

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIRURGIA

ANTERO GOMES NETO

**MODELO EXPERIMENTAL DE TUMOR NO PULMÃO COM IMPLANTE DE
CÉLULAS TUMORAIS POR VIA INTRABRÔNQUICA: AVALIAÇÃO DOS
EFEITOS DA TALIDOMIDA, GEFITINIB E PACLITAXEL**

FORTALEZA

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ANTERO GOMES NETO

**MODELO EXPERIMENTAL DE TUMOR NO PULMÃO COM IMPLANTE DE
CÉLULAS TUMORAIS POR VIA INTRABRÔNQUICA: AVALIAÇÃO DOS
EFEITOS DA TALIDOMIDA, GEFITINIB E PACLITAXEL**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

FORTALEZA

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

G612m Gomes Neto, Antero

Modelo experimental de tumor no pulmão com implante de células tumorais por via intrabrônquica: avaliação dos efeitos da talidomida, gefitinib e paclitaxel / Antero Gomes Neto. – Fortaleza, 2006.

162 f.: Il.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Departamento de Cirurgia.

1. Neoplasias Pulmonares. 2. Carcinoma 256 de Walker. 3. Ratos. 4. Talidomida. 5. Proteína tirosina quinase. 6. Paclitaxel.
I Título

CDD: 616.99424

**MODELO EXPERIMENTAL DE TUMOR NO PULMÃO COM IMPLANTE DE
CÉLULAS TUMORAIS POR VIA INTRABRÔNQUICA: AVALIAÇÃO DOS
EFEITOS DA TALIDOMIDA, GEFITINIB E PACLITAXEL**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Cirurgia.

Aprovada em: 04/10/2006

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Riad Naim Younes
Universidade de São Paulo (USP)

Prof^a. Dr^a. Edna Frasson de Souza Montero
Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Prof. Dr. Marcos Venício Alves Lima
Hospital do Câncer do Ceará

Prof. Dr. Luiz Gonzaga Porto Pinheiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A minha esposa, Vivianne, que esteve sempre do meu lado, não só como mulher, mas também como médica e mestra em farmacologia, participando ativamente de todas as etapas do Doutorado, trocando idéias e dando sugestões, e teve ainda a compreensão e a sabedoria para tolerar a minha ausência em muitos finais de semana durante a realização desse estudo.

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

Aos meus filhos, Larissa e Leonardo, que me dão carinho e alegria de viver.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, que acreditou na realização desse trabalho, e com quem pude contar em todas fases dessa pesquisa.

Ao Prof. Dr. Manoel Odorico Moraes que nos estimulou a enveredar na pesquisa do câncer, que iniciou com o mestrado no Departamento de Fisiologia e Farmacologia, e ora culmina com a conclusão desse trabalho no Doutorado.

Ao Professor Paulo Roberto Carvalho de Almeida do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UFC, pela análise minuciosa dos exames histopatológicos desse estudo, o meu especial agradecimento.

Aos Professores Doutores Marcelo Alcântara Holanda, Luiz Gonzaga Porto Pinheiro e Sergio Botelho Guimarães, participantes da Banca de Qualificação, pelas suas importantes sugestões que contribuíram para o aprimoramento desta Tese.

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

Ao Dr. Marcílio Dias de Holanda Neto pelo seu voluntarismo, esmero e profissionalismo, sem medir esforços, sacrificou parte do seu precioso tempo, na realização das tomografias de tórax dos animais desse estudo.

Aos então estudantes de Medicina e hoje médicos, Bruno Machado Furtado e Silvana Araújo de Aguiar, pela contribuição na fase inicial desse trabalho.

Aos estudantes de Medicina, Antônio Felipe Leite Simão, Samuel de Paula Miranda e Nilfácio Prado Bezerra, e a estudante de Farmácia, Lívia Talita Cajaseiras Mourão que participaram ativamente na fase experimental desse trabalho, com muita responsabilidade e espírito científico.

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

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Maria Luciene Vieira de Oliveira que foi sempre solícita, desempenhando a sua função com esmero e competência.

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

À bibliotecária Norma Carvalho Linhares pela revisão das referências bibliográficas.

A todos os colegas e professores do Doutorado em Cirurgia pela interação e ensinamentos que resultaram nesse trabalho.

“O desconhecido não é aquilo a respeito do qual não sabemos absolutamente nada, mas é aquilo que, no que conhecemos, se impõe a nós como elemento de inquietação.”

Heidegger

RESUMO

O câncer de pulmão tem sido, na última década, a principal causa de morte por câncer no mundo, apesar do surgimento de novos quimioterápicos e das terapias alvo-direcionadas. Por isso, faz-se necessário o entendimento das alterações moleculares e biológicas envolvidas nos processos de carcinogênese e crescimento tumoral, bem como o desenvolvimento de modelos experimentais adequados que permitam estudar o comportamento biológico dos tumores de pulmão e o efeito de drogas antineoplásicas. O objetivo desse estudo foi desenvolver um modelo de tumor no pulmão em ratos imunocompetentes de execução simples e fácil reprodutibilidade, e avaliar a atividade de drogas antitumorais. Cento e noventa e um ratos Wistar fêmeas, peso médio de 199 ± 23 g, foram distribuídos ao acaso em três etapas experimentais. Todos os animais foram anestesiados com tribromoetanol 2,5% (1 ml/100g de rato) intraperitonial (ip), traqueostomizados e intubados com cateter de polietileno 16G, seguindo-o por via intrabrônquica (ib) até as porções inferiores do pulmão para inocular células do tumor 256 de Walker. A 1ª etapa (n=32) foi feita para estabelecer a técnica do implante de células por via ib e o índice de pega tumoral, inoculando-se de 10^5 a 5×10^5 células. A 2ª etapa (n=16) para avaliar o volume tumoral no 5º dia do implante de 4×10^5 células e correlacionar os achados da tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR) de tórax com os da necropsia. A 3ª etapa (n=143) para avaliar o efeito de drogas e validar o modelo, sendo dividida em duas fases. A 1ª fase (n=72) para avaliar o volume tumoral no 5º ou 6º dia do implante de 4×10^5 células do tumor, composta de cinco grupos: Grupo controle (Gc), NaCl 0,9% (1ml/gavagem); Grupo celecoxib (Gclx), 15, 30 e 60 mg/kg/dia/gavagem; Grupo talidomida (Gtld), 45 mg/kg/d/sc; Grupo gefitinib (Ggfb), 25 mg/kg/dia; Grupo talidomida + gefitinib (Gtld +gfb). A 2ª fase (n=71) para avaliar a sobrevivência dos animais, com seis grupos: Gc, Gclx (15, 30, 60), Gtld, Ggfb, Gtld + gfb, Grupo paclitaxel (Gpcl), 8 mg/kg ip. O índice geral de pega do tumor com o implante 4×10^5 células foi de 96% (149/155), sendo 90% na 1ª etapa, 100% na 2ª etapa e 96% na 3ª etapa. A mortalidade cirúrgica foi de 4,2% (8/191) e 21 animais foram excluídos do estudo por ausência de tumor no pulmão, morte por infecção (abscesso pulmonar) e outras causas não relacionadas com o tumor. Na 2ª etapa, as medidas do tumor feitas na TCAR e comparadas com a necropsia foram semelhantes ($r=0,953$, $p<0,0001$). Na 1ª fase da 3ª etapa, não se observou diferença no volume tumoral dos animais dos grupos tratados em relação ao controle; e na 2ª fase verificou-se aumento significativo da sobrevivência mediana dos animais tratados com TLD, GFB e PCL (13, 13 e 29 dias, respectivamente), em relação ao controle (11dias), teste de *Log Rank*: $p<0,001$. Conclui-se que o modelo de tumor de pulmão por implantação de células tumorais por via intrabrônquica mostrou-se viável, com alto índice de pega e mortalidade cirúrgica desprezível, de execução simples e fácil reprodutibilidade. A TCAR revelou-se um método de imagem de alta acurácia no diagnóstico, localização e mensuração das lesões tumorais. O modelo mostrou-se eficaz na avaliação de atividade antitumoral de drogas antineoplásicas como o paclitaxel, antiangiogênicas como a talidomida, e inibidores de tirosina quinase do EGFR como o gefitinib.

Palavras-Chave: Neoplasias Pulmonares; Carcinoma 256 de Walker; Ratos; Talidomida; Proteína tirosina quinase; Paclitaxel

ABSTRACT

Lung cancer has been the main cause of death from cancer worldwide over the past decade in spite of the appearance of new chemotherapy drugs and targeted therapies. It is therefore necessary to clarify the molecular and biological changes involved in carcinogenesis and tumor growth and to develop experimental models for the study of the biology of lung tumors and the effects of antineoplastic drugs. The objective of the study was to develop a practical and easily reproducible lung tumor model using immunocompetent rats and to evaluate the activity of antineoplastic drugs. One hundred ninety-one female Wistar rats, with an average weight of 199 ± 23 g, were randomly assigned to one of three experimental groups. All animals were anesthetized intraperitoneally (ip) with 2.5% tribromoethanol (1ml/100g live weight), tracheostomized and intubated with a polyethylene catheter (16G) guided intrabronchially (ib) to the bottom of the lung for inoculation with Walker 256 tumor cells. Group 1 (n=32) established the ib cell implant technique and the tumor take rate with inoculation of 10^5 to 5×10^5 cells. Group 2 (n=16) evaluated tumor volume on the fifth day of implant with 4×10^5 cells and correlated chest findings from high-resolution computerized tomography (HRCT) and necropsy. Group 3 (n=143) evaluated the effect of antineoplastic drugs and validated the model in two stages. Stage 1 (n=72) evaluated tumor volume on the fifth day of implant with 4×10^5 cells, divided into 5 groups: control (CG), 0.9% NaCl (1ml/gavage); celecoxib (Gclx), 15, 30 and 60mg/kg/day/gavage; thalidomide (Gtld), 45mg/kg/d/sc; gefitinib (Ggfb), 25mg/kg/day/gavage; and thalidomide + gefitinib (Gtld + gfb). Stage 2 (n=71) evaluated the survival of the animals divided into six groups: Gc, Gclx, Gtld, Ggfb, Gtld + gfb, and Gpcl (paclitaxel) 8mg/kg ip. The overall take rate for implants of 4×10^5 cells was 96% (149/155), specifically 90% in the first experimental group, 100% in the second and 96% in the third. Surgical mortality was 4.2% (8/191); 21 animals were excluded due to absence of tumor in the lung, death from infection (pulmonary abscess) and other causes not related to the tumor. In Group 2, measures obtained with HRCT and necropsy were similar ($r=0.953$, $p<0.0001$). In the first stage of Group 3 no difference in tumor volume was observed between treated animals and controls; in the second stage median survival time was significantly extended in animals treated with TLD, GFB and PCL (13, 13 and 29 days, respectively) compared to controls (11 days) (Log Rank test: $p<0.001$). In conclusion, the present lung tumor model with intrabronchial tumor cell implantation was shown to be feasible and was associated with high tumor take rates, minor surgical mortality, simple execution and easy reproducibility. HRCT was found to be a highly accurate method of diagnosis, localization and tumor measurement. The model was efficient in the evaluation of the antitumoral activity of the antineoplastic drug paclitaxel, the antiangiogenic drug thalidomide, and the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib, making it a valid model for testing new drugs in lung cancer.

Keywords: Lung neoplasms; carcinoma 256, Walker; Rats; Thalidomide; Protein-Tyrosine Kinase

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Ciclo celular e suas fases G ₀ , G ₁ , S, G ₂ e M. São também mostrados alguns genes que controlam o ciclo celular e têm uma função na carcinogênese (rb, p53 e ciclinas).	23
FIGURA 2 - Epitélio estratificado bem diferenciado separado do comparti do estroma por uma membrana basal bem delineada.....	25
FIGURA 3 - Reversão do fenótipo tumoral pela normalização do estroma.....	27
FIGURA 4 - Receptores da tirosina quinase (TK) em seu estado inativo.....	29
FIGURA 5 - Receptor PDGFR β ativado.....	30
FIGURA 6 - Mecanismo de desregulação da tirosina quinase pela superexpressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR).....	32
FIGURA 7 - Vias de sinalização do Ras-Raf-MEK-ERK e do PI3K-PDK1-AKT que são ativadas pelo EGFR.....	34
FIGURA 8 - Estrutura química do gefitinib.....	36
FIGURA 9 - A indução da ciclooxigenase-2 (COX-2) estimula mediadores angiogênese.....	42
FIGURA 10 - Estrutura química do celecoxib.....	44
FIGURA 11 - Estrutura química da talidomida.....	46
FIGURA 12 - Estrutura química do paclitaxel.....	50
FIGURA 13 - a) animal posicionado em decúbito. b) campo cirúrgico. c) cervicotomia transversa acima do manúbrio esternal traquéia exposta.....	60
FIGURA 14 - a) cateter de polietileno (16G) e cateter de polietileno ultrafino (22G). b) cateter introduzido no jelco em posição de inocular as células	61
FIGURA 15 - a) traquéia intubada com cateter 16G. b) cateter posicionado para a inoculação por via intrabronquica das células tumorais. c) traquéia suturada. d) rafia da pele.....	61
FIGURA 16 - Mensuração do tumor (setas) na tomografia computadorizada de alta resolução do tórax na janela do pulmão (a) e do mediastino (b) no 5 ^o dia do implante tumoral.....	62
FIGURA 17 - a) peça de necropsia mostrando o tumor no pulmão esquerdo (seta). b) medidas dos diâmetros tumorais com paquímetro digital (seta), de animal sacrificado no 5 ^o dia do implante tumoral.....	64
FIGURA 18 - Fluxograma dos experimentos da primeira fase.....	66
FIGURA 19 - Fluxograma dos experimentos da segunda fase.....	67

- FIGURA 20** - Rato A com tumor (setas) localizado no segmento lateral do lobo inferior do pulmão esquerdo. Rato B com tumor (setas) no segmento posterior do lobo inferior do pulmão esquerdo.....71
- FIGURA 21** - Exame histológico corado pela hematoxilina-eosina (HE). Tumor incipiente no 6º dia do implante, formando bloco peribronquiolar....72
- FIGURA 22** - Exame histopatológico corado pela HE em aumento de 400X mostrando o tumor no 6º dia do implante, caracterizado pelas células poligonais com núcleos volumosos.....73
- FIGURA 23** - Exame histopatológico corado pela HE em aumento de 400X, mostrando o tumor no 6º dia do implante, com áreas de necrose e corpos apoptóticos.....73
- FIGURA 24** - Teste de regressão linear simples, mostrando correlação positiva dos dados de volume tumoral em cm³ de tomografia com os de necropsia ($p < 0,0001$).....74
- FIGURA 25** - Pulmão de animais no 5º dia do implante de 4×10^5 células do tumor de Walker.....75
- FIGURA 26** - Gráfico do volume tumoral de animais do grupo controle e grupo do Celecoxib, 15mg/kg/dia (CLX-15), medidos na necropsia no 5º dia do implante de 4×10^5 células do tumor de Walker80
- FIGURA 27** - Volumes tumorais medidos pela TCAR no 5º dia do implante de 4×10^5 células do tumor de Walker.....84
- FIGURA 28** - Exame histopatológico corado pela HE, mostrando um abscesso pulmonar.....84
- FIGURA 29** - Volume tumoral medido na tomografia no 6º dia do implante de 4×10^5 células do tumor de Walker.....87
- FIGURA 30** - Exame histopatológico corado pela HE (40X), mostrando o tumor invadindo o tecido adiposo mediastinal (A), a traquéia (B) e músculo esquelético da parede torácica (C).....89
- FIGURA 31** - Animais do grupo controle com massa tumoral ocupando todo o pulmão esquerdo e invadindo o mediastino, com o pulmão direito totalmente preservado.....90
- FIGURA 32** - Sobrevida média do grupo controle = $10,92 \pm 0,29$ (EP); IC 95% (10,35;11,48). mediana = $11,00 \pm 0,38$ (EP); IC 95% (10,27;11,74).....91

- FIGURA 33** - Sobrevida mediana do grupo controle = 11,00±0,38 dias; IC 95% (10,27; 11,74). CLX15 = 11±0,44 dias IC 95% (10,14; 11,86). (Teste de Log Rank, p = 0,22).....92
- FIGURA 34** - Sobrevida mediana do grupo controle = 11,00±0,38 dias; IC 95% (10,27; 11,74). CLX30 = 9±0,3 dias IC 95% (8,42; 9,58). (Teste de Log Rank, p = 0,0005).....93
- FIGURA 35** - Animal com peritonite, distensão e perfuração de alça intestinal com sinais de isquemia e trombose mesentérica.....93
- FIGURA 36** - Sobrevida mediana do grupo controle = 11,00±0,38 dias; IC 95% (10,27; 11,74). CLX60 = 4±1,4 dias IC 95% (1,23; 6,77). (Teste de Log Rank, p = 0,043).....94
- FIGURA 37** - Sobrevida dos animais tratados com doses crescentes do celecoxib.....95
- FIGURA 38** - Sobrevida mediana do grupo controle = 11,00±0,38 dias; IC 95% (10,27; 11,74). TLD45 = 13±0,45 dias IC 95% (12,12; 13,88). (Teste de Log Rank, p = 0,0001).....96
- FIGURA 39** - Exame histológico corado pela HE (400X) mostrando o tumor ocupando maciçamente o pulmão e com extensa área de necrose tumoral coagulativa.....97
- FIGURA 40** - Sobrevida mediana do grupo controle = 11,00±0,38 dias; IC 95% (10,27; 11,74). GFB25 = 13±0,47 dias IC 95% (12,08; 13,92). (Teste de Log Rank, p = 0,0006).....97
- FIGURA 41** - Sobrevida mediana do grupo controle = 11,00±0,38 dias; IC 95% (10,27; 11,74). GFB25 = 11±0,16 dias IC 95% (10,69; 11,31). (Teste de Log Rank, p = 0,78).....98
- FIGURA 42** - Tumor pequeno no lobo inferior do pulmão esquerdo, no 29º dia do implante tumoral (seta).....99
- FIGURA 43** - Massa tumoral acometendo todo o pulmão esquerdo, 29º dia do implante tumoral (seta grossa). O pulmão direito normal (seta fina).....100
- FIGURA 44** - Sobrevida mediana: grupo controle = 11 dias e grupo taxol = 29 dias (Teste de Log Rank: p < 0,0001).....100

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Índice de pega tumoral <i>versus</i> quantidade de células implantadas no pulmão.....	70
TABELA 2 - Volume tumoral em cm ³ calculado pelos diâmetros tumorais obtidos na tomografia e na necropsia no 5 ^o dia do implante de 4 x 10 ⁵ células do carcinosarcoma de Walker.....	76
TABELA 3 - Valores dos diâmetros e volumes tumorais de animais do grupo controle, medidos na necropsia no 5 ^o dia do implante de 4x10 ⁵ células do tumor de Walker.....	78
TABELA 4 - Valores dos diâmetros e volumes tumorais de animais do grupo tratado com Celecoxib (15 mg/kg/dia), medidos na necropsia no 5 ^o dia do implante de 4x10 ⁵ células do tumor de Walker.....	79
TABELA 5 - Volumes tumorais de animais do grupo controle e grupo do Celecoxib, 15 mg/kg/dia (CLX-15), medidos na necropsia no 5 ^o dia do implante de 4x10 ⁵ células do tumor de Walker.....	79
TABELA 6 - Valores dos diâmetros e volumes tumorais de animais do grupo controle, medidos pela TCAR no 5 ^o dia do implante de 4x10 ⁵ células do tumor de Walker.....	81
TABELA 7 - Valores dos diâmetros e volumes tumorais de animais do grupo tratado com talidomida (45 mg/kg/dia), medidos pela TCAR no 5 ^o dia do implante de 4x10 ⁵ células do tumor de Walker.....	82
TABELA 8 - Valores dos diâmetros e volumes tumorais de animais do grupo tratado com gefitinib (25 mg/kg/dia), medidos pela TCAR no 6 ^o dia do implante de 4x10 ⁵ células do tumor de Walker.....	83
TABELA 9 - Volumes tumorais de animais do grupo controle, grupo da talidomida, 45mg/kg/dia (TLD-15) e grupo do gefitinib 25 mg/kg/dia (GFB-25), medidos pela TCAR.....	83
TABELA 10 - Valores dos diâmetros e volumes tumorais de animais do grupo controle, medidos pela TCAR no 6 ^o dia do implante de 4x10 ⁵ células do tumor de Walker.....	85
TABELA 11 - Valores dos diâmetros e volumes tumorais de animais do grupo tratado com gefitinib (25 mg/kg/dia) associado com talidomida (45 mg/kg/dia), medidos pela TCAR.....	86

- TABELA 12** - Volumes tumorais de animais do grupo controle e grupo do gefitinib, 25 mg/kg/dia (GFB-25), associado com talidomida, 45 mg/kg/dia (TLD-45), medidos pela TCAR.....87
- TABELA 13** - Mortalidade cirúrgica dos animais submetidos ao implante de células do tumor de Walker por via ib nas três etapas experimentais.....101
- TABELA 14** - Índice geral de pega dos tumores nos animais submetidos ao implante de 4×10^5 células do tumor de Walker por via intrabrônquica.....102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINES = Antiinflamatórios não esteroidais

bFGF = Fator de crescimento de fibroblasto básico

Cat = catalítico

CDK = ciclina quinase dependente

CEPA = Comissão de Ética em Pesquisa Animal

CLX = Celecoxib

cm = centímetro

COX – 2 = Cicloxigenase – 2

CPC = Câncer de pequenas células

CNPC = Câncer de não pequenas células

D = dia

DP = Desvio padrão

EGF = Fator de crescimento epidérmico

EGFR = Receptor do fator de crescimento epidérmico

EN = Eritema nodoso

EPM = Erro padrão da média

FDA = Food and drug administration

FGF = Fator de crescimento do fibroblasto

FGFR = Receptor do fator de crescimento do fibroblasto

Gc = Grupo controle

Gclx = Grupo celecoxib

GDP = guanosina-difosfato

GFB = Gefitinib

Ggfb = Grupo gefitinib

GM-CSF = Fator estimulador de colônia dos granulócitos e macrófagos

Gpcl = Grupo Paclitaxel

Gtld = Grupo talidomida

GTP = guanosina-trifosfato

HE = coloração pela Hematoxilina-Eosina

HGF = Fator de crescimento do hepatócito

IFN = Interferon

IL-1 = Interleucina-1

IL-6 = Interleucina-6

IL-8 = Interleucina-8

IL-10 = Interleucina-10

IL-12 = Interleucina-12

IMMP = Inibidor da metaloproteinase de matriz

ip = Intraperitoneal

Kg = quilograma (s)

m = metro (s)

μ g = micrograma (s)

μ L: microlitro (s)

mg = miligrama (s)

mL = mililitro (s)

mm = milímetro (s)

MEC = Matriz extracelular

MMP = Metaloproteinase de matriz

NO = Óxido nítrico

oC = Grau centígrado ou Celsius

pcl = Paclitaxel

PDGF = Fator de crescimento derivado das plaquetas

PDGFR = Receptor do fator de crescimento derivado das plaquetas

PGE = Prostaglandina E

PO = Pós-operatório

POI = Pós-operatório imediato

r = Coeficiente de correlação

R² = Coeficiente de determinação

Rb = Retinoblastoma

RC = Resposta completa

RNM = Ressonância nuclear magnética

RP = Resposta parcial

RTK = Receptores da tirosina quinase

sc = Subcutâneo

SF = Fator de dispersão

SV = Sobrevida

TC = Tomografia computadorizada

TCAR = Tomografia computadorizada de alta resolução

TGF- α = Fator transformador de crescimento α

TGF- β = Fator transformador de crescimento β

TK = Tirosina quinase

TKI = Inibidor da tirosina quinase

TLD = Talidomida

TM = Transmembrana

TNF = Fator de necrose tumoral

UFC = Universidade Federal do Ceará

US = Ultrassonografia

V = Volume

VT = Volume Tumoral

VEGF: Fator de crescimento do endotélio vascular

VEGFR = Receptor do fator de crescimento do endotélio vascular

α = alfa

β = beta

x = vez (es)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Carcinogênese	21
1.2 Crescimento tumoral	24
1.3 Microambiente Tumoral	25
1.4 Receptores da Tirosina Quinase (TK)	28
1.5 Receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR)	32
1.6 EGFR Como Alvo Para Terapêutica Anticâncer	34
1.6.1 Gefitinib.....	35
1.7 Angiogênese tumoral	36
1.8 Ciclooxygenase II (COX-2)	40
1.8.1 Inibidores da COX-2	43
1.8.1.1 Celecoxib.....	43
1.9 Talidomida	46
1.9.1 Atividade antitumoral da talidomida.....	48
1.10 Paclitaxel.....	49
1.11 Modelos de tumor de pulmão.....	50
1.11.1 Modelo de câncer de pulmão espontâneo ou induzido quimicamente.....	51
1.11.2 Modelo de câncer de pulmão em camundongo transgênico.....	52
1.11.3 Modelos subcutâneos ou ectópicos de câncer de pulmão em camundongos e ratos.....	53
1.11.4 Modelos ortotópicos de câncer de pulmão em camundongos e ratos.....	55
1.12 Método de imagem em pequenos animais	56
2 OBJETIVOS	58
3 MÉTODO	59
3.1 Animais usados nos experimentos	59
3.2 Obtenção e preparo da suspensão das células neoplásicas	59
3.3 Técnica do Implante Tumoral via Intrabrônquica (ib)	60
3.4 Técnica de realização da tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR)	61
3.5 Desenho Experimental	62

3.5.1 Estabelecer a técnica do implante de células tumorais por via <i>ib</i> e o índice de pega tumoral.....	62
3.5.2 Avaliar o volume tumoral e correlacionar os achados da TCAR de tórax com os da necropsia.....	63
3.5.3 Avaliação do efeito de drogas e validação do modelo.....	64
3.6 Análise Estatística	69
4 RESULTADOS	70
4.1 Desenvolvimento da técnica do implante de células tumorais por <i>via ib</i> e estabelecimento do modelo tumoral	70
4.2 Avaliação do volume tumoral e correlação dos achados da TCAR de tórax com os da necropsia	74
4.3 Avaliação do efeito de drogas e validação do modelo	77
4.4 Mortalidade cirúrgica	101
4.5 Índice de pega tumoral	101
5 DISCUSSÃO	103
5.1 Estabelecimento de modelo experimental de tumor de pulmão por via intrabrônquica com o carcinossarcoma de Walker	103
5.2 Avaliação do efeito de drogas e validação do modelo de tumor de pulmão por via <i>ib</i> com o carcinossarcoma de Walker	108
5.2.1 Avaliação do efeito antitumoral do Celecoxib - Inibidor da Cox-2.....	109
5.2.2 Avaliação do efeito antitumoral da talidomida - inibidor da angiogênese.....	111
5.2.3 Avaliação do efeito antitumoral do gefitinib - inibidor de tirosina quinase do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR).....	116
5.2.4 Avaliação do efeito antitumoral do paclitaxel - quimioterápico convencional.....	119
6 CONCLUSÃO	122
7 REFERÊNCIAS	123
APÊNDICES	150
ANEXOS	158

1 INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão tem sido, na última década, a principal causa de morte por câncer no mundo. Mais de 170.000 casos novos são diagnosticados anualmente, dos quais 160.000 morrem, representando cerca de 28% das mortes por câncer (JEMAL et al., 2004). No Brasil, em 2000, o câncer de pulmão foi também a causa mais comum de morte entre os homens, seguida do câncer de estômago e próstata (INCA/MS, 2000), embora a previsão de incidência do câncer de próstata para 2006 seja maior que a de pulmão (INCA/MS, 2005). O tabagismo é o maior fator de risco, sendo responsável por cerca de 85% dos casos. Os outros 15% incluem a exposição a asbestos, radônio, carcinógenos ambientais e, ainda, fatores genéticos (DOLL, 2000).

Do ponto de vista histológico e de comportamento biológico, o câncer de pulmão é dividido em dois grandes grupos: o carcinoma de não pequenas células (CNPC) e o carcinoma de pequenas células (CPC) (TRAVIS, 2002). O grupo do CNPC constitui 80% dos cânceres de pulmão e é subdividido em adenocarcinoma, com a variedade bronquioloalveolar, carcinoma epidermóide e carcinoma de grandes células (TRAVIS, 2002). O CPC, responsável por 20% dos cânceres de pulmão, pertence ao grupo dos tumores neuroendócrinos e é dividido em quatro subgrupos (CPC, carcinoma neuroendócrino de grandes células, carcinóide típico e atípico) pelas suas características biológicas e morfológicas (WISTUBA et al., 2001). Os dois primeiros têm alto potencial de proliferação e metastatização e, os dois últimos, são tumores de malignidade baixa a intermediária.

A responsividade ao tratamento convencional quimioterápico e radioterápico permanece baixa, e a sobrevida em cinco anos dos pacientes com carcinoma de não pequenas células (CNPC) e o carcinoma de pequenas células (CPC) gira em torno de 14% e 5%, respectivamente (CARNEY, 2002). A ressecção cirúrgica é a modalidade terapêutica que oferece a maior esperança de cura para os pacientes com câncer nos estágios iniciais da doença, mas o percentual de sobrevida a longo prazo continua baixo, mesmo nos pacientes tratados cirurgicamente (NARUKE et al., 2001). Além disto, o câncer de pulmão, na maioria dos casos, é diagnosticado em uma fase de doença avançada e inoperável, quando resta como opção terapêutica somente a quimioterapia sistêmica (BONOMI et al., 2000).

Os protocolos atuais de quimioterapia, à base de cisplatina ou carboplatina combinada com paclitaxel, docetaxel e gemcitabina, mostram uma sobrevida mediana variando de 7,9 a 13,1 meses para pacientes portadores de CNPC em estágios avançados (IIIB e IV) da doença (BONOMI et al., 2000).

A realização de “screening” com tomografia computadorizada helicoidal de baixa dose e a busca de marcadores biológicos, além de outros métodos para o diagnóstico precoce do câncer de pulmão, representam hoje um importante campo de pesquisa, uma vez que o índice de cura é muito maior quando os pacientes são operados com doença localizada (LIBBY et al., 2006).

Além dos novos quimioterápicos, têm surgido outras alternativas terapêuticas para o câncer de pulmão, como as drogas imunomoduladoras, antiangiogênicas e alvo-direcionadas (CIARDIELLO et al., 2000; MASFERRER et al., 2000; SCHILLER et al., 2002). Contudo, faz-se necessário o entendimento das alterações moleculares e biológicas envolvidas nos processos de carcinogênese e crescimento tumoral, bem como o desenvolvimento de modelos experimentais adequados que permitam estudar o comportamento biológico dos tumores de pulmão e o efeito antitumoral destas drogas.

1.1 Carcinogênese

A carcinogênese se faz em múltiplos estágios por um processo de ativação de oncogenes e inativação de genes supressores, com diferentes alterações genéticas nos CNPC e CPC do pulmão. Os oncogenes RAS, MYC e BCL-2 são os mais frequentemente implicados no câncer de pulmão (JIANG et al., 1995; GRAZIANO et al., 1999).

O gene RAS (H-RAS, K-RAS e N-RAS) codifica a proteína GTPase, a qual tem uma função de transdução de sinal através do receptor da tirosina quinase. A hidrólise do guanosina-trifosfato (GTP) em guanosina-difosfato (GDP) anula a sinalização RAS, porém a mutação do oncogene RAS impede a hidrólise do GTP, tornando a sinalização persistentemente ativada. A maioria das mutações está relacionada com o tabagismo e ocorre com maior frequência no códon 12, seguida de mutações nos códon 13 e 61, sendo

cerca de 90% encontradas no K-RAS e no adenocarcinoma de pulmão, sem nenhuma mutação detectada no CPC (RODENHUIS et al., 1988; SLEBOS et al., 1990). A presença de mutação no K-RAS está associada a um prognóstico ruim em pacientes com CNPC, tanto no estágio precoce quanto no tardio (VAN ZANDWIJK et al., 1995; GRAZIANO et al., 1999).

O proto-oncogene MYC (M-LYC, N-MYC e C-CMY) codifica um fator que regula a expressão do gene envolvido na síntese do DNA, no metabolismo do RNA e na regulação do ciclo celular (OSTER et al., 2002). A ativação do gene MYC ocorre pela amplificação ou perda do controle da transcrição, resultando em superexpressão da proteína MYC. A ativação deste oncogene desregula tanto o crescimento quanto a morte programada no “checkpoint” do ciclo celular, criando um ambiente propício para a aceleração do processo de carcinogênese (OSTER et al., 2002). A amplificação do MYC ocorre em cerca de 15 a 30% dos CPC e em 5 a 10% dos CNPC, e é um indicativo de prognóstico ruim (RICHARDSON e JOHNSON, 1993; JOHNSON et al., 1996).

O proto-oncogene BCL-2 é uma proteína anti-apoptótica com grande expressão no CPC de pulmão (75% a 95%) e expressão menor no carcinoma epidermóide (25%–30%) e no adenocarcinoma (10%) (JIANG et al., 1995; PEZZELLA et al., 1993).

Os genes supressores mais comumente inativados no câncer de pulmão são o p53, p16, p14 e as ciclinas D1. A alteração mais frequente é a mutação ou deleção do p53, que é um gene importante para a manutenção da integridade do genoma sempre que o DNA é danificado (KHANNA e JACKSON, 2001; HANAWALT et al., 2003). Na vigência de um estresse celular, com dano no DNA, durante os períodos de hipóxia, ocorre uma “up-regulation” do gene p53, o qual atua numa seqüência de eventos na fase G1/S do ciclo celular (Figura 1), induzindo a apoptose (IHRIE et al., 2003). O tabagismo frequentemente leva a mutações, desativando o p53, tanto no CNPC quanto no CPC do pulmão (TOYOOKA et al., 2003).

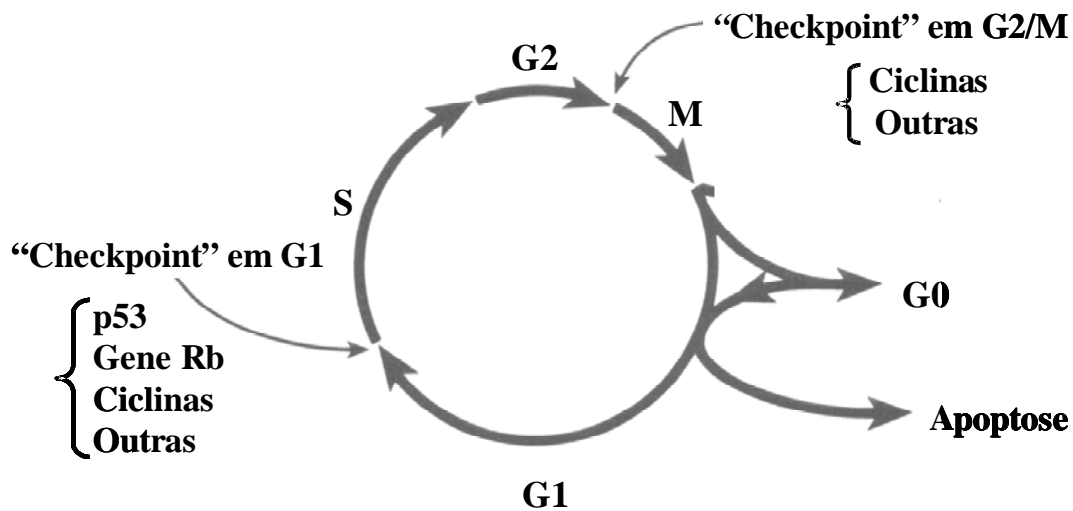


FIGURA 1 - Ciclo celular e suas fases G₀, G₁, S, G₂ e M. São também mostrados alguns genes que controlam o ciclo celular e têm uma função na carcinogênese (Rb, p53 e ciclinas).

A Figura 1 mostra o ciclo celular com as suas fases S e M, separada por intervalos Gs (*gaps*: G₀, G₁ e G₂) nos quais são sintetizadas as proteínas e enzimas que serão usadas nas fases subseqüentes. Na fase S, ou fase de síntese, se processa a replicação do DNA; já na fase M (mitose) ocorre a divisão celular em duas células filhas. No intervalo G₀, as células ficam em estado de repouso; realizam funções especializadas, entrando no ciclo de divisão, somente quando recrutadas para tal. No intervalo G₁, que precede a fase S, são sintetizadas as proteínas, RNA e enzimas necessárias para a síntese do DNA. O ciclo celular é controlado nesta fase por um G₁ "checkpoint", onde as células aguardam um sinal para entrarem na fase S. No intervalo G₂, que precede a fase M, é organizado o fuso mitótico, continua o processo de síntese de proteína e aumenta o volume celular. Na transição da fase G₂ para M há um segundo "checkpoint".

As mutações nas ciclinas D1, que controlam o ciclo celular em dois "checkpoints", ocorrem também no câncer de pulmão, especialmente nos grandes fumantes, e estão associadas a um mau prognóstico (RATSCHILLER et al., 2003). A demonstração de

ciclina D1 no epitélio brônquico de pacientes fumantes pode ser usada como marcador molecular na identificação de pacientes de alto risco para o desenvolvimento de câncer e, assim, permitir a prevenção, ou mesmo uma intervenção terapêutica precoce (RATSCHILLER et al., 2003).

Ainda, em fumantes com câncer de pulmão ou lesões pré-neoplásicas pode ocorrer uma inativação por hipermetilação de outros genes supressores de tumores (p16, p14, H-Caderina e E-Caderina) (ZOCHBAUER-MULLER et al., 2002).

1.2 Crescimento tumoral

O crescimento tumoral pode ser estimulado ou inibido por um mecanismo de ação autócrino ou parácrino, por uma série de proteínas, ou fatores de crescimento e seus receptores, expressados pelas células tumorais ou por outras células do estroma no microambiente tumoral (MAULIK et al., 2003). Os fatores de crescimento secretados na região pericelular que estimulam as células vizinhas são chamados de agentes parácrinos, enquanto os que interagem com receptores das células que os produziram são denominados agentes autócrinos. O peptídeo gastrina e a bombesina estimulam por um mecanismo autócrino os sinais proliferativos celulares, induzindo a mitogênese do CPC do pulmão, enquanto o fator de crescimento do fibroblasto (FGF) e o fator transformador de crescimento α (TGF- α) participam de forma autócrina no desenvolvimento do câncer de pulmão não pequenas células (ROZENGURT, 1998). O bloqueio da alça autócrina com anticorpos monoclonais promove, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, a parada do crescimento tumoral (HALMOS e SCHALLY, 1997).

Ainda outros fatores de crescimento que atuam de forma autócrina através de receptores de transdução de sinais da tirosina quinase (TK), como o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e o receptor do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGFR), juntamente com seus ligantes, o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), são expressos por diversos tumores e estão envolvidos na carcinogênese (REISSMANN et al., 1999).

Por fim, a literatura vem atribuindo um papel cada vez mais importante ao microambiente tumoral, aos receptores da tirosina quinase e seus ligantes e à enzima ciclooxigenase 2 (COX-2) no processo de carcinogênese (ROBERTSON et al., 1998; HARRIS et al., 1999).

1.3 Microambiente Tumoral

O microambiente é composto de células tumorais, células do sistema imune, células do estroma e matriz extracelular, e é considerado o local onde ocorre o processo neoplásico de proliferação e migração das células tumorais. A interação patológica entre as células tumorais e as células do estroma no microambiente tumoral do hospedeiro desencadeia uma série de mecanismos que permitem o crescimento tumoral. As células tumorais podem interagir com o estroma tornando-o permissivo à progressão do tumor, fenômeno que se denomina estroma tumoral reativo (MULLER e FUSENING, 2004) (Figura 2).

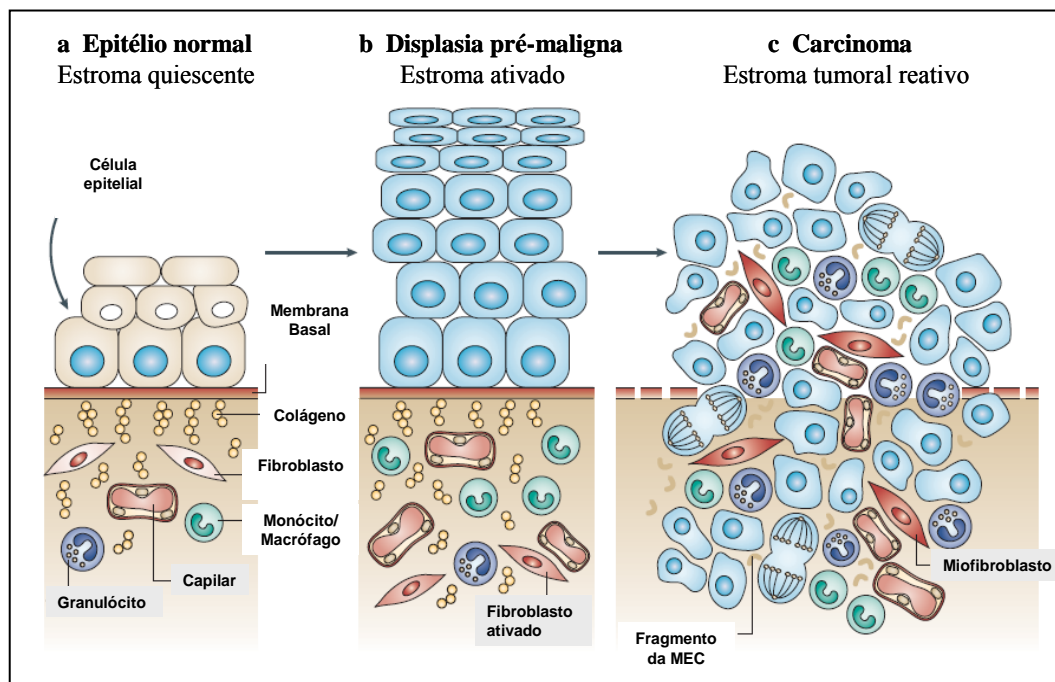


FIGURA 2 - a) Epitélio estratificado bem diferenciado, separado do compartimento do estroma por uma membrana basal bem delineada. O estroma contém normalmente fibras de

colágeno ao lado de fibroblastos quiescentes, vasos sanguíneos, granulócitos e leucócitos residentes (monócitos e macrófagos); b) Na transição para displasia pré-maligna as células epiteliais se multiplicam, resultando em uma hiperplasia do epitélio. Os fibroblastos são ativados, os macrófagos aumentam e inicia-se o processo de angiogênese; c) A progressão para carcinoma está associada a um aumento da proliferação celular (células mitóticas) e ao desenvolvimento do estroma tumoral ativado. Os fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos, resultando no aumento da expressão de fatores de crescimento, persistência da angiogênese, invasão da membrana basal degradada pelas células tumorais, e aparecimento de infiltrado vascular no tecido tumoral. Modificada de Mueller, M.M.; Fusening, N.E. Friends or foes – Bipolar effects of the tumor estroma in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, v. 4, p. 840, 2004.

