

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**MODELO DE IMPLANTE DE TUMOR DE WALKER NO CÉREBRO  
DE RATOS**

Dissertação submetida à Coordenação do curso de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes

**FRANCISCO HÉLDER CAVALCANTE FÉLIX**

**2001**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

F 36 m Félix, Francisco Hélder Cavalcante

Modelo de implante de tumor de Walker no cérebro de ratos / Francisco Hélder Cavalcante Félix. – Fortaleza, 2001. 149f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina.

1. Carcinoma 256 de Walker – imunologia. 2. Modelos animais. 3. Ciclosporina. 4. Dexametasona. I. Moraes, Manoel Odorico (orient.). II. Título.

CDD 619

Esta dissertação encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca de Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

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

---

**Francisco Hélder Cavalcante Félix**

**Dissertação aprovada em 14 de Setembro de 2001**

---

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes

---

Prof. Dr. Otoni Cardoso do Vale

---

Profa. Dra. Geanne Matos Cunha

Somos a memória que temos e a  
responsabilidade que assumimos. Sem  
memória não existimos, sem responsabilidade  
talvez não mereçamos existir.

José Saramago

A meus avós, Luís e Maria, por me ensinarem  
a viver com simplicidade, honestidade,  
liberdade e bom humor.

À minha companheira, Juvenia, e ao nosso Lucas, cujo amor foi ensinamento na dúvida, companheiro no afazer, acalento durante a vicissitude, presença constante e imprescindível em minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes**, mais que um mestre, também jovial companheiro nestes anos de labuta para a execução de nossos objetivos.

À **Profa. Dra. Glauce B. Viana**, por me receber amistosamente em seu laboratório, além dos conselhos e ajuda imprescindíveis.

À **Profa. Dra. Geanne Matos Cunha**, por ter gentilmente dividido comigo seu conhecimento científico e humano.

Aos amigos e companheiros de trabalho, os quais lutaram todos juntos para a realização de um sonho: **Roberto Lima Picanço Júnior, Milena Gurgel Teles do Amaral, João Evangelista Bezerra Neto, Guilherme Gurgel Teles do Amaral, Márcia Maciel**.

Ao amigo **Paulo Lavor Porto**, por ter-me ensinado e auxiliado na técnica de cultura e manipulação de células e suspensões celulares.

Aos amigos **Ana Rosa e Pergentino**, pelos conselhos importantes e pela prestimosa ajuda.

Aos companheiros de pós-graduação do LOE: **Raimundo Pajón Gonçalves, Ferdinando, Patrícia Bonavides de Castro, Cláudia do Ó Pessoa**.

A todos os amigos colegas do **Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da UFC**, que comigo dividiram alegrias e agruras de banco universitário.



Ao corpo docente do **Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da UFC**, pela competência científica e pedagógica.

Aos demais amigos bolsistas, alunos e funcionários do **LOE**.

À **Maria Vilani Rodrigues Bastos** pela colaboração em alguns experimentos, além de sua preciosa amizade.

À **Dra. Maria Artemiza P. A. Cardoso** pela ajuda e atenção com os animais experimentais.

À **Srta. Sílvia Maria Azevedo de Lima** pela gentileza e préstimos como secretária da Pós-graduação.

Ao **Laboratório Emílio Ribas** pelo apoio técnico ao realizar exames hematológicos para esta equipe, agradecendo de forma especial ao desprendimento e gentileza da **Dra. Zélia Petrola Jorge Bezerra**.

Ao **Laboratório Central do Hospital Universitário Walter Cantídio**, em especial à **Dra. Zilmar Fontenele e Silva** pela realização de testes e exames bioquímicos e hematológicos.

À **CAPES** e ao **Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq)** pelo apoio financeiro.

Por último, porém mais importante, à minha mulher, eterna companheira, **Juvenia Bezerra Fontenele**, que participou passo a passo da jornada que culminou com esta dissertação, e a toda a sua família, meus gratos amigos.

# ÍNDICE

Lista de Abreviaturas	xiv
Lista de Tabelas	xvii
Lista de Figuras	xix
Resumo	xxi
Abstract	xxiii

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 Neoplasia maligna (câncer)	1
1.2 Tumores do sistema nervoso central (SNC)	2
1.2.1 Metástases cerebrais	3
1.2.2 Tratamento de metástases cerebrais	6
1.3 Multirresistência a drogas antineoplásicas: implicações para tumores do SNC	11
1.4 Imunologia dos transplantes e tumores experimentais no SNC	16
1.4.1 Ciclosporina (CS): imunomodulador específico de linfócitos T	20
1.5 Modelos animais de tumores cerebrais	21
1.5.1 Características ideais de um modelo de tumor do SNC	22
1.5.2 Modelos baseados em transplantes de tecidos e células	22
1.5.2.1 Modelos de transplante singênico	23
1.5.2.2 Carcinossarcoma 256 de Walker (W256)	26

1.5.2.3 Modelos de inoculação intracraniana do tumor W256	27
1.6 Objetivos	29
1.6.1 Gerais	29
1.6.2 Específicos	29
<b>2 MATERIAL</b>	<b>30</b>
2.1 Tumor	30
2.2 Animais	30
2.3 Reagentes e drogas	30
2.4 Composição de soluções e corantes	32
2.4.1 Azul de Trypan a 0,75%	32
2.4.2 Salina para suspensão de células tumorais	32
2.4.3 Veículo para diluir a CS (CrEL)	32
2.4.4 Solução para fixação de tecidos	33
2.5 Material cirúrgico e outros	33
2.6 Material permanente e equipamentos	34
<b>3 MÉTODOS</b>	<b>35</b>
3.1 Cirurgia	35
3.1.1 Atlas estereotáxico	35
3.1.2 Anestésicos usados	35
3.1.3 Canhão	35
3.1.4 Cirurgia estereotáxica	36
3.1.5 Agulhas de proteção	36

3.2 Solução de células	39
3.2.1 Obtenção da solução de células tumorais	39
3.3 Inoculação intracerebral	40
3.4 Grupos experimentais	40
3.5 Tratamentos	41
3.5.1 Ciclosporina (CS)	41
3.5.2 Diluente da CS (CrEL)	41
3.5.3 Dexametasona (DEXA)	41
3.6 Exames laboratoriais	42
3.6.1 Análise dos resultados de testes hematológicos	42
3.7 Evolução ponderal dos animais	43
3.8 Morte ou sacrifício dos animais	43
3.9 Sobrevida dos animais inoculados com tumor	44
3.10 Exames histopatológicos	44
3.10.1 Fixação intracardíaca	44
3.10.2 Retirada de órgãos para exame	45
3.10.3 Processamento e análise do material	46
3.10.4 Medida do volume tumoral estimado (VTE)	46
3.11 Transplante de fragmentos pulmonares	47
3.12 Anotação e análise dos dados	48
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>50</b>

4.1 Características do modelo	50
4.1.1 Estatística do modelo	50
4.1.2 Macroscopia dos animais	53
4.1.3 Influência da retirada do capacete pelo animal no modelo	53
4.1.4 Eficiência do crescimento tumoral em relação ao tratamento com CS	56
4.2 Estudos histopatológicos	56
4.2.1 Tumor intracerebral	58
4.2.2 Volume tumoral cerebral estimado (VTE)	65
4.2.3 Análise histopatológica qualitativa	65
4.2.4 Alterações nos órgãos analisados	70
4.3 Transplante de fragmentos pulmonares	70
4.4 Estudos hematológicos	70
4.4.1 Linhagem eritróide	70
4.4.1.1 Hemácias	70
4.4.1.2 Hematócrito	71
4.4.1.3 Hemoglobina	71
4.4.2 Linhagem mielóide	71
4.4.2.1 Leucócitos totais	71
4.4.2.2 Valores absolutos de neutrófilos	73
4.4.2.3 Valores relativos de neutrófilos	73
4.4.2.4 Valores absolutos de linfócitos	80

4.4.2.5 Valores relativos de linfócitos	80
4.4.2.6 Valores absolutos de monócitos	85
4.4.2.7 Valores relativos de monócitos	85
4.4.2.8 Valores absolutos de eosinófilos	85
4.4.2.9 Valores relativos de eosinófilos	85
4.4.3 Plaquetas	87
4.4.4 Outros	87
4.5 Estudos bioquímicos	87
4.5.1 Creatinina	87
4.6 Estudos ponderais	90
4.6.1 Série de comparação de pesos de órgãos	90
4.6.1.1 Comparando pesos dos animais da série de órgãos	90
4.6.1.2 Peso dos cérebros	90
4.6.1.3 Peso dos fígados	90
4.6.1.4 Peso dos pulmões	91
4.6.1.5 Peso dos rins	91
4.6.2 Série de comparação de evolução ponderal	91
4.6.2.1 Pesos dos animais no dia da cirurgia	94
4.6.2.2 Pesos dos animais do 5 <sup>o</sup> DPI (SHAM e CS no 15 <sup>o</sup> DPO)	94
4.6.2.3 Pesos dos animais no dia da morte (SHAM e CS no 21 <sup>o</sup> – 27 <sup>o</sup> DPO)	94
4.6.2.4 Comparação do peso no dia da morte: estratificação por sobrevivida	97

4.7 Sobrevida dos animais com tumor cerebral	97
<b>5 DISCUSSÃO</b>	<b>102</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b>	<b>125</b>
<b>7 BIBLIOGRAFIA</b>	<b>127</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
AP	Ântero-posterior
b-FGF	Fator de crescimento de fibroblastos básico
BHE	Barreira hemato-encefálica
CAA	Células apresentadoras de antígenos
CAT	Cérebro adjacente ao tumor
CPH	Complexo principal de histocompatibilidade
CrEL	Diluyente da ciclosporina (Cremophor EL)
CS	Ciclosporina
DPI	Dias após inoculação
DPML	Departamento de patologia e medicina legal
DPO	Dias de pós-operatório
DV	Dorsoventral
DX	Doxorrubicina
e.v.	Endovenoso
EGF	Fator de crescimento epitelial
EPA	Ependimoblastoma A
EPM	Erro padrão da média
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ET	Etoposide
G-CSF	Fator de crescimento de colônias de granulócitos
GM-CSF	Fator de crescimento de colônias de granulócitos e macrófagos
gpP	Glicoproteína P
GSH	Glutation reduzido
GST	Glutation-S-transferase
H-E	Hematoxilina-eosina
HIC	Hipertensão intracraniana
i.m.	Intramuscular



i.p.	Intraperitoneal
IC 95%	Intervalo de confiança 95%
IFN- $\alpha$	Interferon alfa
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL	Interleucina
L	Lateral
LABCEX	Laboratório de cirurgia experimental
LAK	Células killer ativadas por linfocinas
LCR	Líquido céfalo-raquiano
LT	Leucotrieno
MEC	Matriz extracelular
M-G-G	May-Grünwald e Giemsa
MMP	Metaloproteinases da matriz
MO	Medula óssea
MRD	Multirresistência a drogas antineoplásicas
n.s.	Não significativa
NO	Óxido nítrico
PFI	Pressão do fluido intersticial
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E dois
PM	Peso molecular
PMN	Polimorfonuclear
q.s.p.	Quantidade suficiente para
QT	Quimioterapia
RC	Razão de chance (odds ratio)
RNM	Ressonância nuclear magnética
RT	Radioterapia
s.c.	Subcutâneo
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
Ta	T auxiliar (linfócito)

Tc	T citotóxico (linfócito)
TD	Tempo de duplicação
TGF- $\beta$ 1	Fator de transformação de crescimento beta
TGI	Trato gastro-intestinal
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
VCR	Vincristina
VEG/PF	Fator de crescimento de endotélio/ permeabilidade vascular
VTE	Volume tumoral estimado
W256	Walker 256 (tumor)

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA</b>		<b>PÁGINA</b>
1-	Estatística do modelo de inoculação de W256 no cérebro	51
2-	Características dos animais e dos experimentos	52
3-	Amostragem do animal 110 ao 168: eficiência de aproveitamento e perda do capacete	52
4-	Análise da macroscopia post-mortem de animais inoculados com tumor (realizado com os animais 113 a 137, n = 14)	54
5-	Influência da perda do capacete no modelo	54
6-	Volume tumoral cerebral estimado por diâmetros em um corte histológico, no 7DPI e 9DPI	66
7-	Alterações qualitativas nas lâminas de cérebro analisadas	68
8-	Valores da linhagem eritrocitária, em animais inoculados com tumor, tratados com CS, com veículo e controle	72
9-	Valores de neutrófilos e linfócitos, em animais inoculados com tumor, tratados com CS, veículo e controle	74
10-	Contagem de alterações dos neutrófilos e linfócitos, em animais inoculados com tumor, tratados com CS, com veículo e controle	76
11-	Valores de monócitos e eosinófilos, em animais inoculados com tumor, tratados com CS e controle	86
12-	Valores da linhagem plaquetária, em animais inoculados com tumor, tratados com CS e controle	88
13-	Valores das dosagens de creatinina sérica, em animais inoculados com tumor, tratados com CS e controle	89
14-	Valores dos pesos de órgãos, em animais inoculados com tumor, tratados ou não e controle	92
15-	Evolução ponderal em animais inoculados com tumor, tratados com CS, veículo e controle	95

16-	Peso no dia da morte em animais inoculados com tumor, tratados ou não, estratificados pela sobrevida	98
17-	Sobrevida em animais inoculados com tumor, tratados ou não com CS, veículo e dexametasona 0,3 mg/kg/dia ou 3,0 mg/kg/dia	98

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1-	Localização dos sítios de metástase tumoral no SNC	8
2-	Mecanismos celulares de resistência a drogas antineoplásicas	13
3-	Estrutura prevista esquemática da gpP, e seu mecanismo de ação	15
4-	Esquema de localização estereotáxica no SNC	25
5-	Glioma humano inoculado em cérebro de rato imunossuprimido	25
6-	Figura esquemática do ponto de inoculação e do aparato para injeção de células tumorais no cérebro	37
7-	Animal experimental posicionado no aparelho estereotáxico	38
8-	Influência da perda do capacete em características do modelo	55
9-	Aspecto microscópico da lesão após a implantação da cânula intracerebral (animal do grupo SHAM)	57
10-	Aspecto microscópico do tumor crescendo abaixo do córtex cerebral (animal do grupo Tumor)	59
11-	Aspecto microscópico comparativo de tumor inoculado no cérebro e tumor de Walker crescendo no subcutâneo	60
12-	Aspecto microscópico do tumor cerebral invadindo estruturas neurais	61
13-	Aspecto microscópico de infiltrado tumoral perivascular (animal do grupo Tumor)	62
14-	Aspecto microscópico de disseminação celular tumoral ao longo de feixe de fibras nervosas (substância branca)	62
15-	Aspecto microscópico de área de necrose central em tumor cerebral (animal do grupo Tumor)	63
16-	Aspecto microscópico de área de hemorragia em tumor cerebral (animal do grupo Tumor)	63

17-	Aspecto microscópico de neoangiogênese tumoral cerebral	64
18-	Aspecto microscópico das meninges nos animais inoculados com tumor cerebral	64
19-	Influência do tratamento com ciclosporina (CS) no volume tumoral estimado (VTE)	67
20-	Influência do tratamento com ciclosporina (CS) na ocorrência de eventos histopatológicos	69
21-	Número absoluto de neutrófilos	75
22-	Frequência de animais com neutrofilia absoluta de acordo com os tratamentos	77
23-	Número relativo de neutrófilos	78
24-	Frequência de animais com neutrofilia relativa de acordo com os tratamentos	79
25-	Número absoluto de linfócitos	81
26-	Frequência de animais com linfopenia absoluta de acordo com os tratamentos	82
27-	Número relativo de linfócitos	83
28-	Frequência de animais com linfopenia relativa de acordo com os tratamentos.	84
29-	Influência do transplante tumoral e tratamento com CS no peso dos cérebros	93
30-	Evolução ponderal dos animais influenciada pelos tratamentos	96
31-	Gráfico de sobrevida cumulativa de Kaplan-Meier	99
32-	Frequência de sobrevida no 12DPI em relação aos tratamentos	101

## RESUMO

**Modelo de Implante de Tumor de Walker em Cérebro de Ratos.** Francisco Hélder Cavalcante Félix, Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes, Fortaleza, 2001.

Os importantes efeitos incapacitantes dos tumores do sistema nervoso central (SNC) são desproporcionais a sua baixa incidência. Mesmo assim, entre as doenças neurológicas, ficam atrás apenas dos acidentes vasculares do SNC como causa de morte. Metástases cerebrais constituem os tumores intracranianos mais comuns do adulto, ocorrendo até 10 vezes mais frequentemente que tumores primários. Avanços significativos ocorreram em seu diagnóstico e tratamento, embora mais pesquisa sobre os fenômenos que diminuem o efeito de drogas em metástases cerebrais e tratamentos eficazes para estas patologias sejam cada vez mais necessários. O desenvolvimento de melhores modelos animais de tumores do SNC será necessário para a avaliação *in vivo* de novas formas de quimioterapia (QT) e terapia adjuvante para tumores cerebrais. No presente trabalho, o autor objetivou desenvolver um modelo de tumor cerebral simples e de fácil reprodução utilizando a linhagem W256, além de testar o efeito na sobrevida animal de uma droga largamente usada para o tratamento de efeitos secundários a edema cerebral (dexametasona). O autor também testou uma droga envolvida numa nova proposta de reversão de multirresistência a drogas anti-neoplásicas em tumores cerebrais (ciclosporina – CS). Ratos albinos (Wistar) tiveram o tumor inoculado através de estereotaxia, após a instalação cirúrgica de uma cânula no ponto escolhido (caudato subfrontal direito). O modelo de tumor implantado no cérebro de ratos, simulando uma metástase cerebral, mostrou-se bem sucedido e reprodutível (95% de crescimento tumoral), com baixa incidência de disseminação tumoral extracraniana local (21%), baixa evidência de infecção local (21%), ausência de metástases à distância e ausência de sinais de infecção sistêmica. Os animais sobreviveram uma mediana de 12,5 dias (grupo controle), 13 dias (tratados com veículo da CS), 11 dias (tratados com CS), 9,5 e 9 dias (dexametasona 0,3 e 3,0 mg/kg/dia, respectivamente). As diferenças entre estas medianas não foram significantes (teste de Kruskal-Wallis), embora as diferenças entre as taxas de sobrevida no 12º dia após a inoculação tenham mostrado redução significativa no grupo que recebeu dexametasona 3,0 mg/kg/dia ( $p < 0,05$ ), mas não no grupo tratado com CS (teste de Fischer). O volume tumoral estimado (VTE) no sétimo dia pós-inoculação (7DPI) foi de  $17,08 \pm 6,7 \text{ mm}^3$  no controle e  $12,61 \pm 3,6 \text{ mm}^3$  após tratamento com CS, sem diferença significativa (teste t-Student). O VTE no 9DPI de animais do grupo Tumor foi de  $67,25 \pm 19,8 \text{ mm}^3$ . O tempo de duplicação foi de 24,25 h. O modelo comportou-se como um tumor de características indiferenciadas, apresentando invasividade local comparada à de tumores primários do SNC, prestando-se ao estudo da migração de células tumorais no SNC. Observaram-se fenômenos como degeneração neuronal hidrópica, edema celular neuronal, sinais de morte celular neuronal e gliose, além da presença de infiltrados celulares tumorais e inflamatórios perivasculares. Observaram-se, também, neoformação vascular, formação de nódulos tumorais satélites ao tumor principal e migração celular tumoral no parênquima cerebral normal. Observou-se, além da infiltração parenquimatosa, marcante migração celular tumoral ao longo de tratos de substância branca (corpo caloso) e ao longo dos espaços perivasculares de Virchow-Robins. O modelo apresenta-se como um misto de tumor cerebral intraparenquimatoso e carcinomatose leptomeníngea, podendo ser utilizado para estudar o comportamento e testar formas de tratamento para ambas as patologias. O crescimento tumoral intracerebral induziu aumento do número de neutrófilos no sangue periférico (ANOVA,  $p < 0,01$ ), maior chance de apresentar neutrofilia (teste de Fischer,  $p < 0,01$ ), maior chance de apresentar

linfopenia (teste de Fischer,  $p < 0,01$ ) e aumento do peso dos cérebros dos animais experimentais (teste t-Student,  $p < 0,001$ ) em relação ao controle. Nenhum dos outros valores hematológicos, bioquímicos e biológicos foi alterado de maneira significativa. O tratamento de animais inoculados com tumor com a CS, não alterou nenhuma das medidas hematológicas, bioquímicas ou biológicas em relação aos animais inoculados com tumor e não tratados, exceto o peso dos animais na primeira semana após inoculação tumoral (ANOVA,  $p < 0,05$ ). A CS, dessa forma, induziu significativamente uma caquexia precoce nos animais inoculados com tumor cerebral. O tratamento com CS de animais inoculados com tumor mostrou tendências não significantes a diminuir volume (26%) e massa (7%) tumorais e aumentar número de neutrófilos infiltrantes de tumor (razão de chance - RC = 5,6) e necrose tumoral, indicando a necessidade de posteriores estudos para caracterizar morfológica e funcionalmente a resposta inflamatória local em animais inoculados com tumor e a influência da CS neste processo, além do efeito da CS na angiogênese tumoral. Concluindo, o modelo de W256 intracerebral mostrou-se simples, de fácil execução, reprodutível e útil. Neste modelo, a inoculação tumoral induz modificações hematológicas e biológicas nos animais. A CS pareceu exacerbar a caquexia tumoral neste modelo. A CS, todavia, não alterou a chance de sobrevivência de animais inoculados com tumor cerebral, ao contrário da dexametasona 3,0 mg/kg/dia, que reduziu esta chance. A CS, assim, parece ser mais segura neste modelo tumoral que uma droga largamente utilizada para tratamento de pacientes com metástase cerebral.



## ABSTRACT

**Rat Brain Walker Tumor Implantation Model.** Francisco Hélder Cavalcante Félix, Dissertation submitted as partial fulfillment of requirement to degree of Master in Pharmacology to the post-graduation Pharmacology course of the Ceará Federal University. Supervisor: Dr. Manoel Odorico de Moraes, Fortaleza, 2001.

The disabling effects of central nervous system (CNS) tumors are out of proportion to their low incidence. They're second only to stroke as neurologic mortality causes. Brain metastases are the commonest intracranial tumors in adults, almost 10 times more frequent than primary brain tumors. Their diagnosis and treatment have met significant advances, although much more research about drug resistance and new treatment modalities are needed. New and even better brain tumor animal models will help to evaluate novel drug regimens and adjuvant therapies for CNS neoplasms. In the present work, the author presents a simple and easily reproducible brain tumor model utilizing the tumor cell line W256 transplanted to Wistar rats. They tested a drug widely used for palliative treatment of tumoral brain edema (dexamethasone), for survival impact. They also have tested the effects of a drug newly proposed as multidrug resistance reversal agent (cyclosporin – CS). Wistar albino rats had stereotaxic intracranial tumor inoculation after the surgical installation of a permanent cannula on the area of interest (right subfrontal caudate). The brain tumor model, as a model of metastatic brain disease, was successful, with reproducible tumor growth (95%), low incidence of extracranial tumor implantation (21% local, no distant metastasis) and few evidence of surgical site infection (21%). The median survival of the animals was 12.5 days (control), 13 days (CS vehicle treated), 11 days (CS treated), 9.5 and 9 days (dexamethasone 0.3 and 3.0 mg/kg/day). These differences were not significant, although the survival rates on the 12<sup>th</sup> day post-inoculation have showed a significant survival decrease for the case of dexamethasone 3,0 mg/kg/day ( $p < 0.05$ ), but not for CS treatment (Fischer's Exact Test). The estimated tumor volume was  $17.08 \pm 6.7 \text{ mm}^3$  (control) and  $12.61 \pm 3.6 \text{ mm}^3$  (CS treatment, not significant, Student's t-test). The tumor volume in the 9<sup>th</sup> day post-inoculation was estimated in  $67,25 \pm 19,8 \text{ mm}^3$ . The doubling time was 24.25 h. This model behaved as an undifferentiated tumor, with local invasiveness features compared with that of primary brain tumors. It fits well, in this way, for the study of tumor cell migration on CNS parenchyma. Phenomena like neuronal degeneration, neuron cell edema and death, and gliosis, as well as perivascular cell infiltrates, were seen frequently. One could find, also, neoangiogenesis, satellite tumor growth, and tumor cell migration in normal brain parenchyma. Besides heavy parenchymatous infiltration, it was also disclosed markedly tumor cell migration along white matter tracts, such as callosal fibers and infiltration in the Virchow-Robins perivascular space. The model presents as a dual brain tumor and leptomeningeal carcinomatosis model. It could be used for the study and treatment test in the scenario of these two pathologies. The intracerebral tumor growth induced peripheral blood neutrophil count elevation (ANOVA,  $p < 0.01$ ), higher chance for neutrophilia (Fischer's Exact Test,  $p < 0.01$ ), higher chance for lymphopenia (Fischer's Exact Test,  $p < 0.01$ ) and brain weight increase (Student's t-test,  $p < 0.001$ ) comparing to control. There was no significant change in any of the other hematologic, biochemical and biological parameters tested. CS treatment did not alter any of the tests, as compared to non-treated brain tumor animals. The only exception was the mean animal weight on the first week post-inoculation (ANOVA,  $p < 0.05$ ). CS, in this way, was responsible for an early cachexia in the brain tumor inoculated animals. CS treatment of brain tumor animals did show non-significant effects indicating a volume (26%) and weight tumor decrease, and tumor infiltrating neutrophil increase (odds ratio - OR = 5.6). This indicates the necessity to further study morphologically and functionally the local inflammation in brain tumor inoculated

animals, as well the effects of CS administration. In conclusion, the W256 intracerebral tumor model is simple, easily performed, reproducible and of great potential utility. In this model, tumor inoculation can lead to hematologic and biologic modifications in the experimental animals. CS could apparently lead to early tumor cachexia in this tumor model. However, CS treatment did not modify the survival chance of the brain tumor animals, in sharp contrast to dexamethasone 3.0mg/kg/day, a much-used drug in the treatment of brain tumors, which decreased the animal survival.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Neoplasia maligna (câncer)

O sentido literal da palavra neoplasia é “novo crescimento”, e este crescimento constitui o neoplasma. O termo “tumor” foi originalmente aplicado ao aumento de volume causado pela inflamação. Hoje em dia, no entanto, é utilizado como sinônimo de neoplasia. Câncer é o termo comumente utilizado para os tumores malignos. Segundo o oncologista inglês Sir Rupert Willis (COTRAN et al, 1994):

“Um neoplasma é uma massa anormal de tecido, o qual apresenta crescimento incoordenado e exagerado em relação aos tecidos normais e persiste dessa forma mesmo depois de cessado o estímulo que provocou a transformação.”

A isto se pode acrescentar que a proliferação da massa anormal parece desprovida de “propósito”, agride o organismo hospedeiro e é virtualmente autônoma a este. O crescimento do neoplasma parece ocorrer às expensas das reservas metabólicas e nutricionais do hospedeiro. Este último, assim por dizer, fenece à medida que o tumor floresce. Hoje está claro, no entanto, que a autonomia tumoral é relativa: depende da vasculatura, nutrição e estímulos endócrinos e parácrinos do hospedeiro (COTRAN et al, 1994).

O desenvolvimento da malignidade dá-se através da ocorrência de vários eventos independentes entre si. Na base do fenômeno neoplásico, encontramos alterações na seqüência de nucleotídeos do ácido desoxirribonucléico (ADN) que constitui o repositório da informação genética celular. Tais alterações são mutações de genes (elementos discretos do genoma que se correlacionam com a expressão de proteínas celulares). Mutações seqüenciais de genes relacionados ao controle da proliferação celular podem acumular-se num único clone celular, originando uma expressão de potencial tumoral ou metastático. A carcinogênese, dessa forma,

envolve uma série de eventos genéticos sequenciais, cada um aumentando a capacidade de um determinado clone celular de multiplicar-se e invadir tecidos vizinhos.

Mutações de ganho de função podem ativar oncogenes, que transcrevem proteínas com função regulatória positiva de eventos celulares ligados à estimulação do ciclo celular de duplicação e proliferação (CORTNER & WOUDE, 1997). Os produtos de genes supressores de tumor são proteínas com função regulatória negativa de crescimento e sua perda de função também promove a carcinogênese (PERKINS & STERN, 1997).

## **1.2 Tumores do sistema nervoso central (SNC)**

Os tumores do SNC são neoplasias que, a despeito de sua baixa incidência, têm efeitos incapacitantes desproporcionalmente grandes. Dentre as doenças neurológicas, perdem apenas para acidentes vasculares do SNC como causa de morte (BLACK & LOEFLER, 1997).

O termo “tumor do SNC” significa clinicamente qualquer tumor dentro da cavidade craniana ou canal medular, estando ou não no interior do parênquima do SNC. A localização e controle das funções somáticas definem o tipo de déficit neurológico que um dado paciente irá experimentar devido ao crescimento tumoral. A velocidade de progressão clínica relaciona-se com os elementos histológicos e relações anatômicas dentro do SNC (BLACK & LOEFFLER, 1997).

Tumores do SNC produzem numerosos sintomas neurológicos devido a seu tamanho, localização e invasividade local. Geralmente, destroem os tecidos nos quais se situam e deslocam aqueles circunjacentes. Constituem causa freqüente de hipertensão intracraniana (HIC). Acima de tudo, a maioria é letal. Vários tipos tumorais, primários ou secundários, ocorrem na cavidade craniana e no canal medular, alguns mais freqüentes que os outros. Alguns demonstram a propensão de ocorrer em locais específicos do SNC, produzindo síndromes distintas. As taxas de crescimento e invasividade dos tumores variam desde lesões altamente malignas (como o glioblastoma multiforme) até neoplasias benignas de progressão lenta, não

invasivas (como os meningiomas). Tais características são importantes para explicar evolução clínica distinta e avaliar prognóstico após tratamento (ADAMS et al, 1997).

De forma geral, os tumores do SNC constituem um problema importante dentre as neoplasias. Em 1993, houve cerca de 400 mil mortes por câncer nos EUA (ADAMS et al, 1997). Destas, o número atribuível a neoplasmas primários do SNC foi de 12 mil, ou em torno de 5 casos por 100 mil habitantes (ADAMS et al, 1997; LEVIN et al, 1997). Algo em torno de 20% dos pacientes com câncer teve envolvimento intracraniano na evolução da doença neoplásica (PERCY et al, 1972; WALKER et al, 1985; ADAMS et al, 1997). Nas crianças, tumores primários do SNC são a segunda malignidade em frequência, perdendo apenas para as leucemias (OLIVEIRA et al, 1986; DUFFNER et al, 1986, GEYER & BERGER, 1990; MAPSTONE & WARF, 1991; ADAMS et al, 1997).

### **1.2.1 Metástases cerebrais**

Metástases são implantes tumorais descontínuos ao tumor primário. A ocorrência de metástase inequivocamente classifica um tumor como maligno, uma vez que, por definição, tumores benignos não metastizam. A invasividade dos cânceres permite-lhes penetrar vasos sanguíneos, linfáticos e cavidades orgânicas, encontrando a oportunidade de disseminação. Com poucas exceções, todos os cânceres podem metastizar. As principais exceções são a maioria das neoplasias de células gliais do SNC (gliomas) e carcinomas basocelulares da pele. Ambos são neoplasias altamente invasivas, mas raramente metastizam. Fica evidente que as propriedades de invasão e metástase são separáveis. Cerca de 30% de todos os pacientes recém-diagnosticados com tumores sólidos (excluindo cânceres de pele outros que não o melanoma) apresentam-se com metástases ao diagnóstico. A disseminação metastática reduz enormemente a possibilidade de cura. Logo, muito mais que o tratamento do tumor primário, nenhum outro avanço beneficiaria mais os pacientes do que métodos para evitar a disseminação tumoral distante (excetuando-se, é claro, a prevenção do câncer) (COTRAN et al, 1994).

