da mucosa, submucosa e muscular (Figura 50).

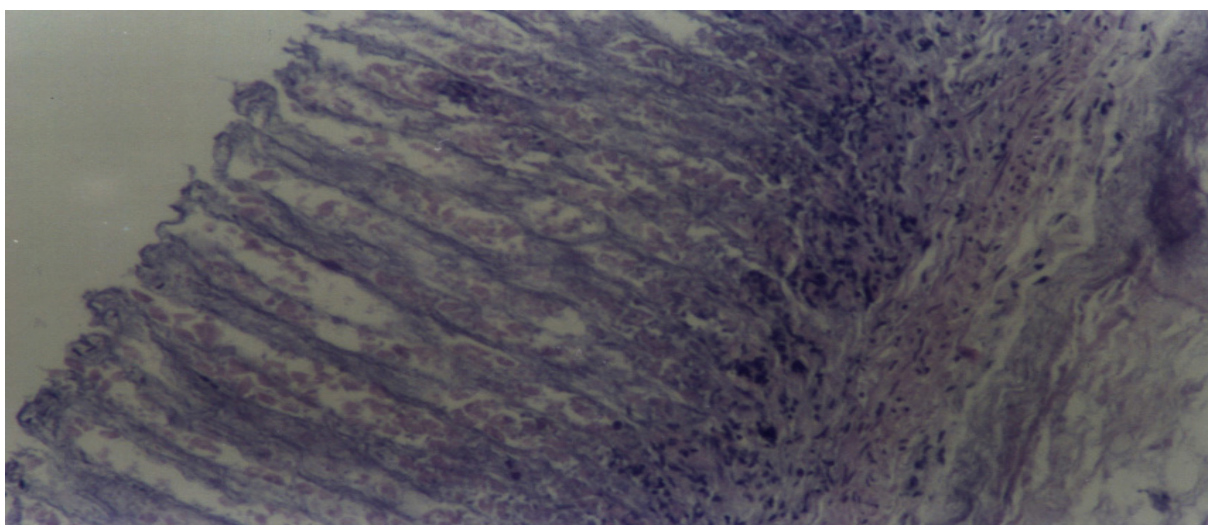


Figura 50. Necrose na mucosa, submucosa e muscular. Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 3^o dia (HE) 100X

Em situação semelhante à anterior, outro animal com tumor em fase evolutiva inicial de 3 dias, submetido a tratamento com 5FU + LEU associado à HT, exibe necrose da muscular própria e da submucosa (Figura 51).

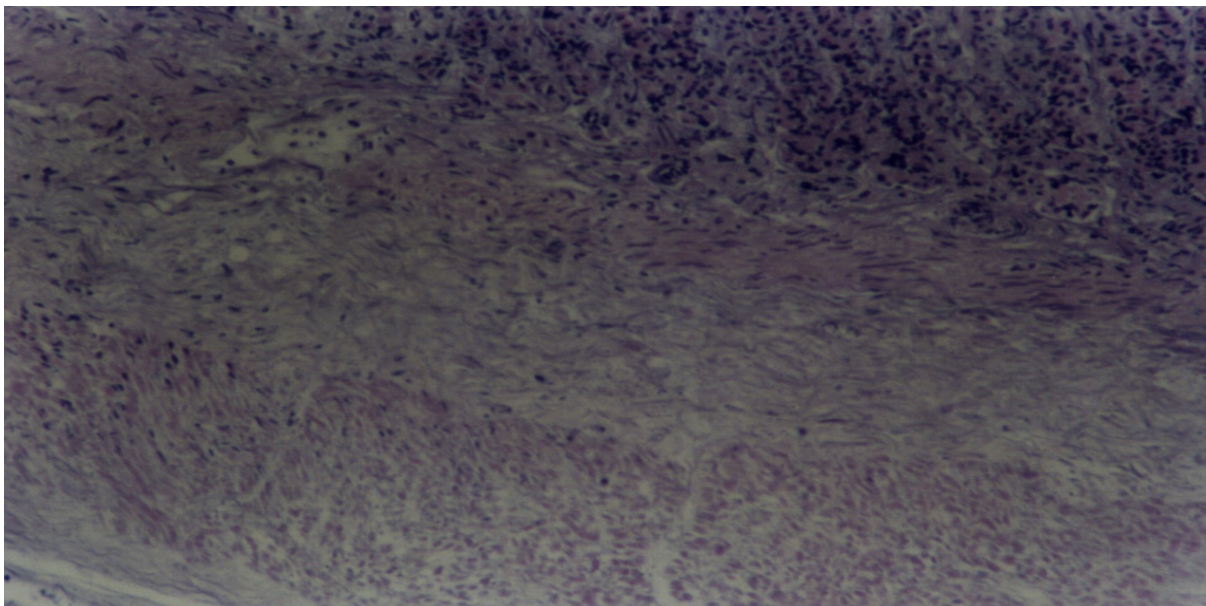


Figura 51. Tumor não visualizado. Necrose da muscular própria e da submucosa. Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 3º dia (resposta completa) (HE) 100X

Observa-se ainda uma situação inusitada, haja vista que o tumor de Walker 256, em fase evolutiva inicial de 3 dias e implantado em estômago de rato, manifesta-se com vaso repleto de êmbolos tumorais, a despeito do tratamento com 5FU + LEU associado à HT (Figura 52).

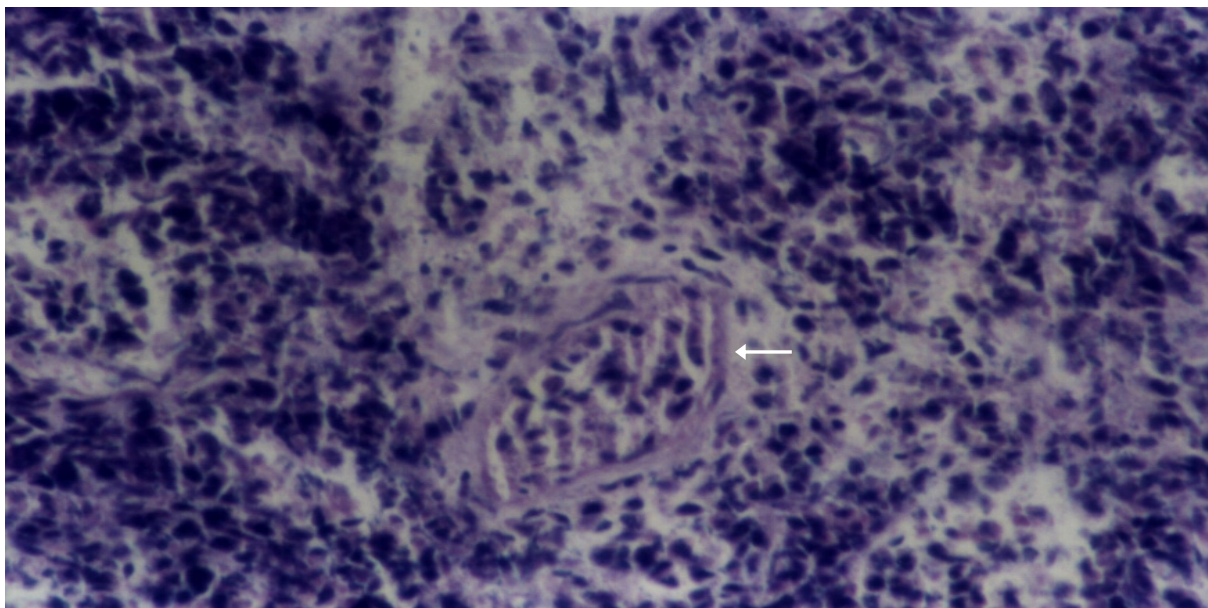


Figura 52. Vaso repleto de êmbolos tumorais (seta). Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 3º dia (HE) 200X

Tem-se também observado tumor em fase evolutiva inicial de 3 dias invadindo a submucosa (extensa necrose liquefativa), muscular e serosa, resultado do tratamento com 5FU + LEU associado à HT (Figura 53).

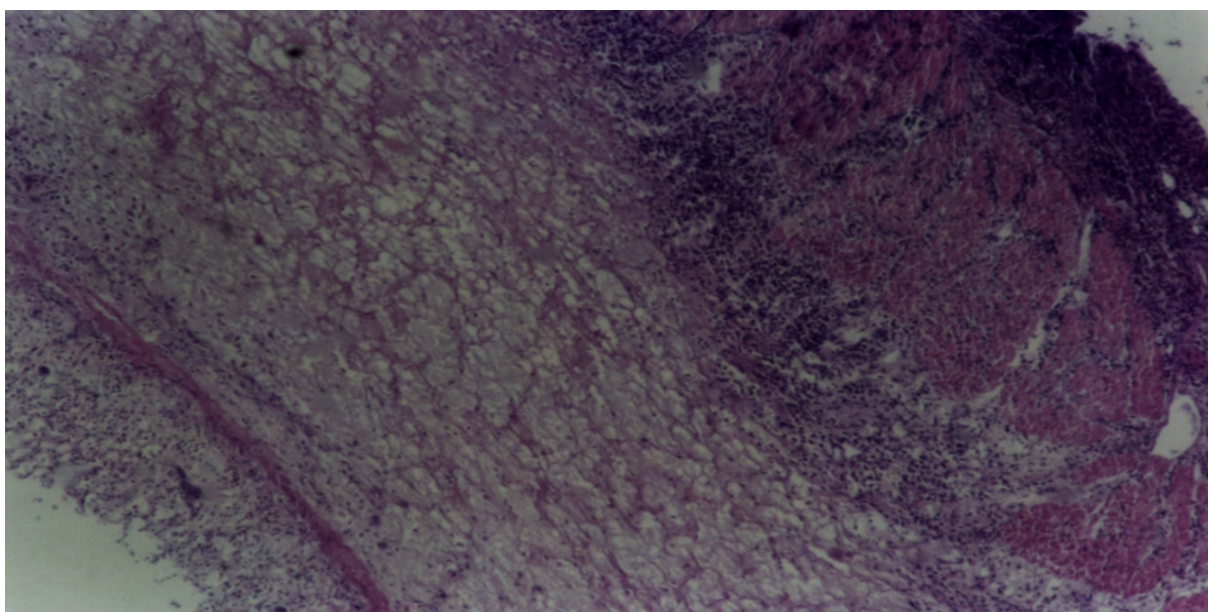


Figura 53. Tumor invadindo a submucosa (extensa necrose liquefativa), muscular e serosa. Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 3º dia (HE) 40X

Observa-se ainda que o tumor de Walker 256, em sua fase evolutiva inicial de 3 dias, invade a gordura e o músculo, mesmo com o tratamento de 5FU + LEU associado à HT (Figura 54).

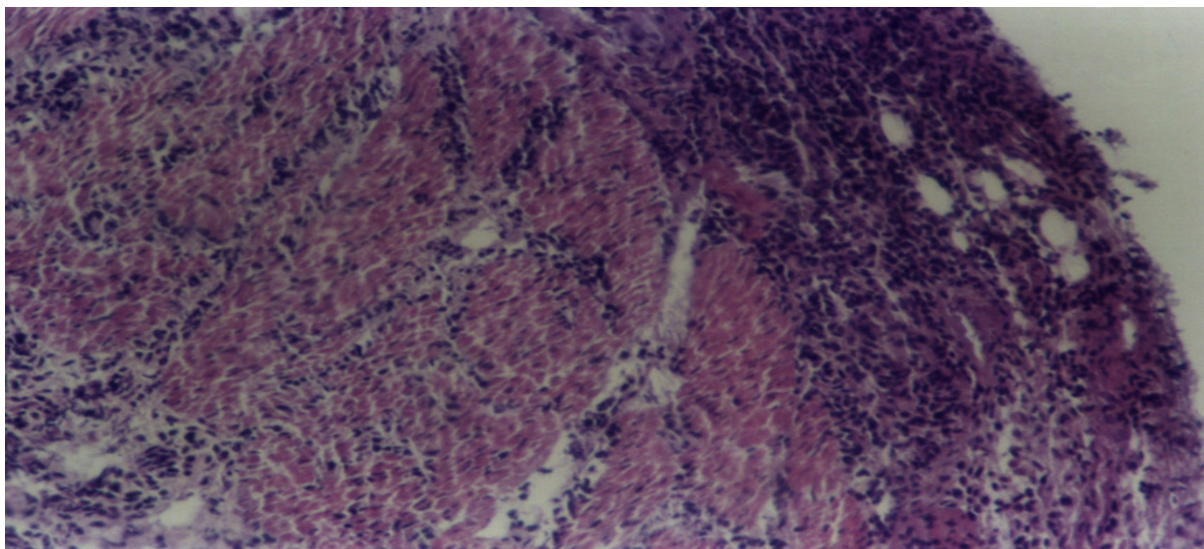


Figura 54. Tumor invadindo essencialmente a musculatura e o tecido adiposo. Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 3^o dia (HE) 100X

Evidencia-se intensa necrose do tumor, em fase evolutiva intermediária de 7 dias, sob tratamento com 5FU + LEU associado à HT (Figura 55).

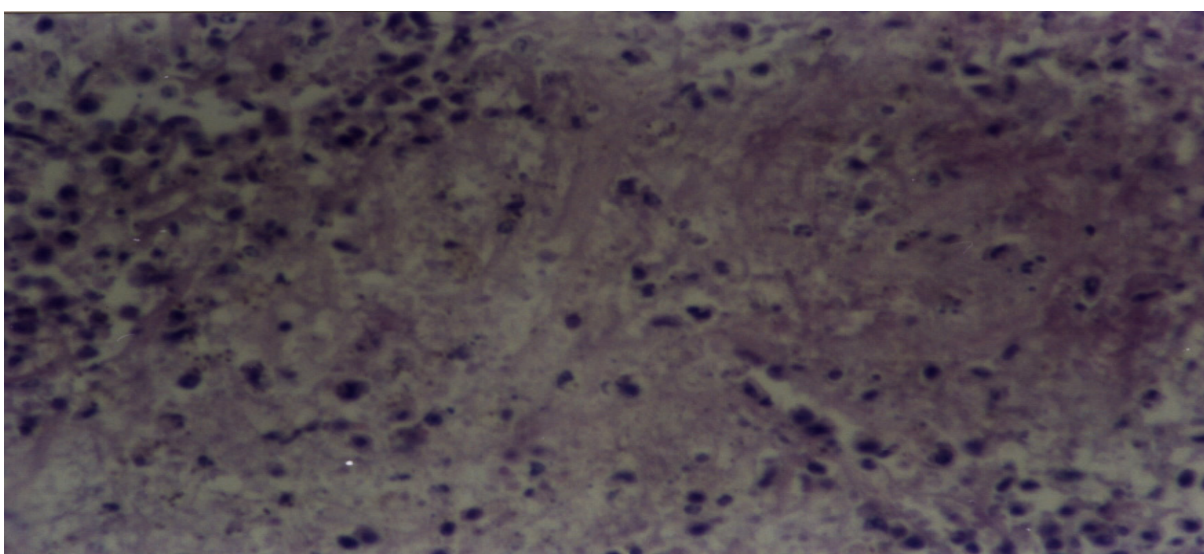


Figura 55. Tumor com intensa necrose. Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 7^o dia (HE) 200X

Percebe-se claramente fígado com células tumorais no espaço porta. Há também células tumorais na luz da veia porta. Tendo-se, inclusive, a visão do ducto biliar (Figura 56).

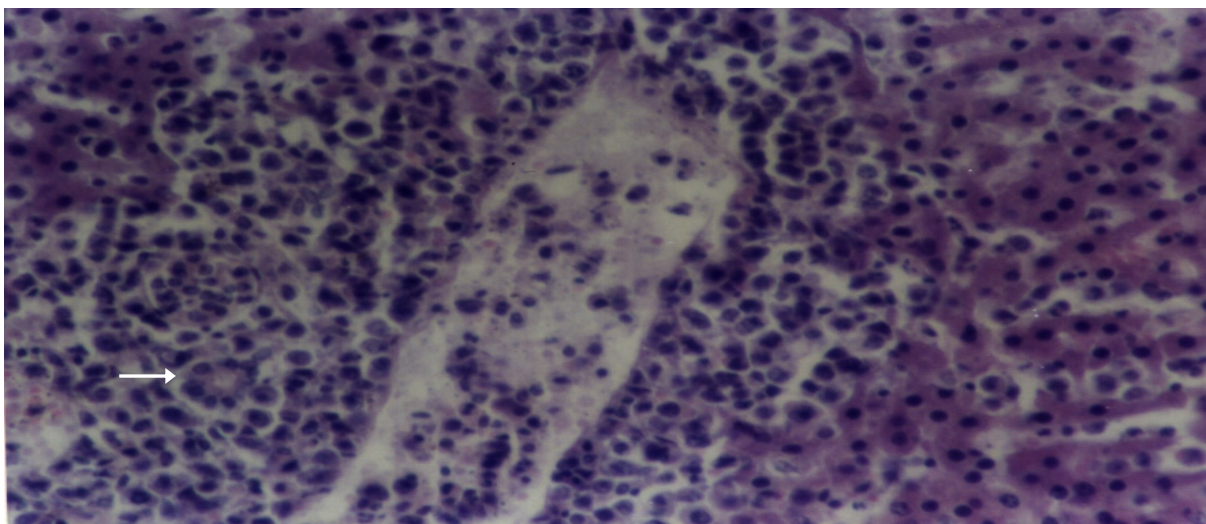


Figura 56. Células tumorais no espaço porta e na luz da veia porta. Visão ducto biliar (seta). Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 7^o dia (HE) 200X

Já se havia visto êmbolos tumorais em vasos com o tumor em fase evolutiva inicial de 3 dias, agora vêem-se êmbolos tumorais em vasos na submucosa com o tumor em fase evolutiva intermediária de 7 dias (Figura 57).

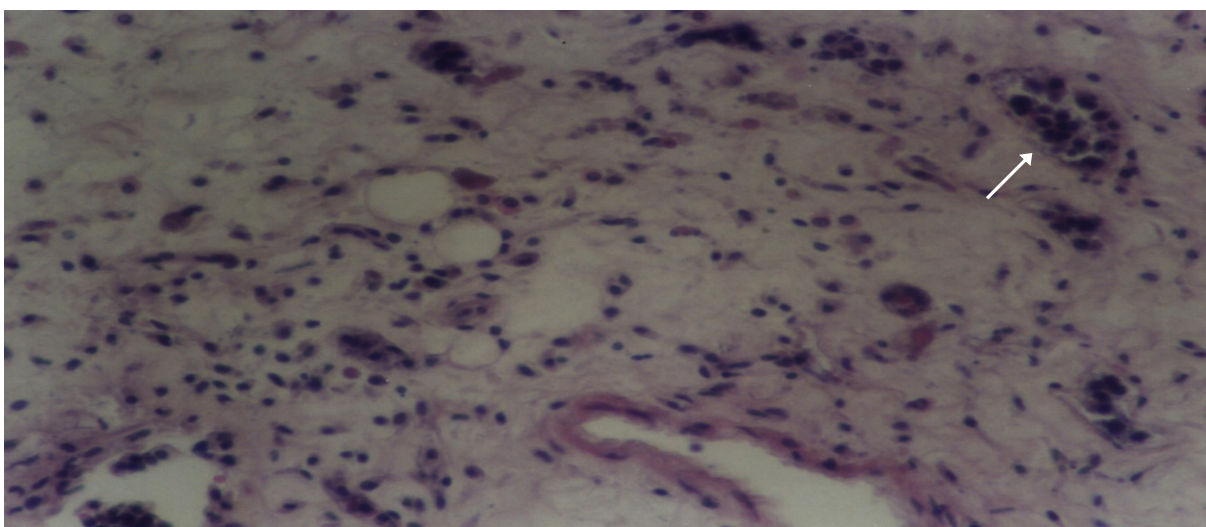


Figura 57. Êmbolos tumorais em vasos na submucosa (seta). Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 7^o dia (HE) 200X

Evidencia-se também reação inflamatória fibrosante na submucosa com o tumor em fase evolutiva intermediária de 7 dias sob tratamento com 5FU + LEU associado à HT (Figura 58).

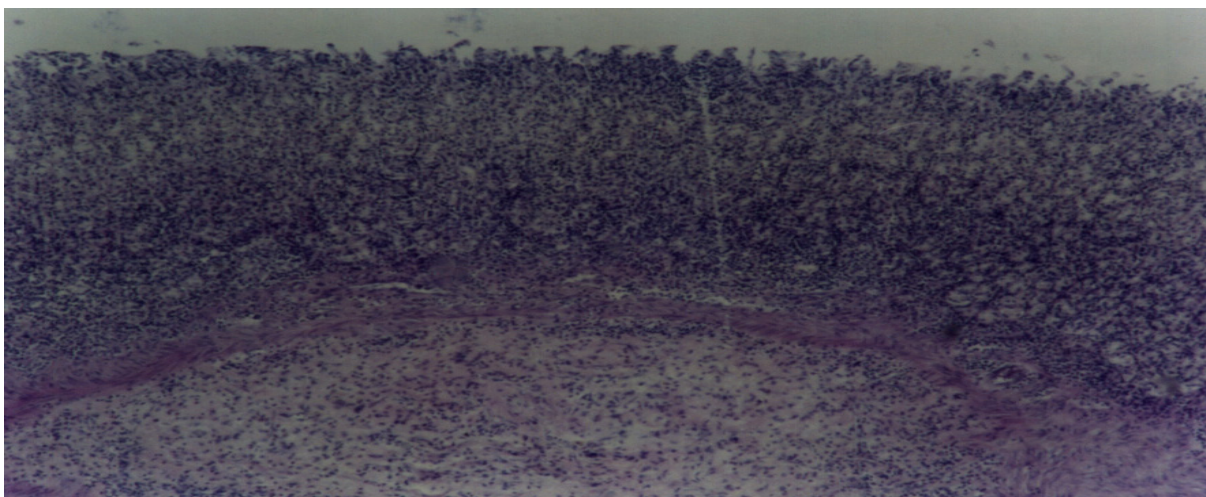


Figura 58. Reação inflamatória fibrosante da submucosa. Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 7^o dia (HE) 40X

No mesmo Grupo Experimental, evidencia-se linfócitos e exudato inflamatório com predomínio de linfócitos (cicatrização do conjuntivo) em tumor em fase evolutiva intermediária de 7 dias sob tratamento com 5FU + LEU associado à HT (Figura 59).

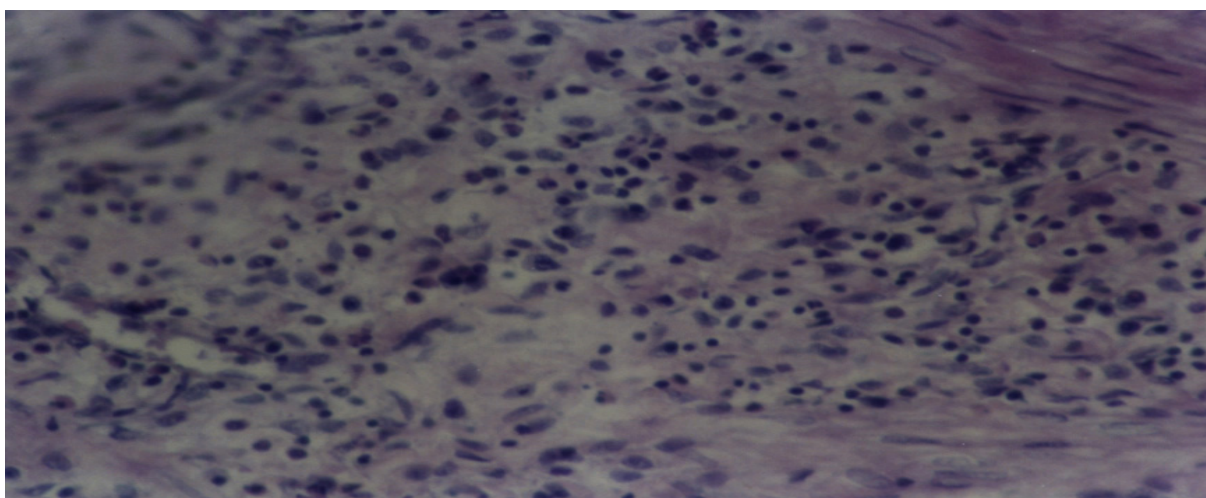


Figura 59. Exudato inflamatório com predomínio de linfócitos. Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 7^o dia (HE) 100X

Ainda no mesmo Grupo Experimental, há presença de macrófagos (pigmentos acastanhados) e linfócitos que falam a favor de inflamação crônica que evolui para cicatrização do conjuntivo em tumor em fase evolutiva intermediária de 7 dias sob tratamento com 5FU + LEU associado à HT (Figura 60).