As células tumorais produzem uma série de proteases e fatores de crescimento que modificam o microambiente do estroma. Por meio de uma ação parácrina, estes fatores alteram a homeostase dos tecidos, induzem a inflamação e a angiogênese, e ativam vários tipos de células do estroma circunvizinho, como fibroblastos, adipócitos e macrófagos, promovendo a secreção adicional de fatores de crescimento e proteases. Os fibroblastos ativados, por sua vez, secretam fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular (MEC), proteases e metaloproteinases da matriz que degradam e remodelam a MEC. A indução de inflamação no estroma também resulta na produção de uma série de fatores que promovem a angiogênese e a progressão tumoral. A angiogênese, por sua vez, promove não somente o crescimento do tumor, mas a sua progressão de uma fase pré-maligna para um fenótipo tumoral maligno, invasivo e metastatizante (MULLER e FUSENING, 2004).

Por outro lado, a propensão de alguns tipos de tumores metastatizarem para um determinado órgão foi assinalada por Stephen Paget, em 1889. Segundo a teoria de Paget, o desenvolvimento de um foco metastático de tumor em um determinado local dependia de um entendimento ou comunicação entre as células neoplásicas, ou “seeds”, e o microambiente do órgão hospedeiro, ou “soil”. Sabe-se agora, mais de um século depois do enunciado de Paget, que o potencial de metastatização de um tumor depende da sua interação com fatores homeostáticos do microambiente tumoral que promovem o crescimento, angiogênese, invasão e metástase das células tumorais (FIDLER, 2003).

O estroma tem, portanto, uma participação direta na tumorigênese, e a sua normalização, por meio de inibidores da angiogênese ou de antiproteases, pode reverter a progressão do tumor, como mostra a Figura 3.

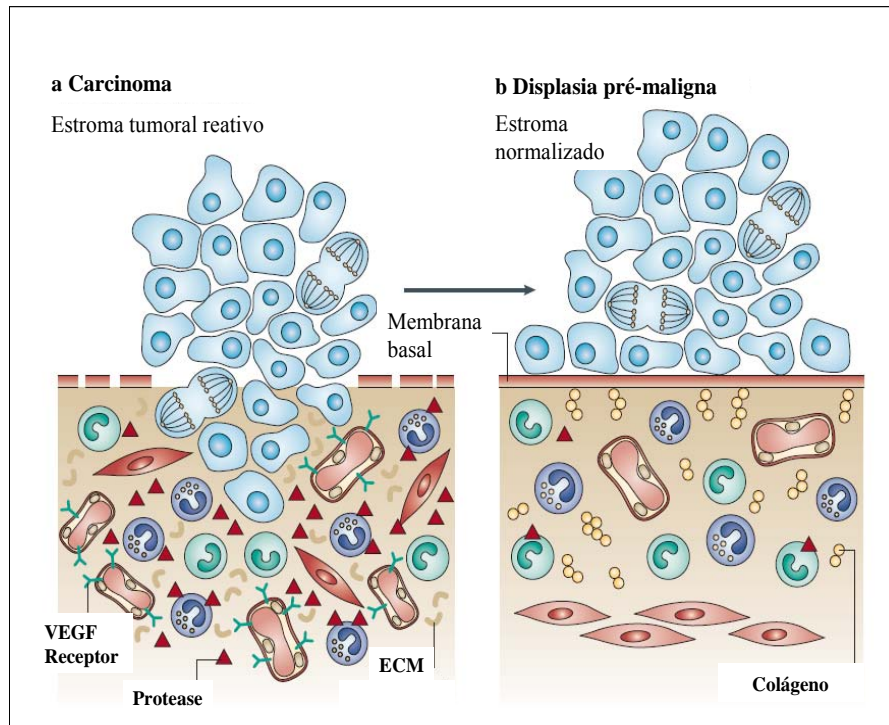


FIGURA 3 - Reversão do fenótipo tumoral pela normalização do estroma. **a)** O estroma tumoral reativo, caracterizado pela presença de proliferação de células endoteliais, vasos sanguíneos que expressam o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fragmentos da matriz extracelular (MEC), proteases ativas, fibroblastos ativados e ruptura da membrana basal; **b)** O estroma ativado do microambiente tumoral é normalizado pelo bloqueio da angiogênese. Há uma redução das proteases e dos fragmentos da matriz com recomposição das fibras do colágeno, restabelecimento da membrana basal e reversão do fenótipo maligno e invasivo em displasia pré-maligna. Modificada de Mueller, M.M.; Fusening, N.E. Friends or foes – Bipolar effects of the tumor stroma in cancer. Nat. Rev. Cancer, v. 4, p. 841, 2004.

1.4 Receptores da Tirosina Quinase (TK)

As proteínas tirosina quinases (TK) são enzimas que catalisam a transferência de fosfato do ATP para resíduos de tirosina nos polipeptídios. O genoma humano contém cerca de 90 genes TK e 43 genes de TK-símbios, cujos produtos regulam a proliferação, sobrevivência, diferenciação, função e motilidade celulares (KRAUSE e VAN ETTEN, 2005). As TK eram até recentemente reconhecidas como oncogenes em tumores animais induzidos por retrovírus. Este conceito mudou radicalmente depois da descoberta do anticorpo imatinib, um inibidor da TK BCR-ABL na leucemia mieloide crônica, que foi um alvo na terapia-alvo do câncer (KRAUSE e VAN ETTEN, 2005).

Os receptores que regulam a atividade das TK são divididos em dois grandes grupos, os transmembrana e os intracelulares, denominados receptores do tipo TK não-receptores. Os receptores transmembrana são proteínas com um domínio ligante extracelular e um domínio catalítico intracelular, ao passo que os receptores intracelulares carecem de domínio transmembrana e são encontrados no citosol e no núcleo. Em todas as TKs, o domínio quinase apresenta uma estrutura bilobar com um N terminal que se liga ao ATP e ao magnésio, um C terminal com uma alça de ativação, e uma fenda entre os lobos à qual se ligam os substratos ligantes (Figura 4).

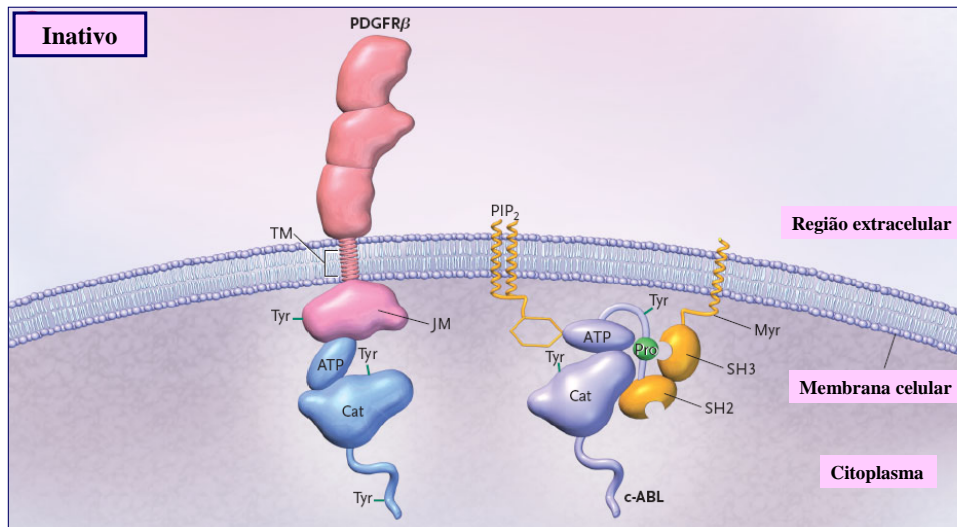


FIGURA 4 - Receptores da tirosina quinase (TK) em seu estado inativo. Vê-se um receptor típico da tirosina quinase (receptor β do fator de crescimento derivado das plaquetas [PDFGR β]) e um receptor de TK não-receptor (c-ABL), com a parte ligada ao ATP e ao lobo catalítico (Cat) do domínio quinase, e a região transmembrana (TM) do receptor do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGFR β). O PDGFR β inativo é um monômero não fosforilado, com um domínio catalítico inibido pela tirosina regulatória (Tyr) na alça de ativação que interage com o domínio justamembrana (JM). O TK não-receptor inativo (c-ABL) está associado com a membrana através de um N terminal covalente do grupo miristato (Myr), e é inibido por uma interação do domínio (SH3) com um resíduo de prolina (Pro) adjacente e pela interação direta do domínio catalítico com um lipídio inibitório de membrana, o fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂). Modificada de Krause, D.S.; Van Etten, R.A. Tyrosina kinases as targets for cancer therapy. N. Engl. J. Med., v. 353, p. 175, 2005

Na ausência de ligantes, os receptores das TKs permanecem na forma de monômeros não fosforilados, com o domínio quinase inativo. Os receptores se tornam ativados quando os ligantes se acoplam ao domínio extracelular, resultando em dimerização do receptor, ruptura da interação justamembrana autoinibitória, autofosforilação da tirosina regulatória e ativação da alça da quinase (Figura 5). Esta reorientação aumenta a atividade catalítica da enzima e recruta uma série de proteínas para a membrana, ativando múltiplas vias de sinalização (SCHLESSING, 2000).

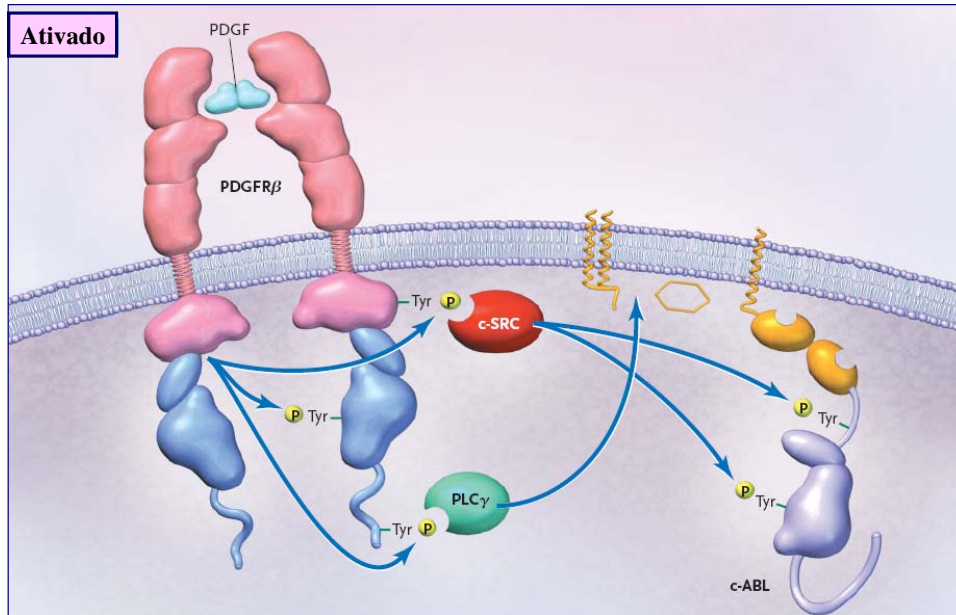


FIGURA 5 - Receptor PDGFR β ativado. O PDGFR β é ativado por um ligante dimérico, o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), que induz a dimerização do receptor e a fosforilação intermolecular (P, em amarelo) da alça de ativação da tirosina. Isto resulta em uma mudança na conformação do domínio catalítico e em um aumento da atividade enzimática, enquanto a fosforilação de outras tirosinas no domínio intracelular do receptor faz ligações com o domínio SH2 que tem proteínas sinalizadoras (c-SRC) e fosfolipase C γ (PLC γ). O c-ABL é ativado pela fosforilação de duas tirosinas regulatórias, uma na alça de ativação e outra próxima ao sítio de ligação SH3, que pode ser fosforilado por outras TK, como as c-SRC. Modificada de Krause, D.S.; Van Etten, R.A. Tyrosina kinases as targets for cancer therapy. *N. Engl. J. Med.*, v. 353, p. 175, 2005

Os receptores das TKs não-receptores, chamados de c-ABL, são mantidos em estado inativo por proteínas e lipídios inibidores celulares e por uma autoinibição intracelular (VAN ETTEN, 2003). Estes receptores são ativados por diversos sinais intracelulares através da dissociação de inibidores, decorrente do recrutamento do receptor transmembrana ativado e da transfosforilação por outras quinases (Figura 6). A sinalização da TK é interrompida, em parte pela ação da tirosina fosfatase que hidrolisa o tirosol fosfato, ou por inibidores moleculares, como gefitinib e erlotinib.

A regulação das TKs ocorre em vários níveis, e a alteração da regulação destas proteínas por mecanismos diversos pode estimular o desenvolvimento de células neoplásicas. A ativação excessiva da TK pode aumentar a sobrevivência e a proliferação celular de células malignas, e nos tumores pode aumentar a angiogênese, a invasividade e o potencial metastático. Um dos mecanismos de ativação da TK em neoplasias é a fusão do receptor da TK com o não-receptor. Na ausência de ligante, a dimerização constitutiva da TK por mutação no receptor TK ou a ativação do sinal também pode induzir ativação e autofosforilação em neoplasias (KRAUSE e VAN ETTEN, 2005). Outro mecanismo de desregulação da TK ocorre em um subgrupo de câncer de pulmão de não pequenas células por deleção ou mutação pontual no domínio quinase do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), aumentando a sensibilidade do receptor ao ligante e alterando a sinalização do receptor (LYNCH et al., 2004). Um terceiro mecanismo de desregulação da TK é o aumento ou a expressão aberrante do receptor da TK, dos seus ligantes, ou de ambos, sendo um exemplo disto a superexpressão do receptor da TK (HER-2) no câncer de mama (Figura 6) (FINN e SLAMON, 2003). O trastuzumab (Herceptin[®]), anticorpo monoclonal recombinante humano anti-HER-2, quando associado à quimioterapia, aumenta a resposta e melhora a sobrevivência de pacientes com câncer de mama metastático que superexpressam HER-2 (SLAMON et al., 2001). Já o bevacizumab (Avastin[®]), um anticorpo monoclonal anti-VEGF, quando associado ao irinotecan, fluoracil e leucovorin, proporciona um aumento significativo da sobrevivência de pacientes com câncer metastático de cólon (HURWITZ et al., 2004).

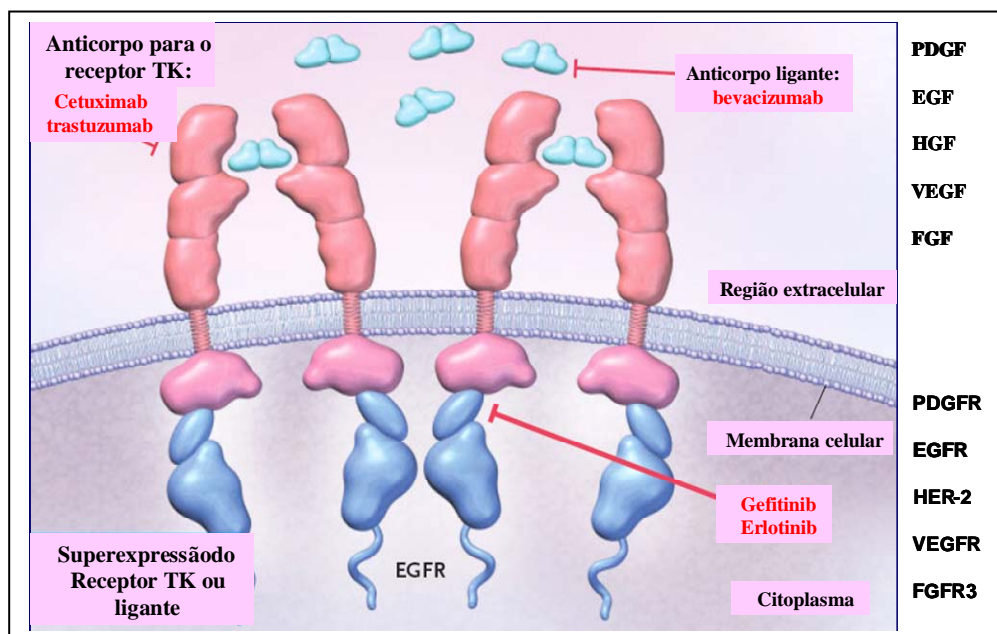


FIGURA 6 - Mecanismo de desregulação da tirosina quinase pela superexpressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e dos seus ligantes e alvos terapêuticos no câncer. Exemplos de agentes terapêuticos-alvos estão grafados de vermelho. As pequenas moléculas inibidoras da TK (gifitinib e erlotinib) agem bloqueando a ligação do ATP ao substrato para o domínio catalítico da tirosina quinase. Os receptores das TKs e seus ligantes podem ser bloqueados por anticorpos monoclonais, impedindo a dimerização do receptor (porção superior da figura). Os ligantes mais comuns são: fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento do hepatócito (HGF), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento do fibroblasto (FGF), e seus respectivos receptores TKs PDGFR, EGFR, HER-2, VEGFR e FGFR3. Modificada de Krause, D.S.; Van Etten, R.A. Tyrosina kinases as targets for cancer therapy. N. Engl. J. Med., v. 353, p. 177, 2005.

1.5 Receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR)

O EGFR é uma proteína de 170 kDa, localizada na superfície celular; consiste de um domínio ligante extracelular, uma região transmembrana e um domínio intracelular. A transdução do sinal do EGFR exerce uma função importante no processo de tumorigênese, influenciando a proliferação, angiogênese e metástase e, ainda, bloqueando a apoptose (HUANG et al., 1999). O EGFR (ErbB-1 ou HER-1) é um dos membros da família de receptores da tirosina quinase (RTK), como citado acima; a família inclui outros receptores

com funções semelhantes, o ErbB-2/HER2, ErbB-3/HER3 e ErbB-4/HER4 (YARDEN et al., 2001). Estes receptores são ativados por diferentes ligantes, incluindo o fator de crescimento epidérmico (EGF), fator transformador de crescimento alfa ($TGF\alpha$) e as neuregulinas. Estes ligantes ativam principalmente os receptores EGFR e HER-2 por se ligarem ao seu domínio extracelular, induzindo a dimerização do receptor (GRAUS-PORTA et al., 1997). A dimerização, semelhante à que ocorre com os outros receptores da TK, desencadeia a ativação do domínio intracelular do receptor e a autofosforilação da tirosina quinase do resíduo intracelular do receptor, com a subsequente ativação de várias moléculas sinalizadoras da execução de diferentes funções celulares (LENFERINK et al., 1998).

As vias mais importantes de sinalização das TKs ativadas pelo EGFR são as do Ras-Raf-MEK-ERK e do PI3K-PDK1-AKT. Estas vias estão diretamente envolvidas na expressão de genes relacionados com a proliferação celular, angiogênese, inibição da apoptose, diferenciação, adesão e migração (Figura 7) (YARDEN et al., 2001; JANMAAT e GIACCONE, 2003). As células que superexpressam o EGFR ativam estas vias que, por sua vez, modulam os níveis de moléculas pró-apoptóticas tipo ciclinas D1 e ciclinas quinase-dependentes (CDK), e, assim, desregulam os “checkpoints” do ciclo celular na transição G1/S, resultando no aumento da sobrevivência das células tumorais (HACKEL et al., 1999).

O EGFR pode também ser ativado por outros estímulos que não se ligam diretamente ao receptor, tais como hormônios, linfocinas e o fator estresse (CARPENTER, 1999). Estes estímulos promovem a transativação do EGFR e também induzem a resposta mitogênica nas células através da TK, a qual pode ser inibida pelo gefitinib. A sinalização do EGFR via fosforilação do domínio intracelular da proteína TK pode, portanto, ser bloqueada por pequenas moléculas inibidoras da tirosina quinase (TKI) ativadas pelo EGFR. Isto foi demonstrado pela administração de anticorpos contra o ErbB-1 ou de drogas específicas para inibir o receptor da tirosina quinase, como o gefitinib, que inibiram o crescimento tumoral dos cânceres que superexpressavam estes receptores, como o carcinoma de pulmão de não pequenas células (CIARDIELLO et al., 2000).

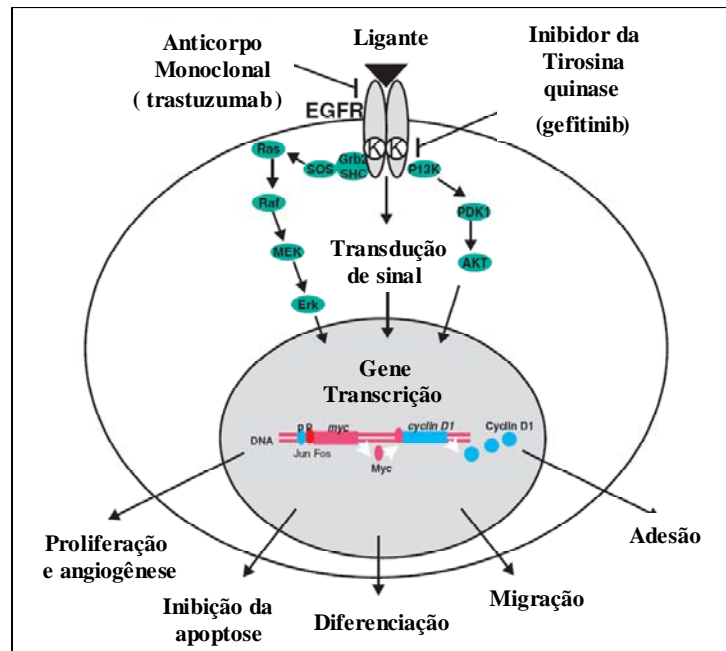


FIGURA 7 - Vias de sinalização do Ras-Raf-MEK-ERK e do PI3K-PDK1-AKT ativadas pelo EGFR e relacionadas com a proliferação celular, angiogênese, inibição da apoptose, diferenciação, adesão e migração. Modificada de Janmaat, M. L, Giaccone, G. Small-Molecule Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors. *The Oncologist*, v. 8, p. 577, 2003.

1.6 EGFR Como Alvo Para Terapêutica Anticâncer

A atividade do EGFR é essencial para o desenvolvimento embrionário, estando mais especificamente envolvida na organogênese de muitos órgãos derivados do mesoderma e ectoderma, tais como o cérebro, o coração e o pulmão (THREADGILL et al., 1995). Apesar de o EGFR ter um papel crítico na embriogênese, no organismo do adulto aparentemente não possui uma função fisiológica definida, embora os receptores do ErbB estejam envolvidos no desenvolvimento das glândulas mamárias (TROYER et al., 2001). Tem sido mostrado que o EGFR exerce um papel crítico no desenvolvimento e na progressão do câncer, e que a expressão aumentada ou aberrante do EGFR ou de seus ligantes é comum em muitos tipos de tumores e correlaciona-se com doença mais agressiva e de pior prognóstico (TANG et al., 2000). Isto é explicado pelas ações que a expressão desregulada do EGFR exerce sobre o crescimento tumoral, incluindo a promoção da

proliferação celular, a angiogênese, invasão, metástases e a inibição da apoptose (TANG et al., 2000; WOODBURN, 1999). Apesar da expressão do EGFR ser um fator prognóstico importante em alguns tumores, tais como os de cabeça e pescoço, ovário, mama, esôfago, pulmão e bexiga, ainda não existe um teste ou um “cutoff” padrão para avaliar e definir a superexpressão de EGFR nos tecidos (ARTEAGA, 2002). Por isto, as pesquisas clínicas não devem incluir somente pacientes que tenham alta expressão de EGFR ou excluir aqueles com baixo nível em ensaios com inibidores do EGFR (ARTEAGA, 2002). A inibição ou o bloqueio das ações do EGFR sobre as células tumorais tem se tornado um alvo racional e importante no tratamento do câncer. Neste sentido, vários compostos químicos que inibem a atividade quinase do EGFR têm sido desenvolvidos especificamente contra o receptor ou seus ligantes (CIARDIELLO et al., 2001). Estas moléculas diferem entre si pela capacidade de ligar-se ao receptor de forma reversível ou irreversível ou, ainda, de inibir outros membros da família de receptores ErbB. Dentre elas estão os anticorpos monoclonais contra o domínio extracelular do receptor e as pequenas moléculas inibidoras da tirosina quinase do EGFR (EGFR-TKI), com destaque para o gefitinib (iressa[®]), descrita anteriormente, e o erlotinib (tarceva[®]), como as moléculas mais estudadas.

1.6.1 Gefitinib

O gefitinib (Iressa[®], Astra Zeneca, London, Reino Unido) (Figura 8) é um inibidor seletivo e reversível do receptor do fator de crescimento epidérmico inibidor da tirosina quinase (EGFR-TKI) pertencente à classe das anilinoquinazolininas, ativo por via oral, em dose única diária (ARTEAGA e JOHNSON, 2001). Esta droga tem uma ação predominantemente citostática *in vitro*, embora em alguns casos tenha sido observado um efeito citotóxico contra uma variedade de linhagens celulares de câncer humano que expressam o EGFR, como as do câncer de mama, ovário e cólon (CIARDIELLO et al., 2000; JANMAAT et al., 2003). O Gefitinib tem ainda atividade contra o câncer de próstata, cólon e CNPC de pulmão, *in vivo*, em modelos de enxertos de tumor ectópico e em estudos clínicos (CIARDIELLO et al., 2000; WAKELING et al., 2002; KIM et al., 2005; NIHO et al., 2006).

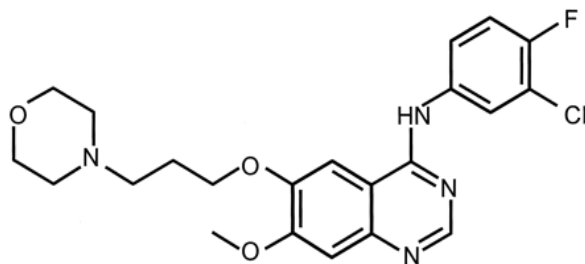


FIGURA 8 - Estrutura química do gefitinib: 4-(3-cloro-4-fluoroanilina)-7-metoxi-6-(3-morfolinopropoxi)-quinazolina.

O efeito antitumoral dos inibidores da EGFR-TK se deve a uma super-regulação dos inibidores da Cdk, resultando em uma inibição das atividades da Cdk, na parada do ciclo celular na fase G1 e, também, em uma diminuição dos níveis de VEGF e bFGF, reduzindo a neovascularização (CIARDIELLO et al., 2001).

Por fim, com base em relatos da literatura, pode-se enumerar alguns aspectos em relação ao EGFR e às drogas anti-EGFR: o EGFR parece ter uma importante função na sinalização da via de crescimento tumoral em variedade de tumores malignos (ARTEAGA, 2002); os inibidores do EGFR-TK têm uma atividade antitumoral em muitos tipos de câncer, inclusive no CNPC de pulmão (NIHO et al., 2006); os efeitos antitumorais do gefitinib são atribuídos a uma ação antiproliferativa e a outros mecanismos, como a inibição da angiogênese, invasão e metástase (CIARDIELLO et al., 2001; HIRATA et al., 2002); os efeitos antiangiogênicos do gefitinib podem ser potencializados com o uso combinado de drogas citotóxicas ou radiação (CIARDIELLO et al., 2001); o bloqueio combinado do EGFR e do HER2 pelo gefitinib e outros compostos alvo-direcionados pode potencializar o efeito antitumoral em cânceres que expressem estes receptores (MOASSER et al., 2001); e a diversidade de respostas às drogas anti-EGFR pode ser explicada por possíveis variações na expressão ou no estado de atividade do EGFR (CIARDIELLO et al., 2000; CALVO et al., 2002).

1.7 Angiogênese tumoral

O surgimento de novos vasos sanguíneos em torno de um tumor maligno foi relatado por Goldman (1907) há cerca de um século; posteriormente, foi demonstrado nos trabalhos pioneiros de Folkman (1971) que os tumores, ao alcançar um diâmetro de 1-2

mm, devem induzir a angiogênese para poder crescer (WEIDNER et al., 1991; FOLKMAN, 2003).

A indução da angiogênese é mediada por múltiplas moléculas estimuladoras, que podem ser expressas pelas células tumorais ou por células do estroma reativo do hospedeiro recrutadas pelo tumor (POLVERINI e LEIBOVICH, 1984; MULLER e FUSENING, 2004).

O processo de angiogênese tumoral inicia-se por um desequilíbrio entre os fatores proangiogênicos e antiangiogênicos, no momento em que a “upregulation” dos fatores estimuladores predomina ou se associa a uma “downregulation” dos fatores inibidores (O'REILLY et al., 1996).

Existem vários polipeptídeos com atividade angiogênica. Nas últimas duas décadas foram clonados mais de 10 destes compostos. Entre os principais polipeptídeos angiogênicos estão o fator básico de crescimento fibroblástico (bFGF), o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e o fator de crescimento do endotélio derivado das plaquetas (PDGF). Existem outras substâncias angiogênicas menos específicas, destacando-se entre elas os fatores transformadores de crescimento α e β (TGF- α e TGF- β), o fator de necrose tumoral α (TNF- α), o fator de dispersão (scatter factor – SF), o fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e a interleucina 8 (IL-8) (TEMECK e PASS, 1998).

Masferrer et al., em 2000, demonstraram ainda atividade angiogênica em outras moléculas como nicotinamida, adenosina, ciclooxigenase-2 (COX-2) e as prostaglandinas (PGE₁ e PGE₂) derivadas da conversão do ácido aracdônico pela COX-2.

Existem também vários fatores inibidores da angiogênese, destacando-se entre eles os esteróides, a fumagilina e seus derivados, o interferon α e β (IFN- α e IFN- β), a interleucina-12, a angiostatina (fragmento do plasminogênio), a endostatina (fragmento do colágeno), os inibidores do VEGF e do bFGF, e os inibidores das metaloproteinases (O'REILLY et al., 1994). A maioria dos inibidores da angiogênese (fator plaquetário 4, prolactina, interferon α , interleucina-12 e angiostatina) é constituída de proteínas endógenas que têm a função fisiológica de delimitar o poder de replicação das células

endoteliais. Algumas destas proteínas inibem também a angiogênese *in vivo*, sendo a angiostatina a mais potente delas.

Alguns estudos na literatura têm mostrado que drogas com ação antiinflamatória, como a talidomida, os inibidores seletivos da COX-2 e os inibidores da tirosina quinase do EGFR, como o gefitinib, apresentam ação antiangiogênica (KRUSE et al., 1998; MASFERRER et al., 2000; CIARDIELLO et al., 2001). Quando 1 traz uma relação das principais substâncias antiangiogênicas.

QUADRO 1 - Principais substâncias inibidoras da angiogênese

Angiostatina

Endostatina

IL-12 (Interleucina-12)

IFN- α e IFN- β (Interferon α e β)

Fumagilina

Protamina

Inibidores do VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular)

Inibidores do bFGF (fator básico de crescimento fibroblástico)

Inibidores das metaloproteinases

Inibidores das integrinas vasculares $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_3$

Inibidores da COX-2 (ciclooxigenase-2)

Inibidores da tirosina quinase do receptor EGF (EGFR-KI)

Talidomida

A angiogênese é importante, tanto na indução do crescimento tumoral quanto no desenvolvimento de metástases. A diferença de vascularização entre tumores malignos e benignos depende da expressão dos fatores angiogênicos, bem como dos seus receptores nas células endoteliais e no estroma tumoral. Esses fatores se mantêm persistentemente elevados após o implante experimental de tumores malignos, mas diminuem rapidamente depois do implante de tumores benignos (SKOBE et al., 1997; ONN et al., 2003). No tumor maligno observa-se inicialmente a ativação do estroma através da rápida progressão dos vasos sanguíneos e das células do próprio estroma em direção às células tumorais. A subsequente infiltração dos vasos sanguíneos no interior do tecido tumoral parece ser um pré-requisito para a invasão tumoral (SKOBE et al., 1997).

Skobe et al. (1997) mostraram também em camundongos que a confirmação da expressão do VEGFR permite fazer a distinção entre células malignas e benignas, e que o bloqueio deste receptor por anticorpos monoclonais inibe a angiogênese e a invasão das células malignas, sem reduzir a proliferação celular. Portanto, através da parada da angiogênese, o bloqueio do VEGFR transforma um tumor maligno em tumor não invasivo, com fenótipo benigno, mostrando com isso a importância da vascularização na invasão tumoral.

A expressão do VEGF pode ocorrer em mais de 50% dos CPNPC e correlaciona-se com o aumento da densidade microvascular intratumoral e com a piora do prognóstico (MASUYA et al. 2001). A interleucina-8 (IL-8), da família das quimiocinas, é também um potente fator angiogênico e, assim como o VEGF, é expressa em cerca de 50% dos CPNPC. Outros fatores angiogênicos, tais como o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento do fibroblasto básico (bFGF), são também expressados pelos CNPC, mas infreqüentemente pelo carcinoma de pequenas células (YATSUNAMI et al., 1997; YAMASHITA et al., 1999). Todos estes fatores correlacionam-se com a piora do prognóstico do tumor (TAKANAMI et al., 1996; JUNKER, 2001). As metaloproteinasas (MMP) e seus inibidores (IMMP) desempenham uma importante função na promoção da angiogênese e também no desenvolvimento de metástases tumorais, tanto no CPNP quanto no CPC do pulmão (NELSON et al., 2000; BONOMI, 2002).

Ainda em relação às metástases, o complexo E-caderina-catenina é importante na manutenção da arquitetura tissular (BREMNES et al., 2002). A perda da expressão da E-caderina está relacionada com o aumento da invasividade local, com o surgimento de metástases e, portanto, com a piora do prognóstico no câncer de pulmão (HIRATA et al., 2001; KALOGERAKI et al., 2003).

1.8 Ciclooxygenase 2 (COX-2)

A enzima ciclooxygenase (COX) é encontrada na maioria das células. Dois genes são responsáveis pelo controle genético e expressão da ciclooxygenase-1 (COX-1) e ciclooxygenase-2 (COX-2), cada uma das quais com funções orgânicas diferentes (HERSCHMAN, 1994). A COX-1, também denominada enzima constitutiva, é expressa nas células da maioria dos tecidos em condições fisiológicas, enquanto a COX-2, ou enzima induzida, é raramente detectável na maioria dos tecidos, embora seja expressa nas células inflamatórias em condições patológicas e nas células tumorais, induzida por citocinas, fatores de crescimento e oncogenes (NEEDLEMAN et al., 1986; LEVY, 1997). A disponibilização recente de drogas inibidoras da COX-2 oferece a possibilidade de interferir no desenvolvimento do câncer e na progressão de metástases, o que torna a enzima COX-2 um alvo estratégico atraente na quimioprevenção e no tratamento de pacientes com câncer de pulmão (CASTELAO et al., 2003).

COX-1 e COX-2 são responsáveis pela síntese das prostaglandinas E (PGEs) a partir do ácido aracdônico. Inicialmente, o ácido aracdônico é liberado do estoque de fosfolípido de membrana pela ação da fosfolipase. O passo seguinte é a conversão do ácido aracdônico em PGH₂ pela prostaglandina sintetase (ciclooxygenase) e, finalmente, em prostaglandina E₂ (PGE₂).

Sabe-se hoje que a enzima COX-2 é expressa em células de muitos tumores malignos epiteliais, inclusive no câncer NPC de pulmão. COX-2 e seus derivados (PGE₂) parecem estar envolvidos na carcinogênese destes tumores, participando do processo de iniciação tumoral, apoptose, angiogênese, crescimento, invasão e metástase, embora por

mecanismos ainda não bem definidos (TSUJII et al., 1995; TSUJII et al., 1997; ROBERTSON et al., 1998; MASFERRER et al., 2000; CASTELAO et al., 2003).

O mecanismo de ação da carcinogênese pela COX-2 ainda não foi completamente esclarecido, mas parece ser desencadeado pelo excesso de produção de PGE₂ decorrente de uma “upregulation” da COX-2 (HARRIS et al., 1999). Isto provocaria mutações por moléculas de radicais livres formadas pela biossíntese sustentada de prostaglandina (HARRIS et al., 1999). Outro mecanismo pelo qual a PGE₂ estimula a carcinogênese e o crescimento tumoral é através da indução da angiogênese, que ocorre pela expressão aumentada do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) estimulada pela COX-2, via PGE₂, (FORM e AUERBACH, 1983; HANAHAN e FOLKMAN, 1996) (Figura 9. A participação da COX-2 no processo de angiogênese tumoral foi também confirmada, em modelo animal, pela observação da expressão de COX-2 nos vasos tumorais neoformados, enquanto em tecidos normais, os vasos expressavam somente a enzima constitutiva COX-1 (MASFERRER et al., 1999). Como foi descrito antes, a angiogênese, ou neovascularização tumoral, é necessária para o suprimento de oxigênio e nutrientes a tumores com diâmetro maior ou igual a 2 mm, sendo fundamental para manter a viabilidade e o crescimento do tumor.

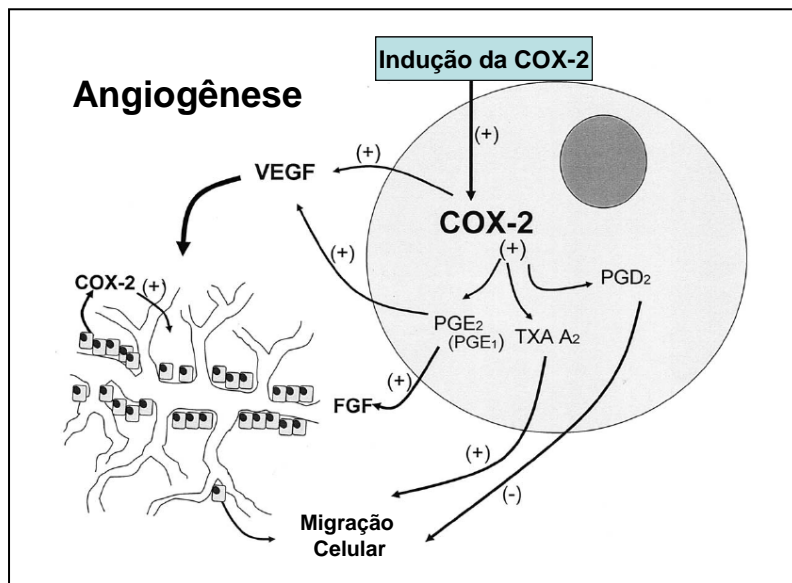


FIGURA 9 - A indução da ciclooxygenase-2 (COX-2) estimula mediadores da angiogênese. PGE₂, PGE₁ e COX-2 estimulam VEGF, um potente estimulador da neovascularização. PGE₂ ativa também FGF, resultando em aumento da angiogênese. TXA-A₂ é associado com migração celular. (FGF = fator de crescimento fibroblástico; PGE₁ = prostaglandina-E1; PGE₂ = prostaglandina-E2; PGD₂ = prostaglandina-D2; TXA-A₂ = tromboxano A₂; VEGF = fator de crescimento do endotélio vascular). Modificada de Castelao, J.E. et al. Lung cancer and cyclooxygenase-2. *Ann. Thorac Surg.*, v. 76, p. 1331, 2003.

A expressão ou “upregulation” da COX-2 no endotélio dos novos vasos tumorais angiogênicos, mas não nas células tumorais, na maioria das amostras de biópsias de pacientes com câncer de esôfago, estômago, cólon, mama, próstata e pulmão, reforça a hipótese do envolvimento desta enzima no mecanismo de indução da angiogênese (TSUJII et al., 1998 ZIMMERMAN et al., 1999; MURATA et al., 1999; MASFERRER et al., 2000).

Como já dissemos, outros autores apontam ainda o envolvimento de diversos mecanismos bioquímicos no desenvolvimento do câncer através da ação da COX-2 e seus derivados (PGEs). Estes incluem, além da atividade angiogênica da COX-2 (MASFERRER et al., 2000), o aumento da proliferação celular (SHENG et al., 1998), a prevenção da apoptose pelo aumento da expressão do Bcl-2 (TSUJII e DUBOIS, 1995), o aumento do potencial metastático pela “downregulation” da E-caderina e consequente redução da adesão celular, e pelo aumento da matriz metaloproteinase (MMP) (TSUJII et al., 1997) e a

inibição da vigilância imunológica associada ao aumento dos níveis de IL-10 e à diminuição dos níveis de IL-12 (HUANG et al., 1998).

1.8.1 Inibidores da COX-2

Os antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs), tais como a aspirina, a indometacina e o ibuprofeno, inibem tanto a COX-1 quanto a COX-2, e bloqueiam a cascata da síntese das PGEs (VANE et al., 1971). As primeiras manifestações antitumorais dos AINEs foram observadas em ratos e tiveram por mecanismo a inibição da indução de tumor maligno de mama pelo 7,12-dimetilbenz(a)antraceno com o uso de indometacina (MCCORMICK et al., 1985).

Na época, os autores atribuíram a inibição da tumorigênese a uma possível ação local ou sistêmica da indometacina. Posteriormente, usando ibuprofeno, Robertson et al.(1998) obtiveram uma redução no volume tumoral de carcinoma mamário de rato e inibição da expressão dos genes das isoformas I e II das ciclooxigenases responsáveis pela produção de prostaglandinas. Foi demonstrado também em humanos que a ingestão regular de aspirina ou outro AINE reduzia, em até 50%, a possibilidade de morrer de câncer de cólon, em pessoas de risco, indicando um efeito quimiopreventivo nos AINEs (DUBOIS et al., 1998).

1.8.1.1 Celecoxib

O celecoxib (Figura 10), um AINE inibidor seletivo da COX-2, portanto com menor toxicidade que os outros AINEs, foi uma das primeiras drogas antiinflamatórias e analgésicas que surgiram com ação seletiva para esta enzima (Mitchell et al., 1994).