O tumor secundário é formado por uma população celular com características diversas do primário que o originou. A formação das metástases envolve uma série de eventos genéticos e fenotípicos que permitem às células neoplásicas transitar de seu local de origem para outros tecidos. Tais passos são conhecidos como “cascata metastática”, e caracterizam o processo de metastização. A cascata metastática inclui a invasão local das células do tumor primário, penetração na circulação próxima ao tumor, interação com células sanguíneas, implantação e extravasamento das células tumorais em sítios distantes e interação com o órgão alvo (COTRAN et al, 1994; FIDLER, 1997).

Metástases cerebrais desenvolvem-se quando células tumorais oriundas de órgãos fora do SNC se disseminam para o cérebro. Constituem os tumores intracranianos mais comuns do adulto, ocorrendo com uma frequência 10 vezes maior que os tumores primários. São também as complicações estruturais neurológicas mais comuns do câncer somático, e a segunda causa de “déficit” neurológico em pacientes com câncer, ficando atrás apenas das encefalopatias metabólicas (PATCHELL, 1997). Uma grande proporção de metástases cerebrais permanece sem diagnóstico. Com o avanço das técnicas de neuro-imagem e estudos de autópsia mais cuidadosos em pacientes com câncer, tornou-se claro que as metástases cerebrais, como um grupo, são os tumores do SNC mais comuns na população (WALKER et al, 1985). Além disso, a frequência de metástases cerebrais pode estar aumentando a medida que são desenvolvidas técnicas de imagem mais sensíveis para detectar tumores pequenos e aumenta a sobrevivência de pacientes de câncer em geral (BOHNEN et al, 1997).

O SNC constitui um sítio favorável ao implante secundário, o mesmo ocorrendo em 25 a 35% de todos os pacientes com câncer (PERCY et al, 1972; COTRAN et al, 1994; LOEFFLER et al, 1997; ADAMS et al, 1997). O tipo mais comum de metástase nessa região é a parenquimatosa. Os compartimentos anatômicos cranianos mais comumente envolvidos são a díploe, dura-máter, as leptomeninges (aracnóide e pia) e o parênquima cerebral. O envolvimento intracranial é calculado em 25% dos pacientes com câncer, enquanto o intradural, em 20% e o intraparenquimatoso, em 10% dos pacientes. Estudos clínicos indicam

que implantes múltiplos constituem 53% dos casos, sendo esta característica específica para determinados tipos tumorais (PERCY et al, 1972; LOEFFLER et al, 1997).

Os cinco sítios primários mais comuns são pulmões, mama, pele (melanoma), rins e trato gastrintestinal (TGI), dando conta de cerca de 80% de todas as metástases (DE GIROLAMI et al, 1994). Alguns tumores raros (ex.: coriocarcinoma) têm elevada tendência a metastizar para o cérebro, enquanto outros tumores mais comuns (ex.: próstata) quase nunca invadem o SNC, mesmo quando metastizam para ossos adjacentes (DE GIROLAMI et al, 1994). Os tumores primários mais comuns em pacientes menores de 21 anos são sarcomas (rabdmiossarcoma, osteossarcoma, sarcoma de Ewing) e tumores de células germinativas (SCHOENBERG et al, 1976).

O estudo mais completo disponível sobre metástases cerebrais foi conduzido em 1973-74. A incidência anual relatada foi de 8,4 por 100 mil habitantes (9,7 para sexo masculino e 7,1 para sexo feminino). A incidência anual ajustada para idade subia rapidamente após os 35 anos e tal aumento era mais abrupto em homens do que mulheres. O tumor primário mais comum foi o carcinoma broncogênico (incidências anuais, para cada 100 mil habitantes, de 6,6 para homens e 2,2 para mulheres) (WALKER et al, 1985). A ocorrência de metástases cerebrais em tumores sólidos infantis é bem menor, sendo referida entre 6-10%. Neuroblastomas têm uma tendência muito pequena de metastizar para o SNC, provavelmente devido à raridade de sua disseminação hematogênica para o pulmão (SCHOENBERG et al, 1976).

De uma forma geral, metástases cerebrais, especialmente de carcinomas, têm bordas bem definidas que empurram os tecidos normais circunjacentes. Focos de necrose e hemorragia podem estar presentes. Microscopicamente podem tanto se assemelhar a seus primários quanto mostrar-se indiferenciados, sem indicação sobre seu tecido de origem (BOHNEN et al, 1997).

O mecanismo comum de metástase para o SNC é a disseminação hematogênica, através da circulação arterial. Mais de 70% dos pacientes que desenvolvem metástases cerebrais também são portadores de tumores pulmonares

primários ou metástases pulmonares de outros primários. Isto levou alguns autores a denominar as metástases cerebrais de “implantes terciários”, posto que ocorreriam a partir de implantes secundários, especialmente pulmonares (THIERY & SASTRE-GARAU, 1995). A localização mais freqüente das metástases cerebrais é a junção entre substância cinzenta e substância branca, devido ao estreitamento dos vasos que ocorre nesta área e que serve como “armadilha” para êmbolos tumorais. Também tendem a ser comuns nas “áreas de borramento”, zonas de circulação arterial na fronteira dos principais territórios vasculares do SNC. A distribuição de metástases ao longo do SNC segue aproximadamente o peso relativo (e fluxo sanguíneo) de cada área (**figura 1**). Cerca de 80% das metástases localizam-se nos hemisférios do SNC, 15% no cerebelo e 5% no tronco do SNC (SCHOENBERG et al, 1976).

Metástases cerebrais podem ser únicas ou múltiplas. Metástases cerebrais de cólon, mama e rim são, em geral, únicas, enquanto o melanoma e câncer de pulmão têm maior tendência de produzir múltiplas lesões. O advento da ressonância nuclear magnética (RNM) tem mostrado que a incidência de metástases cerebrais múltiplas é maior do que se pensava. Hoje sabe-se que 2/3 a 3/4 dos pacientes com lesões do SNC têm múltiplos sítios ao diagnóstico (BOHNEN et al, 1997).

Uma das complicações mais importantes das metástases cerebrais é o desenvolvimento de edema cerebral e HIC. A quantidade de edema varia entre tipos diferentes de tumor e pode mesmo variar bastante entre nódulos diferentes de um mesmo tumor num dado paciente. O melanoma metastático é particularmente conhecido por induzir edema (BOHNEN et al, 1997).

### **1.2.2 Tratamento de metástases cerebrais**

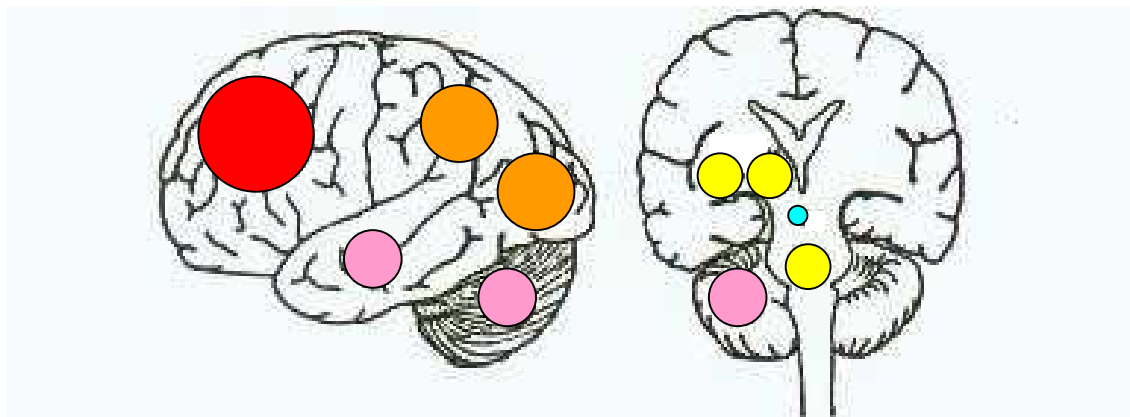
Um dos desafios da oncologia clínica é o tratamento da invasão neoplásica do SNC. Alguns pacientes selecionados beneficiam-se com tratamentos combinados da doença metastática do SNC (LOEFFLER et al, 1997). Avanços significativos ocorreram em seu diagnóstico e tratamento, permitindo que a maioria dos pacientes não morra devido aos implantes secundários, experimente palição eficaz dos



sintomas neurológicos e aumento significativo de sobrevida (BOHNEN et al, 1997). O tratamento é necessário para a maioria dos tumores do SNC, incluindo cirurgia, radioterapia (RT) e quimioterapia (QT). No momento em que os tumores do SNC começam a produzir sintomas neurológicos, seu tamanho é geralmente entre 20 e 50 g (2 a  $5 \times 10^{10}$  células) (SHAPIRO, 1987). Devido ao volume craniano limitado, os tumores tornam-se letais quando atingem cerca de 100 g ( $10^{11}$  células) (WEN, 1997). Alguns tumores benignos podem ser ressecados quase completamente, permitindo curar o paciente. Para a maioria dos tumores malignos isto não é possível. Mesmo a “ressecção total macroscópica” remove apenas cerca de 90% do tumor, reduzindo a carga tumoral a cerca de 2 a 5 g (2 a  $5 \times 10^9$  células).

A RT pode reduzir mais duas unidades log (uma unidade log equivale a um fator de 10 vezes, duas equivalem a um fator de 100 vezes, etc) de células, deixando 2 a  $5 \times 10^7$  células sobreviventes, enquanto a QT pode reduzir outro log tumoral (restando 2 a  $5 \times 10^6$  células). Infelizmente, os tratamentos combinados atuais não conseguem reduzir a carga tumoral abaixo de  $5 \times 10^5$  células, o suficiente para que os mecanismos imunológicos do organismo erradiquem o tumor remanescente. Como resultado, o tratamento destes tumores raramente é curativo (SHAPIRO, 1987).

Não há dúvida que o tratamento beneficia a maioria dos pacientes. Aqueles que não se submetem a tratamento têm uma sobrevida mediana de apenas 4 semanas, todos vindo a morrer devido ao crescimento tumoral intracerebral (MARKESBERY et al, 1978).



**Figura 1: Localização dos sítios de metástase tumoral no SNC.** As cores nos círculos indicam porcentagem de tumores metastáticos localizados em cada sítio: vermelho 25% (lobo frontal), laranja 15% (lobos parietal e occipital), rosa 10% (lobo temporal e cerebelo), amarelo 5% (gânglios da base, tálamo, tronco cerebral), azul 1% (mesencéfalo) (Modificado de PATCHELL, 1997).

O edema vasogênico que ocorre nos tecidos circunjacentes aos tumores do SNC contribui significativamente para a morbidade associada a estas lesões. Este edema resulta da ruptura da barreira hematoencefálica (BHE), permitindo o acúmulo de exsudato rico em proteínas no espaço extravascular. O edema vasogênico tende a espalhar-se mais rapidamente na substância branca que na cinzenta (WEN, 1997).

A BHE constitui um conjunto de características estruturais da microvasculatura do SNC que impede o livre trânsito de células e moléculas através do endotélio vascular cerebral. Suas características principais são: (1) junções estreitas interendoteliais elaboradas e número reduzido de vesículas citoplasmáticas (indicando reduzido movimento transcelular); (2) elevada resistência elétrica transendotelial; (3) impermeabilidade a marcadores eletrodensos; (4) permeabilidade restrita a solutos polares e macromoléculas. Além disso, sabe-se que a presença de astrócitos é essencial para a indução e manutenção da BHE. Astrócitos perivasculares encontram-se em estreita associação com a membrana basal das células endoteliais, tanto diretamente quanto através de processos citoplasmáticos. A liberação de mediadores químicos pelos astrócitos parece estar relacionada com a indução das características da BHE no endotélio (ALLT & LAWRENSEN, 1997).

A desorganização da BHE no seio dos tumores do SNC decorre da produção de fatores de crescimento como fator de crescimento de endotélio/ permeabilidade vascular (VEG/PF) (SENGER et al, 1993), glutamato (BAETHAMNN et al, 1989) e leucotrienos (LT) (BLACK et al, 1985) que aumentam a permeabilidade dos vasos tumorais, e pela ausência de junções estreitas intercelulares no endotélio, a qual se desenvolve em resposta a fatores angiogênicos, como fator de crescimento de fibroblastos básico (b-FGF) (TAKAHASHI et al, 1992) e VEG/PF. (SENGER et al, 1993).

A maioria dos pacientes com tumor cerebral e edema peritumoral pode ser bem conduzida com corticosteróides. São indicados em qualquer paciente com tumor cerebral e edema peritumoral sintomático. Seu mecanismo envolve a redução da permeabilidade de capilares tumorais, limitando o extravasamento de sódio,

proteínas e água. (NAKAGAWA et al, 1984) Também podem aumentar o *clearance* do edema peritumoral facilitando o transporte de fluido para o sistema ventricular (WEN, 1997). Ocasionalmente, outras medidas são necessárias.

Todo paciente com metástase cerebral deve iniciar a corticoterapia ao diagnóstico. A dexametasona é preferida por ter efeito mineralocorticóide mínimo e pouca tendência a induzir psicose (FISHMAN, 1975). Mais de 70% têm melhora sintomática após iniciar a corticoterapia (PATCHELL, 1997). Os pacientes podem experimentar melhora sintomática já nas primeiras 24 a 72 h, embora estudos de neuro-imagem só venham a demonstrar redução de edema pelo menos 1 semana após o uso de corticosteróides. Eles reduzem sintomas do paciente e morbidade cirúrgica, ao reduzir o edema cerebral e a pressão intracraniana. (WEN, 1997). A sobrevida mediana de pacientes com metástases no SNC tratados apenas com esteróides é de 2 meses (CHANG et al, 1992). A dose inicial é de 16 mg/dia, dividido em doses de 6/6 h, e deve ser gradualmente reduzida e eventualmente interrompida para minimizar toxicidade. Cerca de 10% dos pacientes não toleram uma redução dos esteróides e voltam a ser sintomáticos (MARKESBERY et al, 1978; PATCHELL, 1997).

Apesar de sua utilidade, os corticosteróides estão associados a grande número de efeitos colaterais. Três grupos de complicações têm particular interesse nos pacientes com tumor cerebral: complicações gastrintestinais, infecções oportunistas e miopatia por esteróides (WEN, 1997).

Agentes quimioterápicos exercem seus efeitos interferindo com a multiplicação celular. Uma vez que várias células normais também têm a característica de multiplicar-se, a maioria dos quimioterápicos também é tóxica para tecidos normais, como aqueles da medula óssea (MO). O objetivo da QT é utilizar drogas com toxicidade seletiva contra o câncer.

Pacientes selecionados com metástases cerebrais também podem ser tratados com QT, embora sua eficácia não esteja estabelecida. Infelizmente, a maioria dos quimioterápicos administrados sistemicamente que demonstram eficácia contra câncer somático têm-se mostrado sem efeito contra metástases cerebrais da mesma população celular. Existem várias razões para isso. A mais importante é a presença

da BHE, que limita a passagem de drogas hidrossolúveis para o cérebro. Estratégias foram desenvolvidas para “romper” a BHE, utilizando agentes como manitol e análogos da bradicinina para aumentar a passagem de drogas hidrossolúveis para o tumor. Infelizmente tais abordagens têm tido apenas mínimo efeito (WEN, 1997). No entanto, sabe-se que os capilares do leito tumoral não reproduzem as características da BHE, tendo maior permeabilidade aos antineoplásicos que o parênquima cerebral normal. A permeabilidade da BHE aos antineoplásicos depende das alterações induzidas pelos tumores. Na área peritumoral e no líquido cefalorraquiano (LCR) na cavidade pós-operatória de tumores cerebrais humanos, não ocorre concentração até níveis terapêuticos de antineoplásicos, como a cisplatina. Após a remoção cirúrgica de uma metástase cerebral, a permeabilidade a antineoplásicos cai, mostrando o reparo da BHE (NAKAGAWA et al, 1996). Dessa forma, células remanescentes no local podem escapar da ação de drogas antineoplásicas e crescer. A ocorrência de maior incidência de metástases cerebrais após QT sistêmica de tumores sólidos sugeriu a denominação de “santuário farmacológico” para o compartimento limitado pela BHE, onde as células tumorais poderiam “escapar” da ação das drogas antineoplásicas (TSUKADA et al, 1983).

O emprego de QT para tratamento de metástases cerebrais da maioria dos tumores primários tem sido de pouco sucesso. Ela pode ter papel no tratamento de lesões pequenas, assintomáticas, secundárias a tumores altamente quimiossensíveis (mama, carcinoma pulmonar de pequenas células, tumores germinativos). Outros tratamentos, como cirurgia ou RT, devem ser sempre associados (PATCHELL, 1997). Pesquisas sobre os fenômenos que diminuem o efeito de drogas em metástases cerebrais e novos tratamentos para estas patologias são cada vez mais necessários.

### **1.3 Multirresistência a drogas antineoplásicas (MRD): implicações para tumores do SNC**

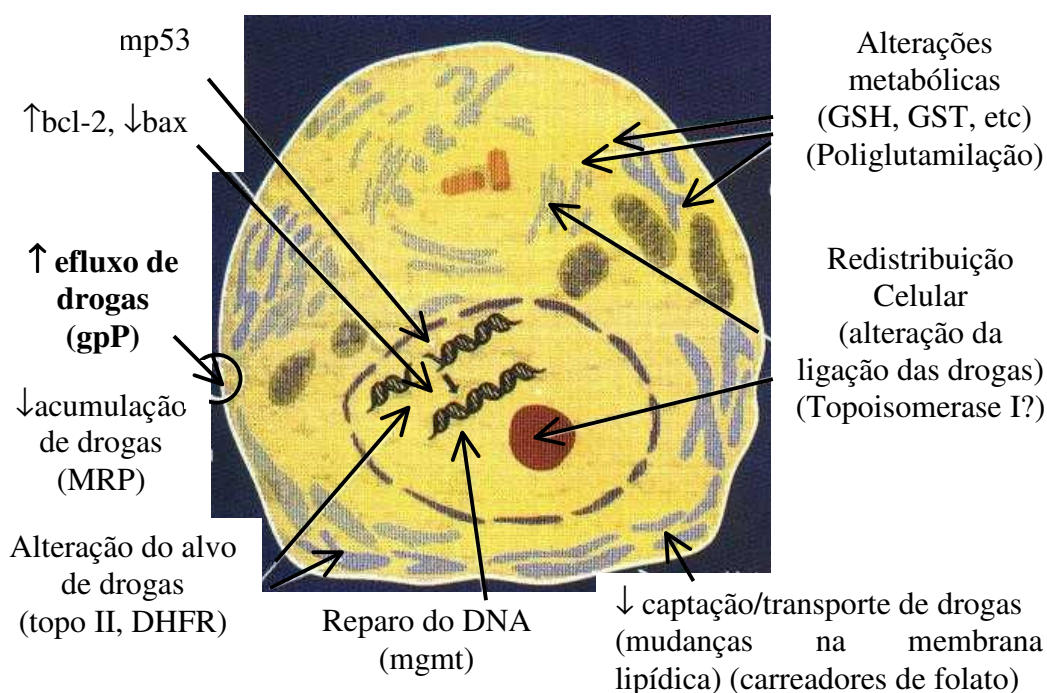
Os tumores sofrem mutações espontâneas que levam ao desenvolvimento de resistência a agentes citotóxicos aos quais nunca foram expostos anteriormente. Isto

pode ocorrer precocemente, antes da detecção clínica da neoplasia, de forma que, no momento do diagnóstico, a maioria dos tumores contém clones resistentes (**figura 2**). Isto mostra a importância de se utilizarem combinações de agentes antineoplásicos sem resistência cruzada tão precocemente quanto possível a fim de alcançar a cura (MILOSAVLJEVIC, 1997).

Células tumorais podem apresentar resistência a múltiplas drogas antineoplásicas (multirresistência a drogas, MRD). Estas células apresentam resistência cruzada a várias classes de drogas antineoplásicas naturais (alcalóides da *Vinca*, antraciclinas, taxanos, epipodofilotoxinas) e a vários outros agentes farmacológicos relacionados entre si pelas características: substâncias lipofílicas, peso molecular (PM) entre 300-900 D, transporte para o meio intracelular aparentemente por difusão passiva (BECK & DALTON, 1997).

MRD mostrou estar associada, pelo menos em parte, à expressão de glicoproteína P (gpP) (**figura 3**). Esta constitui uma proteína integral da membrana celular com PM de cerca de 170 kD que parece funcionar como bomba de efluxo dependente de energia capaz de transportar uma grande quantidade de agentes estruturalmente não relacionados, como o etoposide (ET), taxol, vincristina (VCR), e vários compostos naturais (BELLAMY, 1996). A gpP é normalmente encontrada na superfície apical de hepatócitos, no epitélio colunar do jejuno e cólon, na membrana de borda em escova das células dos túbulos proximais renais, no endotélio da BHE e na membrana hemato-testicular. Esta localização específica sugere um papel excretor para a gpP (BURGIO et al, 1996). Foi proposto que esta proteína tem um papel na excreção de xenobióticos (toxinas de origem natural) do organismo (BURT & THORGEIRSSON, 1988; GOTTESMAN & PASTAN, 1988).

## MECANISMOS CELULARES DE MULTIRRESISTÊNCIA A DROGAS



**Figura 2: Mecanismos celulares de resistência a drogas antineoplásicas.** Entre os principais estão: alteração de genes do ciclo celular (bcl-2, bax, mp53), alterações metabólicas (glutation celular), redistribuição dos ligantes celulares das drogas, diminuição da captação ou transporte de drogas, reparo de danos ao DNA, alteração de proteínas alvo de drogas, e finalmente, proteínas transmembrana capazes de diminuir a acumulação ou aumentar o efluxo de drogas (MRP, gpP); ↑ = aumento, ↓ = diminuição (Modificado de BECK, 1997).

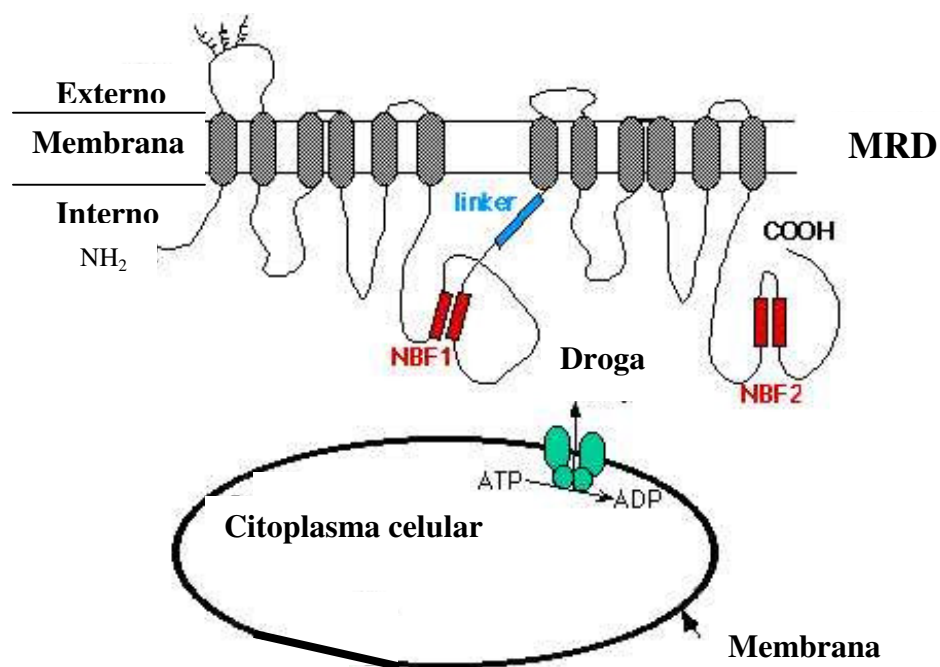
Um dos objetivos dos estudos de resistência a drogas antineoplásicas é encontrar um meio clinicamente aplicável de revertê-la. Considera-se que a reversão da MRD beneficiaria tanto pacientes portadores de tumores hematológicos quanto tumores sólidos (BELLAMY, 1996). Vários compostos têm atividade moduladora da gpP, entre eles o imunossupressor ciclosporina (CS) e PSC833 (um derivado não imunossupressor da CS). CS e PSC833 são potentes inibidores da ligação de drogas com gpP e de MRD. Os principais problemas do uso de CS por tempo prolongado são a imunossupressão e toxicidade renal (JETTÉ et al, 1996).

O gene MDR1, que codifica a gpP em seres humanos, foi encontrado em células endoteliais cerebrais e pode ter um papel na formação da BHE. O significado do gene MDR1 nas falhas de tratamento de tumores do SNC não está claro, embora alguns gliomas e tumores neuroectodérmicos primitivos o expressem em níveis aumentados (MILOSAVLJEVIC, 1998).

Foi descrita a presença de gpP nos capilares cerebrais (CORDON-CARDO et al, 1989). Na BHE, a gpP é responsável pela permeabilidade seletiva a alguns compostos hidrofóbicos (nicotina, etanol) mas não a outros (quimioterápicos naturais, como alcalóides da *Vinca*) (TATSUTA et al, 1992). Demonstrou-se, com o auxílio de microdiálise, que a principal explicação para a baixa permeabilidade da CS no SNC, apesar de sua característica altamente lipofílica, se deve a presença da gpP no endotélio cerebral (SAKATA et al, 1994). A presença de gpP nas células endoteliais dos capilares tumorais neoformados, nos tumores do SNC, representa um novo papel da gpP na resistência destes tumores a drogas antineoplásicas.

Tumores cerebrais humanos primários e secundários mostraram expressar gpP em seu endotélio, ao contrário de tumores extracranianos. Além disso, demonstrou-se que esta expressão endotelial independe da expressão da gpP nas células tumorais (TÓTH et al, 1996).





**Figura 3: Estrutura prevista esquemática da gpP, e seu mecanismo de ação.** A gpP é uma proteína transmembrana de cerca de 170 kDa, formada por uma cadeia polipeptídica única, dividida em duas porções homólogas de igual comprimento. Divide-se em 12 porções transmembrana e 6 alças extracelulares. Próximo à porção C-terminal são encontradas duas regiões ligantes de nucleotídeos (NBF-1 e 2), envolvidas na hidrólise de ATP. A gpP parece possuir a capacidade de ligar-se a substâncias hidrofóbicas de estrutura díspar, enquanto estas se encontram dissolvidas na fase lipídica da membrana. Através da lise de ATP, a gpP transporta estas substâncias para o meio extracelular, evitando seu acúmulo no citoplasma (BELLAMY, 1996).

O uso de moduladores de MRD pode aumentar a captação de quimioterápicos pelo SNC, mas este efeito pode ser complicado pela modificação da farmacocinética do quimioterápico pelo agente modulador. TATSUTA et al (1992) haviam demonstrado que a gpP na membrana luminal da BHE bloqueia o acúmulo de VCR no cérebro de camundongos. COLOMBO et al (1994), mostraram que a combinação entre CS e doxorubicina (DX) aumenta de forma importante a toxicidade desta última em camundongos, além de não aumentar a concentração da DX no SNC. BURGIO et al (1996) demonstraram que o aumento da concentração de ET no SNC de ratos tratados com CS parece dever-se não à ligação da CS com gpP da BHE, mas à ligação da CS com a gpP renal, levando à diminuição do clearance renal de ET e conseqüente aumento de sua concentração plasmática.

Sugere-se que a presença de gpP no endotélio de tumores cerebrais e cérebro normal adjacente possa excluir drogas antineoplásicas, sendo um novo mecanismo de resistência a drogas. A abordagem de “abrir” seletivamente a BHE pela administração de inibidores de gpP pode teoricamente aumentar a disponibilidade de drogas antineoplásicas nos tumores do SNC. No entanto, a neurotoxicidade pode ser igualmente elevada (TÓTH et al, 1996).

#### **1.4 Imunologia dos transplantes e tumores experimentais no SNC**

O complexo principal de histocompatibilidade (CPH) engloba uma família de moléculas de superfície celular que constituem antígenos envolvidos nas respostas de rejeição a transplantes de tecido em mamíferos. Moléculas do CPH dividem-se em duas classes: I e II, diferentes por sua distribuição tecidual, estrutura e funções. A presença de antígenos do CPH é imprescindível para a ocorrência de reações inflamatórias contra transplantes. Moléculas classe I medeiam a ação

tecidual de linfócitos T citotóxicos (Tc) CD8+ ativados, enquanto células contendo moléculas classe II estão envolvidas na ativação de linfócitos T auxiliares (Ta) CD4+ através da apresentação de epítomos antigênicos. Tais células são conhecidas como células apresentadoras de antígenos (CAA) (BACH & SACHS, 1987; SELL et al, 1996).

Após o transplante de tecido para um receptor da mesma espécie (alotransplante), segue-se uma seqüência de eventos: (1) 2 – 3 dias após o transplante inicia-se a revascularização, a qual deve se completar entre 6 – 7 dias; (2) uma semana após o transplante surge um acúmulo perivascular de células mononucleares, seguindo-se infiltração e edema local; (3) linfócitos Tc CD8+ são responsáveis pela lesão citotóxica direta, enquanto linfócitos Ta CD4+ contribuem para a inflamação vascular e trombose; (4) cerca de 10 dias após o transplante, o processo está se concluindo com trombose vascular e necrose do tecido transplantado. A lesão vascular é mediada pela deposição de anticorpos e complexos antígeno-anticorpo, através da ativação do complemento e da cascata da coagulação, e com participação ativa de neutrófilos. Estas últimas células são importantes na necrose vascular fibrinóide e na rejeição hiperimune de enxertos (SELL et al, 1996).

O SNC é tido como “sítio imunologicamente privilegiado” devido à maior facilidade com que alo- e xenoenxertos, tumorais ou não, crescem no tecido nervoso se comparado ao restante do organismo (GREENE, 1952; SCHEINBERG et al, 1965; BARKER & BILLINGHAM, 1977). As principais diferenças nos arcos aferentes e eferentes da resposta imune no SNC constituem (SLOAN et al, 1991; KNOPF et al, 1995):

- a) A drenagem linfática do SNC é mal definida, embora já se tenha demonstrado que macromoléculas inoculadas centralmente possam atingir linfonodos cervicais.
- b) CAA clássicas (células dendríticas) expressando moléculas do CPH classe II não estão presentes no SNC, exceto no plexo coróide.
- c) A BHE intacta poderia prevenir a recirculação de linfócitos para o SNC, inibindo a vigilância imunológica; linfócitos ativados, no entanto, são

capazes de atravessar a BHE.

- d) Moléculas do CPH classe I, importantes na expressão de antígenos de reconhecimento “próprio” e “não-próprio”, presentes na maioria dos tecidos do organismo, não são expressas em níveis detectáveis no SNC intacto.

O tipo celular responsável pelos eventos iniciais na rejeição de enxertos para o SNC é provavelmente o macrófago tissular residente do tecido nervoso, ou micróglia (SLOAN et al, 1991). Células da micróglia expressam constitutivamente moléculas do CPH classe II, além de responderem prontamente com *upregulation* destas moléculas e produção de citocinas quando estimuladas (FORD et al, 1996). Elas são capazes de iniciar respostas imunes mediadas pela ativação de linfócitos T<sub>H</sub> CD4<sup>+</sup> e liberação de interleucina (IL)-2. Distintamente de CAA clássicas, células da micróglia induzem a morte por apoptose dos linfócitos T<sub>H</sub> logo após sua ativação. Isto poderia ter implicação na tolerância de antígenos seqüestrados no SNC (FORD et al, 1996).