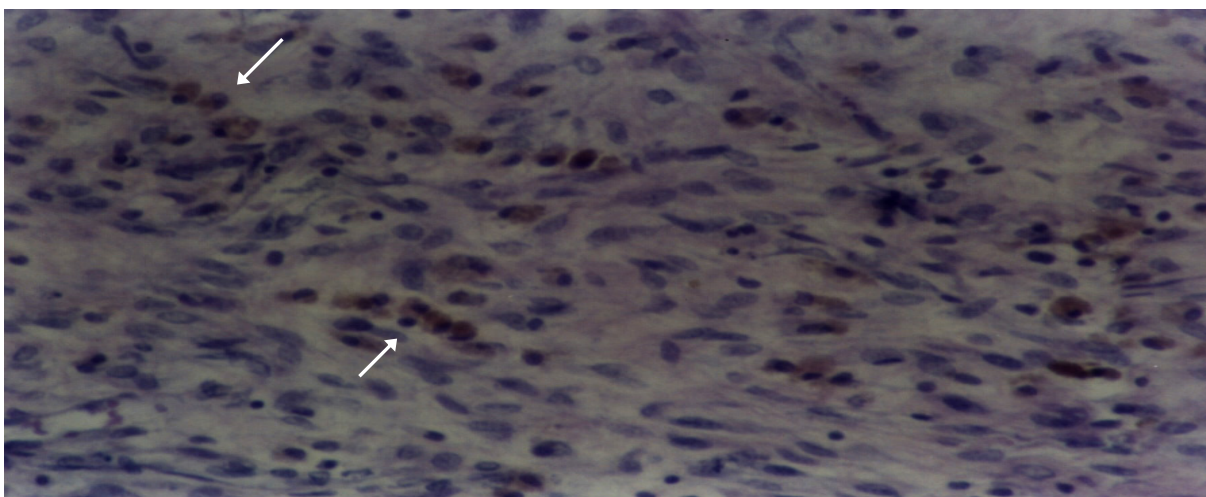


Figura 60. Presença de macrófagos (setas) e linfócitos. Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 7^o dia (resposta completa) (HE) 200X

Um animal com sobrevida de 95 dias apresentou área de necrose mínima em tumor em fase evolutiva avançada de 10 dias sob tratamento com 5FU + LEU associado à HT (Figura 61).

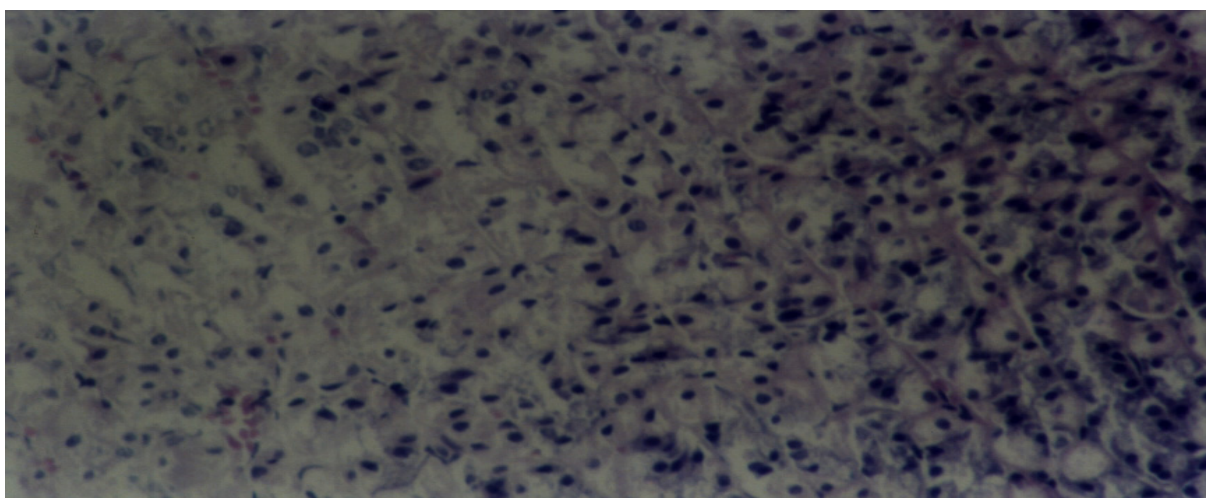


Figura 61. Necrose mínima da mucosa. Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 10^o dia (HE) 200X

Tumor em fase evolutiva avançada de 10 dias sob tratamento com 5FU + LEU apresenta intensa hemorragia (Figura 62).

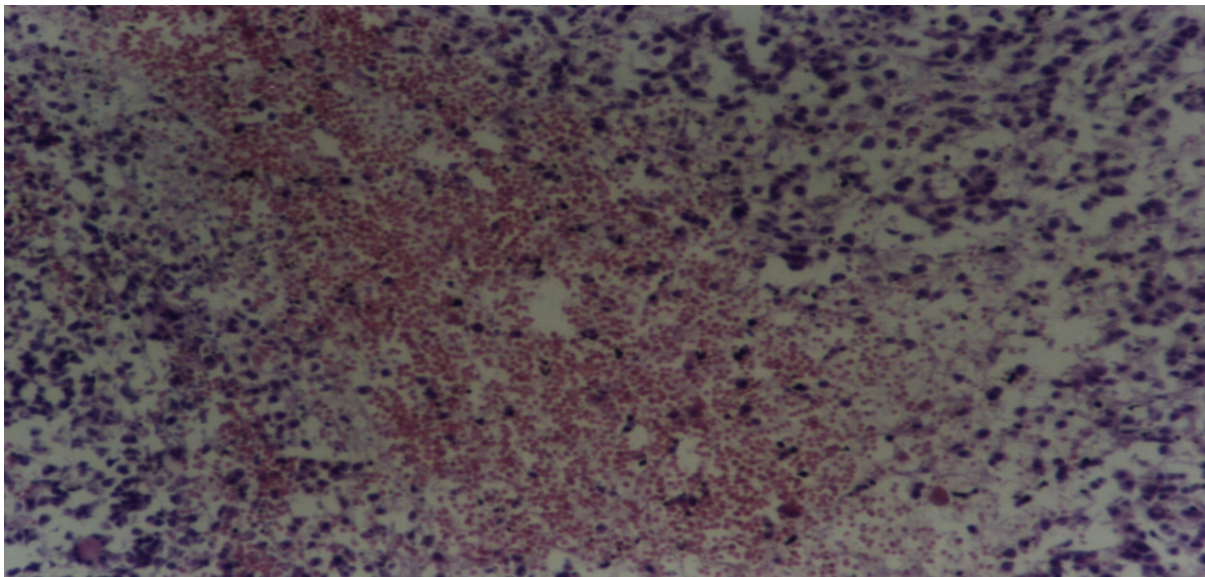


Figura 62. Tumor com bastante hemorragia. Tratamento com 5FU + LEU no 10^o dia (HE) 100X

Tumor em fase evolutiva avançada de 10 dias acomete, inclusive, a junção esôfago-gástrica, a despeito do tratamento com 5FU + LEU (Figura 63).

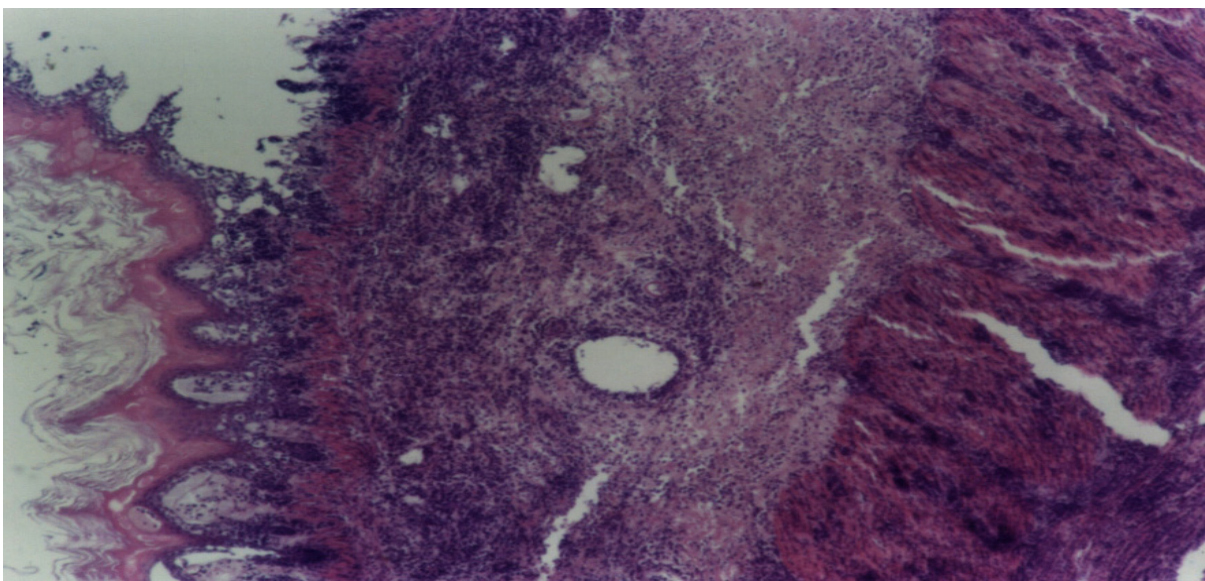


Figura 63. Presença de tumor na junção esôfago-gástrica. Tratamento com 5FU + LEU no 10^o dia (HE) 40X

Tumor em fase evolutiva avançada de 10 dias sob tratamento com 5-FU + LEU associado à HT não mais se evidencia na junção esôfago-gástrica, claramente normal após 95 dias de sobrevida (Figura 64).

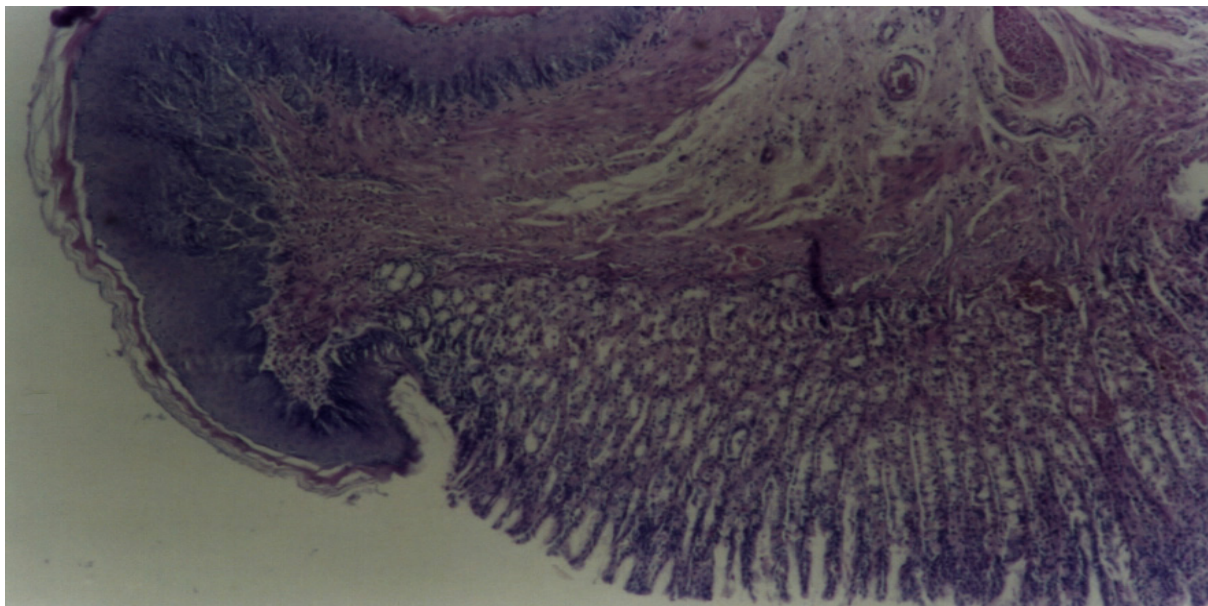


Figura 64. Junção esôfago-gástrica normal. Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 10^o dia (resposta completa) (HE) 40X

Tumor em fase evolutiva avançada de 10 dias sob tratamento com 5FU + LEU associado à HT evidencia capilar com células tumorais ao seu redor. Ao meio, observa-se artéria normal e veia cheia de êmbolos tumorais e com manguito perivascular de células tumorais ao seu redor (Figura 65).

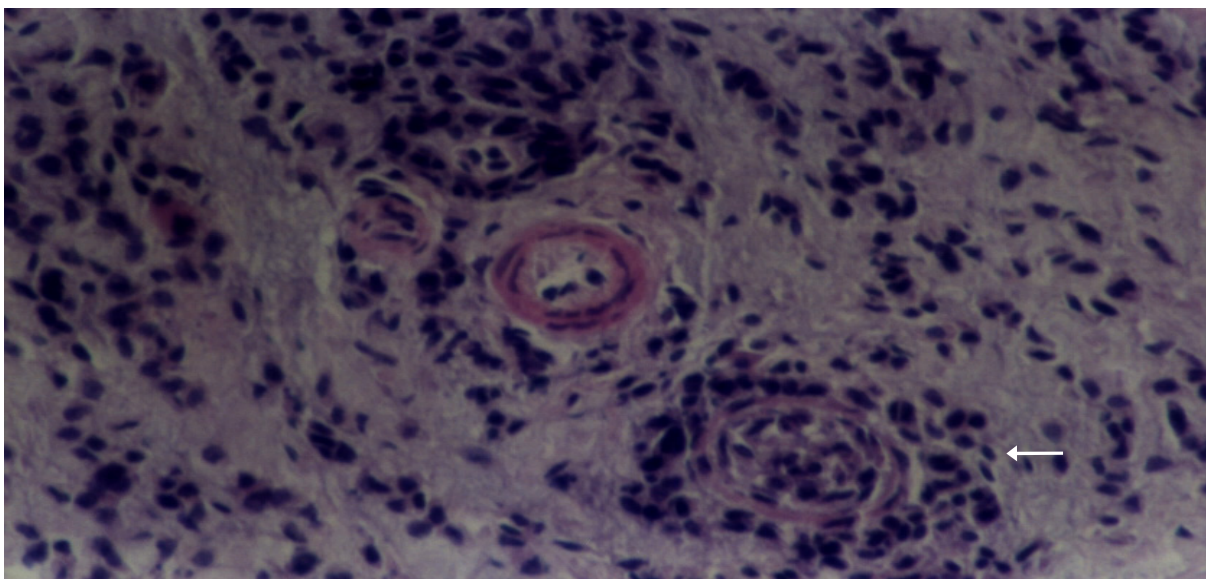


Figura 65. Veia (seta) com êmbolos tumorais. Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 10^o dia (HE) 200X

Num animal em fase evolutiva avançada de 10 dias sob tratamento com 5FU + LEU associado à HT evidencia-se tumor nas camadas mucosa, muscular da mucosa, submucosa e muscular, além de veia com êmbolos na submucosa (Figura 66).

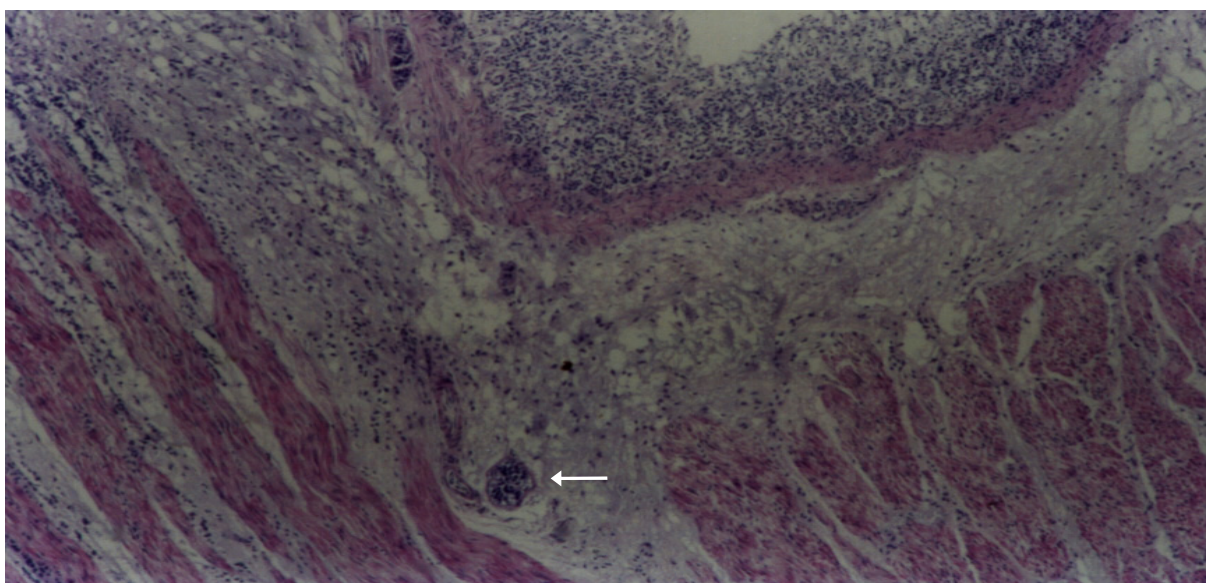


Figura 66. Tumor em todas as camadas. Veia com êmbolos na submucosa (seta). Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 10^o dia (HE) 40X

Numa visão mais nítida desse mesmo animal, observa-se grande quantidade de êmbolos tumorais na veia da submucosa (Figura 67).

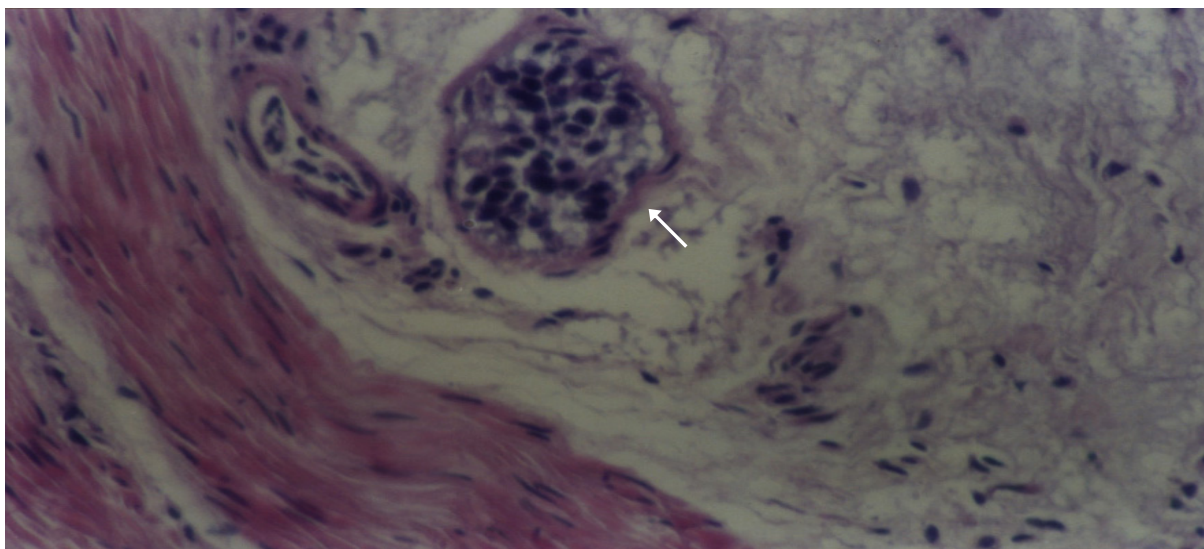


Figura 67. Êmbolo tumoral em veia da submucosa (seta). Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 10º dia (HE) 200X

Em outro animal com tumor em fase evolutiva avançada de 10 dias sob tratamento com 5FU + LEU associado à HT denota-se nitidamente intenso infiltrado tumoral perineural (Figura 68).

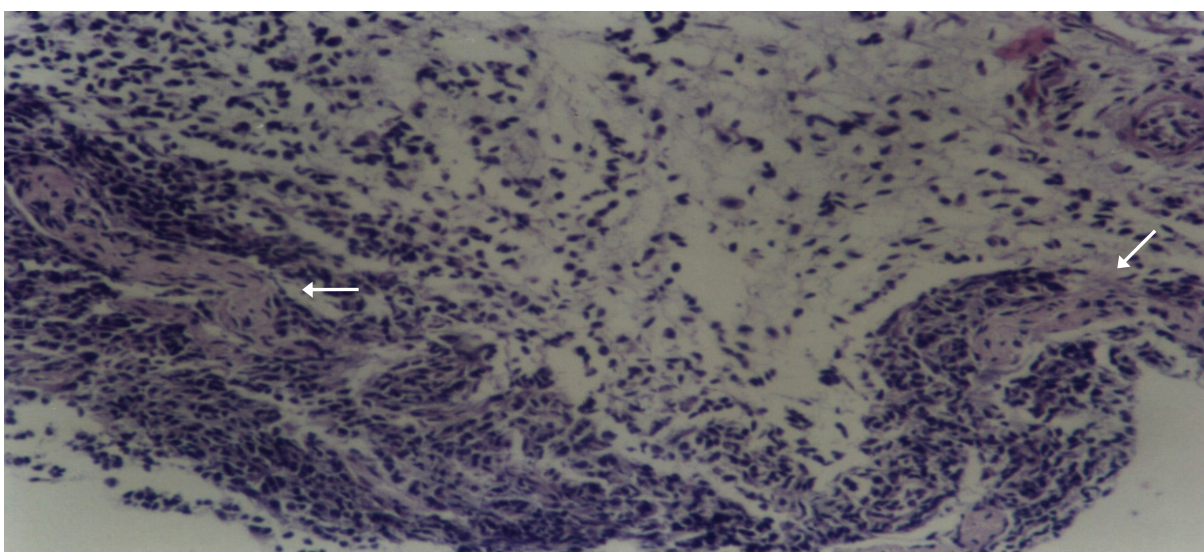


Figura 68. Infiltrado tumoral perineural (setas). Tratamento com 5FU + LEU associado à HT no 10º dia (HE) 100X

4. Progressão Tumoral

O carcinossarcoma de Walker 256, após o 7^o dia da implantação em estômagos de rato Wistar e sem tratamento, mostra-se como neoplasia indiferenciada, com células tumorais entre as glândulas, citoplasma claro e mal delimitado, núcleos volumosos de cromatina frouxa (vesiculosos) e nucléolo denso com halo mais claro ao seu redor (Figura 69).

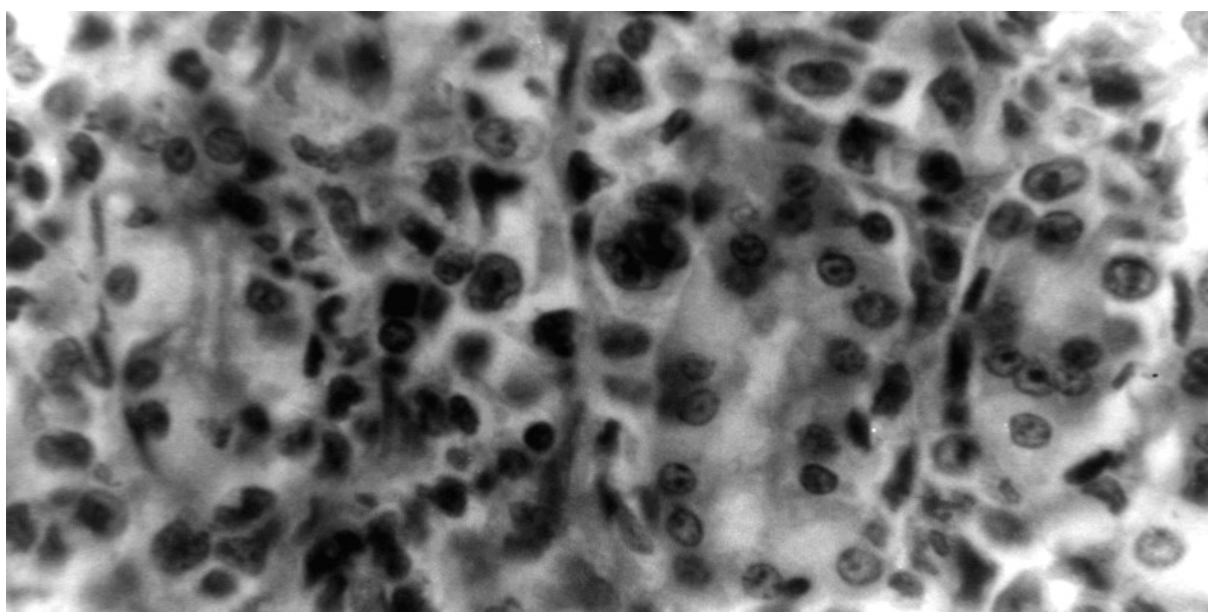


Figura 69. Tumor original mostra-se como neoplasia indiferenciada

Apresenta células indiferenciadas e pleomórficas (anisocitose e anisocariose), com grande relação núcleo-citoplasma (Figura 70).

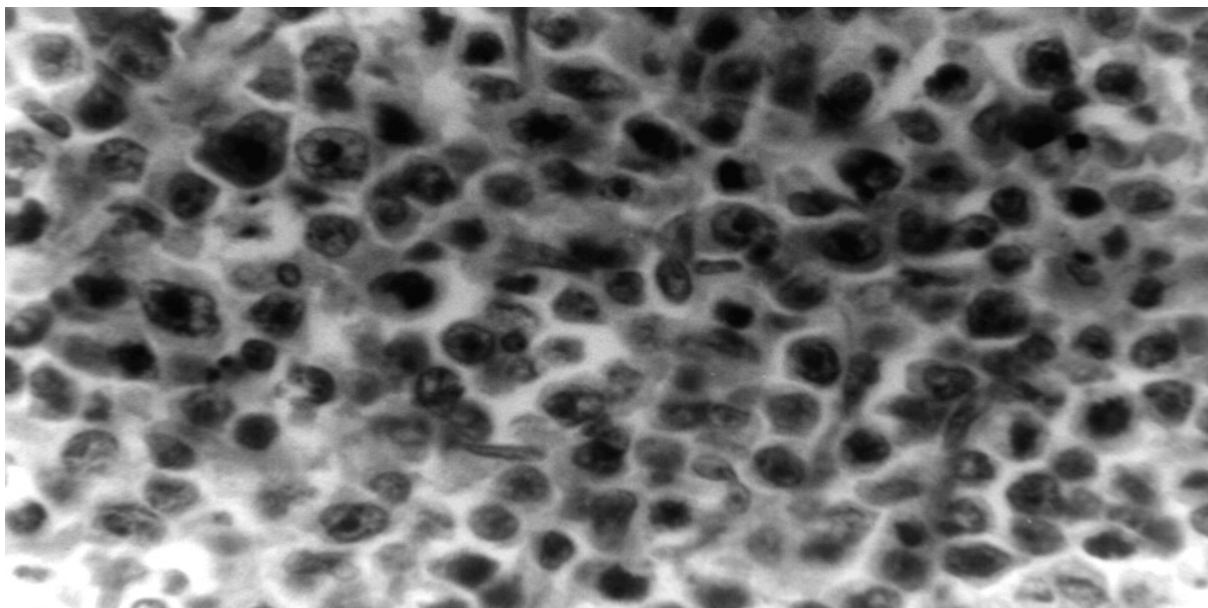


Figura 70. Tumor original apresenta células indiferenciadas e pleomórficas

Mostra-se como neoplasia de alto grau mitótico, observando-se três mitoses atípicas no campo (Figura 71).