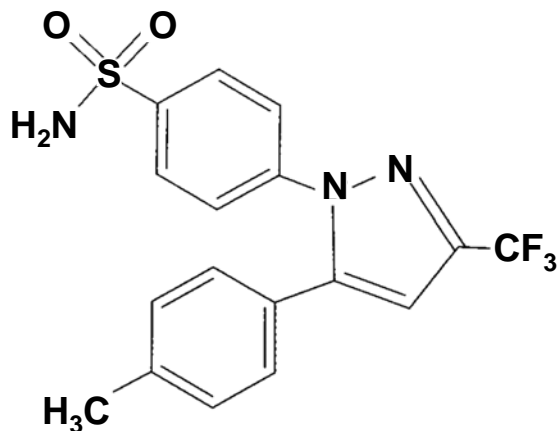


FIGURA 10 - Estrutura química do celecoxib: 4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1-H-pirazol-1-Y1]-benzenesulfonamida.

A participação das prostaglandinas derivadas da COX-2 no crescimento tumoral e na formação de novos vasos foi confirmada por Masferrer et al. (2000) quando da sua observação da capacidade do celecoxib de suprimir ou retardar de maneira significativa o crescimento de tumores humanos de pulmão e cólon implantados em camundongos atímicos, além de reduzir em 50% a incidência de metástase nos animais tratados. Estes autores constataram ainda que o celecoxib, ao contrário dos inibidores da COX-1, apresentava uma potente atividade antiangiogênica através da inibição da formação de novos vasos em um modelo de angiogênese em córnea de rato. Esses autores constataram ainda, por método imunohistoquímico, um aumento significativo da expressão da COX-2, tanto nas células neoplásicas quanto nos vasos intratumorais de tumores de cólon, próstata, pulmão e mama, implantados na pata traseira de camundongos atímicos.

Entretanto, ao contrário da expressão da COX-2, a qual foi observada somente nos tecidos neoplásicos, houve expressão da COX-1 tanto nos tecidos normais, sobretudo nos fibroblastos e células da musculatura lisa, quanto nos vasos do estroma tumoral. Com estes resultados, os autores apontaram a possibilidade do uso desse agente antiinflamatório no tratamento do câncer em humanos.

Com o intuito de determinar a contribuição da COX-2 e o efeito do celecoxib na angiogênese, Kenyon et al.(1996) testaram doses crescentes de celecoxib em modelo de córnea de camundongo *in vivo* e observaram uma redução do número e comprimento dos brotos capilares de forma dose-dependente, tendo o efeito inibitório máximo sido alcançado com a dose de 30 mg/kg/dia. Para verificar se a atividade antiangiogênica do celecoxib se devia à inibição da síntese das prostaglandinas, os autores testaram um isômero inativo (1,3- *versus* 1,5-diarilpirazol) do celecoxib sem no entanto observar qualquer atividade antiangiogênica com a dose máxima de 30 mg/kg/dia. Tampouco houve redução da angiogênese no mesmo modelo com o uso de indometacina, considerada um potente inibidor de COX-1 e 2.

Kawamori et al.(1998) demonstraram uma ação quimiopreventiva do celecoxib no câncer de cólon, como um dos primeiros indícios da ação de um inibidor seletivo da COX-2 no câncer.

Harris et al.(2000) observaram também uma ação quimiopreventiva do celecoxib pela redução do risco de câncer de mama em rato, atribuída a uma modulação das etapas da carcinogênese induzida pela droga. Além disso, relataram uma redução significativa na incidência, multiplicidade e volume dos tumores mamários nos animais tratados com celecoxib em relação ao grupo controle. Neste estudo não foram observados efeitos colaterais como sangramento ou úlceras gastrointestinais com o uso do celecoxib.

Mais recentemente, DiPerna et al.(2003) mostraram que a inibição seletiva da COX-2 com celecoxib inibiu de maneira significativa o crescimento tumoral e a formação de metástases mediastinais de uma linhagem de câncer de pulmão humano em um modelo ortotópico em camundongo.

Os indícios de que a COX-2 e seus derivados têm uma participação importante na tumorigênese e de que o uso de inibidores seletivos da COX-2, por inibir a angiogênese, retarda o crescimento tumoral e reduz a incidência de metástases em vários tipos de tumores, apontam para uma nova indicação dos antiinflamatórios inibidores da COX-2 na quimioprevenção e no tratamento do câncer em animais e em humanos. Isto nos estimulou a investigar a ação do celecoxib sobre o crescimento tumoral e a sobrevivência de animais usando um modelo de tumor de pulmão com o sarcoma de Walker.

1.9 Talidomida

A talidomida ou α -N-ftalimido-glutarimida (Figura 11) é uma substância química derivada da piperidina, inicialmente usada na clínica pelos seus efeitos hipnóticos e depois como droga antiinflamatória, imunomoduladora e antitumoral, de baixa toxicidade sistêmica. A talidomida e seus análogos imunomoduladores pertencem a uma classe de compostos com efeitos no sistema imune, alguns deles responsáveis pelas ações antiinflamatórias e antitumorais destas drogas. A talidomida foi sintetizada primeiro na Alemanha em 1954, e os estudos preliminares em animais mostraram ter um efeito sedativo e hipnótico indutor do sono, com pouquíssima toxicidade e menor potencial de overdose que os barbitúricos (TEO et al., 2002). Todavia, estes estudos não incluíram toxicologia reprodutiva em animais não roedores tipo coelhos e macacos, que fatalmente teriam mostrado os efeitos teratogênicos da droga.

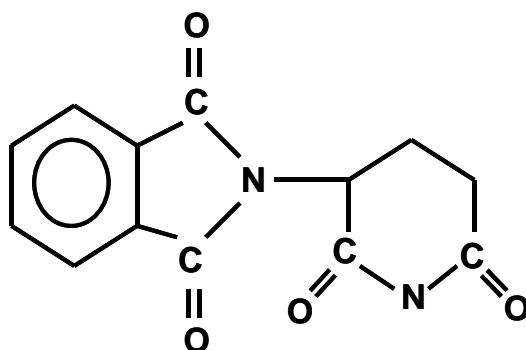


FIGURA 11 - Estrutura química da talidomida

A talidomida foi aprovada inicialmente como um sedativo com efeitos anti-eméticos na Alemanha em 1957, e subseqüentemente em outros países que incluíram o Reino Unido, Canadá e Austrália. A droga passou rapidamente a ser usada na gravidez por seus efeitos anti-eméticos. Entretanto, o fato de a talidomida ter produzido efeitos teratogênicos graves, como o aparecimento de malformações (focomelia) em recém-nascidos de gestantes que a utilizaram nos primeiros meses de gravidez, fez com que a sua comercialização fosse proibida em 1961 (MELLIN e KATZENSTEIN, 1962; TSENG et al., 1996). As deformidades nos recém nascidos apareceram rapidamente, e quando a droga foi retirada do

mercado, em 1961, já haviam nascido em mais de 40 países cerca de 12000 crianças com deformidade (MELLIN e KATZENSTEIN, 1962).

Nos Estados Unidos a talidomida nunca tinha sido aprovada, mas, em 1998, depois de ter sido retirada do mercado há mais de 40 anos, foi liberada por recomendação da Organização Mundial de Saúde, para o uso na lepra, no tratamento do eritema nodoso (EN) crônico (reação dermatológica dolorosa do leproso), por seu excelente efeito antiinflamatório nesta doença (ZELDIS et al., 1999; TEO et al, 2002).

Contudo, os pacientes selecionados para o uso da droga, assim como os farmacêuticos e os médicos, são submetidos a um cadastro obrigatório, além dos pacientes serem convidados a assistirem um vídeo que mostram vítimas do efeito teratogênico da talidomida (ZELDIS et al., 1999). Aos pacientes sexualmente ativos são indicados o uso de duas formas de contracepção, o que faz da talidomida uma das drogas de maior restrição para a sua prescrição dentre aquelas até então aprovadas nos Estados Unidos (ZELDIS et al. 1999). Apesar de a talidomida ser aprovada somente para o EN da lepra, nos Estados Unidos ela vem sendo usada experimentalmente, de forma isolada ou combinada com terapias convencionais no tratamento de doenças neoplásicas, dermatológicas e inflamatórias (STIRLING, 1998; SINGHAL et al., 1999; RAJE e ANDERSON, 2002).

A descoberta de uma ação inibidora da angiogênese pela droga, despertou o interesse da comunidade científica internacional para a realização de muitos estudos clínicos no tratamento de tumores sólidos (D'AMATO et al., 1994; FIGG et al., 2001; DALIANI et al., 2002; MALL et al., 2002). A droga é ministrada por via oral, nas doenças benignas (dermatológicas e inflamatórias) em doses que variam de 100 a 400 mg/dia (2 to 8 mg/kg/dia), e nas oncológicas de 200 to 400 mg/dia (4 to 8 mg/kg/dia). A aprovação da talidomida está em processo de aprovação pelo FDA, para o mieloma múltiplo, cuja resposta completa tem alcançado cifras de até 32%, para os pacientes pré-tratados (DRACH et al., 2004). Dos efeitos colaterais atribuídos ao uso da talidomida, alguns são dose-dependente, e incluem sonolência, constipação, rash cutâneo, neuropatia periférica e trombose venosa profunda (GHOBRIAL e RAJKUMAR, 2003).

Foram sintetizados alguns análogos da talidomida, como a Lenalidomida (Revlimid[®]) e o CC-4047 (Actimid[®]), com maior atividade antiinflamatória e antitumoral, e com menos efeitos adversos. Essas drogas têm também uma ação imunomoduladora bem mais potente que a talidomida (CORRAL e KAPLAN, 1999; MULLER et al., 1999). A talidomida e seus análogos exercem atividade imunomoduladora ao inibir a síntese do fator de necrose tumoral- α (TNF- α), das interleucinas (IL) 1 β , 6, 12, e do fator estimulador de colônia dos granulócitos e macrófagos (GM-CSF), e estimular a de IL-10 pelas células mononucleares (CORRAL et al., 1999). A talidomida estimula ainda a proliferação de linfócitos T que aumenta a atividade citotóxica anti-câncer, induz a expressão de IL-2, e inibe a do TNF- α , responsável também pela ação imunomoduladora da droga (MOREIRA et al., 1993). O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória produzida pelos monócitos, macrófagos e linfócitos, e sua elevação está associada com várias doenças imunes e inflamatórias, como artrite reumatóide, doença de Crohn, tuberculose, caquexia do câncer e EN da lepra (CORRAL et al., 1999). Sampaio et al, em 1991, demonstraram pela primeira vez um bloqueio seletivo pela talidomida da produção de TNF- α por monócitos humanos estimulados com lipopolissacárides (LPS), e aventaram um possível benefício do uso da droga em pacientes com câncer, no sentido de amenizar a caquexia geralmente associada a níveis elevados de TNF- α nestes pacientes. Tramontana et al., em 1995, constataram também que o TNF- α e a IL-1 estavam aumentados em pacientes com tuberculose, e que o tratamento deste pacientes com talidomida diminuía os níveis tanto do TNF- α como da IL-1. Ao lado disto, eles observaram um aumento de peso dos pacientes tratados com talidomida. Baseados nestes resultados, os autores presumiram que a perda de peso dos pacientes tuberculosos deveria estar associada a uma produção crônica de TNF- α .

1.9.1 Atividade antitumoral da talidomida

A talidomida e seus análogos têm uma propriedade antiangiogênica pela inibição da expressão do VEGF, bFGF e da COX-2, que aliada ao seu efeito imunomodulador é responsável pela ação antitumoral em alguns tipos de câncer (D'AMATO et al., DREDGE et al., 2002; 1994; LI et al., 2003; SON et al., 2006). A inibição da IL-6 é responsável pelo

mecanismo anti-proliferativo, enquanto a diminuição da expressão do fator nuclear (NF)- κ B e de outras proteínas induzem a apoptose. A talidomida também estimula a atividade antitumoral das células T, mediada pela IL-2 e IFN- γ . Em suma, os efeitos antitumorais da talidomida são atribuídos às atividades imunomoduladoras, antiangiogênicas, antiproliferativas e proapoptóticas. Estas ações medeiam as respostas antitumorais observadas no mieloma múltiplo refratário e nos tumores sólidos, embora o mecanismo exato ainda não tenha sido completamente esclarecido (D'AMATO et al., 1994; SINGHAL et al., 1999; RICHARDSON et al., 2001). Os estudos na oncologia têm mostrado um aumento da sobrevida de pacientes com tumores de pulmão de pequenas células (Mall et al., 2002), não pequenas células (GALLIGIONI e FERRO, 2001; SHEPHERD, 2001) e outros tumores (rim, próstata, ovário e mama (EISEN et al., 2000; FIGG et al., 2001; DALIANI et al., 2002) tratados com talidomida nas doses de 100 a 200mg por dia, com poucos efeitos colaterais, tipo sonolência e neuropatia periférica que desaparecem com a diminuição da dose.

As ações antitumorais da talidomida observada nos estudos experimentais com tumores sólidos nos estimularam a testar esta droga para validar o presente modelo com o carcinossarcoma de Walker. Acreditamos que os congêneres da talidomida, sem a sua teratogenicidade e com uma maior potência antiangiogênica e imunomoduladora, seja paulatinamente introduzida na prática clínica, como uma importante opção terapêutica das doenças inflamatórias e neoplásicas.

1.10 Paclitaxel

O paclitaxel é uma droga semi-sintética precursora do taxane. Tem uma estrutura química complexa ligada por um ester a um anel do taxane na posição do C13, essencial para a atividade antimicrotúbulo e antitumoral da droga (Figura 12).

Os taxanes são uma classe de drogas naturais com grande espectro de ação antitumoral, inicialmente extraída da casca do teixo ocidental (*Taxus brevifoli*). O paclitaxel foi inicialmente aprovado nos EUA para o tratamento de pacientes com câncer de ovário com falência aos esquemas de primeira linha, e a seguir para pacientes com câncer

de mama (ROWINSKY e DONEHOWE, 1995). Posteriormente o paclitaxel foi aprovado pelo FDA em combinação com a cisplatina como esquema de primeira linha no tratamento do câncer de pulmão não pequenas células (BONOMI et al., 2000).

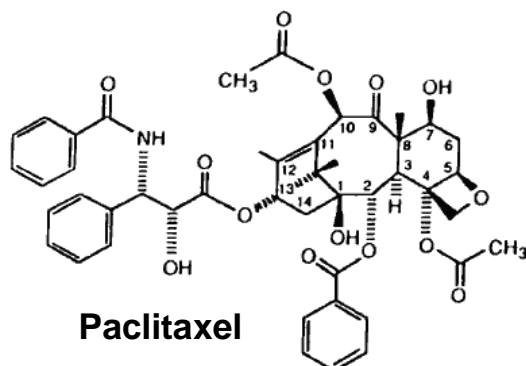


FIGURA 12 - Estrutura química do paclitaxel.

O paclitaxel tem como mecanismo de ação principal a estabilização e a polimerização dos microtúbulos através de uma ligação com o N-terminal da subunidade β -tubulina. Essa estabilidade inibe a reorganização dinâmica da rede de microtúbulo, que é essencial para muitas funções celulares vitais na interfase da mitose. Isso resulta em retardo ou bloqueio da mitose na metáfase/anáfase, similar ao que ocorre com os alcalóides da vinca (KUMAR, 1981).

O paclitaxel não tem boa biodisponibilidade por via oral e geralmente é administrado por via intravenosa, na dose de 175 mg/m^2 a cada três semanas. Do ponto de vista farmacológico apresenta grande volume de distribuição, meia vida longa, liga-se a todos os tecidos, com exceção do sistema nervoso central, sendo metabolizado no fígado e excretado pela via biliar. A mielossupressão é a sua principal toxicidade, manifestada geralmente por neutropenia. Anemia e trombocitopenia severa são incomuns, exceto em pacientes previamente tratados (ROWINSKY e DONEHOWE, 1995).

1.11 Modelos de tumor de pulmão

Nos últimos anos foram descritos vários modelos de tumor de pulmão em camundongos e em ratos. Esses modelos permitem o estudo da biologia tumoral e de todas

as etapas da carcinogênese. No modelo de tumor de pulmão em camundongo pode se desenvolver os tipos histológicos humanos, como por exemplo, o adenocarcinoma, com as características morfológicas e moleculares similares às vistas no ser humano. Isso permite não somente o estudo da biologia tumoral, mas também a avaliação de resposta terapêutica de novas drogas e a identificação de novos marcadores para o diagnóstico precoce do câncer. A similaridade do fenótipo e genótipo do câncer de pulmão entre murinos e humanos torna-se relevante para o estudo do câncer nestes animais (SARGENT et al., 2002).

Os modelos já descritos em camundongos incluem os espontâneos, que são os tumores que se originam nos pulmões induzidos por carcinógenos (REHM et al., 1991); os modelos que resultam da indução de tumores em animais transgênicos e nocauteados (knockout) que têm melhorado com a geração de linhagem de camundongos portadores de mutações em oncogenes e genes supressores, simulando às encontradas no câncer de pulmão humano (CHEN et al., 1994; KANG et al., 2000); e os modelos ectópicos e ortotópicos de câncer de pulmão com o implante de várias linhagens de carcinoma humano. O conhecimento detalhado das alterações genéticas e moleculares do câncer de pulmão humano, como as descritas acima, é indispensável para o desenho dos modelos em camundongo e para a definição dos estudos que se deseja executar.

1.11. 1 Modelo de câncer de pulmão espontâneo ou induzido quimicamente

Linhagens de camundongos que têm alta suscetibilidade para o desenvolvimento de tumor de pulmão espontâneo, geralmente, responde a indução química através da exposição à fumaça de cigarro, ou a outros carcinógenos químicos (SHIMKIN e STONER, 1975). A linhagem com mutação no K-RAS é mais susceptível ao desenvolvimento do câncer de pulmão (CHEN et al., 1994). Outros trinta diferentes loci identificados no genoma do camundongo estão implicados na tumorigênese e conferem aumento de susceptibilidade ao câncer de pulmão (TRIPODIS et al., 2001).

Os carcinógenos derivados do tabaco, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e os derivados das nitrosaminas, estão entre os mais usados na indução de

tumores de pulmão em modelo de camundongo (MALKINSON, 1989) (REHM et al., 1991). A caracterização molecular no estudo da carcinogênese dos tumores de pulmão espontâneos induzidos por carcinógenos nestes modelos, geralmente revelam várias alterações genéticas que promovem a mutação do K-RAS, a superexpressão do c-MYC e a inativação do p53 (LI et al., 1994; MALKINSON, 2001). Isso permite a investigação e a introdução de modificações genéticas que alterem a suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer nos modelos de tumor induzidos quimicamente.

1.11.2 Modelo de câncer de pulmão em camundongo transgênico

Tem sido desenvolvidos modelos transgênicos de tumor de pulmão, nos quais se estuda a expressão de oncogenes e suas funções na carcinogênese da iniciação a progressão do tumor. Camundongos que expressam c-MYC desenvolvem adenomas brônquioalveolar multifocais e adenocarcinomas, enquanto camundongos que expressam c-MYC e EGF desenvolvem adenocarcinoma bronquioloalveolar em período de tempo mais curto, sugerindo a cooperação destes fatores na progressão do tumor (EHRHARDT et al., 2001). Com o controle do c-MYC os animais não desenvolvem câncer, mas somente hiperplasias (GEICK et al., 2001). Animais transgênicos nocauteados para o fator transformador de crescimento $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), e que expressam somente o TGF- $\beta 2$, apresentam maior incidência de adenocarcinoma, que os animais selvagens (KANG et al., 2000). Já os animais com ativação sistêmica do K-RAS, desenvolvem adenocarcinoma de pulmão e papilomas de pele e de criptas intestinais, indicando um aumento da sensibilidade dos tecidos à mutação deste oncogene (JOHNSON et al., 2001). Todos estes modelos desenvolvem adenocarcinoma pulmonar com baixo grau de malignidade e sem metástases, mas apresentando uma grande similaridade histopatológica com o adenocarcinoma humano.

Existem poucos modelos de tumor neuroendócrino em camundongo, tipo CPC do pulmão, sendo geralmente necessária a inativação do RB e a supressão do p53 para que o tumor desenvolva-se no pulmão quando induzido por vírus inoculados por via intrabrônquica. Esses tumores metastatizam-se rapidamente para fígado, cérebro, adrenal e

medula óssea, locais similares aos dos pacientes com CPC de pulmão (JONKERS et al., 2001; MEUWISSEN et al., 2003). Nenhum dos modelos murinos descritos acima desenvolvem o carcinoma epidermóide, nem metástases, que possam simular o que ocorre no CNPC em estágio avançado.

1.11.3 Modelos subcutâneos ou ectópicos de câncer de pulmão em camundongos e ratos

Os testes pré-clínicos *in vivo* na avaliação terapêutica de novas drogas são comumente realizados em modelos de camundongos imunodeficientes, com o enxerto subcutâneo (sc) ectópico de linhagens de câncer de pulmão humano (CIARDIELLO et al., 2001; WAKELING et al., 2002), embora Killion et al. (1998), já destacassem a importância dos modelos ortotópicos na investigação de estratégias terapêuticas e os considerassem como uma ponte para os testes clínicos de novos fármacos. Apesar do câncer de pulmão desenvolvido em modelos de murinos ter a mesma similaridade genética do tumor humano, o crescimento tumoral assim como as respostas às intervenções terapêuticas são diferentes, quando o tumor é implantado de forma ectópica no subcutâneo ou ortotópica no pulmão (KUO et al., 1993; ONN et al., 2003).

Wilmanns et al. (1992) mostraram que tumor de uma mesma linhagem de carcinoma de cólon, quando implantado no cólon, fígado, pulmão e sc de camundongos apresentavam respostas significativamente diferentes aos quimioterápicos doxorubicina e 5-fluorouracil. Estes autores sugeriram que o microambiente tumoral possa ter modulado a quimiossensibilidade das células tumorais, por fenômenos moleculares ocorridos na interação das células tumorais com o estroma do hospedeiro.

Onn et al. (2003) usando várias linhagens de câncer de pulmão humano do tipo CNPC e CPC e implantando-as no sc e no pulmão, observaram no último, um desenvolvimento local e regional semelhante ao que ocorre no câncer primário de pulmão humano, com a formação inicial de um nódulo, seguido por uma extensão do tumor para todo pulmão e disseminação para os linfonodos intra e extratorácicos. Por outro lado, o tumor implantado ortotopicamente no pulmão apresentara uma resposta terapêutica

limitada ao paclitaxel, enquanto o tumor implantado no sc regredira totalmente com o uso da mesma droga. A análise imunohistoquímica do tumor implantado no pulmão revelou aumento da expressão dos fatores pró-angiogênicos IL-8, bFGF e VEGF. Isso pode ser explicado pela teoria do microambiente tumoral de Paget ("*seed and soil*"), que segundo o autor o fenótipo das células tumorais pode ser influenciado pelo microambiente onde elas são implantadas (PAGET, 1889).

Wilmanns et al. (1992) e Kuo et al. (1993) confirmaram a teoria do uso da semente em solo fértil de Paget (1889), pela observação de que alguns tumores desenvolvem-se e crescem mais rapidamente em um determinado órgão do que em outro, assim como respondem de forma diferente a quimioterápicos quando implantado em órgãos distintos.

Além da questão do solo fértil defendida por Paget (1889), que pode permitir o surgimento de subpopulações de células tumorais com propriedades biológicas e metastáticas diferentes, a interação tumor versus hospedeiro no modelo ortotópico pode desencadear respostas inflamatórias com a liberação de citocinas, fatores de crescimento tumoral, fatores angiogênicos e outros, diferentes das observadas no modelo SC ectópico (KILLION et al., 1998; MULLER e FUSENING, 2004). Isto poderia explicar a diferença de resposta de um quimioterápico a um mesmo tumor implantado em locais diferentes dos animais. Apesar disto, os testes experimentais de novas drogas para o câncer de pulmão ainda são realizados preferencialmente em modelos sc de tumor (CIARDIELLO et al., 2001; WAKELING et al., 2002).

Killion et al. em 1998 afirmaram que, "While ectopic models of cancer allow rapid screening of new compounds and transgenic models afford opportunities to study early cellular and molecular events in tumor progression and metastasis, orthotopic transplantation of tumor cells remains an affordable, reproducible and reliable methodology for the study of organ-specific determinants of the biology and therapy of cancer".

Por isso, vários autores (HOWARD et al., 1991; JOHNSTON et al., 2001; ONN et al., 2003) têm buscado desenvolver e validar modelos ortotópicos de tumor com linhagens de células humanas. Nesses modelos, os tumores oriundos de cada órgão específico devem

ser implantados no órgão correspondente do animal de experimentação, em vez de ser no subcutâneo de camundongos ou ratos.

1.11.4 Modelos ortotópicos de câncer de pulmão em camundongos e ratos

Para desenvolvimento de modelos ortotópicos de câncer de pulmão com células humanas, há que se preencher dois requisitos básicos, sendo o primeiro deles, o uso de linhagens celulares de tumor primário de pulmão, e o segundo, que os animais sejam imunossuprimidos, já que estes tumores não crescem em animais imunocompetentes (MCLEMORE et al., 1987 e HOWARD et al., 1991). Isso foi bem documentado por McLemore et al. (1987) que descreveram o primeiro modelo de tumor ortotópico de pulmão implantando as células por via *ib* no pulmão de camundongos. Estes autores mostraram um alto índice de pega tumoral com células de carcinoma humano em camundongos atímicos, enquanto nenhum tumor desenvolveu-se em camundongos imunocompetentes. Howard et al. (1991) usando ratos irradiados (500 rads no corpo inteiro) e não-irradiados, e inoculando linhagens de câncer de pulmão humano dos tipos adenoescamoso, carcinoma de grandes células e adenocarcinoma, mostraram um alto índice de pega tumoral em 83%, 100% e 90% nos ratos irradiados, “nudes”, e baixo índice em 7%, 54% e 33% nos ratos selvagens, respectivamente.

Nos modelos de tumor de pulmão, a inoculação de células tumorais no parênquima pulmonar pode ser feita por via intrabrônquica (*ib*) ou implantação direta no pulmão, mediante punção através de toracotomia aberta ou percutânea.

O modelo ortotópico de tumor de pulmão com a inoculação das células por via *ib* foi inicialmente realizado por McLemore et al. (1987), com passagem de um cateter através de punção traqueal e, posteriormente, aprimorado por Howard et al. (1991) e Johnston et al. (2001), que introduziram a traqueotomia cervical para a passagem de um cateter *ib* ultrafino, possibilitando a implantação das células na periferia do parênquima pulmonar. March et al. (2001) fizeram uma pequena modificação da técnica, usando a intubação orotraqueal para o acesso da via aérea e implantação do tumor.

O modelo de tumor de pulmão com a implantação das células diretamente no parênquima pulmonar por punção através de toracotomia foi inicialmente descrito por

Wang et al. 1997 e, depois, realizado por outros grupos (GOMES NETO et al., 2002; DIPERNA et al., 2003; SIEVERS et al., 2005). A via percutânea para inoculação do tumor no pulmão tem sido menos aceita, por causar extravasamento das células e disseminação do tumor para o espaço pleural (MCLEMORE et al., 1988; MIYOSHI et al., 2000).

Gomes Neto et al. (2002) relataram pela primeira vez um modelo de câncer no pulmão de ratos usando células do carcinossarcoma 256 de Walker e implantando-as por punção direta no parênquima pulmonar através de toracotomia. Entretanto, esse modelo, por utilizar uma toracotomia aberta para o acesso do pulmão, necessita o uso de respirador para pequenos animais, de uma técnica cirúrgica mais refinada e de maior tempo para a sua execução que os modelos de tumor sem toracotomia. Por isso, o presente estudo teve como um de seus objetivos desenvolver um modelo de tumor de fácil realização do ponto de vista técnico, implantando-se células do carcinossarcoma de Walker no pulmão por via intrabrônquica, através de traqueotomia cervical.

1.12 Método de imagem em pequenos animais

Exames de imagem não invasivos são imprescindíveis no diagnóstico e estadiamento clínico do câncer de pulmão. A tomografia computadorizada (TC) helicoidal tem sido muito usada em programas de rastreamento na detecção precoce de câncer de pulmão em pacientes com alto risco. Ainda são poucos os relatos do uso de TC em estudos experimentais, embora se observe um interesse crescente da literatura para o uso da TC e de outros métodos de imagem na pesquisa básica, como forma de monitorizar progressão de tumores e avaliar a eficácia terapêutica de drogas (PAULUS et al., 2000).

Os métodos de imagem minimamente invasivos ou não invasivos usados em pequenos animais devem ter alta precisão anatômica e boa correlação histopatológica. O estudo do câncer e de outras doenças em modelos animais antes do emprego da TC de alta resolução (TCAR) limitava-se à investigação *ex vivo*. Estudos longitudinais para avaliar a progressão de tumores nos diversos estágios tinham que, necessariamente, realizar biópsia ou sacrificar os animais. Isto passa a ser dispensável com o uso de métodos não invasivos. Por isso, métodos de imagem têm sido introduzidos na pesquisa experimental, adaptando-se

os sistemas de imagem já usados na clínica. A TC, a ultrassonografia (US) e a ressonância nuclear magnética (RNM) estão entre os métodos mais usados (KENNELL et al., 2000; KRIX et al., 2003; DE CLERCK et al., 2004; GRESCHUS et al., 2005).

Kennell et al. (2000), em um estudo comparando o rendimento da RNM com os da TCAR obtidos de tumores de pulmão em camundongos, observaram que a qualidade das imagens da TCAR foi superior à da RNM. As imagens da RNM apresentavam-se completamente borradas por artefatos de movimento, o que inviabilizava o método para a avaliação de tumores *in vivo*. Os autores ressaltaram ainda o fato de a TCAR ser um exame de custo mais baixo e de realização mais rápida, como sendo uma vantagem adicional do método. De Clerck et al. (2004) usaram a microtomografia, que eles denominaram de micro-TC na detecção de tumor de pulmão em camundongos, sendo os pioneiros no uso desse método em pequenos animais. Recentemente, Greschus et al. (2005), mostraram o emprego da TC volumétrica na visualização tridimensional (3D) de cérebro, órgãos intratorácicos e abdominais de camundongos. Este método de imagem permitiu a demonstração de pequenos nódulos no pulmão em modelos ortotópicos de câncer em camundongos.

Entretanto, ainda há que se responder se esses métodos de imagens são capazes de detectar tumores nos estágios iniciais em camundongos e ratos, e qual o grau de correlação deles com os achados macroscópicos de necropsia e com o exame histopatológico. No presente estudo, realizou-se a TCAR em um modelo de tumor em pulmão de ratos e avaliou-se a correlação dos achados da tomografia em relação à presença, localização e medidas do tumor, com os achados de necropsia e exame histopatológico, no 5º dia de inoculação de células do carcinossarcoma de Walker. O efeito antitumoral de drogas foi também avaliado pelo cálculo do volume tumoral feito através das medidas dos diâmetros tumorais obtidas pela TCAR nos animais dos grupos controles e nos tratados. A análise da sobrevivência dos animais foi o outro parâmetro utilizado para a avaliação do efeito antitumoral de drogas no estudo.

2 OBJETIVO

1) desenvolver um modelo de tumor no pulmão de fácil realização do ponto de vista técnico, de boa reprodutibilidade, implantando células do carcinossarcoma 256 de Walker por via intrabrônquica em ratos imunocompetentes.

2) usar um método de imagem, a tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR), para o diagnóstico *in vivo* da presença do tumor, monitorização do crescimento tumoral e eficácia terapêutica de drogas antitumorais

3) validar o modelo pela avaliação do efeito antitumoral de drogas antineoplásicas clássicas, antiangiogênicas e alvo-direcionadas.

3 MÉTODO

3.1 Animais usados nos experimentos

Os experimentos foram realizados com 191 ratos fêmeas da linhagem Wistar, peso médio de 199 ± 23 g, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram mantidos durante o estudo no biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, abrigados no máximo de 6 por gaiola, a 24° C, em ciclo circadiano (luz/escuro) de 12 horas e com acesso a água e alimentos *ad libitum*.

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará e todos os experimentos foram realizados conforme os princípios éticos de experimentação animal (Protocolo 33/06, Anexo E).

3.2 Obtenção e preparo da suspensão das células neoplásicas

Foram utilizadas células do carcinossarcoma 256 de Walker, obtidas de ratos Wistar. Esta neoplasia é mantida em laboratório através da inoculação sucessiva a cada 7 dias de suspensão de 10^6 células, por via intramuscular, na face interna da coxa de ratos Wistar. No 7^o dia do implante tumoral, os animais são sacrificados com overdose de hidrato de cloral e a coxa é retirada em condições de antissepsia utilizando-se material esterilizado. Fragmentos do tumor são retirados e triturados, excluindo-se os tecidos necróticos, colocado-os em placa de Petri, contendo solução de gentamicina a 0,45% e Ringer com lactato na proporção de 1:10 para obtenção da suspensão celular. A seguir, a suspensão celular é filtrada e homogeneizada, a viabilidade das células avaliada pelo teste azul de trypan, e a contagem para o cálculo da quantidade de células por 1ml de suspensão feita em câmara de Neubauer. Depois disso, mantém-se a suspensão de células em temperatura de 4° C durante todo o experimento.

3.3 Técnica do Implante Tumoral via Intrabrônquica (ib)

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol a 2,5%, na dose de 1ml/100 gramas de peso, por via intraperitoneal (ip), posicionados em decúbito dorsal e submetidos a tricotomia da região cervical e antisepsia com povidine® (polivinilpirrolidona). A seguir, realizou-se uma traqueotomia cervical, iniciando com a incisão na pele logo acima do manúbrio esternal e dissecando-se os planos musculares até a visualização da traquéia, pela técnica descrita por Howard et al., em 1991 (Figura 13). A traquéia foi aberta com uma pequena incisão com bisturi lâmina número 11 a nível do 2º e 3º anel, através da qual introduz-se um cateter de polietileno 16G. Com um leve torque para a direita, prosseguiu-se com o cateter na traquéia e brônquio principal esquerdo e, através deste, passou-se um cateter de polietileno ultrafino 22G (Figura 14) até atingir a periferia do pulmão, quando se percebe uma leve resistência. Neste local injetou-se uma suspensão de células tumorais em um volume que varia de 70 a 100 µl. Depois da inoculação das células, retiram-se os cateteres, sutura-se a traquéia com um ponto simples de Prolene® 7-0 e a pele do animal com fio Mononylon® 4-0. (Figura 15). No final do procedimento, que varia em torno de 5 a 6 minutos, o animal foi posicionado em decúbito lateral esquerdo até o desaparecimento do efeito anestésico, no sentido de manter o inóculo no local do implante, conforme preconizado por Wang et al. (1997).

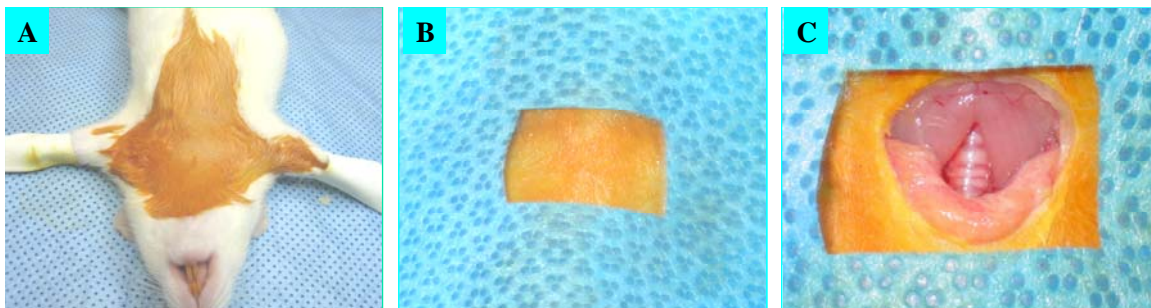


FIGURA 13 – a) animal posicionado em decúbito dorsal. b) campo cirúrgico. c) cervicotomia transversa acima do manúbrio esternal e traquéia exposta.

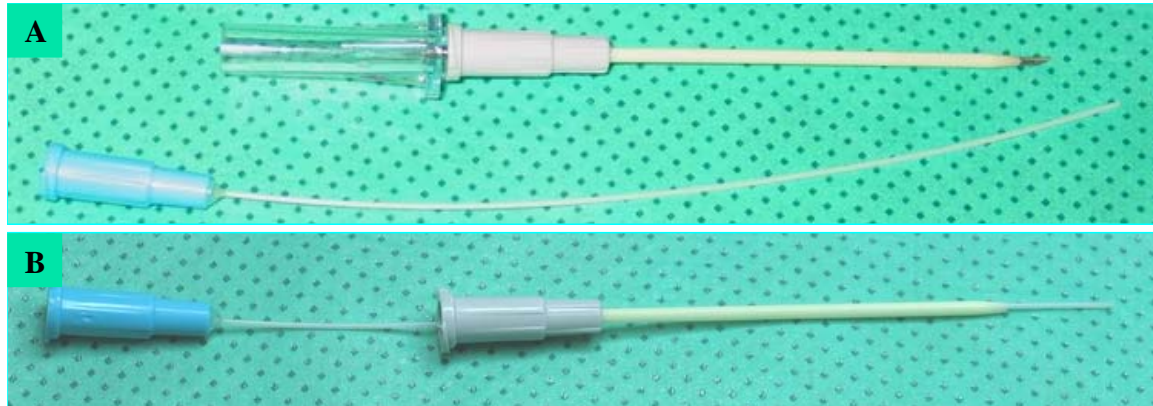


FIGURA 14 - a) cateter de polietileno (16G) e cateter de polietileno ultrafino (22G). b) cateter introduzido no jelco em posição de inocular as células.

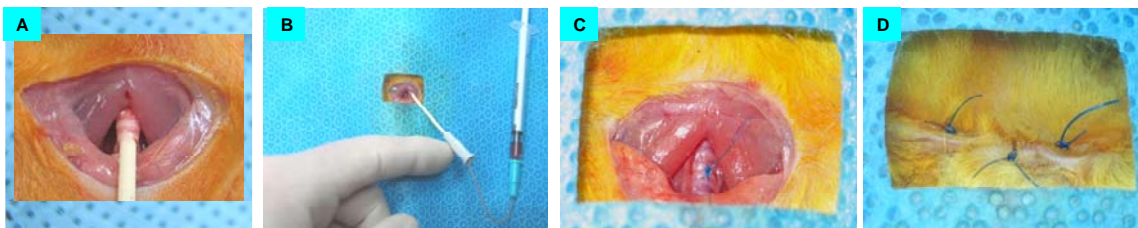


FIGURA 15 - a) traquéia intubada com cateter 16G. b) cateter posicionado para a inoculação por via intrabrônquica das células tumorais. c) traquéia suturada. d) rafia da pele.

3.4 Técnica de realização da tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR).

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral a 10%, na dose de 0,1 ml/ 30 gramas de peso por via ip, que os mantinham em hipnose o tempo suficiente para a realização do procedimento tomográfico. Os animais eram a seguir colocados em decúbito ventral e com o auxílio de lençóis permaneciam imóveis nessa posição, sem a necessidade de fitas de fixação, durante todo o exame. Depois da obtenção das imagens, os animais eram recolocados em caixas alcochoadas com algodão para aquecê-los, até ocorrer a recuperação da anestesia, quando eram transferidos para as gaiolas.

As imagens foram realizadas em um aparelho de tomografia da marca Siemens (SOMATON AR. TX) usando-se um filtro de alta resolução para cortes finos de 2 mm, 130

KV, 50 mA, um tempo de corte de 3 segundos (150 mAS) e um FOV médio de 5 cm. Foram feitos em média 6 cortes com espessura de 2mm e com intervalos de 2mm, na metade inferior do tórax, onde se localizava o tumor. As imagens foram fotografadas em janela larga, para estudo dos pulmões, e janela estreita, para o estudo do mediastino. As medidas dos tumores foram feitas em duas dimensões (axiais e perpendiculares) usando-se a janela larga (Figura 16).

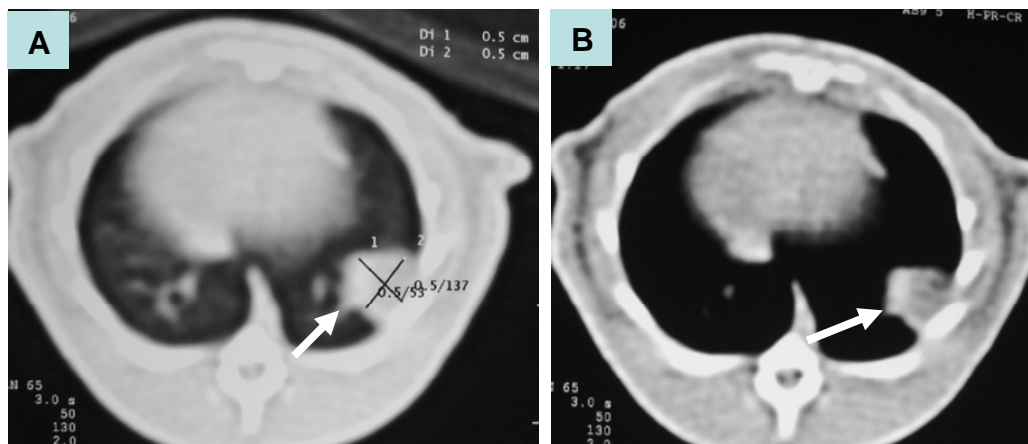


FIGURA 16 – a) Mensuração do tumor (setas) na tomografia computadorizada de alta resolução do tórax, realizada no 5^o dia do implante tumoral, usando-se a janela de pulmão; b) janela de mediastino.

3.5 Desenho Experimental

Para se estabelecer e validar o presente modelo, os experimentos foram realizados em três etapas, sendo que em todas elas os animais foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos. Foram excluídos da análise os animais que morreram no seguimento do experimento de causa não relacionada com o tumor e os que não apresentaram tumor no pulmão aos exames macroscópico de necropsia e histopatológico.

3.5.1 1^a etapa (n=32): Estabelecer a técnica do implante de células tumorais por via ib e o índice de pega tumoral.