Embora de forma menos nítida que em sítios extraneurais, a resposta inflamatória contra enxertos no SNC, com infiltrado celular linfocitário formado particularmente por células T<sub>C</sub> CD8<sup>+</sup> capazes de produzir citocinas citotóxicas, ocorre no SNC (SLOAN et al, 1991). O uso de CS demonstrou diminuir o infiltrado inflamatório linfocitário e a rejeição destes enxertos (SLOAN et al, 1991). A retirada do tratamento com CS induziu rejeição de xenoenxertos, acompanhada de infiltração por granulócitos ou células polimorfonucleares (PMN) (MORIOKA et al, 1992).

Tumores cerebrais são tipicamente acompanhados por infiltrados inflamatórios que variam consideravelmente em extensão e composição, dependendo do tipo tumoral examinado. Estudos de imunohistoquímica demonstraram a presença de macrófagos, linfócitos e granulócitos infiltrantes de tumor (STEVENS et al, 1988). A presença de macrófagos parece estar relacionada diretamente com a quantidade de edema cerebral e a malignidade tumoral (SHINONAGA et al, 1988). MORIOKA et al (1992) compararam diferenças de infiltrados inflamatórios encontrados em tumores intracerebrais experimentais em

ratos. Num modelo de W256 intracerebral, simulando metástase cerebral, mostrou-se intenso infiltrado por PMN, linfócitos e macrófagos. Já no modelo de glioma RG-2, demonstrou-se infiltrado macrofágico e edema cerebral de mesma intensidade, porém menor infiltrado linfocitário e ausência de PMN, em relação ao modelo de W256. Observou-se, ainda, diferença importante na extensão de áreas de necrose tumoral entre os dois tipos de modelos, com grandes áreas no modelo de metástase e virtual ausência no modelo de glioma. Os autores sugeriram que a explicação poderia ser a maior imunogenicidade do modelo de metástase com W256, indicada pela presença de infiltrado mais intenso por linfócitos Tc CD8+, expressão de moléculas do CPH classe I e presença de granulócitos. Estes autores ainda sugeriram que a reação imune ao transplante de W256 intracerebral pode comparar-se à reação contra enxertos. Modelos animais de imunogenicidade tumoral utilizando transplante de gliomas demonstraram que tumores imunogênicos estavam associados com maior infiltrado inflamatório tumoral e maior sobrevida animal após implante, indicando uma função da reação imune antitumoral no SNC (TZENG et al, 1991).

Análise de infiltrados mononucleares em metástases cerebrais de seres humanos mostraram a presença de macrófagos e linfócitos Tc CD8+ em quantidade variável, e linfócitos Ta CD4+ e B em pequeno número de casos (ROSSI et al, 1991). As células inflamatórias agrupavam-se principalmente em agregados perivascularares, porém um número variável de macrófagos infiltrava o tumor e o parênquima adjacente. Infiltrados de macrófagos poderiam indicar melhor prognóstico em alguns tipos de metástases, com um papel discutível em limitar a infiltração tumoral no parênquima normal. No entanto, não se demonstrou correlação entre expressão de moléculas do CPH classe I e infiltrado inflamatório em metástases cerebrais em seres humanos. Os autores demonstraram a existência de algum grau de resposta imune local a tumores cerebrais metastáticos humanos, mas sem diferença significativa em relação a metástases extradurais ou a gliomas malignos (ROSSI et al, 1991). Adicionando ainda mais dúvidas ao papel da resposta imune no prognóstico de tumores cerebrais, experiências de imunoterapia adotiva envolvendo a infiltração intralesional de tumores cerebrais humanos com células

mononucleares ativadas por linfocinas (LAK) e IL-2 não demonstraram efeito na sobrevida dos pacientes (MERCHANT et al, 1988).

#### **1.4.1 Ciclosporina (CS): imunomodulador específico de linfócitos T**

A ciclosporina (CS) é um polipeptídeo cíclico hidrofóbico formado por 11 aminoácidos que pode ser extraído de várias espécies de fungos, dentre os quais, o *Tolypocladium inflatum*, de onde foi inicialmente isolado. A sua meia-vida plasmática é de 17 a 40 horas, apresentando uma curva bifásica. O seu metabolismo ocorre no fígado e a maioria dos metabólitos é excretada na bile. Acumula-se na maioria dos tecidos, principalmente nos eritrócitos, em concentrações 3 a 14 vezes maiores que as encontradas no plasma, e neste último encontra-se 95% ligado às proteínas plasmáticas, especialmente lipoproteínas (BOREL & KIS, 1991; FAHR, 1993). É o protótipo de uma nova geração de imunossuppressores que tem sido crescentemente utilizada nos últimos anos em uma grande variedade de transplantes de órgãos, bem como no tratamento de doenças auto-imunes (BOREL & KIS, 1991; FAHR, 1993; BOREL, 1994). A CS atua nos eventos celulares iniciais da resposta imunológica, inibindo a função dos linfócitos T<sub>H</sub> CD4<sup>+</sup> antígeno-dependentes ativados, principais células envolvidas na rejeição de transplantes (PALACIOS & MÖLLER, 1981; BOREL, 1994).

A CS liga-se reversivelmente ao seu receptor citosólico, uma proteína denominada ciclofilina. A ciclofilina provavelmente está envolvida no bloqueio da ativação linfocitária através da inibição da transcrição de diversas citocinas, especialmente a IL-2. A droga não tem efeitos na transcrição de outros genes nem parece ativar nenhum gene (ROSENKRANZ & KLOPMAN, 1992; RUSSELL et al, 1992; RYFFEL et al, 1992; GRAHAM, 1994). A CS pode inibir o crescimento tumoral, especialmente de células dependentes de fatores de crescimento (ROSENKRANZ & KLOPMAN, 1992; RUSSELL et al, 1992; RYFFEL et al, 1992). A CS não tem atividade genotóxica, nem se liga ao DNA. Em estudos experimentais, ela foi incapaz de causar câncer na ausência de eventos iniciadores (ROSENKRANZ & KLOPMAN, 1992; RUSSELL et al, 1992; RYFFEL et al,

1992; GRAHAM, 1994). Todavia, devido a seu efeito imunossupressivo, a droga pode permitir o crescimento de células transformadas *in vivo*, um efeito dose-dependente. Na experiência clínica, a imunossupressão com CS associa-se ao aumento de incidência de neoplasias, particularmente da pele, quando se compara com a população normal. A imunossupressão convencional (azatioprina, globulina antilinfócito, prednisona, etc) também demonstrou riscos equivalentes de facilitação tumoral. Lesões linfoproliferativas regridem após redução da dose ou interrupção do tratamento (ROSENKRANZ & KLOPMAN, 1992; RUSSELL et al, 1992; RYFFEL et al, 1992).

### **1.5 Modelos animais de tumores cerebrais**

A prevalência de tumores cerebrais está aumentando. Apesar dos esforços e desenvolvimentos multidisciplinares, o prognóstico de um paciente com tumor cerebral primário mudou apenas minimamente nas últimas duas décadas. Um dos maiores desafios da neuro-oncologia reside em melhorar a qualidade de vida de pacientes com glioma. Como AUSMAN et al colocaram em 1970: parece haver pequena possibilidade de melhorar a terapia cirúrgica ou a RT de tumores cerebrais malignos. Nessa época ficou claro que o desenvolvimento de novos e melhores modelos animais de glioma seria necessário para a avaliação *in vivo* de novas formas de QT e terapia adjuvante para tumores cerebrais. A contribuição dada por tais modelos tem dirigido o estudo biológico e terapêutico dos tumores cerebrais nos últimos 25 anos (PETERSON & BROWN, 1997).

A justificativa e necessidade de modelos representativos de gliomas permanecem hoje tão grandes quanto eram em 1970, embora o surgimento de novas modalidades de tratamento, como a imunoterapia, braquiterapia e radiocirurgia estereotáxica (*gamma-knife*) ofereçam algum otimismo. Poucas de um incontável número de drogas testadas mostraram-se úteis na QT de tumores do SNC. Uma vez que nossa compreensão da genética molecular aumente, a tendência será cada vez mais uma orientação biológica das terapias.

### **1.5.1 Características ideais de um modelo de tumor do SNC**

Para representar adequadamente o comportamento de tumores primários do SNC, um modelo experimental deve agrupar as seguintes características listadas abaixo:

- 1) Deve ser composto de células neoplásicas derivadas de tumores do SNC.
- 2) A taxa de crescimento do tumor e suas características de malignidade devem ser previsíveis e reprodutíveis.
- 3) A espécie utilizada deve ser de pequeno porte e de fácil manutenção para permitir o teste de grande número de animais.
- 4) O tempo para indução tumoral deve ser relativamente curto, e a sobrevivência após a indução deve ser padronizada.
- 5) O tumor deve ter crescimento intraparenquimatoso e características de barreira hematoencefálica de tumores do SNC, mostrando neovascularização e características de invasão e encapsulamento afins.
- 6) Não deve haver crescimento tumoral no tecido subcutâneo (s.c.), ou nos compartimentos epidural ou subdural.
- 7) O tumor deve ser capaz de crescer em cultura e deve ter manuseio seguro.
- 8) A resposta terapêutica deve ser semelhante àquela de tumores humanos.

Embora haja muitos modelos com determinada utilidade disponíveis até o momento, nenhum preencheu todos estes requisitos.

### **1.5.2 Modelos baseados em transplantes de tecidos e células**

O transplante de tecidos ou células tumorais em animais receptores tem gerado inúmeros modelos de tumores cerebrais. Existem essencialmente 2 tipos de modelos de transplante:

- 1) tumores singênicos, induzidos por vírus ou substâncias químicas e mantidos em cultura ou passagem s.c. por períodos prolongados;
- 2) modelos de heterotransplante, nos quais tumores de uma espécie são



transplantados em receptores imuno-incompetentes ou sítios imunologicamente privilegiados (câmara anterior do olho, cérebro, etc) de animais de outras espécies ou outras raças da mesma espécie.

As técnicas de transplante evoluíram tremendamente. Os primeiros pesquisadores utilizavam uma agulha e estilete para injetar fragmentos tumorais à mão livre. Este método impreciso e não quantitativo foi melhorado por WILSON et al (1967), que conseguiram uma estreita variação na mortalidade utilizando implantação estereotáxica de uma quantidade padronizada de células obtidas de cultura (**figura 4**). Aperfeiçoamentos posteriores na técnica de implante incluem melhor localização estereotáxica, suspensões celulares concentradas ( $10^4$  a  $10^7$  células/10 $\mu$ L), agulhas de injeção melhoradas, lavagem do campo operatório e aumento da viscosidade da suspensão celular com ágar 0,5-1,0%. Isto possibilitou eficiência de crescimento intracerebral de 90 - 100%, e metástases espinhais ou extracranianas de 0 - 5% (KOBAYASHI et al, 1980).

### **1.5.2.1 Modelos de transplante singênico**

ZIMMERMAN & ARNOLD (1941) transplantaram endimoblastomas induzidos por metilcolantreno intracerebralmente em camundongos, obtendo uma pega tumoral de 90 - 100%. De estoques congelados deste tumor original, AUSMAN et al (1970) estabeleceram várias linhagens celulares estáveis, incluindo o endimoblastoma A (EPA). Eles transplantaram para o cérebro de animais tecido fragmentado de passagens s.c. de EPA e foram capazes de demonstrar diferenças quantitativas na sensibilidade tumoral a diferentes drogas medindo o aumento da sobrevivência em comparação com controles não tratados. Este trabalho estimulou o estudo de agentes quimioterápicos para tumores cerebrais utilizando modelos animais.

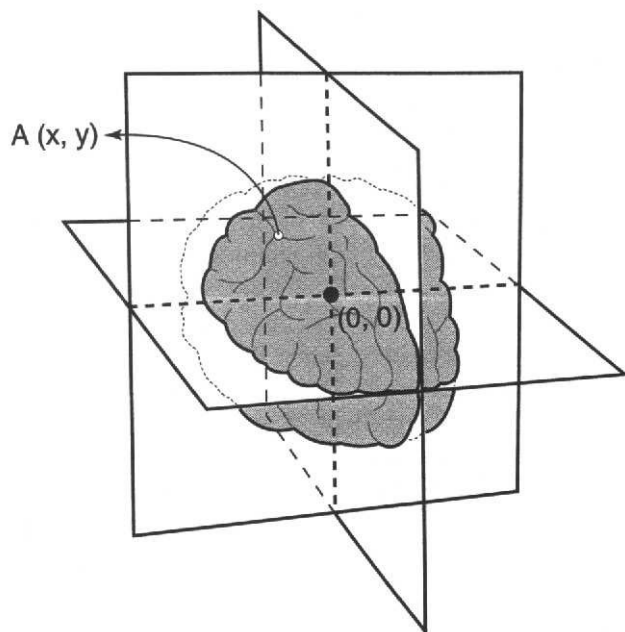
A linhagem C-6 mostra morfologia astrocítica e tem sido largamente estudada em neurobiologia, devido à presença de marcadores gliais como a proteína glial fibrilar acídica e proteína S100. Tem sido utilizada *in vitro*, e vários investigadores têm publicado modelos de transplante *in vivo* utilizando células C-6,

ao mesmo tempo em que as técnicas de implantação tornam-se mais refinadas. Vários investigadores relataram modelos usando células C-6 crescendo no cérebro de várias linhagens de ratos, mostrando que em ratos Wistar as células C-6 crescem com características mais próximas às de gliomas humanos, incluindo invasão parenquimatosa, neovascularização e necrose (SAN-GALLI et al, 1989; COHEN et al, 1990).

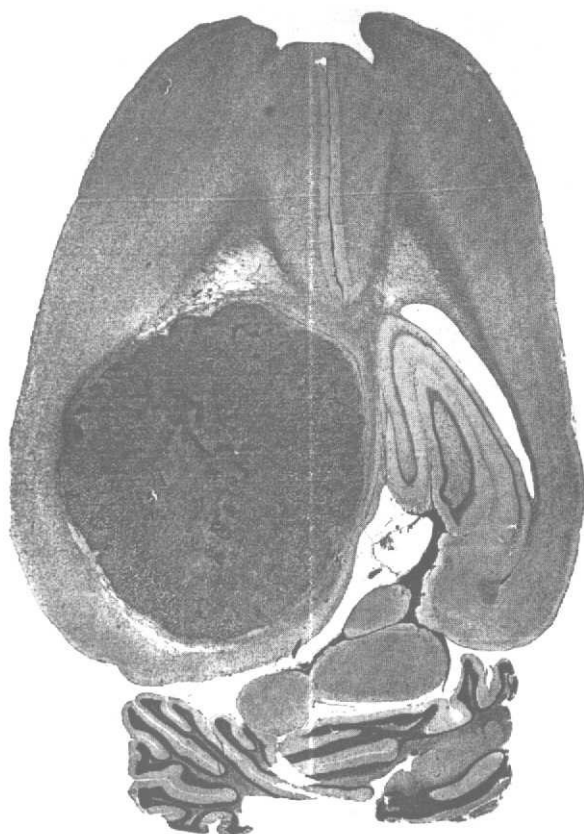
A linhagem de gliossarcoma 9L foi desenvolvida a partir de tumores induzidos com N-nitroso-metiluréia em ratos Wistar e Fischer. Várias linhagens estáveis foram estabelecidas, mostrando morfologia glial. A passagem seriada levou a transformações sarcomatosas (BARKER et al, 1973). Esta linhagem perdeu sua habilidade de invadir o parênquima cerebral e, desta forma, cresce principalmente nos espaços perivasculares de Virchow-Robin. Este padrão de crescimento pode dever-se à inabilidade das células em induzir neovascularização, sua habilidade de produzir enzimas que remodelam a matriz extracelular ou sua inabilidade de produzir matriz sólida. SCHWARTZ et al (1991) utilizaram estas características das células 9L como controle para avaliar os efeitos *in vitro* e *in vivo* da transfecção de vários oncogenes por meio de retrovírus. As células 9L/ras e 9L/neu produziram tumores *in vivo* maiores, de crescimento mais rápido, mais sólidos, altamente vascularizados, em relação àqueles produzidos por células 9L não transfectadas.

Embora modelos de transplante tenham se tornado a principal forma de pesquisa *in vivo* de tumores cerebrais (**figura 5**), é importante ter em mente que eles têm uma série de limitações inerentes. Tumores cerebrais humanos são extremamente heterogêneos, enquanto linhagens celulares clonais não representam esta tendência. Linhagens tumorais mantidas em cultura podem, com passagem seriada, mostrar variabilidade em taxas mitóticas e potencial de transformação, além de freqüentemente sofrerem degeneração sarcomatosa. Transplante direto de animal a animal minimiza a variabilidade, embora a experiência com camundongos atômicos mostre que a passagem s.c. seriada resulte em morfologia tumoral modificada.

A variabilidade persiste mesmo nos estudos de transplante clonal mais cuidadosamente controlados. Infelizmente, apesar da implantação estereotáxica e



**Figura 4: Esquema de localização estereotáxica no SNC.** A técnica estereotáxica permitiu a inoculação de soluções celulares tumorais com precisão em pontos específicos do cérebro de animais experimentais.



**Figura 5: Glioma humano inoculado em cérebro de rato imunossuprimido.** Os modelos experimentais de tumor cerebral permitem o estudo da biologia tumoral de tumores cerebrais humanos.

injeção de um número controlado de células, a sobrevivência pode ser influenciada por erros na técnica, como injeção de células mortas ou insuficientes ou semeadura de sítios extracranianos. Por estas razões, a busca por novos e melhores modelos continua (PETERSON & BROWN, 1997).

### **1.5.2.2 Carcinossarcoma 256 de Walker (W256)**

O carcinossarcoma 256 de Walker (W256) originou-se de um tumor espontâneo descoberto no biotério do professor George Walker, no laboratório da Escola de Medicina da Universidade de Johns Hopkins, em 1928. A massa tumoral encontrada numa rata albina prenha foi descrita como adenocarcinoma mamário e transplantada serialmente em animais da mesma linhagem (EARLE, 1935). Após inúmeros transplantes ao longo de anos, a linhagem celular apresentava diversas sub-linhagens com variações morfológicas, sendo classificadas como carcinomatosas, sarcomatosas, carcinossarcomatosas e mistas (EARLE, 1935; SCHREK & AVERY, 1937; TALALAY et al, 1952; FISHER & FISHER, 1964).

Na década de 50 foram obtidas linhagens celulares caracterizadas, mantidas por cultura serial *in vitro*. Na *American Type Culture Collection* (HAY et al, 1994), a linhagem LLCWRC256 encontra-se disponível, tendo características imunofenotípicas de carcinoma indiferenciado (HAY et al, 1994).

A transplantabilidade do tumor W256 tem sido demonstrada por meio de diversas técnicas, através de fragmentos tumorais (EARLE, 1935), suspensão celular obtida de tumores sólidos (EARLE, 1935; SCHREK & AVERY, 1937), suspensão celular obtida de cultura *in vitro*, suspensão celular obtida da forma ascítica do tumor. Diversas vias e sítios de inoculação têm sido utilizados: subcutânea (EARLE, 1935; TALALAY et al, 1952; JENSEN & MUNTZING, 1970), intramuscular (i.m.) (EARLE, 1935; TALALAY et al, 1952; MORAES FILHO et al, 1980), intraperitoneal, intrapleural e endovenosa.

Em modelos de transplante tumoral i.m. com W256, o crescimento tumoral e o tempo decorrido entre sua inoculação e o aparecimento do tumor mostraram-se

diretamente proporcionais ao número de células inoculadas (SCHREK & AVERY, 1937). Em relação ao sexo, demonstrou-se melhor desenvolvimento tumoral em ratos machos que em fêmeas, possivelmente relacionado à influência hormonal. O crescimento tumoral após inoculação de W256 mostrou melhores resultados em animais entre 70 e 80 dias de vida.

No Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará, desde 1994 mantém-se o Carcinossarcoma 256 de Walker por passagens seriadas *in vivo*, inoculando-se suspensão celular obtida de tumores sólidos, por via i.m., na pata posterior de ratos Wistar machos.

### **1.5.2.3 Modelos de inoculação intracraniana do tumor W256**

O tumor W256 tem sido utilizado para produzir diversos modelos de crescimento tumoral intracraniano. A inoculação de W256 por via intracarotídea produz com eficiência tumores, como modelo de metastização cerebral múltipla (HASEGAWA et al, 1983); por via intracisternal, como modelo de metastização leptomeníngea (KOOISTRA et al, 1986); ou ainda por inoculação direta de *pellets* ou suspensões celulares no parênquima cerebral (YAMADA et al, 1983; JAMSHIDI et al, 1992).

Os modelos de crescimento intracraniano de W256, por qualquer técnica, têm sido explorados para estudar fenômenos relacionados com os tumores cerebrais em geral, como alterações da permeabilidade vascular em leitos vasculares tumorais no SNC (BLASBERG et al, 1984a, BLASBERG et al, 1984b; BABA et al, 1992), edema cerebral associado a tumores e o efeito de corticóides (YAMADA et al, 1983; JAMSHIDI et al, 1992). Vários trabalhos testaram a permeabilidade de drogas antineoplásicas em tumores W256 intracranianos (GREIG et al, 1990; CORNFORD et al, 1992; HUANG et al, 1994) e estratégias para aumentar a penetração de drogas antitumorais no SNC (HIESIGER et al, 1986; ROBINSON & RAPOPORT, 1990). Um modelo de inoculação de células W256 transgênicas para o gene de timidina-quinase do vírus herpes simplex mostrou a utilidade do

ganciclovir no tratamento de metástases leptomenígeas por estas células (VRIONIS et al, 1996).

De uma forma geral, os modelos de inoculação intracraniana de W256 são considerados como modelos de metástase cerebral, ou ainda de crescimento tumoral heterotópico (tecido de origem não local) no SNC (CORNFORD et al, 1992).

MORREALE et al (1993) desenvolveram uma técnica melhorada para transplantar tumores no SNC de ratos, permitindo maior eficiência de crescimento tumoral no parênquima cerebral, com menor extravasamento para estruturas adjacentes (meninges, crânio ósseo, s.c. e pele) e menor taxa de metastização distante (esp. pulmões).

O autor inoculou, através de estereotaxia, um volume reduzido de suspensão celular concentrada obtida de cultura *in vitro* da linhagem LLCWRC256 da ATCC. O local escolhido foi o núcleo caudado subfrontal direito. As coordenadas foram: ântero-posterior (AP) = 1,5 mm; lateral (L) = 3,0 mm; dorso-ventral (DV) = 5,0 mm, usando como ponto de referência para coordenadas zero (0,0 x 0,0 x 0,0), o bregma. Um volume de 1 a 10  $\mu\text{L}$  de uma solução a  $1,0 \times 10^5$  células/ $\mu\text{L}$  foi inoculado. Logo antes da inoculação, a agulha de injeção posicionada no local por meio do aparelho estereotáxico era abaixada 1  $\mu\text{m}$ , e em seguida elevada à posição anterior. Dessa forma, criava-se uma “bolsa” de inoculação que seria preenchida pela solução celular, evitando extravasamento ao longo da agulha de injeção. O autor conseguiu, dessa forma, um modelo com 100% de eficiência de crescimento tumoral, com 0% de ocorrência de crescimento tumoral metastático à distância. Demonstrou também que, inicialmente, o crescimento de células tumorais ficava aparentemente restrito ao núcleo caudado, sugerindo a ausência de extravasamento durante a injeção. Tal modelo foi proposto para o teste da biologia de tumores cerebrais e para *screening* de substâncias antineoplásicas com potencial efeito em lesões no SNC.

Cientistas têm utilizado a técnica descrita por Morreale para desenvolver novos métodos de estudo da biologia e metabolismo de tumores do SNC, tendo demonstrado diferenças no metabolismo lipídico entre as células tumorais intracerebrais e o parênquima normal adjacente, que podem levar tanto a novas

formas de diagnóstico por imagem como as novas abordagens terapêuticas (NARIAI et al, 1993; NARIAI et al, 1994).

## **1.6 Objetivos**

### **1.6.1 Gerais**

Desenvolver um modelo de transplante de tumor heterotópico no SNC de ratos, adaptando o modelo de MORREALE et al (1993).

A fim de aproximar-se da situação observada em análises histopatológicas de tumores cerebrais humanos, de heterogeneidade clonal celular (DE GIROLAMI et al, 1994), optou-se por inocular suspensões celulares obtidas de tumores sólidos, em contraste com o caráter monoclonal de células cultivadas *in vitro*.

Com vistas à simplicidade e facilidade de reprodução, escolheu-se o método de inoculação manual, objetivando-se sempre a eficiência de crescimento tumoral no local da inoculação e a ausência de disseminação local ou distante.

### **1.6.2 Específicos**

Caracterizar o modelo de metástase cerebral baseado no transplante heterotópico de tumor para o SNC de ratos com estudos biológicos, bioquímicos, hematológicos, histopatológicos, e de sobrevivência dos animais com tumor.

Demonstrar o efeito da dexametasona, uma droga largamente utilizada no tratamento de metástases cerebrais, na sobrevivência de animais inoculados com o tumor cerebral.

Testar a segurança do uso da ciclosporina, uma droga proposta como nova forma de tratamento para tumores cerebrais, neste modelo de tumor cerebral em animais.

## 2. MATERIAL

### 2.1 Tumor

Carcinossarcoma de Walker, mantido por inoculação i.m. de cerca de  $1,0 \times 10^6$  células no membro posterior de ratos albinos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, machos, pesando cerca de 150 - 200 g, a cada 9 dias, no Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental (LABCEX).

### 2.2 Animais

Ratos albinos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, com idade entre 6 a 12 semanas, machos, pesando cerca de 200 - 250 g, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, mantidos em caixas plásticas com raspa de madeira e ração padrão, em ambiente com temperatura constante (20°C) e ciclo claro-escuro de 12hs, no Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental. Cada animal experimentado recebeu uma etiqueta padrão contendo identificação (número de série, grupo experimental), peso, idade, data e natureza dos experimentos.

### 2.3 Reagentes e drogas

Os reagentes e drogas utilizados foram de grau analítico, encontrando-se listados abaixo, com suas respectivas procedências:

PRODUTO	PROCEDÊNCIA
Álcool etílico	LABSYNTH, Brasil
Anfotericina B	Bristol-Meyers Squibb, Brasil
Azul de Trypan	SIGMA, U.S.A.



PRODUTO	PROCEDÊNCIA
Ciclosporina	Biossintética, Brasil
Citrato de sódio	Reagen, Brasil
Cloreto de cálcio	LABSYNTH, Brasil
Cloreto de magnésio	LABSYNTH, Brasil
Cloreto de potássio	LABSYNTH, Brasil
Cloreto de sódio	LABSYNTH, Brasil
Cloreto de sódio 0,9% (salina)	B.BRAUN, Brasil
Cremophor EL	Sigma, U.S.A.
Dexametasona	Prodome, Brasil
Formaldeído 37%	Reagen, Brasil
Fosfato dibásico de sódio	Reagen, Brasil
Fosfato monobásico de sódio	Reagen, Brasil
Glicose 50%	CEME, Brasil
HEPES	Whittaker, U.S.A.
Hidróxido de sódio	Reagen, Brasil
PBS	GIBCO, U.S.A.
Penicilina G benzatina	CEME, Brasil
Penicilina G cristalina	CEME, Brasil
Ringer lactato	Gaspar Viana, Brasil
Sulfato de gentamicina	CEME, Brasil
Tiopental	CEME, Brasil

## 2.4 Composição de soluções e corantes

### 2.4.1 Azul de Trypan a 0,75%

Azul de Trypan	(0,75g)	SIGMA, U.S.A.
Água destilada	(q.s.p. 100 ml)	

### 2.4.2 Salina para suspensão de células tumorais

PBS	(0,1 M)	GIBCO, U.S.A.
Glicose	(10 g)	CEME, Brasil
Citrato de sódio	(10 mM)	Reagen, Brasil
Penicilina cristalina	(150000 U)	CEME, Brasil
Sulfato de gentamicina	(0,56 mg)	CEME, Brasil
Anfotericina B	(2,5 mg)	Bristol-Meyers Squibb, Brasil
Água destilada	(q.s.p. 1000 ml)	

### 2.4.3 Veículo para diluir a CS (CrEL)

Cloreto de sódio	(147 mM)	LABSYNTH, Brasil
Cloreto de potássio	(4 mM)	LABSYNTH, Brasil
Cloreto de cálcio	(3 mM)	LABSYNTH, Brasil
Cloreto de magnésio	(1,2 mM)	LABSYNTH, Brasil
Glicose	(5 mM)	CEME, Brasil
Hepes	(15 mM)	Whittaker, U.S.A
Cremophor EL	(150 ml)	Sigma, U.S.A.
Álcool etílico	(30 ml)	LABSYNTH, Brasil
Água destilada	(q.s.p. 1000 ml)	

#### 2.4.4 Solução para fixação de tecidos

Fosfato dissódico de sódio	(49,1 mM)	Reagen, Brasil
Fosfato monobásico de sódio	(50,9 mM)	Reagen, Brasil
Formaldeído 37%	(100 ml)	Reagen, Brasil
Ajustar pH para 7,2 com hidróxido de sódio	(1,0 N)	Reagen, Brasil
Água destilada	(q.s.p. 1000 ml)	

#### 2.5 Material cirúrgico e outros

PRODUTO	PROCEDÊNCIA
Agulhas gengivais 30 G	IBRAS CBO, Brasil
Agulhas aço inox 22 G	IBRAS CBO, Brasil
Acrílico autopolimerizante	Clássico, Brasil
Líquido autopolimerizante	Clássico, Brasil
Brocas de baixa rotação nº 03	Maillefer, Suíça
Parafusos 303SS	JJ Morris, U.S.A.
Lâminas de bisturi nº 10	Paramount, U.S.A.
Tubo de polietileno 0,10 cc/m	Fischer Scientific, U.S.A.
Tubo de polietileno PE 20	Clay Adams, U.S.A.
Epóxi de secagem rápida	ITW Devcon, U.S.A.
Tubos de plástico de 1,8 ml	Corning, U.S.A.
Tubos de plástico de 15 ml	Corning, U.S.A.
Tubos de plástico de 50 ml	Corning, U.S.A.

## 2.6 Material permanente e equipamentos

### PRODUTO

Micro-seringa 701 N 25  $\mu$ L

Centrífuga refrigerada

Estereotáxico Stellar

Fluxo laminar

Microscópio de inversão

Hemocitômetro de Neubauer

Contador automatizado modelo C-06

### PROCEDÊNCIA

Hamilton, U.S.A.

Eppendorf, Alemanha

Stoelting, U.S.A.

VECO, Brasil

Nikon, Japão

Fischer, U.S.A.

Coulter, U.S.A.

## 3. MÉTODOS

### 3.1 Cirurgia

#### 3.1.1 Atlas estereotáxico

No atlas (PAXINOS & WATSON, 1986), as estruturas estão em três planos: transversal, sagital ou longitudinal, coronal ou frontal.

A metodologia consiste em escolher a prancha na qual a região desejada esteja melhor representada, e determinar as medidas AP, L e DV.

As coordenadas escolhidas foram AP = + 1,6 mm; L = - 3,0 mm e DV = + 5,0 mm (posição no caudado direito, vide **figura 6**).

#### 3.1.2 Anestésicos usados

Tiopental sódico (30 mg/kg, i.p.)

Hidrato de cloral (200 mg/kg, i.p.)

#### 3.1.3 Canhão

O aparato que permitiu a inoculação intracerebral, uma cânula fixa de demora a ser colocada no ponto calculado, foi montado serrando-se a parte superior e a ponta de uma agulha IBRAS (agora chamada canhão) até tamanho suficiente para atingir a área calculada. O canhão foi testado para adaptar-se com perfeição na haste da torre do estereotáxico.