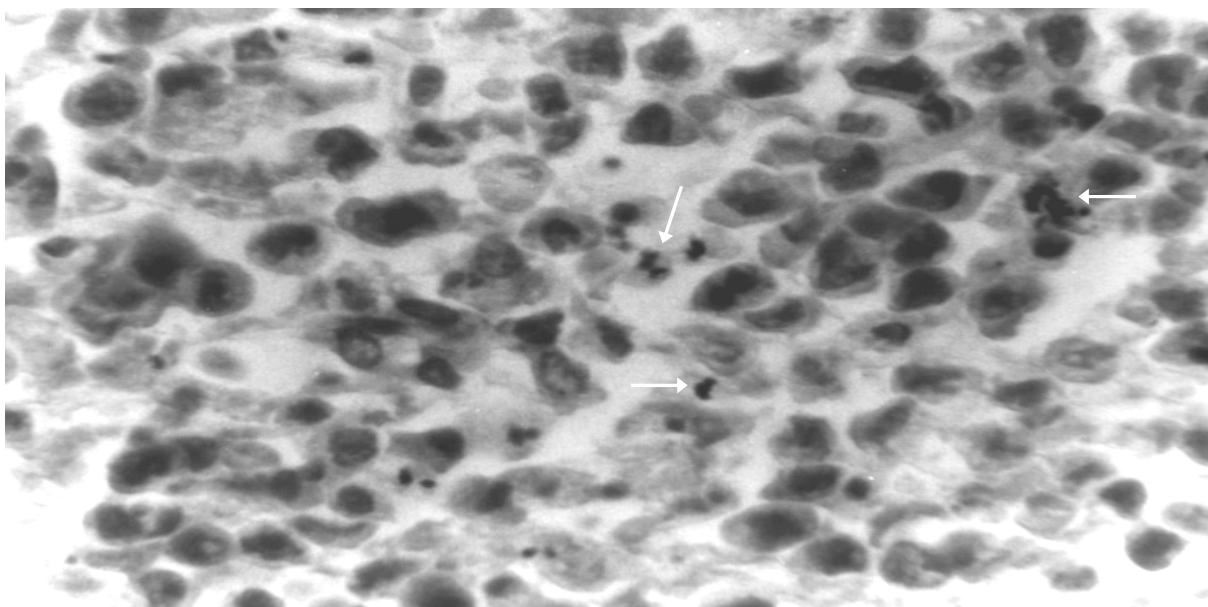


Figura 71. Tumor original mostra-se como neoplasia de alto grau mitótico (setas)

Apresenta picnose de poucas células, o que demonstra a necrose natural (Figura 72).

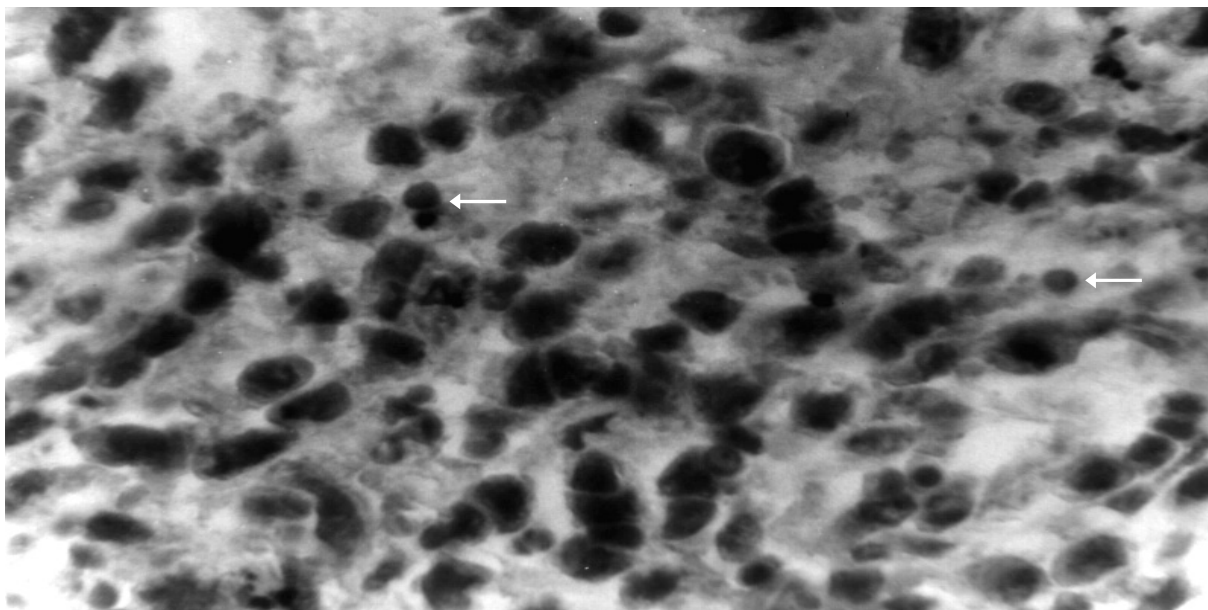


Figura 72. Tumor original apresenta células com picnose (setas)

Apresenta células em apoptose (Figura 73).

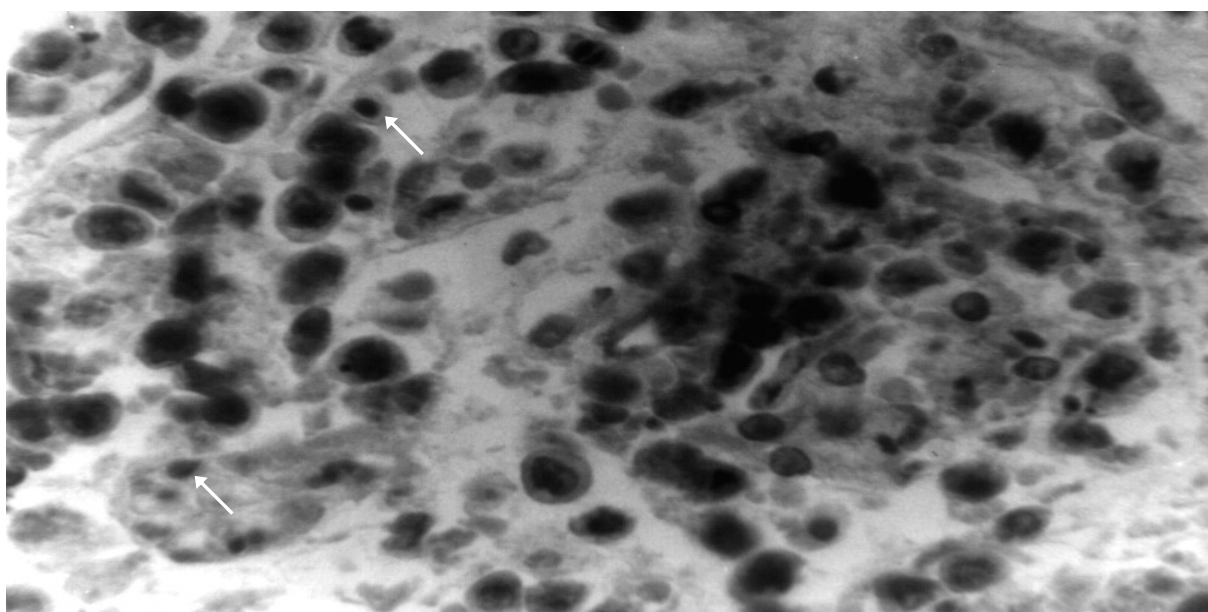


Figura 73. Tumor original apresenta células apoptóticas (setas)

Apresenta células pleomórficas, que se imiscuem entre as glândulas, indiferenciadas e com núcleos hipercromáticos (Figura 74).

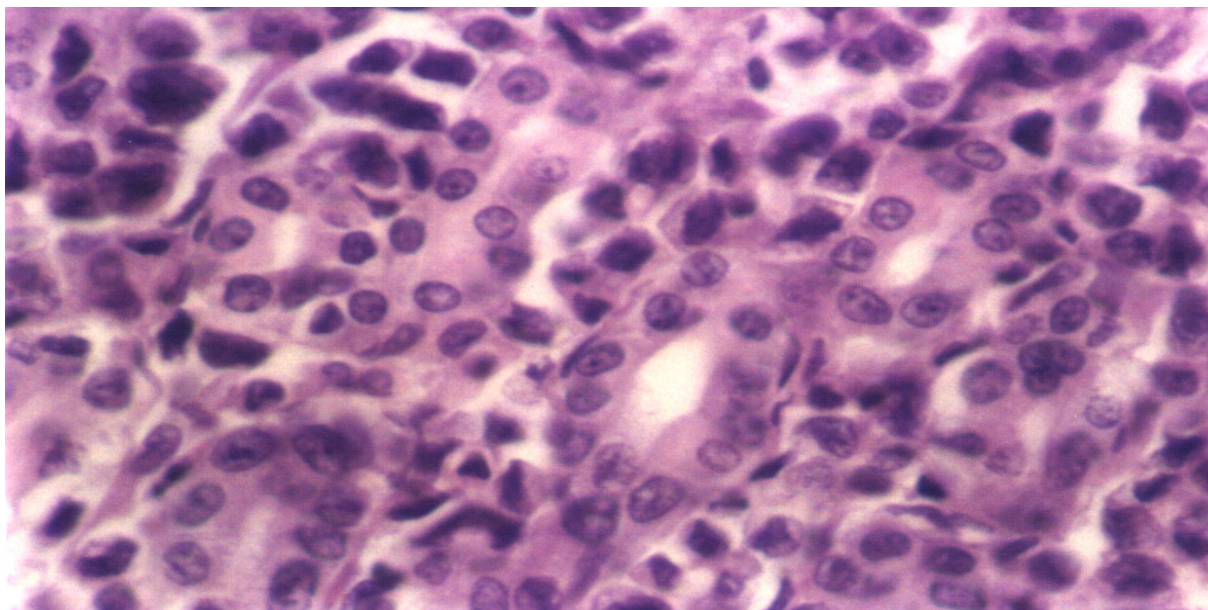


Figura 74. Tumor original apresenta células pleomórficas entre glândulas

Apresenta células pleomórficas e três mitoses atípicas (Figura 75).

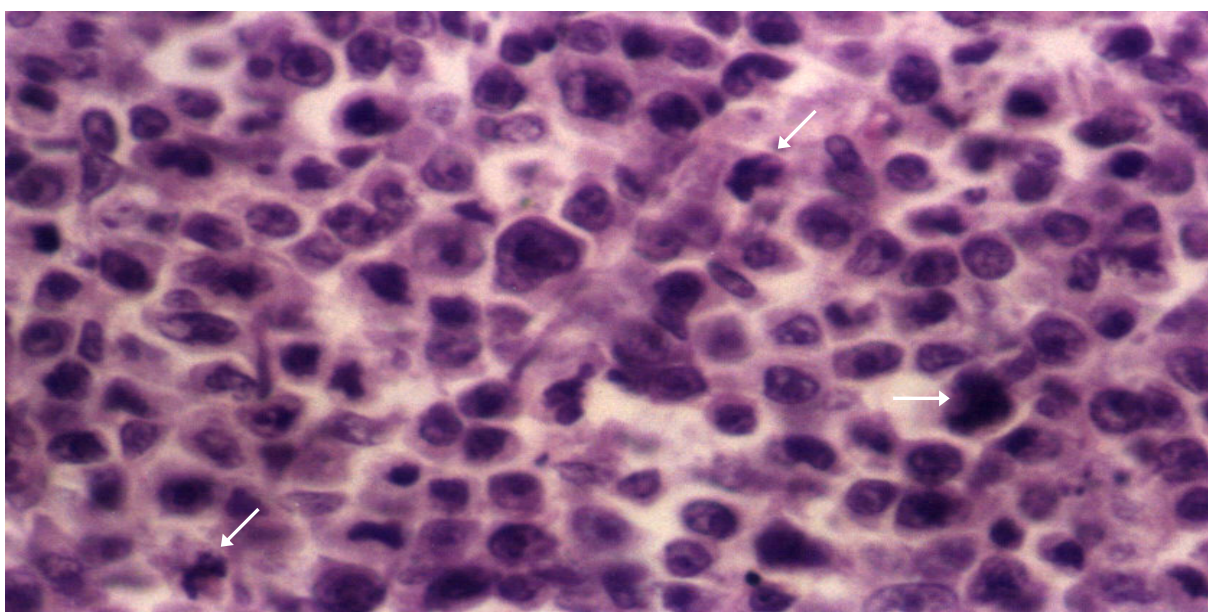


Figura 75. Tumor original apresenta células pleomórficas e três mitoses atípicas (setas)

Apresenta células de aspecto geral epitelióide, porém, com duas mitoses atípicas (Figura 76).

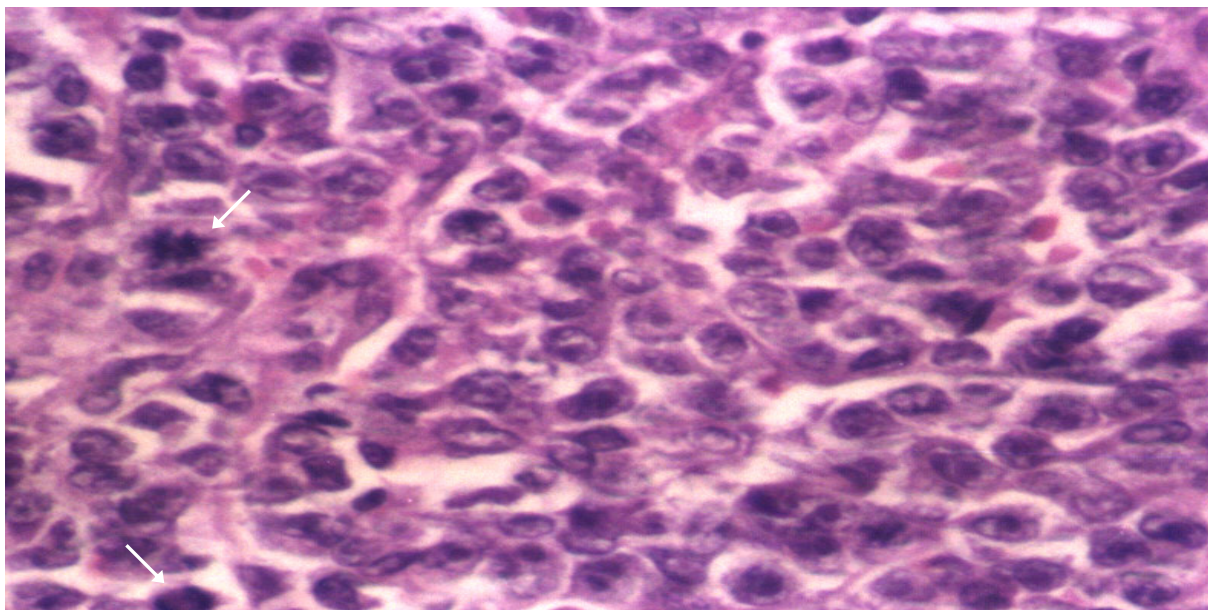


Figura 76. Tumor original apresenta células de aspecto epitelióide e duas mitoses atípicas (setas)

Apresenta células indiferenciadas que se imiscuem entre as glândulas (invasividade), de maneira generalizada (Figura 77).

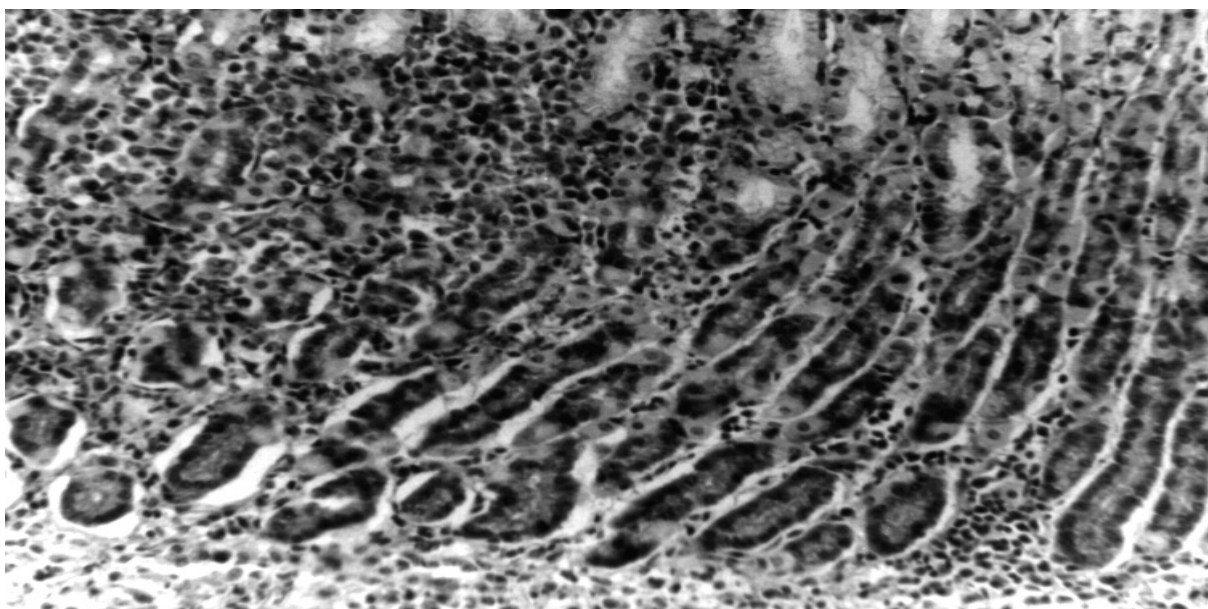


Figura 77. Tumor original apresenta células indiferenciadas entre glândulas

O tumor de Walker 256, originalmente implantado em estômagos de rato Wistar, mesmo sob tratamento com Fluorouracil (5-FU) na sua fase evolutiva avançada de 10 dias:

Apresenta invasão da mucosa, de forma bastante intensa, onde se evidencia edema (mucosite focal) (Figura 78).

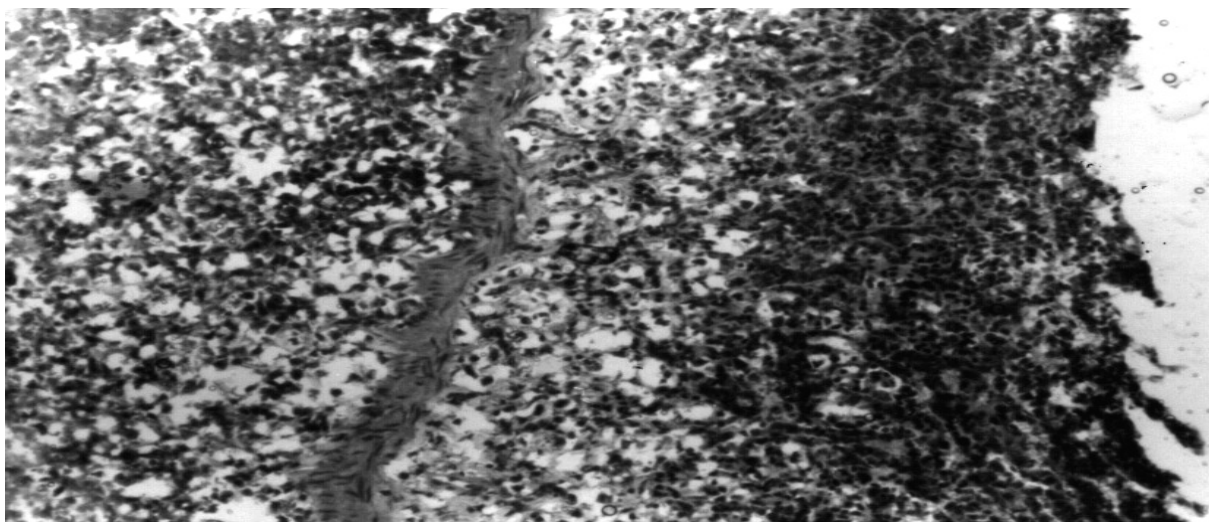


Figura 78. Tumor sob tratamento com 5-FU no 10^o dia apresenta invasão da mucosa, além de edema (mucosite focal)

Apresenta invasão da mucosa gástrica, destruindo-a (Figura 79).

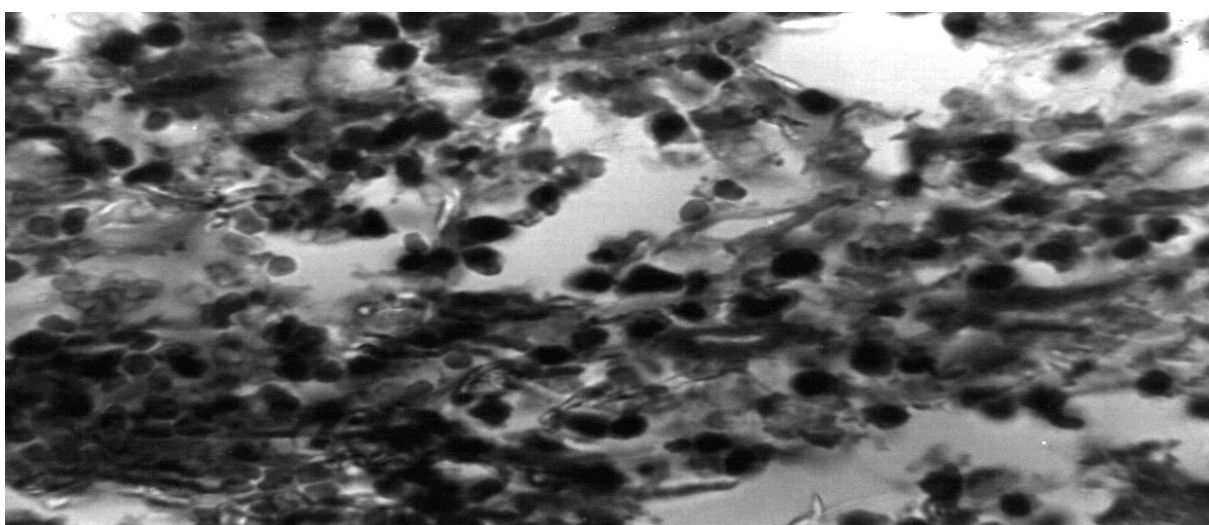


Figura 79. Tumor sob tratamento com 5-FU no 3^o dia apresenta invasão da mucosa gástrica, destruindo-a

O tumor de Walker 256, originalmente implantado em estômagos de ratos Wistar, sob tratamento com Paclitaxel (Taxol®) associado à hipertermia na sua fase evolutiva inicial de 3 dias, invade o pâncreas, apresentando células pleomórficas entre os ácinos (Figura 80).

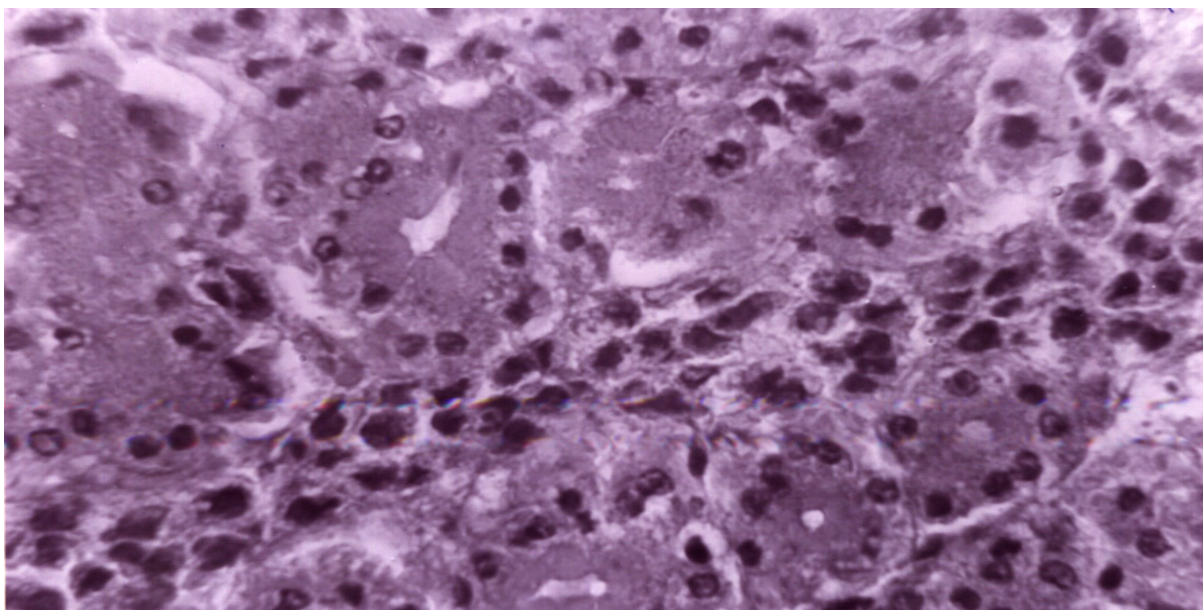


Figura 80. Tumor sob tratamento com Taxol® + HT no 3º dia apresenta invasão pancreática, além de células pleomórficas nos ácinos

Como podemos ver na figura abaixo, o cariótipo normal de um rato, neste caso proveniente de células fibroblásticas, possui 42 cromossomos.