Os animais dessa etapa foram divididos aleatoriamente em quatro grupos e inoculados com uma quantidade variável de células do carcinossarcoma de Walker por via

ib pela técnica previamente descrita, para se estabelecer o número de células necessárias para o índice de pega tumoral:

Grupo 1 (n=8) - 10^5 células.

Grupo 2 (n=8) - 2×10^5 células.

Grupo 3 (n=10) - 4×10^5 células.

Grupo 4 (n=6) - 5×10^5 células.

No 6^o dia, os animais foram submetidos a eutanásia com overdose de hidrato de coral e necropsiados através de esternotomia mediana e laparotomia para a retirada em bloco da traquéia, pulmões e coração, visando a verificação da presença de tumor no tórax e abdome (adrenais e fígado). Os pulmões foram seccionados e fatias do tumor fixadas com formol isotônico tamponado (100 mL de solução de formaldeído a 37%, 900 mL de água destilada, 4 g de fosfato de sódio monobásico e 6,5 g de fosfato de sódio dibásico). Depois de 24 horas foram colocadas em frascos com álcool a 70%, coradas em hematoxilina-eosina, e o exame histopatológico feito por um patologista de forma cega.

3.5.2 2^a etapa (n=16): Avaliar o volume tumoral e correlacionar os achados da TCAR de tórax com os da necropsia.

Nessa etapa, os animais foram inoculados com 4×10^5 células do carcinossarcoma de Walker, por via ib, para a avaliação do volume tumoral. Este número de células foi escolhido para permitir a inoculação de um maior número de animais, otimizando-se, assim, uma maior disponibilidade de células tumorais por experimento, embora o maior índice de pega tumoral na primeira etapa tenha ocorrido com a inoculação de 4×10^5 células. No 5^o dia após o implante das células tumorais, os animais foram submetidos a TCAR e, em seguida, sacrificados com overdose de hidrato de coral e necropsiados. As tomografias foram realizadas com cortes finos de 2mm de espessura e as medidas dos tumores foram feitas em duas dimensões, pela técnica acima descrita. Na necropsia, os

tumores foram medidos manualmente (os 2 diâmetros maiores), utilizando-se um paquímetro digital (Figura 17). O cálculo dos volumes tumorais foi feito em cm^3 pela fórmula de Steel: $(D \times d^2)/2$ (D = diâmetro maior e d = diâmetro menor). Os diâmetros tumorais foram mensurados na TCAR e na necropsia para avaliar a correlação entre os dois métodos.

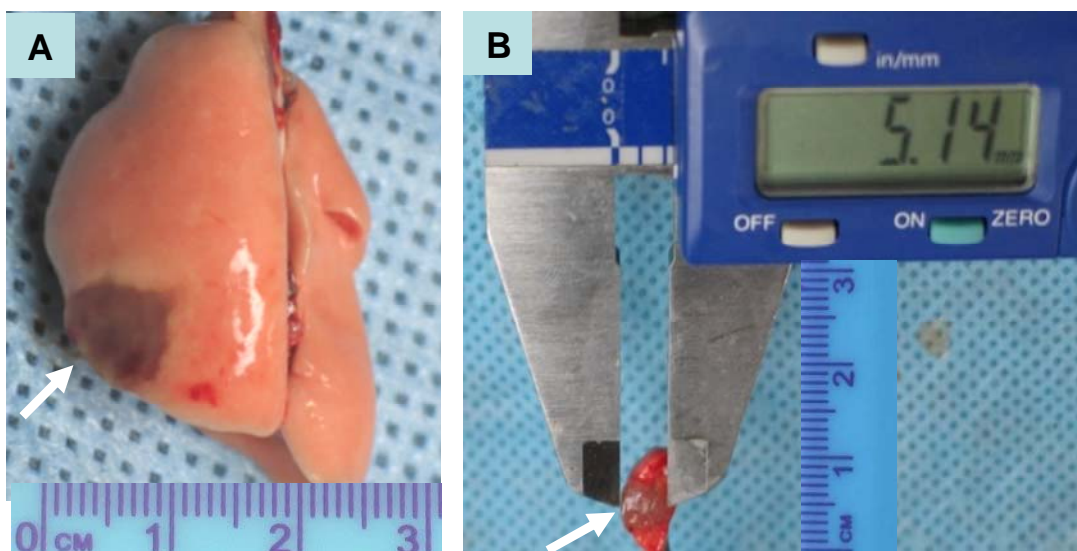


FIGURA 17 - a) peça de necropsia mostrando o tumor no pulmão esquerdo (seta). b) medidas dos diâmetros tumorais com paquímetro digital (seta), de animal sacrificado no 5^o dia do implante tumoral.

3.5.3 3^a etapa(n=143): Avaliação do efeito de drogas e validação do modelo

Esta etapa consistiu de duas fases nas quais os animais foram divididos aleatoriamente e submetidos à inoculação de 4×10^5 células do carcinossarcoma de Walker pela técnica acima descrita. A primeira fase foi formada por cinco grupos e a segunda por seis, com as seguintes denominações:

Grupo controle (Gc) - administrado 1 ml de solução salina isotônica (0,9%), sem droga, por gavagem, por via subcutânea ou intraperitoneal de acordo com o grupo experimental.

Grupo celecoxib (Gclx) - tratado com celecoxib, administrado por gavagem na dose de 15 mg/kg diluído em 0,5 ml de solução salina isotônica (0,9%), 2x/dia, iniciando-se doze horas antes do implante tumoral e mantendo-se até a morte natural dos animais. O celecoxib foi

administrado em doses crescentes de 15, 30 e 60 mg/kg de peso por dia, iniciando-se um dia antes da implantação das células tumorais e continuando até o sacrifício dos animais. Estas doses foram baseadas no trabalho de DiPerna et al, 2003, que usaram a dose de 125 mg/kg de ração, equivalente a 25 mg/kg de peso por dia, que produzia um nível plasmático de 0.25 µg/mL (0.6 µmol/L).

Grupo talidomida (Gtld) - tratado com talidomida, administrada por via sc em dose única diária de 45 mg/kg, diluindo-se 9 mg da droga em 1ml de solução (0.98ml de solução salina ácida + 0.02ml de DMSO). Escolheu-se essa dose, com base nos estudos de Gomes Neto, 2001, que usou doses de 45 e 180 mg/kg por via sc e não demonstrou diferença de sobrevivência dos animais tratados com a dose maior. O tratamento foi iniciado no dia do implante tumoral e mantido até a morte natural dos animais.

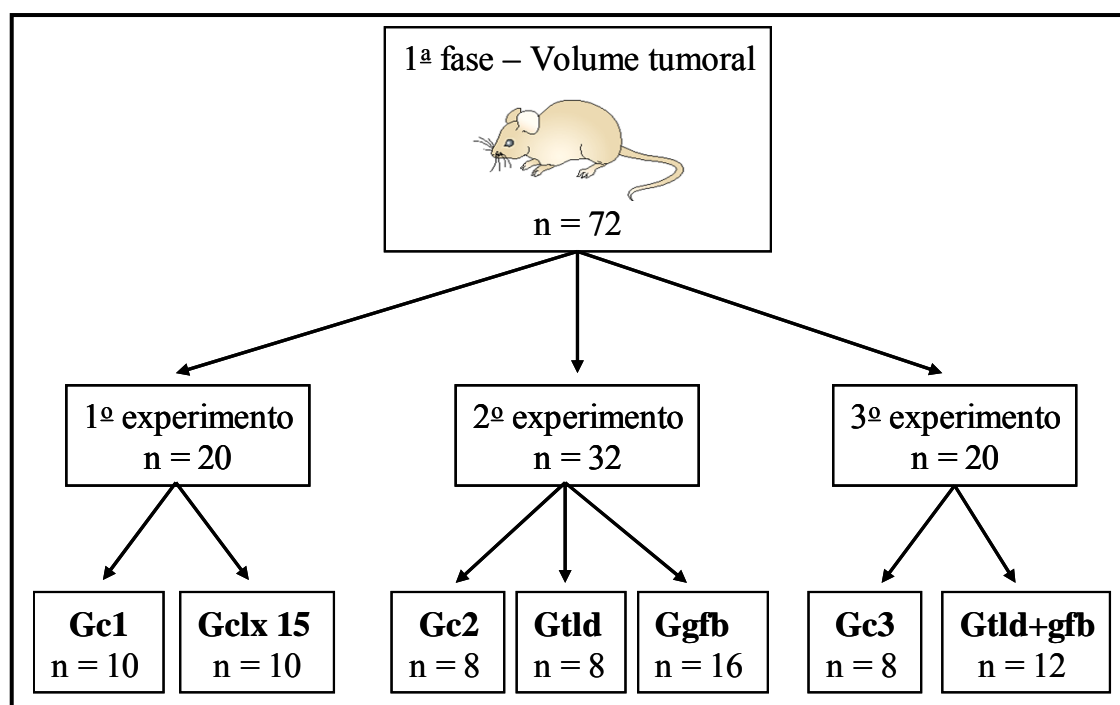
Grupo gefitinib (Ggfb) - tratado com gefitinib, administrado por gavagem na dose de 25 mg/kg por dia, diluindo-se 5 mg em 1 ml de solução salina isotônica (0.9%), com o tratamento iniciado no dia do implante tumoral e mantido até a morte natural dos animais. Essa dose foi baseada no estudo experimental de Wakeling et al. (2002), que mostraram inibição do crescimento tumoral de forma dose-dependente, em camundongos inoculados no sc com linhagens celulares de carcinoma humano, e tratados com doses crescentes de gefitinib (12.5, 50 e 200 mg/kg/dia, via oral).

Grupo talidomida + gefitinib (Gtld+gfb) - tratado com gefitinib e talidomida nas doses acima descritas.

Grupo paclitaxel (Gpcl) - tratado com paclitaxel, administrado por via ip na dose de 8 mg/kg dissolvida em 1 ml de solução salina isotônica (0.9%), em dose única no terceiro dia após o implante tumoral. Oliveira, 2003, administrou o paclitaxel no 3º, 7º e 10º dia do implante tumoral em modelo de tumor de estômago com o carcinossarcoma de Walker em ratos, e mostrou melhor sobrevivência nos animais tratados com dose única no terceiro dia. Por isso, nesse estudo, escolheu-se o terceiro dia para a aplicação de dose semelhante do paclitaxel.

Na primeira fase (n=72), composta de cinco grupos (Gc=26; Gclx=10; Gtld=8; Ggfb=16; Gtld+gfb=12), avaliou-se o volume tumoral no 5^o ou no 6^o dia do implante tumoral. O grupo controle (Gc) desta fase teve três subgrupos, referentes a três experimentos distintos: Gc1=10, Gc2=8 e Gc3=8, que foram, respectivamente, controles dos grupos Gclx, Gtld/Ggfb e Gtld+gfb. A figura 18 mostra a representação gráfica dos experimentos dessa fase em um fluxograma.

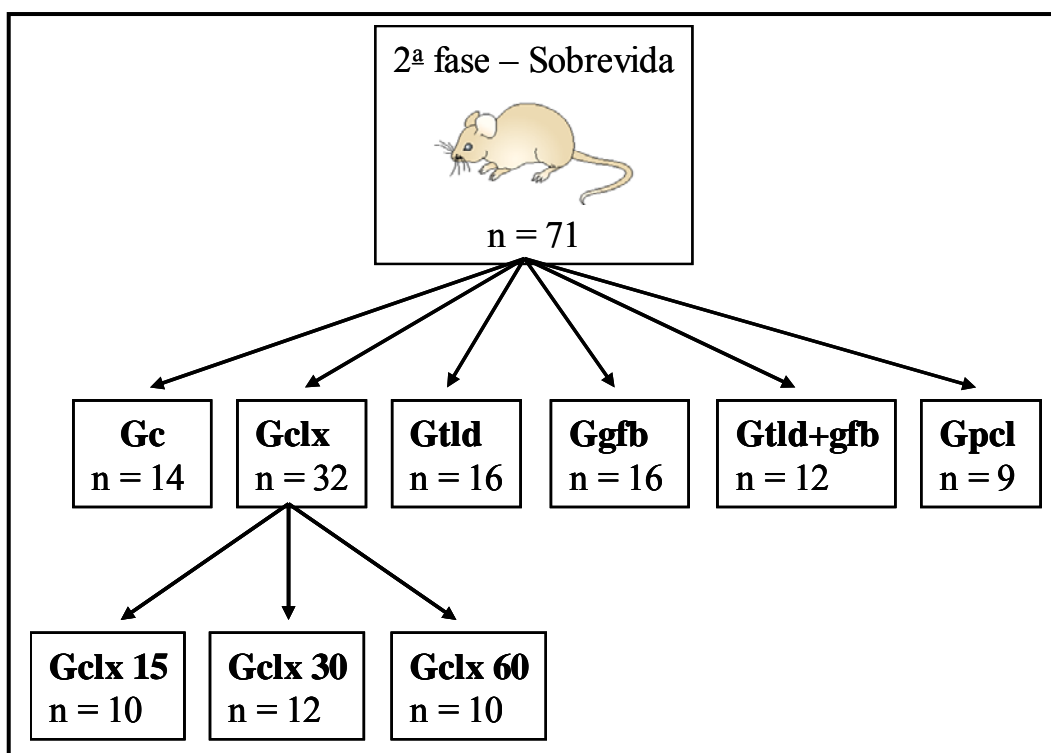
O volume tumoral dos animais do 1^o experimento foi calculado pelos diâmetros tumorais medidos na necropsia e do 2^o experimento pelas medidas dos diâmetros obtidos na TCAR e na necropsia, no 5^o dia do implante tumoral, com exceção do Ggfb que foi submetido somente a TCAR, sem o sacrifício dos animais. O volume tumoral dos grupos Gc3 e Gtld+gfb do 3^o experimento foi calculado somente pelas medidas da TCAR no 6^o dia do implante tumoral, sem o sacrifício dos animais, que foram os mesmos da segunda fase, observados até o dia de suas mortes para a análise da sobrevida.



Gc: grupo controle, Gclx: grupo celecoxib, Gtld: grupo talidomida, Ggfb: grupo gefitinib, Gtld+gfb: grupo talidomida+gefitinib.

FIGURA 18 – Fluxograma dos experimentos da primeira fase.

Na segunda fase (n=71), constituída de seis grupos (Gc=14; Gclx2=32; Gtld=16; Ggfb=16; Gtld+gfb=12, Gpcl=9), avaliou-se a sobrevivência dos animais. Os animais foram observados com pesagem diária até o dia de suas mortes naturais, quando foram submetidos a necropsia pela técnica acima descrita. O grupo do celecoxib (Gclx) dessa fase foi dividido em três subgrupos: Gclx 15=10, Gclx 30=12, Gclx 60=10, tratados respectivamente com celecoxib 15, 30 e 60 mg/kg por dia, para verificar se havia resposta antitumoral dose dependente. Os animais dos grupos Ggfb e Gtld+gfb (n=28) foram os mesmos animais da primeira fase, que tiveram o volume tumoral avaliado por tomografia, respectivamente no 5^o e no 6^o dia do implante tumoral, e continuaram em tratamento para a análise da sobrevivência (Figura 19).



Gc: grupo controle, Gclx: grupo celecoxib, Gtld: grupo talidomida, Ggfb: grupo gefitinib, Gtld+gfb: grupo talidomida+gefitinib, Gpcl: grupo paclitaxel.

FIGURA 19 – Fluxograma dos experimentos da segunda fase.

Os animais dos primeiros cinco grupos das duas fases, com a exceção do Gpcl, tiveram tratamento com as mesmas drogas.

No grupo do paclitaxel (Gpcl), interrompeu-se o estudo no 29^o dia e os animais foram sacrificados e necropsiados porque a sobrevida estava muito acima do que se observara nos outros grupos. Nesse grupo, analisou-se somente a sobrevida dos animais. Por questões operacionais não foi possível realizar a TCAR na primeira semana para a avaliação do volume tumoral e, a partir da segunda semana, considerou-se que não havia mais sentido realizá-la, pela inexistência de animais vivos no grupo controle para a comparação dos resultados.

3. 6 Análise Estatística

Os dados de volume tumoral expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) obtidos na TC e na necropsia foram comparados pelo teste de regressão linear simples e a diferença entre os diversos grupos experimentais determinada pelos testes não paramétricos de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis. As taxas de sobrevida foram calculadas pelo teste de Kaplan-Meier e a diferença de sobrevida entre os grupos pelo teste de Log-Rank. Os dados foram analisados utilizando-se o programa de computação SPSS (SPSS for Windows Software), sendo considerado o nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 1ª etapa (n=32): Desenvolvimento da técnica do implante de células tumorais por *via ib* e estabelecimento do modelo tumoral.

O procedimento experimental foi realizado sem nenhuma dificuldade técnica, porquanto os autores já haviam acumulado experiência com a realização de traqueostomia em pequenos animais (GOMES NETO et al., 2002). O procedimento em cada animal durou em média 5 minutos, operando-se cerca de 12 animais em uma hora. Houve 2 óbitos cirúrgicos nesta etapa, correspondendo a uma taxa de mortalidade de 6,2% (2/32). No 6º dia, os animais foram sacrificados e necropsiados e constatada a presença macroscópica de um nódulo localizado no lobo inferior esquerdo do pulmão (Figura 20), em um percentual que aumentou progressivamente nos grupos inoculados com uma maior quantidade de células (Tabela 1). O exame histopatológico confirmou os achados da macroscopia em todos os casos. Verificou-se que o tumor em geral crescia formando um bloco maciço em torno de um brônquio ou bronquíolo e caracterizava-se pela presença de células poligonais, nucléolos evidentes, cromatina frouxa e com alto índice de mitoses atípicas (Figura 21 e 22). Havia em alguns casos a presença de pequenos focos necróticos e hemorrágicos, e ainda, áreas de apoptose com fragmentos celulares e corpos apoptóticos (Figura 23).

TABELA 1 - Índice de pega tumoral *versus* quantidade de células implantadas no pulmão

Grupos	Células tumorais	nº animais	nº de pega tumoral	% de pega tumoral
Grupo 1	1 x 10 ⁵	7	5	72
Grupo 2	2 x 10 ⁵	7	6	86
Grupo 3	4 x 10 ⁵	10	9	90
Grupo 4	5 x 10 ⁵	6	6	100

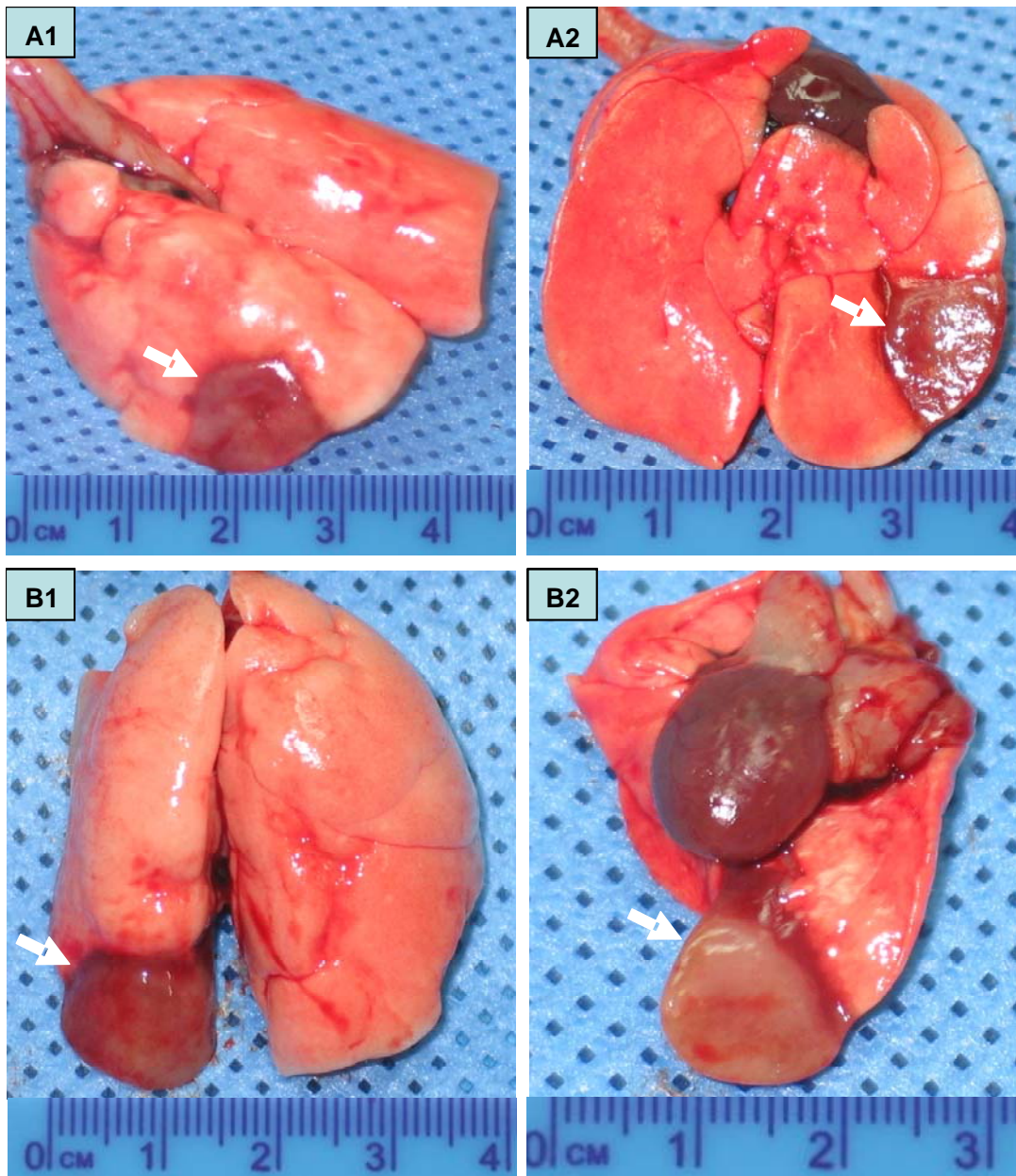


FIGURA 20 – Rato A com tumor (setas) localizado no segmento lateral do lobo inferior do pulmão esquerdo, face lateral (A1) e medial (A2). Rato B com tumor (setas) no segmento posterior do lobo inferior do pulmão esquerdo, face posterior (B1) e medial (B2). Animais no 5^o dia do implante de 4×10^5 células do tumor de Walker.

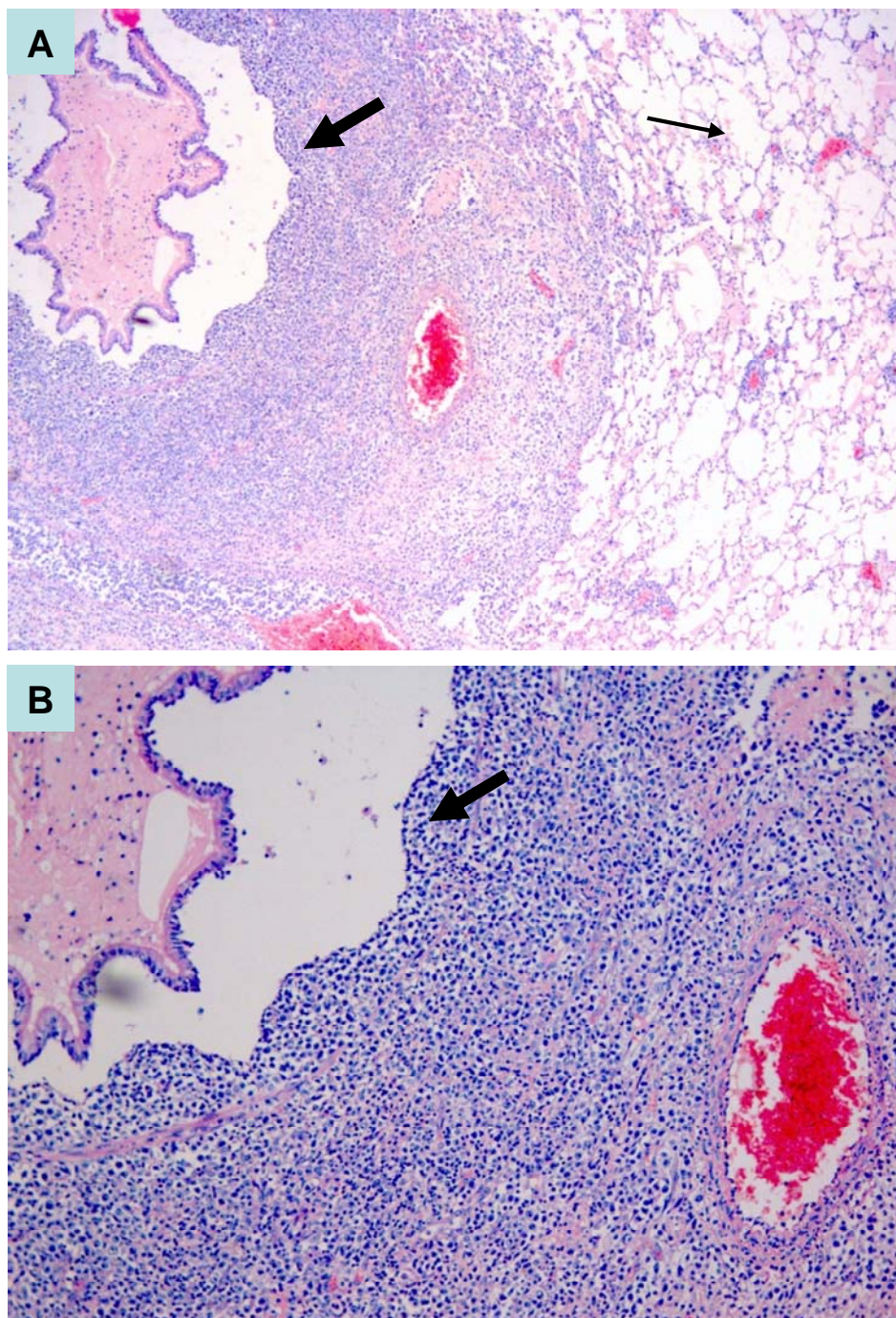


FIGURA 21 – Exame histológico corado pela hematoxilina-eosina (HE). A) Tumor incipiente no 6^o dia do implante, formando um bloco peribronquiolar (seta grossa) com pulmão adjacente edemaciado e congesto (seta fina), aumento de 40X. B) Tumor infiltrando a parede bronquiolar (seta), aumento de 100X.

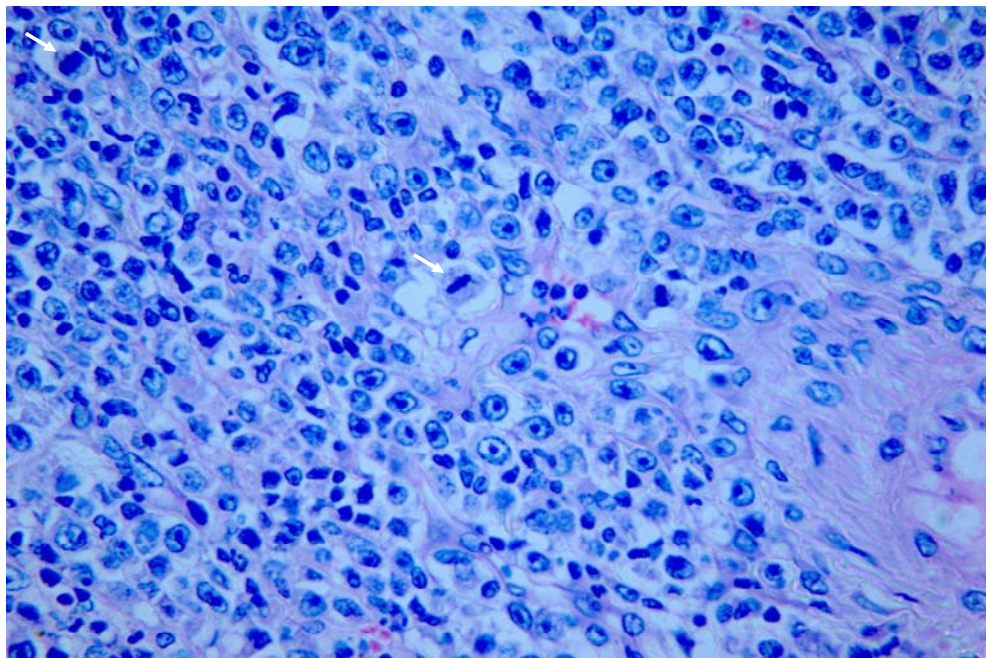


FIGURA 22 – Exame histopatológico corado pela HE em aumento de 400X, mostrando o tumor no 6^o dia do implante, caracterizado pelas células poligonais com núcleos volumosos, nucléolos evidentes, cromatina frouxa e com alto índice de mitoses atípicas (setas), substituindo todo o parênquima pulmonar nesta área.

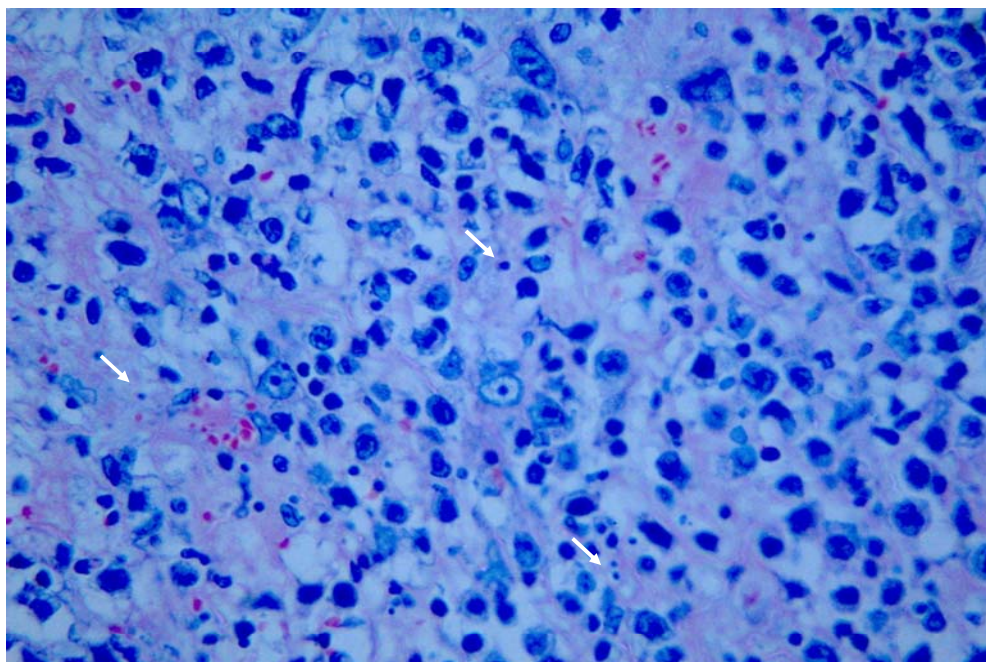


FIGURA 23 – Exame histopatológico corado pela HE em aumento de 400X, mostrando o tumor no 6^o dia do implante, com áreas de necrose e corpos apoptóticos (setas).

4.2 2ª etapa (n=16): Avaliação do volume tumoral e correlação dos achados da TCAR de tórax com os da necropsia.

Os animais dessa etapa, inoculados com 4×10^5 células do carcinosarcoma de Walker e submetidos à TCAR e à necropsia no 5º dia após o implante do tumor, apresentaram um índice de pega tumoral de 100%. Houve um óbito cirúrgico. Observou-se uma correlação positiva dos volumes tumorais em cm^3 ($r=0,953$, $R^2= 0,908$, $p<0,0001$) obtidos na TCAR e necropsia, com média±DP de $0,118\pm 0,108$ e $0,127\pm 0,13$, respectivamente (Figura 24 e 25 e Tabela 2). O achados da necropsia confirmaram exatamente o que foi visto na TCAR, em relação ao volume e localização do tumor, que situou-se nos segmentos lateral ou posterior do lobo inferior esquerdo. O exame microscópico mostrou achados semelhantes àqueles vistos na primeira etapa.

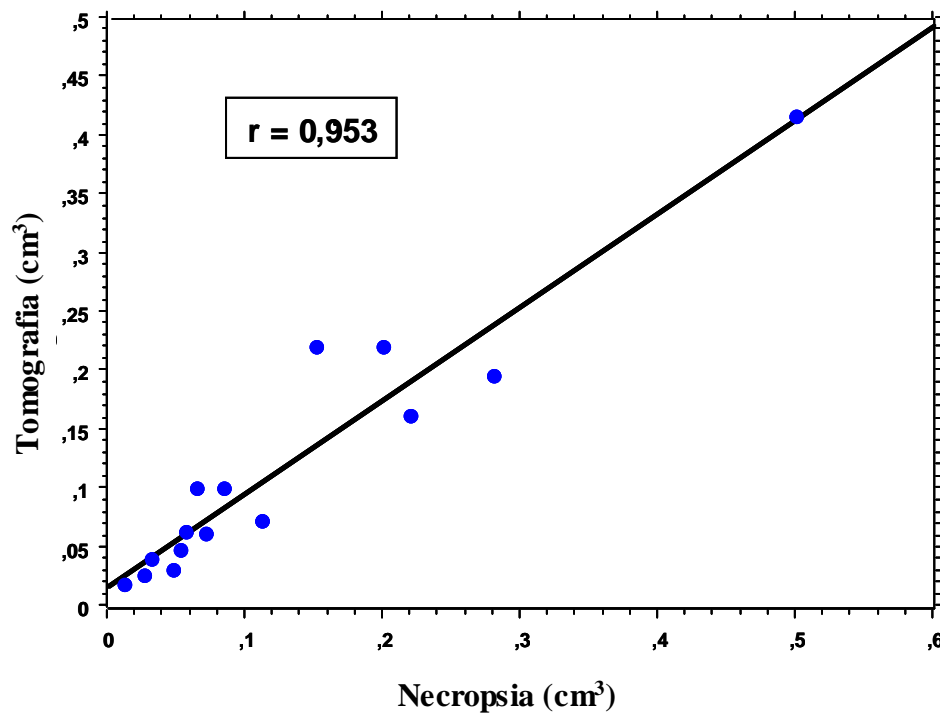


FIGURA 24 - Teste de regressão linear simples, mostrando correlação positiva dos dados de volume tumoral em cm^3 de tomografia com os de necropsia ($R^2= 0,908$, $p=0,0001$).

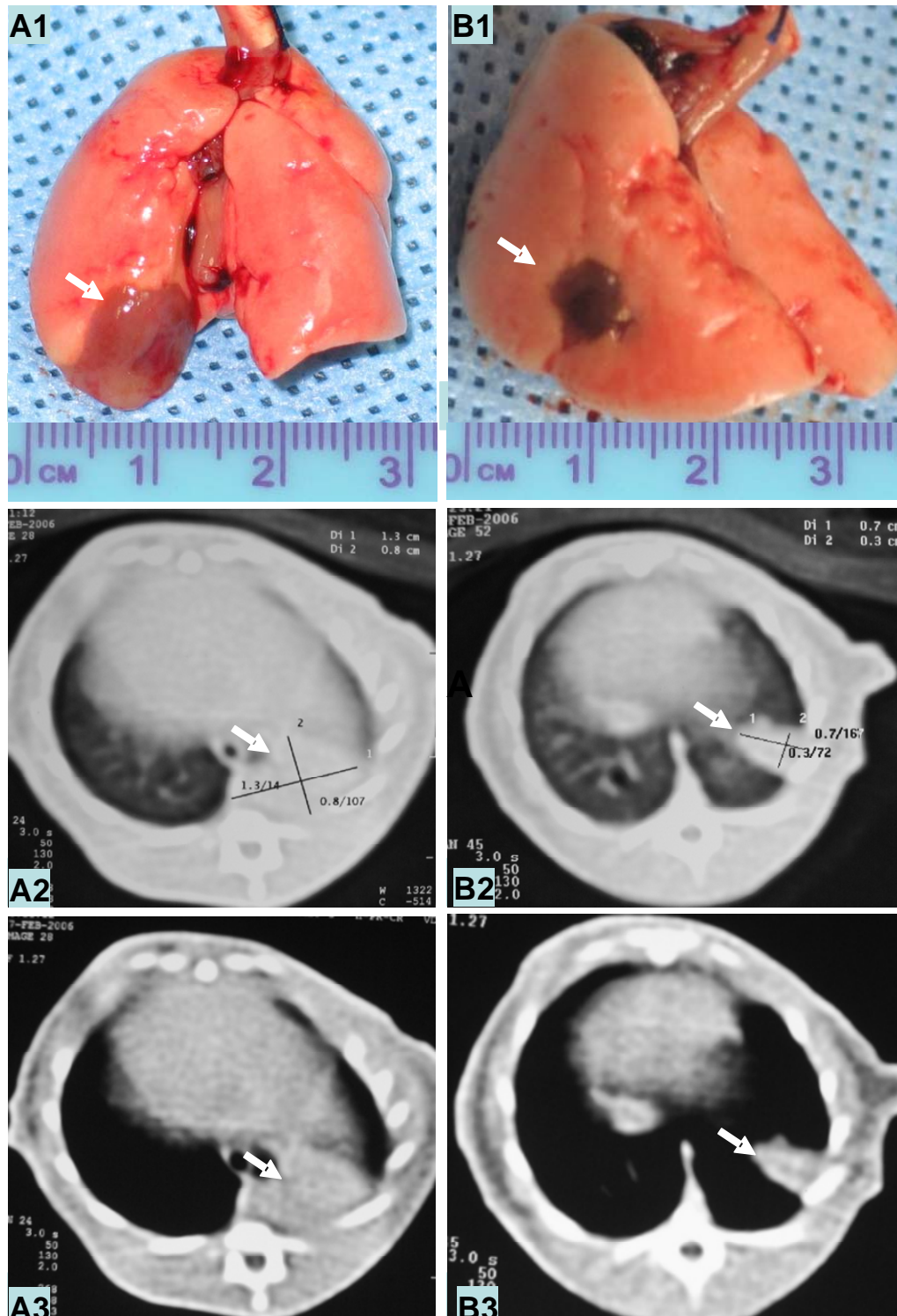


FIGURA 25 – Pulmão de animais no 5º dia do implante de 4×10^5 células do tumor de Walker. Rato A com tumor (setas) localizado no segmento posterior do lobo inferior do pulmão esquerdo. Rato B com tumor (setas) no segmento lateral do lobo inferior do pulmão esquerdo. Peça cirúrgica (A1 e B1), TCAR na janela de pulmão (A2 e B2) e janela de mediastino (A3 e B3).

TABELA 2 - Volume tumoral em cm^3 calculado pelos diâmetros tumorais obtidos na tomografia e na necropsia no 5º dia do implante de 4×10^5 células do carcinosarcoma de Walker

No. de animais	Necropsia (V = cm^3)	Tomografia (V = cm^3)
1	0,220	0,162
2	0,151	0,220
3	0,084	0,100
4	0,032	0,040
5	0,012	0,018
6	0,026	0,027
7	0,071	0,063
8	0,065	0,100
9	0,200	0,220
10	0,500	0,416
11	0,280	0,196
12	0,112	0,072
13	0,048	0,031
14	0,052	0,048
15	0,056	0,064
Média ± DP	0,127±0,13	0,118±0,108

Teste de regressão linear simples, mostrando correlação positiva dos dados de volume tumoral (em cm^3) de tomografia com os de necropsia ($p=0,0001$).

4.3 3ª etapa(n=143): Avaliação do efeito de drogas e validação do modelo realizada em duas fases.

1ª fase (n=72) – Nesta fase, avaliou-se o volume tumoral de animais inoculados com 4×10^5 células do carcinosarcoma de Walker, em três experimentos.

A mortalidade cirúrgica nesta fase foi de 1,4 % (1/72), e quinze ratos foram excluídos do estudo: Cinco por ausência de tumor no pulmão na TCAR (2), ou no exame de necropsia (3); Cinco por abscesso pulmonar, embora também apresentasse tumor no pulmão pelo exame histológico; dois por terem sido parcialmente devorados pelos outros animais antes da realização da necropsia; dois que morreram no 3º e 4º PO de causa desconhecida; e um por peritonite e necrose de alças intestinais. Dos 67 animais seguidos até o 5º ou 6º dia do implante tumoral e necropsiados, 64 desenvolveram tumor no pulmão (índice de pega = 95,5%) diagnosticado pela TCAR e/ou exame de necropsia, e confirmado pelo estudo histopatológico.

Finalmente, com a exclusão dos 15 animais e de 1 óbito cirúrgico, permaneceram 56 animais, que foram incluídos na primeira fase para a avaliação do volume tumoral e comparação dos resultados. Nos grupos Gc1 e Gclx, os diâmetros tumorais foram medidos na necropsia dos animais no 5º dia do implante tumoral; nos Grupos Gc2 e Gtld, medidos pela TCAR e necropsia no 5º dia do implante tumoral; e nos Grupos Gc3, Ggfb e Gtld+gfb, medidos pela TCAR e os volumes tumorais calculados em cm^3 pela fórmula $(D \times d^2/2)$. Nos grupos Gc1 e Gclx não se realizaram tomografia por questões operacionais.

A alta correlação dos dados da TCAR com os da necropsia observada nos animais da segunda etapa nos credenciou a utilizar este método para detecção e mensuração dos diâmetros tumorais nessa fase dos experimentos.

1º Experimento:

Grupo Controle 1. (Gc1) - número de animais = 9. Neste grupo o medida dos diâmetros tumorais foi feita com paquímetro digital na necropsia no 5º dia do implante de 4×10^5 células do tumor de Walker e o cálculo dos volumes pela fórmula acima descrita. Foi

excluído 1 animal do grupo sem tumor no pulmão no exame de necropsia. A tabela 3 mostra os volumes tumorais desse grupo expressos em média \pm erro padrão da média.

TABELA 3 - Valores dos diâmetros e volumes tumorais de animais do grupo controle, medidos na necropsia no 5^o dia do implante de 4×10^5 células do tumor de Walker.