A agulha de injeção propriamente dita foi obtida serrando-se uma agulha gengival até o tamanho desejado, para atingir o ponto de inoculação.

### 3.1.4 Cirurgia estereotáxica

Os animais foram mantidos previamente em jejum por 12 hs para o procedimento, anestesiados, e colocados em posição no aparelho estereotáxico, com os dentes incisivos encaixados na barra incisora.

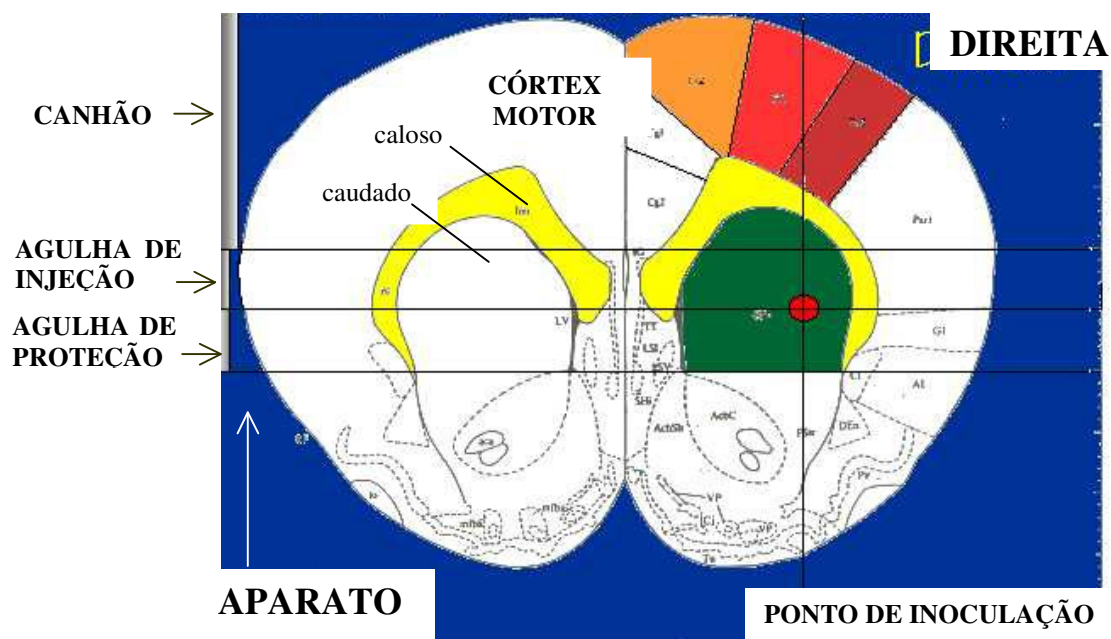
Abriu-se a pele entre os olhos e as orelhas com uma tesoura de ponta curva para expor o bregma. Afastou-se a fáscia, aponeurose e periósteo com tesoura e bisturi. Quatro orifícios foram feitos com broca de dentista, um para o canhão e outras 3 aberturas para parafusos de fixação, dispendo-as como um quadrado em relação à entrada da cânula. Depois de abaixada a cânula à sua posição final, o aparato implantado, constituído dos parafusos e canhão, foi protegido com acrílico autopolimerizante, chamando-se então capacete (**figura 7**).

Após a cirurgia, administrou-se  $1 \times 10^5$  U de penicilina benzatina i.m. na coxa do animal. Entre 5 e 15 dias após, realizou-se a inoculação das substâncias (corante, drogas, tumor, etc) na área definida.

### 3.1.5 Agulhas de proteção

Após a cirurgia para instalação do canhão, o orifício externo deste foi obstruído com agulhas gengivais especialmente preparadas. A parte superior das agulhas gengivais foi seccionada para impedir os animais de agarrá-las para retirar a proteção. A agulha foi cortada com uma ponta cega, de um comprimento tal que ultrapassava o ponto calculado de inoculação em 1 mm. Dessa forma, criou-se uma “bolsa” de inoculação, a qual foi preenchida posteriormente pela suspensão celular infundida, evitando extravasamento. No período que se seguiu à cirurgia (5 a 15 dias), as agulhas de proteção foram deixadas no local (**figura 6**).

Após a inoculação tumoral, o orifício externo dos canhões foi ocluído com agulhas de proteção curtas, visando apenas evitar o contato entre o ponto de lesão e o meio exterior.



**Figura 6: Figura esquemática do ponto de inoculação e do aparato para injeção de células tumorais no cérebro.** O canhão desce até cerca de 1 mm antes do ponto de inoculação. Ao longo do canhão coloca-se uma agulha de proteção que desce até cerca de 1 mm após o ponto de inoculação, o que criará uma “bolsa” onde se depositará a solução celular inoculada. No momento da injeção, a agulha de proteção é retirada e introduz-se a agulha de injeção, a qual atinge exatamente o ponto calculado de injeção. O esquema respeita a escala real entre o aparato de inoculação e as dimensões do cérebro.



**Figura 7: Animal experimental posicionado no aparelho estereotáxico. (A)** Campo operatório aberto tendo-se feito os orifícios para os parafusos e cânula. **(B)** Capacete instalado no crânio do animal.



## 3.2 Solução de Células

### 3.2.1 Obtenção da solução de células tumorais

A técnica para obter-se a solução de células tumorais foi realizada modificando-se o método descrito por FRESHNEY (1987). Os animais com tumor de Walker inoculado na pata foram sacrificados e as patas portadoras de tumor foram desarticuladas. Os espécimes foram assepsiados rigorosamente com álcool iodado e fragmentos tumorais, limpos de pele, tecido conectivo, gordura e ossos, foram retirados e então picotados com tesoura e bisturi em pedaços diminutos, de cerca de 5 - 10 mm de diâmetro. Tais pedaços foram incubados com solução para suspensão de células tumorais num *erlenmeyer* com bala magnética e agitados durante 10 minutos. O sobrenadante foi separado e centrifugado a 20 G por 2 minutos em centrífuga refrigerada. Ressuspendeu-se o precipitado em 5 ml da mesma solução e procedeu-se a contagem de células tumorais viáveis pela técnica de azul de Trypan (FRESHNEY, 1987).

Fizeram-se duas lavagens seriadas do material, centrifugando-se e em seguida ressuspendendo-se o precipitado em mais 5 ml de solução e repetindo-se a operação.

O material foi concentrado, inicialmente centrifugando-o (igual técnica) e ressuspendendo-o em 1 ml da solução e após isto centrifugando e ressuspendendo novamente o precipitado num volume suficiente para atingir entre  $5,0 \times 10^4$  a  $1,5 \times 10^5$  células viáveis por  $\mu\text{l}$  da solução final.

A contagem de confirmação da concentração celular na fórmula final foi feita tomando-se um volume de 5 - 10  $\mu\text{l}$  e diluindo-se em 1 - 5 ml de solução. Contaram-se as células viáveis de acordo com a técnica de azul de Trypan, ajustando-se para a diluição utilizada.

Quando se encontrou maior concentração por  $\mu\text{l}$  que a necessária para inoculação, a solução foi diluída até atingir o valor desejado. Quando se encontrou concentração insuficiente de células na solução, esta foi centrifugada com a mesma

técnica anterior e ressuspendida num menor volume, calculado para obter o valor desejado.

### **3.3 Inoculação intracerebral**

Os animais, deixados em jejum por 12 hs para o procedimento, foram anestesiados com éter etílico em máscara ou campânula. Encheu-se a microseringa Hamilton com a solução a ser inoculada com o auxílio de outra seringa, verificando se não estava obstruída e retirando-se todas as bolhas ao colocar o êmbolo da microseringa. Entre 0,5 e 2,0 µl (cerca de  $6,0 - 7,0 \times 10^4$  células) foram inoculados, dependendo da concentração da solução. Depois da injeção, esperaram-se 5 min para haver a difusão e equilíbrio da solução tumoral inoculada com o líquido intersticial.

### **3.4 Grupos experimentais**

De acordo com a presença ou ausência de inoculação tumoral ou tratamento associado ou não, os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

1. SHAM: animais operados para instalação do capacete, mas inoculados com solução salina sem células tumorais, não tratados (controle).
2. CS: animais operados para instalação do capacete, mas inoculados com solução salina sem células tumorais, tratados com CS.
3. CrEL: animais operados para instalação do capacete, mas inoculados com solução salina sem células tumorais, tratados com CrEL.
4. Tumor: animais operados para instalação do capacete, inoculados com solução salina contendo células tumorais, não tratados.
5. Tumor + CS: animais operados para instalação do capacete, inoculados com solução salina contendo células tumorais, tratados com CS.
6. Tumor + CrEL: animais operados para instalação do capacete, inoculados com solução salina contendo células tumorais, tratados com CrEL.

7. Tumor + DEXA 0,3: animais operados para instalação do capacete, inoculados com solução salina contendo células tumorais, tratados com 0,3 mg/kg/dia de dexametasona.

8. Tumor + DEXA 3,0: animais operados para instalação do capacete, inoculados com solução salina contendo células tumorais, tratados com 3,0 mg/kg/dia de dexametasona.

### **3.5 Tratamentos**

#### **3.5.1 Ciclosporina (CS)**

Animais dos grupos CS e Tumor + CS foram tratados com CS 10 mg/kg/dia em injeção s.c. única diária, a partir do 7<sup>o</sup> dia antes da inoculação tumoral até o dia da morte ou sacrifício.

#### **3.5.2 Diluente da CS (CrEL)**

Animais dos grupos CrEL e Tumor + CrEL foram tratados com CrEL 0,3 ml/dia em injeção s.c. única diária a partir do 7<sup>o</sup> dia antes da inoculação tumoral até o dia da morte ou sacrifício.

#### **3.5.3 Dexametasona (DEXA)**

Animais dos grupos Tumor + DEXA 0,3 ou Tumor + DEXA 3,0 foram tratados com 0,3 mg/kg/dia ou 3,0 mg/kg/dia respectivamente, em injeção i.p. única diária, a partir do 4<sup>o</sup> dia pós-inoculação, até o dia da morte ou sacrifício.

### 3.6 Exames laboratoriais

Animais submetidos ao ensaio de hematologia tiveram amostras de sangue retiradas por punção retro-ocular com capilar de vidro, em tubos contendo heparina sódica, e submetidas à contagem de células sanguíneas, linhagem eritróide, mielóide e megacariocítica.

As contagens de hemácias, leucócitos totais e plaquetas, além de hematócrito e hemoglobina, foram realizadas por meio mecânico, através de contador automatizado.

A contagem diferencial leucocitária foi obtida por leitura manual de esfregaços corados pela técnica de May-Grünwald e Giemsa (M-G-G).

Animais submetidos ao ensaio de bioquímica tiveram amostras de sangue retiradas por punção retro-ocular com capilar de vidro, em tubos sem anticoagulante e centrifugadas para obtenção do soro.

A dosagem de creatinina nas amostras de soro, foi realizada através de espectrofotometria.

Todos os animais submetidos à retirada de amostras de sangue para análise foram mantidos em jejum de 12 hs para o procedimento.

#### 3.6.1 Análise dos resultados de testes hematológicos

Os valores individuais de cada animal das séries eritrocitária, leucocitária e megacariocítica foram classificados comparando-se com valores de referência publicados na literatura (ARCHER & JEFFCOTT, 1977; SMITH et al, 1994). Animais com valores de hemácias abaixo de  $5,3 \times 10^6$  células por  $\text{mm}^3$ , ou hemoglobina abaixo de 14,7 g/dL foram classificados com *anemia*. Animais com valores de leucócitos totais abaixo de  $4,8 \times 10^3$  células por  $\text{mm}^3$  foram classificados com *leucopenia*. A contagem parcial dos leucócitos foi realizada de duas formas: (1) contagem absoluta: número de células leucocitárias de cada linhagem; (2) contagem relativa: razão (expressa em porcentagem) entre o número de leucócitos

de cada linhagem e o número total de leucócitos. Animais com valores absolutos de neutrófilos acima de  $1,9 \times 10^3$  células por  $\text{mm}^3$  foram classificados com *neutrofilia absoluta*. Animais com valores relativos de neutrófilos acima de 36% foram classificados com *neutrofilia relativa*. Animais com valores absolutos de linfócitos abaixo de  $5,0 \times 10^3$  células por  $\text{mm}^3$  foram classificados com *linfopenia absoluta*. Animais com valores relativos de linfócitos abaixo de 62% foram classificados com *linfopenia relativa*. Animais com valores de plaquetas abaixo de  $5,1 \times 10^5$  células por  $\text{mm}^3$  foram classificados com *plaquetopenia*.

### **3.7 Evolução ponderal dos animais**

Os animais inoculados com tumor e utilizados no ensaio de evolução ponderal foram pesados antes da cirurgia, no 5<sup>o</sup> dia após a inoculação (DPI) e no dia da morte ou sacrifício.

Os animais inoculados com solução sem células tumorais (grupos SHAM e CS) utilizados no ensaio de evolução ponderal foram pesados antes da cirurgia, no 15<sup>o</sup> dia pós-operatório (DPO) e entre o 21<sup>o</sup> e 27<sup>o</sup> DPO, datas que se aproximam, respectivamente, ao 5<sup>o</sup> DPI e ao dia da morte ou sacrifício dos animais inoculados com tumor.

### **3.8 Morte ou sacrifício dos animais**

Os animais inoculados com tumor intracerebral foram observados diariamente, a intervalos de 12 h, por sinais de patologia (hipoatividade, emagrecimento, paralisia, desconforto respiratório). Quando o animal era encontrado morto, considerava-se esta data o dia da morte. Se o animal apresentava sinais de desconforto respiratório importante, indicando morte iminente (*gasping*), este era sacrificado com éter etílico sob campânula e a data anotada como dia da morte.

Os animais inoculados com tumor cerebral e utilizados na medida do volume tumoral estimado (VTE) foram sacrificados com perfusão intracardíaca de fixativo no 7<sup>o</sup> DPI, ou no 9<sup>o</sup> DPI, conforme descrito na seção a seguir.

Os animais operados e inoculados com solução sem células tumorais (grupos CS e SHAM) foram sacrificados com éter etílico sob campânula entre o 21<sup>o</sup> e 27<sup>o</sup> DPO.

### **3.9 Sobrevida dos animais inoculados com tumor**

Os animais inoculados com tumor intracerebral que não foram sacrificados para a medida de VTE tiveram anotado o dia da morte. O intervalo, em dias, entre o dia da inoculação e o dia da morte constitui a sobrevida do animal, e foi anotado para os animais dos grupos tratados (grupos Tumor + CS, Tumor + CrEL, Tumor + DEXA 0,3 e Tumor + DEXA 3,0) e para os animais do grupo não tratado (grupo Tumor).

### **3.10 Exames histopatológicos**

#### **3.10.1 Fixação intracardíaca**

Os animais do ensaio de histopatologia para avaliação do VTE foram submetidos à perfusão intracardíaca de fixativo, da seguinte forma:

1. No 7<sup>o</sup> DPI ou 9<sup>o</sup> DPI os animais foram profundamente anestesiados com tiopental sódico 50 mg/kg i.p. ou com éter etílico sob campânula e máscara.
2. Os animais foram colocados em posição dorsal com os membros e a cabeça fixados.
3. O tórax foi aberto por incisão e ressecção ampla de costelas e esterno, para expor completamente os pulmões e coração.
4. Um escalpe nº 21 foi inserido na parede lateral do ventrículo esquerdo a

meio caminho entre a base atrioventricular e o ápice cardíaco, conectado a uma seringa de 50 ml contendo a solução de perfusão, com cuidado para não lesar a válvula mitral.

5. Uma incisão foi feita no átrio direito.

6. Manualmente, numa velocidade não excedendo a 3 ml/min, a solução de perfusão (salina a 0,9%) foi infundida, num volume entre 50 a 150 ml, até o perfusato sair claro do átrio direito.

7. A seguir, um volume de 100 ml de fixativo foi perfundido na mesma velocidade para fixar o animal, observando-se o sinal de rigidez e contrações musculares durante a infusão.

8. Cérebros, pulmões, fígados e rins foram removidos e acondicionados em frascos contendo cerca de 20 vezes seus volumes em fixativo por 48 h.

9. Cortes e fragmentos foram retirados dos órgãos para estudo histopatológico e o restante do material acondicionado para armazenamento a longo prazo, em recipientes contendo álcool 70%.

10. Os cortes de cérebro foram realizados de tal forma que a superfície de corte ao histopatológico correspondia grosso modo ao ponto de inoculação das células tumorais.

### **3.10.2 Retirada de órgãos para exame**

Todos os animais inoculados com tumor intracerebral, assim como os animais inoculados com solução sem células tumorais (grupos CS, CrEL e SHAM), tiveram seus órgãos retirados para análise. Apenas os animais utilizados para a medida de VTE sofreram fixação intracardíaca. Os demais tiveram os órgãos fixados por imersão.

Os órgãos (cérebro, pulmões, fígado e rins) foram pesados logo após retirados e depois postos em recipientes contendo 20 vezes seu volume em fixativo, o qual foi trocado a cada 24 h. Após 48 - 72 h, amostras dos órgãos foram retiradas para processamento histopatológico, após o que o restante dos órgãos foi acondicionado em álcool 70% para armazenamento a longo prazo.

Os cérebros foram cortados transversalmente com lâmina de bisturi, grosso modo com uma face na altura do ponto de inoculação, em fatias de cerca de 5 mm de espessura, com a face a ser cortada marcada.

### **3.10.3 Processamento e análise do material**

As amostras foram enviadas ao Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML) da Universidade Federal do Ceará, onde foram processadas, incluídas em parafina e cortadas em micrótomo manual.

As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H-E) e armazenadas no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE). Dois patologistas independentes analisaram as lâminas e descreveram os achados histopatológicos.

Foram analisados:

1. No cérebro: presença de células tumorais, organização e infiltração das células tumorais em relação ao tecido cerebral normal, presença de células inflamatórias no sítio tumoral, presença de áreas de hemorragia ou necrose na massa tumoral, presença de células tumorais nas meninges.
2. Nos pulmões: presença de focos metastáticos.
3. No fígado: presença de focos metastáticos.
4. Nos rins: presença de alterações parenquimatosas ou intersticiais.

### **3.10.4 Medida do volume tumoral estimado (VTE)**

As lâminas de cérebro obtidas de animais que sofreram fixação intracardíaca foram submetidas à análise para avaliar VTE, através dos diâmetros aparentes nos cortes realizados na altura do ponto de inoculação.

Foram utilizados cortes previamente comparados com pranchas do atlas estereotáxico, garantindo que as áreas analisadas se encontravam em cortes situados aproximadamente na mesma altura de secção.

Com a ajuda de ocular micrometrada, utilizando objetiva de 20X, as lâminas foram examinadas. Foram medidos em mm os diâmetros tumorais maior e menor



em cada lâmina. O VTE foi calculado assumindo-se que o ponto de inoculação estava no centro do tumor e que o tumor crescera de forma esferóide, através da fórmula de STEEL (1987):

$$V(mm^3) = \frac{D \times d^2}{2}$$

Onde  $D$  é o diâmetro maior e  $d$  é o diâmetro menor.

Foram efetuadas medidas em lâminas oriundas de animais sacrificados no 7DPI ou 9DPI. Foram calculadas as médias do VTE para cada dia. A partir destes valores calculou-se o tempo de duplicação (TD), ou *doubling time*, que consiste no número de horas necessárias para que haja duplicação do volume tumoral. Considerou-se que os volumes tumorais medidos nos dois pontos temporais utilizados (7 e 9 DPI) comportam-se como a fase log linear (onde TD é uma constante) de uma curva volume tumoral *versus* tempo, que não foi obtida para este modelo. Para obter o TD, utilizou-se a fórmula:

$$TD(horas) = \frac{Nh}{n}$$

Onde  $Nh$  = número de horas e  $n = 3.32(\log N - \log N_0)$  onde  $N_0$  = volume tumoral no início da fase Log e  $N$  = volume tumoral no final da fase log.

### 3.11 Transplante de fragmentos pulmonares

Um animal inoculado com tumor cerebral, sacrificado no 7<sup>o</sup> DPI sem injeção intracardíaca de fixativo, teve seus pulmões retirados e os lobos separados. Um dos lobos foi guardado para estudo histopatológico. O restante foi fragmentado e inoculado no s.c. de 5 ratos Wistar com a ajuda de um trocater de inoculação. Os animais (jejum prévio) foram anestesiados com éter etílico em máscara e campânula para o procedimento. Após a inoculação, foram observados diariamente procurando por sinais de crescimento tumoral.

### 3.12 Anotação e análise dos dados

Todos os dados correspondentes aos experimentos realizados foram armazenados e testados estatisticamente em base informatizada (programa Microsoft Excel versão X.0, Microsoft Corporation, EUA; programa InStat 2.05a, GraphPad, EUA, 1990-1994; programa Statview 5.0, SAS, EUA, 1992-1998), da seguinte forma:

1) Os dados hematológicos foram todos apresentados em termos de média e erro padrão da média (EPM), comparando-se resultados entre diversos grupos através de testes paramétricos (teste t-Student ou análise de variância unifatorial [ANOVA] c/ teste de Student-Newman-Keuls como pós-teste).

2) As contagens de alterações qualitativas dos valores hematológicos foram apresentadas em termos de frequências da ocorrência de cada alteração nos grupos e comparados com o grupo SHAM com o Teste de Fischer, com resultados expressos em razão de chance (RC), com intervalos de confiança 95% (IC 95%) apresentados quando significantes.

3) Os dados bioquímicos foram expressos e comparados da mesma forma que os resultados hematológicos.

4) Os dados ponderais foram expressos e comparados da mesma forma que os resultados hematológicos.

5) Os dados relativos à sobrevida dos animais foram apresentados em termos de mediana e comparados entre os grupos com testes não paramétricos (teste U de Mann-Whitney, teste de Kruskal-Wallis). A sobrevida cumulativa dos grupos ao longo do tempo de experimento foi comparada com o modelo de Kaplan-Meier. Sobrevidas no 12<sup>o</sup> DPI foram comparadas com o Teste de Fischer, com resultados expressos em RC, com IC 95% apresentados quando significantes.

6) Os dados relativos à análise de VTE foram expressos e comparados da mesma forma que os resultados hematológicos.

7) Os dados relativos à análise de achados de histopatológico foram

apresentados como frequências da ocorrência de cada achado nas lâminas analisadas, e comparados com o grupo SHAM com o Teste de Fischer, com resultados expressos em RC, com IC 95% apresentados quando significantes.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Características do modelo

#### 4.1.1 Estatística do modelo

Como mostrado na **tabela 1**, do total de animais alocados para os experimentos, 98 (58%) sofreram inoculação cerebral de tumor ou veículo (SHAM). Dos 70 (42%) animais não inoculados, 23 (33%) não o foram por falta de tumor experimental disponível no biotério do LABCEX, 13 (19%) morreram no PO imediato, em geral por resposta idiossincrática aos anestésicos, 16 (23%) perderam o capacete antes de ser realizada a inoculação, 3 (4%) apresentaram obstrução da cânula intracerebral no momento da inoculação, 4 (6%) não puderam ser inoculados por problemas na solução de células tumorais (em geral precipitação de debris de tecido necrótico do tumor sólido) e 11 (16%) não puderam sofrer inoculação por problemas variados.

Para demonstrar que os problemas técnicos enfrentados na realização do trabalho foram em sua maioria solucionados, a **tabela 2** traz uma amostragem dos 58 últimos animais a serem operados. Houve um aproveitamento de 42 (72%) dos animais, sendo que o principal problema capaz de impedir um animal de ser inoculado foi a perda do capacete, ocorrida em 10 (17%) dos animais.

A **tabela 3** resume as características gerais dos animais experimentais e dos procedimentos de inoculação. Os animais tinham em média cerca de 210 g de peso no dia da cirurgia, aguardaram uma mediana de 8 dias entre o dia da cirurgia e o dia da inoculação, receberam em média cerca de  $6 \times 10^4$  células tumorais viáveis num volume entre 0,5 a 2,0  $\mu$ l e pesaram no dia da morte, em média cerca de 190 g.

A eficiência do modelo pode ser obtida através da razão percentual entre o número de animais que desenvolveu tumor e o número de animais que chegou a ser

**Tabela 1: Estatística do modelo de inoculação de W256 no cérebro.**

Período de experimentação	27/06/1997 a 23/03/1999 (635 dias)	
Animais operados	168	-
Animais inoculados	98 de 168	58%
Não inoculados	70	42%
Motivos		
Faltou tumor	23 de 70	33%
Morte PO	13	19%
Perdeu capacete	16	23%
Cânula obstruída	3	4%
Solução ruim	4	6%
Outros	11	16%
Animais com tumor	87 de 98	89%
Sem tumor	11	11%
Motivos		
Solução ruim	6	-
Desconhecido	5	-
Animais inoculados sem intercorrência	92	-
Eficiência corrigida do modelo	87 de 92	95%

**Tabela 2: Amostragem do animal 110 ao 168: eficiência de aproveitamento e perda do capacete.**

Animais inoculados	42 de 58	72%
Perderam capacete	19	-
Antes de inocular	10 de 58	17%
Após inocular	9 de 42	21%

**Tabela 3: Características dos animais e dos experimentos.**

	valor	n
Peso dos animais no dia da cirurgia (g)	209,6 ± 2,4	155
Dias entre cirurgia e inoculação	8 (4 – 29)	109
Número de células inoculadas (x 10 <sup>4</sup> )	6,1 ± 0,07	92
Peso dos animais no dia da morte (g)	189,1 ± 3,9	40

Média ± EPM, dias em mediana com valores mínimo e máximo entre parênteses.

inoculado. No entanto, parte dos animais que foi inoculada não desenvolveu tumor devido a presença de debris tumorais na solução celular. Dessa forma, a eficiência deve ser corrigida levando-se em conta apenas os animais que sofreram procedimento de inoculação sem intercorrências. Fazendo assim, chegamos a uma eficiência de 95% de crescimento tumoral naqueles animais que foram inoculados com sucesso. A **tabela 1** resume estes dados.

#### 4.1.2 Macroscopia dos animais

Na **tabela 4** estão os resultados dos estudos de macroscopia *post-mortem* realizados em 14 dos animais inoculados com tumor, para definir a incidência de metástases distantes para órgãos-alvo como pulmões e fígado (0%); disseminação tumoral no local de inoculação para sítios extraneurais, como s.c. (21%), órbita (0%) e crânio ósseo (21%); e infecção de ferida cirúrgica (21%).

No que concerne a disseminação tumoral local para estruturas extra-neurais, deve-se relatar que, naqueles animais sacrificados no 7<sup>o</sup> DPI e 9<sup>o</sup> DPI para medida de VTE, não foram identificados pontos macroscópicos de crescimento tumoral ectópico.

#### 4.1.3 Influência da retirada do capacete pelo animal no modelo

Testou-se a possível associação entre a perda do capacete e diversos eventos. Foi contada a frequência dos eventos em animais que perderam e que mantiveram o capacete após inoculação e comparou-se estas frequências com o Teste de Fischer, encontrando-se valores de RC para cada teste. A **tabela 5** e a **figura 8** resumem os achados.

Animais que perderam o capacete após a inoculação mostraram uma chance 30,6 (IC 95% = 1,2 - 785,9) vezes maior de apresentar disseminação tumoral local ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 4: Análise da macroscopia post-mortem de animais inoculados com tumor (realizado com os animais 113 a 137, n = 14).**

Metástase	Disseminação tumoral local			Infecção
	s.c.	Órbita	Crânio	
00%	21%	00%	21%	21%

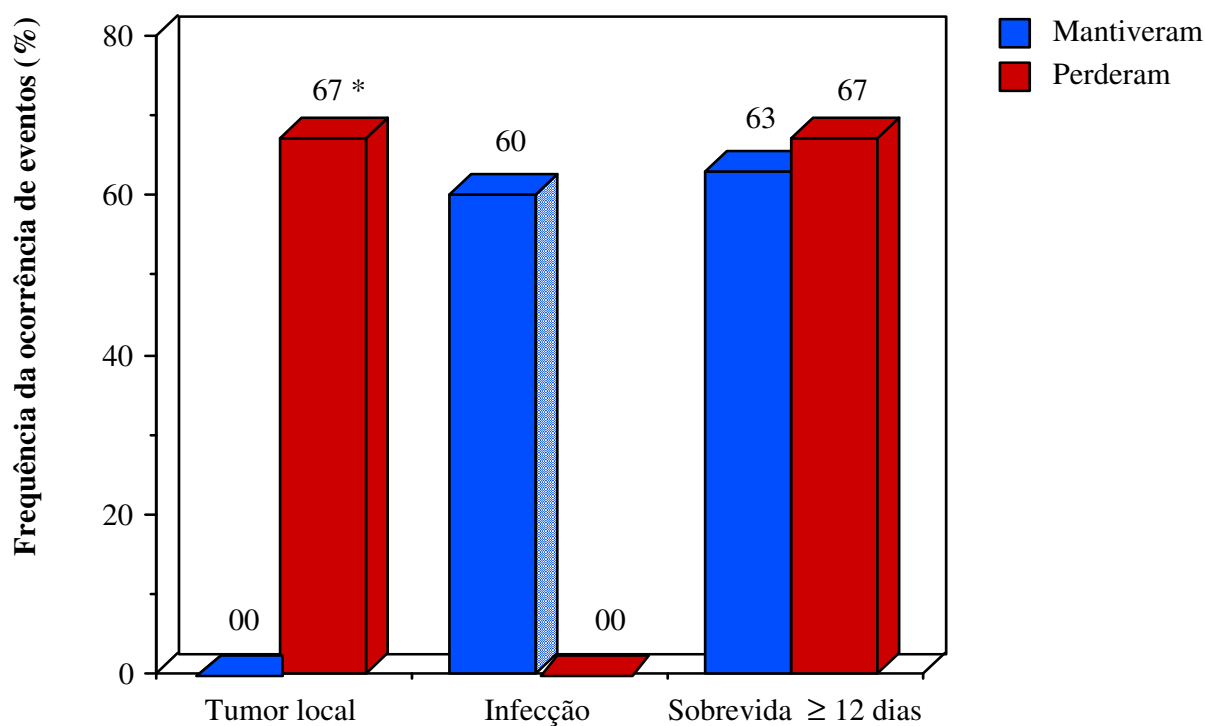
Os animais foram necropsiados após a morte ou sacrifício e foram observadas as presenças ou não de metástase para órgãos distantes (pulmão e fígado), disseminação tumoral extracerebral no local de implante (crânio ósseo, órbita e SC) e infecção de ferida cirúrgica.

**Tabela 5: Influência da perda do capacete no modelo.**

	Tumor local	Infecção	Sobrevida $\geq 12$	Sobrevida
	%	%	%	dias
Mantiveram	00	60	63	12,5 (8 – 14)
(n = 8)	-	(8,3)	-	
Perderam	67	00	67	13,5 (7 – 17)
(n = 6)	(30,6) <sup>a</sup>	-	(1,2)	

Os animais foram necropsiados após a morte ou sacrifício e foi observada a presença ou ausência de disseminação de tumor no local da cirurgia ou infecção de ferida cirúrgica. Comparou-se o grupo de animais que mantiveram o capacete no local durante todo o experimento com o grupo de animais que perderam o capacete ao longo do experimento. A sobrevida (dias) de animais que mantiveram ou perderam o capacete foi anotada, comparando-se as medianas (teste U de Mann-Whitney). A frequência (%) de animais com sobrevida  $\geq 12$  foi comparada entre os grupos. Sobrevida em mediana com valores mínimo e máximo. Valores de RC mostrados entre parênteses. <sup>a</sup>  $p < 0,05$ ; Teste de Fischer.