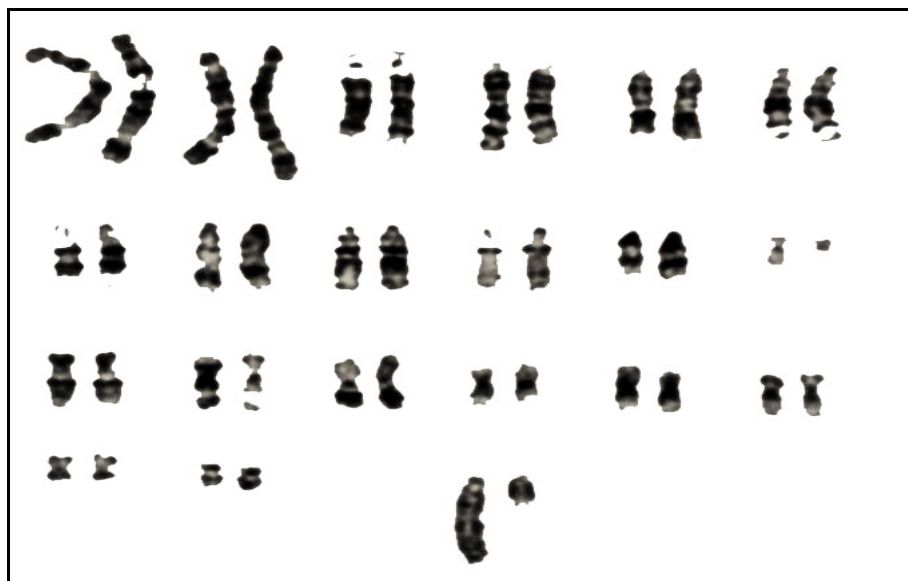


Figura 81. Cariótipo normal de rato (fibroblastos) com 42 cromossomos

Fonte: “*Tumour Progression: in vitro and in vivo investigations of “spontaneously” transformed rat cell lines*”. Manoel Odorico de Moraes (Tese de Doutorado).

Pode-se observar que o cariótipo do tumor de Walker 256, neste experimento, apresenta, no mínimo, alteração autossômica, o que denota alteração no número de cromossomos, pois, em várias observações ($n = 10$), manifestou-se diminuição do número de cromossomos, alguns com 36, 37, outros com 38 ou 39 cromossomos (Figura 82). A contagem de cromossomos foi realizada pela análise visual quantitativa

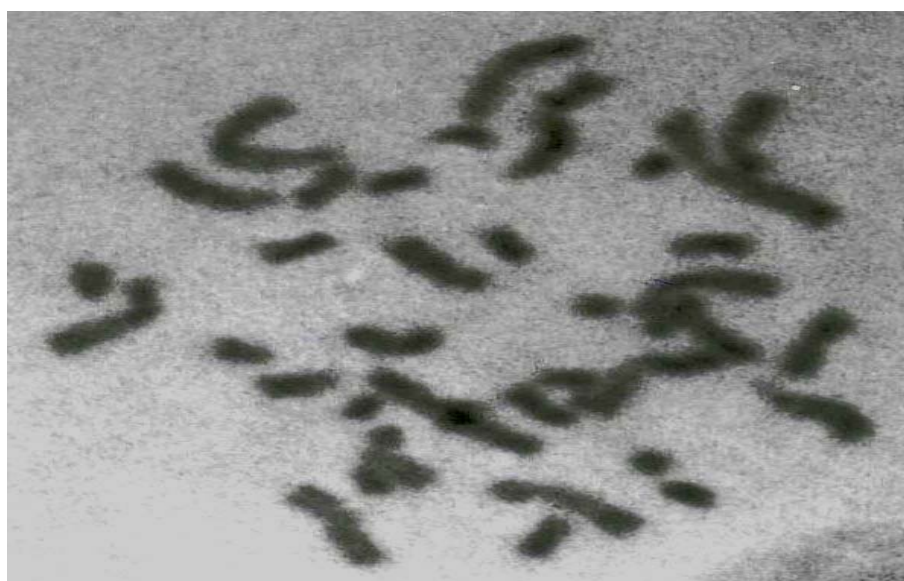


Figura 82. Cariótipo de célula tumoral (Walker 256) com 37 cromossomos

DISCUSSÃO

1. Tratamento com Paclitaxel (Taxol®)

Os Grupos Experimentais Taxol, isolados ou associados à hipertermia nos 3^o, 7^o e 10^o dias, apresentam curvas de sobrevivência mais elevadas, com significância estatística ($p < 0,0001$ – Teste Log-Rank) em relação ao Grupo Controle.

Quando se compara o grupo de 3 dias com Taxol isolado com aquele associado à hipertermia neste mesmo período, constata-se que não houve significância estatística entre eles. O mesmo ocorrendo ao se comparar o grupo de 10 dias com Taxol isolado com aquele associado à hipertermia neste mesmo período. Todavia, quando se compara o grupo de 7 dias com Paclitaxel (Taxol®) isolado com aquele associado à hipertermia, neste mesmo período, constata-se que houve significância estatística ($p < 0,01$ – Teste Log-Rank) entre eles.

Como se pode inferir, a droga isolada Taxol tem similarmente o mesmo efeito que aquela associada à hipertermia quando o tumor está na fase inicial de 3 dias e quando em sua fase avançada de 10 dias. O mesmo já não pode ser dito quando o tumor encontra-se em sua fase intermediária de 7 dias, pois, neste momento, a associação Taxol e hipertermia mostrou ser melhor que o Taxol isolado ($p < 0,01$ – Teste Log-Rank).

Neste trabalho, utiliza-se o Taxol duas horas antes do tratamento hipertérmico, com tempo suficiente para o mesmo iniciar sua ação. Já é sabido que o mecanismo de ação do Taxol está em estabilizar os microtúbulos durante a mitose, por mudar a dinâmica de equilíbrio em direção à reunião de microtúbulos (Schiff *et al.*, 1979; Schiff & Horwitz, 1980; Manfredi & Horwitz, 1984; Wallin *et al.*, 1986). Já a hipertermia *mild* (41 a 42°C), por sua vez, resulta na desorganização do sistema de microtúbulos (Knox *et al.*, 1991). A hipertermia usada neste trabalho é a do tipo *mild*, cuja média de temperatura é de 41,8°C

(Robins *et al.*, 1993; Oliveira, 1997). Ora, se o Taxol atua sobre os microtúbulos, e a hipertermia também, não se pode esperar portanto um sinergismo efetivo, uma vez que, no momento em que a hipertermia inicia sua ação, o Taxol já teria atuado sobre os microtúbulos, não podendo assim a hipertermia ter sua ação efetiva e esperada. Outra hipótese seria quando a hipertermia passasse a agir sobre os microtúbulos, estes já estariam estabilizados pela ação do Taxol, e nestas circunstâncias, a hipertermia não os reconheceria como tal, daí, não teria a ação efetiva e esperada, uma vez que apresentaria mínima ação de sinergismo sobre o tumor na sua fase intermediária de 7 dias, onde a hipertermia associada ao Taxol mostrou significância estatística ($p < 0,01$ – Teste Log-Rank).

Tem-se demonstrado a ação do Taxol sobre o tumor carcinossarcoma de Walker 256 em inibir e determinar mudanças e locomoção, um efeito que pode estar relacionado à invasividade e ao potencial metastático do tumor (Keller & Zimmermann, 1986).

A ação do Taxol associado à hipertermia em adenocarcinoma humano de mama MCF-7 *in vitro* demonstrou que a hipertermia inibiu a citotoxicidade do Taxol relacionada com os efeitos sobre o ciclo celular, ou seja, a hipertermia pode retardar, ou parar, a progressão de células tratadas com Taxol, através e fora da fase S dentro de G2/M (Leal *et al.*, 1999).

Os resultados obtidos em todos os estudos executados em adenocarcinoma mamário murino, onde foi utilizada hipertermia associada à quimioterapia com Taxol e epirrubicina, puderam demonstrar que a combinação Taxol e hipertermia é altamente efetiva, com um superaditivo efeito usando 45 mg/kg de Taxol quando comparado a 30 mg/kg. Um superaditivo efeito foi obtido combinando Taxol na dose de 45 mg/kg e epirrubicina 9 mg/kg associado à hipertermia. Não obstante, os resultados finais sugeriram que é possível usar Taxol associado à hipertermia como protocolo para resposta de tumor local, enquanto

epirrubicina poderia ser acrescentado no sentido de se atingir um melhor controle sistêmico (Cividalli *et al.*, 2000).

Neste contexto, utiliza-se o tumor carcinossarcoma de Walker 256, implantado não simplesmente na musculatura esquelética, como se manifesta histopatologicamente sua predileção, mas também satisfatoriamente em musculatura glandular, como no caso em discussão, mais precisamente nos estômagos de rato Wistar. Sob condições de hipertermia associada à quimioterapia, neste caso o Taxol, ou simplesmente com Taxol isolado, obteve-se resposta terapêutica satisfatória (parcial) do tumor em sua fase inicial de 3 dias e no estágio avançado de 10 dias com o uso isolado do Taxol. Já o tumor implantado no estômago, em seu estágio intermediário de 7 dias, responde satisfatoriamente melhor à associação quimioterápica de Taxol e hipertermia do que simplesmente ao uso de Taxol isolado.

Como se pode ver, há divergências de tratamento em experimentos *in vitro* e *in vivo*, e para uma elucidação completa e satisfatória, ter-se-ia um bom conhecimento da fisiologia do tumor, da sua microcirculação, do pH, e a hipoxia que poderia influenciar na interação entre a hipertermia e as diferentes drogas.

Portanto, torna-se difícil determinar se a hipertermia e/ou drogas citotóxicas, frente à morte celular, são fatores independentes, ou se estes reforçam a resposta tumoral.

Numa série de dois ratos com 108 dias de sobrevida (estatisticamente censurados), os quais apresentavam o tumor em ninhos (Figura 17) como resposta terapêutica parcial ao tratamento quimioterápico com Taxol associado à hipertermia em tumor em fase evolutiva inicial de 3 dias. Observa-se ainda bastante hemorragia em função da hipertermia.

Tem-se observado que o tumor ora invade a gordura (tecido adiposo), e as células aí presentes são poligonais, tomando aspecto de tumor epitelió-

de. Refere-se aqui a células submetidas a tratamento quimioterápico com Taxol associado à hipertermia em tumor em fase evolutiva inicial de 3 dias (Figura 15). Não se observa, no entanto, hemorragia em função da hipertermia.

Observa-se nesta fase evolutiva inicial de 3 dias que o tumor submetido ao tratamento quimioterápico com Taxol associado à hipertermia apresenta corpos apoptóticos (Figura 16).

Evidencia-se tumor na submucosa, com células circunjacentes ao vaso (Figura 13) e linfócitos próximos ao vaso, o que denota reação imunológica. Os linfócitos T citolíticos fornecem efetiva imunidade anti-tumoral *in vivo*, como demonstrado por estudos de transplante de tumor experimental. De fato, os linfócitos T citolíticos medeiam a rejeição de tumores transplantados, sendo este apenas um exemplo de imunidade anti-tumoral específica *in vivo* (Abbas *et al.*, 1994).

No caso aqui em discussão, além da reação imunológica, há também reação inflamatória (Figura 13).

Numa série de quatro ratos com 1 ano, 3 meses e 5 dias (estatisticamente censurados), onde, ao serem sacrificados, eis que três deles não mais apresentaram o tumor após tratamento quimioterápico com Taxol associado à hipertermia, demonstrando assim resposta terapêutica completa (cura), ou seja, completamente curados, uma vez que todos os tumores inoculados nos estômagos de rato se implantam (Fonteles *et al.*, 1979; Moraes Filho *et al.*, 1980). Em contrapartida, apenas um dos ratos apresentou resposta terapêutica parcial, apesar da sobrevida de 1 ano, 3 meses e 5 dias, com tumor em pequenos agrupamentos em meio à extensa hemorragia (Figura 18). Hemorragia esta que é quase uma constante quando se faz o tratamento com hipertermia. É bem verdade que neste caso o tumor encontra-se em fase avançada de 10 dias, estatisticamente censurado, com mais de 1 ano de sobrevida e com células tumorais em fase sucessiva de degeneração, provavelmente apresentando necrose e/ou apoptose.

Em série de ratos submetidos a tratamento quimioterápico com Taxol associado à hipertermia em tumor em fase evolutiva inicial de 3 dias, o mesmo se implanta nitidamente na submucosa, aqui preservando a mucosa, a qual se apresenta claramente separada da submucosa pela muscular da mucosa (Figura 19). As células tumorais são do tipo poligonal (carcinoma), mas, à luz da imunohistoquímica, resultaram vimentina positiva (sarcoma e/ou tumor de pequenas células) (Alves et al., 2002).

O tumor de Walker 256 implantado em estômagos de ratos em suas várias etapas de evolução nos 3^o, 7^o e 10^o dias sofreu variação morfológica para a variante sarcomatosa de pequenas células, o que está bem caracterizado ao exame de imunohistoquímico pelo método ABC e pode ser melhor evidenciado através das Figuras 33 e 35. Isto também foi observado por outros pesquisadores (Alves et al., 2002).

Um grupo de ratos submetidos a tratamento quimioterápico com Taxol associado à hipertermia apresentou extensas áreas de necrose decorrentes da quimioterapia e da hipertermia, e extensas áreas de hemorragia decorrentes da hipertermia apenas, uma vez que, com o tratamento somente quimioterápico, não se observa hemorragia (Figura 12).

O tumor carcinosarcoma de Walker 256 mostra, na sua grande maioria, tropismo muscular e preservação da mucosa gástrica. Não obstante, pode-se observar que o tumor se apropria de toda a espessura da parede gástrica, inclusive com áreas de necrose na mucosa, decorrentes do tumor e/ou do tratamento quimioterápico com Taxol associado à hipertermia em tumor em fase evolutiva inicial de 3 dias (Figura 11).

Em série experimental submetida a tratamento quimioterápico com Taxol isolado em tumor em fase evolutiva avançada de 10 dias, observa-se infiltração na submucosa e na muscular, até atingir a serosa, com presença de células

fusiformes (sarcoma e/ou tumor de pequenas células) e ausência de sangramento (Figura 10).

O tumor carcinossarcoma de Walker 256 tem alta virulência e a sobrevivência sem tratamento tem sido baixa ($13,25 \pm 0,53$) quando inocula-se 1 ml em estômagos de rato com 1 milhão (10^6) de células. Todavia, sob tratamento quimioterápico com Taxol associado à hipertermia em tumor em fase evolutiva inicial de 3 dias, não ocorre metástase à distância, mas sim, invasão pancreática por contigüidade, onde o tumor entremeia-se entre ácinos (Figura 14).

Em algumas séries experimentais, o tumor submetido a tratamento quimioterápico com Taxol® associado à hipertermia se apresenta epitelióide, mesmo que a imunohistoquímica seja vimentina positiva, invade o tecido adiposo, o que demonstra a agressividade do tumor, notadamente em tumores de pequenas células, como neste caso, e apresenta poucas áreas necróticas, mas exhibe a presença de corpos apoptóticos (Figura 16).

Na sua maioria, o tumor de Walker 256 acomete completamente a submucosa e a muscular, atingindo inclusive a serosa, às vezes preservando a mucosa (Figura 19). Evidencia-se então como sarcoma, ou mesmo como tumor de pequenas células, uma vez que apresenta vimentina positiva em 100% das células.

Os experimentos, na sua quase totalidade, quando da realização do tratamento quimioterápico com Taxol, isolado ou associado à hipertermia, manifestaram expressão sarcomatosa plena ou tumor de pequenas células (vimentina positiva em 100%). Não obstante, em alguns grupos, a associação Taxol e hipertermia atenuou a expressão sarcomatosa, marcando a vimentina em apenas 40% das células (Figura 21), o que pode ser devido a um possível efeito da hipertermia sobre receptores antigênicos do tumor, alterando-os ou destruindo-os em algumas células de alguns grupos estudados, pois, ao se realizar o tratamento

quimioterápico deste tumores apenas com Taxol, esta atenuação da vimentina não se manifesta.

Atualmente, já está bem estabelecido que a morte de células normais e/ou tumorais por apoptose é uma grande resposta à praticamente todas as modalidades de terapia do câncer, incluindo radioterapia, quimioterapia, imunoterapia, hipertermoterapia, ablação hormonal, fotodinamicoterapia, e mais recentemente, geneterapia (Stephens & Meyn, 2001). Neste trabalho, demonstra-se tanto a ação do quimioterápico (Paclitaxel (Taxol®)), como da hipertermia, evidenciando bem a apoptose, pois denotam-se corpos apoptóticos (Figura 16).

A morfologia *in vivo* da apoptose é sempre a mesma, independente de espécie, célula ou tipo de tecido, ou se ocorre em tecido normal ou se tumoral. O seu aparecimento não é influenciado por causa, que inclui a apoptose associada a processos fisiológicos ou condições patológicas, e responde a modalidades terapêuticas incluindo drogas, radiação ionizante, hipertermia e terapia gênica. Os corpos apoptóticos espontâneos ou induzidos por radiação são histologicamente os mesmos em todos os tecidos normais, tendo-se estudado inclusive glândulas serosas, timo, intestino e glândula mamária. Quanto aos tumores, a preocupação é o conhecimento de sua morfologia, sendo a apoptose induzida a mesma em carcinomas, linfomas e sarcomas em humanos e animais (Stephens & Meyn, 2001).

Dessa maneira, tem-se evidenciado que o Taxol também é citotóxico sobre células de carcinoma gástrico não-cíclicas em fase G_0/G_1 e pode induzir morte celular apoptótica (Chang *et al.*, 1996) em tumor humano. No entanto, também evidenciou-se apoptose em tumor experimental em fase evolutiva inicial de 3 dias implantado no estômago de rato sob efeito do Taxol associado à hipertermia (Figura 16). O que leva-se a acreditar que o Taxol, como agente quimioterápico, é capaz de levar à apoptose, assim como o sinergismo quimioterápico (Taxol®) associado à hipertermia também leva à apoptose.

2. Tratamento com 5-Fluorouracil (5-FU)

O tumor de Walker 256, implantado em estômagos de rato Wistar, em sua fase evolutiva inicial de 3 dias e sob tratamento quimioterápico com 5-FU somente, causa necrose extensa do tecido, mas de maneira coagulativa, ou seja, uma necrose isquêmica, onde as células necrosadas apresentam, além de alterações nucleares, citoplasma com aspecto de substância coagulada (Pereira, 1994), preservando, portanto, sua forma e arquitetura, onde as células e seus núcleos se mostram como sombras (Figura 26).

Numa fase precoce de implante do tumor com apenas 3 dias de evolução, as células tumorais entremeiam-se às glândulas na mucosa gástrica, destruindo-as (Figura 27), mostrando assim o poder de virulência e invasividade do carcinossarcoma de Walker 256.

O tumor de Walker 256, implantado em estômagos de rato Wistar, em sua fase evolutiva intermediária de 7 dias e sob tratamento quimioterápico com 5-FU somente, mostra-se, ao exame histopatológico por HE, como células poligonais (epiteliais) ou fusiformes (mesenquimais), fazendo com que se pense tratar-se de um carcinossarcoma. No entanto, ao exame imunohistoquímico, revelou tratar-se de um sarcoma e/ou tumor de pequenas células, uma vez que fora 100% positivo para vimentina (Figura 33) e 100% negativo para queratina (Figura 34).

Este tumor apresenta ainda extensa área de necrose, onde a lise celular é de pronto evidente (Figura 29) e encontram-se poucas células, diferentemente da necrose coagulativa (Figura 26), o que demonstra uma melhor ação do quimioterápico nesta fase evolutiva, embora estes resultados não tenham mostrado significância estatística quando se compara quimioterapia associada à hipertermia com quimioterapia isolada.

O mesmo tumor também se comporta de maneira agressiva e invasiva, vez que já infiltra o pâncreas, apesar da pouca necrose. No entanto, tal ação

não é considerada como uma metástase, mas sim como uma infiltração por contigüidade, pois o pâncreas é um órgão contíguo ao estômago, local onde o tumor foi originalmente implantado (Figura 30).

Ao se estudar o carcinossarcoma de Walker 256, em sua fase evolutiva intermediária de 7 dias, eis que, sob tratamento quimioterápico com 5-FU somente, e ao exame imunohistoquímico, este mostra-se 100% vimentina positiva e 100% queratina negativa. Porém, na mucosa, que é vimentina negativa, há algumas células dendríticas denominadas células de Langherans, as quais se mostram vimentina positiva (Figura 35). Estas células são também conhecidas como células apresentadoras de antígenos.

O tumor de Walker 256, implantado em estômagos de rato Wistar, em sua fase evolutiva avançada de 10 dias e sob tratamento quimioterápico com 5-FU, apresenta considerável hemorragia em seu interior, o que é muito mais devido ao efeito da hipertermia do que ao da quimioterapia (Figura 31).

Este tumor mostra massa tumoral elevada, a muscular da mucosa ao meio, ao lado da mucosa, e como para-efeito do quimioterápico (5-FU), há mucosite focal, decorrente do 5-FU, evidenciada na forma de edema e áreas esbranquiçadas (Figura 32). Além disso, há também presença de hemorragia, característica esta não exclusiva da hipertermia, pois aqui trata-se de tratamento com quimioterapia somente e no entanto ocorreu hemorragia.

O mesmo tumor, apesar de mostrar-se ora com características carcinomatosas (células poligonais), ora sarcomatosas (células fusiformes), ao ser submetido à imunohistoquímica, revela ser na verdade um sarcoma e/ou tumor de pequenas células, uma vez que a coloração para vimentina resultou 100% positiva (Figura 33), resultado este confirmado pela coloração para queratina, que foi 100% negativa (Figura 34).

Numa abordagem estatística, temos que o tumor de Walker 256 em sua fase evolutiva inicial de 3 dias sob tratamento quimioterápico com 5-FU isola-

do quando comparado ao 5-FU associado à hipertermia, demonstra ser estatisticamente significativa ($p = 0,01$), uma vez que ao se observar a curva de Kaplan-Meier (Figura 22) tem-se a nítida compreensão de que o tratamento isolado com 5-FU no 3º dia foi mais efetivo que o 5-FU associado à hipertermia, de tal maneira, se pode afirmar que o 5-FU associado à hipertermia, neste estágio evolutivo inicial de 3 dias, não foi sinérgico.

Com relação ao tumor de Walker 256 em sua fase evolutiva intermediária de 7 dias sob tratamento quimioterápico com 5-FU isolado quando comparado ao 5-FU associado à hipertermia, demonstra não haver significância estatística entre eles (Figura 22), o que denota a ineficiência do tratamento quimioterápico isolado, assim como da quimioterapia associada à hipertermia, diante, portanto, da agressividade tumoral, uma vez que se está diante de um tumor de pequenas células de alto grau de virulência (100% vimentina positiva) (Pinheiro et al., 2000; Alves et al., 2002). No entanto, apesar de não haver significância estatística, este grupo é o único em que a quimioterapia com 5-FU isolado mostra ligeira melhora na sobrevida quando comparado ao 5-FU associado à hipertermia (Figura 22).

Já o tumor de Walker 256 em sua fase evolutiva avançada de 10 dias sob tratamento quimioterápico com 5-FU isolado quando comparado com 5-FU associado à hipertermia, demonstra ter alta significância estatística ($p = 0,0026$), com curvas de Kaplan-Meier bem diferenciadas umas das outras, evidenciando assim que o 5-FU e a hipertermia não foram sinérgicos e que o 5-FU isolado foi mais efetivo (Figura 22), mesmo estando o tumor em fase evolutiva avançada.

3. Tratamento com Ácido Folínico (Leucovorin®) (LEU)

Ao se fazer o estudo comparativo dos tratamentos 5FU + LEU isolado *versus* 5FU + LEU associado à HT, em tumores em fase evolutiva inicial de 3 dias, observa-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre e-

les, mostrando assim que a hipertermia associada à quimioterapia coadjuvante pelo ácido folínico é efetiva (Tabela VI; Figura 42).

Entretanto, quando se fez o estudo comparativo desses mesmos tratamentos em tumores em fases evolutivas intermediária (7 dias) e avançada (10 dias), eis que não houve nenhuma significância estatística entre eles, mostrando assim que não ocorreu sinergismo entre hipertermia e quimioterapia induzida pelo ácido folínico (Tabelas VII e VIII; Figuras 43 e 44).