Rato	Diâmetro		V (cm³)
	maior (cm)	menor (cm)	
1	1,7	1,3	1,430
2	1,6	1,2	1,150
3	1,2	0,98	0,570
4	1,3	1,2	0,930
5	0,4	0,3	0,018
6	0,6	0,5	0,075
7	0,52	0,5	0,065
8	0,9	0,6	0,160
9	0,48	0,46	0,050
Média\pm EPM	0,88\pm 0,16	0,73\pm 0,13	0,412\pm 0,185

Grupo Celecoxib (Gclx) - número de animais = 7. Neste grupo foram excluídos três animais que morreram no 3^o, 4^o e 5^o dia do implante tumoral. O último apresentou peritonite com algumas alças intestinais enegrecidas e necrosadas, por provável efeito colateral do celecoxib. Não se verificou diferença dos volumes tumorais no grupo tratado com celecoxib 15 mg/kg (CLX 15) em relação ao grupo controle (Tabela 4, 5 e Figura 26)

TABELA 4 - Valores dos diâmetros e volumes tumorais de animais do grupo tratado com Celecoxib (15mg/kg/dia), medidos na necropsia no 5º dia do implante de 4×10^5 células do tumor de Walker.

Rato	Diâmetro		V (cm ³)
	maior (cm)	menor (cm)	
1	0,97	0,93	0,420
2	0,65	0,59	0,110
3	1,20	1,20	0,860
4	1,00	0,91	0,410
5	1,40	1,20	1,000
6	0,80	0,60	0,140
7	0,60	0,30	0,027
Média± EPM	0,946± 0,109	0,819± 0,127	0,487± 0,192

TABELA 5 - volumes tumorais de animais do grupo controle e grupo do Celecoxib, 15mg/kg/dia (CLX-15), medidos na necropsia no 5º dia do implante de 4×10^5 células do tumor de Walker.

Grupos	Número de animais	Volume tumoral (cm ³)	p
Gc1	9	0,412± 0,185	-
Gclx - 15	7	0,487± 0,192	ns

Resultados expressos em média ± erro padrão da média, ns = não significante. Teste de Mann-Whitney, p = 0,66.

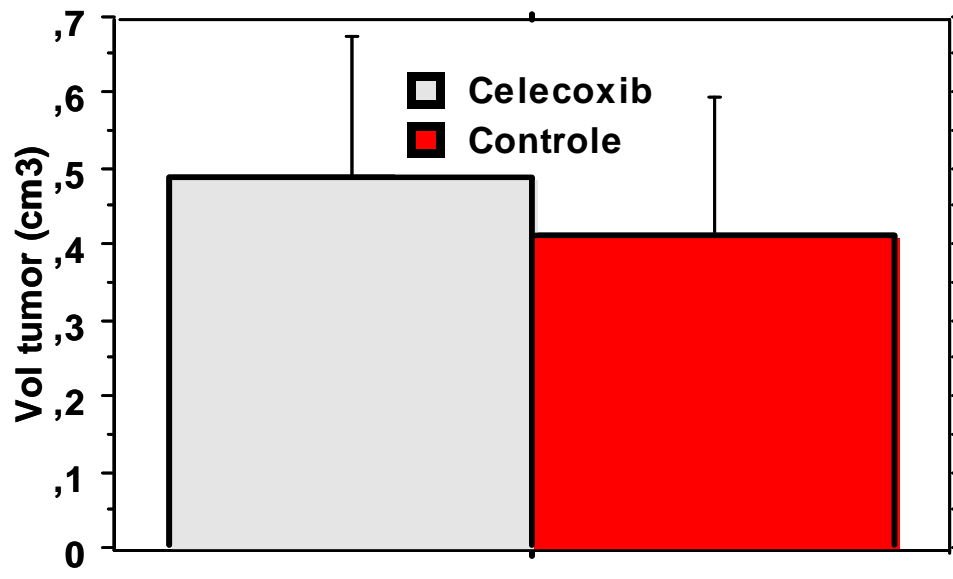


FIGURA 26 - Gráfico do volume tumoral de animais do grupo controle e grupo do Celecoxib, 15mg/kg/dia (CLX-15), medidos na necropsia no 5º dia do implante de 4×10^5 células do tumor de Walker. Teste de Mann-Whitney, $p = 0,66$.

2º Experimento:

Grupo Controle 2 (Gc2) - número de animais = 7. Neste grupo houve um óbito cirúrgico. A medida dos diâmetros tumorais foi feita pela TCAR no 5º dia do implante de 4×10^5 células do tumor de Walker e o cálculo dos volumes pela fórmula acima descrita. A tabela 6 mostra os volumes tumorais desse grupo expressos em média \pm erro padrão da média.

TABELA 6 - Valores dos diâmetros e volumes tumorais de animais do grupo controle, medidos pela TCAR no 5º dia do implante de 4×10^5 células do tumor de Walker.

Rato	Diâmetro		Volume
	maior (cm)	menor (cm)	tumoral (cm ³)
1	0,9	0,6	0,162
2	0,9	0,7	0,220
3	0,8	0,5	0,100
4	0,5	0,4	0,040
5	0,4	0,3	0,018
6	0,6	0,3	0,027
7	0,5	0,5	0,062
Média± EPM	0,657± 0,078	0,471± 0,057	0,090± 0,029

Grupo Talidomida (Gtld) - número de animais = 8. Não se verificou diferença dos volumes tumorais no grupo tratado com talidomida 45 mg/kg (TLD-45) em relação ao grupo controle (Tabela 7, 9 e Figura 27)

TABELA 7 - Valores dos diâmetros e volumes tumorais de animais do grupo tratado com talidomida (45 mg/kg/dia), medidos pela TCAR no 5^o dia do implante de 4×10^5 células do tumor de Walker.

Rato	Diâmetro		Volume
	maior (cm)	menor (cm)	tumoral (cm ³)
1	0,8	0,5	0,100
2	0,9	0,7	0,220
3	0,5	0,4	0,040
4	0,8	0,7	0,196
5	0,9	0,4	0,072
6	0,7	0,3	0,031
7	0,6	0,4	0,048
8	0,8	0,4	0,064
Média± EPM	0,750± 0,050	0,475± 0,053	0,096± 0,026

Grupo Gefitinib (Ggfb) - número de animais = 9. Neste grupo foram excluídos 7 animais, dos quais, 1 por ausência de tumor no pulmão, 5 por apresentarem infecção respiratória e abscesso pulmonar confirmado por exame histológico (Figura 28) e 1 por ter sido devorado pelos animais antes da realização da necropsia. Não se observou diminuição significativa dos volumes tumorais no grupo tratado com Gefitinib 25 mg/kg (GFB 25) em relação ao grupo controle (Gc2), que foi de $0,045 \pm 0,01$ e $0,090 \pm 0,029$ respectivamente (Tabelas 8, 9 e Figura 27)

TABELA 8 - Valores dos diâmetros e volumes tumorais de animais do grupo tratado com gefitinib (25 mg/kg/dia), medidos pela TCAR no 5^o dia do implante de 4×10^5 células do tumor de Walker.

Rato	Diâmetro maior (cm)	Diâmetro menor (cm)	Volume tumoral (cm³)
1	0,7	0,5	0,087
2	0,6	0,5	0,075
3	0,5	0,4	0,040
4	0,5	0,5	0,062
5	0,6	0,5	0,075
6	0,3	0,2	0,006
7	0,4	0,3	0,018
8	0,5	0,3	0,022
9	0,5	0,3	0,022
Média± EPM	0,5± 0,04	0,4± 0,04	0,045± 0,01

TABELA 9 - Volumes tumorais de animais do grupo controle, grupo da talidomida, 45mg/kg/dia (TLD-15) e grupo do gefitinib 25mg/kg/dia (GFB-25), medidos pela TCAR no 5^o dia do implante de 4×10^5 células do tumor de Walker.

Grupos	Número de animais	Volume tumoral (cm³)	p
Gc2	7	0,090± 0,029	-
Gtld - 45	8	0,096± 0,026	ns
Ggfb - 25	9	0,045± 0,01	ns

Resultados expressos em média ± erro padrão da média. Não houve diferença significativa nos grupos tratados com talidomida (TLD) e com gefitinib (GFB) em relação ao controle. ns = não significativa. Teste de Kruskal-Wallis, $p = 0,23$.

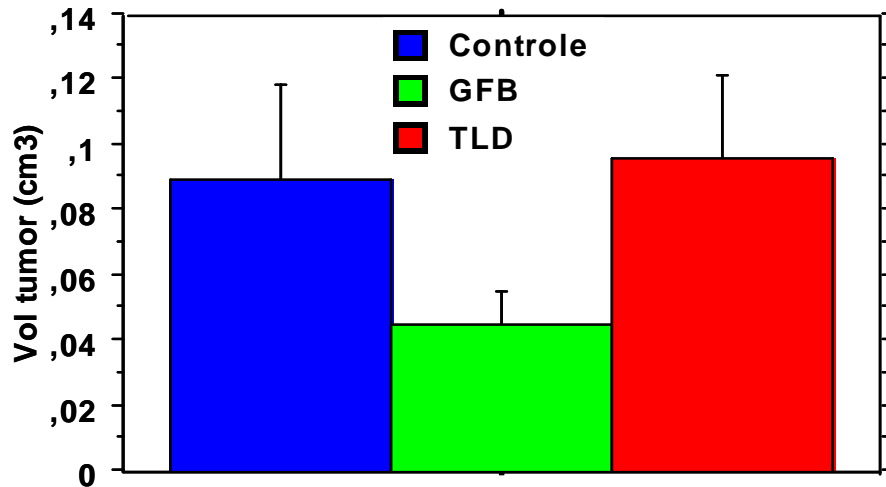


FIGURA 27 - Volumes tumorais medidos pela TCAR no 5º dia do implante de 4×10^5 células do tumor de Walker. Resultados expressos em média \pm EPM. Não houve diferença significativa nos grupos tratados com talidomida (TLD) e com gefitinib (GFB) em relação ao controle. Teste de Kruskal-Wallis, $p = 0,23$.

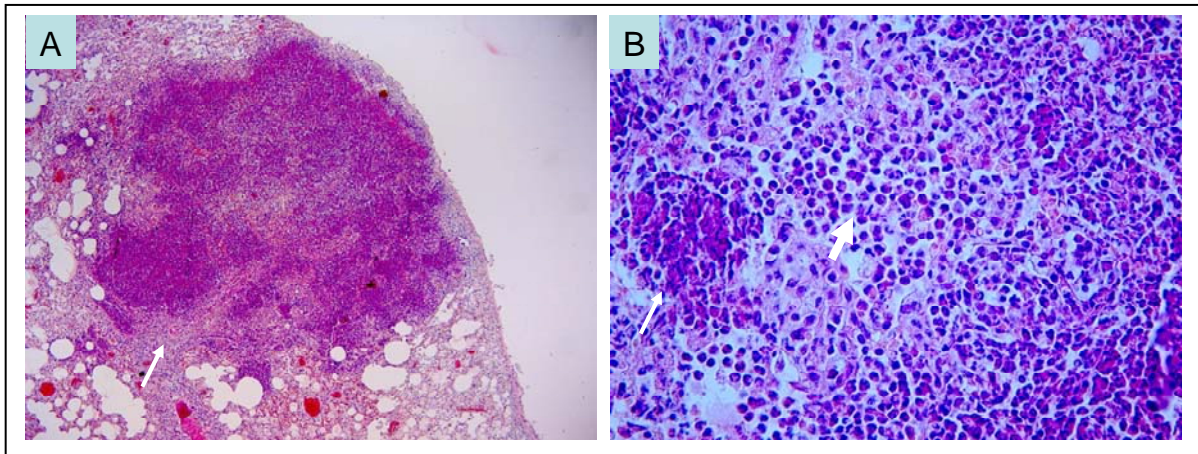


FIGURA 28 - Exame histopatológico corado pela HE, mostrando um abscesso pulmonar. A) com aumento de 40X. B) com aumento de 400X, mostrando polimorfonucleares preservados no centro (seta grossa) e piócitos na periferia (seta fina).

3º Experimento:

Grupo Controle 3 (Gc3) - número de animais = 7. Neste grupo foi excluído 1 animal que morreu e não foi necropsiado. A medida dos diâmetros tumorais foi feita pela TCAR no 6º dia do implante de 4×10^5 células do tumor de Walker e o cálculo dos volumes pela fórmula acima descrita. A tomografia não pôde ser feita no 5º dia por questões operacionais. A tabela 10 mostra os volumes tumorais desse grupo expressos em média \pm erro padrão da média.

TABELA 10 - Valores dos diâmetros e volumes tumorais de animais do grupo controle, medidos pela TCAR no 6º dia do implante de 4×10^5 células do tumor de Walker.

Rato	Diâmetro		Volume tumoral (cm ³)
	maior (cm)	menor (cm)	
1	1,5	0,9	0,607
2	0,8	0,5	0,100
3	1,2	0,9	0,486
4	1,3	1,0	0,650
5	1,2	0,9	0,486
6	1,1	0,8	0,352
7	1,4	0,8	0,448
Média \pm EPM	1,2 \pm 0,086	0,83 \pm 0,061	0,447 \pm 0,069

Grupo Talidomida + Gefitinib (Gtld+gfb) - número de animais = 9. Deste grupo foram excluídos três animais, 2 por ausência de tumor no pulmão, na TCAR, no exame de necropsia e histopatológico, e o outro por ter sido devorado parcialmente pelos demais ratos, inviabilizando a realização da necropsia. Não houve diferença de volume tumoral no grupo tratado com Gefitinib 25 mg/kg (GFB 25) associado com talidomida 45mg/kg/dia (TLD-45) em relação ao grupo controle (Tabela 11, 12 e Figura 29).

TABELA 11 - Valores dos diâmetros e volumes tumorais de animais do grupo tratado com gefitinib (25 mg/kg/dia) associado com talidomida (45mg/kg/dia), medidos pela TCAR no 6^o dia do implante de 4×10^5 células do tumor de Walker.

Rato	Diâmetro maior (cm)	Diâmetro menor (cm)	Volume tumoral (cm³)
1	1,4	1,1	0,847
2	1,0	0,4	0,08
3	1,0	0,9	0,405
4	1,3	0,8	0,416
5	1,2	0,8	0,384
6	1,2	0,6	0,216
7	1,0	0,8	0,320
8	0,8	0,5	0,100
9	0,9	0,7	0,220
Média± EPM	1,09± 0,065	0,73± 0,071	0,332± 0,077

TABELA 12 - Volumes tumorais de animais do grupo controle e grupo do gefitinib, 25mg/kg/dia (GFB-25), associado com talidomida, 45mg/kg/dia (TLD-45), medidos pela TCAR no 6º dia do implante de 4×10^5 células do tumor de Walker.

Grupos	Número de animais	Volume tumoral (cm ³)	p
Gc3	7	0,447± 0,069	-
Gtld 45 + Ggfb 25	9	0,332± 0,077	ns

Resultados expressos em média ± erro padrão da média. Não houve diferença de volume tumoral do grupo tratado com gefitinib (GFB) associado com talidomida (TLD) em relação ao controle. ns = não significativa. Teste de Mann-Whitney, $p = 0,11$.

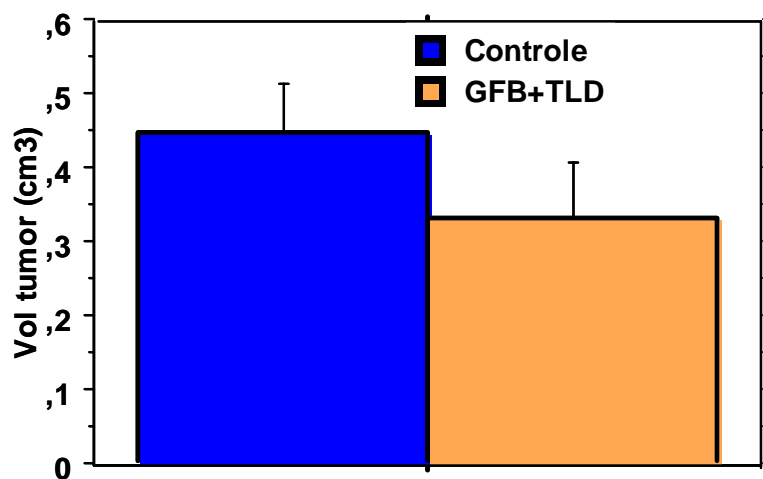


FIGURA 29 - Volume tumoral medido na tomografia no 6º dia do implante de 4×10^5 células do tumor de Walker. Resultados expressos em média ± EPM. Não houve diferença do grupo tratado com gefitinib (GFB) associado com talidomida (TLD) em relação ao controle. Teste de Mann-Whitney, $p = 0,11$.

2ª fase (n=71) - Nesta fase, avaliou-se a sobrevivência dos animais inoculados com 4×10^5 células do carcinossarcoma de Walker.

A mortalidade cirúrgica nesta fase foi de 5,6 % (4/71), e seis ratos foram excluídos do estudo, sendo dois por ausência de tumor no pulmão no exame de necropsia; e quatro que morreram no 3º e 4º dia do implante tumoral de causa desconhecida. As exclusões dos grupos Ggfb e Gtld + gfb já foram referidas na primeira fase. Dos 63 animais necropsiados, 61 desenvolveram tumor no pulmão (índice de pega = 97%) e foram incluídos no estudo. O exame histopatológico mostrou tumor com grau de diferenciação semelhante ao visto nas etapas 1 e 2, mas ocupando uma extensão bem maior do pulmão. Na quase totalidade dos casos, o tumor ocupava maciçamente o pulmão e apresentava grandes áreas de necrose e focos hemorrágicos, sendo mais acentuadas nos animais tratados com gefitinib. Em alguns casos se detectou invasão do mediastino (tecido adiposo mediastinal, traquéia e esôfago), parede torácica (Figura 30) e diafragma mas não foram observadas metástases à distância para o pulmão, fígado ou adrenais.

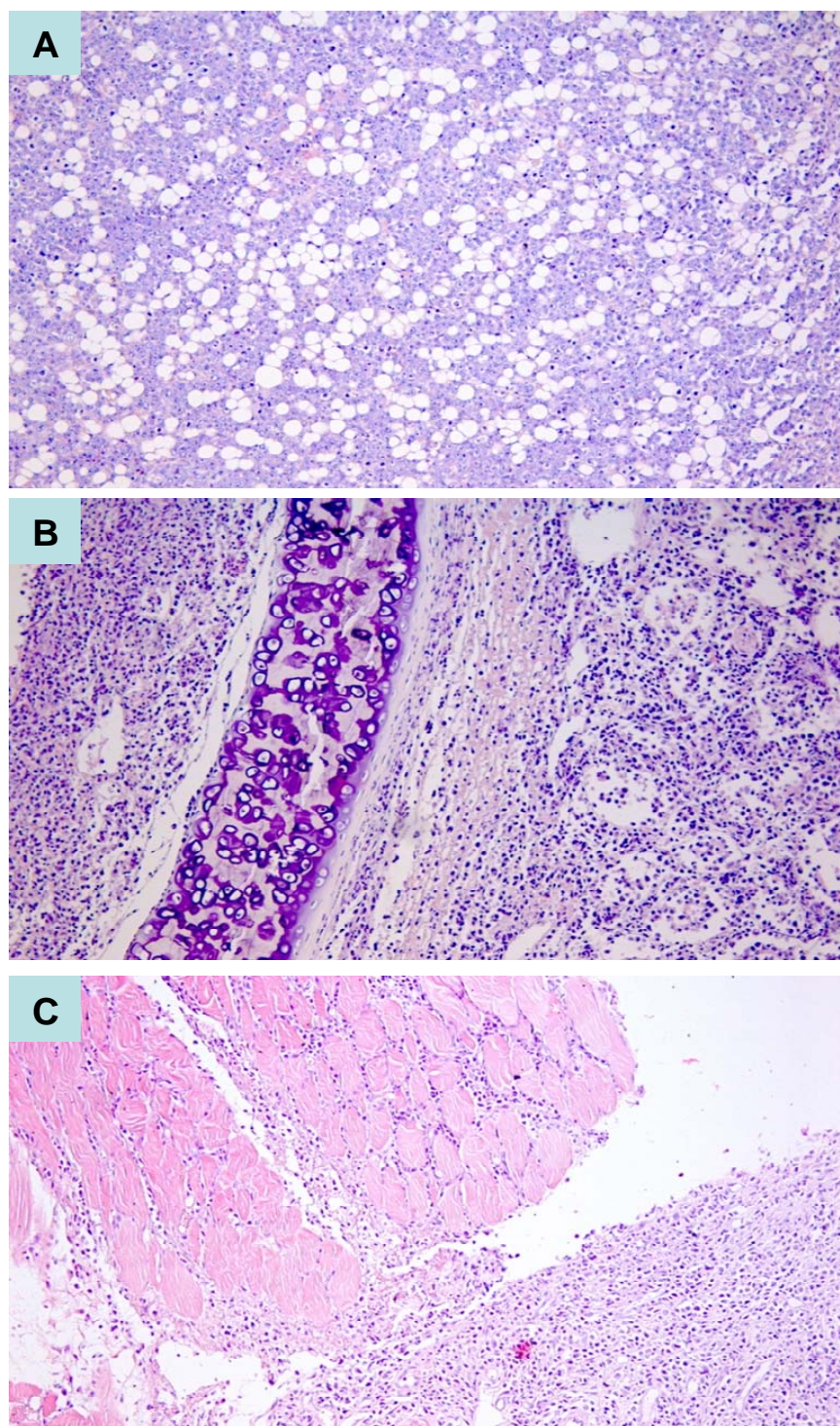


FIGURA 30 - Exame histopatológico corado pela HE (40X), mostrando o tumor invadindo o tecido adiposo mediastinal (A), a traquéia (B) e músculo esquelético da parede torácica (C).

Grupo Controle (Gc) – número de animais incluídos = 12. Neste grupo foram excluídos 2 animais, um que morreu no 3^o dia do implante tumoral e outro sem tumor no pulmão no exame de necropsia. Nos outros animais a presença do tumor foi confirmada pelo exame de necropsia e histopatológico. A massa tumoral geralmente ocupava todo o pulmão (Figura 31). Oito animais (66%) apresentaram invasão maciça do mediastino, e dois, derrame pleural. Todos Os animais morreram até a segunda semana, como mostra a curva de sobrevida (Figura 32).

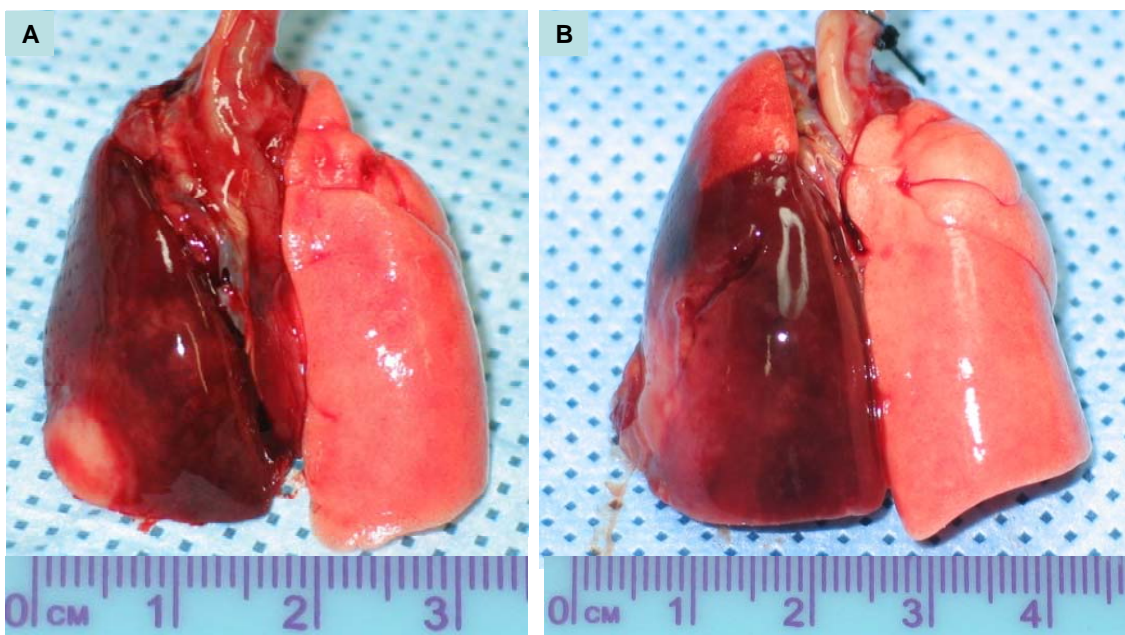


FIGURA 31 - Animais do grupo controle com massa tumoral ocupando todo o pulmão esquerdo e invadindo o mediastino, com o pulmão direito totalmente preservado.

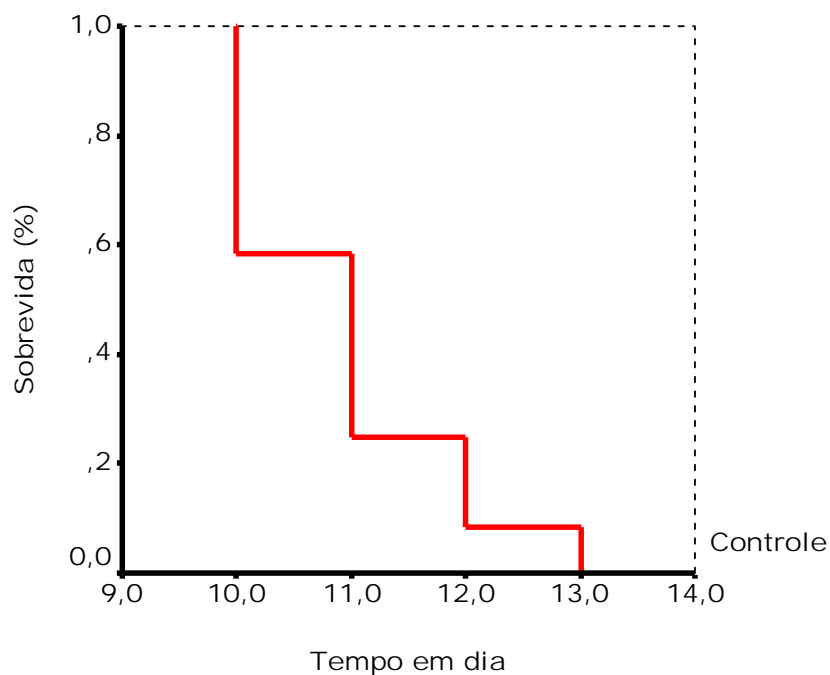


FIGURA 32 - Sobrevivida média do grupo controle = $10,92 \pm 0,29$ (EP); IC 95% (10,35;11,48). mediana = $11,00 \pm 0,38$ (EP); IC 95% (10,27;11,74).

Grupo Celecoxib (Gclx). Este grupo foi dividido em três subgrupos tratados com doses crescentes de Celecoxib para avaliar se havia alguma resposta dose-dependente, iniciando-se com uma dose mínima de 15 mg/kg (CLX 15) por dia, até a dose máxima de 60 mg/kg (CLX 60) por dia, obtendo-se os seguintes resultados:

Gclx 15 – número de animais incluídos = 7. Neste subgrupo foram excluídos três animais que morreram no 3º e 4º dia do implante tumoral de causa desconhecida. Os outros seguiram-se até a morte natural, quando foram necropsiados. No exame de necropsia observou-se a presença de massa tumoral em todos eles, em um havia invasão da parede torácica e em outro derrame pleural. Constatou-se ainda invasão do mediastino em 6 dos 7 animais (86%) desse subgrupo. Não houve aumento da sobrevivida dos animais tratados em relação ao controle (Figura 33).

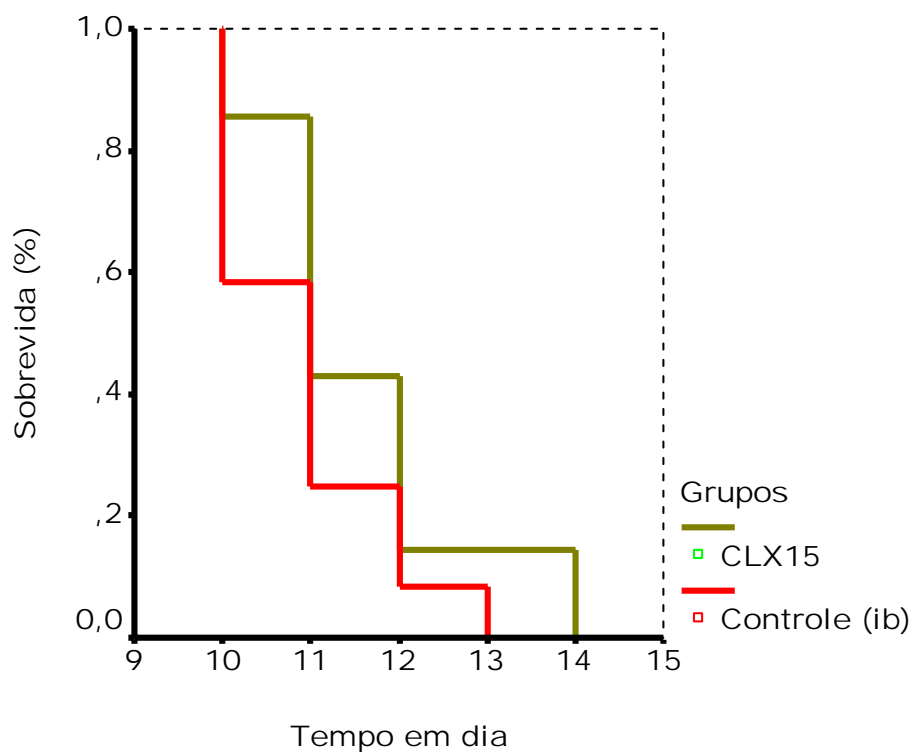


FIGURA 33 - Sobrevivência mediana do grupo controle = $11,00 \pm 0,38$ dias; IC 95% (10,27; 11,74). CLX15 = $11 \pm 0,44$ dias IC 95% (10,14; 11,86). (Teste de Log Rank, $p = 0,22$).

Gclx 30 – número de animais incluídos = 11. Houve 1 óbito cirúrgico. A sobrevivência dos animais tratados com celecoxib na dose 30 mg/kg por dia foi significativamente menor que no grupo controle (Figura 34). Isto deveu-se provavelmente ao efeito colateral da droga. No exame de necropsia, alguns animais apresentaram sinais de obstrução intestinal e peritonite, com ascite, distensão com perfuração de alças intestinais, e dilatação do estômago com conteúdo fecalóide, e outros, sinais de isquemia e trombose mesentérica (Figura 35). Todos eles tinham tumor no pulmão de tamanhos variados, mas os óbitos não foram por causa da neoplasia.

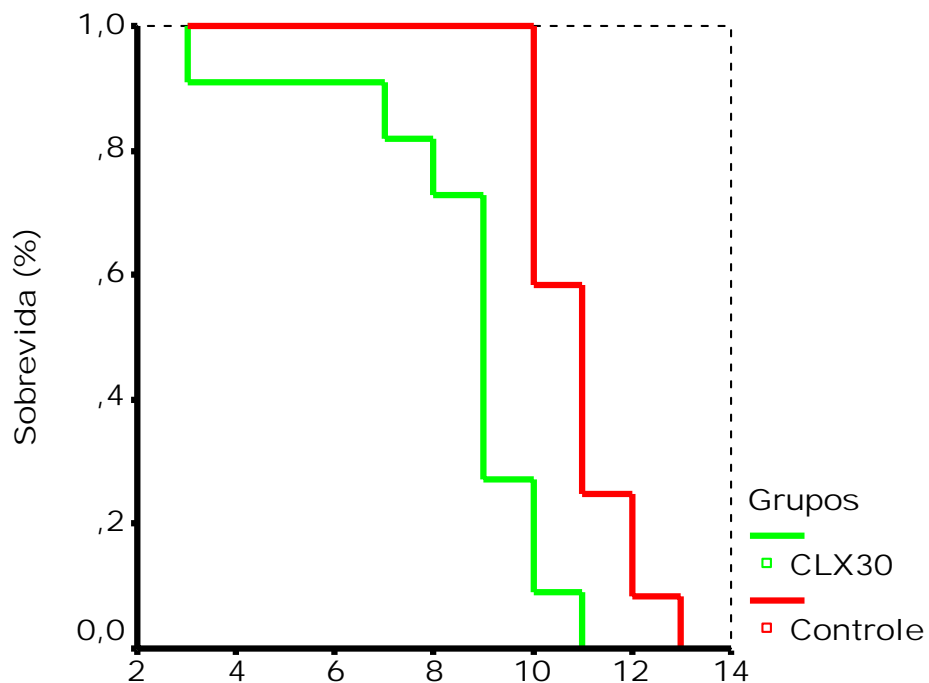


FIGURA 34 - Sobrevida mediana do grupo controle = $11,00 \pm 0,38$ dias; IC 95% (10,27; 11,74). CLX30 = $9 \pm 0,3$ dias IC 95% (8,42; 9,58). (Teste de Log Rank, $p = 0,0005$)

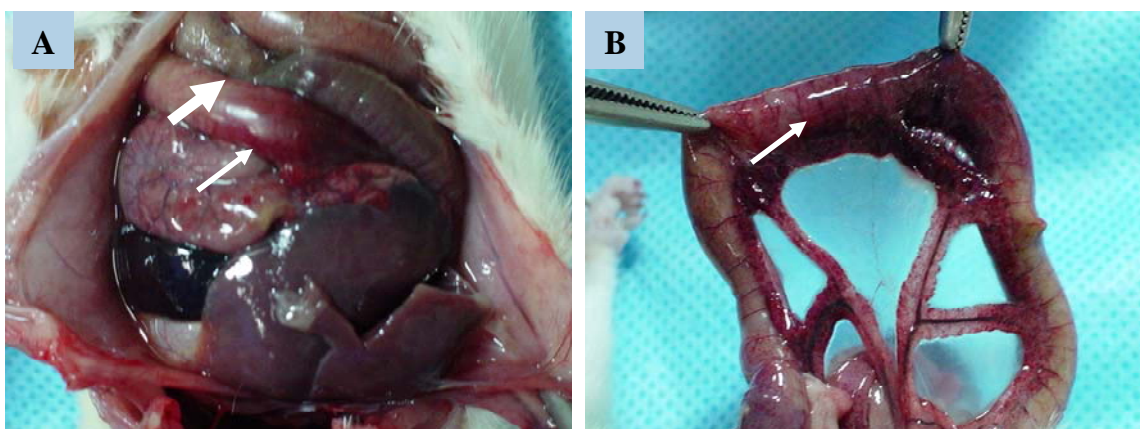


FIGURA 35 – Animal com peritonite, distensão e perfuração de alça intestinal com sinais de isquemia e trombose mesentérica.

Gclx 60 – número de animais incluídos = 8. Houve 2 óbitos cirúrgicos. A maioria dos animais deste subgrupo morreu de forma semelhante ao subgrupo do CLX30, ou seja, por provável paraefeito da droga, embora tenha sido constatada a presença de tumor no pulmão. Em somente dois animais não se observou sinais de peritonite e distensão de alças. Estes animais morreram no 7º e 8º dia por pneumonia aspirativa decorrente provavelmente de complicação da gavagem. Por isso, a sobrevida mediana foi muito baixa (Figura 36). A figura 37 mostra as curvas de sobrevida dos animais tratados com doses crescentes do celecoxib e revelam que, além de não ter havido melhora no subgrupo do CLX15, houve diminuição da sobrevida nos outros subgrupos pelas razões acima citadas.

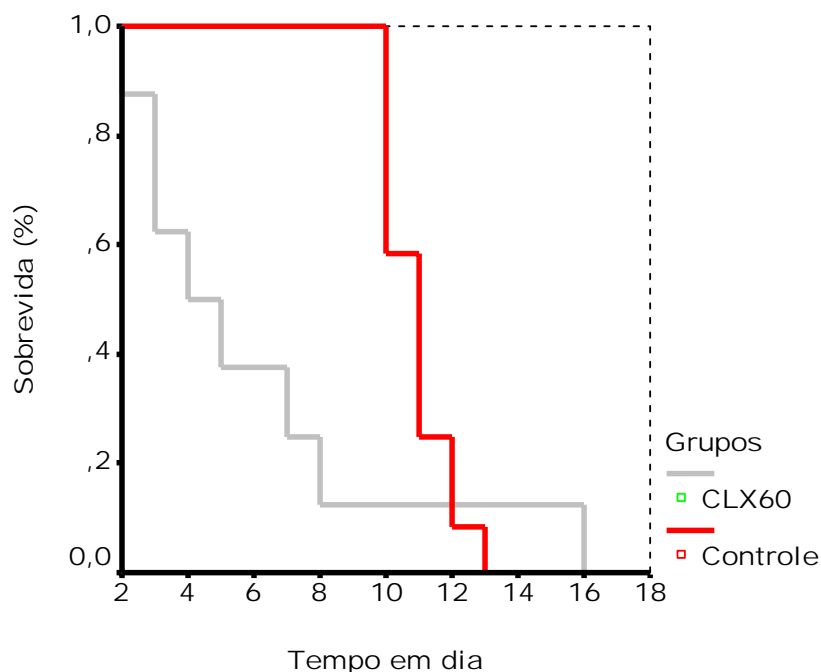


FIGURA 36 - Sobrevida mediana do grupo controle = $11,00 \pm 0,38$ dias; IC 95% (10,27; 11,74). CLX60 = $4 \pm 1,4$ dias IC 95% (1,23; 6,77). (Teste de Log Rank, $p = 0,043$)

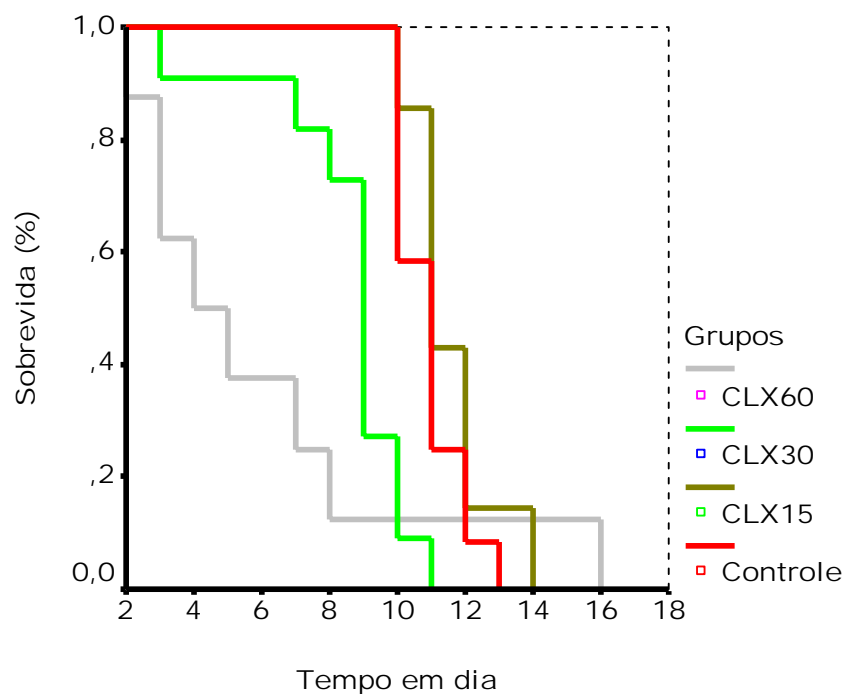


FIGURA 37 - Sobrevivência dos animais tratados com doses crescentes do celecoxib. Não houve diferença de sobrevivência mediana do grupo CLX15 = $11 \pm 0,44$ dias IC 95% (10,14; 11,86) em relação ao controle = $11,00 \pm 0,38$ dias; IC 95% (10,27; 11,74). (Teste de Log Rank, $p = 0,22$). Os subgrupos CLX30 = $9 \pm 0,3$ dias IC 95% (8,42; 9,58) e CLX60 = $4 \pm 1,4$ dias IC 95% (1,23; 6,77), tiveram sobrevivência menor que o grupo controle e o subgrupo CLX15 (Teste de Log Rank, $p < 0,05$)

Grupo Talidomida (Gtld) – número de animais incluídos = 14. Houve um óbito cirúrgico e outro animal foi excluído da análise por não ter apresentado tumor no pulmão no exame de necropsia. Dos outros quatorze animais, 12 apresentaram derrame pleural, dois destes implante tumoral no diafragma e dois no mediastino. Verificou-se aumento significativo da sobrevivência mediana nesse grupo de animais tratados com talidomida (Teste de Log Rank, $p = 0,0001$), na dose de 45 mg/kg/dia (TLD45), em relação ao grupo controle (Figura 38).

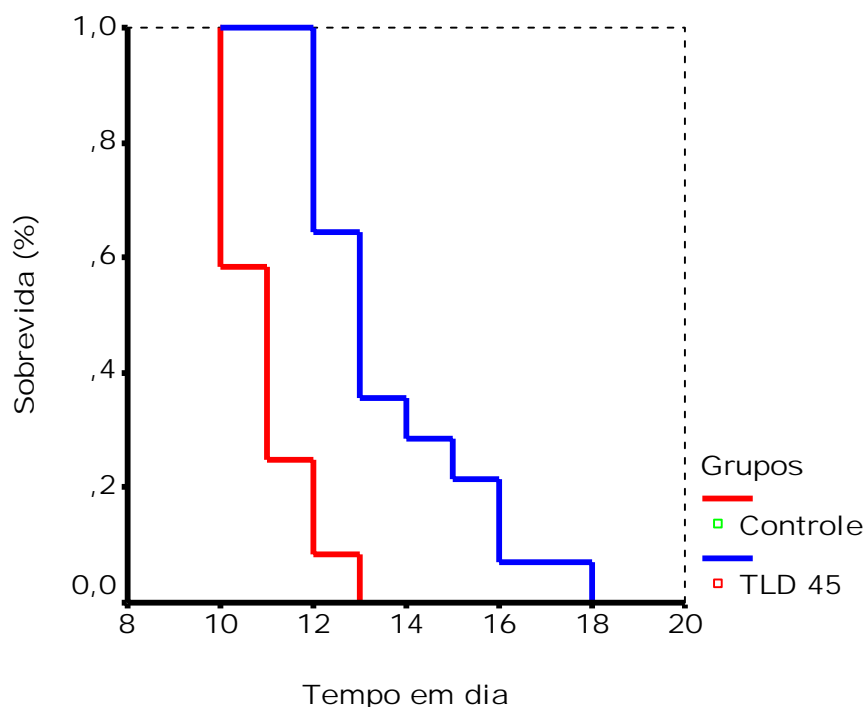


FIGURA 38 - Sobrevivida mediana do grupo controle = $11,00 \pm 0,38$ dias; IC 95% (10,27; 11,74). TLD45 = $13 \pm 0,45$ dias IC 95% (12,12; 13,88). (Teste de Log Rank, $p = 0,0001$)

Grupo Gefitinib (Ggfb) - número de animais incluídos = 9. Estes animais são os mesmos do Ggfb da primeira fase que realizaram tomografia no 5º dia e foram acompanhados até a morte espontânea para avaliação da sobrevivida. No exame de necropsia, 3 apresentaram derrame pleural, 3 invasão do mediastino e 1 invasão da parede torácica, configurando um acometimento loco-regional da doença. O exame histológico mostrou na maioria dos casos que o tumor ocupava maciçamente o pulmão e apresentava grandes áreas de necrose e focos hemorrágicos (figura 39). A sobrevivida desse grupo de animais tratados com gefitinib, na dose de 25 mg/kg/dia (GFB25), foi significativamente maior que a do grupo controle (Teste de Log Rank, $p = 0,0001$), (Figura 40).