**Figura 8: Influência da perda do capacete em características do modelo.** Frequência (%) de ocorrência de eventos (disseminação de tumor no local da cirurgia, infecção de ferida cirúrgica e animais com sobrevida  $\geq$  12 dias) de acordo com a situação do capacete (animais que o mantiveram e animais que o perderam após a inoculação). \*  $p < 0,05$  (Teste de Fischer).

Animais que mantiveram o capacete após a inoculação mostraram uma chance 8,3 vezes maior de apresentar infecção de ferida cirúrgica, não significativa (n.s.). A chance dos animais sobreviverem um tempo igual ou maior a 12 dias após a inoculação foi praticamente igual entre os dois grupos (RC = 1,2; n.s.).

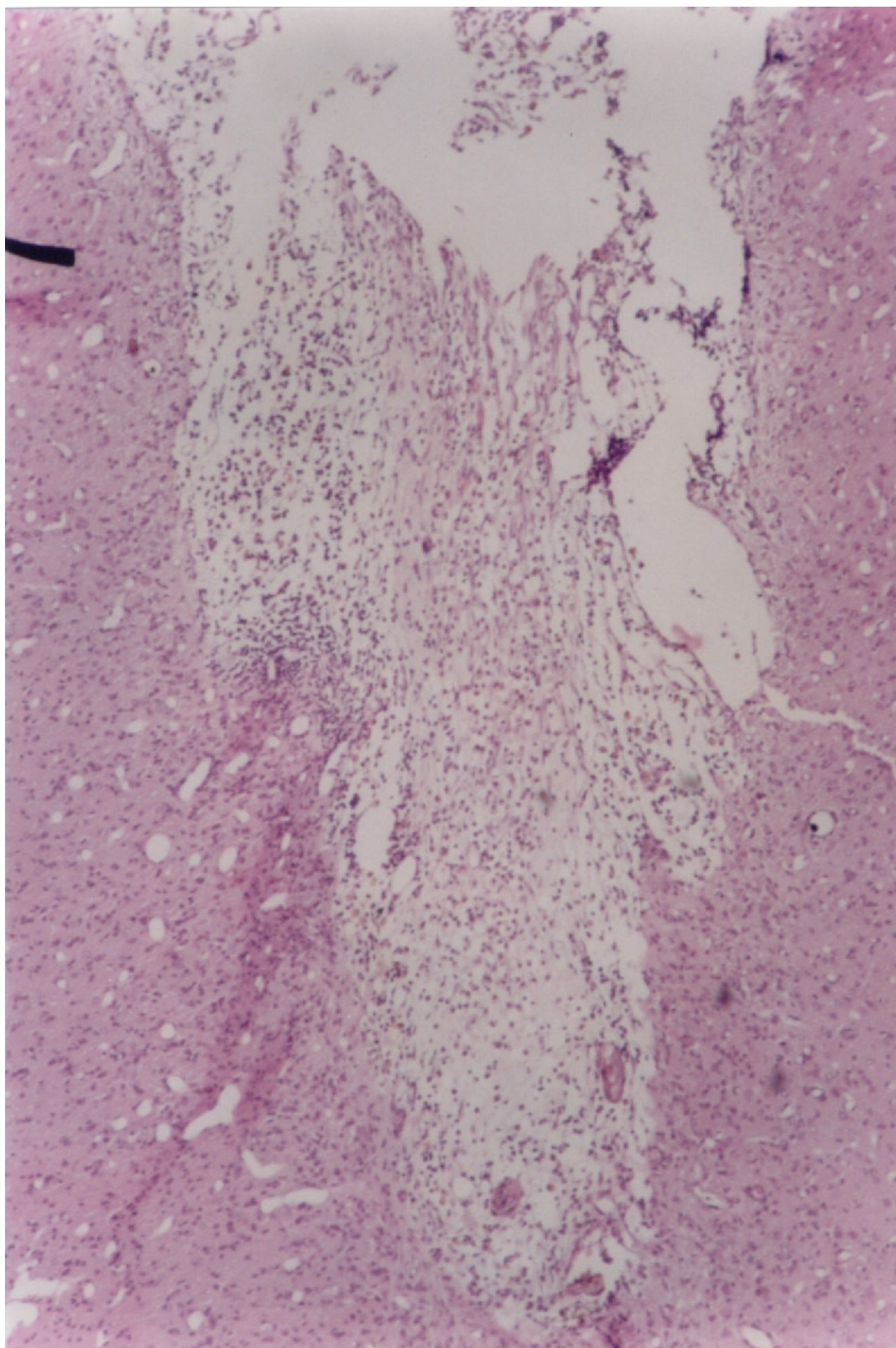
Comparou-se a sobrevida mediana dos animais no grupo que perdeu o capacete após inoculação (n = 6) e no grupo que manteve o capacete (n = 8), com o teste U de Mann-Whitney. A variação observada entre as medianas dos grupos não foi significativamente maior do que o esperado pelo acaso ( $p > 0,05$ ).

#### **4.1.4 Eficiência do crescimento tumoral em relação ao tratamento com CS**

Como a CS foi administrada em pré-tratamento, testou-se a influência da CS na eficiência de crescimento tumoral. A frequência de crescimento tumoral em cada grupo foi comparada com a ajuda do Teste de Fischer, obtendo-se uma RC para o teste. No grupo Tumor, 97,2% dos animais apresentaram crescimento tumoral no local da inoculação (35 de 36). No grupo Tumor + CS, 86,2% dos animais apresentaram crescimento tumoral no local da inoculação (25 de 29). Comparando-se a chance de encontrar crescimento tumoral no local da inoculação entre os grupos encontrou-se uma RC igual a 5,6 para o grupo Tumor (n.s.; teste exato de Fisher).

## **4.2 Estudos histopatológicos**

O aspecto microscópico da lesão após a implantação da cânula intracerebral é mostrado na **figura 9** (animal do grupo SHAM). Observou-se perda de continuidade do tecido nervoso normal preenchido por fibrose, células de corpo estranho e células inflamatórias. O espaço peri-lesional foi preenchido pela proliferação de células gliais (gliose).

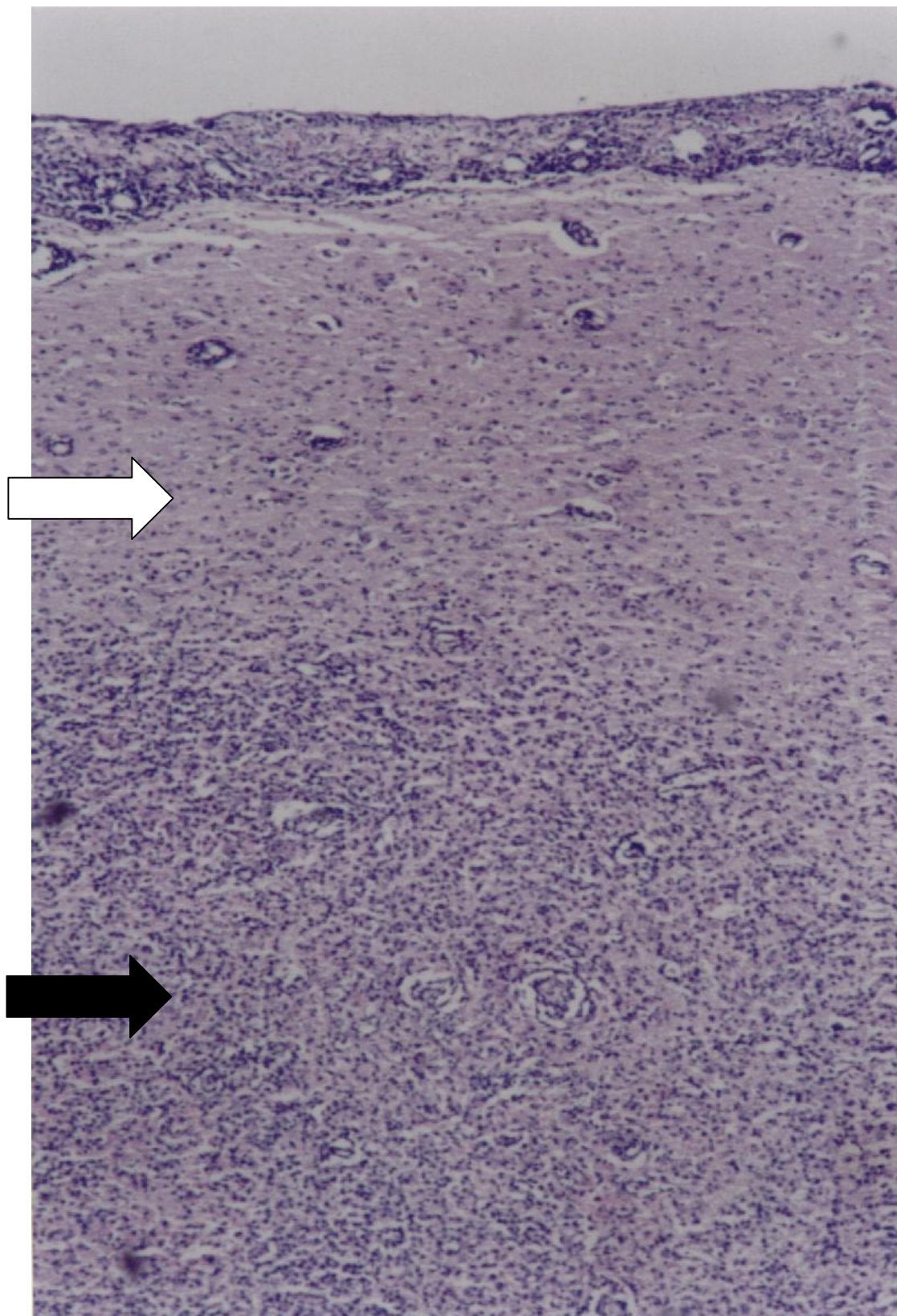


**Figura 9:** Aspecto microscópico da lesão após a implantação da cânula intracerebral (animal do grupo SHAM). Observa-se perda de continuidade do tecido nervoso normal preenchido por fibrose, células de corpo estranho e células inflamatórias. O espaço peri-lesional mostra proliferação de células gliais (gliose). Fixação em parafina, corante H-E (aumento 40X).

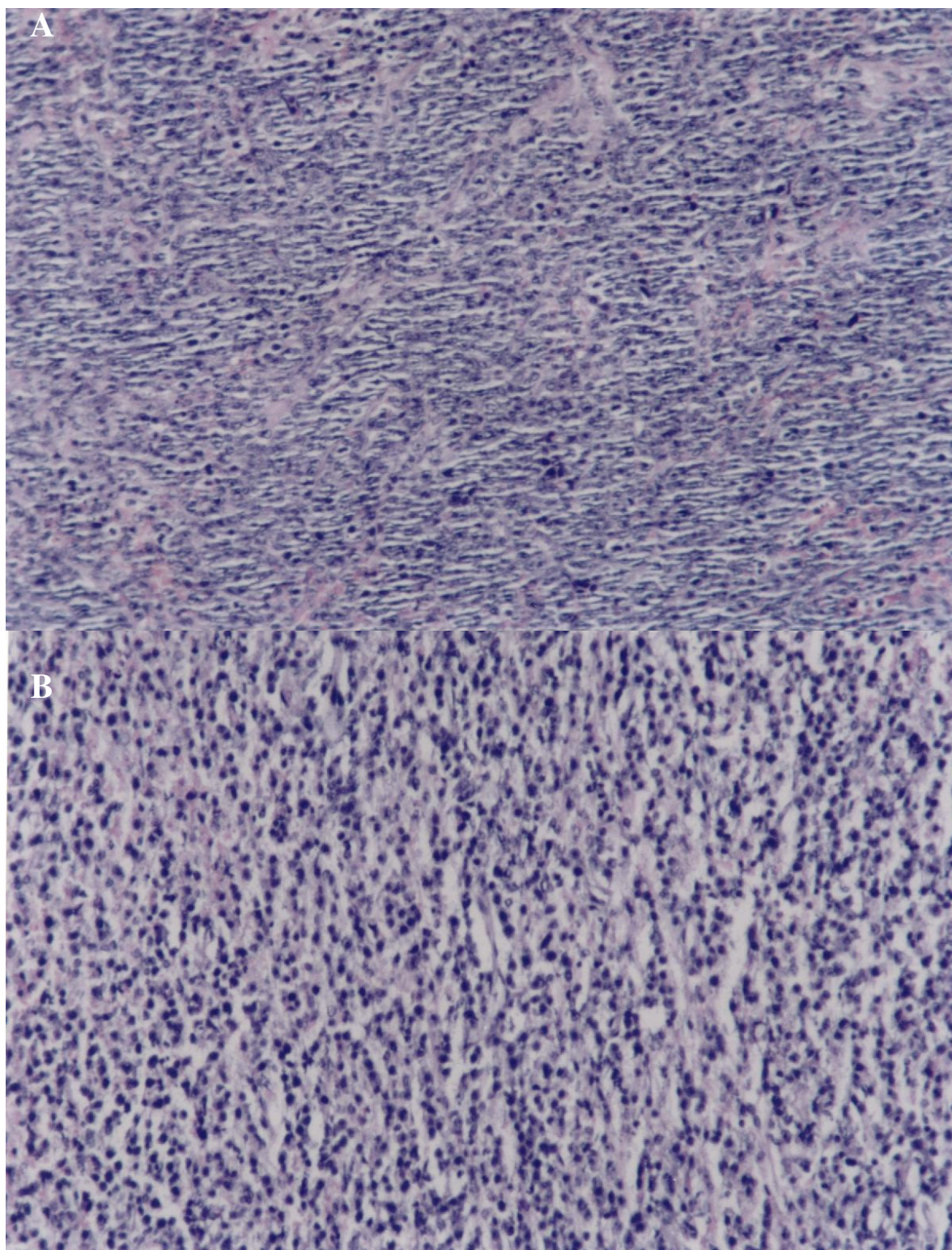
### 4.2.1 Tumor intracerebral

A análise histopatológica descreveu tumores de pequenas e médias células, indiferenciados, de crescimento rápido, com focos necróticos, formados por células arredondadas, de tamanho monótono, núcleos reticulados com nucléolos proeminentes, apresentando 30 figuras de mitose por campo de grande aumento, indicando malignidade (**figuras 10 e 11**). O diagnóstico diferencial patológico do tumor, baseando-se em cortes corados com H-E, incluiu linfomas, sarcomas indiferenciados, carcinomas indiferenciados e tumores neuroectodérmicos primitivos (laudo do professor Dalgimar Beserra de Menezes, do DPML). As mesmas características foram apresentadas por cortes histológicos dos tumores W256 crescendo na pata de animais da manutenção tumoral *in vivo*, tumores W256 crescendo no s.c. e *imprintings* tumorais de peças de W256 (**figura 11**).

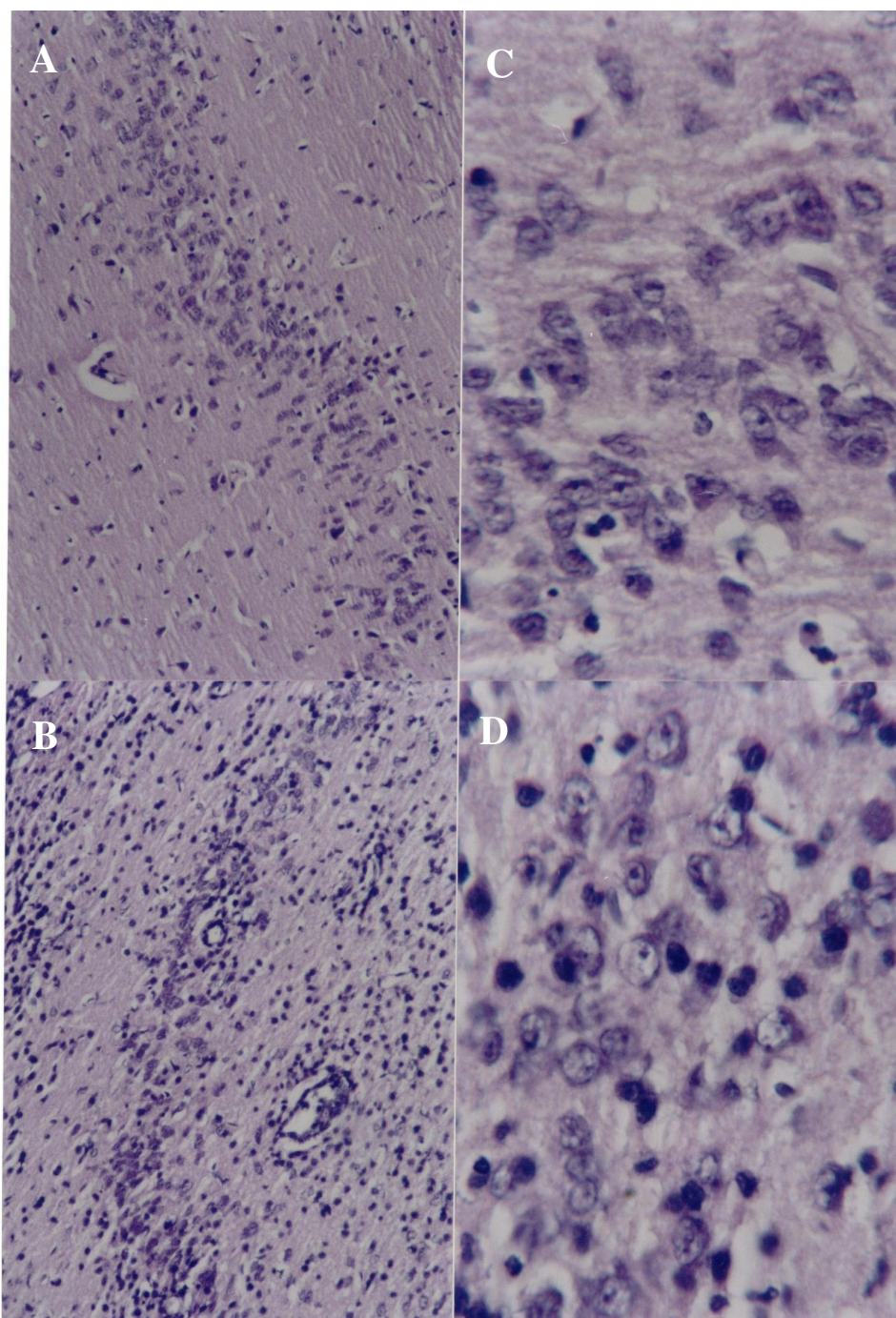
Os tumores cerebrais cresciam formando nódulos concêntricos ao ponto de inoculação e diversos nódulos satélites menores. Os nódulos tumorais não eram encapsulados e as células tumorais infiltravam o tecido cerebral circunjacente (**figura 10**). Células tumorais foram encontradas infiltrando o parênquima cerebral normal (**figura 12**), ao longo dos espaços perivasculares de Virchow-Robbin (**figura 13**) e ao longo de feixes de substância branca, como o corpo caloso (**figura 14**). Um nódulo satélite foi observado num hemisfério contralateral ao tumor principal, em uma das lâminas. Observaram-se áreas de necrose e hemorragia intratumorais (**figuras 15 e 16**), além de depósitos de material proteináceo fibrinóide e neoformação vascular associados ao tumor (**figuras 13 e 17**). Observaram-se infiltrados celulares tumorais nas meninges em 97,5% dos tumores analisados (22 de 23) (**figura 18**). Observaram-se infiltrados perivasculares (espaço de Virchow-Robbin) em 100% dos tumores analisados.



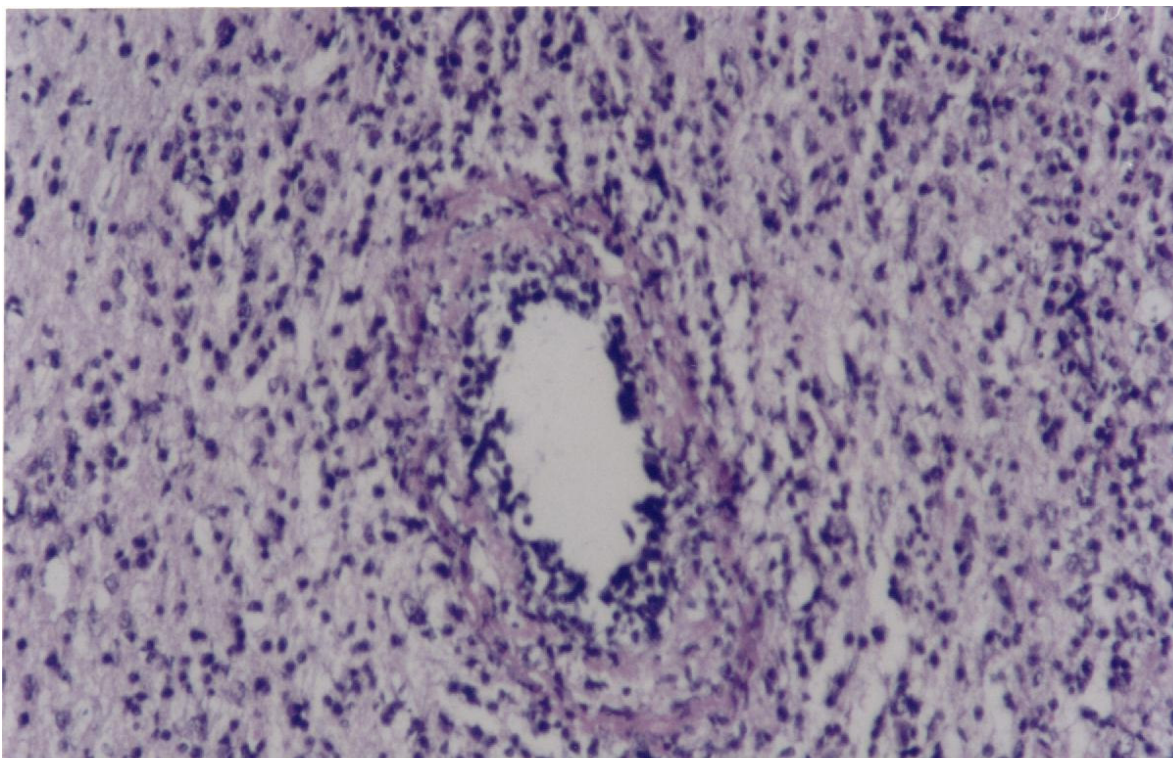
**Figura 10: Aspecto microscópico do tumor crescendo abaixo do córtex cerebral (animal do grupo Tumor).** Observa-se infiltração difusa do tecido nervoso normal, com ausência de demarcação nítida entre a área tumoral (seta escura) e o tecido cerebral (seta clara). Fixação em parafina, corante H-E (aumento 40X).



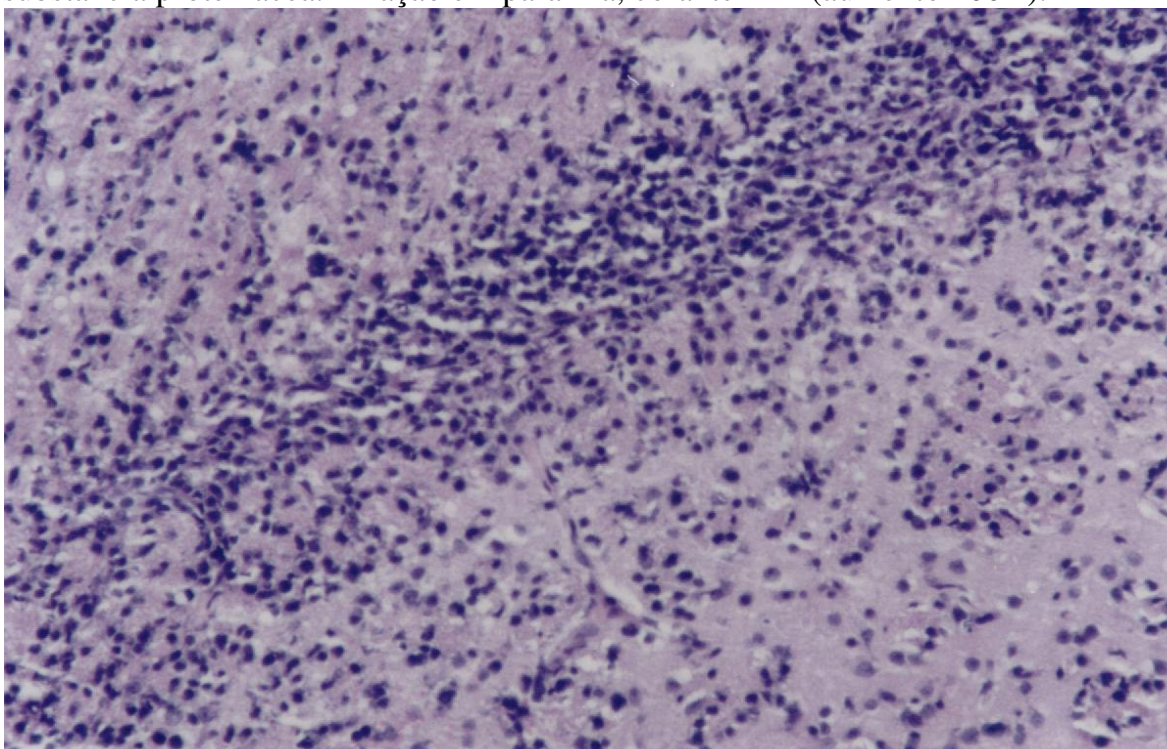
**Figura 11: Aspecto microscópico comparativo de tumor inoculado no cérebro e tumor de Walker crescendo no subcutâneo.** Observam-se células agrupadas em pseudopaliçadas formando panorama monótono tanto em tumor de Walker crescendo no subcutâneo (**A**) (aumento 40X), quanto em tumor inoculado no cérebro de ratos (**B**) (aumento 100X). Lâmina fixada em parafina, corada em H-E.



**Figura 12: Aspecto microscópico do tumor cerebral invadindo estruturas neurais.** As fotos foram obtidas de um mesmo animal inoculado com tumor. Demonstra-se o córtex piriforme (área olfatória primária) no hemisfério contralateral à inoculação tumoral, observando-se estruturas neuronais íntegras (A) (aumento 100X). Já no piriforme ipsilateral à inoculação tumoral, observa-se a presença de células tumorais infiltrando parênquima cerebral, além de neoangiogênese (B) (aumento 100X). As células tumorais são arredondadas, de tamanho monótono, núcleos reticulados com nucléolos proeminentes. Os neurônios do lado afetado (D) mostram alterações degenerativas (cariorrexe, picnose, degeneração hidrópica), quando comparados àqueles do lado não afetado (C) (aumento 400X). Fixação em parafina, corante H-E.

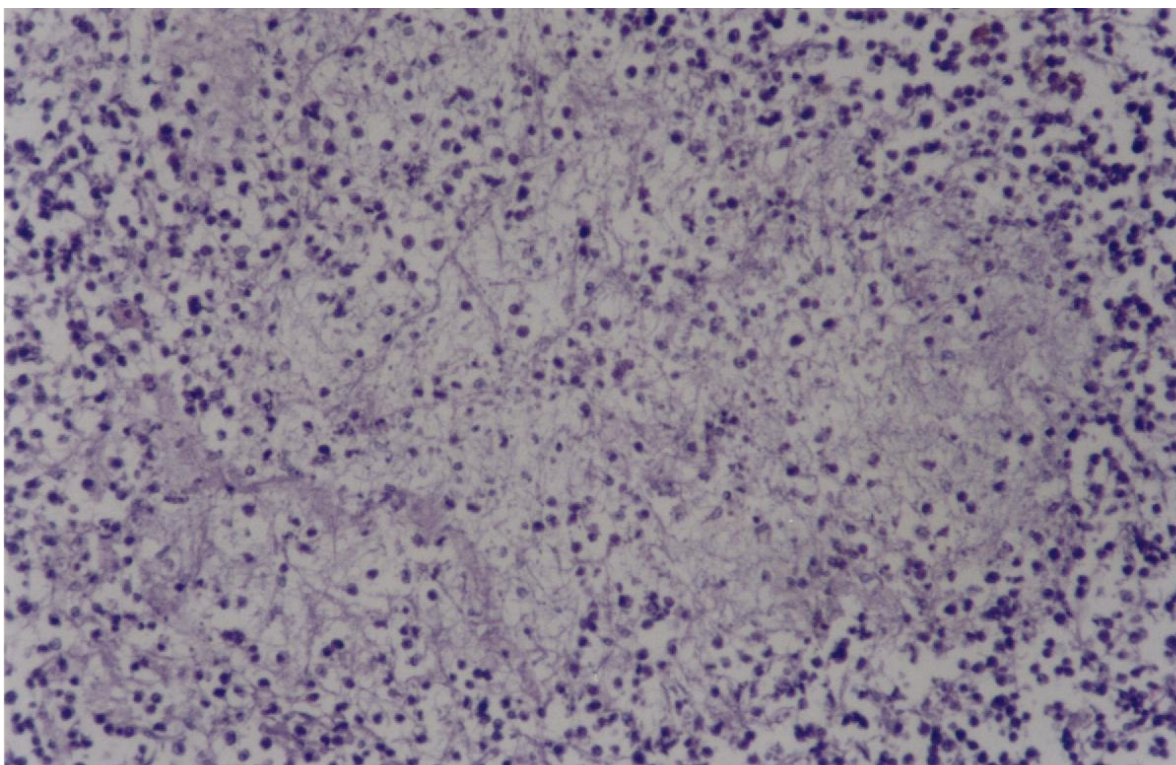


**Figura 13: Aspecto microscópico de infiltrado tumoral perivascular (animal do grupo Tumor).** Observa-se presença de infiltrado de células tumorais e linfomonocitárias no espaço perivascular de Virchow-Robbin, além de depósito de substância proteinácea. Fixação em parafina, corante H-E (aumento 100X).

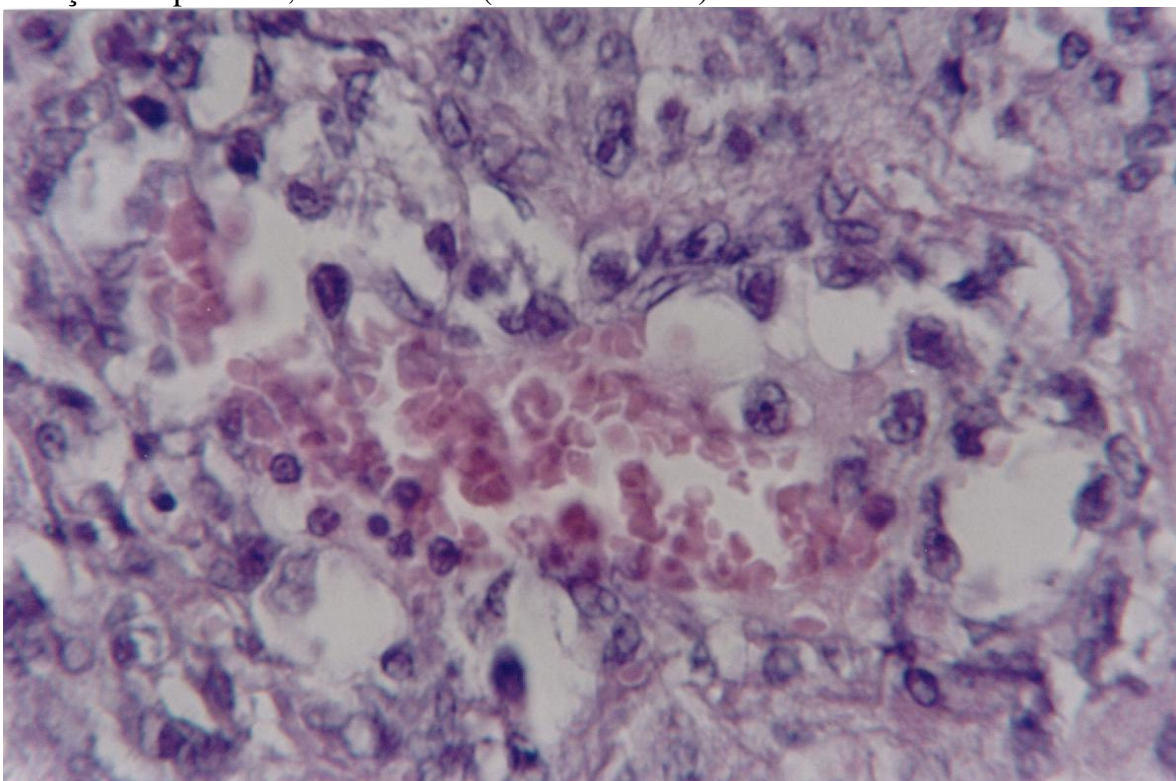


**Figura 14: Aspecto microscópico de disseminação celular tumoral ao longo de feixe de fibras nervosas (substância branca).** Observam-se células tumorais invadindo ao longo de uma seção do corpo caloso ipsilateral à inoculação de tumor. Fixação em parafina, corante H-E (aumento 100X).