Ao se submeter 50 animais (ratos Wistar) à combinação de tratamento quimioterápico com hipertermia, sendo 25 deles sob efeito de 5FU e os outros 25 sob efeito de 5FU + LEU, e com suas respectivas temperaturas aferidas em seis tempos diferentes (0, 20, 30, 40, 50, e 60 min.), tem-se que a compensação das médias de temperatura diferiu nas várias combinações de tempo *versus* tratamento, exceto no tempo basal (zero) (Teste de Turkey, $\Delta_{5\%} = 1,16$) (Quadro 1).

Era de se esperar que o 5FU + LEU fosse mais efetivo e melhorasse a sobrevivência ou a efetividade do 5FU, e daí melhorasse também o sinergismo (LEU modulando) com a hipertermia, o que não ocorreu. O que se constatou, na verdade, foi que a hipertermia como um todo em nada melhorou a sobrevivência quando comparada à quimioterapia isolada. Adicionalmente, o Leucovorin® veio induzir uma maior termotolerância, haja vista que 9 dos 25 animais sujeitos ao 5FU + LEU associado à HT manifestaram-se com diminuição da temperatura inicial, ou permanência da mesma, a despeito de se acrescentar calor em todo o experimento durante uma hora.

Existem duas explicações possíveis para esta situação: a primeira no sentido da associação de 5FU com Leucovorin® favorecer a termotolerância por induzir a expressão das proteínas do choque térmico (HSP); e a segunda no sentido do Leucovorin® não ter melhorado o efeito do 5FU na presença da hi-

pertermia e ter agido no sentido de aumentar a resistência do tumor à droga, sendo por esta razão que o efeito na sobrevida não foi efetivo.

Esperava-se que as médias de temperatura ao longo do tempo (min.) dos animais submetidos ao 5FU + LEU associado à HT fossem superiores aos valores do 5FU associado à hipertermia (Figura 45). Para surpresa do observador, eis que os resultados foram exatamente o oposto: as médias de temperatura dos animais ao longo do tempo (min.) foram sempre superiores para todos os tempos (20, 30, 40, 50 e 60 min.), exceto o basal (zero). No estudo de medidas repetidas de tempo, obteve-se a conformação gráfica (Figura 45). Por ser o tempo uma variável contínua, pode-se garantir que em todos os tempos o gráfico demonstra bem a realidade.

O carcinossarcoma de Walker 256, quando implantado em estômagos de rato por inoculação via mucosa gástrica, tinha como característica, na maioria da vezes, preservar a mucosa e invadir as outras camadas, e ocasionalmente, invadir também a própria mucosa (Oliveira, 1997). Porém, tem-se observado nestes experimentos ser quase uma constante o fato do tumor ser mais invasivo e não preservar a mucosa, acometendo assim todas as camadas, daí o porquê do 5FU + LEU associado à HT atuar sobre a mucosa, determinado assim necrose na mesma e na submucosa (Figura 46 – vide setas).

Observa-se que mesmo o tumor estando numa fase evolutiva inicial de 3 dias, este já se manifesta difusamente, disseminando-se assim para a submucosa, e que, apesar da efetividade do 5FU + LEU associado à HT determinar uma intensa necrose sobre o tumor, não há uma efetividade satisfatória, pois o grau de envolvimento tumoral é bastante considerável, superando assim a ação terapêutica do 5FU + LEU associado à HT. Aqui sabe-se que houve significância estatística ($p < 0,05$) (Tabela VI; Figura 42), mas como estamos diante de tumor de pequenas células, onde sua virulência e agressividade são consideravelmente manifestas, daí porquê, mesmo que o tratamento seja efetivo, como

demonstra o tumor com intensa necrose (Figura 47), não é suficiente para uma boa resposta na taxa de sobrevivência, ou seja, para uma resposta terapêutica completa (cura) e não apenas uma resposta terapêutica parcial.

Em alguns animais experimentais há progressão tumoral sem resposta ao tratamento, e noutros há cura total. Mas neste caso, ocorre apenas resposta terapêutica parcial, uma vez que o tumor em fase evolutiva inicial de 3 dias, sob tratamento com 5FU + LEU associado à HT, apresenta-se como tumor residual com reação inflamatória, além de necrose na submucosa (Figura 48).

Há situações em que o tumor de Walker 256 invade a mucosa, submucosa e muscular, além da junção esôfago-gástrica (JEG), não “respeitando” nada. Diga-se de passagem, o tumor não fora originalmente implantado na JEG, o mesmo ascendeu até chegar a esta posição, e neste caso, não respondeu a nenhum efeito do tratamento com 5FU + LEU associado à HT em tumor em fase evolutiva inicial de 3 dias (Figura 49).

Há outras situações, possivelmente face à boa resposta imunológica do animal, da efetividade do tratamento com 5FU + LEU associado à HT, e da fase evolutiva inicial (3 dias) do tumor, que fazem com que se consiga boa resposta terapêutica, ou mesmo resposta terapêutica completa (cura) no animal por parte do tratamento (Figuras 50 e 51).

Dia após dia, tem-se observado que o tumor de Walker 256 mostra-se cada vez mais agressivo e invasivo, uma vez que o tumor, mesmo em fase evolutiva inicial de 3 dias, já se apresenta com êmbolos, daí porque não há efetiva, nem resposta terapêutica alguma, uma vez que neste caso o animal estava sob tratamento com 5FU + LEU associado à HT (Figura 52).

Isto vem explicar porque nenhum tratamento é efetivo, porque a sobrevivência dos animais é tão precoce, e porque não ocorre metástase do tumor, pois, antes mesmo da metástase ocorrer, o animal vai a óbito, o que demonstra

ser o tumor de pequenas células, dado seu comportamento, invasividade, alto grau de agressividade e alta taxa de proliferação (Figura 71 – vide setas).

Semelhante a estes êmbolos tumorais em fase evolutiva tumoral tão precoce, só encontra-se uma maior barreira para o sucesso dos xenotransplantes: a rejeição hiperaguda, a qual se refere à ligação de anticorpos humanos preformados às células endoteliais do doador. O que resulta na ativação do complemento, lise celular e eventual trombose vascular (Geller *et al.*, 1998).

Em animal com tumor em fase evolutiva inicial de 3 dias, o mesmo invade a submucosa, muscular e serosa, e sob tratamento com 5FU + LEU associado à HT, este é efetivo sobre a submucosa, ocasionando assim extensa necrose liquefativa, mas não o é sobre a muscular e a serosa (Figura 53).

O tumor de Walker 256 implantado em estômago de rato manifesta-se mais que agressivo, invadindo a musculatura e o tecido adiposo, mesmo em fase evolutiva inicial de 3 dias e sob tratamento com 5FU + LEU associado à HT, não obtendo, neste caso, resposta terapêutica alguma (Figura 54).

O tumor de Walker 256 implantado em estômago de rato com tumor em fase evolutiva intermediária de 7 dias e sob tratamento com 5FU + LEU associado à HT, manifesta-se na forma de intensa necrose e com resposta terapêutica parcial (Figura 55). Aqui, mesmo dado à agressividade do tumor de pequenas células, há resposta terapêutica parcial.

Já se havia demonstrado anteriormente (Oliveira, 1997), em um determinado grupo de animais, que ao se inocular 100 mil (10^5) células do tumor de Walker estes animais se mantiveram vivos por $40,2 \pm 4,5$ dias. Um dos animais deste grupo apresentou invasão do fígado (provavelmente por contiguidade no peritônio), além de ascite hemorrágica (Oliveira, 1997).

Nos experimentos deste trabalho, cuja quantidade de células tumorais inoculadas foi sempre igual a 1 milhão (10^6), o tumor em fase evolutiva intermediária de 7 dias e sob tratamento com 5FU + LEU associado à HT apresen-

ta-se no fígado com células tumorais no espaço porta, na luz da veia porta e invadindo os sinusóides hepáticos (Figura 56), mostrando assim a agressividade do tumor de pequenas células, não exibindo nenhuma resposta terapêutica positiva.

Em animal experimental com tumor em fase evolutiva intermediária de 7 dias e sob tratamento com 5FU + LEU associado à HT, mostra êmbolos tumorais em vasos na submucosa, não possibilitando o menor grau de sobrevida para o animal (Figura 57).

Por outro lado, em um grupo experimental com tumor em fase evolutiva intermediária de 7 dias, sob tratamento com 5FU + LEU associado à HT, ocorre fibrose na submucosa (Figura 58), com predomínio de linfócitos, o que fala a favor de cicatrização e conseqüente cura total. No entanto, estes casos são raros (Figuras 58 e 59).

Neste mesmo grupo experimental, encontra-se, em outro animal, presença de macrófagos (pigmentos acastanhados) e linfócitos, o que aponta para inflamação crônica (Figura 60). O tumor foi sendo destruído e a inflamação foi se instalando, com conseqüente aparecimento de exudato inflamatório e cicatrização no conjuntivo, resultando em cura total (Figura 60). Um bom exemplo do tratamento quimioterápico com 5FU + LEU associado à HT.

Em rato Wistar com tumor implantado no estômago em fase evolutiva avançada de 10 dias e sob tratamento com 5FU + LEU isolado, observa-se bastante hemorragia. Isto demonstra que a hemorragia não é resposta exclusiva apenas da hipertermia, e pode ocorrer também em quimioterapia isolada (Figura 62), mesmo com tumor em fase evolutiva avançada de 10 dias.

Em outro animal com tumor em fase evolutiva avançada de 10 dias e sob tratamento com 5FU + LEU associado à HT, nota-se um infiltrado tumoral perineural (Figura 68), o que corresponderia, do ponto de vista clínico, à manifestação dolorosa. Aqui, mais uma vez, vem demonstrar a agressividade do tu-

mor de pequenas células ao se infiltrar, comprometendo assim a região perineural.

Outro animal experimental, com tumor em fase evolutiva avançada de 10 dias e sob tratamento com 5FU + LEU associado à HT, mostra necrose mínima da mucosa. Esta necrose exígua demonstra a eficácia do tratamento, o que possibilitou ao animal uma sobrevida de 95 dias. Este animal foi estatisticamente censurado, uma vez que se estabeleceu 90 dias como o ponto de corte, e a partir daí, todos os animais que sobrevivessem estariam curados ou com resposta terapêutica parcial, o que fora aqui constatado, ou seja, houve necrose mínima, mas não houve cura e sim resposta terapêutica parcial; o que comprova que mesmo sendo tumor de pequenas células, portanto agressivo e invasivo, não se pode desistir do tratamento; observe-se que neste caso específico houve resposta terapêutica satisfatória (parcial) em tumor em fase evolutiva avançada de 10 dias.

Em outro rato com tumor em fase evolutiva avançada de 10 dias e sob tratamento com 5FU + LEU associado à HT, evidencia-se tumor invadindo todas as camadas, atingindo inclusive a JEG, devido à natureza de sua agressividade e invasividade (Figura 63). Vale salientar que neste experimento o tumor não fora originalmente implantado na JEG, como o fora em trabalho anterior (Oliveira, 1997).

Em outro animal com tumor em fase evolutiva avançada de 10 dias e sob tratamento com 5FU + LEU associado à HT, obteve-se cura total (resposta terapêutica completa), pois o rato apresentava sobrevida de 95 dias (estatisticamente censurado) e podia-se notar as estruturas todas normais, incluindo a JEG (Figura 64).

Denota-se ainda, em tumor em fase evolutiva avançada de 10 dias e sob tratamento com 5FU + LEU associado à HT, capilar preenchido por êmbolos tumorais e células tumorais ao seu redor, veia cheia de êmbolos e com man-

guito perivascular de células tumorais ao seu redor, com apenas artéria normal (Figura 65).

Tem-se observado êmbolos tumorais em veia de animais com tumor em fase evolutiva inicial de 3 dias (Figura 52). Também notam-se os mesmos êmbolos tumorais em animais com tumor em fase evolutiva intermediária de 7 dias (Figura 57), além de células tumorais na luz da veia porta (Figura 56).

Todos esses achados vêm a caracterizar o alto grau de agressividade e invasividade do tumor de Walker 256. No entanto, o tumor também se manifesta com êmbolos tumorais em veia da submucosa em animais com tumor em fase evolutiva avançada de 10 dias sob tratamento com 5FU + LEU associado à HT, demonstrando assim a ineficiência do tratamento, na sua grande maioria, neste experimento (Figuras 66 e 67). Devido não à essência do tratamento de *per se*, mas primordialmente à agressividade e invasividade do tumor de pequenas células (tumor de Walker 256), que neste trabalho apresenta invasividade sanguínea, sem metástase, ou seja, sem passar para a matriz intersticial, desde a fase mais avançada de 10 dias, passando pela de 7 dias.

O Leucovorin® serviu para modular este estudo em dois sentidos: o primeiro, em manifestar invasividade tumoral intravasos desde sua fase evolutiva inicial até a mais avançada, uma vez que isto ainda não havia sido manifesto nem com o uso do Taxol® nem com o uso do 5FU isolados; e o segundo, em induzir termotolerância (Figura 45), o que explicaria a resistência aumentada do tumor ao 5FU, o que não ocorre quando se associa 5FU + LEU em tumores de cólon humano (Zaniboni et al., 1993; Wolmark et al., 1993), onde houve uma boa resposta de imunomodulação do Leucovorin® em relação ao 5FU, melhorando assim a sobrevida.

Este experimento, no qual usamos 5FU + LEU associado à HT, nos orienta ainda no sentido de não mais se fazer hipertermia associada à quimioterapia com 5FU onde haja imunomodulação com Leucovorin®, mesmo em tumo-

res quimiossensíveis ao 5FU, pois o efeito hipertérmico neste trabalho fora rebo-
te, ou seja, o contrário do esperado.

4. Progressão Tumoral

Tinha-se como norma prática na preparação do inóculo e repicagem do tumor de Walker 256, disponibilizá-lo no 10^o ao 12^o dia de evolução. No entanto, o tumor nesta fase apresenta-se bastante necrosado, pouco se aproveitando do mesmo (Oliveira, 1997). Com a repicagem freqüente e constante, o tumor foi se tornando cada vez mais agressivo em necrose, a ponto de se ter que disponibilizá-lo em um período de tempo mais curto, com o fito de viabilidade tumoral – de tumor vivo – com capacidade experimental. Sendo assim, utilizou-se o tumor aos 7 (sete) dias de evolução, por ser este o melhor dia de viabilidade tumoral e por seu tempo hábil, pois, aos 6 (seis) dias, o tumor ainda não apresenta boa viabilidade, e aos 8 (oito) dias, o mesmo já começa a apresentar necrose.

Esta precocidade de uso do tumor em fase mais curta de tempo tem tornado o mesmo cada vez mais agressivo, pois, se antes o carcinossarcoma 256 de Walker, ao ser implantado em estômagos de rato Wistar, atravessava a mucosa e se implantava na muscular e, na grande maioria das vezes, preservava a mucosa (Oliveira, 1997), agora, com o uso do tumor de Walker 256 no estágio de 3 dias desde o seu inóculo nos animais de manutenção, este tem se manifestado bastante agressivo, acometendo inclusive a mucosa, mesmo sob tratamento (Figura 11).

Tem-se ciência de que o tumor de Walker 256 com o qual se trabalha no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (DFF) da Universidade Federal do Ceará (UFC), até então considerado como um carcinossarcoma, trata-se na verdade de um tumor de pequenas células, por excelência, uma vez que, ao ser submetido à histopatolo-

gia clássica (H&E), apresentava células poligonais características de carcinoma, grande atividade mitótica, células indiferenciadas e grande pleomorfismo, e ao ser submetido à imunohistoquímica (IHM), apresentava vimentina positiva em 100% dos casos, o que se leva a concluir tratar-se de um tumor de pequenas células em essência. Tal constatação deste trabalho foi também alcançada por outros pesquisadores do LOE, tais como Pinheiro et al. (2000) e Alves et al. (2002), os quais concluíram que o tumor de Walker/LOE sofrera variação morfológica para a variante sarcomatosa de pequenas células isoladas e indiferenciadas.

O tumor de Walker 256 tem apresentado alta capacidade proliferativa, uma vez que, ao ser implantado como tumor original na mucosa gástrica, em fase evolutiva inicial de 3 (três) dias, evidencia apenas um broto tumoral na mucosa (Bröyn, 1974). Todavia, tem-se observado que o tumor de Walker 256 apresenta, já nesta fase evolutiva inicial (3 dias), embolia tumoral, mesmo estando o tumor sob potente tratamento, neste caso, quimioterapia com 5-Fluorouracil mais um imunomodulador – ácido folínico (Leucovorin®), associados à hipertermia. Sendo assim, o tumor, ao exibir êmbolos em fase tão inicial de evolução (3 dias), fala a favor de elevada agressividade, fazendo com que seja difícil uma terapêutica efetiva para esta situação (Figura 52).

Também objeto de observação deste trabalho, constata-se êmbolos tumorais em vasos na submucosa quando o tumor de Walker 256 encontra-se em sua fase evolutiva intermediária de 7 (sete) dias, fase esta bem mais proliferativa. Mesmo assim, êmbolos tumorais nesta fase evolutiva, haja vista ser a fase na qual o tumor vence a membrana basal, já se manifestam na forma de êmbolos intravasos, vez que o tumor está sob tratamento quimioterápico reforçado com 5FU + LEU associados à HT (Figura 57).

O que não dizer do tumor de Walker 256 em sua fase evolutiva avançada de 10 (dez) dias, vez que nas fases inicial (3 dias) e intermediária (7

dias) o tumor já se manifestava na forma de êmbolos dentro de vasos, sob tratamento quimioterápico com 5FU + LEU associados à HT, pois, na fase evolutiva avançada de 10 dias, os vasos se encontram cheios de êmbolos tumorais e manguito perivascular de células tumorais ao seu redor (Figura 65). Nesta situação, o tumor de Walker 256 também está sob tratamento reforçado (5FU + LEU associados à HT); não obstante, sem a efetividade esperada, pois, se este tratamento não respondeu satisfatoriamente com o tumor em sua fase evolutiva inicial de 3 dias, onde já havia a presença de êmbolos tumorais dentro dos vasos, o que dizer do tumor em sua fase evolutiva avançada de 10 dias, onde já há maior quantidade de êmbolos. Desta forma, pouco se pode esperar de quaisquer tratamentos em vista de um tumor tão agressivo quanto este.

Foi constatado em trabalho recente (Oliveira, 1997) que o tumor de Walker 256, implantado em estômagos de rato Wistar com 1 milhão (10^6) de células em todos os casos, não apresenta metástases à distância, apesar de êmbolos tumorais tão precocemente evidenciados. No entanto, foi observada invasividade por contiguidade no fígado (Oliveira, 1997) e pâncreas (Figuras 14 e 80).

O tumor de Walker 256, embora apresente precoce invasividade e elevada agressividade, não apresenta tumores secundários ou metástases. Este fato poderia ser explicado por possíveis alterações na expressão de moléculas de adesão, o que impediria a migração de células tumorais para a fixação em moléculas do órgão-alvo, e conseqüente extravasamento, para que assim seja possível a formação de metástases.

Os cânceres crescem por infiltração progressiva, invasão e destruição do tecido circunjacente. Em geral, são pouco demarcados do tecido normal circundante, e lhes falta um plano de clivagem bem definido (Robbins *et al.*, 1991).

A maioria dos cânceres é obviamente invasiva, e se pode esperar, por exemplo, invasão da parede do cólon ou do útero, ou projeção através da

superfície da pele (nódulo da irmã Josefa). Eles não reconhecem os limites anatômicos e normais e, com frequência, expandem-se através dos linfáticos, dos vasos sanguíneos, e dos espaços perivasculares (Robbins *et al.*, 1991).

Neste trabalho, pôde-se constatar que o tumor experimental expandiu-se para os vasos sanguíneos nas diferentes fases de sua evolução (inicial (3 dias), intermediária (7 dias) e avançada (10 dias)) (Figuras 52, 57 e 65), além também de expandir-se em infiltrado perineural (Figura 68), o que vem confirmar a natureza invasiva e agressiva do mesmo.

As artérias são muito mais resistentes a invasões do que as veias ou os canais linfáticos. Esta resistência é atribuída convencionalmente à espessura das paredes arteriais, porém, pode ser atribuída também ao conteúdo em elastina dessas paredes, assim como, ao fato de elaborarem inibidores da protease (Robbins *et al.*, 1991).

Portanto, constata-se com evidência que o tumor experimental em fase evolutiva avançada de 10 dias sob reforçado tratamento quimioterápico (5FU + LEU associados à HT) mostra capilar com células tumorais ao seu redor e veia cheia de êmbolos, e denotam-se ainda artéria ao meio e artéria completamente normal (Figura 65), demonstrando assim que as artérias são menos susceptíveis a invasões.

Vários estudos têm demonstrado uma clara correlação entre o nível de expressão de E-caderinas e invasividade, além de fornecerem evidências de que as mesmas devem agir como uma proteína supressora da invasão. Contudo, o papel das E-caderinas na invasividade deve ser restrito à invasão inicial em si mesma. A liberação de células tumorais a partir do tumor primário e a formação de metástases exigem atividades celulares adicionais, tal como: ações proteolíticas, interações adesivas das células tumorais com a membrana basal e eventos de locomoção celular. A este respeito, deve-se observar que linhagens celulares derivadas de tumor têm sido isoladas e que estas mostram uma perda completa

da expressão de E-caderina, apesar de não metastizarem *in vivo* (Herrenknecht, 1996).

O reduzido nível, ou ausência, de E-caderinas em tumores desdiferenciados pode ser provocado por diversas maneiras. Por exemplo, vários tumores estão associados com deleção alélica ou perda de heterozigose sobre o cromossomo 16, onde as E-caderinas estão localizadas (16q22), resultando numa regulação baixa de sua expressão (Herrenknecht, 1996).

Acredita-se, portanto, que o tumor experimental de Walker 256, devido a sua invasividade para os vasos, provavelmente possa apresentar alteração (diminuição) na expressão ou na atividade das E-caderinas.

A perda de expressão, ou aumentada expressão, de algumas integri- nas específicas pode ser vista em alguns tipos de células neoplásicas específicas, levando assim a uma invasividade aumentada e/ou a propriedades metastáticas (Rosales *et al.*, 1995).

Em alguns casos, tem sido relatado que a progressão tumoral, em fase mais benigna para fase mais maligna, está associada com perda de expressão de subunidades específicas de integrinas (Hart, 1996).

Em geral, um rato possui 42 cromossomos normais (Figura 81). A quantidade encontrada no tumor experimental de Walker 256 deste estudo foi inferior, variando entre 36 e 39 cromossomos. O que possibilita dizer que se está, no mínimo, diante de uma alteração autossômica (Figura 82).

Na maioria das desordens autossômicas recessivas, o principal defeito bioquímico refere-se a alguns aspectos do metabolismo do DNA, ou estrutura cromossomal, especialmente reparo do DNA. A perda da capacidade das células em reparar o dano ao DNA em pacientes com *Xeroderma pigmentosum* é bem conhecida. Através de estudos de mutações nesta doença, pôde-se encontrar e caracterizar 14 ou mais genes envolvidos na reparação de nucleotídeos (Hoeijmakers, 1994). Outras doenças autossômicas recessivas que estejam associa-

das a uma aumentada incidência de neoplasias podem exibir anormalidades genéticas relacionadas a defeitos na manutenção ou reparo da estrutura genômica. Estas incluem: síndrome de Bloom, anemia de Fanconi e ataxia telangiectasia (Hanawalt & Sarasin, 1986), as quais estão associadas à instabilidade cromossômica.

Alguns investigadores têm relatado aberrações numéricas e estruturais em cromossomos celulares, intestinais e outros (Gardner *et al.*, 1982; Takai *et al.*, 1986).

A morfologia de fibroblastos da pele que crescem em cultura de células a partir de pacientes com polipose familiar, ou síndrome de Gardner, exibem mudanças indicativas de que tais células são anormais e mais parecidas com células em processo de transformação neoplásica *in vitro* (Antecol & Mukherjee, 1982). Assim sendo, alterações em um único gene (APC) podem levar ao desenvolvimento de neoplasia numa variedade de tecidos, originando assim a polipose familiar.

Uma aberração numérica autossômica foi constatada no tumor experimental de Walker 256 deste estudo (Figura 82). Espera-se que num futuro próximo possa-se detectar tais aberrações com o intuito de melhor caracterizar o tumor e até dizer com clarividência o porquê dele apenas invadir e não metastizar.

Neste experimento, detectou-se apenas alteração autossômica (Figura 82) do tumor de Walker 256. Num futuro próximo, onde se possa fazer estudos mais detalhados envolvendo alterações cromossômicas estruturais, quiçá seja-se capaz de descrever, por exemplo, transformações cromossômicas ou mesmo alteração de fatores de crescimento.

Sabe-se ser grande o número de subtipos histológicos que fazem parte dos sarcomas de partes moles (SPM), e várias alterações moleculares relativas às translocações em diferentes cromossomos e em genes distintos já foram determinadas.

A superexpressão de fatores de crescimento e de receptores de fatores de crescimento tem sido relatada (EGF, EGFr, TGF- α , PDGF- α) (Kohlberger *et al.*, 1995). O aumento da expressão do fator de crescimento de cadeia derivado de plaquetas mostrou-se relacionado à presença de tumores de alto grau e a um elevado índice de antígeno de proliferação nuclear, sugerindo que PDGF- α deva ser um importante mediador da proliferação celular nos SPM. Demonstrou-se também que fatores de crescimento tipo insulina (IGF-1 e IGF-2) encontram-se superexpressos em 50% das vezes, sugerindo assim a existência de mecanismos regulatórios autócrinos e parácrinos envolvidos no crescimento desses tumores (Kohlberger *et al.*, 1995).