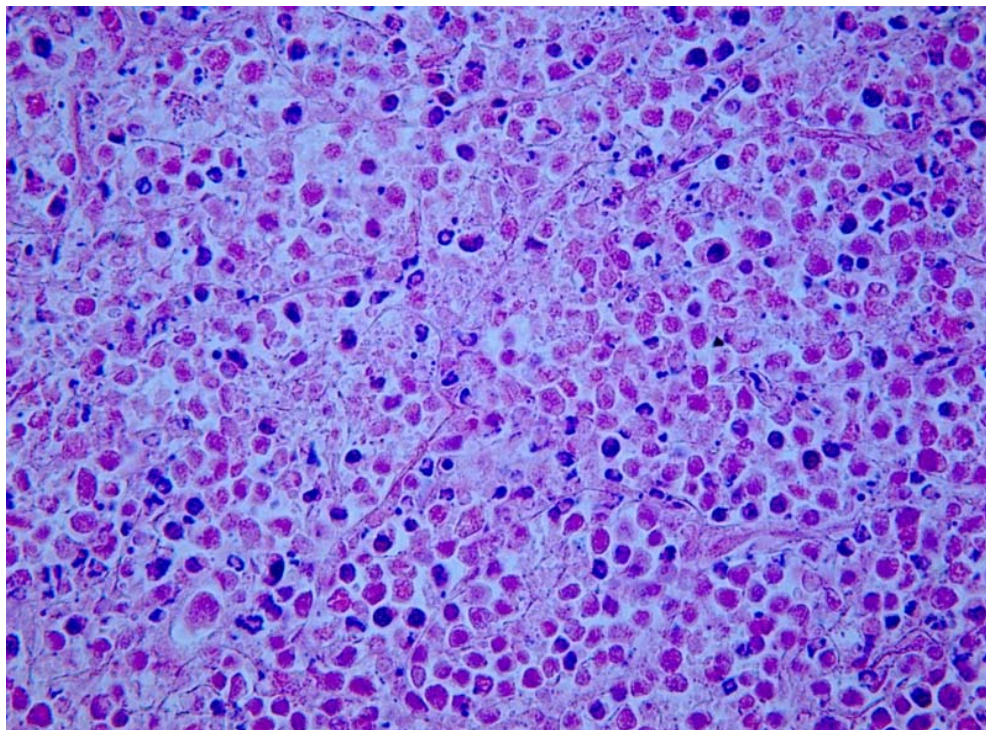


FIGURA 39 - Exame histológico corado pela HE (400X) mostrando o tumor ocupando maciçamente o pulmão e com extensa área de necrose tumoral coagulativa.

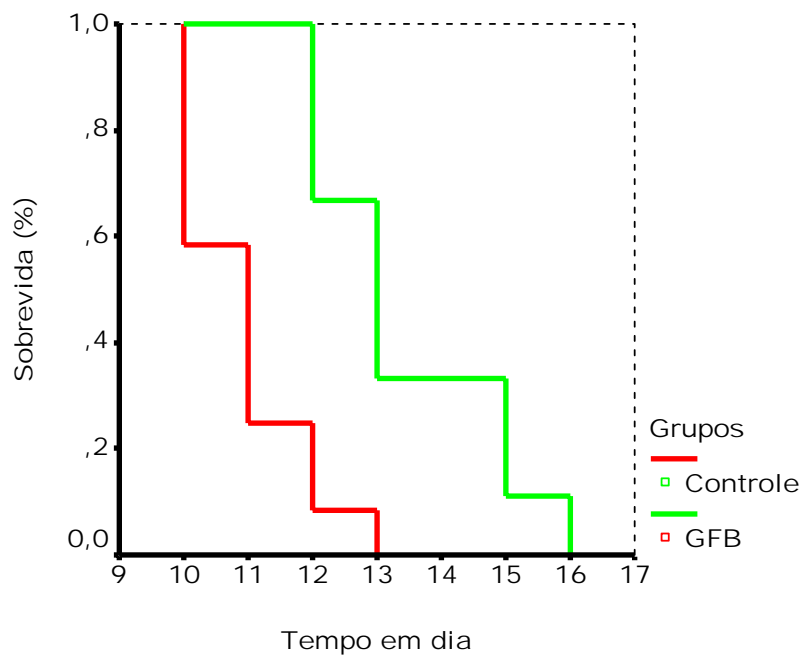


FIGURA 40 - Sobrevida mediana do grupo controle = $11,00 \pm 0,38$ dias; IC 95% (10,27; 11,74). GFB25 = $13 \pm 0,47$ dias IC 95% (12,08; 13,92). (Teste de Log Rank, $p = 0,0006$)

Grupo Talidomida + Gefitinib (Gtld + gfb) - número de animais incluídos = 9. Estes animais são também os mesmos do grupo Gtld + gfb da primeira fase que foram submetidos à tomografia no 6º dia e acompanhados até a morte espontânea para avaliação da sobrevida. Os animais desse grupo tinham tumor com características semelhantes às do grupo Ggfb. Três deles apresentavam invasão maciça do mediastino com infiltração de vasos e da traquéia, e um, invasão da parede torácica. Não houve aumento de sobrevida dos animais tratados com gefitinib, 25 mg/kg/dia (GFB25), associado com talidomida, 45 mg/kg/dia (TLD45), em relação ao grupo controle (Figura 41)

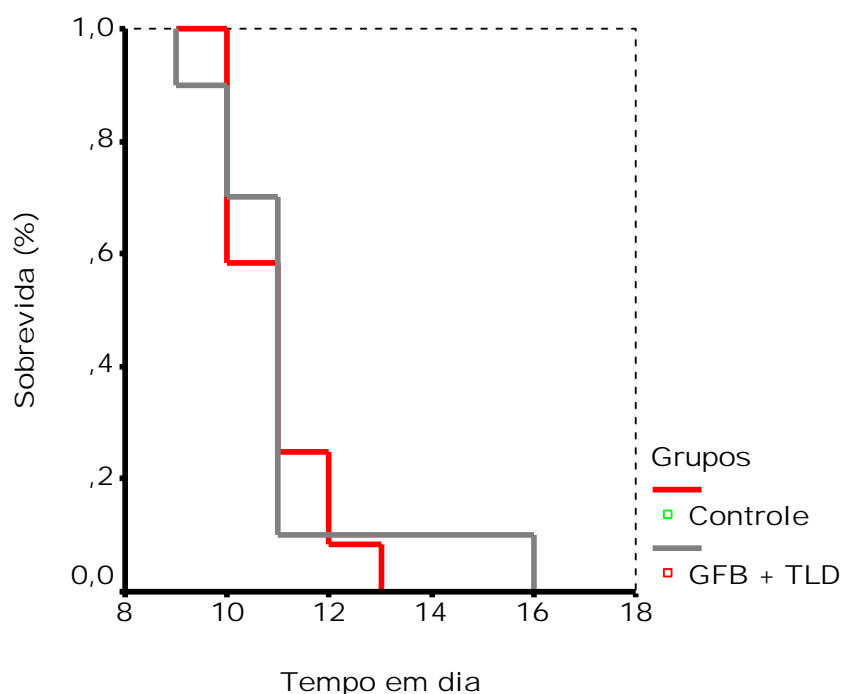


FIGURA 41 - Sobrevida mediana do grupo controle = $11,00 \pm 0,38$ dias; IC 95% (10,27; 11,74). GFB25 = $11 \pm 0,16$ dias IC 95% (10,69; 11,31). (Teste de Log Rank, $p = 0,78$)

Grupo paclitaxel (Gpcl) - número de animais = 9. Não houve óbito cirúrgico e nenhum animal foi excluído neste grupo. A sobrevida dos animais foi maior que a observada nos animais de todos os outros grupos. Em nenhum animal apareceu sinais de insuficiência respiratória ou perda de peso que sugerisse progressão da neoplasia. Não se sabendo o que

estava acontecendo com esse grupo de animais, decidiu-se por interromper o estudo no 29º dia e realizar a eutanásia nos animais. No exame de necropsia foi surpreendente o achado de tumor, alguns pequenos (Figura 42), e outros maciços, ocupando todo o pulmão (Figura 43). Isto comprovou a eficácia da droga, com uma excelente resposta antitumoral nesse grupo de animais. Em dois animais não havia tumor no pulmão que pode ter sido consequência da ação da droga, o que nos levou a incluí-los na sobrevida como casos censurados (Figura 44).

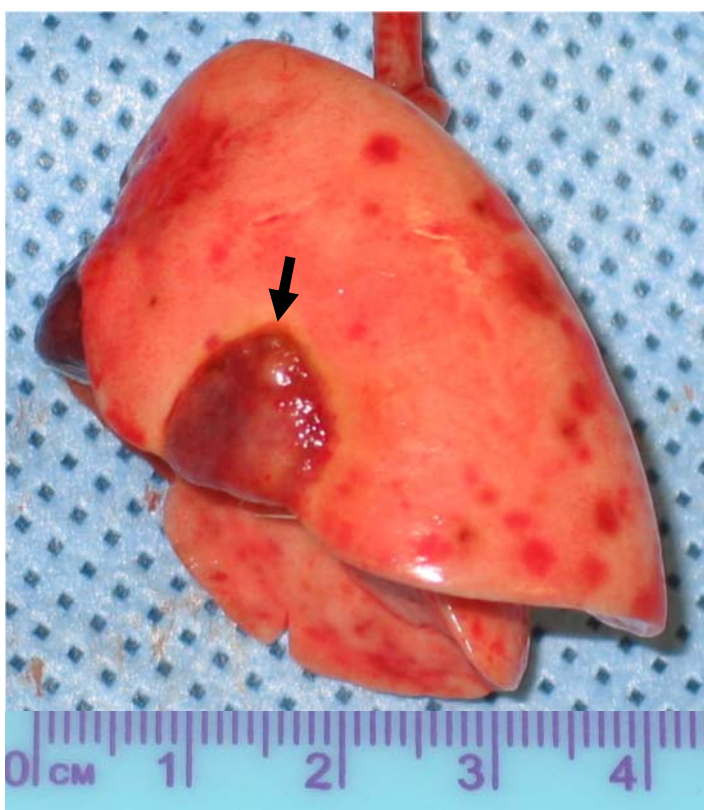


FIGURA 42 - Tumor pequeno no lobo inferior do pulmão esquerdo, no 29º dia do implante tumoral (seta).

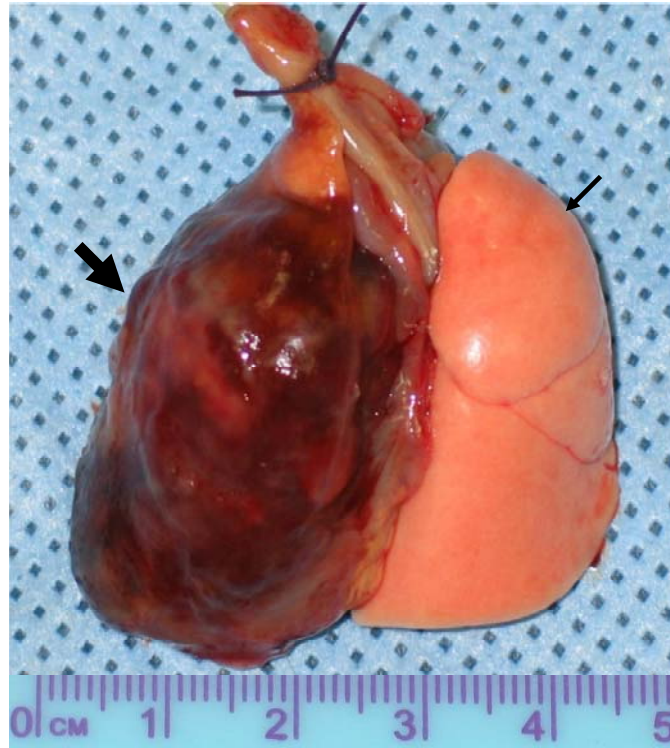


FIGURA 43 - Massa tumoral acometendo todo o pulmão esquerdo, no 29º dia do implante tumoral (seta grossa). O pulmão direito normal (seta fina)

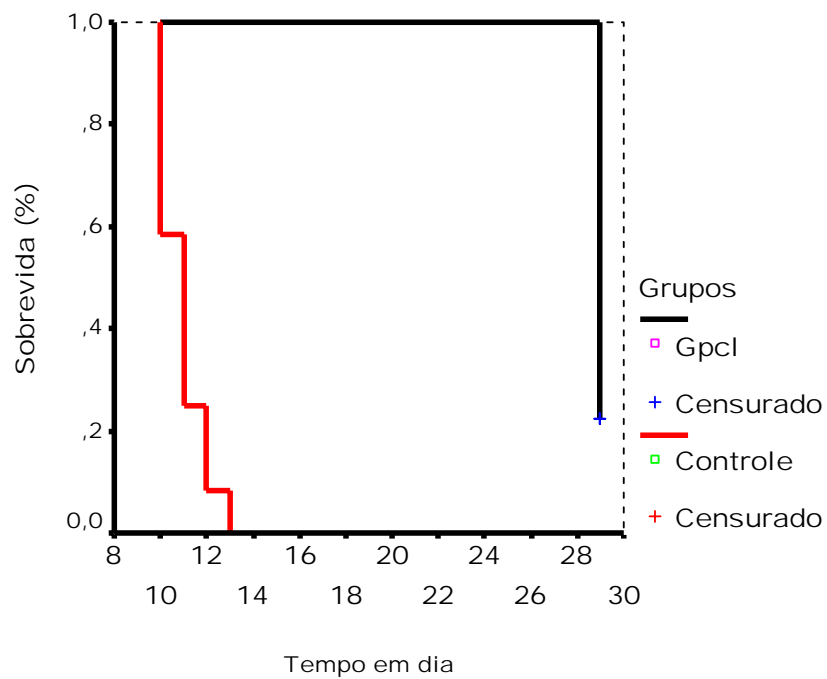


FIGURA 44 - Sobrevida mediana: grupo controle = 11 dias e Gpcl (grupo paclitaxel) = 29 dias (Teste de Log Rank: $p = 0,0001$)

4.4 Mortalidade cirúrgica.

A mortalidade cirúrgica global foi de 4,2% (8/191), tendo variado de 1,4% na primeira fase da terceira etapa a 6,2% nas duas primeiras etapas (Tabela 13). Isto revela a simplicidade do modelo de tumor de pulmão com o implante de células por via ib adotado no presente estudo.

TABELA 13 - Mortalidade cirúrgica dos animais submetidos ao implante de células do tumor de Walker por via ib nas três etapas experimentais.

Etapas	Nº de animais inoculados com tumor	Nº de óbito cirúrgico	Mortalidade %
1 ^a	32	2	6,2%
2 ^a	16	1	6,2%
3 ^a (1 ^a fase)	72	1	1,4 %
3 ^a (2 ^a fase)	71	4	5,6 %
Total	191	8	4,2%

4.5 Índice de pega tumoral com o implante de 4×10^5 células do tumor de Walker por via intrabrônquica.

O exame histopatológico confirmou a presença de tumor no lobo inferior do pulmão esquerdo em forma de nódulo ou de grande massa tumoral invadindo todo o pulmão, em 149 dos 155 animais do estudo, perfazendo um índice geral de pega de 96% (Tabela 14).

Nos animais que foram seguidos até a morte espontânea pela neoplasia, observou-se na maioria deles a disseminação loco-regional do tumor para o mediastino e, em alguns,

para a pleura, diafragma e parede torácica. Não se constatou a presença de metástase à distância para o fígado ou adrenais, locais comuns de disseminação do câncer de pulmão.

TABELA 14 - Índice geral de pega dos tumores nos animais submetidos ao implante de 4×10^5 células do tumor de Walker por via intrabrônquica.

Etapas	Nº de animais inoculados com tumor	Nº de animais que desenvolveram tumor	Índice de Pega tumoral
1 ^a	10	9	90%
2 ^a	15	15	100%
3 ^a (1 ^a fase)	67	64	95,5
3 ^a (2 ^a fase)	63	61	97%
Total	155	149	96%

5 DISCUSSÃO

5.1 Estabelecimento de modelo experimental de tumor de pulmão por via intrabrônquica com o carcinossarcoma de Walker

O presente estudo mostrou o desenvolvimento de um modelo de tumor no pulmão simples, rápido e de fácil reprodução. O procedimento todo era feito em 5 a 6 minutos, sendo realizados em torno de 20 a 24 procedimentos em 2 horas. O uso da traqueotomia e da via ib para o implante das células neste modelo foi feito com um trauma mínimo e com uma mortalidade desprezível de 4,2 %, comparada a que se observa na literatura, de 5 a 10%, com modelos semelhantes (MCLEMORE et al., 1987; HOWARD et al., 1991; WANG et al., 1997). A linhagem celular utilizada foi do carcinossarcoma de Walker, descrito como um adenocarcinoma de glândula mamária de rata, que ao longo dos anos sofreu variações morfológicas, assumindo formas carcinomatosa, sarcomatosa mista e carcinossarcomatosa (EARLE, 1935; FISHER e FISHER, 1961), embora células oriundas de pulmão de roedores ou humanos podem ser usadas neste modelo. Entretanto, para a utilização de células humanas, faz-se necessário o uso de camundongos atímicos ou ratos imunossuprimidos. Com o uso deste tipo de animal pode-se desenvolver o que se denomina de modelo ortotópico, no qual células originadas de pulmão são implantadas no próprio pulmão (HOWARD et al., 1991; JOHNSTON et al., 2001). O modelo ortotópico pode ser estabelecido com qualquer linhagem de tumor humano, independente do seu fenótipo, e isto facilitaria a análise da responsividade destes tumores à terapia anticâncer. No nosso laboratório já está em andamento um projeto de modelo ortotópico de tumor de pulmão em rato baseado no presente modelo.

Na análise da tumorigenicidade observou-se um desenvolvimento do tumor em forma de nódulo, documentado por tomografia e necropsia no 5o dia do implante de 4×10^5 células, em 90% dos animais, na primeira etapa dos experimentos. O índice de pega foi menor, quando se diminuiu a quantidade de células implantadas. É importante destacar que o volume da suspensão do tumor a ser injetado no pulmão deve ser pequeno ($<100 \mu\text{L}$) porque os animais não toleram a injeção de grandes volumes no parênquima pulmonar

(WANG et al., 1997). No presente modelo foram injetados no pulmão cerca de 60 a 90 μL da suspensão do tumor, mas há relatos da injeção de 1 mL em outros modelos (SOARES e TERRA, 1993; OLIVEIRA et al., 1998). O índice geral de pega no presente estudo com o implante de 4×10^5 células por via ib foi de 96%, semelhante ao índice de pega (94,5%) com a implantação de 2×10^5 células da mesma linhagem tumoral feita por toracotomia, no modelo desenvolvido no nosso laboratório por Gomes Neto et al. (2002), embora usando a metade do número de células.

Wang et al. (1997) fizeram também a implantação de células tumorais por punção direta do parênquima pulmonar através de toracotomia, tendo ocorrido maior índice de pega nesta via que na via ib (100% versus 95%). Isso mostra a influência do microambiente tumoral, proporcionando um melhor desenvolvimento das células quando implantadas diretamente no parênquima pulmonar por toracotomia. Outros autores que usaram a via transtraqueal e ib para a implantação de células no pulmão mostraram um índice de pega tumoral que variou de 80 a 100% dos animais, com baixíssima mortalidade (HOWARD et al., 1991). Isto corrobora com os resultados de 96% de pega tumoral obtidos no presente modelo. Os modelos de implante tumoral por toracotomia, embora apresentem também altos índices de pega tumoral, têm algumas desvantagens que são a necessidade de uma técnica cirúrgica mais apurada para a sua execução, a menor reprodutibilidade e o maior índice de mortalidade cirúrgica. No modelo de toracotomia desenvolvido no nosso laboratório por Gomes Neto et al. (2002) foi observada uma mortalidade cirúrgica de 14,3%, enquanto no presente modelo de tumor por via ib foi somente de 4,2%.

O alto índice de pega e o rápido crescimento do tumor caracterizado pela presença de um grande nódulo no pulmão, com um volume médio de $0,118 \pm 0,108 \text{cm}^3$ no quinto dia do implante das células, demonstram o grau de agressividade do tumor de Walker. Howard et al. (1991), usando a via ib em modelo de tumor em rato, para inoculação no pulmão de células de diferentes linhagens tumorais, observaram o desenvolvimento de tumor no pulmão somente a partir da terceira semana do implante. Schneider et al. (2002) inoculando no pulmão de ratos por toracotomia $1,5 \times 10^6$ células tumorais de uma linhagem de adenocarcinoma moderadamente diferenciado, originado de cólon de ratos expostos ao metilazoximetanol, constataram a presença de um nódulo pulmonar somente 15 dias após a

implantação e antes de qualquer tratamento. Outros autores, usando diferentes linhagens celulares em modelo de tumor de pulmão por via *ib* em ratos “nudes”, detectaram a presença de pequenos nódulos pulmonares (<1–3 mm de diâmetro) somente na 5ª semana após a inoculação de 20×10^6 células (MARCH et al., 2001). Com o tumor de Walker usado no nosso modelo constatamos nódulo pulmonar no 5º dia pós-inoculação e depois de duas semanas, os animais já haviam sucumbido na quase totalidade.

Howard et al. (1999), em modelo ortotópico de tumor de pulmão em ratos “nudes” com o implante endobrônquico de linhagens de células humanas (NCI-H460 large cell lung carcinoma cells), relataram a presença de metástase à distância para vários órgãos, sendo os linfonodos mediastinais o primeiro local a ser secundariamente acometido. Os principais locais afetados foram o pulmão contralateral, rim, cérebro, osso e, mais raramente, as adrenais. Entretanto, até o 14º dia do implante tumoral não apareceram metástases. A disseminação para os linfonodos mediastinais foi observada no 21º do implante e as metástases à distância somente a partir do 28º dia. Johnston et al 2001, usando também a mesma linhagem celular em ratos “nudes” e o mesmo modelo experimental, encontraram no grupo controle metástases para linfonodos mediastinais em 100% dos animais, além de metástases sistêmicas para ossos (95%), rins (83%), cérebro (48%) e pulmão contralateral (82%). A mediana de sobrevida dos animais foi 32 dias, tendo ocorrido aumento significativo da sobrevida e redução das metástases nos animais tratados com cisplatina e mitomicina. Os autores consideraram o modelo de câncer de pulmão relevante, embora com um tumor de características agressivas pela ocorrência da morte dos animais por volta da 5ª semana do implante, por disseminação local e sistêmica da doença.

No presente modelo ocorreu o crescimento rápido do tumor no pulmão e disseminação mediastinal da doença, contudo não foram observadas metástases à distância. A agressividade do tumor de Walker, confirmada pela morte dos animais nas duas primeiras semanas, pode explicar a ausência de metástase à distância nesse modelo. O crescimento rápido do tumor e a morte precoce dos animais (sobrevida mediana de 11 dias) foram provavelmente a razão da não detecção de metástases sistêmicas nesse modelo. No presente modelo não houve metástase nem mesmo para o pulmão contralateral, mostrando não ter havido disseminação ou extravasamento endobrônquico das células no momento do

implante, fato que outros autores especulam possa ter ocorrido nos modelos por eles relatados (HOWARD et al., 1999; JOHNSTON et al., 2001). A disseminação mediastinal maciça observada no presente modelo assemelha-se ao que ocorre em pacientes portadores de carcinoma de pequenas células. Este tumor em humanos tem um comportamento biológico muito agressivo e a regra é a disseminação precoce para o mediastino, embora também o faça para locais à distância (CAPELOZZI, 2005).

No presente estudo foi realizada tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR) para diagnosticar o tumor de pulmão em rato, após a inoculação de células do tumor de Walker, tendo sido um método de imagem rápido e não invasivo na detecção precoce do tumor. A TCAR foi validada pela histologia, onde se compararam as medidas de diâmetro tumoral nas seções histológicas com as obtidas na tomografia. A alta correlação dos dados da TCAR com os de necropsia observada neste modelo ($r=0,953$, $p<0,0001$), e no de toracotomia também desenvolvido no nosso laboratório (GOMES NETO et al., 2002), permitiu o uso da TCAR para avaliar o desenvolvimento, o volume tumoral e a sobrevida no mesmo grupo de animais. Até esta data, a detecção de tumores em trabalhos experimentais necessitava do sacrifício dos animais para o exame histológico e microscópico, o que demandava custo e tempo. A TCAR propiciou a avaliação da resposta terapêutica de diversas drogas antineoplásicas usadas para validar o modelo. Na literatura, há relatos recentes do uso da tomografia em modelos experimentais (PAULUS et al., 2000; GOMES NETO et al., 2002; DE CLERCK et al., 2004; GRESCHUS et al., 2005).

De Clerck et al. (2004) usaram a tomografia, que eles denominaram de microtomografia (micro-TC) na detecção de tumor de pulmão em camundongos. Estes autores relatam o primeiro estudo com o uso da micro-TC em tumor de pulmão de camundongo induzido pela injeção do carcinógeno uretano, e ressaltaram as vantagens deste método na visualização de tecidos com densidade de partes moles no pulmão de maneira não totalmente invasiva na pesquisa experimental. Mais recentemente, Greschus et al. (2005) usaram a tomografia com reconstrução volumétrica tridimensional (3D), que foi capaz de mostrar pequenos nódulos pulmonares em modelos ortotópicos de tumor de pulmão em camundongos e os efeitos adversos do tratamento, tipo fibrose pulmonar.

A ressonância nuclear magnética (RNM) é outro exame de imagem que, a princípio, poderia ser usado para avaliar tumor *in vivo* em pequenos animais. Entretanto, Kennell et al. (2000) mostraram que as imagens de RNM obtidas de tumores de pulmão em camundongos eram completamente borradas por artefatos de movimento, o que inviabilizava o método para a avaliação de tumores *in vivo*. Por outro lado, estes autores demonstraram alto rendimento da TCAR feita com os animais anestesiados, o que também foi verificado no presente trabalho. Os autores ressaltaram ainda a vantagem da TCAR ser um exame de mais baixo custo e de realização mais rápida que a ressonância magnética.

A sobrevida mediana no presente modelo foi de 10,92 dias, semelhante à sobrevida relatada de 10,08 dias, no modelo de pulmão por toracotomia de Gomes Neto et al. (2002). Esta sobrevida foi menor do que no modelo de estômago (13,2 dias) de Oliveira et al. (1998), de rim (14 dias) de Silva et al. (2002), e de bexiga, de (14,5 dias) Dornelas et al. (2006), com o mesmo tipo de tumor. O diferente número de células necessárias para o desenvolvimento do tumor no pulmão implantado por vias diversas, ou em órgãos distintos, e a variação do tempo de sobrevida dos ratos inoculados com o mesmo tipo de tumor nos diversos órgãos, poderia ser explicada pela teoria de Paget (1889) do microambiente tumoral "seed and soil". Segundo este autor, o fenótipo das células tumorais pode ser influenciado pelo microambiente onde elas são implantadas. Esta teoria foi recentemente revista por Fidler (2003) que afirmou que o potencial de crescimento, angiogênese, invasão e metastatização de um tumor depende da sua interação com fatores homeostáticos do estroma do hospedeiro no microambiente tumoral.

Mueller e Fusening (2004) mostraram ainda que a interação do tumor com o estroma do hospedeiro no microambiente tumoral pode desencadear respostas inflamatórias com a liberação de citocinas, fatores de crescimento tumoral e outros, que diferem entre os diversos órgãos. A menor sobrevida dos animais nos modelos de pulmão pode também ser explicada pelo fato de o pulmão ser um órgão vital, onde o crescimento maciço do tumor provocaria insuficiência respiratória que abreviaria a morte dos animais.

Atualmente a oncologia utiliza mais comumente os modelos ectópicos, subcutâneos, em camundongos para o teste de novas drogas anticâncer (CIARDIELLO et al., 2001). Entretanto, a validade dos resultados nestes modelos é questionável pelas diferenças

farmacodinâmicas entre o tratamento de enxertos tumorais subcutâneos e o tratamento de tumores situados no órgão de origem. A quimiossensibilidade das drogas antitumorais e as respostas terapêuticas dependem do local anatômico do implante tumoral, impostas pela interação do estroma com o tumor no microambiente tumoral, que difere dos modelos subcutâneos para os ortotópicos (KUO et al., 1993; ONN et al., 2003). Por isso, a busca de modelos ortotópicos em animais se justifica pela possibilidade de se poder antecipar com maior precisão, ou se predizer, a resposta de novas drogas antitumorais em humanos, baseada nos resultados experimentais obtidos em animais (KILLION et al., 1998; KERBEL et al., 1999).

5.2 Avaliação do efeito de drogas e validação do modelo de tumor de pulmão por via ib com o carcinossarcoma de Walker.

Com o maior conhecimento da biologia molecular, da bioquímica celular e conseqüentemente das vias de sinalização intracelular, foram desenvolvidos novos compostos alvo-direcionados contra estruturas moleculares específicas do câncer. Destes novos compostos, destacam-se como os mais estudados: os inibidores da COX-2; os inibidores do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e da tirosina quinase; os inibidores das metaloproteinases, e uma série de outros inibidores da angiogênese, dentre eles a talidomida. No presente estudo, com o objetivo primeiro de validar o modelo, foram usados: um inibidor da COX-2, o celecoxib; um inibidor do EGFR, o gefitinib; um inibidor da angiogênese, a talidomida, além do uso de um quimioterápico convencional, o paclitaxel, que serão discutidos a seguir.

5.2.1 Avaliação do efeito antitumoral do Celecoxib - Inibidor da COX-2.

Existem vastas evidências na literatura que sugerem um papel importante da COX-2 no câncer. Esta enzima, em condições fisiológicas, não está normalmente presente nos tecidos, embora ela seja rapidamente induzida por uma variedade de citocinas e agentes mitogênicos (LEVY et al., 1997). Na maioria das linhagens de tumores humanos usados em modelos experimentais, ocorre uma “up-regulation” da COX-2 na vasculatura preexistente adjacente ao tumor primário, nos vasos neoformados do tumor primário e nos vasos dos tumores metastáticos (SANO et al., 1995; TUCKER et al., 1999). Além disso, TSUJII et al., 1998 e MASFERRER et al., 2000, encontraram expressão aumentada de COX-2 no endotélio vascular e também nas células tumorais de humanos, o que despertou nestes autores a idéia de que os inibidores da COX-2 e de seus derivados (PGs) poderiam inibir a produção de fatores angiogênicos pelas células tumorais dos cânceres humanos. A inibição desta via poderia afetar a progressão tumoral por bloquear a formação de vasos sanguíneos mantenedores da viabilidade das células e do crescimento.

Masferrer et al. (2000) relataram o uso do celecoxib (inibidor seletivo da COX-2), em animais inoculados com linhagens do carcinoma pulmonar de Lewis e do carcinoma colônico humano. Esse estudo demonstrou um efeito antitumorígeno do celecoxib, com a inibição do crescimento tumoral e do número de metástases pulmonares. Os autores atribuíram estes resultados a uma atividade antiangiogênica da droga, uma vez que eles observaram um efeito antiangiogênico direto na vasculatura da córnea induzido pelo fator de crescimento fibroblástico (FGF). Os autores observaram ainda que a angiogênese induzida pelo FGF era dependente da expressão de COX-2. Isso fortaleceu a idéia da importância da COX-2 na geração de novos vasos para o suprimento tumoral. Esse trabalho criou a expectativa de que os inibidores seletivos da COX-2, como o celecoxib e outros, por sua ação antiangiogênica e antitumoral, poderiam ser usados com possibilidades de sucesso no tratamento de tumores que tivessem expressão aumentada de COX-2 em animais e em humanos.

DiPerna et al. (2003) demonstraram, em um modelo ortotópico de tumor pulmonar em camundongo com uma linhagem de adenocarcinoma de pulmão humano que expressava

COX-2, uma redução do volume do tumor primário e das metástases para linfonodos mediastinais na terceira e quarta semana pós-implante, nos animais tratados com celecoxib (25 mg/kg por dia). Os autores destacaram que o celecoxib não promoveu a regressão de uma massa tumoral pré-existente, mas impediu o crescimento tumoral, comparado com os animais não tratados. Com base nos resultados obtidos, os autores levantaram a possibilidade do uso dos inibidores da COX-2 para bloquear a progressão do tumor primário e das metástases em pacientes com adenocarcinoma de pulmão.

Mais recentemente, Sievers et al. (2005), usaram doses crescentes de celecoxib para avaliar um possível efeito dose-dependente em um modelo ortotópico de tumor de pulmão em camundongo com linhagem de adenocarcinoma de pulmão humano. Este estudo não mostrou benefício adicional com doses maiores da droga, embora tenha havido inibição do volume tumoral com as doses utilizadas.

No presente estudo, usou-se o celecoxib em um modelo de tumor de pulmão em rato com o carcinossarcoma de Walker para investigar um possível efeito antitumoral desta droga, através da avaliação do crescimento tumoral e da sobrevida dos animais. Nesse modelo foram utilizadas células do carcinossarcoma de Walker, por falta de linhagens celulares humanas no nosso laboratório, embora se sabendo que os animais inoculados com células do tumor de Walker no pulmão têm uma sobrevida muito curta em decorrência do crescimento tumoral acelerado. Há registros na literatura da expressão de Cox-2 pelo carcinoma pulmonar de Lewis (MASFERRER et al., 2000) e em linhagem de adenocarcinoma de pulmão humano (DIPERNA et al., 2003), embora não haja citação da expressão de Cox-2 pelo tumor de Walker. Todavia, o celecoxib e outras drogas foram utilizadas com o objetivo principal de validar o modelo em estudo.

No presente estudo não se observou redução do volume tumoral, nem aumento da sobrevida dos animais com o uso do celecoxib na dose de 15mg/kg/dia. Este resultado demonstra a ausência de ação antitumoral da droga, possivelmente decorrente da não expressão de COX-2 pelo tumor de Walker ou da grande agressividade biológica do mesmo, constatada pela pequena sobrevida dos animais (mediana de 11 dias). O aumento da dose do celecoxib para 30 e 60mg/kg/dia, no sentido de verificar se havia alguma resposta dose-dependente, não mostrou resultado positivo. O que se observou foi um

aumento da toxicidade da droga, com o surgimento de necrose intestinal por provável trombose e/ou isquemia mesentérica, culminando com a morte precoce da maioria dos animais.

Recentemente, vários autores relataram uma ocorrência maior de eventos cardiovasculares como isquemia e infarto do miocárdio em pacientes que usam celecoxib na dose de 200 e 400 mg duas vezes por dia, em relação ao placebo, de forma dose-dependente (SOLOMON et al., 2005; CALDWELL et al., 2006). Entretanto, encontrou-se somente uma publicação na literatura mostrando o evento necrose intestinal em ratos Wistar tratados com celecoxib após a indução de lesão gastrointestinal induzida por indometacina (LAUDANNO et al., 2000). Esses achados despertam a atenção para a probabilidade da ocorrência de efeitos adversos graves com o uso de doses altas dessa droga. Outros estudos são necessários para estabelecer se a expressão aumentada da COX-2 representa um alvo terapêutico para o uso dos inibidores da COX-2 no câncer humano.

5.2.2 Avaliação do efeito antitumoral da talidomida - inibidor da angiogênese.

A talidomida é uma droga que tem atividade analgésica, antiinflamatória, antiangiogênica e antitumoral contra tumores sólidos e outros, refratários a tratamentos convencionais, embora nem todas essas ações tenham mecanismos totalmente conhecidos.

O efeito antiangiogênico da talidomida foi demonstrado pela primeira vez por D'Amato et al. (1994) em modelo de angiogênese induzido pelo bFGF, implantado na forma de "pellet" em córnea de coelho. Neste modelo, a talidomida, administrada na dose de 200mg/kg, inibiu em 36% a neovascularização da córnea. Os autores postularam que a inibição da formação de novos vasos a partir dos brotos vasculares pré-existentes que ocorria na córnea pela ação da talidomida poderia também ocorrer durante o desenvolvimento fetal nas gestantes, sendo este o mecanismo responsável pelo bloqueio do crescimento dos membros nos recém-nascidos. Posteriormente, Kruse et al. (1998), demonstraram também inibição da neovascularização pela talidomida em modelo de angiogênese induzido pelo VEGF em córnea de coelho. Esses autores mostraram que a inibição da angiogênese pela talidomida decorria de um bloqueio da expressão de $\alpha_v\beta_3$

integrina induzida pelo bFGF e de $\alpha_v\beta_5$ integrina pelo VEGF, embora o mecanismo exato do efeito antiangiogênico desta droga ainda seja desconhecido.

Os resultados obtidos no presente trabalho revelam um efeito da talidomida no aumento da sobrevida dos animais. O grupo tratado com talidomida, na dose de 45mg/kg/dia, teve uma sobrevida significativamente maior que o grupo controle (sobrevida mediana do grupo da TLD-45 = $13\pm 0,45$ dias vs grupo controle = $11,00\pm 0,38$ dias). Muito embora o aumento do tempo de sobrevida ocorrido no grupo de animais tratados com TLD-45 tenha sido pequeno, com um incremento de somente dois dias na sobrevida mediana dos animais tratados, ainda assim a diferença em relação ao grupo controle foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). É importante salientar que dois dias de vida em roedores corresponde a dois meses no ser humano, o que não deixa de ser um aumento, ainda que pequeno, mas refletindo uma ação antitumoral da talidomida.

Nos animais tomografados e necropsiados no 5^o dia do implante tumoral, não se verificou redução do volume tumoral do grupo tratado com TLD-45 ($0,096\pm 0,026$ cm³) em relação ao controle ($0,090\pm 0,029$ cm³). A ausência de efeito da droga mensurado pela não redução do volume tumoral pode ser explicada pelo rápido crescimento do tumor, o qual no quinto dia do implante já apresentava um diâmetro maior de $0,657\pm 0,078$ cm. Isto é, provavelmente, decorrente do comportamento biológico agressivo do tumor de Walker (IWAMA DE MATOS et al., 1980).

O aumento da sobrevida nos animais tratados com talidomida pode não ter ocorrido pela inibição da angiogênese, embora um efeito antiangiogênico, por si só, possa ter sido suficiente para retardar o crescimento tumoral dos animais tratados. Bauer et al (1998), demonstraram que a talidomida não tinha efeito antiangiogênico em roedores, uma vez que estes animais não têm, nos seus microssomos hepáticos, a enzima citocromo P450 que lisa a talidomida no seu metabólito com ação antiangiogênica. Entretanto, essa demonstração foi feita em um modelo de angiogênese *in vitro*, usando secções de aorta torácica de rato, incubadas em meio de cultura com um fator de crescimento.

A ausência de inibição de angiogênese pela talidomida no modelo *in vitro* não pode ser extrapolada para o modelo *in vivo*, nem o resultado da inibição ou ausência de inibição da angiogênese para um tipo de tumor pode ser extrapolado para outro tumor, ou para

linhagens celulares diferentes de um mesmo tumor, por inúmeras razões que citaremos a seguir. Em primeiro lugar, no modelo de angiogênese *in vitro* ou *in vivo*, geralmente se usa somente uma substância angiogênica, como foi feito no modelo acima referido (BAUER et al., 1998). Além do mais, Belo et al. (2001), demonstraram, em roedores, que a talidomida inibiu a angiogênese induzida por esponja injetada no sc, mas não bloqueou a angiogênese do tumor de Ehrlich implantado também no sc do mesmo grupo de animais. Estes autores revelaram uma ação seletiva da talidomida na mesma espécie de animal e levantaram a hipótese de que, mais do que espécie-específica, a talidomida é tecido-específica. Em segundo lugar, no processo de angiogênese tumoral, embora em alguns casos possa estar envolvido somente um fator angiogênico (ARENBERG et al., 1996), na maioria das vezes múltiplos fatores angiogênicos diretos ou indiretos, liberados pelo tumor ou pelas células do hospedeiro, estão implicados no processo (ARENBERG et al., 1996). Em terceiro lugar, em duas linhagens de células tumorais oriundas de um mesmo tumor, cada uma pode expressar fatores angiogênicos diferentes, ou até mesmo uma delas não expressar qualquer substância angiogênica (KOTOH et al., 1999). Isso pode explicar porque, tanto em modelos experimentais quanto na clínica, animais ou pacientes com o mesmo tipo de tumor apresentam respostas antitumorais diversas, ou nenhuma resposta à terapia antiangiogênica com a talidomida (KOTOH et al., 1999; BELO et al., 2001; BLADE et al., 2001). Por fim, existem alguns trabalhos na literatura relatando o efeito antiangiogênico e/ou antitumoral da talidomida em alguns tumores em roedores, tipo melanoma, glioblastoma e linhagens de câncer de pulmão não pequenas células (PALENCIA et al., 2002; DECICCO et al., 2004).