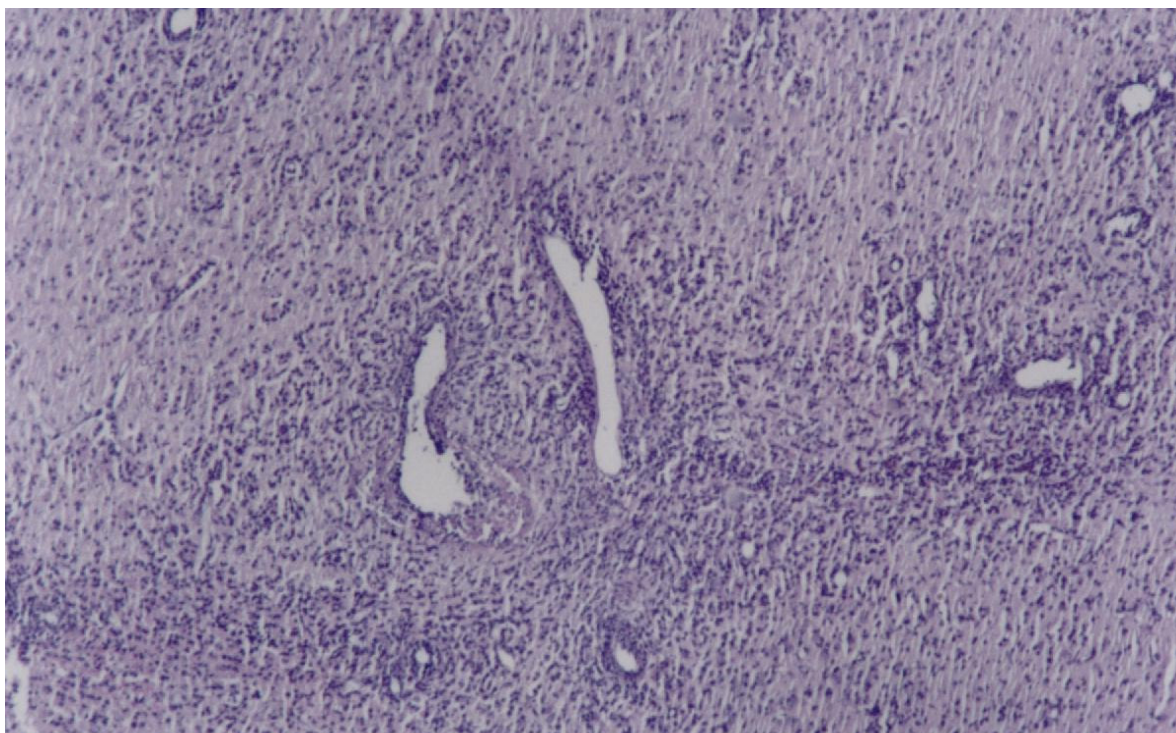




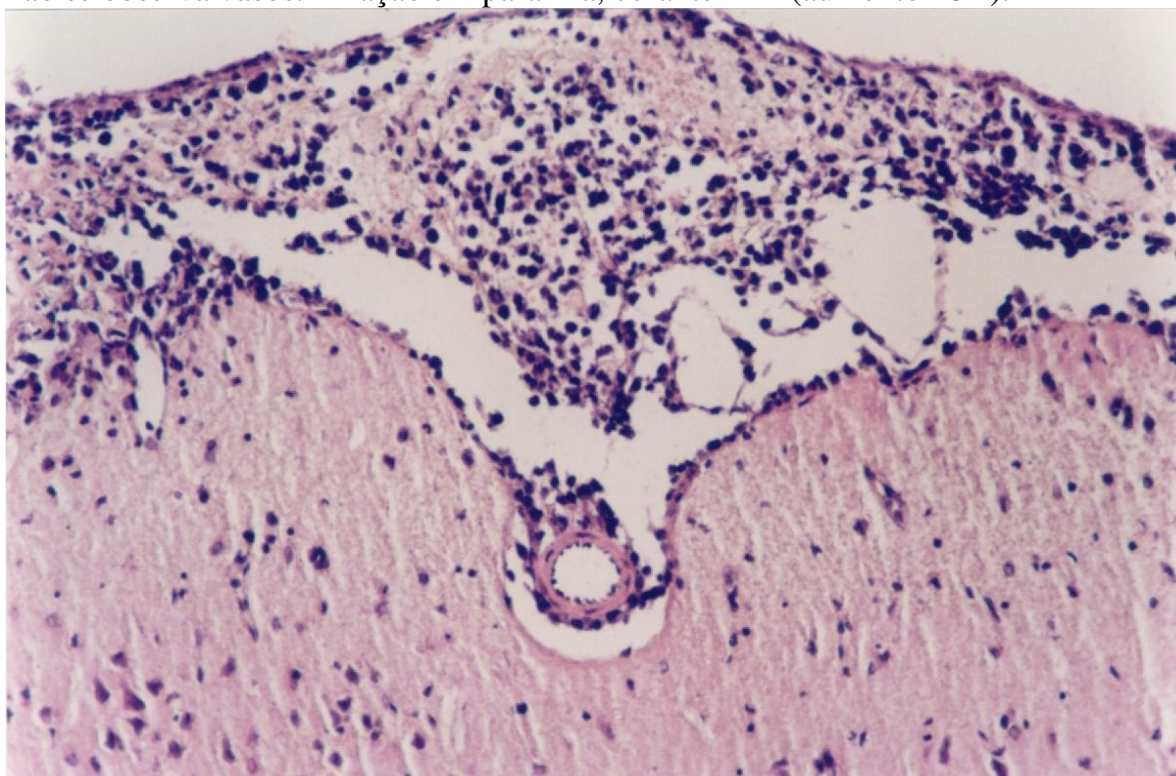
**Figura 15: Aspecto microscópico de área de necrose central em tumor cerebral (animal do grupo Tumor).** Observam-se restos celulares e materiais necrótico, circundado por células tumorais com alterações indicando hipóxia e morte celular. Fixação em parafina, corante H-E (aumento 100X).



**Figura 16: Aspecto microscópico de área de hemorragia em tumor cerebral (animal do grupo Tumor).** Observa-se presença de hemácias formando acúmulos em meio às células tumorais. Fixação em parafina, corante H-E (aumento 400X).



**Figura 17: Aspecto microscópico de neovangiogênese tumoral cerebral.** Observam-se vasos sanguíneos de calibres variados, em grande número, permeando área de caudado inoculado com tumor cerebral. No núcleo caudado, normalmente não se observa vasos. Fixação em parafina, corante H-E (aumento 40X).



**Figura 18: Aspecto microscópico das meninges nos animais inoculados com tumor cerebral** Observa-se infiltração das meninges por células tumorais. Fixação em parafina, corante H-E (aumento 100X).

#### 4.2.2 Volume tumoral cerebral estimado (VTE)

Como mostrado na **tabela 6** e na **figura 19**, o VTE no 7<sup>o</sup> DPI do grupo Tumor (n = 12) foi de  $17,08 \pm 6,7 \text{ mm}^3$ , enquanto o VTE no 7<sup>o</sup> DPI do grupo Tumor + CS (n = 11) foi de  $12,61 \pm 3,6 \text{ mm}^3$ . A diferença entre as médias foi de  $4,47 \text{ mm}^3$  (26%; ns; teste t-Student). O VTE no 9<sup>o</sup> DPI de animais do grupo Tumor foi de  $67,25 \pm 19,8 \text{ mm}^3$  (n = 4). Foi possível estimar o TD do tumor assumindo-se que, no intervalo considerado (entre o 7<sup>o</sup> DPI e o 9<sup>o</sup> DPI), o crescimento tumoral comporta-se como a fase *log* linear de uma curva de crescimento *versus* tempo. O valor do TD estimado foi de 24,25 h.

#### 4.2.3 Análise histopatológica qualitativa

Comparou-se a frequência de alterações histopatológicas observadas nas lâminas analisadas entre o grupo de animais inoculados com tumor e o grupo de animais inoculados com tumor e tratados com CS. Utilizou-se o Teste de Fischer, obtendo-se valores de RC para cada teste. A **tabela 7** e a **figura 20** mostram os dados.

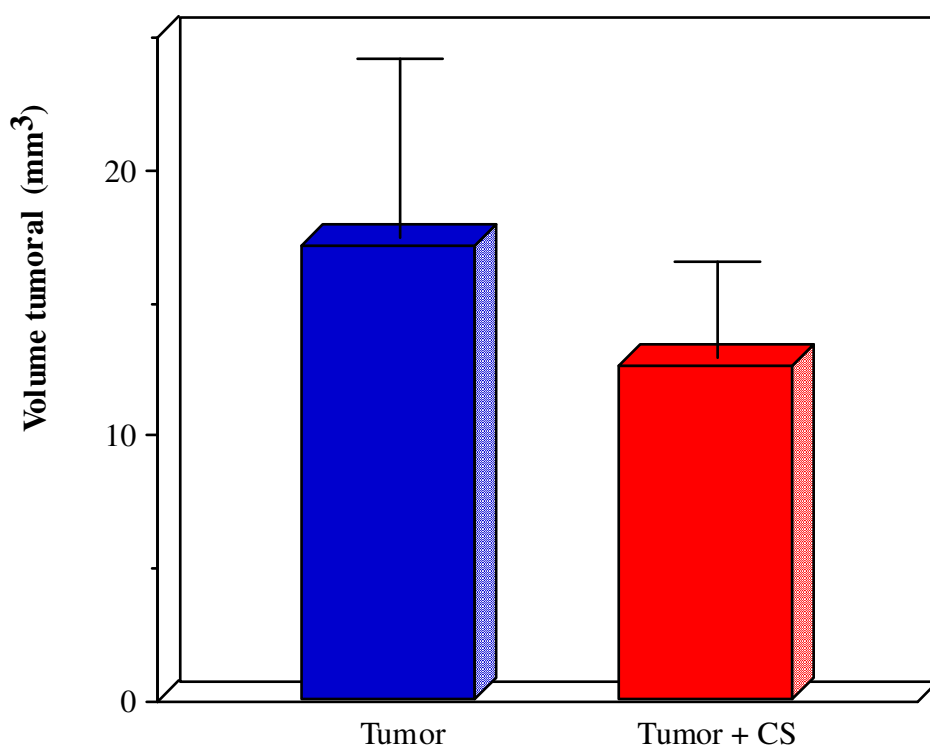
O grupo Tumor mostrou uma chance 2,7 vezes maior de apresentar infiltrado proteináceo compatível com deposição de fibrina (n.s.), além de uma chance pouco maior de apresentar hemorragia intratumoral (RC = 1,6; n.s.). A chance de observar-se nódulos tumorais satélites ao tumor principal foi praticamente igual nos dois grupos (RC = 1,1; n.s.).

O grupo Tumor + CS mostrou uma chance 5,6 vezes maior de apresentar infiltrados de PMN e necrose tumoral, ambos intimamente associados (n.s.).

**Tabela 6: Volume tumoral cerebral estimado por diâmetros em um corte histológico, no 7º DPI e 9º DPI.**

Grupo	VTE mm <sup>3</sup>	
	7º DPI	9º DPI
Tumor	17,1 ± 6,72 (n = 12)	67,3 ± 19,81 (n = 4)
Tumor + CS	12,6 ± 3,58 (n = 11) (26%)	-

Os animais foram sacrificados e sofreram fixação intracardíaca com formaldeído 3,7%. Lâminas foram preparadas com cortes realizados aproximadamente na altura do ponto de inoculação. Os diâmetros tumorais maior e menor foram medidos e calculou-se o VTE utilizando-se a fórmula de Steel. Teste t-Student, grupo Tumor + CS versus grupo Tumor (n.s.). Porcentagem de inibição mostrada entre parênteses.

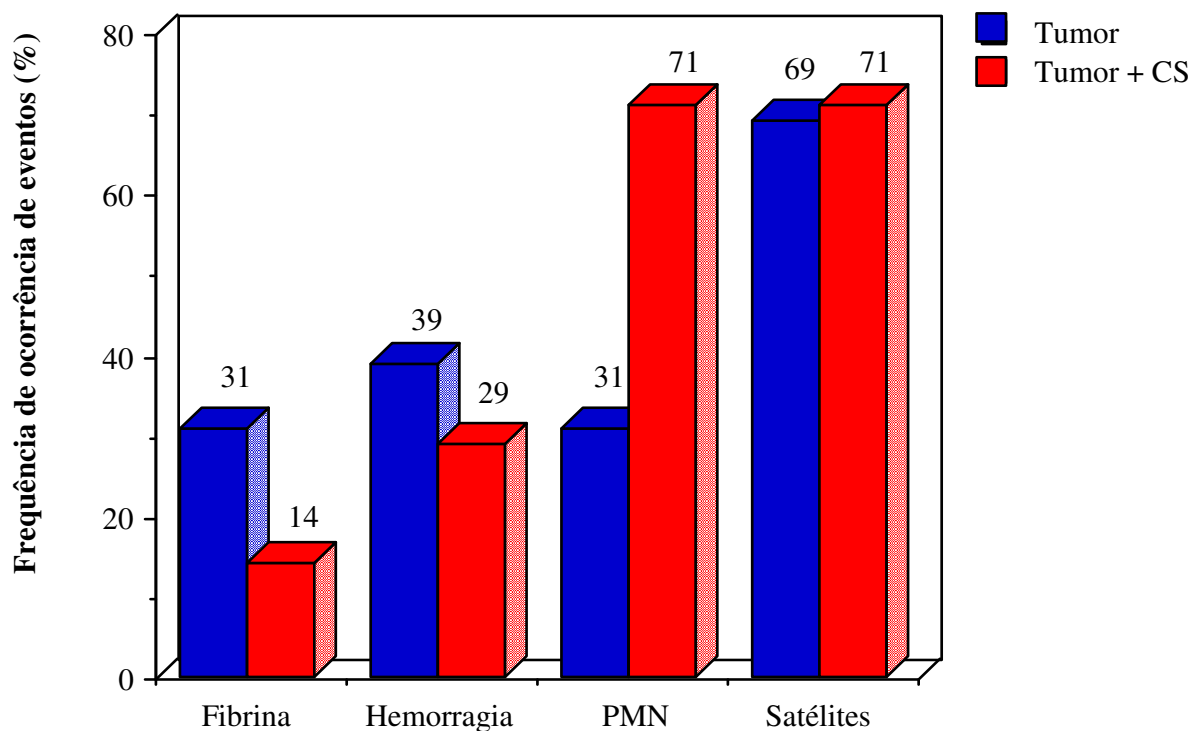


**Figura 19: Influência do tratamento com ciclosporina (CS) no volume tumoral estimado (VTE).** Média + EPM do VTE (mm<sup>3</sup>) a partir dos diâmetros tumorais maior e menor medidos num corte histológico na altura do ponto de inoculação no cérebro, em animais inoculados com tumor e tratados ou não com CS (10mg/kg/dia s.c.; 7 dias antes da inoculação tumoral e até a morte). O VTE foi calculado assumindo-se crescimento tumoral esferóide a partir do ponto de inoculação, utilizando-se a fórmula de Steel. A diferença não foi estatisticamente significativa (Teste t-Student).

**Tabela 7: Alterações qualitativas nas lâminas de cérebro analisadas.**

	Fibrina	Hemorragia	PMN	Satélites
	%	%	%	%
Tumor	31	39	31	69
n = 13	(2,7)	(1,6)	-	-
Tumor + CS	14	29	71	71
N = 7	-	-	(5,6)	(1,1)

Os animais foram necropsiados após a morte ou sacrifício e foram observadas as presenças ou não de depósito de material fibrinóide (fibrina), hemorragia intratumoral (hemorragia), infiltrado de polimorfonucleares (PMN) ou nódulos tumorais satélites (satélites). As peças foram fixadas com formaldeído 3,7% tamponado após a morte ou sacrifício dos animais, e os cortes feitos após inclusão em parafina e corados com H-E. As diferenças não foram estatisticamente significantes. Valores de RC mostrados entre parênteses (Teste de Fischer).



**Figura 20: Influência do tratamento com ciclosporina (CS) na ocorrência de eventos histopatológicos.** Frequência (%) da ocorrência de alterações histopatológicas (depósitos de fibrina, hemorragia intratumoral, infiltrado de polimorfonucleares, nódulos tumorais satélites) em lâminas de cérebros de animais inoculados com tumor, tratados ou não com CS (10mg/kg/dia s.c.; 7 dias antes da inoculação tumoral e até a morte). As peças foram fixadas com formaldeído 3,7% tamponado após a morte ou sacrifício dos animais, e os cortes feitos após inclusão em parafina e corados com H-E. As diferenças não foram estatisticamente significantes (Teste de Fischer).

#### **4.2.4 Alterações nos órgãos analisados**

Foram analisados cortes histopatológicos em H-E dos pulmões, fígados e rins. Em nenhum destes se evidenciaram implantes tumorais secundários ou outras alterações dignas de nota da estrutura celular e tecidual. Em alguns cortes de pulmões foram observadas lesões perivasculares ou peribrônquicas compostas principalmente de células inflamatórias linfomonocitárias e neutrofílicas. A possível presença de células tumorais nestas lesões não pôde ser descartada apenas com base nos cortes em H-E.

### **4.3 Transplante de fragmentos pulmonares**

Todos os animais que receberam transplante s.c. de fragmentos pulmonares de um animal inoculado com tumor cerebral desenvolveram massas endurecidas, aderidas, infiltradas em planos profundos, com necrose da pele subjacente. O exame histopatológico das peças mostrou tumores malignos com características semelhantes às do tumor W256 também encontrado nos animais inoculados intracerebralmente. O fragmento pulmonar do animal utilizado como “doador” dos pulmões, submetido a exame histopatológico, não demonstrou nenhuma lesão sugestiva de micrometástase ao exame com H-E.

### **4.4 Estudos hematológicos**

#### **4.4.1 Linhagem eritróide**

##### **4.4.1.1 Hemácias**

Foram comparados os valores de hemácias por  $\text{mm}^3$  de sangue, através de ANOVA, nos grupos SHAM, Tumor, Tumor + CS, CS e CrEL. Como mostra a



**tabela 8**, a variação entre os grupos não foi significativamente maior do que o esperado pelo acaso ( $p > 0,05$ ).

#### **4.4.1.2 Hematócrito**

Os valores de hematócrito foram comparados, através de ANOVA, nos grupos supracitados. Como mostra a **tabela 8**, a variação entre os grupos não foi significativamente maior do que o esperado pelo acaso ( $p > 0,05$ ).

#### **4.4.1.3 Hemoglobina**

Foram comparados os valores de hemoglobina sanguínea, através de ANOVA, nos grupos citados anteriormente (**tabela 8**). A variação entre os grupos não foi significativamente maior do que o esperado pelo acaso ( $p > 0,05$ ). Nenhum animal apresentou anemia, segundo a definição utilizada neste trabalho.

### **4.4.2 Linhagem mielóide**

#### **4.4.2.1 Leucócitos totais**

Foram comparados os valores totais de leucócitos por  $\text{mm}^3$  de sangue, através de ANOVA, nos grupos SHAM, Tumor, Tumor + CS, CS e CrEL. Como mostra a **tabela 9**, a variação entre os grupos não foi significativamente maior do que o esperado pelo acaso ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 8: Valores da linhagem eritrocitária, em animais inoculados com tumor, tratados com CS, com veículo e controle (med  $\pm$  EPM).**

	Eritrócitos (n x 10 <sup>6</sup> )	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/dL)
SHAM (n = 32)	7,7 $\pm$ 0,11	42,2 $\pm$ 0,54	14,7 $\pm$ 0,19
Tumor (n = 14)	7,6 $\pm$ 0,25	42,3 $\pm$ 1,12	14,6 $\pm$ 0,45
Tumor + CS (n = 9)	7,9 $\pm$ 0,29	42,5 $\pm$ 1,39	14,9 $\pm$ 0,55
CS (n = 7)	7,9 $\pm$ 0,67	41,3 $\pm$ 1,19	14,4 $\pm$ 0,54
CrEL (n = 6)	7,8 $\pm$ 0,18	43,4 $\pm$ 1,37	14,2 $\pm$ 0,45

Os animais foram anestesiados com éter etílico em máscara/campânula, e tiveram amostras de sangue retiradas em tubos contendo heparina sódica, por punção retro-ocular. A contagem de elementos da série vermelha foi feita de forma automatizada (Coulter C-6). Valores comparados com ANOVA (n.s.).

#### 4.4.2.2 Valores absolutos de neutrófilos

Os valores absolutos de neutrófilos por  $\text{mm}^3$  de sangue, através de ANOVA, nos grupos SHAM, Tumor, Tumor + CS, CS e CrEL, são mostrados na **tabela 9** e na **figura 21**. A variação entre os grupos foi significativamente maior do que o esperado pelo acaso. Os grupos Tumor ( $p < 0,01$ ) e Tumor + CS ( $p < 0,05$ ) foram significativamente diferentes do grupo SHAM, mas não entre si. Não houve outras diferenças significantes (teste de Tukey-Kramer).

Como mostra a **tabela 10** e a **figura 22**, no grupo SHAM e grupo Tumor, 34% (11 de 32) e 64% (9 de 14) dos animais apresentaram neutrofilia absoluta, respectivamente (RC = 3,4; n.s.). No grupo Tumor + CS e grupo CS, 78% (7 de 9) (RC = 6,7; IC95% = 1,2 – 37,8;  $p < 0,05$ ) e 86% (6 de 7) (RC = 11,5; IC95% = 1,2 – 107,6;  $p < 0,05$ ) dos animais apresentaram neutrofilia absoluta, respectivamente. Já no grupo CrEL, apenas 17% (1 de 6) dos animais apresentaram neutrofilia absoluta (RC = 0,4; n.s.) (Teste de Fischer).

#### 4.4.2.3 Valores relativos de neutrófilos

Os valores relativos de neutrófilos por  $\text{mm}^3$  de sangue foram comparados, através de ANOVA, nos grupos SHAM, Tumor, Tumor + CS, CS e CrEL. Como mostra a **tabela 9** e a **figura 23**, a variação entre os grupos foi significativamente maior do que o esperado pelo acaso. Os grupos Tumor, Tumor + CS ( $p < 0,01$ ) e CS ( $p < 0,05$ ) foram significativamente diferentes do grupo SHAM, mas não entre si. O grupo Tumor + CS foi significativamente diferente do grupo CrEL ( $p < 0,05$ ). Não houve outras diferenças significantes (teste de Student-Newman-Keuls).

Como mostra a **tabela 10** e a **figura 24**, no grupo Tumor e grupo Tumor + CS, 36% (5 de 14) (RC = 37,6; IC95% = 1,9 – 744,4;  $p < 0,01$ ) e 33% (3 de 9) (RC = 35; IC95% = 1,6 – 762,5;  $p < 0,01$ ) dos animais apresentaram neutrofilia relativa, respectivamente. Nos grupos SHAM, CS e CrEL, nenhum dos animais apresentou neutrofilia relativa (Teste de Fischer).

**Tabela 9: Valores de neutrófilos e linfócitos, em animais inoculados com tumor, tratados com CS, veículo e controle.**

	Leucócitos	Neutrófilos		Linfócitos	
	n x 10 <sup>6</sup>	n x 10 <sup>3</sup>	Relativo (%)	n x 10 <sup>3</sup>	Relativo (%)
SHAM (n = 32)	11,4 ± 0,51	1,9 ± 0,16	17,1 ± 1,22	9,1 ± 0,47	79,7 ± 1,37
Tumor (n = 14)	11,3 ± 1,15	3,8 ± 0,71 (100%) <sup>a</sup>	31,5 ± 5,18 (84%) <sup>c</sup>	7,2 ± 0,84 (21%)	65,6 ± 5,42 (18%) <sup>c</sup>
Tumor + CS (n = 9)	10,7 ± 1,20	3,7 ± 0,54 (95%) <sup>b</sup>	35,1 ± 4,87 (105%) <sup>c</sup>	6,8 ± 0,97 (25%)	63,6 ± 4,83 (20%) <sup>d</sup>
CS (n = 7)	11,5 ± 1,54	3,4 ± 0,41 (79%)	29,6 ± 1,31 (73%) <sup>d</sup>	7,3 ± 1,04 (20%)	64,6 ± 3,77 (19%) <sup>d</sup>
CrEL (n = 6)	10,1 ± 1,69	1,8 ± 0,50	18,3 ± 3,32 (7%)	6,9 ± 0,88 (24%)	72,2 ± 6,45 (10%)

Os animais foram anestesiados com éter etílico em máscara/campânula, e tiveram amostras de sangue retiradas em tubos contendo heparina sódica, por punção retro-ocular. A contagem de leucócitos totais foi feita de forma automatizada (Coulter C-6). A leucometria parcial foi feita manualmente em esfregaços corados com M-G-G. Os resultados foram expressos como média ± EPM.

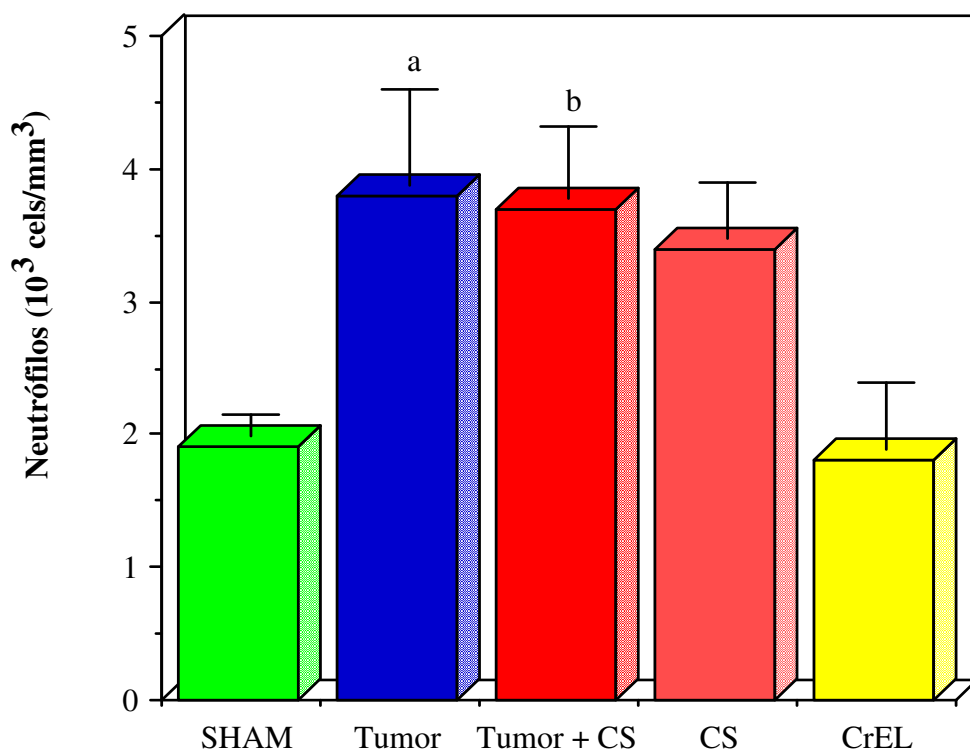
<sup>a</sup> p < 0,01; ANOVA, post-hoc: teste de Tukey-Kramer.

<sup>b</sup> p < 0,05; ANOVA, post-hoc: teste de Tukey-Kramer.

<sup>c</sup> p < 0,01; ANOVA, post-hoc: teste de Student-Newman-Keuls.

<sup>d</sup> p < 0,05; ANOVA, post-hoc: teste de Student-Newman-Keuls.

A porcentagem de aumento (neutrófilos) ou inibição (linfócitos), é mostrada entre parênteses.



**Figura 21: Número absoluto de neutrófilos.** Influência da inoculação tumoral e/ou tratamento com CS (10mg/kg/dia s.c.; 7 dias antes da inoculação tumoral e até a morte) ou CrEL (0,3ml/kg/dia s.c.; 7 dias antes da inoculação tumoral e até a morte) no número absoluto de neutrófilos circulantes ( $10^3$  células/  $\text{mm}^3$ ). Os animais tiveram amostras de sangue retiradas por punção retro-ocular no 7<sup>o</sup> DPI (15<sup>o</sup> DPO para os grupos CS e CrEL) e leucometria diferencial realizada por contagem manual em esfregaços corados com M-G-G. Valores apresentados como média + EPM. ANOVA, <sup>a</sup>  $p < 0,01$ ; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  (ANOVA), em relação ao grupo SHAM.

**Tabela 10: Freqüência de neutrofilia e linfopenia em animais inoculados ou não com tumor, tratados ou não com CS ou veículo.**

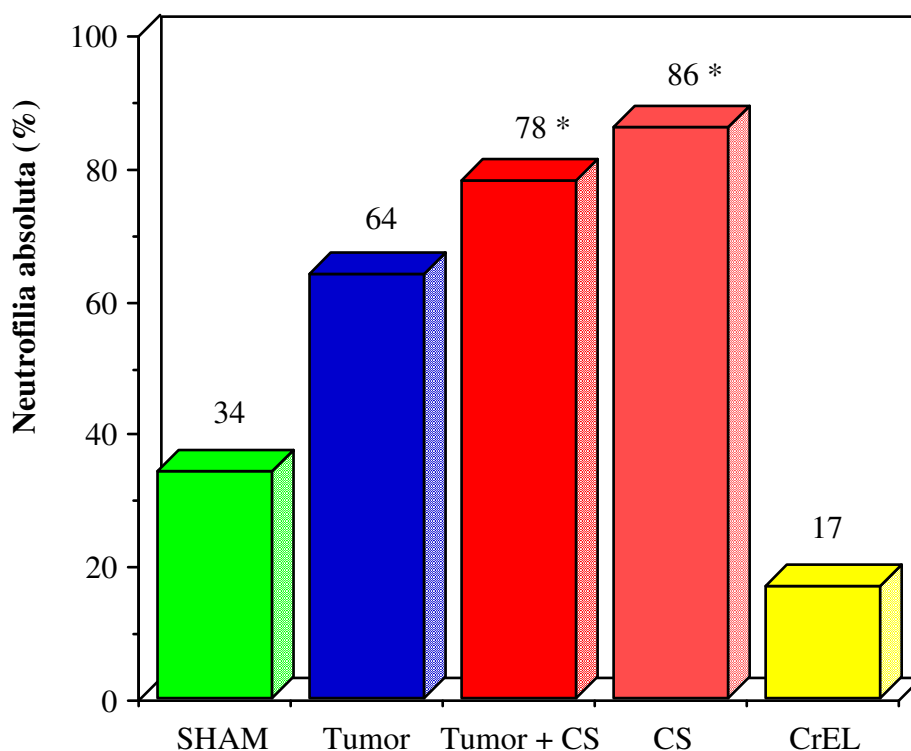
	Neutrofilia		Linfopenia	
	%		%	
	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa
SHAM	34	0	3	0
(n = 32)	-	-	-	-
Tumor	64	36	29	36
(n = 14)	(3,4)	(37,6) <sup>b</sup>	(12,4) <sup>a</sup>	(37,6) <sup>b</sup>
Tumor + CS	78	33	33	33
(n = 9)	(6,7) <sup>a</sup>	(35) <sup>b</sup>	(15,5) <sup>a</sup>	(35) <sup>b</sup>
CS	86	0	14	14
(n = 7)	(11,5) <sup>a</sup>	-	(5,1)	(15)
CrEL	17	0	17	17
(n = 6)	(0,4)	-	(6,2)	(17,7)

Os animais foram anestesiados com éter etílico em máscara/campânula, e tiveram amostras de sangue retiradas em tubos contendo heparina sódica, por punção retro-ocular. A contagem de leucócitos totais foi feita de forma automatizada (Coulter C-6). A leucometria parcial foi feita manualmente em esfregaços corados com M-G-G.