Quando se trata de câncer de pulmão em humanos, o carcinoma neuroendócrino de pequenas células, em 78% das vezes, apresentou-se em topografia central. O alargamento do mediastino pelas metástases linfonodais é frequente (Younes, 1997; Shields, 2001; Pearson, 2002).

Ainda se tratando de câncer de pulmão em humanos, os carcinomas de pequenas células apresentam o pior prognóstico quando comparados aos carcinomas de não-pequenas células. São tumores de tratamento químico- e radioterápicos. Indica-se a cirurgia apenas quando se apresentam como nódulos periféricos únicos e quando os exames de estadiamento demonstram que não há disseminação linfática ou metástase à distância (Younes, 1997; Shields, 2001; Pearson, 2002).

Já o tumor de pequenas células tipo tumor de Walker 256 utilizado neste trabalho, mostra-se bastante agressivo e, mesmo sem exibir metástases à distância, evidencia invasividade e alterações qualitativas nas mitoses, além de alterações inclusive no número de cromossomos; o tumor mostra-se com instabilidade genética, a qual bem evidencia uma progressão de baixo controle em sua evolução. Daí porque se faz vaticinar ser de difícil manuseio terapêutico.

Com todas estas observações feitas, e frente a todas as dificuldades apresentadas no manuseio do tumor, o mesmo enseja a que se façam muitas e maiores análises em trabalhos futuros, no intuito de melhor conhecer este tumor, haja vista que o esforço de reconhecê-lo como um tumor de pequenas células e as investigações no âmbito da quimioterapia com Paclitaxel (Taxol®), 5-Fluorouracil (5-FU) e Ácido Folínico (Leucovorin®), isolados ou associados à hipertermia, foram apenas um ensaio, não obstante, novos ensaios virão com certeza.

CONCLUSÕES

1. Tratamento com Paclitaxel (Taxol®)

Com relação ao tumor de Walker 256 implantado em estômagos de rato Wistar, concluiu-se que:

O tratamento com Paclitaxel isolado foi mais significativo do que o Paclitaxel associado à hipertermia.

2. Tratamento com 5-Fluorouracil (5-FU)

Com relação ao tumor de Walker 256 implantado em estômagos de rato Wistar, concluiu-se que:

O tratamento com 5-FU isolado foi mais significativo do que o 5-FU associado à hipertermia.

3. Tratamento com Ácido Folínico (Leucovorin®)

Com relação ao tumor de Walker 256 implantado em estômagos de rato Wistar, concluiu-se que:

Os tratamentos com 5-FU + LEU isolados e 5-FU + LEU associados à hipertermia não obtiveram significância.

4. Progressão Tumoral

Com relação ao tumor de Walker 256 implantado nos estômagos de rato Wistar, concluiu-se que:

- 1) Em todas as fases evolutivas (inicial – 3 dias, intermediária – 7 dias e avançada – 10 dias) o tumor apresentou invasividade e agressividade, mas sem metástase.
- 2) O tumor de Walker 25 tem comportamento semelhante a tumores de pequenas células indiferenciadas.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

Abbas, AK; Lichtman, AH; Pober, JS. **Cellular and molecular immunology**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1994. chapt. 84, p. 366.

Ackerman, NB. The natural history of tumors implanted beneath the gastric serosa in rats. **Am. J. Surg.**, v. 119, n. 6, p. 646-648, 1970.

Adwankar, MK; Chitnis, MP. Effect of hyperthermia alone and in combination with anticancer drugs on the viability of P388 leukemic cells. **Tumori**, v. 70, n. 3, p. 231-234, 1984.

Agashe, VR; Hartl, FU. Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. **Semin. Cell Dev. Biol.**, v. 11, n. 1, p. 15-25, 2000.

Agostino, D. Are the showers of cancer cells in the blood responsible for an increase in metastases? **Tumori**, v. 54, n. 6, p. 427-440, 1968.

Agostino, D; Grossi, CE; Clifton, EE. Effect of heparin on circulating Walker carcinosarcoma 256 cells. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 27, p. 17-24, 1961.

Ahlers, O; Boehnke, T; Kerner, T *et al.* Changes in serum cytokine levels during induce whole body hyperthermia. **Crit. Care**, v. 3, suppl 1, p. P082, 1999.

Ahlers, O; Boehnke, T; Kerner, T *et al.* Lymphocyte alterations during hyperthermia. **Br. J. Anesth.**, v. 80, suppl 1, p. 301, 1998

Aldaz, CM; Conti, CJ; Klein-Szanto, AJ; Slaga, TJ. Progressive dysplasia and aneuploidy are hallmarks of mouse skin papillomas: relevance to malignancy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, n. 7, p. 2029-2032, 1987.

Alves, APNN; Ferreira, FVA; Pessoa, C; Macêdo, P; Moraes, MEA; Oliveira, R; Cardoso, R; Lotufo, LV; Moraes, MO. Revisão da caracterização imunohistoquímica do Carcinossarcoma de Walker do Laboratório de Oncologia Experimental (LOE). Departamento de Fisiologia e Farmacologia/Departamento de Patologia e Medicina Legal. *In*: Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 34., 2002, Águas de Lindóia. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2002.

Amaning, EP; Olszewski, WL. Kinetics of distribution of recirculating lymphocytes during whole body hyperthermia. **Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)**, v. 42, n. 2, p. 107-113, 1994.

Ansfield, FJ; Ramirez, G; Korbitz, BC; Davis, HL Jr. Five-drug therapy for advanced breast cancer: a phase I study. **Cancer Chemother. Rep.**, v. 55, n. 2, p. 183-187, 1971.

Ansfield, FJ; Schroeder, JM; Curreri, AR. Five-years clinical experience with 5-fluorouracil. **JAMA**, v. 181, p. 295-294, 1962.

Antecol, MH; Mukherjee, BB. Effects of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on fibroblasts from individuals genetically predisposed to cancer. **Cancer Res.**, v. 42, n. 9, p. 3870-3879, 1982.

Atherton, JC; Peek, RM Jr; Tham, KT; Cover, TL; Blaser, MJ. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, v. 112, n. 1, p. 92-99, 1997.

Azocar, J; Yunis, EJ; Essex, M. Sensitivity of human natural killer cells to hyperthermia. **Lancet**, v. 1, n. 8262, p. 16-17, 1982.

Balaban, GB; Herlyn, M; Clark, WH Jr; Nowell, PC. Karyotypic evolution in human malignant melanoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 19, n. 1-2, p. 113-122, 1986.

Barone, RM; Byfield, JE; Frankel, S. Combination infusional 5-fluorouracil and radiation therapy for the treatment of metastatic carcinoma of the colon to the liver. **Dis. Colon Rectum**, v. 22, n. 6, p. 376-382, 1979.

Bellamy, WT; Dalton, WS; Dorr, RT. The clinical relevance of multidrug resistance. **Cancer Invest.**, v. 8, n. 5, p. 547-562, 1990.

Benschop, RJ; Schedlowski, M; Wienecke, H; Jacobs, R; Schmidt, RE. Adrenergic control of natural killer cell circulation and adhesion. **Brain Behav. Immun.**, v. 11, n. 4, p. 321-332, 1997.

Berenblum, I. Challenging problems in cocarcinogenesis. **Cancer Res.**, v. 45, n. 5, p. 1917-1921, 1985.

Beviláqua, RAU. Síntese protéica. *In*: Rossi, BM; Pinho, M. **Genética e biologia molecular para o cirurgião**. São Paulo: Lemar, 1999. p. 75-93.

Blackburn, EH. Telomeres: no end in sight. **Cell**, v. 77, n. 5, p. 621-623, 1994.

Bonica, JJ. **Management of pain**. 2nd ed., Philadelphia: Lea & Febiger, 1990. 74 p.

Borrelli, MJ; Wong, RS; Dewey, WC. A direct correlation between hyperthermia-induced membrane blebbing and survival in synchronous G1 CHO cells. **J. Cell Physiol.**, v. 126, n. 2, p. 181-190, 1986.

Bragheto, I. Factores relacionados con la génesis del cáncer gástrico. *In*: Csendes, A; Strauzer, T. **Cáncer gástrico**. Santiago de Chile: Andes Bello, 1984. v. 1, cap. 2, p. 13-23.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativas de incidência e mortalidade por câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2002.

Bröyn, T. A simple method to establish simulated gastric and intestinal cancer in rats by mucosal implantation of Walker tumour. **Acta Chir. Scand.**, v. 140, n. 6, p. 481-485, 1974.

Bull, JM. An update on the anticancer effects of a combination of chemotherapy and hyperthermia. **Cancer Res.**, v. 44, n. 10 suppl., p. 4853s-4856s, 1984.

Burd, R; Dziedzic, TS; Xu, Y; Caligiuri, MA; Subjeck, JR; Repasky, EA. Tumor cell apoptosis, lymphocyte recruitment and tumor vascular changes are induced by low temperature, long duration (fever-like) whole body hyperthermia. **J. Cell Physiol.**, v. 177, n. 1, p. 137-147, 1998.

Caldarola, L; Dei Poli, M; Bigliani, S. Sullo sviluppo del tumore di Walker nella cute e nel tessuto sottocutaneo del ratto-nota I. **Minerva Chir.**, v. 23, p. 51-55, 1968.

Calderwood, SK; Hahn, GM. Thermal sensitivity and resistance of insulin-receptor binding. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 756, n. 1, p. 1-8, 1983.

Cao, S; Frank, C; Rustum, YM. Role of fluoropyrimidine Schedule and (6R,S)leucovorin dose in a preclinical animal model of colorectal carcinoma. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 88, n. 7, p. 430-436, 1996.

Carter, SK; Friedman, M. Integration of chemotherapy into combined modality treatment of solid tumors. **Cancer Treat. Rev.**, v. 1, p. 1-13, 1974

Castro, AAOL; Arcuri RA. Etiopatogenia e precursores. *In*: Mello, ELR; Correia, MM. **Câncer gástrico**. Rio de Janeiro: Revinter, 1999. cap. 2, p. 7-8.

Castro, RMRPS. Bioquímica e sistema imune. *In*: Lopes, A; Iyeyasu, H; Lopes, LF; Almeida, ES; Castro, RMRPS. **Oconlogia para graduação**. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2005.

Chang, YF; Li, LL; Wu, CW; Liu, TY; Lui, WY; P'eng, FK; Chi, CW. Paclitaxel-induced apoptosis in human gastric carcinoma cell lines. **Cancer**, v. 77, n. 1, p. 14-18, 1996.

Cheng, KC; Loeb, LA. Genomic instability and tumor progression: mechanistic considerations. **Adv. Cancer Res.**, v. 60, p. 121-156, 1993.

Cheung LY, Delcore R. Stomach. *In*: Townsend, CM Jr; Beauchamp, RD; Evers, BM; Mattox, KL (Eds.). **Sabiston textbook of surgery: the biological basis of modern surgical practice**. 16th ed., Philadelphia: Saunders, 2001. cap. 43, p. 837-872.

Chin, KV; Tanaka, S; Darlington, G; Pastan, I; Gottesman, MM. Heat shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance (MDR1) gene in human renal carcinoma cells. **J. Biol. Chem.**, v. 265, n. 1, p. 221-226, 1990.

Chorazy, M. Sequence rearrangements and genome instability. A possible step in carcinogenesis. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 109, n. 3, p. 159-172, 1985.

Ciocca, DR; Oesterreich, S; Chamness, GC; McGuire, WL; Fuqua, SA. Biological and clinical implications of heat shock protein 27,000 (Hsp27): a review. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 85, n. 19, p. 1558-1570, Oct. 1993.

Cividalli, A; Livdi, E; Ceciarelli, F; Piscitelli, M; Pasqualetti, P; Cruciani, G; Danesi, DT. Hyperthermia and paclitaxel-epirubicin chemotherapy: enhanced cytotoxic effect in a murine mammary adenocarcinoma. **Int. J. Hyperthermia**, v. 16, n. 1, p. 61-71, 2000.

Coley-Nauts, H; Fowler, GA; Bogatko, FH; **A review of the influence of bacterial infection and of bacterial products (Coley's toxins) on malignant tumors in man**. Stockholm: Lakeville Journal, 1953. 103 p.

Cortés, F; Piñero, J; Ortiz, T. Importance of replication fork progression for the induction of chromosome damage and SCE by inhibitors of DNA topoisomerases. **Mutat. Res.**, v. 303, n. 2, p. 71-76, 1993.

Coss, RA; Dewey, WC; Bamburg, JR. Effects of hyperthermia on dividing Chinese hamster ovary cells and on microtubules *in vitro*. **Cancer Res.**, v. 42, n. 3, p. 1059-1071, 1982.

Costanzi, JJ; Gagliano, R; Coltman, CA Jr; Bickers, JN. 5-fluorouracil in the treatment of acute leukemia: a Southwest Oncology Group Study. **Cancer Treat. Rep.**, v. 63, n. 11-12, p. 2126-2128, 1979.

Cox, DR; Oakes, D. **Analysis of survival data**. London: Chapman and Hall, 1984. 201p.

Crabtree, JE. Gastric mucosal inflammatory responses to *Helicobacter pylori*. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 10, suppl. 1, p. 29-37, 1996.

Crile, G Jr. The effects of heat and radiation on cancer implanted in the feet of mice. **Cancer Res.**, v. 25, p.372-380, 1963.

Crumb, CK; Willetts, PF Jr; Stephenson, HE Jr. Gastric cancer – a decrescent malignancy. **Surgery**, v. 68, n. 2, p. 277-282, 1970.

Curreri, AR; Ansfield, FJ; Mclver, FA; Waisman, HA; Heidelberger, C. Clinical studies with 5-fluorouracil. **Cancer Res.**, v. 18, p. 478-484, 1958.

D'Oleire, F; Schmitt, CL; Robins, HI; Cohen, JD; Spriggs, D. Cytokine induction in humans by 41.8°C whole-body hyperthermia. **J. Natl. Cancer. Inst.**, v. 85, n. 10, p. 833-834, 1993.

Dahl, O. Interaction of hyperthermia and chemotherapy. **Recent Results Cancer Res.**, v. 107, p. 157-169, 1988.

De Gusmão, VR; Nogueira Mendes, E; De Magalhães Queiroz, DM; Aguiar Rocha, G; Camargos Rocha, AM; Ramadan Ashour, AA; Teles Carvalho, AS. *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from children with and without duodenal ulcer in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 8, p. 2853-2857, 2000.

Dedrick, RL; Myers, CE; Bungay, PM; DeVita, VT Jr. Pharmacokinetic rationale for peritoneal drug administration in the treatment of ovarian cancer. **Cancer Treat. Rep.**, v. 62, n. 1, p. 1-11, 1978.

Dewey, WC. Arrhenius relationships from the molecule and cell to the clinic. **Int. J. Hyperthermia**, v. 10, n. 4, p. 457-483, 1994.

Dewey, WC; Hopwood, LE; Sapareto, SA; Gerweck, LE. Cellular responses to combinations of hyperthermia and radiation. **Radiology**, v. 123, n. 2, p. 463-474, 1977b.

Dewey, WC; Thrall, DE; Gillette, EL. Hyperthermia and radiation – a selective thermal effect on chronically hypoxic tumor cells *in vivo*. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v. 2, n. 1-2, p. 99-103, 1977a.

Dewhirst, MW; Ozimek, EJ; Gross, J; Cetas, TC. Will hyperthermia conquer the elusive hypoxic cell? Implications of heat effects on tumor and normal-tissue microcirculation. **Radiology**, v. 137, n. 3, p. 811-817, 1980.

Di, YP; Repasky, EA; Subjeck, JR. Distribution of HSP70, protein kinase C, and spectrin is altered in lymphocytes during a fever-like hyperthermia exposure. **J. Cell Physiol.**, v. 172, n. 1, p. 44-54, 1997.

Dixon, MF; Genta, RM; Yardley, JH; Correa, P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. **Am. J. Surg. Pathol.**, v. 20, n. 10, p. 1161-1181, 1996.

Doll, R. The lessons of life: keynote address to the nutrition and cancer conference. **Cancer Res.**, v. 52, n. 7 suppl., p. 2024s-2029s, 1992.

Donghi, R; Longoni, A; Pilotti, S; Michieli, P; Della Porta, G; Pierotti, MA. Gene p53 mutations are restricted to poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid gland. **J. Clin. Invest.**, v. 91, n. 4, p. 1753-1760, 1993.

Downing, JF; Martinez-Valdez, H; Elizondo, RS; Walker, EB; Taylor, MW. Hyperthermia in humans enhances interferon- γ synthesis and alters the peripheral lymphocyte population. **J. Interferon Res.**, v. 8, n. 2, p. 143-150, 1988.

Downing, JF; Taylor, MW. The effect of in vivo hyperthermia on selected lymphokines in man. **Lymphokine Res.**, v. 6, n. 2, p. 103-109, Spring 1987.

Dubois, JB. Radiation therapy. *In*: Sugimura, T; Sasako, M. **Gastric cancer**. New York: Oxford University Press, 1997. cap. 20, p. 291-296.

Earle, WR. A study of the Walker rat mammary carcinoma 256 *in vivo* and *in vitro*. **Am. J. Cancer**, v. 24, p. 566-612, 1935.

Faithfull, NS; Reinhold, HS; Van den Berg, AP; Van Rhoon, GC; Van der Zee, J; Wike-Hooley, JL. Cardiovascular changes during whole body hyperthermia treatment of advanced malignancy. **Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.**, v. 53, n. 3, p. 274-281, 1984.

Falkson, G; Falkson, HC. Fluorouracil, methyl-CCNU and vincristine in cancer of the colon. **Cancer**, v. 38, n. 4, p. 1468-1470, 1976.

Farber, E. Cellular biochemistry of the stepwise development of cancer with chemicals: G. H. A. Clowes memorial lecture. **Cancer Res.**, v. 44, n. 12 pt 1, p. 5463-5474, 1984.

Fendrick, AM; Chernew, ME; Hirth, RA; Bloom, BS; Bandekar, RR; Scheiman, JM. Clinical and economic effects of population-based *Helicobacter pylori* screening to prevent gastric cancer. **Arch. Intern. Med.**, v. 159, n. 2, p. 142-148, 1999.

Filipits, M; Suchomel, RW; Zochbauer, S; Malayeri, R; Pirker, R. Clinical relevance of drug resistance genes in malignant disease. **Leukemia**, v. 10, suppl 3, p. S10-S17, 1996.

Fisher, ER; Fisher, B. Electron microscopic, histologic and histochemical features of the Walker carcinoma. **Cancer Res.**, v. 21, p. 527-531, 1961.

Fisher, ER; Fisher, B. Experimental study of factors influencing development of hepatic metastasis from circulating tumor cells. **Acta Cytol.**, v. 9, p. 146-159, 1965.

Fisher, ER; Fisher, B. Local factors affecting tumor growth. I. Effect of tissue homogenates. **Cancer Res.**, v. 23, p. 1651-1647, 1964.

Folkman, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 82, n. 1, p. 4-6, 1990.

Fonteles, MC; Alencar, JW; Matos, FJA. Avaliação da atividade antitumoral de *Plumeria bractrata* A. Dc. **Pesquisa Médica**, v. 4/5, n. 1, p. 14-21, 1966.

Fonteles, MC; Craveiro, AA; Alencar, JW; Matos, FJA; Moraes Filho, MO. Avaliação da atividade antitumoral de óleos essenciais do Nordeste Brasileiro. **Ciência e Cultura**, v. 31, n. 7, p. 723-729, 1979.

Fonteles, MC; Craveiro, AA; Matos, FJA; Alencar, JW; Moraes Filho, MO. Avaliação antitumoral de óleos essenciais do Nordeste Brasileiro. **Ciência e Cultura**, v. 30, n. 7, p. 619, 1978.

Forman, D *et al.* An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. The Eurogast Study Group. **Lancet**, v. 341, n. 8857, p. 1359-1362, 1993.

Formenti, SC; Shrivastava, PN; Sapozink, M; Jozsef, G; Chan, KK; Jeffers, S; Morrow, PC; Muggia, FM. Abdomino-pelvic hyperthermia and intraperitoneal

carboplatin in epithelial ovarian cancer: feasibility, tolerance and pharmacology.

Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., v. 35, n. 5, p. 993-1001, 1996.

Freireich, EJ; Gehan, EA; Rall, DP; Schmidt, LH; Skipper, HE. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. **Cancer Chemother. Rep.**, v. 50, n. 4, p. 219-244, 1966.

Friedewald, WF; Rous, P. The initiating and promoting elements in tumor production. An analysis of the effect of Tar, benzopyrene, and methylcholanthrene on rabbit skin. **J. Exp. Med.**, v. 80, p. 101-126, 1944.

Fujimoto, S; Shrestha, RD; Kokubun, M; Kobayashi, K; Kiuchi, S; Konno, C; Ohta, M; Takahashi, M; Kitsukawa, Y; Mizutani, M *et al.* Positive results of combined therapy of surgery and intraperitoneal hyperthermic perfusion for far-advanced gastric cancer. **Ann. Surg.**, v. 212, n. 5, p. 592-596, 1990.

Fujimoto, S; Shrestha, RD; Kokubun, M; Ohta, M; Takahashi, M; Kobayashi, K; Kiuchi, S; Okui, K; Miyoshi, T; Arimizu, N *et al.* Intraperitoneal hyperthermic perfusion combined with surgery effective for gastric cancer patients with peritoneal seeding. **Ann. Surg.**, v. 208, n. 1, p. 36-41, 1988.

Fujimoto, S; Takahashi, M; Kobayashi, K; Kure, M; Mutou, T; Masaoka, H; Ohkubo, H. Relation between clinical and histologic outcome of intraperitoneal hyperthermic perfusion for patients with gastric cancer and peritoneal metastasis. **Oncology**, v. 50, n. 5, p. 338-343, 1993.

Fujimura, T; Yonemura, Y; Fushida, S; Urade, M; Takegawa, S; Kamata, T; Sugiyama, K; Hasegawa, H; Katayama, K; Miwa, K. *et al.* Continuous hyperther-

mic peritoneal perfusion for the treatment of peritoneal dissemination in gastric cancers and subsequent second-look operation. **Cancer**, v. 65, n. 1, p. 65-71, 1990.

Gabai, VL; Zamulaeva, IV; Mosin, AF; Makarova, YM; Mosina, VA; Budagova, KR; Malutina, YV; Kabakov, AE. Resistance of Ehrlich tumor cells to apoptosis can be due to accumulation of heat shock proteins. **FEBS Lett.**, v. 375, n. 1-2, p. 21-26, 1995.

Gardner, EJ; Rogers, SW; Woodward, S. Numerical and structural chromosome aberrations in cultured lymphocytes and cutaneous fibroblasts of patients with multiple adenomas of the colorectum. **Cancer**, v. 49, n. 7, p. 1413-1419, 1982.

Geller, PL; Nitzberg, RS. **Surgery pretest self-assessment and review**. 8th ed., New York: McGraw-Hill, 1998. 305p.

Gerke, P; Filejski, W; Robins, HI; Wiedemann, GJ; Steinhoff, J. Nephrotoxicity of ifosfamide, carboplatin and etoposide (ICE) alone or combined with extracorporeal or radiant-heat-induced whole-body hyperthermia. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 126, n. 3, p. 173-177, 2000.

Gerner, EW. Definition of the thermal dose. *In*: Overgaard, J (Ed.). **Hypethermic oncology**. London: Taylor and Francis, 1985. p. 253-262.

Giovanella, BC; Lohman, WA; Heidelberger, C. Effects of elevated temperatures and drugs on the viability of L1210 leukemia cells. **Cancer Res.**, v. 30, n. 6, p. 1623-1631, 1970.

Goldie, JH; Coldman, AJ. Genetic instability in the development of drug resistance. **Semin. Oncol.**, v. 12, n. 3, p. 222-230, 1985.

Green, PH; O'Toole, KM; Slonim, D; Wang, T; Weg, A. Increasing incidence and excellent survival of patients with early gastric cancer: experience in a United States medical center. **Am. J. Med.**, v. 85, n. 5, p. 658-661, 1988.

Grey, JM; Tinoco, EM; Rodrigues, A; Machado, AV; Pinheiro, CJ; Grey, RC; Cobra, CJFP *et al.* **Princípios de cirurgia**. Rio de Janeiro: FAE/MEC, 1986. p. 431-441.

Guillou, PF. The molecular biology of cancer. *In*: Taylor, I; Cooke, TG; Guillou, P. **Essential general surgical oncology**. New York: Churchill Livingstone, 1996. p. 13-26.

Hahn, GM. **Hyperthermia and cancer**. New York: Plenum Press, 1982. 285 p.

Hall, CN; Darkin, D; Brimblecombe, R; Cook, AJ; Kirkham, JS; Northfield, TC. Evaluation of the nitrosamine hypothesis of gastric carcinogenesis in precancerous conditions. **Gut**, v. 27, n. 5, p. 491-498, 1986.

Hallissey, MT; Dunn, JA; Ward, LC; Allum, WH. The second British Stomach Cancer Group trial of adjuvant radiotherapy or chemotherapy in resectable gastric cancer: five-year follow-up. **Lancet**, v. 343, n. 8909, p. 1309-1312, 1994.

Hamada, M; Fujiwara, T; Hizuta, A; Gochi, A; Naomoto, Y; Takakura, N; Takahashi, K; Roth, JA; Tanaka, N; Orita, K. The p53 gene is a potent determinant

of chemosensitivity and radiosensitivity in gastric and colorectal cancers. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 122, n. 6, p. 360-365, 1996.