Recentemente, Son et al. (2006) investigaram o mecanismo de ação antitumoral da talidomida em um modelo ortotópico de glioma em cérebro de rato e demonstraram uma diminuição significativa da angiogênese pela marcação da microvasculatura com o CD31. Os autores demonstraram também uma inibição da expressão do VEGF e do bFGF pela talidomida, que eles atribuíram ser responsável pela inibição da angiogênese e, conseqüentemente, do efeito antitumoral.

Em humanos, a talidomida tem sido usada no tratamento de pacientes com alguns tipos de tumores, como mieloma múltiplo refratário à quimioterapia convencional,

carcinoma de células renais em estágios avançados, astrocitoma e melanoma, obtendo-se resultados satisfatórios com percentuais variáveis de respostas parciais e estabilização da doença (EISEN et al., 2000; BLADE et al., 2001; PAWLAK e LEGHA, 2004). Os pacientes com mieloma múltiplo, além da estabilização da doença, têm obtido controle da dor, o que tem concorrido para uma melhora de sua qualidade de vida. Por isso, apesar da talidomida ser uma droga proscrita devido ao seu efeito teratogênico (focomelia), ela vem sendo seletivamente reintroduzida na oncologia para o tratamento dos tumores acima citados, bem como na prática clínica, sendo droga de escolha para o tratamento de várias afecções dermatológicas, que incluem o eritema nodoso da lepra, a doença do enxerto versus hospedeiro, a estomatite aftosa e o lupus eritematoso discóide (SHESKIN, 1965; VOGELSANG et al., 1986; ÖSTRAAT et al., 1992; TSENG et al., 1996).

Fine et al. (2000) mostraram que o uso clínico da talidomida em pacientes com astrocitomas ou gliomas recorrentes e refratários à radioterapia e a pelo menos dois regimes de quimioterapia, resultou em resposta parcial ou estabilização do tumor, por no mínimo oito semanas, em 44% dos pacientes. Os pacientes que tiveram estabilização do tumor apresentaram um pequeno aumento na sobrevida (mediana de 30 semanas) em relação aos que apresentaram progressão da doença (mediana de 22 semanas). Os autores atribuíram o efeito antitumoral da talidomida a uma ação antiangiogênica ou imunomoduladora, uma vez que eles não encontraram atividade citotóxica *in vitro* ou *in vivo* da droga.

Alguns estudos têm mostrado um efeito sinérgico ou a potencialização dos efeitos de drogas citotóxicas associadas com agentes antiangiogênicos em tumores sólidos (SHALINSKY et al., 1999; MALL et al., 2002). Shalinsky et al., em 1999, demonstraram que o uso do paclitaxel, quando feito isoladamente em animais com linhagens de células do câncer de pulmão não pequenas células resistentes à quimioterapia, não afetou o crescimento tumoral. Entretanto, o fez de forma significativa, quando associado ao inibidor da angiogênese. Estes resultados confirmam a hipótese de O'Reilley et al. (1996), corroborada depois por Boehm et al. (1997), que as células endoteliais do tumor e do hospedeiro não desenvolvem resistência a agentes antiangiogênicos.

Conquanto o mecanismo de ação da maioria dos agentes antiangiogênicos durante o processo de tumorigênese seja conhecido, muitos deles agem por mecanismos ainda não completamente elucidados. A talidomida, além de inibir a expressão do VEGF e do bFGF,

bloqueia a produção de TNF- α pelos macrófagos e modula a síntese de outras citocinas associadas com a neovascularização (SAMPAIO et al., 1991; LI et al., 2003; SON et al., 2006). Foi mostrado *in vitro* que a talidomida inibe a síntese de interferon- α pelas células mononucleares do sangue periférico e aumenta a síntese de interleucina 4 e 5 (MCHUGH et al., 1995).

Nogueira et al. (1994), relataram que a expressão de moléculas de adesão (especialmente ICAM-1 e selectina-E, que têm uma função importante na indução da angiogênese pelo recrutamento de células inflamatórias) é também modulada pela talidomida. Além disso, os leucócitos e, principalmente, os macrófagos, juntamente com as células tumorais, liberam fatores que ativam e estimulam as células endoteliais. Estas células, uma vez ativadas, induzem a síntese de mediadores inflamatórios como prostaglandinas e óxido nítrico (NO), responsáveis pela vasodilatação, etapa inicial que precede a angiogênese tumoral (FUKUMURA e JAIN, 1998). A talidomida inibe seletivamente a síntese de TNF α por aumentar a degradação do seu RNAm e reduz a produção de NO em ratos (LOPEZ-TALAVERA et al., 1996). Baseado nisso, especula-se que no modelo de tumor de pulmão ora apresentado, a talidomida possa ter aumentado a sobrevivência dos animais, inibindo a angiogênese ou modulando a expressão de citocinas e de mediadores inflamatórios, ou ainda, atuando por outros mecanismos. Esta droga pode interferir na tumorigênese inibindo ou bloqueando a expressão de citocinas pró-inflamatórias e/ou fatores de crescimento tumoral com ação autócrina ou parácrina, inibindo assim a proliferação das células neoplásicas, retardando o crescimento tumoral (SAMPAIO et al., 1991).

O efeito antitumoral da talidomida nesta pesquisa pode ainda ter sido resultante da modulação do sistema imune, como já foi demonstrado experimentalmente em ratos Wistar, pela “downregulation” do TNF- α (ÖSTRAAT et al., 1992; KLAUSNER et al., 1996; RAJE et al., 2002). Na literatura, não há relatos do uso da talidomida em modelos de tumor com o carcinossarcoma de Walker, mesmo já tendo sido demonstrado seu efeito antitumoral em ratos e em camundongos inoculados com outras linhagens de células tumorais (DECICCO et al., 2004; SON et al., 2006).

Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram os da literatura, embora o efeito antitumoral da talidomida usada como monoterapia tenha sido fugaz, provavelmente

pelo rápido crescimento tumoral dependente do comportamento biológico agressivo do tumor de Walker, quando todos os animais evoluíram inexoravelmente para a morte em um período de tempo muito curto. Contudo, esses resultados, respaldados pela literatura, nos permitem afirmar que o uso da talidomida e de seus análogos destituídos de efeitos teratogênicos, de forma isolada ou associada a agentes citotóxicos, tem uma perspectiva futura promissora no tratamento de tumores sólidos avançados.

5.2.3 Avaliação do efeito antitumoral do gefitinib - inibidor de tirosina quinase do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR).

A resposta antitumoral do gefitinib está relacionada não somente com o nível de expressão do EGFR, mas também ao seu estado de atividade, uma vez que a inibição do crescimento tumoral tem sido demonstrada experimentalmente em tumores que apresentam expressão alta, moderada ou baixa do EGFR (ARTEAGA, 2002; CIARDIELLO et al., 2000). Por outro lado, a falta de resposta de alguns tumores ao gefitinib parece estar ligado a um mecanismo intrínseco de ativação persistente da sinalização da quinase do receptor EGFR (MAGNE et al., 2002).

A atividade antitumoral do gefitinib parece estar associada a uma inibição da angiogênese tumoral, conforme mostraram Ciardiello et al. (2001) estudando o seu efeito em várias linhagens de carcinoma humano (côlon, mama, ovário e estômago) inoculadas no subcutâneo de camundongos, que expressavam o EGFR. Esse estudo mostrou no grupo de animais tratados com gefitinib uma inibição do crescimento tumoral associada com a diminuição da expressão do VEGF, bFGF e TGF α . Este efeito foi potencializado nos animais submetidos ao tratamento combinado de gefitinib com paclitaxel. Tais resultados demonstraram, de forma elegante, que o efeito antitumoral do gefitinib estava relacionado com a inibição da síntese local de fatores de crescimento autócrinos e parácrinos ligados a angiogênese. Isso ficou caracterizado pela regressão tumoral, inibição da expressão do VEGF, bFGF e TGF e da neovascularização de todos os animais tratados com gefitinib, potencializado pela associação do paclitaxel. Hirata et al., (2002) demonstraram também inibição da angiogênese induzida por FGF em modelo de córnea em camundongos tratados com gefitinib e observaram uma redução da expressão dos fatores angiogênicos VEGF e

IL-8. Com estes resultados, os autores aventaram a possibilidade do efeito antitumoral do gefitinib ser mediado, pelo menos em parte, pela inibição da angiogênese tumoral por ação direta nas células endoteliais que expressam o EGFR.

Wakeling et al. (2002), em outro estudo experimental com linhagens celulares de carcinoma humano inoculados no sc de camundongos e tratados com doses crescentes de gefitinib (12.5, 50 e 200 mg/kg/dia, via oral), mostraram inibição do crescimento tumoral de forma dose-dependente. Durante o tratamento, os animais não desenvolveram resistência, embora alguns tumores voltassem a crescer com a retirada da droga.

No presente estudo, não se observou uma redução do volume do tumor no 5º dia do implante tumoral nos animais tratados gefitinib, na dose de 25mg/kg/dia, porém, verificou-se um aumento significativo da sobrevida em relação ao controle (sobrevida mediana do grupo da GFB-25 = $13 \pm 0,47$ dias vs grupo controle = $11,00 \pm 0,38$ dias). O curto período de sobrevida dos animais inoculados com o tumor de Walker, menos de duas semanas, não permitiu a realização da avaliação semanal do volume tumoral com TCAR para monitorar o crescimento tumoral, como foi feita em outros estudos (CIARDIELLO et al., 2001; WAKELING et al., 2002). Entretanto, o aumento na sobrevida dos animais reflete uma ação antitumoral do gefitinib nesse modelo de tumor.

Não há estudos na literatura sobre a expressão do EGFR no tumor de Walker, nem mesmo com o uso de inibidores do EGFR-TK em modelos experimentais com esse tumor. Portanto, o presente trabalho é o primeiro que mostra uma ação antitumoral do gefitinib no tumor de Walker em modelo de tumor de pulmão. O estudo histopatológico constatou a presença de mais necrose tumoral no grupo de animais tratados que no controle, o que pode ter sido pela inibição da angiogênese, um dos mecanismos de ação antitumoral do gefitinib, uma vez que a inibição da angiogênese nos tumores sólidos geralmente aumenta a necrose tumoral, conforme demonstrado por Shalinsky et al. (1999). Observou-se ainda alto índice de apoptose, que também tem sido vista nos tumores que expressam EGFR e são tratados como inibidores do EGFR tirosina quinase. A ausência de resposta antitumoral no grupo de animais tratados com gefitinib associado com talidomida pode ser explicada por uma possível ação antagonica entre as duas drogas.

Vários estudos clínicos têm revelado o efeito antitumoral do gefitinib em câncer de pulmão humano e outros tumores. Dois estudos clínicos de fase II (IDEAL 1 e IDEAL 2), incluindo pacientes com câncer de pulmão que não responderam a dois ou mais esquemas de quimioterapia contendo platina e docetaxel, foram randomizados para receberem gefitinib 250 ou 500mg por dia, com o objetivo de avaliar a resposta da droga. Estes estudos mostraram atividade do gefitinib em pacientes com CNPC de pulmão pré-tratados com quimioterapia, com resposta objetiva em 11,8% e melhora dos sintomas em 43% dos pacientes, no grupo de 250 mg dia (FUKUOKA et al., 2002; KRIS et al., 2002). Estes estudos demonstraram ainda que mulheres não fumantes e portadoras de carcinoma bronquioloalveolar apresentaram melhor resposta, sendo, portanto, um fator de bom prognóstico para resposta ao gefitinib no CNPC de pulmão. Outros estudos clínicos com agentes anti-EGFR mostraram que os pacientes com alta incidência de rash cutâneo são os que respondem melhor ao tratamento (CLARK et al., 2003). Esses resultados permitiram a aprovação e o registro do gefitinib no Japão (2002) e nos Estados Unidos (2003), como terapêutica de terceira linha para o CNPC de pulmão, sendo o primeiro agente alvo antitumoral testado clinicamente (JANMAAT e GIACCONE, 2003).

Em 2003 foram concluídos dois outros grandes estudos randomizados fase III (Iressa NSCLC Trial Assessing Combination Treatment 1 - INTACT1; Iressa NSCLC Trial Assessing Combination Treatment 2 – INTACT2), com o uso de gefitinib combinado com diferentes esquemas de quimioterapia (GIACCONE et al., 2004; HERBST et al., 2004). Em ambos, os pacientes eram portadores de CNPC de pulmão em estágios avançados e virgens de tratamento. No INTACT1, os pacientes receberam quimioterapia com esquema de cisplatina-gemcitabina com placebo ou gefitinib (250 ou 500 mg), e no INTACT2, carboplatina-paclitaxel com placebo ou gefitinib (250 ou 500 mg). Em nenhum dos estudos se atingiram os objetivos que tiveram como metas finais: melhora da sobrevida, tempo de sobrevida sem progressão da doença, resposta objetiva do tumor e qualidade de vida. No entanto, os estudos confirmaram a segurança e a tolerabilidade do gefitinib, com perfil de toxicidade comparável ao grupo controle, com exceção das reações de pele e diarreia observadas nos pacientes que receberam a droga. Com os resultados dos estudos clínicos fase II e III pôde-se observar que os tumores pré-tratados com quimioterapia são mais

sensíveis aos EGFR-TKIs, como demonstrado nos estudos do IDEAL1 e IDEAL2, do que os tumores virgens de tratamento (INTACT1 e INTACT2).

Ainda se fazem necessários outros estudos para estabelecer a melhor estratégia de tratamento com o gefitinib para pacientes com CNPC de pulmão e identificar subgrupos de pacientes que possam se beneficiar com o uso desta droga, embora, já tenha sido demonstrado que mulheres não fumantes portadoras de carcinoma bronquioloalveolar e pacientes com mutação do EGFR, apresentam melhor resposta terapêutica (FUKUOKA et al., 2002; KRIS et al., 2002; NIHO et al., 2006). Em um estudo recente de fase II, Niho et al. (2006), usaram o gefitinib (250mg/dia) como monoterapia em 40 pacientes com câncer de pulmão não pequenas células avançado e mostraram boa atividade da droga, com uma taxa de resposta de 30%, estabilização da doença em 6 e resposta parcial (RP) em 4 casos que expressavam o EGFR. Estudos pré-clínicos têm indicado que o gefitinib pode potencializar a eficácia antitumoral de drogas citotóxicas (CIARDIELLO et al., 2001). Entretanto, estudos clínicos, apesar de mostrarem uma toxicidade tolerável do gefitinib combinado com agentes citotóxicas, não têm evidenciado benefício adicional na sobrevida ou no tempo de progressão da doença, com a exceção do subgrupo de pacientes portadores de adenocarcinoma (SIROTNAK et al., 2000; GIACCONE et al., 2004; HERBST et al 2004). Outras estratégias de tratamento, que incluem a combinação de anti-EGFR, associado com um anticorpo monoclonal, trastuzumab (Herceptin[®]), anti-ErbB-2, pela inibição simultânea do EGFR e ErbB-2, têm demonstrado uma ação sinérgica tanto in vitro, em linhagens celulares de câncer de mama, quanto em estudos clínicos (NORMANNO et al., 2002). Contudo, os resultados clínicos da ação isolada ou combinada de agentes alvos com drogas citotóxicas convencionais ainda não são os desejados e não têm reproduzido sempre os resultados experimentais. A seleção de pacientes baseada em marcadores moleculares e o surgimento de novas moléculas alvo-direcionadas, quem sabe, possam, no futuro, ser uma luz para o controle do câncer.

5.2.4 Avaliação do efeito antitumoral do paclitaxel - quimioterápico convencional.

Riondel et al., em 1986, relataram um dos primeiros estudos com o paclitaxel em modelos experimentais de camundongos atímicos, inoculados com linhagens de células

humanas de vários tumores primários, incluindo o de ovário e o de pulmão. Esses autores demonstraram uma atividade antitumoral da droga, com o retardo do crescimento tumoral em todos os tumores, e, baseado nos resultados obtidos, sugeriram o uso clínico da droga.

Mais recentemente, Trail et al. (1999), demonstraram a atividade antitumoral do paclitaxel em modelos experimentais de tumor em camundongo com linhagens de carcinoma humano (côlon, pulmão e próstata), sendo esta ação potencializada pela doxorubicina, que teve em efeito desprezível quando usada isoladamente. Song et al. (2001), em um modelo experimental de metástase pulmonar em camundongo, demonstraram também com o uso do paclitaxel, redução do tamanho dos tumores em 75%, sendo este efeito potencializado com a associação do suramin, um inibidor do fator de crescimento do fibroblasto ácido (aFGF) e básico (bFGF).

Nosso trabalho foi o primeiro a mostrar um efeito antitumoral do paclitaxel em modelo de tumor de pulmão com o carcinosarcoma de Walker, embora, Oliveira et al., em 2003, já tenha usado essa droga em modelo de tumor de estômago em rato com a mesma neoplasia e demonstrado atividade antitumoral da droga pelo aumento significativo da sobrevida dos animais. Chan et al. (2002), usaram o docetaxel, um derivado do taxane, em modelo ortotópico de pulmão em ratos imunossuprimidos por irradiação (400 cGY no corpo inteiro), mas inoculados com uma linhagem de adenocarcinoma de pulmão humano por via *ib*. Este estudo mostrou um aumento da sobrevida dos animais, inibição das metástases e aumento da apoptose em relação ao controle. No nosso modelo, o uso do paclitaxel, mostrou resultado semelhante, com aumento significativo da sobrevida dos animais.

Os bons resultados obtidos como o uso clínico do paclitaxel em combinação com cisplatina ou carboplatina, têm justificado a utilização destes regimes como esquemas de primeira linha do tratamento do câncer de pulmão. Bonomi et al. (2000), em um estudo clínico multicêntrico com 599 pacientes portadores de câncer de pulmão não pequenas células avançado, randomizados para receber em um braço, cisplatina e paclitaxel, e no outro, cisplatina e etoposide, observaram uma sobrevida superior no regime combinado de cisplatina com paclitaxel. A sobrevida mediana global foi de 9,9 meses no braço do paclitaxel versus 7,6 meses no braço do etoposide, sendo significativamente superior nos estágios IIIB e IV e, assim, justificando-se a substituição do último pelo primeiro regime,

que passou a ser uma das combinações de escolha no tratamento do câncer de pulmão. Schiller et al. (2002), realizaram outro estudo randomizado de pacientes com câncer de pulmão não pequenas células avançado para determinar se um dos três regimes de quimioterapia à base de cisplatina ou carboplatina (cisplatina e gemcitabina, cisplatina e docetaxel, ou carboplatina e paclitaxel) era superior ao tratamento combinado de cisplatina e paclitaxel. O estudo incluiu 1155 pacientes e demonstrou que a sobrevida não foi diferente entre os pacientes que receberam cisplatina e paclitaxel, em relação aos outros três regimes, concluindo não haver vantagens do uso destes regimes sobre o do paclitaxel.

O presente estudo demonstrou um aumento significativo (teste de *Log Rank*: $p=0,0001$) na sobrevida dos animais tratados com paclitaxel (29dias), em relação ao controle (11dias), confirmando-se uma excelente resposta antitumoral, consistente com a experiência clínica e experimental com o uso dessa droga (BONOMI et al., 2000; SONG et al., 2001; ZHANG, 2005).

Os resultados observados demonstraram a exequibilidade do modelo de tumor em pulmão de ratos implantado no lobo inferior esquerdo, através da instilação de células por via intrabrônquica, e abre caminho para o desenvolvimento posterior de um modelo ortotópico de tumor de pulmão em ratos imunossuprimidos, com a inoculação de células tumorais humanas.

A eficácia da TCAR na detecção do tumor permitiu a avaliação de resposta *in vivo* de drogas nos tumores situados no pulmão. A progressão tumoral não pôde ser documentada neste modelo em razão do tumor de Walker ter um comportamento biológico muito agressivo, que levou ao óbito a quase totalidade dos animais, já na segunda semana de seguimento, não dando, assim, a oportunidade da repetição da tomografia. Este estudo abre a perspectiva do uso da TCAR, um exame não invasivo, para o diagnóstico e o monitoramento da progressão tumoral *in vivo* em estudos longitudinais de animais tratados com drogas anticâncer de pulmão.

6 CONCLUSÃO

1. O modelo de tumor no pulmão por implantação de células tumorais por via intrabrônquica mostrou-se viável, com alto índice de pega, trauma mínimo e mortalidade cirúrgica desprezível, de execução simples e fácil reprodutibilidade.
2. A tomografia computadorizada de alta resolução revelou-se um método de imagem de alta acurácia no diagnóstico, localização e mensuração das lesões tumorais, credenciando-se para a monitorização de crescimento tumoral nesse modelo.
3. O modelo mostrou-se eficaz para a avaliação de atividade antitumoral de drogas antineoplásicas como o paclitaxel, antiangiogênicas como a talidomida, e inibidores de tirosina quinase do receptor do fator de crescimento epidérmico como o gefitinib.

7 REFERÊNCIAS

ACHIWA, H.; YATABEM Y.; HIDA, Y.; KUROSHI, T.; KOZAKI, K-I.; NAKAMURA, S.; OGAWA, M.; SUGIURA, T.; MITSUDOMI, T.; TAKAHASHI, T. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase 2 expression in primary, resected lung adenocarcinoma. **Clin. Cancer Res.**, v. 5, p. 1001-1005, 1999.

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

ARRIAGADA, R.; BERGMAN, B.; LE CHEVALIER, T.; PIGNON, J. P. Cisplatin-Based Adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 350, p. 351-360, 2004.

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

ARTEAGA, C. L.; JOHNSON, D. H. Tyrosine kinase inhibitors-ZD1839 (Iressa). **Curr. Opin. Oncol.**, v. 13, p. 491-498, 2001.

ARTEAGA, C. L. Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? **Oncologist**, v. 7, suppl. 4, p. 31-39, 2002.

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

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

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

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

BONOMI, P.; KIM, K. M.; FAIRCLOUGH, D.; CELLA, D.; KUGLER, J.; ROWINSKY, E.; JIROUTEK, M.; JOHNSON, D. Comparison of survival and quality of life in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with two dose levels of paclitaxel combined with cisplatin versus etoposide with cisplatin: results of an Eastern Cooperative Oncology Group Trial. **J. Clin. Oncol.**, v. 18, p. 623-631, 2000.

BONOMI, P. Matrix metalloproteinases and matrix metalloproteinase inhibitors in lung cancer. **Semin. Oncol.**, v. 29, p. 78-86, 2002.

BREMNES, R. M.; VEVE, R.; HIRSCH, F. R.; FRANKLIN, W. A. The E-cadherin cell-cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasis, and prognosis. **Lung Cancer**, v. 36, p. 115-124, 2002.

CALDWELL, B.; ALDINGTON, S.; WEATHERALL, M.; SHIRTCLIFFE, P.; BEASLEY, R. Cardiovascular events and celecoxib: a systematic review and meta-analysis. **J. R. Soc. Med.**, v. 99, p. 132-140, 2006.

CALVO, B.; CASKEY, L.; EARP, H. Real-time fluorescent quantitative PCR reveals increased HER2, HER3, and unchanged HER1 (EGFR) m RNA expression levels in colon carcinomas. **Proc. Am. Assoc. Cancer Res.**, v. 7, p. 3761s, 2002.

CAPELOZZI, V.L. Anatomia patológica do câncer do pulmão. In: ZAMBONI, M.; CARVALHO, W.R. **Câncer do pulmão**. 1st ed. São Paulo: Editora Atheneu, cap. 4, p. 47-68, 2005.

CARNEY, D. N. Lung cancer-time to move on from chemotherapy. **N. Engl. J. Med.**, v. 346, p. 126-128, 2002.

CARPENTER, G. Employment of the epidermal growth factor receptor in growth factor-independent signaling pathways. **J. Cell Biol.**, v. 146, p. 697-702, 1999.

CASTELAO, J. E.; BART III, R. D.; DIPERNA, C. A.; SIEVERS, E. M.; BREMNER, R. M. Lung cancer and cyclooxygenase-2. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 76, p. 1327-1335, 2003.

CHAN, D. C.; EARLE, K. A.; ZHAO, T. L.; HELFRICH, B.; ZENG, C.; BARON, A.; WHITEHEAD, C. M.; PIAZZA, G.; PAMUKCU, R.; THOMPSON, W. J.; ALILA, H.; NELSON, P.; BUNN, P. A. Exisulind in combination with docetaxel inhibits growth and metastasis of human lung cancer and prolongs survival in athymic nude rats with orthotopic lung tumors. **Clin. Cancer Res.**, v. 8, 904-912, 2002.

CHEN, B.; JOHANSON, L.; WIEST, J. S.; ANDERSON, M. W.; YOU, M. The second intron of the K-ras gene contains regulatory elements associated with mouse lung tumor susceptibility. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 1589-1593, 1994.

CIARDIELLO, F.; CAPUTO, R.; BIANCO, R.; DAMIANO, V.; POMATICO, G.; DE PLACIDO, S.; BIANCO, A. R.; TORTORA, G.. Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. **Clin. Cancer Res.**, v. 6, p. 2053-2063, 2000.

CIARDIELLO, F.; CAPUTO, R.; BIANCO, R.; DAMIANO, V.; FONTANINI, G.; CUCCATO, S.; DE PLACIDO, S.; BIANCO, A. R.; TORTORA, G. Inhibition of growth factor production and angiogenesis in human cancer cells by ZD1839 (Iressa), a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. **Clin. Cancer Res.**, v. 7, p. 1459-1465, 2001.

CIARDIELLO, F.; TORTORA, G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. **Clin. Cancer Res.**, v. 7, p. 2958-2970, 2001.

CLARK, G. M.; PÉREZ-SOLER, R.; SIU, L. L.; et al. Rash severity is predictive of increased survival with erlotinib HCl. **Proc Am Soc Clin Oncol.**, 22:786a, 2003.

CORRAL, L. G.; HASLETT, P. A.; MULLER, G. W.; CHEN, R.; WONG, L. M.; OCAMPO, C. J.; PATTERSON, R. T.; STIRLING, D. I.; KAPLAN, G. Differential cytokine modulation and T cell activation by 2 distinct classes of thalidomide analogues that are potent inhibitors of TNF- α . **J. Immunol.**, v. 163, n. 1, p. 380-386, 1999.

CORRAL, L. G.; KAPLAN, G. Immunomodulation by thalidomide and thalidomide analogues. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 58, Suppl. 1, p. I107-I113, 1999.

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

DALIANI, D. D.; PAPANDREOU, C. N.; THALL, P. F.; WANG, X.; PEREZ, C.; OLIVA, R.; PAGLIARO, L.; AMATO, R. A pilot study of thalidomide in patients with progressive metastatic renal cell carcinoma. **Cancer**, v. 95, p. 758-765, 2002.

DECICCO, K.L.; TANAKA, T.; ANDREOLA, F.; DE LUCA, L.M. The effect of thalidomide on non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines: possible involvement in the PPARgamma pathway. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 10, p.1805-12, 2004.

DE CLERCK, N. M.; MEURRENS, K.; WEILER, H.; VAN DYCK, D.; VANHOUTTE, G.; TERPSTRA, P.; POSTNOV, A.A. **Neoplasia**, v. 6, p. 374 – 379, 2004.

DIPERNA, C. A.; BART, R. D.; SIEVERS, E. M.; MA, Y.; STARNES, V. A.; BREMNER, R. M. Cyclooxygenase-2 inhibition decreases primary and metastatic tumor burden in a murine model of orthotopic lung adenocarcinoma. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 126, p. 1129-1133, 2003.

DOLL, S. R. Smoking and lung cancer. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 162, p. 4-6, 2000.

DOLL, R.; PETO, R.; BOREHAM, J.; SUTHERLAND, I. Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. **BMJ**, v. 328, p. 1519, 2004.

DORNELAS, C.A.; ALMEIDA, P. R. C.; NASCIMENTO, G.L.; LIMA, E.B.; MORAES, M.O. Modelo experimental do carcinossarcoma 256 de Walker em bexiga de ratos. **Acta. Cir. Bras.**, v.21, n.1, p. 38-42, 2006.

DRACH, J.; KAUFMAN, H.; WOEHRER, S.; CHOTT, A.; ZIELINSKI, C.; RADERER, M. Durable remissions after rituximab plus thalidomide for relapsed/refractory mantle cell lymphoma. **Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.**, v. 23, p. 576, 2004.

DREDGE, K.; MARRIOTT, J.; MACDONALD, C.; MAN, H. W.; CHEN, R.; MULLER, G. W.; STIRLING, D.; DALGLEISH, A. G. Novel thalidomide analogues display anti-angiogenic activity independently of immunomodulatory effects. **Br. J. Cancer**, v. 87, n. 10, p. 1166-1172, 2002.

DUBOIS, R. N.; ABRAMSON, S. B.; CROFFORD, L.; GUPTA, R. A.; SIMON, L. S.; VAN DE PUTTE, L. B.; LIPSKY, P. E. Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB J.**, v. 12, p. 1063-1073, 1998.

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

EHRHARDT, A.; BARTELS, T.; GEICK, A.; KLOCKE, R.; PAUL, D.; HALTER, R. Development of pulmonary bronchiolo-alveolar adenocarcinomas in transgenic mice overexpressing murine c-myc and epidermal growth factor in alveolar type II pneumocytes. **Br. J. Cancer**, v. 84, p. 813-818, 2001.

EISEN, T.; BOSHOFF, C.; MAK, I.; SAPUNOR, F.; VAUGHAN, M. M.; PYLE, L.; JOHNSTON, S. R. D.; AHERN, R.; SMITH, I. E.; GORE, M. E. Continuous low dose thalidomide: a phase II studying advanced melanoma, renal cell, ovarian and breast cancer. **Br. J. Cancer**, v. 82, p. 812-817, 2000.

FIDLER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. **Nat. Rev. Cancer**, v. 3, n. 6, p. 453-458, 2003.

FIGG, W. D.; DAHUT, W.; DURAY, P.; HAMILTON, M.; TOMPKINS, A.; STEINBERG, S. M.; JONES, E.; PREMKUMAR, A.; LINEHAN, W. M.; FLOETER, M. K.; CHEN, C. C.; DIXON, S.; GHOBRIAL, I. M.; RAJKUMAR, S. V. Management of thalidomide toxicity. **J. Supp. Oncol.**, v. 1, p. 194-205, 2003.

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

FINN, R. S.; SLAMON, D. J. Monoclonal antibody therapy for breast cancer: herceptin. **Cancer Chemother. Biol. Response Modif.**, v. 21, p. 223-233, 2003.

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

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

FOLKMAN, J. Fundamental concepts of the angiogenic process. **Curr. Mol. Med.**, v. 3, n. 7, p. 643-651, 2003.

FORM, D. M.; AUERBACH, R. PGE2 and angiogenesis. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, n. 172, p. 214-218, 1983.

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

FUKUOKA, M.; YANO, S.; GIACCONE, G.; et al. Final results from a phase II trial of ZD 1839 (Iressa) for patients with advanced non-small cell lung cancer (IDEAL 1). **Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.**, v. 21, p. 298a, 2002.

GALLIGIONI, E.; FERRO A. Angiogenesis and antiangiogenic agents in non-small cell lung cancer. **Lung Cancer**, v. 34, Suppl. 4, p. 3-7, 2001.

GEICK, A.; REDECKER, P.; EHRHARDT, A.; KLOCKE, R.; PAUL, D.; HALTER, R. Uteroglobin promoter-targeted c-MYC expression in transgenic mice cause hyperplasia of Clara cells and malignant transformation of T-lymphoblasts and tubular epithelial cells. **Transg. Res.**, v. 10, p. 501-511, 2001.

GHOBRIAL, I.M.; RAJKUMAR, S.V. Management of thalidomide toxicity. **J. Support Oncol.**, v. 1, p. 194-205, 2003.

GIACCONE, G.; HERBST, R.S.; MANEGOLD, C.; SCAGLIOTTI, G.; ROSEL, R.; MILLER, V. et al. Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 1. **J.Clin. Oncol.**, v. 22, p. 777-84, 2004.

GOMES-NETO, A. **Estabelecimento e validação do modelo de tumor de pulmão em rato com o carcinossarcoma de Walker – Avaliação do efeito antitumoral da talidomida.** Fortaleza, 2001. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Fisiologia e Farmacologia - Universidade Federal do Ceará, p. 52.

GOMES-NETO, A.; PESSOA, B. B.G. P.; AGUIAR, S. A.; FURTADO, B. M.; MORAES, M. O.; RIBEIRO, R. A. Modelo de tumor de pulmão em rato com o carcinossarcoma de Walker. **Acta Cir. Bras.**, v. 17, n. 1, p. 12-22, 2002.

GOLDMAN, E. The growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to the vascular system. **Lancet**, v. 2, p. 1236-1240, 1907.

GRESCHUS, S.; KIESSLING, F.; LICHY, M.P.; MOLL, J.; MUELLER, M.M.; SAVAI, R.; ROSE, F.; RUPPERT, C.; GUNTHER, A.; LUECKE, M.; FUSENIG, N.E.; SEMMLER, W.; TRAUPE, H. Potential applications of flat-panel volumetric CT in morphologic and functional small animal imaging. **Neoplasia**, v. 7, n. 8, p. 730-40, 2005.

GRAUS-PORTA, D.; BEERLI, R. R.; DALY, J. M HYNES, N. E. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. **EMBO J.**, v. 16, n. 7, p. 1647-1655, 1997.

GRAZIANO, S. L.; GAMBLE, G. P.; NEWMAN, N. B.; ABBOTT, L. Z.; ROONEY, M.; MOOKHERJEE, S.; LAMB, M. L.; KOHMAN, L. J.; POIESZ, B. J. Prognostic significance of K-ras codon 12 mutations in patients with resected stage I and II non-small-cell lung cancer. **J. Clin. Oncol.**, v. 17, p. 668-675, 1999.

HACKEL, P. O.; ZWICK, E.; PRENZEL, N.; ULLRICH, A. Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 11, n. 2, p. 184-189, 1999.

HALMOS, G.; SCHALLY, A. V. Reduction in receptors for bombesin and epidermal growth factor in xenografts of human small-cell lung cancer after treatment with bombesin antagonist RC-3095. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 956-960, 1997.

HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, v. 86, p. 353-364, 1996.

HANAWALT, P. C.; FORD, J. M.; LLOYD, D. R. Functional characterization of global genomic DNA repair and its implications for cancer. **Mutat. Res.**, v. 544, p. 107-114, 2003.

HARRIS, R. E.; ROBERTSON, F. M.; ABOU-ISSA, H. M.; FARRAR, W. B.; BRUEGGEMEIER, R. Genetic induction and up-regulation of cyclooxygenase (COX) and aromatase (CYP19): an extension of the dietary fat hypothesis of breast cancer. **Med. Hypotheses**, v. 52, p. 292-293, 1999.

HARRIS, R. E.; ALSHAFIE, G. A.; ABOU-ISSA, H.; SEIBERT, K. Chemoprevention of Breast Cancer in Rats by Celecoxib, a Cyclooxygenase 2 Inhibitor. **Cancer Res.**, v. 60, p. 2101-2103, 2000.

HERBST, R. S.; GIACCONE, G.; SCHILLER, J. H.; NATALE, R. B.; MILLER, V.; MANEGOLD, C.; SCAGLIOTTI, G.; ROSELL, R.; OLIFF, I.; REEVES, J. A.; WOLF, M. K.; KREBS, A. D.; AVERBUCH, S. D.; OCHS, J. S.; GROUS, J.; FANDI, A.; JOHNSON, D. H. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 2. **J. Clin. Oncol.**, v. 22, n. 5, p. 785-794, 2004.

HERSCHMAN, H. R. Regulation of prostaglandin synthase-1 and prostaglandin synthase-2. **Cancer Metast. Rev.**, v. 13, p. 241-256, 1994.

HIRATA, T.; FUKUSE, T.; NAIKI, H.; WADA, H. Expression of E-cadherin and lymph node metastasis in resected non-small-cell lung cancer. **Clin. Lung Cancer**, v. 3, p. 134-140, 2001.

HIRATA, A.; OGAWA, S.; KOMETANI, T. et al. ZD1839 (Iressa) induces antiangiogenic effects through inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. **Cancer Res.**, v. 62, p. 2554-2560, 2002.

HOFFMAN, R. M. Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic. **Investig. New Drugs**, v. 17, p. 343-359, 1999.

HOWARD, R. B.; CHU, H.; ZELIGMAN, B. E.; MARCELL, T.; BUNN, P. A.; MCLEMORE, T. L.; MULVIN, D. W.; COWEN, M. E.; JOHNSTON, M. R. Irradiated nude rat model for orthotopic human lung cancers. **Cancer Res.**, v. 51, p. 3274-3280, 1991.

HOWARD, R. B.; MULLEN, J. B. M.; PAGURA, M. E.; JOHNSTON, M. R. Characterization of a highly metastatic, orthotopic lung cancer model in the nude rat. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 17, p. 157-162, 1999.

HUANG, M.; STOLINA, M.; SHARMA, S.; MAO, J. T.; ZHU, L.; MILLER, P. W.; WOLLMAN, J.; HERSCHEMAN, H.; DUBINETT, S. M. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. **Cancer Res.**, v. 58, p. 1208-1216, 1998.

HUANG, S. M.; HARARI, P. M. Epidermal growth factor receptor inhibition in cancer therapy: Biology, rationale and preliminary clinical results. **Invest. New Drugs**, v. 1, p. 259-269, 1999.

HURWITZ, H.; FEHRENBACHER, L.; NOVOTNY, W.; CARTWRIGHT, T.; HAINSWORTH, J.; HEIM, W.; BERLIN, J.; BARON, A.; GRIFFING, S.; HOLMGREN, E.; FERRARA, N.; FYFE, G.; ROGERS, B.; ROSS, R.; KABBINAVAR, F. Bevacizumab

plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 350, n. 23, p. 2335-2342, 2004.

IHRIE, R. A.; RECZEK, E.; HORNER, J. S.; KHACHATRIAN, L.; SAGE, J.; JACKS, T.; ATTARDI, L. D. Perp is a mediator of p53-dependent apoptosis in diverse cell types. **Curr. Biol.**, v. 13, p. 1985-1990, 2003.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro. **INCA/MS**, 2000.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2006: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, **INCA/MS**, 2005.

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

JANMAAT, M. L.; KRUYT, F. A.; RODRIGUEZ, J. A.; GIACCONE, G. Response to epidermal growth factor receptor inhibitors in non-small cell lung cancer cells: limited antiproliferative effects and absence of apoptosis associated with persistent activity of extracellular signal-regulated kinase or Akt kinase pathways. **Clin. Cancer Res.**, v. 9, n. 6, p. 2316–2326, 2003.

JANMAAT, M. L.; GIACCONE, G. Small-Molecule Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors. **Oncologist**, v. 8, n. 6, p. 576–586, 2003.

JEMAL, A.; TIWARI, R. C.; MURRAY, T.; GHAFOR, A.; SAMUELS, A.; WARD, E.; FEUER, E. J.; THUN, M. J. Cancer statistics. **CA Cancer J. Clin.** v. 54, p. 8-29, 2004.

JIANG, S. X.; SATO, Y.; KUWAO, S.; KAMEYA, T. Expression of bcl-2 oncogene protein is prevalent in small cell lung carcinomas. **J. Pathol.**, v. 177, p. 135-138, 1995.

JOHNSON, B. E.; RUSSELL, E.; SIMMONS, A. M.; PHELPS, R.; STEINBERG, S. M.; IHDE, D. C.; GAZDAR, A. F. MYC family DNA amplification in 126 tumor cell lines

from patients with small cell lung cancer. **J. Cell Biochem. Suppl.**, v. 24, p. 210-217, 1996.

JOHNSON, L.; MERCER, K.; GREENBAUM, D.; BRONSON, R. T.; CROWLEY, D.; TUVESON, D. A.; JACKS, T. Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. **Nature**, v. 410, p. 1111-1116, 2001.

JOHNSTON, M. R.; MULLEN, J. B. M.; PAGURA, M. E.; HOWARD, R. B. Validation of an orthotopic model of human lung cancer with regional and systemic metastases. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 71, p. 1120-1125, 2001.

JONKERS, J.; MEUWISSEN, R.; VAN DER GULDEN, H.; PETERSE, H.; VAN DER VALK, M.; BERNIS, A. Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. **Nat. Genet.**, v. 29, p. 418-425, 2001.

JUNKER, K. Prognostic factors in stage I/II non-small cell lung cancer. **Lung Cancer**, v. 33, Suppl. 1, p. S17-S24, 2001.

KALOGERAKI, A.; BOUROS, D.; ZORAS, O.; KARABEKIOS, S.; CHALKIADAKIS, G.; STATHOPOULOS, E.; SIAFAKAS, N.; DELIDES, G. S. E-cadherin expression on fine-needle aspiration biopsies in primary lung adenocarcinomas is related to tumor differentiation and invasion. **Anticancer Res.**, v. 23, p. 3367-3371, 2003.

KANG, Y.; MARIANO, J. M.; ANGDISEN, J.; MOODY, T. W.; DIWAN, B. A.; WAKEFIELD, L. M.; JAKOWLEW, S. B. Enhanced tumorigenesis and reduced transforming growth factor- β type II receptor in lung tumors from mice with reduced gene dosage of transforming growth factor- β 1. **Mol. Carcinog.**, v. 29, p. 112-126, 2000.

KAWAMORI, T.; RAO, C. V.; SEIBERT, K.; REDDY, B. S. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. **Cancer Res.**, v. 58, p. 409-412, 1998.

KENNEL, S.J.; DAVIS, I.A.; BRANNING, J.; PAN, H.P.; KABALKA, G.W.; PAULUS, M.J. High resolution computer tomography and MRI for lung tumor growth in mice

undergoing radioimmunotherapy: correlation with histology. **Med. Phys.**, v. 27, n. 5, p. 1101 – 1107, 2000.

KENYON, B. M.; VOEST, E. E.; CHEN, C. C.; FLYNN, E.; FOLKMAN, J.; D'AMATO R. J. A model of angiogenesis in the mouse cornea. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 37, p. 1625-1632, 1996.

KERBEL, R.S. What is the optimal rodent model for anti-tumor drug testing? **Cancer Metastasis Rev.**, v. 17, n. 3, p. 301-304, 1999.

KHANNA, K. K.; JACKSON, S. P. DNA double-strand breaks: Signaling, repair and the cancer connection. **Nat. Genet.**, v. 27, p. 247-254, 2001.