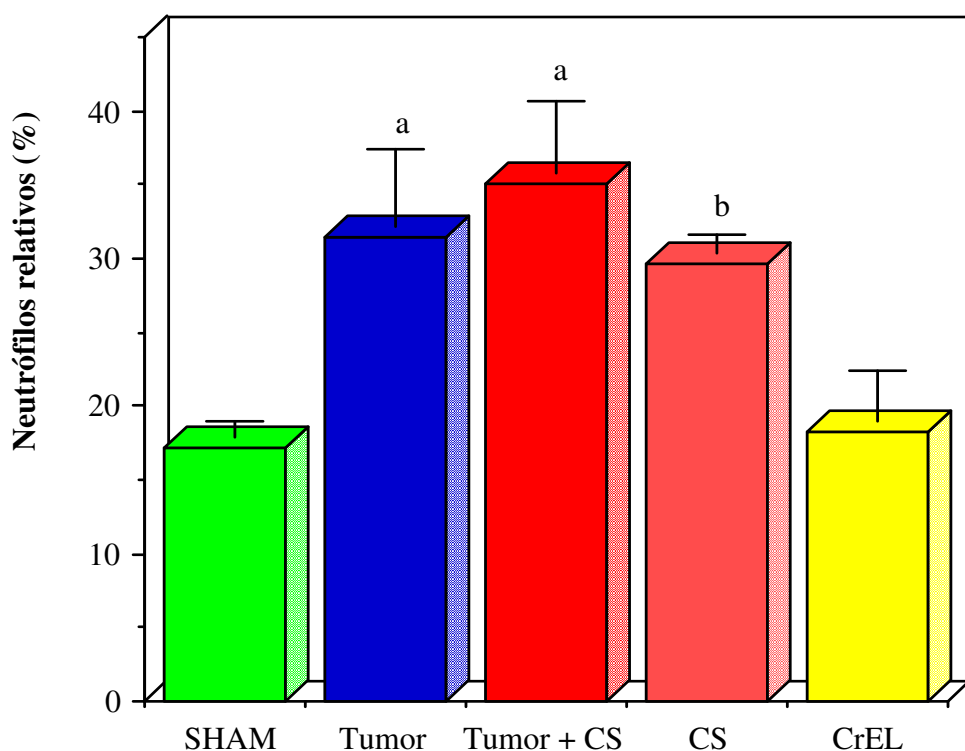
<sup>a</sup>  $p < 0,05$ ; Teste de Fischer.

<sup>b</sup>  $p < 0,01$ ; Teste de Fischer.

Valores de RC são mostrados entre parênteses.

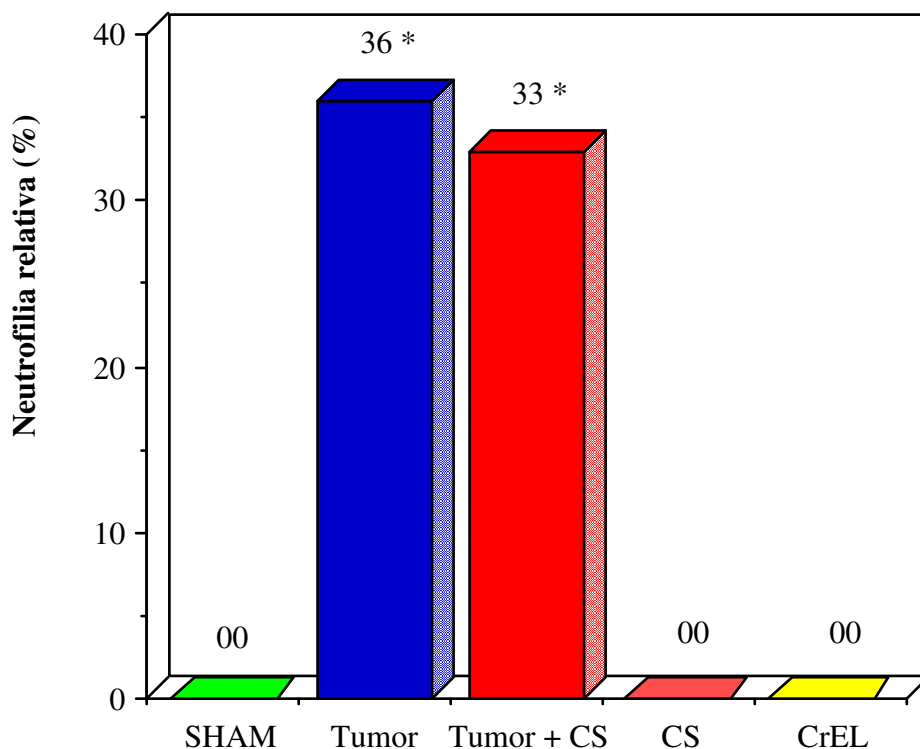


**Figura 22: Frequência de animais com neutrofilia absoluta de acordo com os tratamentos.** Frequência (%) de ocorrência de animais com neutrofilia absoluta de acordo com a inoculação tumoral e/ou tratamento com CS (10mg/kg/dia s.c.; 7 dias antes da inoculação tumoral e até a morte) ou CrEL (0,3ml/kg/dia s.c.; 7 dias antes da inoculação tumoral e até a morte). Os animais tiveram amostras de sangue retiradas por punção retro-ocular no 7<sup>o</sup> DPI (15<sup>o</sup> DPO para os grupos CS e CrEL) e leucometria diferencial realizada por contagem manual em esfregaços corados com M-G-G. \*  $p < 0,05$  (Teste de Fischer), em relação ao grupo SHAM.



**Figura 23: Número relativo de neutrófilos.** Influência da inoculação tumoral e/ou tratamento com CS (10mg/kg/dia s.c.; 7 dias antes da inoculação tumoral e até a morte) ou CrEL (0,3ml/kg/dia s.c.; 7 dias antes da inoculação tumoral e até a morte) no número relativo (%) de neutrófilos circulantes, em relação aos leucócitos totais. Os animais tiveram amostras de sangue retiradas por punção retro-ocular no 7<sup>o</sup> DPI (15<sup>o</sup> DPO para os grupos CS e CrEL) e leucometria diferencial realizada por contagem manual em esfregaços corados com M-G-G. Os valores representam média + EPM do número relativo de neutrófilos. ANOVA, <sup>a</sup>  $p < 0,01$ ; <sup>b</sup>  $p < 0,05$ , em relação ao grupo SHAM.





**Figura 24: Frequência de animais com neutrofilia relativa de acordo com os tratamentos.** Frequência (%) de ocorrência de animais com neutrofilia relativa de acordo com a inoculação tumoral e/ou tratamento com CS (10mg/kg/dia s.c.; 7 dias antes da inoculação tumoral e até a morte) ou CrEL (0,3ml/kg/dia s.c.; 7 dias antes da inoculação tumoral e até a morte). Os animais tiveram amostras de sangue retiradas por punção retro-ocular no 7<sup>o</sup> DPI (15<sup>o</sup> DPO para os grupos CS e CrEL) e leucometria diferencial realizada por contagem manual em esfregaços corados com M-G-G. \*  $p < 0,01$  (Teste de Fischer), em relação ao grupo SHAM.

#### 4.4.2.4 Valores absolutos de linfócitos

Os valores absolutos de linfócitos por  $\text{mm}^3$  de sangue foram comparados através de ANOVA, nos grupos SHAM, Tumor, Tumor + CS, CS e CrEL. Como mostra a **tabela 9** e a **figura 25**, a variação entre os grupos não foi significativamente maior do que o esperado pelo acaso ( $p > 0,05$ ).

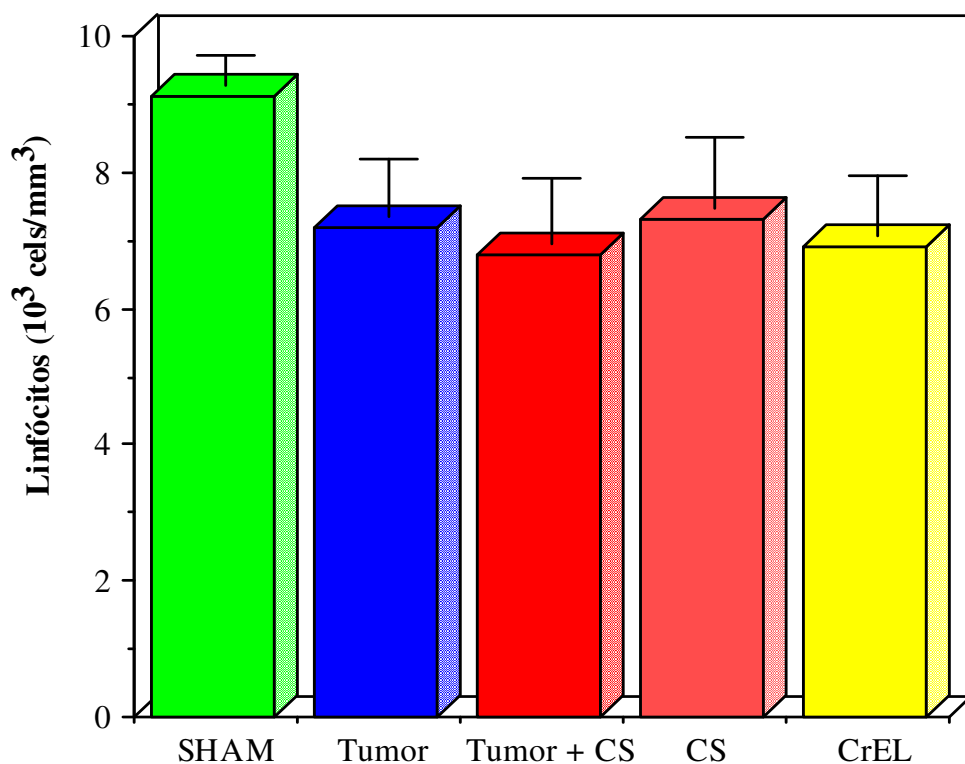
Como mostra a **tabela 10** e a **figura 26**, no grupo SHAM e grupo Tumor, 3% (1 de 32) e 29% (4 de 14) (RC = 12,4; IC95% = 1,2 – 124,3;  $p < 0,05$ ) dos animais apresentaram linfopenia absoluta, respectivamente. No grupo Tumor + CS e grupo CS, 33% (3 de 9) (RC = 15,5; IC95% = 1,4 – 175,5;  $p < 0,05$ ) e 14% (1 de 7) (RC = 5,1; n.s.) dos animais apresentaram linfopenia absoluta, respectivamente.

Da mesma forma, no grupo CrEL, 17% (1 de 6) dos animais apresentaram linfopenia absoluta (RC = 6,2; n.s.) (Teste de Fischer).

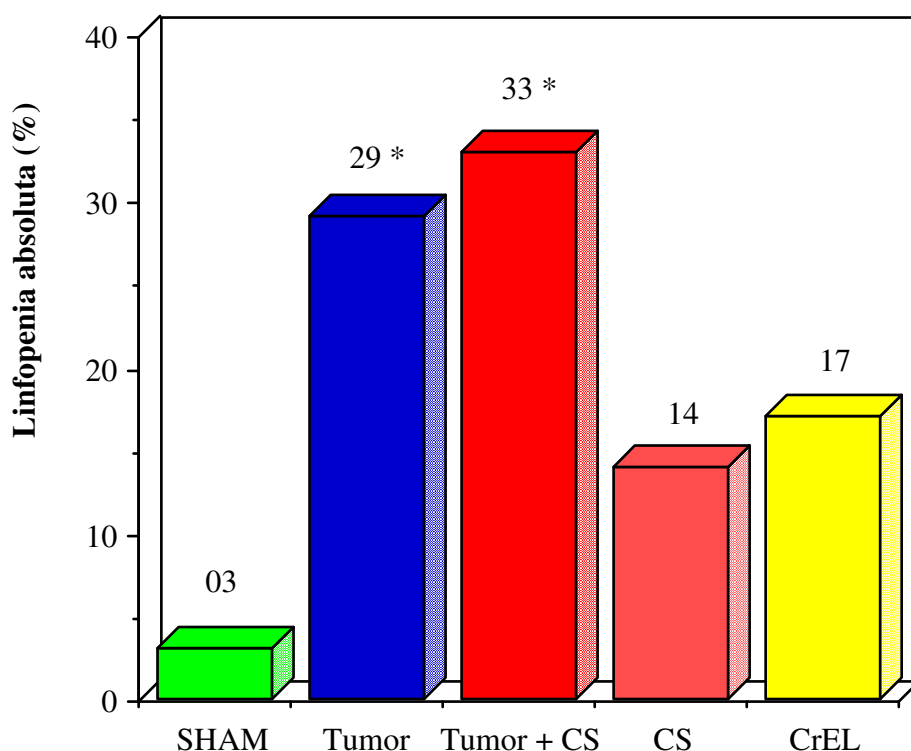
#### 4.4.2.5 Valores relativos de linfócitos

Através de ANOVA, foram comparados os valores relativos de linfócitos por  $\text{mm}^3$  de sangue nos grupos SHAM, Tumor, Tumor + CS, CS e CrEL. Como mostra a **tabela 9** e a **figura 27**, a variação entre os grupos foi significativamente maior do que o esperado pelo acaso. Os grupos Tumor ( $p < 0,01$ ), Tumor + CS ( $p < 0,05$ ) e CS ( $p < 0,05$ ) foram significativamente diferentes do grupo SHAM, mas não entre si. Não houve outras diferenças significantes (teste de Student-Newman-Keuls).

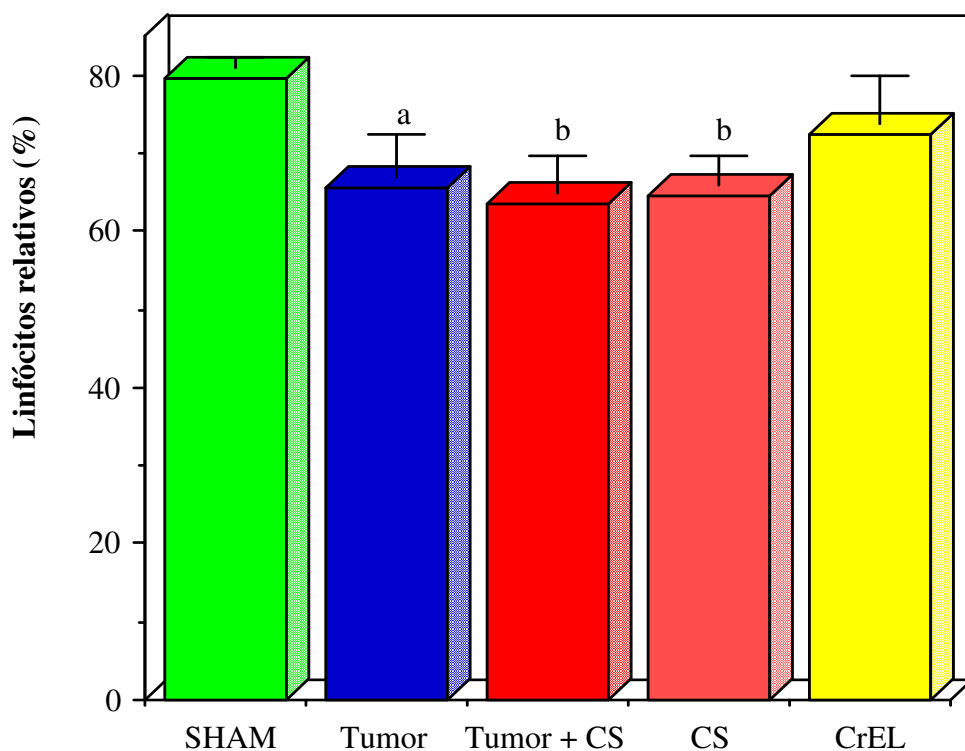
Como mostra a **tabela 10** e a **figura 28**, no grupo SHAM nenhum dos animais (0 de 32) apresentou linfopenia relativa. Nos grupos Tumor, Tumor + CS e CS, 36% (5 de 14) (RC = 37,6; IC95% = 1,9 – 744,4;  $p < 0,01$ ), 33% (3 de 9) (RC = 35; IC95% = 1,6 – 762,5;  $p < 0,01$ ) e 14% (1 de 7) (RC = 15; n.s.) dos animais apresentaram linfopenia relativa, respectivamente. Por outro lado, no grupo CrEL, 17% (1 de 6) dos animais apresentaram linfopenia relativa (RC = 17,7; n.s.) (Teste de Fischer).



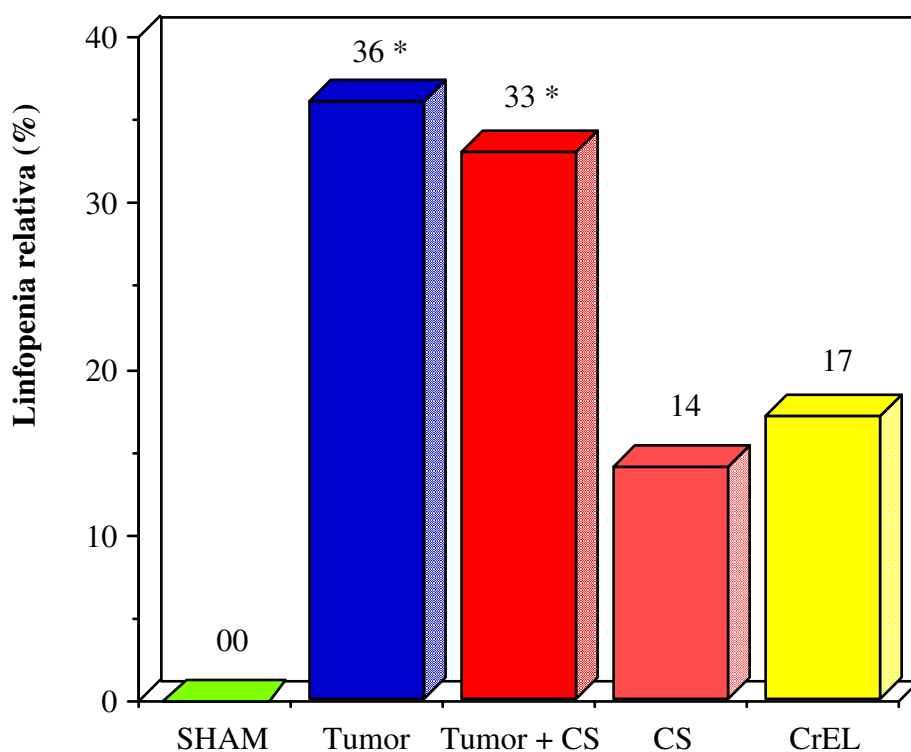
**Figura 25: Número absoluto de linfócitos.** Influência da inoculação tumoral e/ou tratamento com CS (10mg/kg/dia s.c.; 7 dias antes da inoculação tumoral e até a morte) ou CrEL (0,3ml/kg/dia s.c.; 7 dias antes da inoculação tumoral e até a morte) no número absoluto de linfócitos circulantes (10<sup>3</sup> células/ mm<sup>3</sup>). Os animais tiveram amostras de sangue retiradas por punção retro-ocular no 7<sup>o</sup> DPI (15<sup>o</sup> DPO para os grupos CS e CrEL) e leucometria diferencial realizada por contagem manual em esfregaços corados com M-G-G. Valores expressos como média + EPM e comparados através de ANOVA.



**Figura 26: Frequência de animais com linfopenia absoluta de acordo com os tratamentos.** Frequência (%) de ocorrência de animais com linfopenia absoluta de acordo com a inoculação tumoral e/ou tratamento com CS (10mg/kg/dia s.c.; 7 dias antes da inoculação tumoral e até a morte) ou CrEL (0,3ml/kg/dia s.c.; 7 dias antes da inoculação tumoral e até a morte). Os animais tiveram amostras de sangue retiradas por punção retro-ocular no 7<sup>o</sup> DPI (15<sup>o</sup> DPO para os grupos CS e CrEL) e leucometria diferencial realizada por contagem manual em esfregaços corados com M-G-G. \*  $p < 0,01$  (Teste de Fischer), em relação ao grupo SHAM.



**Figura 27: Número relativo de linfócitos.** Influência da inoculação tumoral e/ou tratamento com CS (10mg/kg/dia s.c.; 7 dias antes da inoculação tumoral e até a morte) ou CrEL (0,3ml/kg/dia s.c.; 7 dias antes da inoculação tumoral e até a morte) no número relativo (%) de linfócitos circulantes, em relação aos leucócitos totais. Os animais tiveram amostras de sangue retiradas por punção retro-ocular no 7<sup>o</sup> DPI (15<sup>o</sup> DPO para os grupos CS e CrEL) e leucometria diferencial realizada por contagem manual em esfregaços corados com M-G-G. Valores expressos como média + EPM. ANOVA, <sup>a</sup>  $p < 0,01$ ; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  em relação ao grupo SHAM.



**Figura 28: Frequência de animais com linfopenia relativa de acordo com os tratamentos.** Frequência (%) de ocorrência de animais com linfopenia relativa de acordo com a inoculação tumoral e/ou tratamento com CS (10mg/kg/dia s.c.; 7 dias antes da inoculação tumoral e até a morte) ou CrEL (0,3ml/kg/dia s.c.; 7 dias antes da inoculação tumoral e até a morte). Os animais tiveram amostras de sangue retiradas por punção retro-ocular no 7DPI (15DPO para os grupos CS e CrEL) e leucometria diferencial realizada por contagem manual em esfregaços corados com M-G-G. \*  $p < 0,01$  (Teste de Fischer), em relação ao grupo SHAM.

#### **4.4.2.6 Valores absolutos de monócitos**

Os valores absolutos de monócitos por  $\text{mm}^3$  de sangue foram comparados, através de ANOVA, nos grupos SHAM, Tumor, Tumor + CS e CS. Como mostra a **tabela 11**, a variação entre os grupos não foi significativamente maior do que o esperado pelo acaso.

#### **4.4.2.7 Valores relativos de monócitos**

Os valores relativos de monócitos por  $\text{mm}^3$  de sangue foram comparados, através de ANOVA, nos grupos SHAM, Tumor, Tumor + CS e CS. Como mostra a **tabela 11**, a variação entre os grupos não foi significativamente maior do que o esperado pelo acaso.

#### **4.4.2.8 Valores absolutos de eosinófilos**

Os valores absolutos de eosinófilos por  $\text{mm}^3$  de sangue foram comparados, através de ANOVA, nos grupos SHAM, Tumor, Tumor + CS e CS. Como mostra a **tabela 11**, a variação entre os grupos não foi significativamente maior do que o esperado pelo acaso.

#### **4.4.2.9 Valores relativos de eosinófilos**

Foram comparados, através de ANOVA, os valores relativos de eosinófilos por  $\text{mm}^3$  de sangue nos grupos SHAM, Tumor, Tumor + CS e CS. A variação entre os grupos não foi significativamente maior do que o esperado pelo acaso.

**Tabela 11: Valores de monócitos e eosinófilos, em animais inoculados com tumor, tratados com CS e controle.**

	Monócitos		Eosinófilos	
	$10^3$ cels/mm <sup>3</sup>	Relativo (%)	$10^3$ cels/mm <sup>3</sup>	Relativo (%)
SHAM (n = 32)	0,24 ± 0,034 -	2,4 ± 0,42 -	0,10 ± 0,020 -	0,81 ± 0,176 -
Tumor (n = 11)	0,28 ± 0,060 -	2,3 ± 0,60 (4%)	0,16 ± 0,059 (60%)	1,18 ± 0,443 (46%)
Tumor + CS (n = 6)	0,17 ± 0,068 (29%)	1,3 ± 0,33 (46%)	0,09 ± 0,030 -	0,67 ± 0,210 -
CS (n = 5)	0,19 ± 0,051 (21%)	1,6 ± 0,40 (33%)	0,16 ± 0,040 (60%)	1,40 ± 0,245 (73%)

Animais foram anestesiados com éter etílico em máscara/campânula, e tiveram amostras de sangue retiradas em tubos contendo heparina sódica, por punção retro-ocular. A contagem de leucócitos totais foi feita de forma automatizada (Coulter C-6). A leucometria parcial foi feita manualmente em esfregaços corados com M-G-G. Valores expressos como média ± EPM e comparados através de ANOVA. Porcentagens de aumento (eosinófilos) ou inibição (monócitos) são mostradas entre parênteses.



### 4.4.3 Plaquetas

Os valores de plaquetas por  $\text{mm}^3$  de sangue foram comparados, através de ANOVA, nos grupos SHAM, Tumor, Tumor + CS e CS. Como mostra a **tabela 12**, a variação entre os grupos não foi significativamente maior do que o esperado pelo acaso. Nos grupos SHAM, Tumor, Tumor + CS e CS, 3% (1 de 32), 14% (2 de 14) (RC = 5,1; n.s.), 22% (2 de 9) (RC = 8,8; n.s.) e 14% (1 de 7) (RC = 5,1; n.s.) dos animais apresentaram plaquetopenia, respectivamente (Teste de Fischer).

### 4.4.4 Outros

No esfregaço de uma única colheita de sangue de um dos animais experimentais encontraram-se, como achado casual, células em tudo morfológicamente semelhantes às células tumorais. Na avaliação quantitativa, estas células constituíram 5% do total das células nucleadas circulantes no sangue periférico daquele animal.

## 4.5 Estudos bioquímicos

### 4.5.1 Creatinina

Os valores da concentração sérica de creatinina (mg/dl), através de ANOVA, nos grupos SHAM, Tumor, Tumor + CS e CS encontram-se apresentados na **tabela 13**. A variação entre os grupos não foi significativamente maior do que o esperado pelo acaso (ANOVA).

**Tabela 12: Valores da linhagem plaquetária, em animais inoculados com tumor, tratados com CS e controle.**

	Plaquetas $10^3$ cels/mm <sup>3</sup>	Plaquetopenia %
SHAM (n = 32)	728,4 ± 17,94 -	3 -
Tumor (n = 11)	681,5 ± 65,68 (6%)	14 (5,1)
Tumor + CS (n = 6)	583,3 ± 122,33 (20%)	22 (8,8)
CS (n = 5)	717,6 ± 126,01 (2%)	14 (5,1)

Os animais foram anestesiados com éter etílico em máscara/campânula, e tiveram amostras de sangue retiradas em tubos contendo heparina sódica, por punção retro-ocular. A contagem de elementos da série plaquetária foi feita de forma automatizada e expressa como média ± EPM. Porcentagens de redução (plaquetas, ANOVA) ou valores de RC (plaquetopenia, Teste de Fischer) em relação ao grupo SHAM são mostradas entre parênteses.

**Tabela 13: Dosagem de creatinina sérica, em animais inoculados com tumor, tratados com CS e controle.**

	Creatinina mg/dL
SHAM (n = 32)	0,67 ± 0,042
Tumor (n = 11)	0,67 ± 0,091
Tumor + CS (n = 6)	0,56 ± 0,040
CS (n = 5)	0,77 ± 0,133

Os animais foram anestesiados com éter etílico em máscara/campânula, e tiveram amostras de sangue retiradas em tubos de vidro, por punção retro-ocular. Os resultados foram apresentados como média ± EPM e comparados através de ANOVA.

## **4.6 Estudos ponderais**

### **4.6.1 Série de comparação de pesos de órgãos**

#### **4.6.1.1 Comparando pesos dos animais da série de órgãos**

Através de ANOVA, foram comparados os pesos dos animais utilizados para estudar os pesos dos órgãos, nos grupos SHAM, Tumor e Tumor + CS. Como mostra a **tabela 14**, a variação entre os grupos não foi significativamente maior do que o esperado pelo acaso.

#### **4.6.1.2 Peso dos cérebros**

Os pesos dos cérebros dos animais foram comparados, através de ANOVA, nos grupos SHAM, Tumor e Tumor + CS. Como mostra a **tabela 14** e a **figura 29**, a variação entre os grupos foi significativamente maior do que o esperado pelo acaso. Os grupos Tumor ( $p < 0,001$ ) e Tumor + CS ( $p < 0,01$ ) foram significativamente diferentes do grupo SHAM. Não houve outras diferenças significantes (teste de Student-Newman-Keuls).

#### **4.6.1.3 Peso dos fígados**

Foram comparados os pesos dos fígados dos animais, através de ANOVA, nos grupos SHAM, Tumor e Tumor + CS. Como mostra a **tabela 14**, a variação entre os grupos não foi significativamente maior do que o esperado pelo acaso.

#### 4.6.1.4 Peso dos pulmões

Foram comparados, através de ANOVA, os pesos dos pulmões dos animais nos grupos SHAM, Tumor e Tumor + CS. Como mostra a **tabela 14**, a variação entre os grupos não foi significativamente maior do que o esperado pelo acaso.

#### 4.6.1.5 Peso dos rins

Os pesos dos rins dos animais foram comparados, através de ANOVA, nos grupos SHAM, Tumor e Tumor + CS. Como mostra a **tabela 14**, a variação entre os grupos não foi significativamente maior do que o esperado pelo acaso.

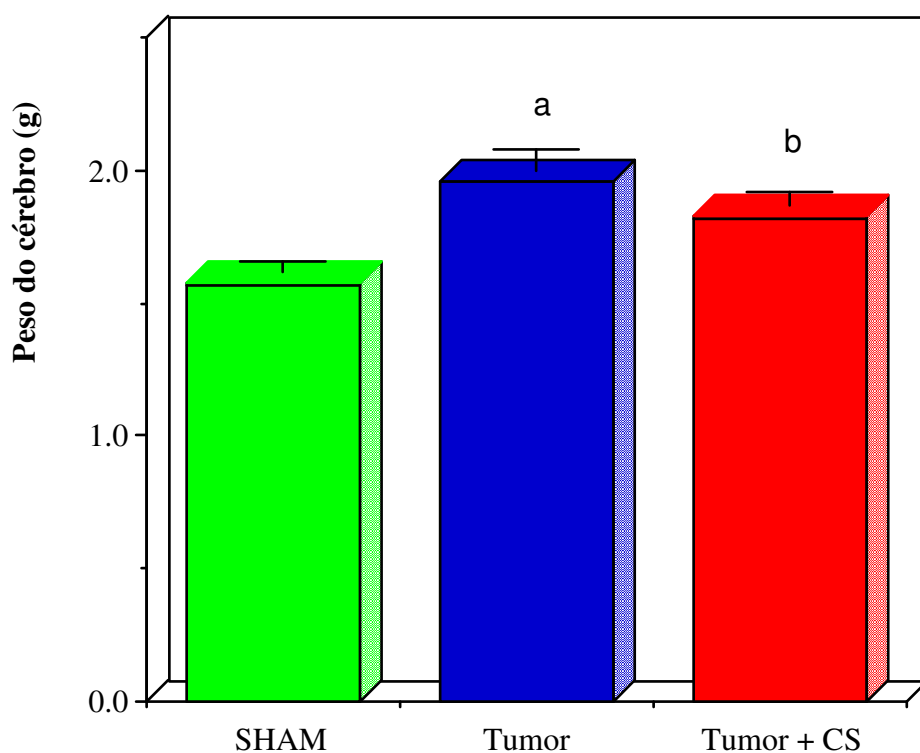
#### 4.6.2 Série de comparação de evolução ponderal

Como demonstrado na **figura 30**, animais do grupo Tumor tenderam a perder peso ao longo do período do desenvolvimento tumoral, com uma curva nitidamente bifásica. Na primeira semana após inoculação, a média dos pesos tendeu a aumentar, como era de se esperar se os animais fossem saudáveis (comportamento do grupo SHAM). Na segunda semana, no dia da morte ou sacrifício, os animais perderam peso em relação aos valores pré-inoculação (ao contrário do grupo SHAM, onde os pesos tendiam a aumentar ainda mais). O tratamento dos animais com veículo, não alterou este padrão bifásico de variação ponderal. Já no grupo inoculado com tumor e tratado com CS, no entanto, o padrão bifásico foi substituído por uma diminuição contínua do peso corporal dos animais. O tratamento apenas com CS induziu uma tendência à perda de peso, não significativa, na primeira semana, retornando ao aumento de peso natural (observado no controle) na segunda semana.