Hammami, MM; Bouchama, A; Shail, E; Aboul-Enein, HY; Al-Sedairy, S. Lymphocyte subsets and adhesion molecules expression in heatstroke and heat stress. **J. Appl. Physiol.**, v. 84, n. 5, p. 1615-1621, 1988.

Hanawalt, PC; Sarasin, AR. Cancer-prone hereditary diseases with DNA processing abnormalities. **Trends Genet.**, v. 2, p. 124-129, 1986.

Harmon, BV; Corder, AM; Collins, RJ; Gobe, GC; Allen, J; Allan, DJ; Kerr, JF. Cell death induced in a murine mastocytoma by 42-47°C heating in vitro: evidence that the form of death changes from apoptosis to necrosis above a critical heat load. **Int. J. Radiat. Biol.**, v. 58, n. 5, p. 845-858, 1990.

Harris, CC. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. **Cancer Res.**, v. 51, n. 18 suppl., 5023s-5044s, 1991.

Hart, IR. Adhesion receptors and cancer. *In*: Horton, MA (Ed.). **Molecular biology of cell adhesion molecules**. New York: John Wiley, 1996. p. 87-98.

Hegewisch-Becker, S. MDR1 reversal: criteria for clinical trials designed to overcome the multidrug resistance phenotype. **Leukemia**, v. 10, suppl 3, p. S32-S38, 1996.

Hegewisch-Becker, S; Nierhaus, A; Panse, J; Wiedemann, G; Hossfeld, DK. Whole body hyperthermia has a stimulatory effect on the immune cell activity in cancer patients. **Ann. Oncol.**, v. 9, suppl 4, p. 136-137, 1998.

Heidelberger, C. Oncogenic transformation of rodent cell lines by chemical carcinogens. *In*: Hiatt, HH; Watson, JD; Winsten, JA (Eds.). **Origins of human cancer**. Book C: human risk and assessment. Cold Spring Harbor: Cold Spring Laboratory, 1977. p. 1513-1520.

Henle, KJ; Leeper, DB. Effects of hyperthermia (45°C) on macromolecular synthesis in Chinese hamster ovary cells. **Cancer Res.**, v. 39, n. 7 pt 1, p. 2665-2274, 1979.

Herman, TS; Cress, AE; Sweets, C; Gerner, EW. Reversal of resistance to methotrexate by hyperthermia in Chinese hamster ovary cells. **Cancer Res.**, v. 41, n. 10, p. 3840-3843, 1981.

Hermans, J; Bonenkamp, JJ; Boon, MC; Bunt, AM; Ohyama, S; Sasako, M; Van de Velde, CJ. Adjuvant therapy after curative resection for gastric cancer: meta-analysis of randomized trials. **J. Clin. Oncol.**, v. 11, n. 8, p. 1441-1447, 1993.

Herrenknecht, K. Cadherins. *In*: Horton, MA (Ed.). **Molecular biology of cell adhesion molecules**. New York: John Wiley, 1996. p. 45-70

Hettinga, JV; Konings, AW; Kampinga, HH. Reduction of cellular cisplatin resistance by hyperthermia – a review. **Int. J. Hyperthermia**, v. 13, n. 5, p. 439-457, 1997.

Higashikubo, R; White, RA; Roti Roti, JL. Flow cytometric BrdUrd-pulse-chase study of heat-induced cell-cycle progression delays. **Cell Prolif.**, v. 26, n. 4, p. 337-348, 1993.

Hildebrandt, B; Loeffel, J; Deja, M *et al.* Whole body hyperthermia induces a renewed remission in a patient with refractory germ cell tumor after high-dose chemotherapy. **Ann. Hematol.**, v. 77, suppl 2., p. 222, 1998.

Hildebrandt, B; Wust, P; Ahlers, O; Dieing, A; Sreenivasa, G; Kerner, T; Felix, R; Riess, H. The cellular and molecular basis of hyperthermia. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 43, n. 1, p. 33-56, 2002.

Hildebrandt, B; Wust, P; Rick, O *et al.* Whole body hyperthermia in germ cell tumors. **Onkologie**, v. 7, n. 3, p. 324-330, 2001.

Hillman, RS. Hematopoietic agents: growth factors, minerals and vitamins. *In:* Gilman, AG; Rall, TW; Nies, AS; Taylor, P. **The pharmacological basis of therapeutics**. New York: Pergamon Press, 1990. p. 1277-1310.

Hoeijmakers, JH. Human nucleotide excision repair syndromes: molecular clues to unexpected intricacies. **Eur. J. Cancer**, v. 30A, n. 13, p. 1912-1921, 1994.

Hoffman-Goetz, L; Pedersen, BK. Exercise and the immune system: a model of the stress response? **Immunol. Today**, v. 15, n. 8, p. 382-387, 1994.

Hope, RA; Longmore, JM; McManus, SK; Wood-Allum, CA. Carcinoma of the stomach. *In:* _____. Oxford handbook of clinical medicine. 4th ed., New York: Oxford University Press, 1998. p. 142.

Hospital das Clínicas de Porto Alegre. **Rotinas assistenciais para tratamento de pacientes com câncer**. Porto Alegre, RS, 1997.

Houghton, JA; Torrance, PM; Radparvar, S; Williams, LG; Houghton, PJ. Binding of 5-fluorodeoxyuridylate to thymidylate synthase in human colon adenocarcinoma xenografts. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.**, v. 22, n. 4, p. 505-510, 1986.

Hsu, SM; Raine, L; Fanger, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 29, n. 4, p. 577-580, 1981.

Ichiyoshi, Y; Toda, T; Minamisono, Y; Nagasaki, S; Yakeishi, Y; Sugimachi, K. Recurrence in early gastric cancer. **Surgery**, v. 107, n. 5, p. 489-495, 1990.

International Agency for Research on Cancer – IARC. GLOBOCAN 2000 – Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. **Banco de Dados**. 2000. Disponível em: <<http://www.dep.iarc.fr/globocan/globocan.html>>. Acesso em: 6 dez. 2002.

Isaacs, JT; Wake, N; Coffey, DS; Sandberg, AA. Genetic instability coupled to clonal selection as a mechanism for tumor progression in the Dunning R-3327 rat prostatic adenocarcinoma system. **Cancer Res.**, v. 42, n. 6, p. 2353-2371, 1982.

Issels, R. Hyperthermia combined with chemotherapy-biological rationale, clinical application and treatment results. **Onkologie**, v. 22, p. 374-381, 1999.

Issels, RD; Prenninger, SW; Nagele, A; Boehm, E; Sauer, H; Jauch, KW; Dencke, H; Berger, H; Peter, K; Wilmanns, W. Ifosfamide plus etoposide com-

bined with regional hyperthermia in patients with locally advanced sarcomas: a phase II study. **J. Clin. Oncol.**, v. 8, n. 11, p. 1818-1829, 1990.

Ito, Y; Azuma, T; Ito, S; Miyaji, H; Hirai, M; Yamazaki, Y; Sato, F; Kato, T; Kohli, Y; Kuriyama, M. Analysis and typing of the *vacA* gene from *cagA*-positive strains of *Helicobacter pylori* isolated in Japan. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 7, p. 1710-1714, 1997.

Iwakabe, K; Shimada, M; Ohta, A; Yahata, T; Ohmi, Y; Habu, S; Nishimura, T. The restraint stress drives a shift in Th1/Th2 balance toward Th2-dominant immunity in mice. **Immunol. Lett.**, v. 62, n. 1, p. 39-43, 1998.

Iwana de Mattos, MCF; Franco, MF. Megacariócitos e plaquetas no tumor de Walker experimental do rato. *In: Jornada Científica da Faculdade de Ciências Médicas de Botucatu*, 1., 1971, São Paulo. **Anais...** São Paulo, 1971. p. 219.

Iwana de Mattos, MCF; Montenegro, MR; Silva, CRV. Walker 256 carcinosarcoma: pathologic microscopic and ultrastructural features of the tumoral circulating cells. **Ciência e Saúde**, v. 32, n. 7, p. 849-857, 1980.

Iwanaga, T; Koyama, H; Takahashi, Y; Taniguchi, H; Wada, A. Diffuse submucosal cysts and carcinoma of the stomach. **Cancer**, v. 36, n. 2, p. 606-614, 1975.

Iwata, K; Shakil, A; Hur, WJ; Makepeace, CM; Griffin, RJ; Song, CW. Tumour pO_2 can be increased markedly by mild hyperthermia. **Br. J. Cancer Suppl.**, v. 27, p. S217-S221, 1996.

Jaattelä, M. Heat shock proteins as cellular lifeguards. **Ann. Med.**, v. 31, n. 4, p. 261-271, 1999.

Jain, RK; Ward-Hartley, K. Tumor blood flow-characterization, modification and role in hyperthermia. **IEEE Trans. Sonics Ultrasonic**, v. SU-31, n. 504-526, 1984.

Japanese Research Society for Gastric Cancer – JRSGC. **Japanese classification of gastric carcinoma**, First English ed., Tokyo: Kanehara, 1995.

Jensen, G; Muntzing, J. Differences in the growth of the Walker carcinoma in Sprague-Dawley and Wistar rats. **Zeitschrift fur Krebsforschung**, v. 74, n. 1, p. 55-58, 1970.

Juaçaba, HG; Frota, GMS; Lima, JM, Silva, IC; Sampaio, JBS. Gastric cancer in Fortaleza, Brazil: a study of 242 cases. **Rev. Med. Univ. Fed. Ceará**, v. 24, n. 1, p. 3-9, 1984.

Kampinga, HH. Hyperthermia, thermotolerance and topoisomerase II inhibitors. **Br. J. Cancer**, v. 72, n. 2, p. 333-338, 1995.

Kappel, M; Poulsen, TD; Galbo, H; Pedersen, BK. Influence of minor increases in plasma catecholamines on natural killer cell activity. **Horm. Res.**, v. 49, n. 1, p. 22-26, 1998.

Kappel, M; Stadeager, C; Tvede, N; Galbo, H; Pedersen, BK. Effects of in vivo hyperthermia on natural killer cell activity, in vitro proliferative responses and

blood mononuclear cell subpopulations. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 84, n. 1, p. 175-180, 1991.

Katona, E. The influence of age on organ-size changes due to tumour growth in rats. **Growth**, v. 36, n. 1, p. 35-43, 1972.

Keller HU, Zimmermann A. Shape changes and chemokinesis of Walker 256 carcinosarcoma cells in response to colchicine, vinblastine, nocodazole and taxol. **Invasion Metastasis**, v. 6, n. 1, p. 33-43, 1986.

Kerner, T; Deja, M; Ahlers, O; Loffel, J; Hildebrandt, B; Wust, P; Gerlach, H; Riess, H. Whole body hyperthermia: a secure procedure for patients with various malignancies? **Intensive Care Med.**, v. 25, n. 9, p. 959-965, 1999.

Kim, J; Bhang, C; Kim, S *et al.* Prevalence of Helicobacter vacA subtype is not different among related diseases in Korean patients. **Gastroenterology**, v. 116, p. A216, 1999.

Kim, SH; Kim, JH; Hahn, EW. The enhanced killing of irradiated HeLa cells in synchronous culture by hyperthermia. **Radiat. Res.**, v. 66, n. 2, p. 337-345, 1976.

Knox, JD; Mitchel, RE; Brown, DL. Effects of hyperthermia on microtubule organization and cytolytic activity of murine cytotoxic T lymphocytes. **Exp. Cell. Res.**, v. 194, n. 2, p. 275-283, 1991.

Kohlberger, P; Kainz, C; Breitenecker, G; Gitsch, G; Sliutz, G; Kolbl, H; Tschachler, E; Reinthaller, A. Prognostic value of immunohistochemically de-

tected p53 expression in vulvar carcinoma. **Cancer**, v. 76, n. 10, p. 1786-1789, 1995.

Kumar, N. Taxol-induced polymerization of purified tubulin. Mechanism of action. **J. Biol. Chem.**, v. 256, n. 20, p. 10435-10441, 1981.

Leal, BZ; Meltz, ML; Mohan, N; Kuhn, J; Prihoda, TJ; Herman, TS. Interaction of hyperthermia with Taxol in human MCF-7 breast adenocarcinoma cells. **Int. J. Hyperthermia**, v. 15, n. 3, p. 225-236, 1999.

Ledbetter, DH. Minireview: cryptic translocations and telomere integrity. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 51, n. 3, p. 451-456, 1992.

Leighton, J; Justh, G; Esper, M. Collagen-coated cellulose sponge: three dimensional matrix for tissue culture of Walker tumor 256. **Science**, v. 155, p. 1259-1261, 1967.

Li, GC; Mivechi, NF; Weitzel, G. Heat shock proteins, thermotolerance, and their relevance to clinical hyperthermia. **Int. J. Hyperthermia**, v. 11, n. 4, p. 459-488, 1995.

Lin, CW; Wu, SC; Lee, SC; Cheng, KS. Genetic analysis and clinical evaluation of vacuolating cytotoxin gene A and cytotoxin-associated gene A in Taiwanese *Helicobacter pylori* isolates from peptic ulcer patients. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 32, n. 1, p. 51-57, 2000.

Lindquist, S; Craig, EA. The heat-shock proteins. **Annu. Rev. Genet.**, v. 22, p. 631-677, 1988.

Liu, FF; Miller, N; Levin, W; Zanke, B; Cooper, B; Henry, M; Sherar, MD; Pintilie, M; Hunt, JW; Hill, RP. The potential role of HSP70 as an indicator of response to radiation and hyperthermia treatments for recurrent breast cancer. **Int. J. Hyperthermia**, v. 12, n. 2, p. 197-208, 1996.

Liu, F-F; Wilson, BC. Hyperthermia and Photodynamic Therapy. *In*: Tannock, IF; Hill, RP. **The basic science of oncology**. New York: McGraw-Hill, 1987. p. 443-465.

Maeda, S; Ogura, K; Yoshida, H; Kanai, F; Ikenoue, T; Kato, N; Shiratori, Y; Omata, M. Major virulence factors, VacA and CagA, are commonly positive in *Helicobacter pylori* isolates in Japan. **Gut**, v. 42, n. 3, p. 338-343, 1998.

Maes, M; Van Bockstaele, DR; Gastel, A; Song, C; Schotte, C; Neels, H; DeMeester, I; Scharpe, S; Janca, A. The effects of psychological stress on leukocyte subset distribution in humans: evidence of immune activation. **Neuropsychobiology**, v. 39, n. 1, p. 1-9, 1999.

Mäkelä, TP; Alitalo, K. Proto-oncogene amplification: role in tumour progression. **Ann. Clin. Res.**, v. 18, n. 5-6, p. 290-296, 1986.

Malins, DC; Polissar, NL; Gunselman, SJ. Tumor progression to the metastatic state involves structural modifications in DNA markedly different from those associated with primary tumor formation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, n. 24, p. 14047-14052, 1996.

Manfredi, JJ; Horwitz, SB. Taxol: an antimitotic agent with a new mechanism of action. **Pharmacol. Ther.**, v. 25, n. 1, p. 83-125, 1984.

Mantel, N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. **Cancer Chemother. Rep.**, v. 50, n. 3, p. 163-170, 1966.

Markman M. Intraperitoneal therapy for treatment of malignant disease principally confined to the peritoneal cavity. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 14, n. 1, p. 15-28, 1993.

Markman, M; Berek, JS; Blessing, JA; McGuire, WP; Bell, J; Homesley, HD. Characteristics of patients with small-volume residual ovarian cancer unresponsive to cisplatin-based ip chemotherapy: lessons learned from a Gynecologic Oncology Group phase II trial of ip cisplatin and recombinant alpha-interferon. **Gynecol. Oncol.**, v. 45, n. 1, p. 3-8, 1992.

Mattos, LAJ; Goldenzon Filho, I. *Helicobacter pylori*: por que tão importante? In: Barroso, LF. **Cirurgia da doença hepática gastroduodenal** – estado atual. Rio de Janeiro: Atheneu, 1996. v. 2, p. 39-49.

McGuire, WP; Hoskin, WJ; Brady, MF *et al.* A phase III trial comparing cisplatin/cytoxan and cisplatin/taxol in advanced ovarian cancer. **Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.**, v. 12, p. 255, 1993.

McGuire, WP; Rowinsky, EK; Rosenshein, NB; Grumbine, FC; Ettinger, DS; Armstrong, DK; Donehower, RC. Taxol: a unique antineoplastic agent with significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasms. **Ann. Intern. Med.**, v. 111, n. 4, p. 273-279, 1989.

Miehlke, S; Kirsch, C; Agha-Amiri, K; Gunther, T; Lehn, N; Malfertheiner, P; Stolte, M; Ehninger, G; Bayerdorffer, E. The *Helicobacter pylori* vacA s1, m1

genotype and *cagA* is associated with gastric carcinoma in Germany. **Int. J. Cancer**, v. 87, n. 3, p. 322-327, 2000.

Mills, MD; Meyn, RE. Hyperthermic potentiation of unrejoined DNA strand breaks following irradiation. **Radiat. Res.**, v. 95, n. 2, p. 327-338, 1983.

Mini, E; Dombrowski, J; Moroson, BA; Bertino, JR. Cytotoxic effects of hyperthermia, 5-fluorouracil and their combination on a human leukemia T-lymphoblast cell line, CCRF-CEM. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.**, v. 22, n. 8, p. 927-934, 1986.

Miwa, H; Go, MF; Sato, N. *H. pylori* and gastric cancer: the Asian enigma. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 97, n. 5, p. 1106-1112, 2002.

Mizuno, S; Amagai, M; Ishida, A. Synergistic cell killing by antitumor agents and hyperthermia in cultured cells. **Jpn. J. Cancer Res.**, v. 71, n. 4, p. 471-478, 1980.

Moertel, CG; Childs, DS; O'Fallon, JR; Holbrook, MA; Schutt, AJ; Reitemeier, RJ. Combined 5-fluorouracil and radiation therapy as a surgical adjuvant for poor prognosis gastric carcinoma. **J. Clin. Oncol.**, v. 2, n. 11, p. 1249-1254, 1984.

Moertel, CG; Schutt, AJ; Hahn, RG; Reitemeier, RJ. Therapy of advanced colorectal cancer with a combination of 5-fluorouracil, methyl-1,3-cis(2-chlorethyl)-1-nitrosourea, and vincristine. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 54, n. 1, p. 69-71, 1975.

Montgomery, DC. **Designs and analysis of experiments**. 3rd ed., New York: John Wiley, 1991. 649p.

Moraes Filho, MO. **Efeitos antineoplásicos do *Croton mucronifolius* Mull. Arg. no carcinossarcoma 256 de Walker**. 1981. 180 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1981.

Moraes Filho, MO; Fonteles, MC; Matos, FJA; Moraes, MEA. Atividade anti-tumoral de plantas do Nordeste Brasileiro. **Ciência e Saúde**, v. 31, n. 7, p. 647, 1980.

Morimoto, RI. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. **Science**, v. 259, n. 5100, p. 1409-1410, 1993.

Muir, CS, Harvey, JC. Cancer of the stomach: overview. *In*: Sugimura, T; Sasaki, M. **Gastric cancer**. New York: Oxford University Press, 1997. v. 1, p. 3-21.

Mukhopadhyay, AK; Kersulyte, D; Jeong, JY; Datta, S; Ito, Y; Chowdhury, A; Chowdhury, S; Santra, A; Bhattacharya, SK; Azuma, T; Nair, GB; Berg, DE. Distinctiveness of genotypes of *Helicobacter pylori* in Calcutta, India. **J. Bacteriol.**, v. 182, n. 11, p. 3219-3227, 2000.

Muraro, CPM. Tumores benignos do estômago. *In*: _____. **Temas de cirurgia do aparelho digestivo alto**. São Paulo: Fundo Editorial Byk, 2000. cap. 7, p. 157-160.

Muraro, CPM; Mantovani, M. **Temas de cirurgia do aparelho digestivo alto**. São Paulo: Fundo Editorial Byk, 2000. cap. 5, p. 131-155.

Murnane, JP. The role of recombinational hotspots in genome instability in mammalian cells. **Bioessays**, v. 12, n. 12, p. 577-578, 1990.

Nabeya, Y; Loganzo, F Jr; Maslak, P; Lai, L; De Oliveira, AR; Schwartz, GK; Blundell, ML; Altorki, NK; Kelsen, DP; Albino, AP. The mutational status of p53 protein in gastric and esophageal adenocarcinoma cell lines predicts sensitivity to chemotherapeutic agents. **Int. J. Cancer**, v. 64, n. 1, p. 37-46, 1995.

Nakashima, H; Honda, M; Inoue, H; Shibuta, K; Arinaga, S; Era, S; Ueo, H; Mori, M; Akiyoshi, T. Microsatellite instability in multiple gastric cancers. **Int. J. Cancer**, v. 64, n. 4, p. 239-242, 1995.

Nakatsuru, S; Yanagisawa, A; Ichii, S; Tahara, E; Kato, Y; Nakamura, Y; Horii, A. Somatic mutation of the APC gene in gastric cancer: frequent mutations in very well differentiated adenocarcinoma and signet-ring cell carcinoma. **Hum. Mol. Genet.**, v. 1, n. 8, p. 559-563, 1992.

Navone, NM; Troncoso, P; Pisters, LL; Goodrow, TL; Palmer, JL; Nichols, WW; von Eschenbach, AC; Conti, CJ. p53 protein accumulation and gene mutation in the progression of human prostate carcinoma. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 85, n. 20, p. 1657-1669, 1983.

Neta, R; Oppenheim, JJ. Radioprotection with cytokines: a clarification of terminology. **Cancer Cells**, v. 3, n. 11, p. 457, 1991.

Neta, R; Perlstein, R; Vogel, SN; Ledney, GD; Abrams, J. Role of interleukin 6 (IL-6) in protection from lethal irradiation and in endocrine responses to IL-1 and tumor necrosis factor. **J. Exp. Med.**, v. 175, n. 3, p. 689-694, 1992.

Neubauer, A; Thiede, C; Huhn, D; Wittig, B. p53 and induction of apoptosis as a target for anticancer therapy. **Leukemia**, v. 10, suppl 3, p. S2-S4, 1996.

Neumann, HA; Fiebig, HH; Lohr, GW; Engelhardt, R. Effects of cytostatic drugs and 40.5°C hyperthermia on human bone marrow progenitors (CFU-C) and human clonogenic tumor cells implanted into mice. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 75, n. 6, p. 1059-1066, 1985.

Nicolson, GL. Generation of phenotypic diversity and progression in metastatic tumor cells. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 3, n. 1, p. 25-42, 1984.

Nishisho, I; Nakamura, Y; Miyoshi, Y; Miki, Y; Ando, H; Horii, A; Koyama, K; Utsunomiya, J; Baba, S; Hedge, P. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. **Science**, v. 253, n. 5020, p. 665-669, 1991.

Noble, RL. Hormonal control of growth and progression in tumors of Nb rats and a theory of action. **Cancer Res.**, v. 37, n. 1, p. 82-94, 1977.

Noguchi, Y; Imada, T; Matsumoto, A; Coit, DG; Brennan, MF. Radical surgery for gastric cancer. A review of the Japanese experience. **Cancer**, v. 64, n. 10, p. 2053-2062, 1989.

Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. **Science**, v. 194, n. 4260, p. 23-28, 1976.

Oh, HJ; Chen, X; Subjeck, JR. Hsp110 protects heat-denatured proteins and confers cellular thermoresistance. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 50, p. 31636-31640, 1997.

Oleson, JR. Hyperthermia. *In*: DeVita, VT Jr; Hellman, S; Rosenberg, SA (Eds.). **Cancer** – Principles and practice of oncology. Philadelphia: Lippincott, 1993. p. 2417-2448.

Oliveira Filho, RS; Bevilacqua, RG; Chammas, R. Hyperthermia increases the metastatic potential of murine melanoma. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 30, n. 8, p. 941-945, 1997.

Oliveira, PFM. **Avaliação dos efeitos da hipertermia associada à quimioterapia em tumores experimentais implantados no estômago de ratos.** 1997. 84 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1997.

Oliveira, PFM; Bruno, DS; Rodrigues Filho, F; Castro, PB; Ferreira, DM. Estabelecimento de um modelo experimental murino de tumor gástrico. *In*: Reunião da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 10., 1995, Serra Negra. **Anais...** Serra Negra: Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 1995. p. 424.

Overgaard, J. Influence of extracellular pH on the viability and morphology of tumor cells exposed to hyperthermia. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 56, n. 6, p. 1243-1250, 1976.

Overgaard, J; Jorgen, AB. Hyperthermia. *In*: Peckham, M; Pinedo, HM; Veronesi, U. **Oxford textbook of oncology**. New York: Oxford University Press, 1985. v. 1, p. 823-835.

Pearson, FG. **Thoracic surgery**. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2002.

Pereira, FEL. Degenerações. Morte celular. Alterações do interstício. *In*: Brasileiro Filho, G.; Pittella, JEH; Pereira, FEL; Bambina, EA; Barbosa, AJ. **Bogliolo – Patologia**. 4. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1994. p. 46-81.

Pinheiro, LGP; Ferraz, EM; Miranda, CK; Otoch, M; Moraes, MO. Carcinossarcoma de Walker 256 implantado no estômago de ratos: tratamento cirúrgico. **Rev. Fac. Med. Univ. Pernambuco**, v. 45, n. 1, p. 13-17, 2000.