KILLION, J. J.; RADINSKY, R.; FIDLER, I. J. Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. **Cancer Metast. Rev.**, v. 17, p. 279-284, 1998.

KIM, K. S.; JEONG, J. Y.; KIM, Y. C.; NA, K. J.; KIM, Y. H.; AHN, S. J.; BAEK, S. M.; PARK, C. S.; PARK, C. M.; KIM, Y. I.; LIM, S. C.; PARK, K. O. Predictors of the response to gefitinib in refractory non-small cell lung cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 11, n. 6, p. 2244-2251, 2005.

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

KOHLER, D. R.; KRUGER, E. A.; GUBISH, E.; PLUDA, J. M.; REED, E. A randomized phase II trial of thalidomide, an angiogenesis inhibitor, in patients with androgen-independent prostate cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 7, p. 1888–1893, 2001.

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

KRAUSE, D. S.; VAN ETTEN, R. A. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. **N. Engl. J. Med.**, v. 353, p. 172-187, 2005.

KRIS, M. G.; HERBST, R.; RISCHIN, D., et al. Objective regression in non-small cell lung cancer patients treated in phase I trials of oral ZD 1839 (Iressa), a selective tyrosine kinase inhibitor that blocks the epidermal growth factor receptor (EGFR). **Lung Cancer**, v. 29, suppl. 1, p. 72, 2000.

KRIS, M. G.; NATALE, R. B.; HERBST, R. S.; et al. A phase II trial of ZD 1839 (Iressa) in advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients who had failed platinum- and docetaxel-based regimens (IDEAL 2). **Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.**, v. 21, p. 292a, 2002.

KRIX, M.; KIESSLING, F.; VOSSELER, S.; FARHAN, N.; MUELLER, M.M.; BOHLEN, P.; FUSENIG, N.E.; DELORME, S. Sensitive noninvasive monitoring of tumor perfusion during antiangiogenic therapy by intermittent bolus – contrast power Doppler sonography. **Cancer Res.**, v. 63, p. 8264 – 8270, 2003.

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

KUMAR, N. Taxol-induced polymerization of purified tubulin. Mechanism of action. **J. Biol. Chem.**, v. 256, p. 10435-10441, 1981.

KUO, T. H.; KUBOTA, T.; WATANABE, M.; FURUKAWA, T.; KASE S.; TANINO, H.; SAIKAWA, Y.; ISHIBIKI, K.; KITAJIMA, M.; HOFFMAN, R. M. Site-specific chemosensitivity of human small-cell lung carcinoma growing orthotopically compared to subcutaneously in SCID mice: The importance of orthotopic models to obtain relevant drug evaluation data. **Anticancer Res.**, v. 13, p. 627-630, 1993.

LAUDANNO, O. M.; ESNARRIAGA, J. M.; CESOLARI, J. A.; MAGLIONE, C. B.; ARAMBERRY, LUCIANO J.; SANBRANO, J. S.; PIOMBO, G.; RISTA, L. Celecoxib vs indomethacin and acute gastric lesions in rats. **Medicina (B Aires)**, v. 60, n. 2, p. 221-224, 2000.

LENFERINK, A. E.; PINKAS-KRAMARSKI, R.; VAN DE POLL, M. L.; VAN VUGT, M.J.; KLAPPER, L. N.; TZAHAR, E.; WATERMAN, H.; SELA, M.; VAN ZOELLEN, E. J.; YARDEN, Y. Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. **EMBO J**, v. 17, n. 1, p. 3385–3397, 1998.

LEVY, G. N. Prostaglandin H synthases, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and colon cancer. **FASEB J.**, v. 11, p. 234-247, 1997.

LI, E.E.; HEFLICH, R. H.; BUCCI, T. J.; MANJANATHA, M. G.; BLAYDES, B. S.; DELCLOS, K. B. Relationships of DNA adduct formation, K-ras activating mutations and tumorigenic activities of 6-nitrochrysene and its metabolites in the lungs of CD-1 mice. **Carcinogenesis**, v. 15, p. 1377-1385, 1994.

LI, X.; LIU, X.; WANG, J.; WANG, Z.; JIANG, W.; REED, E.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; LI, Q. Q. Thalidomide down-regulates the expression of VEGF and bFGF in cisplatin-resistant human lung carcinoma cells. **Anticancer Res.**, v. 23, n. 3B, p. 2481-7, 2003.

LIBBY, D. M.; WU, N.; LEE, I. J.; FAROOQI, A.; SMITH, J. P.; PASMANTIER, M. W.; MCCAULEY, D.; YANKELEVITZ, D. F.; HENSCHKE, C. I. CT screening for lung cancer: the value of short-term CT follow-up. **Chest**, v. 129, n. 4, p. 1039-1042, 2006.

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

LYNCH, T.; BELL, D. W.; SORDELLA, R.; GURUBHAGAVATULA, S.; OKIMOTO, R. A.; BRANNIGAN, B. W.; HARRIS, P. L.; HASERLAT, S. M.; SUPKO, J. G.; HALUSKA, F. G.; LOUIS, D. N.; CHRISTIANI, D. C.; SETTLEMAN, J.; HABER, D. A. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. **N. Engl. J. Med.**, v. 350, p. 2129-2139, 2004.

MAGNE, N.; FISCHER, J. L.; DUBREUIL, A.; FORMENTO, P.; POUPON, M. F.; LAURENT-PUIG, P.; MILANO, G. Influence of epidermal growth factor receptor

(EGFR), p53 and intrinsic MAP kinase pathway status of tumour cells on the antiproliferative effect of ZD1839 ("Iressa"). **Br. J. Cancer**, v. 86, p. 1518–1523, 2002.

MASFERRER, J. L.; KOKI, A. T.; SEIBERT, K. COX-2 inhibitors. A new class of antiangiogenic agents. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 889, p. 84-86, 1999.

MASFERRER, J. L.; LEAHY, K. M.; KOKI, A. T.; ZWEIFEL, B. S.; SETTLE, S. L.; WOERNER, B. M.; EDWARDS, D. A.; FLICKINGER, A. G.; MOORE, R. J.; SEIBERT, K. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. **Cancer Res.**, v. 60, n. 1, p. 1306–1311, 2000.

MALKINSON, A. M. The genetic basis of susceptibility to lung tumors in mice. **Toxicology**, v. 54, p. 241-271, 1989.

MALKINSON, A. M. Primary lung tumors in mice as an aid for understanding, preventing, and treating human adenocarcinoma of the lung. **Lung Cancer**, v. 32, p. 265-279, 2001.

MALL, J. W.; PHILIPP, A. W.; MALL, W.; POLLMANN, C. Long-term survival of a patient with small-cell lung cancer (SCLC) following treatment with thalidomide and combination chemotherapy. **Angiogenesis**, v. 5, p. 11–13, 2002.

MARCH, T. H.; MARRON-TERADA, P. G.; BELINSKY, S. A. Refinement of an orthotopic lung cancer model in the nude rat. **Vet. Pathol.**, v. 38, p. 483-490, 2001.

MASUYA, D.; HUANG, C.; LIU, D.; KAMEYAMA, K.; HAYASHI, E.; YAMAUCHI, A.; KOBAYASHI, S.; HABA, R.; YOKOMISE, H. The intratumoral expression of vascular endothelial growth factor and interleukin-8 associated with angiogenesis in nonsmall cell lung carcinoma patients. **Cancer**, v. 92, p. 2628-2638, 2001.

MAULIK, G.; KIJIMA, T.; SALGIA, R. Role of receptor tyrosine kinases in lung cancer. **Methods Mol. Med.**, v. 74, p. 113-125, 2003.

MCCORMICK, D. L.; MADIGAN, M. J.; MOON, R. C. Modulation of rat mammary carcinogenesis by indomethacin. **Cancer Res.**, v. 45, p. 1803-1808, 1985.

MCHUGH, S. M.; RIFKIN, I. R.; DEIGHTON, J.; WILSON, A. B.; LACHMANN, P. J.; LOCKWOOD, C. M.; EWAN, P. W. The immunosuppressive drug thalidomide induces T helper cells in mitogen and antigen-stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 99, p. 160-167, 1995.

MCLEMORE, T. L.; EGGLESTON, J. C.; SHOEMAKER, R. H.; ABBOTT, B. J.; BOHLMAN, M. E.; LIU, M. C.; FINE, D. L.; MAYO, J. G.; BOYD, M. R. Comparison of intrapulmonary, percutaneous intrathoracic, and subcutaneous models for the propagation of human pulmonary and nonpulmonary cancer cell lines in athymic nude mice. **Cancer Res.**, v. 48, p. 2880-2886, 1988.

MCLEMORE, T. L.; LIU, M. C.; BLACKER, P. C.; GREGG, M.; ALLEY, M. C.; ABBOTT, B. J.; SHOEMAKER, R. H.; BOHLMAN, M. E.; LITTERST, C. C.; HUBBARD, W. C. Novel intrapulmonary model for orthotopic propagation of human lung cancers in athymic nude mice. **Cancer Res.**, v. 47, p. 5132-5140, 1987.

MELLIN, G.; KATZENSTEIN, M. The saga of thalidomide: neuropathy to embryopathy with case reports and congenital abnormalities. **N. Engl. J. Med.**, v. 267, p. 1184-1193, 1962.

MEUWISSEN, R.; LINN, S. C.; LINNOILA, R. I.; ZEVENHOVEN, J.; MOOI, W. J. BERNIS, A. Induction of small cell lung cancer by somatic inactivation of both Trp53 and Rb1 in a conditional mouse model. **Cancer Cell**, v. 4, p. 181-189, 2003.

MITCHELL, J. A.; AKARASEREENONT, P.; THIEMERMANN, C.; FLOWER, R. J.; VANE, J. R. Selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 11693-11697, 1994.

MIYOSHI, T.; KONDO, K.; ISHIKURA, H.; KINOSHITA, H.; MATSUMORI, Y.; MONDEN, Y. SCID mouse lymphogenous metastatic model of human lung cancer constructed using orthotopic inoculation of cancer cells. **Anticancer Res.**, v. 20, p. 161-163, 2000.

MOASSER, M. M.; BASSO, A.; AVERBUCH, S. D.; ROSEN, N. The tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ("Iressa") inhibits HER2-driven signaling and suppresses the growth of HER2-overexpressing tumor cells. **Cancer Res.**, v. 61, n. 19, p. 7184–7188, 2001.

MOREIRA, A.; SAMPAIO, E.; ZMUIDZINAS, A.; FRINDT, P.; SMITH, K.; KAPLAN, G. Thalidomide exerts its inhibitory action on TNF-alpha by enhancing mRNA degradation. **J. Exp. Med.**, v. 177, p. 1675-1680, 1993.

MUELLER, M. M.; FUSENING, N. Friends or foes – Bipolar effects of the tumor stroma in cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, p. 839-849, 2004.

MULLER, G. W.; CHEN, R.; UANG, S. Y.; CORRAL, L. G.; WONG, L. M.; PATTERSON, R. T.; CHEN, Y.; KAPLAN, G.; STIRLING, D. I. Amino-substituted thalidomide analogs: potent inhibitors of TNF-alpha production. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 9, n. 11, p. 1625-1630, 1999.

MURATA, H.; KAWANO, S.; TSUJI, S.; TSUJI, M.; SAWAOKA, H.; KIMURA, Y.; SHIOZAKI, H.; HORI, M. Cyclo-oxygenase-2 over expression enhances lymphatic invasion and metastasis in human gastric carcinoma. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 94, p. 451 – 455, 1999.

NARUKE, T.; TSUCHIYA, R.; KONDO, H.; ASAMURA, H. Prognosis and survival after resection for bronchogenic carcinoma based on the 1997 tnm-staging classification: The Japanese experience. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 71, p. 1759–1764, 2001.

NEEDLEMAN, P.; TURK, J.; JAKSCHIK, B. A.; MORRISON, A. R.; LEFKOWITH, J. B. Arachidonic acid metabolism. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 55, p. 69-102, 1986.

NELSON, A. R.; FINGLETON, B.; ROTHENBERG, M. L.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. **J. Clin. Oncol.**, v. 18, p. 1135-1149, 2000.

NIHO, S.; KUBOTA, K.; GOTO, K.; YOH, K.; OHMATSU, H.; KAKINUMA, R.; SAIJO N.; NISHIWAKI, Y. First-line single agent treatment with gefitinib in patients with

advanced non-small-cell lung cancer: a phase ii study. **J. Clin. Oncol.**, v. 24, n. 1, p. 64-69. 2006.

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

NORMANNO, N.; CAMPIGLIO, M.; DE, L. A.; SOMENZI, G.; MAIELLO, M.; CIARDIELLO, F.; GIANNI, L.; SALOMON, D. S.; MENARD, S. Cooperative inhibitory effect of ZD1839 (Iressa) in combination with trastuzumab (Herceptin) on human breast cancer cell growth. **Ann. Oncol.**, v. 13, n. 1, p. 65-72, 2002.

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

OLIVEIRA, P. F. M. **Avaliação da hipertermia associada ao paclitaxel, 5-fluorouracil e 5-fluorouracil e ácido folínico no tumor de Walker 256 implantado em estômago de rato.** 2003. Tese (Doutorado)- Departamento de Fisiologia e Farmacologia - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

ONN, A.; ISOBE, T.; ITASAKA, S.; WU, W.; O'REILLY, M. S.; KI, H.W.; FIDLER, I. J.; HERBST, R. S. Development of an orthotopic model to study the biology and therapy of primary human lung cancer in nude mice. **Clin. Cancer Res.**, v. 9, p. 5532-5539, 2003.

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

OSTER, S. K.; HO, C. S.; SOUCIE, E. L.; PENN, L. Z. The myc oncogene: Marvelously Complex. **Adv. Cancer Res.**, v. 84, p. 81-154, 2002.

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

PAGET, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. **Cancer Metast. Rev.**, v. 8, p. 98-101, 1889.

PALENCIA, G.; ARRIETA, O.; RIOS, C.; ALTAGRACIA, M.; KRAVZOV, J.; SOTELO, J. Effect of thalidomide in different tumors in rodents. **J. Exp. Ther. Oncol.** v. 2, n. 3, p. 158-62, 2002

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

PAWLAK, W. Z.; LEGHA, S. S. Phase II study of thalidomide in patients with metastatic melanoma. **Melanoma Res.**, v.14, n. 1, p. 57-62, 2004.

PEZZELLA, F.; TURLEY, H.; KUZU, I.; TUNGEKAR, M. F.; DUNNILL, M. S.; PIERCE, C. B.; HARRIS, A.; GATTER, K. C.; MASON, D. Y. bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma. **N. Engl. J. Med.**, v. 329, p. 690-694, 1993.

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

RAJE, N.; ANDERSON, K. Thalidomide and immunomodulatory drugs as cancer therapy. **Curr. Opin. Oncol.**, v. 14, p. 635-640, 2002.

RATSCHILLER, D.; HEIGHWAY, J.; GUGGER, M.; KAPPELER, A.; PIRNIA, F.; SCHMID, R. A.; BORNER, M. M.; BETTICHER, D. C. Cyclin D1 overexpression in bronchial epithelia of patients with lung cancer is associated with smoking and predicts survival. **J. Clin. Oncol.**, v. 21, p. 2085-2093, 2003.

REHM, S.; LIJINSKY, W.; SINGH, G.; KATYAL, S. L. Mouse bronchiolar cell carcinogenesis. Histologic characterization and expression of Clara cell antigen in lesions induced by N-nitrosobis-(2-chloroethyl) ureas. **Am. J. Pathol.**, v. 139, p. 413-422, 1991.

REISSMANN, P. T.; KOGA, H.; FIGLIN, R. A.; HOLMES, E. C.; SLAMON, D. J. Amplification and over expression of the cyclin D1 and epidermal growth factor receptor genes in non-small-cell lung cancer. Lung Cancer Study Group. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 125, p. 61-70, 1999.

RICHARDSON, G. E.; JOHNSON, B. E. The biology of lung cancer. **Semin. Oncol.**, v. 20, p. 105-127, 1993.

RICHARDSON, P.; HIDEHISHIMA, T.; ANDERSON, K. Thalidomide: the revival of a drug with therapeutic promise in the treatment of cancer. In: **Principles and practice of oncology**. New York: Lippincott Williams and Wilkins Healthcare, 2001. v.15, n. 2.

RIONDEL, J.; JACROT, M.; PICOT, F.; BERIEL, H.; MOURIQUAND, C.; POTIER, P. Therapeutic response to taxol of six human tumors xenografted into nude mice. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 17, n. 2, p. 137-142, 1986.

RODENHUIS, S.; SLEBOS, R. J.; BOOT, A. J.; EVERS, S. G.; MOOI, W. J.; WAGENAAR, S. S.; VAN BODEGOM, P. C.; BOS, J. L. Incidence and possible clinical significance of K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human lung. **Cancer Res.**, v. 48, p. 5738-5741, 1988.

ROBERTSON, F. M.; PARRETT, M. L.; JOARDER, F. S.; ROSS, M.; ABOU-ISSA, H. M.; ALSHAFIE, G.; HARRIS, R. E. Ibuprofen-induced inhibition of cyclooxygenase isoform gene expression and regression of rat mammary carcinomas. **Cancer Lett.**, v. 122, p. 165-175, 1998.

ROWINSKY, E. K.; DONEHOWER, R.C. Drug therapy: paclitaxel (Taxol). **N. Engl. J. Med.**, v. 332, p. 1004-14, 1995.

ROZENGURT, E. V. Gastrointestinal peptide signaling through tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins. **Am. J. Physiol.**, v. 275: G177-G182, 1998.

SAMPAIO, E. P.; KAPLAN, G.; MIRANDA, A. The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum. **J. Infect. Dis.**, v. 168, p. 408-414, 1991.

SANO, H.; KAWAHITO, Y.; WILDER, R. L.; HASHIRAMOTO, A.; MUKAI S.; ASAI, K.; KIMURA, S.; KATO, H.; KONDO, M.; HLA, T. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. **Cancer Res.**, v. 55, p. 3785-3789, 1995.

SARGENT, L. M.; SENFT, J. R.; LOWRY, D. T.; JEFFERSON, A. M.; TYSON, F. L.; MALKINSON, A. M.; COLEMAN, A. E.; REYNOLDS, S. H. Specific chromosomal aberrations in mouse lung adenocarcinoma cell lines detected by spectral karyotyping: A comparison with human lung adenocarcinoma. **Cancer Res.**, v. 62, p. 1152-1157, 2002.

SCHILLER, J. H.; HARRINGTON, D.; BELANI, C. P.; LANGER, C.; SANDLER, A.; KROOK, J.; ZHU, J.; JOHNSON, D. H. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 346, p. 92-98, 2002.

SCHLESSING, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, v. 13, p. 211-215, 2000.

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

SHENG, H.; WILLIAMS, C. S.; SHAO, J.; LIANG, P.; DUBOIS, R. N.; BEAUCHAMP, R. D. Induction of cyclooxygenase-2 by activated Ha-ras oncogene in Rat-1 fibroblasts and the role of mitogen-activated protein kinase pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 34, p. 22120-22127, 1998.

SHEPHERD, A. Angiogenesis inhibitors in the treatment of lung cancer. **Lung Cancer**, v. 34, Suppl. 3, p. 81-89, 2001.

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

SHIMKIN, M. B.; STONER, G. D. Lung tumors in mice: Application to carcinogenesis bioassay. **Adv. Cancer Res.**, v. 21, p. 1-58, 1975.

SIEVERS, E. M.; BART, R. D.; BACKHUS, L. M.; LIN, Y.; STARNES, M.; CASTANOS, R.; STARNES, V. A.; BREMNER, R. M. Evaluation of cyclooxygenase-2 inhibition in an orthotopic murine model of lung cancer for dose-dependent effect . **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 129, p. 1242-1249, 2005.

SILVA, L.F.G.; SOARES, F.S.D.; ANSELMO, J.N.N.; FÉ, D.M.M.; CAVALCANTE, J.L.B.G.; MORAES, M.O.; VASCONCELOS, P.R.L. Experimental tumor model in rats kidney. **Acta. Cir. Bras.**, v.17, n.1, p. 62-66, 2002.

SINGHAL, S.; MEHTA, J.; DESIKAN, R.; AYERS, D.; ROBERSON, P.; EDDLEMON, P.; MUNSHI, N.; ANAISSI, E.; WILSON, C.; DHODAPKAR, M.; ZEDDIS J.; BARLOGIE, B. Anti-tumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. **N. Engl. J. Med.**, v. 341, n. 21, p. 1565-1571, 1999.

SIROTNAK, F. M.; ZAKOWSKI, M. F.; MILLER, V. A.; SCHER, H. I.; KRIS, M. G. Efficacy of cytotoxic agents against human tumor xenografts is markedly enhanced by coadministration of ZD1839 (Iressa), an inhibitor of EGFR tyrosine kinase. **Clin. Cancer Res.**, v. 6, n. 12, p. 4885-4892, 2000.

SKOBE, M.; ROCKWELL, P.; GOLDSTEIN, N.; VOSSELER, S.; FUSENIG, N. E. Halting angiogenesis suppresses carcinoma cell invasion. **Nat. Med.**, v. 3, n. 11, p. 1222-1227, 1997.

SLAMON, D. J.; LEYLAND-JONES, B.; SHAK, S.; FUCHS, H.; PATON, V.; BAJAMONDE, A.; FLEMING, .; EIERMANN, W.; WOLTER, J.; PEGRAM, M.; BASELGA, J.; NORTON, L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER-2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER-2. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, n. 11, p. 783-792, 2001.

SLEBOS, R. J.; KIBBELAAR, R. E.; DALESIO, O.; KOOISTRA, A.; STAM, J.; MEIJER, C. J.; WAGENAAR, S. S.; VANDERSCHUEREN, R. G.; VAN ZANDWIJK, N.; MOOI, W. J. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. **N. Engl. J. Med.**, v. 323, n. 9, p. 561-565, 1990.

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

SOLOMON, S. D.; MCMURRAY, J. J.; PFEFFER, M. A.; WITTES, J.; FOWLER, R.; FINN, P.; ANDERSON, W. F.; ZAUBER, A.; HAWK, E.; BERTAGNOLLI, M.; Adenoma Prevention with Celecoxib (APC) Study Investigators. Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention. **N. Engl. J. Med.**, v. 352, n. 11, p. 1071-1080, 2005.

SON, M.J.; KIM, J.S.; KIM, M.H.; SONG, H.S.; KIM, J.T.; KIM, H.; SHIN, T.; JEON, H.J.; LEE, D.S.; PARK, S.Y.; KIM, Y.J.; KIM, J.H.; NAM, D.H.. Combination treatment with temozolomide and thalidomide inhibits tumor growth and angiogenesis in an orthotopic glioma model. **Int. J. Oncol.** v. 28, n. 1, p. 53-9, 2006.

SONG, S.; WIENTJES, G.; WALSH, C.; AU, J. L. Nontoxic doses of suramin enhance activity of paclitaxel against lung metastases. **Cancer Res.**, v. 61, p. 6145-6150, 2001.

STIRLING, D. Thalidomide and its impact on dermatology. **Semin. Cutan. Med. Surg.**, v. 17, p. 231-242, 1998.

TAKANAMI, I.; TANAKA, F.; HASHIZUME, T.; KIKUCHI, K.; YAMAMOTO, Y.; YAMAMOTO, T.; KODAIRA, S. The basic fibroblast growth factor and its receptor in pulmonary adenocarcinomas: an investigation of their expression as prognostic markers. **Eur. J. Cancer**, v. 32A, p. 1504-1509, 1996.

TANG, C. K.; GONG, X. Q.; MOSCATELLO, D. K.; WONG, A. J.; LIPPMAN, M. E. Epidermal growth factor receptor vIII enhances tumorigenicity in human breast cancer. **Cancer Res.**, v. 60, n. 11, p. 3081-3087, 2000.

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

TEO, S.; RESZTAK, K.; SCHEFFLER, M.; et al. Thalidomide in the treatment of leprosy. **Microbes Infect.**, v. 4, p. 1193-1202, 2002.

THREADGILL, D. W.; DLUGOSZ, A. A.; HANSEN, L. A.; TENNENBAUM, T.; LICHTI, U.; YEE, D.; LAMANTIA, C.; MOURTON, T.; HERRUP, K.; HARRIS, R. C. Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. **Science**, v. 269, n. 5221, p. 230–234, 1995.

TOYOOKA, S.; TSUDA, T.; GAZDAR, A. F. The TP53 gene, tobacco exposure, and lung cancer. **Hum. Mutat.**, v. 21, p. 229-239, 2003.

TRAIL, P. A.; WILLNER, D.; BIANCHI, A. B.; HENDERSON, A. J.; TRAILSMITH, M. D.; GIRI, E.; LASCH, S.; HELLSTROM, I.; HELLSTROM, K. E. Enhanced antitumor activity of paclitaxel in combination with the anticarcinoma immunoconjugate BR96-doxorubicin. **Clin. Cancer Res.**, v. 5, p. 3632-3638, 1999.

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

TRAVIS, W. D. Pathology of lung cancer. **Clin. Chest Med.**, v. 23, p. 65-81, 2002.

TRIPODIS, N.; HART, A. A.; FIJNEMAN, R. J.; DEMANT, P. Complexity of lung cancer modifiers: mapping of thirty genes and twenty-five interactions in half of the mouse genome. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 93, p. 1484-1491, 2001.

TROYER, K. L.; LEE, D. C. Regulation of mouse mammary gland development and tumorigenesis by the ERBB signaling network. **J. Mammary Gland Biol. Neoplasia**, v. 6, n. 1, p. 7–21, 2001.

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

TSUJII, M.; DUBOIS, R. N. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. **Cell**, v. 83, p. 493-501, 1995.

TSUJII, M.; KAWANO, S.; DUBOIS, R. N. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 3336-3340, 1997.

TSUJII, M.; KAWANO, S.; TSUJI, S.; SAWAOKA, H.; HORI, M.; DUBOIS, R. N. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. **Cell**, v. 93, p. 705-716, 1998.

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

TUCKER, O. N.; DANNENBERG, A. J.; YANG, E. K.; ZHANG, F.; TENG, L.; DALY, J. M.; SOSLOW, R. A.; MASFERRER, J. L.; WOERNER, B. M.; KOKI, A. T.; FAHEY, T. J. III. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. **Cancer Res.**, v. 59, p. 987-990, 1999.

VAN ZANDWIJK, N.; MOOI, W. J.; RODENHUIS, S. Prognostic factors in NSCLC. Recent experiences. **Lung Cancer**, v. 12, Suppl. 1, p. S27-S33, 1995.

VAN ETTEN, R. A. c-Abl regulation: a tail of two lipids. **Curr. Biol.**, v. 13, p. R608-R610, 2003.

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nat. New Biol.**, v. 231, p. 232-235, 1971.

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

WAKELING, A. E.; GUY, S. P.; WOODBURN, J. R.; ASHTON, S. E.; CURRY, B. J.; BARKER, A. J.; GIBSON, K. H. ZD1839 (Iressa): an orally active inhibitor of epidermal growth factor signaling with potential for cancer therapy. **Cancer Res.**, v. 62, n. 20, p. 5749-5754, 2002.

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

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

WILMANN, C.; FAN, D.; O'BRIAN, C. A.; BUCANA, C. D.; FIDLER, I. J. Orthotopic and ectopic organ environments differentially influence the sensitivity of murine colon carcinoma cells to doxorubicin and 5-fluorouracil. **Int. J. Cancer**, v. 52, p. 98-104, 1992.

WISTUBA, I. I.; GAZDAR, A. F.; MINNA, J. D. Molecular genetics of small cell lung carcinoma. **Semin. Oncol.**, v. 28, p. 3-13, 2001.

WOODBURN, J. R. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. **Pharmacol. Ther.**, v. 82, p. 241-250, 1999.

YAMASHITA, J.; OGAWA, M.; ABE, M.; NISHIDA, M. Platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase concentrations differ in small cell and non-small cell lung cancer. **Chest**, v. 116, p. 206-211, 1999.

YARDEN, Y.; SLIWKOWSKI, M. X. Untangling the ErbB signalling network. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 2, p. 127-137, 2001.

YATSUNAMI, J., TSURUTA, N., OGATA, K., WAKAMATSU, K., TAKAYAMA, K., KAWASAKI, M., NAKANISHI, Y., HARA, N., AND HAYASHI, S. Interleukin-8 participates in angiogenesis in non-small cell, but not small cell carcinoma of the lung. **Cancer Lett.** **120**: 101-108, 1997.

ZELDIS, J.; WILLIAMS, B.; THOMAS, S.; ELSAYED, M. S.T.E.P.S.: a comprehensive program for controlling and monitoring access to thalidomide. **Clin. Ther.**, v. 21, p. 319-330, 1999.

ZHANG, Z. L.; LIU, Z. S.; SUN, Q. Anti-tumor effect of thalidomide and paclitaxel on hepatocellular carcinoma in nude mice. **Chin. Med. J.** v. 118, n. 20, p. 1688-1694, 2005.

ZOCHBAUER-MULLER, S.; GAZDAR, A. F.; MINNA, J. D. Molecular pathogenesis of lung cancer. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 64, p. 681-708, 2002.

APÊNDICE A - Material Cirúrgico

Tesoura de Metzenbaum de 14 cm (Medlight, Brasil)

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

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

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

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

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

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

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

Pinça mosquito de Halsted sem dentes (Medlight, Brasil)

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

Pinça Kelly de 14 cm (Medlight, Brasil)

Porta-agulha tipo Hegar de 12cm

Porta-agulha tipo Hegar com ponta reforçada com Videa

Porta-agulha de Castroviejo curvo sem trava de 12cm

Cabos de bisturi números 3 e 4

Lâminas de bisturi números: 11, 15 e 21

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

APÊNDICE B - Drogas e Reagentes

Povidine: Polivinilpirrolidona a 10% (Tecnofarma, Brasil)

Solução de Ringer com Lactato

Solução salina isotônica (0.9%)

Gentamicina 10mg/mL (Schering-Plough, Brasil)

Celecoxib (Celebra® - Pharmacia Brasil Ltda. Apresentação – Cápsula de 200mg)

Talidomida (Talidomida® Microbiológica Química Farmacêutica Ltda. Apresentação - Comprimido de 100mg)

Gefitinib (Iressa® - Astra Zeneca. Apresentação - Comprimido de 250mg)

Paclitaxel (Taxol® - Bristol-Myers Squib. Apresentação – Frasco-ampola de 100mg)

Tribromoetanol

Hidrato de cloral

APÊNDICE C - Vidraria

Erlenmeyer 25 e 100mL (Pyrex, Brasil)

Becher de 100mL (Pyrex, Brasil)

Becher de 500mL (Pyrex, Brasil)

Micropipetas de 200 μ L e 1000 μ L (Cilson, Brasil)

Câmara de Neubauer (Bright-line Eppendorf Optik Labor)

APÊNDICE D - Equipamento

Agitador magnético (TE 089 MARCONI)

Centrífuga (Modelo 580, São Paulo, Brasil)

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

Microscópio (Nikon, Japão)

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

Balança (Kern 430-21, USA)

Aparelho de tomografia (Siemens, somaton AR.TX)

APÊNDICE E - Outros Materiais

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

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

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

Abocath número 16G usados como tubo traqueal (BD Ind. Cirúrg. Ltda, Brasil)

Cateter 22G (Intracath® Becton Dickinson, USA)

Hastes flexíveis com algodão na extremidade.

Placas de Petri (Pirex)

Peneira de metal com furos de 0,5mm

Colher de metal

Tubos Falcon de 15 e 50mL

Bala magnética

Luvas cirúrgicas

Luvas de procedimento

APÊNDICE F - Peso dos animais (g)

Animais da 1ª etapa (n=32)

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
n=8	n=8	n=10	n=6
198	210	178	190
212	230	182	200
220	244	218	185
225	224	185	210
206	197	195	205
245	233	251	195
236	233	242	
202	211	236	
		211	
		234	

Animais da 2ª etapa (n=16)

Grupo 1	n=16
194	167
206	211
201	180
214	198
220	225
226	220
227	232
199	205

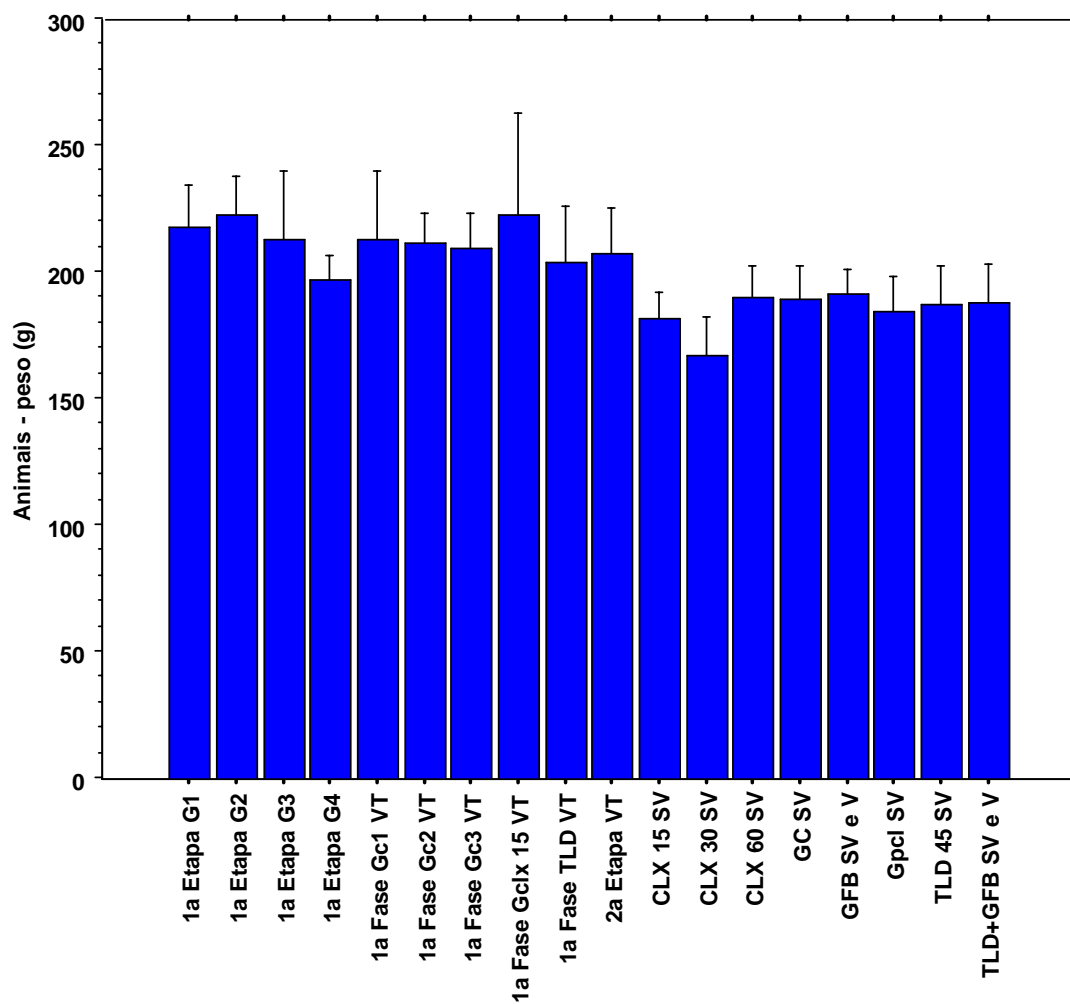
Animais da 1ª fase da 3ª etapa (n=72)

Gc1	Gclx 15	Gc2	Gtld	Ggfb	Gc3	Gtld+gfb
n=10	n=10	n=8	n=8	n=16	n=8	n=12
178	205	227	232	194	224	185
182	201	206	167	198	193	191
218	218	201	211	176	226	200
185	186	214	180	185	209	195
195	188	220	198	194	212	191
251	223	226	225	177	215	177
242	238	194	220	187	212	195
236	246	205	199	185	187	198
211	201			204		171
234	323			207		220
				192		172
				188		164
				204		
				199		
				198		
				183		

Animais da 2ª fase da 3ª etapa (n=71)

Gc	Gclx 15	Gclx 30	Gclx 60	Gtld	Ggfb	Gtld+gfb	Gpcl
n=14	n=10	n=12	n=10	n=16	n=16	n=12	n=9
196	185	152	192	157	194	185	163
194	181	170	178	199	198	191	176
192	175	180	212	212	176	200	204
190	183	179	181	211	185	195	175
176	190	188	182	182	194	191	194
176	164	171	186	172	177	177	197
172	183	150	177	195	187	195	170
198	202	181	185	188	185	198	188
184	184	143	208	187	204	171	196
175	173	150	202	166	207	220	
217		181		185	192	172	
200		166		184	188	164	
186				201	204		
203				184	199		
				186	198		
				196	183		

Peso de todos os animais (199 ± 23 g)



VT = volume tumoral; SV = sobrevida (2ª fase)

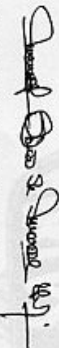
ANEXO A – Apresentação no Encontro Universitário de Iniciação à Pesquisa 2006


Universidade Federal do Ceará
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Encontro Universitário de Iniciação à Pesquisa 2006

CERTIFICADO



Certificamos que **SAMUEL DE PAULA MIRANDA** participou do **XXV ENCONTRO UNIVERSITÁRIO DE INICIAÇÃO À PESQUISA** realizado do dia 29 ao dia 30 de Junho de 2006, apresentando o trabalho **AVALIAÇÃO TOMOGRÁFICA EM MODELO DE TUMOR DE PULMÃO EM RATO..**

Fortaleza, 31 de Julho de 2006


Manoel Odorico de Moraes Filho
Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação


Abdênago Alves de Barros
Coordenador de Pesquisa

ANEXO B – Apresentação na XIV Jornada Anual de Cirurgia - 2006

 <h1 data-bbox="1088 808 1331 1785">XIV Jornada Anual de Cirurgia</h1>	 <h2 data-bbox="397 525 1031 672">CERTIFICADO</h2> <p data-bbox="300 451 365 745">Schwinn <i>et</i> Schwinn PRODUTOS PROFissionais LTDA.</p> <p data-bbox="974 1281 1015 1491">Certificamos que</p> <p data-bbox="820 934 925 1827"><i>Romildo de Albuquerque Ribeiro, Samuel de Paula Miranda, Antônia Felício Leite Simão, Antônio Gomes Neto</i></p> <p data-bbox="527 892 747 1858">Participaram da XIV Jornada Anual de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, realizada no período de 01 a 02 de junho de 2006, na qualidade de Autores do Tema Livre “ Modelo de tumor de pulmão por inoculação intrabronquica (TPIB) - Efeitos de drogas citotóxicas e alvo-direcionadas ”.</p> <p data-bbox="446 1501 479 1858">Fortaleza, 02 de junho de 2006</p> <p data-bbox="292 934 349 1228">Prof. Fco Sérgio Pinheiro Regadas Coordenador Geral da Jornada</p> <p data-bbox="284 1480 349 1827">Prof. Dr Lusmar Veras Rodrigues Chefe do Depto. de Cirurgia da FMUFC</p>
---	---

ANEXO C – Prêmio Germana Amaral de Moraes de Iniciação Científica - 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

DECLARAÇÃO

DECLARO, para os devidos fins, que **ANTERO GOMES NETO**, participou do XXV Encontro de Iniciação Científica, realizado na Universidade Federal do Ceará, no período de 29 a 30 de junho de 2006, como co-autor do trabalho “**MODELO EXPERIMENTAL DE TUMOR DE PULMÃO EM RATO POR VIA INTRABRÔNQUICA**”. Tendo recebido o título de Menção Honrosa pelo Prêmio Germana Amaral de Moraes de Iniciação Científica – Edição 2006.



Fortaleza, 05 de Setembro de 2006.

Adelânia Roque Marinho Guedes
Adelânia Roque Marinho Guedes


Diretora da Divisão de Pesquisa

ANEXO D – Certificado de trabalho apresentado na SBEFTE 2006

CERTIFICADO

38^o Congresso Brasileiro de
Farmacologia e Terapêutica
Experimental

Certificamos que o trabalho 07.018 “MODELO EXPERIMENTAL DE TUMOR DE PULMÃO EM RATO POR VIA INTRABRÔNQUICA.” de autoria de *Simão, A. F. L.; Bezerra, N. P.; Miranda, S. P.; Mourao, L. T. C.; Almeida, P. R. C.; Gomes Neto, A.; Albuquerque Ribeiro, R.* foi apresentado como pôster no 38^o Congresso Brasileiro de Farmacologia, realizado de 18 a 21 de outubro de 2006 em Ribeirão Preto, São Paulo.



Regina Pekelmann Markus
Presidente
Sociedade Brasileira de Farmacologia
e Terapêutica Experimental

ANEXO E – Certificado de trabalho apresentado na SBEFTE 2006

38^o Congresso Brasileiro de
**Farmacologia e Terapêutica
Experimental****CERTIFICADO**

Certificamos que o trabalho 01.070 “VALIDAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL DE TUMOR DE PULMÃO POR VIA INTRABRÔNQUICA(TPIB) UTILIZANDO-SE DROGAS COM DIFERENTES MECANISMOS DE AÇÃO EM RATOS” de autoria de *Bezerra, N. P.; Simao, A. F. L.; Mourao, L. T. C.; Miranda, S. P.; Gomes Neto, A.; Almeida, P. R. C.; Albuquerque Ribeiro, R.* foi apresentado como pôster no 38º Congresso Brasileiro de Farmacologia, realizado de 18 a 21 de outubro de 2006 em Ribeirão Preto, São Paulo.



Regina Pekelmann Markus
Presidente
Sociedade Brasileira de Farmacologia
e Terapêutica Experimental

ANEXO F – Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA)**- Declaração -**

Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366-8338 Fax (85) 3366-8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 33/06, sobre o projeto intitulado: **“Modelo experimental de tumor de pulmão por implantação de células tumorais por via intrabrônquica: avaliação dos efeitos de drogas antiangiogênicas, alvo-direcionadas e antineoplásicas clássicas”** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal CEPA em reunião realizada em 11 de agosto de 2006.

Fortaleza, 24 de agosto de 2006

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Gisela Costa Camarão', written over the printed name.

Profa. Dra. Gisela Costa Camarão
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal - CEPA

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)