Poremba, C; Yandell, DW; Huang, Q; Little, JB; Mellin, W; Schmid, KW; Bocker, W; Dockhorn-Dworniczak, B. Frequency and spectrum of p53 mutations in gastric cancer – a molecular genetic and immunohistochemical study. **Virchows Arch.**, v. 426, n. 5, p. 447-455, 1995.

Rao, S; Horwitz, SB; Ringel, I. Direct photoaffinity labeling of tubulin with taxol. **J. Natl. Cancer. Inst.**, v. 84, n. 10, p. 785-788, 1992.

Ray, FE; Cromer, MA; Aycock, AC; Pitzer, N. The selection of gastric carcinogens. **Brit. J. Cancer**, v. 15, p. 816-820, 1961.

Reinhold, HS; Endrich, B. Tumour microcirculation as a target for hyperthermia. **Int. J. Hyperthermia**, v. 2, n. 2, p. 111-137, 1986.

Rietbroek, RC; Schilthuis, MS; Bakker, PJ; Van Dijk, JD; Postma, AJ; Gonzalez Gonzalez, D; Bakker, AJ; Van der Velden, J; Helmerhorst, TJ; Veenhof, CH. Phase II trial of weekly locoregional hyperthermia and cisplatin in patients with a previously irradiated recurrent carcinoma of the uterine cervix. **Cancer**, v. 79, n. 5, p. 935-943, 1997.

Robbins, SL; Kumar, V; Cotran, RS. **Robbins – Patologia estrutural e funcional**. 4. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1991. p. 204.

Robins, HI; Cohen, JD; Schmitt, CL; Tutsch, KD; Feierabend, C; Arzoomanian, RZ; Alberti, D; D'Oleire, F; Longo, W; Heiss, C; Rushing, D; Love, R; Spriggs, D. Phase I clinical trial of carboplatin and 41.8°C whole-body hyperthermia in cancer patients. **J. Clin. Oncol.**, v. 11, n. 9, p. 1787-1794, 1993.

Robins, HI; Kutz, M; Wiedemann, GJ; Katschinski, DM; Paul, D; Grosen, E; Tiggelaar, CL; Spriggs, D; Gillis, W; D'Oleire, F. Cytokine induction by 41.8°C whole body hyperthermia. **Cancer Lett.**, v. 97, n. 2, p. 195-201, 1995.

Rosales, C; O'Brien, V; Kornberg, L; Juliano, R. Signal transduction by cell adhesion receptors. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1242, n. 1, p. 77-98, 1995.

Rose, WC; Veras, GH; Laster, WR Jr; Schabel, FM Jr. Evaluation of whole-body hyperthermia as an adjunct to chemotherapy in murine tumors. **Cancer Treat. Rep.**, v. 63, n. 8, p. 1311-1325, 1979.

Rosen, N. Cancers of the gastrointestinal tract. *In*: DeVita, VT Jr; Hellman, S; Rosenberg, SA (Eds.). **Cancer – Principles and practice of oncology**. 5th ed., Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. p. 971-1053.

Roti Roti, JL; Kampinga, HH; Malyapa, RS; Wright, WD; vanderWaal, RP; Xu, M. Nuclear matrix as a target for hyperthermic killing of cancer cells. **Cell Stress Chaperones**, v. 3, n. 4, p. 245-255, 1998.

Sager, R; Gadi, IK; Stephens, L; Grabowy, CT. Gene amplification: an example of accelerated evolution in tumorigenic cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 20, p. 7015-7019, 1985.

Sakaguchi, Y; Stephens, L; Danhauser, L; Makino, M; Strebel, FR; Jenkins, G; Bull, JMC. Enhancement of antitumor effect and induction of apoptosis by a combination of 5-fluorouracil and whole body hyperthermia in rats. **Proc. Am. Assoc. Cancer Res.**, v. 34, p. 361 (2151), 1993a.

Sakaguchi, Y; Stephens, LC; Makino, M; Danhauser, LL; Strebel, FR; Jenkins, G; Kaneto, T; Bull, JMC. Efficacy of prolonged intravenous infusion of 5-fluorouracil combined with hyperthermia *in vivo*. **Proc. Am. Assoc. Cancer Res.**, v. 34, p. 361 (2151), 1993b.

Sakaguchi, Y; Stephens, LC; Makino, M; Kaneko, T; Strebel, FR; Danhauser, LL; Jenkins, GN; Bull, JM. Apoptosis in tumors and normal tissues induced by whole body hyperthermia in rats. **Cancer Res.**, v. 55, n. 22, p. 5459-5464, 1995.

Sampaio, MRP; Oliveira, MM. Triagem de substâncias e extratos de origem vegetal no carcinossarcoma de Walker 256. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 47, n. 1, p. 148-153, 1975.

Santos, JCM; Santos, CCM. Tratamento coadjuvante do câncer do reto: quimioterapia. **Rev. Bras. Coloproctol.**, v. 17, n. 2, p. 143-149, 1997.

Sapareto, SA. Thermal isoeffect dose: addressing the problem of thermotolerance. **Int. J. Hyperthermia**, v. 3, p. 4, n. 297-305, 1987.

Sargent, L; Xu, YH; Sattler, GL; Meisner, L; Pitot, HC. Ploidy and karyotype of hepatocytes isolated from enzyme-altered foci in two different protocols of multistage hepatocarcinogenesis in the rat. **Carcinogenesis**, v. 10, n. 2, p. 387-391, 1989.

Sato, T; Akiyama, F; Sakamoto, G; Kasumi, F; Nakamura, Y. Accumulation of genetic alterations and progression of primary breast cancer. **Cancer Res.**, v. 51, n. 21, p. 5794-5799, 1991.

Schiff, PB; Fant, J; Horwitz, SB. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. **Nature**, v. 277, n. 5698, p. 665-667, 1979.

Schiff, PB; Horwitz, SB. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 77, n. 3, p. 1561-1565, 1980.

Schlag, H; Lucke-Huhle, C. Cytokinetic studies on the effect of hyperthermia on Chinese hamster lung cells. **Eur. J. Cancer**, v. 12, n. 10, p. 827-831, 1976.

Schrek, R. A quantitative study of the growth of the Walker rat tumor and the Flexner jobbing rat carcinoma. **Am. J. Cancer**, v. 24, p. 807-822, 1935.

Schrek, R; Avery, RC. Histological observation on transplantable rat and rabbit tumors cultivated in the chorio-allantoic membrane of chick embryos, with special reference to the Walker rat tumor 256. **Am. J. Path.**, v. 13, 45-41, 1937.

Seegenschmiedt, MH; Vernon, CC. A historical perspective on hyperthermia in oncology. *In*: Seegenschmiedt, MH; Fessenden, P; Vernon, CC. **Thermoradiotherapy and thermochemotherapy**. New York: Springer, 1995. p. 3-44.

Sengstag, C. The role of mitotic recombination in carcinogenesis. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 24, n. 4, p. 323-353, 1994.

Shen, RN; Hornback, NB; Shidnia, H; Wu, B; Lu, L; Broxmeyer, HE. Whole body hyperthermia: a potent radioprotector *in vivo*. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v. 20, n. 3, p. 525-530, 1991.

Shen, RN; Lu, L; Young, P; Shidnia, H; Hornback, NB; Broxmeyer, HE. Influence of elevated temperature on natural killer cell activity, lymphokine-activated killer cell activity and lectin-dependent cytotoxicity of human umbilical cord blood and adult blood cells. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v. 29, n. 4, p. 821-826, 1994.

Shields, T. **General thoracic surgery**. 5th ed., Philadelphia: Williams & Wilkins, 2001.

Siegel, SE; Hays, DM; Romansky, S; Isaacs, H. Carcinoma of the stomach in childhood. **Cancer**, v. 38, n. 4, p. 1781-1784, 1976.

Simpson, AJ. The natural somatic mutation frequency and human carcinogenesis. **Adv. Cancer Res.**, v. 71, p. 209-240, 1997.

Singer, JM; Andrade, DF. **Análise de dados longitudinais**. VII Simpósio Nacional de Probabilidade e Estatística, Campinas, SP, 1995. 106p.

Slater, E; Owen, RJ; Williams, M; Pounder, RE. Conservation of the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*: associations with vacuolating cytotoxin allele and IS605 diversity. **Gastroenterology**, v. 117, n. 6, p. 1308-1315, 1999.

Smith, SS. Stalling of DNA methyltransferase in chromosome stability and chromosome remodelling (Review). **Int. J. Mol. Med.**, v. 1, n. 1, p. 147-156, 1998.

Soares, JF; Colosimo, EA. **Métodos estatísticos na pesquisa clínica**. 40^a Reunião Anual da Sociedade Internacional de Biometria, Ribeirão Preto, SP, 1995. 105p.

Song, CW; Lyons, JC; Griffin, RJ; Makepeace, CM; Cragoe, EJ Jr. Increase in thermosensitivity of tumor cells by lowering intracellular pH. **Cancer Res.**, v. 53, n. 7, p. 1599-1601, 1993.

Song, CW; Shakil, A; Griffin, RJ; Okajima, K. Improvement of tumor oxygenation status by mild temperature hyperthermia alone or in combination with carbogen. **Semin. Oncol.**, v. 24, n. 6, p. 626-632, 1997.

Sood, AK; Skilling, JS; Buller, RE. Ovarian cancer genomic instability correlates with p53 frameshift mutations. **Cancer Res.**, v. 57, n. 6, p. 1047-1049, 1997.

Spratt, JS; Adcock, RA; Muskovin, M; Sherrill, W; McKeown, J. Clinical delivery system for intraperitoneal hyperthermic chemotherapy. **Cancer Res.**, v. 40, n. 2, p. 256-260, 1980.

Staley, CA. Gastric carcinoma. *In*: Berger, DH; Feig, BW; Fuhrman, GM (Eds.). **The M. D. Anderson surgical oncology handbook**. Boston: Little Brown, 1995. p. 120-141.

Steel, CG. Clonogenic tumor cells. **J. Cell. Phys.**, v. 3, p. 21-27, 1984.

Stein, U; Rau, B; Wust, P; Walther, W; Schlag, PM. Hyperthermia for treatment of rectal cancer: evaluation for induction of multidrug resistance gene (mdr1) expression. **Int. J. Cancer**, v. 80, n. 1, p. 5-12, 1999.

Stephens, LC; Meyn, RE. Apoptosis in vivo. *In*: Teicher, BA (Ed.). **Tumor models in cancer research**. New Jersey: Humana Press, 2002. cap. 33, p. 633-645.

Stevenson, MA; Minton, KW; Hahn, GM. Survival and concanavalin-A-induced capping in CHO fibroblasts after exposure to hyperthermia, ethanol, and X irradiation. **Radiat. Res.**, v. 86, n. 3, p. 467-478, 1981.

Stewart, HL; Svell, KC; Duham, LJ; Schlyen, MS. **Transplantable and transmissible tumors of animals**. 1st ed., Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1959.

Streffer, C. Aspects of metabolic change after hyperthermia. **Recent Results Cancer Res.**, v. 107, p. 7-16, 1988.

Streffer, C. Metabolic changes during and after hyperthermia. **Int. J. Hyperthermia**, v. 1, n. 4, p. 305-319, 1985.

Streffer, C; Van Beuningen, D; Devi, PU. Radiosensitization by hyperthermia in human melanoma cells: single and fractionated treatments. **Cancer Treat. Rev.**, v. 11, suppl. A, p. 179-185, 1984.

Sugarbaker, PH; Anerbach, AM; Jacquet, P. *et al.* A simplified approach to hyperthermic intraoperative intraperitoneal chemotherapy (HICC) using a self retaining refractor. *In*: Sugarbaker, PH. **Peritoneal carcinomatosis**: principles of management. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1996. p. 415-421.

Sugarbaker, PH; Gianola, FJ; Speyer, JC; Wesley, R; Barofsky, I; Meyers, CE. Prospective, randomized trial of intravenous versus intraperitoneal 5-fluorouracil in patients with advanced primary colon or rectal cancer. **Surgery**, v. 98, n. 3, p. 414-422, 1985.

Taghian, DG; Nickoloff, JA. Chromosomal double-strand breaks induce gene conversion at high frequency in mammalian cells. **Mol. Cell. Biol.**, v. 17, n. 11, p. 6386-6393, 1997.

Tahara, E. Genetic alterations in human gastrointestinal cancers. The application to molecular diagnosis. **Cancer**, v. 75, n. 6 suppl., p. 1410-1417, 1995a.

Tahara, E. Molecular biology of gastric cancer. **World J. Surg.**, v. 19, n. 4, p. 484-488, 1995b.

Tahara, E; Semba, S; Tahara, H. Molecular biological observations in gastric cancer. **Semin. Oncol.**, v. 23, n. 3, p. 307-315, 1996.

Takai, S; Iwama, T; Tonomura, A. Chromosome instability in cultured skin fibroblasts from patients with familial polyposis coli and Peutz-Jeghers' syndrome. **Jpn. J. Cancer Res.**, v. 77, n. 8, p. 759-766, 1986.

Taki, K; Kuwabara, N. Studies on histogenesis of the gastric carcinoma using minute cancers. **Pathol. Res. Pract.**, v. 172, n. 1-2, p. 176-190, 1981.

Talalay, P; Takano, EMV; Hughins, P. Studies on the Walker tumor. I. Standardization of growth of a transplantable tumor. **Cancer Res.**, v. 12, p. 834-837, 1952.

Tamura, G; Kihana, T; Nomura, K; Terada, M; Sugimura, T; Hirohashi, S. Detection of frequent p53 gene mutations in primary gastric cancer by cell sorting and polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism analysis. **Cancer Res.**, v. 51, n. 11, p. 3056-3058, 1991.

Tanaka, S; Toh, Y; Adachi, E; Matsumata, T; Mori, R; Sugimachi, K. Tumor progression in hepatocellular carcinoma may be mediated by p53 mutation. **Cancer Res.**, v. 53, n. 12, p. 2884-2887, 1993.

Tannenbaum, SR; Moran, D; Rand, W; Cuello, C; Correa, P. Gastric cancer in Colombia. IV. Nitrite and other ions in gastric contents of residents from a high-risk region. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 62, n. 1, p. 9-12, 1979.

Tatsuta, M; Iishi, H; Nakaizumi, A; Okuda, S; Taniguchi, H; Hiyama, T; Tsukuma, H; Oshima, A. Fundal atrophic gastritis as a risk factor for gastric cancer. **Int. J. Cancer**, v. 53, n. 1, p. 70-74, 1993.

Tlsty, TD. Gene amplification as marker for studying genomic instability. **Methods Mat. Genet.**, v. 8, p. 388-401, 1996.

Tlsty, TD; Jonczyk, P; White, A; Sage, M; Hall, I; Schaefer, D; Briot, A; Livanos, E; Roelofs, H; Poulouse, B *et al.* Loss of chromosomal integrity in neoplasia. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.**, v. 58, p. 645-654, 1993.

Tlsty, TD; Margolin, BH; Lum, K. Differences in the rates of gene amplification in nontumorigenic and tumorigenic cell lines as measured by Luria-Delbruck fluctuation analysis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, n. 23, p. 9441-9445, 1989.

Tso, PL; Bringaze, WL 3rd; Dauterive, AH; Correa, P; Cohn, I Jr. Gastric carcinoma in the young. **Cancer**, v. 59, n. 7, p. 1362-1365, 1987.

Tuyns, AJ. Salt and gastrointestinal cancer. **Nutr. Cancer**, v. 11, n. 4, p. 229-232, 1988.

Ullman, B; Lee, M; Martin, DW Jr; Santi, DV. Cytotoxicity of 5-fluoro-2'-deoxyuridine: requirement for reduced folate cofactors and antagonism by methotrexate. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 75, n. 2, p. 980-983, 1978.

Urano, M; Gerweck, LE; Epstein, R; Cunningham, M; Suit, HD. Response of a spontaneous murine tumor to hyperthermia: factors which modify the thermal response in vivo. **Radiat. Res.**, v. 83, n. 2, p. 312-322, 1980.

Urano, M; Kuroda, M; Nishimura, Y. For the clinical application of thermochemotherapy given at mild temperatures. **Int. J. Hyperthermia**, v. 15, n. 2, p. 79-107, 1999.

Van Bree, C; Van der Maat, B; Ceha, HM; Franken, NA; Haveman, J; Bakker, PJ. Inactivation of p53 and of pRb protects human colorectal carcinoma cells against hyperthermia-induced cytotoxicity and apoptosis. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 125, n. 10, p. 549-555, 1999.

Van Doorn, LJ; Figueiredo, C; Megraud, F; Pena, S; Midolo, P; Queiroz, DM; Carneiro, F; Vanderborght, B; Pegado, MD; Sanna, R; De Boer, W; Schneeberger, PM; Correa, P; Ng, EK; Atherton, J; Blaser, MJ; Quint, WG. Geographic distribution of vacA allelic types of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, v. 116, n. 4, p. 823-830, 1999.

Vanakoski, J; Seppälä, T. Heat exposure and drugs. A review of the effects of hyperthermia on pharmacokinetics. **Clin. Pharmacokinet.**, v. 34, n. 4, p. 311-322, 1998.

Vaupel, P; Kallinowski, F; Okunieff, P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. **Cancer Res.**, v. 49, n. 23, p. 6449-6465, 1989.

Vidair, CA; Dewey, WC. Evaluation of a role for intracellular Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , and Mg^{2+} in hyperthermic cell killing. **Radiat. Res.**, v. 105, n. 2, p. 187-200, 1986.

_____. Two distinct modes of hyperthermic cell death. **Radiat. Res.**, v. 116, n. 1, p. 157-171, 1988.

Von Ardenne, M; Chaplain, RA; Reitnauer, PG. Selective injury to cancer cells by a combined attack with acidification, heat, vitamin A, dimethyl sulfoxide and other agents facilitating the release of lysosomal enzymes. **Arch. Geschwulstforsch.**, v. 33, n. 4, p. 331-344, 1969.

Von Ardenne, M; Reitnauer, PG. Manipulated selective inhibition of microcirculation in cancer tissues. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 103, n. 3, p. 269-279, 1982.

Wachsberger, PR; Landry, J; Storck, C; Davis, K; O'Hara, MD; Owen, CS; Leeper, DB; Coss, RA. Mammalian cells adapted to growth at pH 6.7 have elevated HSP27 levels and are resistant to cisplatin. **Int. J. Hyperthermia**, v. 13, n. 3, p. 251-255, 1997.

Wallin, M; Nordh, J; Deinum, J. Changes in the hydrodynamic properties of microtubules induced by taxol. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 880, n. 2-3, p. 189-196, 1986.

Wang, HJ; Kuo, CH; Yeh, AA; Chang, PC; Wang, WC. Vacuolating toxin production in clinical isolates of *Helicobacter pylori* with different vacA genotypes. **J. Infect. Dis.**, v. 178, n. 1, p. 207-212, 1998.

Webb, PM; Crabtree, JE; Forman, D. Gastric cancer, cytotoxin-associated gene A-positive *Helicobacter pylori*, and serum pepsinogens: an international study. The Eurogst Study Group. **Gastroenterology**, v. 116, n. 2, p. 269-276, 1999.

Welch, DR; Tomasovic, SP. Implications of tumor progression on clinical oncology. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 3, n. 3, p. 151-188, 1985.

Wernicke, R. **Curso de Física Biológica**. 5. ed., Tomo II, Buenos Aires: El Ateneo, 1949.

Wessalowski, R; Kruck, H; Pape, H; Kahn, T; Willers, R; Gobel, U. Hyperthermia for the treatment of patients with malignant germ cell tumors: a phase I/II study in ten children and adolescents with recurrent or refractory tumors. **Cancer**, v. 82, n. 4, p. 793-800, 1998.

Westra, A; Dewey, WC. Variation in sensitivity to heat shock during the cell-cycle of Chinese hamster cells *in vitro*. **Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.**, v. 19, n. 5, p. 467-477, 1971.

White, E. Life, death, and the pursuit of apoptosis. **Genes Dev.**, v. 10, n. 1, p. 1-15, 1996.

Wiedemann, GJ; D'Oleire, F; Knop, E; Eleftheriadis, S; Bucsky, P; Feddersen, S; Klouche, M; Geisler, J; Mentzel, M; Schmucker, P *et al.* Ifosfamide and carboplatin combined with 41.8°C whole-body hyperthermia in patients with refractory sarcoma and malignant teratoma. **Cancer Res.**, v. 54, n. 20, p. 5346-5350, 1994.

Wiedemann, GJ; Katschinski, DM; Mentzel, M; D'Oleire, F; Wagner, T; Robins HI. Ifosfamide, carboplatin and etoposide combined with aquatherm induced 41.8°C whole-body hyperthermia (WBH) for refractory sarcoma. **J. Clin. Oncol.**, v. 14, p. 1751, 1996.

Wiedemann, GJ; Siemens, HJ; Mentzel, M; Biersack, A; Wossmann, W; Knocks, D; Weiss, C; Wagner, T. Effects of temperature on the therapeutic efficacy and pharmacokinetics of ifosfamide. **Cancer Res.**, v. 53, n. 18, p. 4268-4272, 1993.

Winer, BJ. **Statistical principles in experimental design**. 2nd ed., New York: McGraw-Hill, 1971. 907p.

Wolman, SR. Karyotypic progression in human tumors. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 2, n. 3, p. 257-293, 1983.

Wolmark, N; Rockette, H; Fisher, B; Wickerham, DL; Redmond, C; Fisher, ER; Jones, J; Mamounas, EP; Ore, L; Petrelli, NJ; et al. The benefit of leucovorin-modulated fluorouracil as postoperative adjuvant therapy for primary colon cancer: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project protocol C-03. **J. Clin. Oncol.**, v. 11, n. 10, p. 1879-1887, 1993.

Yamagata, S; Hisamichi, S. Epidemiology of cancer of the stomach. **World J. Surg.**, v. 3, n. 6, p. 663-669, 1979a.

_____. Precancerous lesions of the stomach. **World J. Surg.**, v. 3, n. 6, p. 671-673, 1979b.

Yonezawa, M; Otsuka, T; Matsui, N; Tsuji, H; Kato, KH; Moriyama, A; Kato, T. Hyperthermia induces apoptosis in malignant fibrous histiocytoma cells in vitro. **Int. J. Cancer**, v. 66, n. 3, p. 347-351, 1996.

Younes, RN. **Tumores torácicos**. Rio de Janeiro: Medsi, 1997.

Zaniboni, A; Ehroichmanc; Seitz, JF; et al. FU/FA increases disease free survival in resected colon cancer: results of a prospective pooled analysis of three randomised trials. **Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.**, v. 12 n. A555, p. 191, 1993.

ANEXOS

Anexo 1. Temperaturas medidas em ratos tratados com 5-FU associado à hipertermia

Rato nº	Temperatura (°C)					
	0 min (t ₀)	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
1	36	39,8	40,2	40,2	40,2	40,2
2	36	37,3	37,5	37,9	38	38,5
3	35,8	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5
4	36,2	39,5	41,3	42	42	42
5	37,5	39,7	39,7	39,8	40,6	39,7
6	37,1	39,8	40,8	41	40,9	40,2
7	36,9	37,9	38,2	38,2	38	38
8	36,5	39,2	40	41,2	40	40
9	36,4	38,5	39,2	39	40	40,1
10	36,4	39,1	38,7	39,4	39	39,9
11	36,1	40,3	41,3	42	41,9	42
12	36,5	38	37,9	38,7	38,2	39,1
13	37	39,5	40,3	40	40,2	40,8
14	36,7	38	37,5	38,3	38,8	39
15	37,2	37,5	37,5	39	38,4	38,1
16	37,3	37,8	37,5	37,9	37,6	37,2
17	37,5	39,5	40	39	39	39
18	36,9	38,9	38	37,5	37	37
19	37	38	38,2	38,4	38,7	38,7
20	36,5	38,1	37,8	38,2	37,9	38
21	36,9	37	37,5	37,5	37	36,8
22	37	37,2	40,2	40,4	40,6	40,7
23	37	39,8	40,1	40	40,2	39,8
24	37	39,9	40,7	41,2	41,4	40,4
25	36	37	38	37	37	37

Anexo 2. Temperaturas medidas em ratos tratados com 5-FU + LEU associado à hipertermia

Rato nº	Temperatura (°C)					
	0 min (t ₀)	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
1	37	37	36	36	35,8	35,3
2	37	38	38	39	38,5	39
3	38	36	35,7	37	37	37,2
4	38	39	38,6	39,2	38,1	38,2
5	37	35,8	35	35	35	35
6	36,5	36,5	35,5	36	36,5	35
7	37	38,8	39,8	40,5	40,6	39,7
8	38	39,8	41	41	39,5	40,5
9	38,9	40,9	39,8	39,8	39,4	39,5
10	38	37,7	37,1	37	37,8	38,1
11	37	39,5	39,4	39	39,5	39,5
12	37	39,8	40,1	39,5	39,5	40,1
13	39	38,7	39,4	39,2	39,7	39,5
14	37,5	37,5	37	36,5	36,5	37
15	37,2	36,8	36,9	36,8	36,8	37
16	36,8	37	36,6	36,5	36,5	36,5
17	36,3	40,5	41,7	40,7	40,7	39
18	38	37	37,5	36,7	36,7	37
19	37,2	35	34	34	35	35
20	36,5	36	36	35,7	37	37
21	37	38	38,3	35	36	37
22	37,3	36,2	37,2	38	37,5	38
23	36,2	36,2	36,3	36,3	36,2	36,5
24	38	40,2	38,5	38,3	38,3	36,2
25	37	36	39,5	40,5	40,5	40,9