**Tabela 14: Valores dos pesos de órgãos, em animais inoculados com tumor, tratados ou não e controle.**

	Peso total (g)	Órgãos (g)			
		Cérebro	Pulmões	Fígado	Rins
SHAM (n = 7)	179,1 ± 10,59	1,58 ± 0,037	1,3 ± 0,20	6,8 ± 0,21	1,4 ± 0,08
		-	-	-	-
Tumor (n = 7)	186,0 ± 11,07	1,96 ± 0,076 (24%) <sup>a</sup>	1,7 ± 0,15 (31%)	7,8 ± 0,36 (15%)	1,7 ± 0,05 (21%)
Tumor + CS (n = 7)	171,4 ± 9,69	1,83 ± 0,049 (16%) <sup>b</sup>	1,6 ± 0,28 (23%)	7,3 ± 0,64 (7%)	1,5 ± 0,08 (7%)

Os animais tiveram os órgãos dissecados e pesados inteiros após a morte ou sacrifício. Os resultados são mostrados como média ± EPM. Porcentagens de aumento mostradas entre parênteses. ANOVA, <sup>a</sup> p < 0,001; <sup>b</sup> p < 0,01, teste *post-hoc*: Student-Newman-Keuls.



**Figura 29: Influência do transplante tumoral e tratamento com CS no peso dos cérebros.** Média + EPM dos pesos dos cérebros dos animais inoculados com tumor tratados ou não com CS (10mg/kg/dia s.c.; 7 dias antes da inoculação tumoral e até a morte). Os animais tiveram os encéfalos dissecados e pesados inteiros após a morte ou sacrifício. ANOVA, <sup>a</sup>  $p < 0,001$ ; <sup>b</sup>  $p < 0,01$ ; em relação ao grupo SHAM.

#### 4.6.2.1 Pesos dos animais no dia da cirurgia

Foram comparados os pesos dos animais utilizados para a série ponderal, no dia da cirurgia, através de ANOVA, nos grupos SHAM, Tumor, Tumor + CS, Tumor + CrEL e CS. Como mostra a **tabela 15** e a **figura 30**, a variação entre os grupos não foi significativamente maior do que o esperado pelo acaso.

#### 4.6.2.2 Pesos dos animais no 5º DPI

Foram comparados os pesos dos animais utilizados para a série ponderal, no 5º DPI (SHAM e CS no 15º DPO), através de ANOVA, nos grupos SHAM, Tumor, Tumor + CS, Tumor + CrEL e CS. Como mostra a **tabela 15** e a **figura 30**, a variação entre os grupos foi significativamente maior do que o esperado pelo acaso. O grupo Tumor + CS foi significativamente diferente dos grupos Tumor ( $p < 0,05$ ), Tumor + CrEL e SHAM ( $p < 0,01$ ) (teste de Student-Newman-Keuls).

#### 4.6.2.3 Pesos dos animais no dia da morte

Foram comparados os pesos dos animais utilizados para a série ponderal, no dia da morte (SHAM e CS no 21º –27º DPO), através de ANOVA, nos grupos SHAM, Tumor, Tumor + CS, Tumor + CrEL e CS. Como mostra a **tabela 15**, a variação entre os grupos foi significativamente maior do que o esperado pelo acaso. Os grupos Tumor, Tumor + CrEL ( $p < 0,01$ ) e Tumor + CS ( $p < 0,001$ ) foram significativamente diferentes do grupo SHAM (teste de Student-Newman-Keuls).



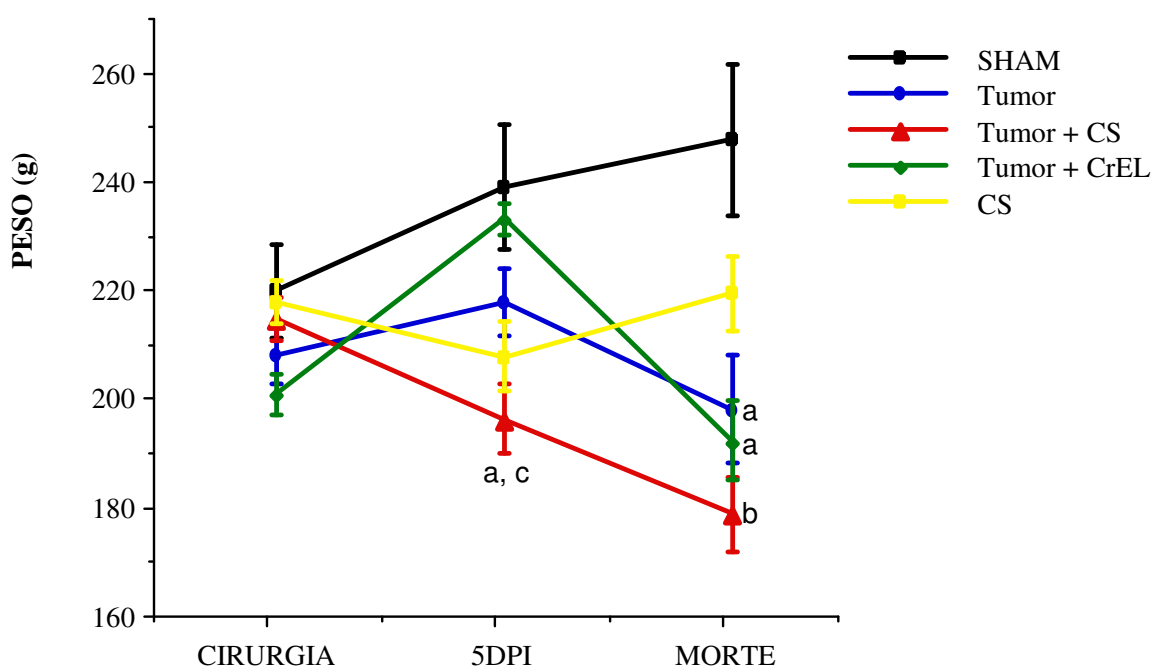
**Tabela 15: Evolução ponderal em animais inoculados com tumor, tratados com CS, veículo e controle.**

Data	Peso (g)		
	Cirurgia	5 <sup>o</sup> DPI	Morte
SHAM (n = 7)	218,1 ± 8,54	237,3 ± 11,53	246,0 ± 13,78
Tumor (n = 10)	206,4 ± 5,25	216,3 ± 6,17 (9%)	196,3 ± 10,00 (20%) <sup>a</sup>
Tumor + CS (n = 10)	213,1 ± 4,05	194,5 ± 6,41 (18%) <sup>a,c</sup>	177,1 ± 6,93 (28%) <sup>b</sup>
Tumor + CrEL (n = 7)	199,1 ± 3,88	231,4 ± 2,93 (3%)	190,7 ± 7,10 (23%) <sup>a</sup>
CS (n = 3)	216,0 ± 12,49	206,0 ± 16,09 (13%)	217,7 ± 16,17 (12%)

Os animais foram pesados no dia da cirurgia, no 5<sup>o</sup> DPI (SHAM, CS: 15<sup>o</sup> DPO) e no dia da morte ou sacrifício (SHAM, CS: 21<sup>o</sup> –27<sup>o</sup> DPO). Os resultados são expressos como média ± EPM. Porcentagens de inibição em relação ao grupo SHAM entre parênteses.

ANOVA, <sup>a</sup> p < 0,01; <sup>b</sup> p < 0,001; teste post-hoc: Student-Neuwman-Keuls, em relação ao grupo SHAM.

ANOVA, <sup>c</sup> p < 0,05; teste post-hoc: Student-Neuwman-Keuls, em relação ao grupo Tumor.



**Figura 30: Evolução ponderal dos animais influenciada pelos tratamentos.** Média + EPM dos pesos dos animais inoculados com tumor e/ou tratados com CS (10mg/kg/dia s.c.; 7 dias antes da inoculação tumoral e até a morte) ou CrEL (0,3ml/kg/dia s.c.; 7 dias antes da inoculação tumoral e até a morte), ao longo do experimento. Os animais foram pesados no dia da cirurgia, no 5DPI e no dia da morte ou sacrifício.

ANOVA, <sup>a</sup>  $p < 0,01$ ; <sup>b</sup>  $p < 0,001$ ; em relação ao grupo SHAM.

ANOVA, <sup>c</sup>  $p < 0,05$ ; em relação ao grupo Tumor.

#### 4.6.2.4 Comparação do peso no dia da morte: estratificação por sobrevida

Foram contados, no grupo Tumor, aqueles animais com sobrevida < 12 dias e sobrevida  $\geq$  12 dias. Comparou-se o peso no dia da morte dos animais do grupo Tumor com sobrevida < 12 dias e com sobrevida  $\geq$  12 dias (teste t-Student).

Foram contados, no grupo Tumor + CS, aqueles animais com sobrevida < 12 dias e sobrevida  $\geq$  12 dias. Comparou-se o peso no dia da morte dos animais do grupo Tumor + CS com sobrevida < 12 dias e com sobrevida  $\geq$  12 dias (teste t-Student). A **tabela 16** resume os achados.

### 4.7 Sobrevida dos animais com tumor cerebral

Comparou-se a sobrevida mediana dos animais nos grupos Tumor, Tumor + CS, Tumor + DEXA 0,3, Tumor + DEXA 3,0 e Tumor + CrEL, com ANOVA e teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Como mostra a **tabela 17**, a variação observada entre as medianas dos grupos não foi significativamente maior do que o esperado pelo acaso.

A sobrevida cumulativa ao longo do tempo de experimento foi analisada com a ajuda do modelo de Kaplan-Meier, utilizando-se o teste de Mantel-Cox para avaliar diferenças na distribuição das curvas de sobrevida entre os grupos. Os resultados mostraram uma diferença estatisticamente significativa na distribuição das curvas de sobrevida cumulativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). A **figura 31** resume a distribuição de Kaplan-Meier para a sobrevida cumulativa dos animais inoculados com tumor.

**Tabela 16: Peso no dia da morte em animais inoculados com tumor, tratados ou não, estratificados pela sobrevivida.**

	Peso (g)	
	Sobrevida < 12	Sobrevida ≥ 12
Tumor	216,2 ± 9,14 (n = 6)	183,8 ± 16,91 (n = 4)
Tumor + CS	186,17 ± 7,50 (n = 6)	163,50 ± 10,81 (n = 4)

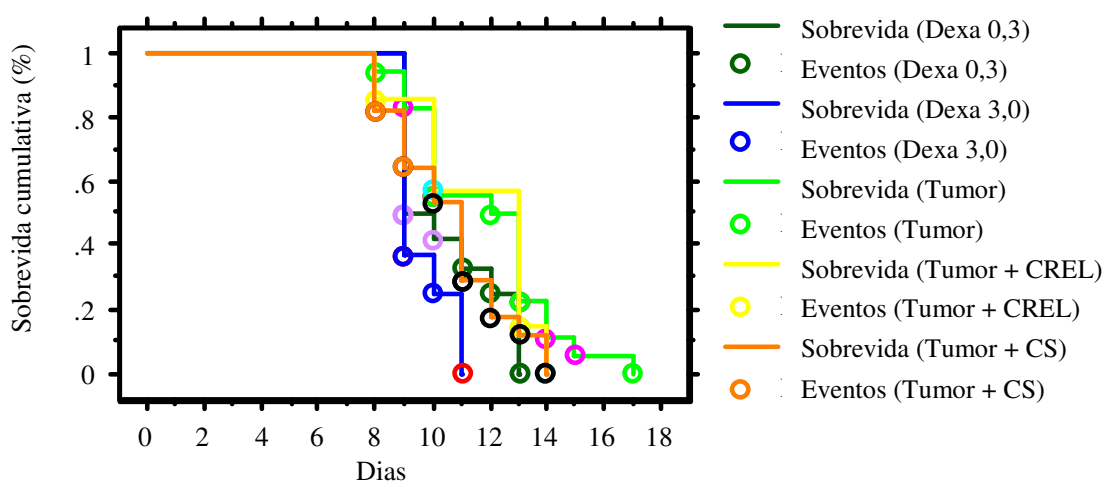
Valores expressos como média ± EPM comparados através do teste t-Student.

**Tabela 17: Sobrevida em animais inoculados com tumor, tratados ou não com CS, veículo e dexametasona 0,3 mg/kg/dia ou 3,0 mg/kg/dia**

	Sobrevida (dias)	Sobrevida no 12 <sup>o</sup> DPI %
Tumor (n = 18)	12,5 (8 – 17) -	50 -
Tumor + CS (n = 17)	11 (8 – 14) (12%)	18 (4,7)
Tumor + CrEL (n = 12)	13 (8 – 14) -	57 (0,75)
Tumor + dexta 0,3 (n = 8)	9,5 (9 – 13) (24%)	25 (3)
Tumor + dexta 3,0 (n = 7)	9 (9 – 11) (28%)	00 (17) <sup>a</sup>

A sobrevivida (dias) de animais inoculados com tumor foi anotada, comparando-se as medianas (teste de Kruskal-Wallis). A frequência (%) de animais com sobrevivida ≥ 12 foi comparada entre os grupos. Sobrevida em mediana com valores mínimo e máximo. Porcentagens de inibição (sobrevivida) e valores de RC (sobrevivida no 12<sup>o</sup> DPI) são mostrados em parênteses.

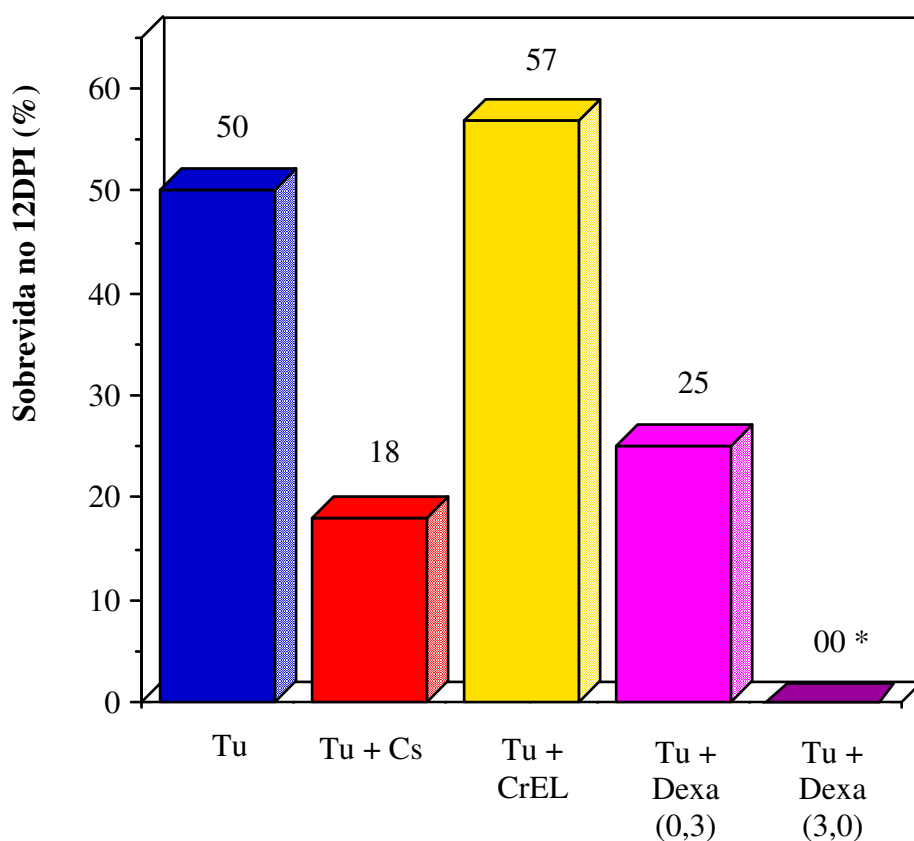
<sup>a</sup> p < 0,05; Teste de Fischer.



**Figura 31: Gráfico de sobrevida cumulativa de Kaplan-Meier.** Gráfico de sobrevida cumulativa dos grupos inoculados com tumor, tratados ou não com CS (10mg/kg/dia s.c.; 7 dias antes da inoculação tumoral e até a morte) ou CrEL (0,3ml/kg/dia s.c.; 7 dias antes da inoculação tumoral e até a morte). As linhas mostram a sobrevida cumulativa em cada grupo num dado dia enquanto os círculos apontam os eventos (morte de animal) que alteravam a sobrevida cumulativa. A distribuição das sobrevidas mostrou diferenças estatisticamente significantes pelo teste de Mantel-Cox ( $p < 0,05$ ).

Comparou-se a frequência, em cada grupo, da sobrevida no 12<sup>o</sup> DPI. Comparando-se a chance de sobrevida entre os grupos encontrou-se uma diferença significativa entre os mesmos ( $p < 0,05$ ; teste de independência do Qui-quadrado).

Como mostra a **figura 32**, o grupo de animais inoculados com tumor e tratados com dexametasona 3,0 mg/kg/dia mostrou uma chance 17 vezes maior (IC 95% = 0,9 - 338,5) de morrer antes do 12<sup>o</sup> DPI ( $p < 0,05$ ; Teste de Fischer). Não houve outras diferenças significantes.



**Figura 32: Frequência de sobrevivida no 12<sup>o</sup> DPI em relação aos tratamentos.** frequência de animais sobreviventes até o 12<sup>o</sup> DPI, em animais inoculados com tumor e tratados ou não com CS (10mg/kg/dia s.c.; 7 dias antes da inoculação tumoral e até a morte), CrEL (0,3ml/kg/dia s.c.; 7 dias antes da inoculação tumoral e até a morte) ou dexametasona (0,3 mg/kg/dia ou 3,0 mg/kg/dia; a partir do 4<sup>o</sup> DPI). \*  $p < 0,01$  (Teste de Fischer), em relação ao grupo Tumor.

## 5. DISCUSSÃO

O modelo de implante tumoral heterotópico no SNC de animais experimentais desenvolvido no presente trabalho mostrou boa reprodutibilidade, tendo sido observado crescimento tumoral cerebral no local de inoculação em 95% dos animais nos quais o procedimento transcorreu sem dificuldades técnicas.

A eficiência corrigida do modelo foi calculada eliminando-se todos os casos em que erros metodológicos foram reconhecidos como causas da falha de crescimento tumoral. O número de sucessos foi, assim, expresso em porcentagem do total de casos onde os procedimentos de cirurgia e inoculação transcorreram sem problemas.

Nos animais examinados para a ocorrência de disseminação tumoral local macroscópica, demonstrou-se a presença de crescimento tumoral no plano s.c. ou no crânio ósseo de cerca de 20% dos animais associada positivamente com a perda do capacete após a inoculação pelos animais. Uma vez que 21% dos animais inoculados perderam o capacete e, destes, 67% apresentaram disseminação tumoral local, pode-se esperar uma taxa total de 14% de disseminação tumoral local ao reproduzir-se o modelo. A melhor maneira de reduzir esta ocorrência a praticamente 0% é eliminar do experimento os animais que perdem o capacete após a inoculação.

Observou-se, no entanto, nos animais sacrificados no 7<sup>o</sup> DPI para medida de VTE, ausência absoluta de crescimento tumoral extracerebral macroscópico, independente da situação do capacete. Isto indica que, mesmo na vigência da perda do capacete, a disseminação tumoral local parece ser um fenômeno tardio. Consoante a isto, a perda do capacete não afetou a sobrevida mediana nem a chance de sobreviver 12 ou mais dias dos animais inoculados com tumor cerebral. Com base nestas informações, decidiu-se por não retirar deste trabalho os animais que perderam o capacete após a inoculação nem os que desenvolveram disseminação tumoral local.

Observou-se, entre os animais que não perderam o capacete, uma chance, não significativa, cerca de 8 vezes maior de desenvolver infecção local, em relação



aos animais que perderam o capacete. Mesmo aparentemente casual, esta diferença de chance poderia teoricamente ser explicada pela manutenção de uma “porta de entrada” para os agentes infecciosos enquanto o capacete estivesse instalado no crânio. Esta associação entre infecção e permanência de aparatos invasivos é notória e bastante difícil de prevenir, sendo diretamente proporcional ao tempo de permanência do instrumento utilizado no organismo (ROJO et al; 1999). Todos os animais receberam, no ato operatório, antibioticoterapia profilática. A antibioticoterapia, todavia, não tem se associado com sucesso à profilaxia de infecções relacionadas à permanência de aparatos invasivos (KHARDORI & YASSIEN, 1995). Isto ocorre pela aderência das bactérias a biofilmes formados na superfície destes aparatos, protegendo-as de agentes antibioticoterápicos sistêmicos. A deposição destes biofilmes, formados por fibrina e proteínas do tecido conectivo, inicia-se tão logo o aparato é inserido no organismo, muitas vezes acompanhando-se de colonização bacteriana. (KHARDORI & YASSIEN, 1995, FRANÇOIS et al, 1996). Uma análise de pacientes hospitalizados com aparatos de demora inseridos no SNC mostrou uma taxa de infecção de cerca de 4% (GUYOT et al, 1998).

Uma vez que a inoculação tumoral nos animais dependia sempre de um calendário de crescimento *in vivo* dos tumores sólidos em manutenção no biotério do LOE, o período entre a cirurgia e a inoculação variou em torno de uma a duas semanas estimando-se uma mediana de 8 dias para o grupo. Este período de repouso foi utilizado para permitir a cicatrização da BHE e diminuição da reação inflamatória local à lesão. GIULIAN et al (1989) estudaram a migração de células inflamatórias e a produção de citocinas no sítio de lesões cerebrais corticais penetrantes em ratos. Eles mostraram uma associação entre a migração de fagócitos mononucleares produtores de IL-1 e a cicatrização no SNC. Os fenômenos inflamatórios celulares e humorais após uma lesão no SNC mostraram seguir um comportamento temporal. As primeiras células inflamatórias apareceram no sítio lesional cerca de 15 h após o evento, aumentando exponencialmente de número até um pico no segundo dia, coincidindo com o pico de produção de IL-1 no local. Células inflamatórias com atividade fagocitária ainda foram observadas até o décimo dia após o evento lesivo. Astrogliose e neoformação vascular,

provavelmente ativadas pela liberação de IL-1, tiveram seus picos de atividade, respectivamente, 3 e 4 dias após o evento. O infiltrado de células inflamatórias, atividade fagocitária, atividade mitótica glial e neovascularização ainda puderam ser observados no sítio lesional até 10 dias após o evento. Experimentos com um modelo de injeção antigênica no SNC, por sua vez, mostram que a BHE retorna a sua permeabilidade normal cerca de 1 semana após a lesão penetrante da instalação de uma sonda (KNOFF et al, 1995).

Todos os animais tiveram pontos de lesão no SNC localizados no hemisfério direito. Em sua revisão, DUNN (1995) refere que lesões ao córtex cerebral esquerdo, mas não ao direito, podem produzir deficiências imunes pronunciadas no número de esplenócitos, proliferação linfocitária e atividade de células exterminadoras naturais (EN).

O número de células inoculadas em cada experimento variou devido à limitação técnica da precisão dos procedimentos de concentração e contagem de células viáveis. O número obtido variou entre 5,0 e 10,0 x 10<sup>4</sup>, com uma média de 6,0 x 10<sup>4</sup> células viáveis inoculadas em cada animal. MORREALE et al (1993) encontraram diferenças no crescimento tumoral de W256 no SNC ao inocular quantidades celulares diferentes por pelo menos 1 fator log (dez vezes).

A presença de nódulos satélites do tumor principal nas lâminas analisadas indica disseminação das células tumorais, podendo ocorrer por qualquer das três vias observadas: parenquimatosa, perivascular e feixes de substância branca. O nódulo satélite encontrado no hemisfério contralateral a um tumor poderia demonstrar evidência também de disseminação tumoral através das vias de circulação do LCR ou através de via fascicular (substância branca, p. ex.: corpo caloso). A presença de depósito de material proteináceo semelhante à fibrina poderia indicar áreas de necrose fibrinóide.

A maioria dos tumores malignos primários do SNC compõem-se de 3 regiões quanto à permeabilidade capilar e fluxo sanguíneo (LEVIN et al, 1980). O núcleo central é formado de material necrótico e algumas células vivas em estágio G0 do ciclo de divisão celular. Não existe BHE, mas a densidade capilar é mínima, assim sendo também a permeabilidade total. A camada imediatamente mais externa

(camada tumoral) é bem vascularizada e tem maior permeabilidade vascular que a BHE. Nesta camada, níveis significantes de antineoplásicos são atingidos com relativa facilidade. Estas duas áreas podem ser encontradas em muitos exemplos de tumores sólidos fora do SNC. No entanto, a camada mais exterior é exclusiva dos tumores do SNC, especialmente gliomas. Denomina-se cérebro adjacente ao tumor (CAT) e consiste de células tumorais infiltrando o tecido nervoso normal, além de neovascularização neoplásica. A permeabilidade capilar e perfusão nesta região são menores que na camada tumoral. O núcleo central e o CAT são as áreas onde a penetração de drogas é diminuída. A exposição a quantidades inadequadas de drogas citotóxicas leva a maior sobrevivência celular tumoral e seleção de resistência. A única maneira de atingirem-se níveis terapêuticos de antineoplásicos nestas áreas é a difusão a partir da camada tumoral, bem perfundida. A toxicidade sistêmica de altas doses que seriam necessárias para isto impede tal abordagem. (MILOSAVLJEVIC, 1997)

Numa zona de cérebro adjacente ao tumor, provavelmente análoga ao CAT, observam-se como descrito na literatura, fenômenos como degeneração neuronal hidrópica, edema celular neuronal, sinais de morte celular neuronal e gliose, além da presença de infiltrados celulares tumorais e inflamatórios perivasculares. O CAT mostrou-se uma área com intensa atividade celular tumoral, observando-se, além da infiltração parenquimatosa, marcante migração celular tumoral ao longo de tratos de substância branca (corpo caloso) e ao longo dos espaços perivasculares de Virchow-Robbin. Observou-se no CAT neoformação vascular, formação de nódulos tumorais satélites ao tumor principal e migração celular tumoral no parênquima cerebral normal.

O fator biológico isolado mais importante para a resposta terapêutica de tumores cerebrais, em especial gliomas, constitui provavelmente a invasão local difusa no tecido nervoso contíguo. Os mecanismos envolvidos na invasão local de tumores do SNC devem ser essencialmente semelhantes àqueles responsáveis pela fase invasiva do processo metastático em tumores sólidos não neurológicos. Estes mecanismos incluem (PILKINTON, 1996; HART, 1996):

1. A liberação de células neoplásicas da massa tumoral principal

(provavelmente como resultado de uma diminuição de expressão de moléculas de adesão célula-célula, como E-caderinas e moléculas de adesão celular neurais).

2. Adesão celular tumoral à vários componentes da matriz extracelular (MEC) mediada por receptores de superfície celular, como integrinas. A laminina, elemento da MEC que medeia a ligação entre o receptor celular de laminina e o colágeno IV, tem papel fundamental, bem como a tenascina, que se liga à fibronectina e diminui a interação célula-célula. Com exceção da membrana basal vascular e da membrana glial limitante externa, o SNC é pobre em MEC, e seus componentes ainda permanecem por ser totalmente descritos. No entanto, foi demonstrado que tumores do SNC podem produzir sua própria MEC, estimulados por fatores de crescimento tais como bFGF, fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de transformação de crescimento beta (TGF- $\beta$ 1).

3. Degradação e remodelamento de proteínas de adesão e estruturais da MEC por proteinases produzidas pelas células tumorais, principalmente metaloproteinases da matriz (MMP), serina-proteinases (ativadores de plasminogênio tissular e uroquinase: tPA e uPA), cisteína-proteinases (catepsinas B e L), aspartato-proteinases (catepsina D) e endoglicosidases (hialuronidase). As MMP mais estudadas, compostas pelo grupo de endopeptidases dependentes de zinco, dividem-se em três subgrupos: collagenases, gelatinases e estromelisinases. Tumores do SNC são capazes de sintetizar várias MMP, estimulados por fatores de crescimento. Embora existam dados conflitantes, as MMP em especial e algumas outras proteinases parecem ter um papel importante na migração celular tumoral no SNC.

4. Migração ativa ou migração envolvendo interação de fatores de crescimento, receptores celulares de superfície e componentes do citoesqueleto. Provavelmente envolve fatores quimiotáticos derivados tanto do tumor quanto do parênquima cerebral. A participação do ácido hialurônico e de seu receptor celular de superfície, a molécula CD44, tem tido destaque crescente não apenas no processo de migração tumoral no SNC, mas também na angiogênese tumoral necessária à proliferação e invasão tumoral.

A simples observação de seções histológicas de tumores do SNC humanos

traz pouca informação sobre os mecanismos envolvidos no comportamento invasivo local. Vários modelos laboratoriais *in vitro* e *in vivo* têm sido desenvolvidos a fim de estudar dinamicamente a invasão tumoral no SNC, a maioria modelos de glioma. A maioria dos tumores transplantáveis demonstra invasão perivascular, provavelmente devido à presença da lâmina basal vascular, rica em proteínas estruturais da MEC que constituem elementos de adesão e invasão celular. Alguns modelos tumorais, como o glioma C6, mostram migração celular ao longo de tratos de substância branca, como os do corpo caloso. Modelos como o glioma 9L mostram disseminação ao longo das vias de circulação do LCR (MIKKELSEN & EDVARSEN, 1997). No entanto, uma infiltração mais difusa do tecido nervoso normal por células tumorais individuais que “escapam” da massa tumoral é mais freqüentemente encontrada em gliomas e meduloblastomas humanos. Modelos tumorais de carcinogênese química ou viral produzem sistemas tumorais mais consistentemente invasivos do que as técnicas de implantação costumam permitir. A inconveniência das técnicas de carcinogênese induzida do SNC constitui longo tempo de latência entre a administração do fator carcinogênico e o crescimento tumoral, além da imprevisibilidade do local (ou locais) de acometimento no SNC (PILKINTON, 1996).

O modelo de W256 intracerebral desenvolvido por MORREALE et al (1993) não demonstrava invasão importante do parênquima cerebral circunjacente. Os tumores formavam massas circunscritas e compactas bem delimitadas em relação ao tecido cerebral normal. Tais achados não foram reproduzidos no presente modelo de W256 intracerebral, demonstrando, ao contrário, características mais próximas de tumores primários cerebrais, com presença de invasão tumoral parenquimatosa difusa, migração perivascular e através da substância branca e mesmo disseminação através de vias de circulação do LCR. O fato de que as células tumorais utilizadas para inoculação neste trabalho originaram-se de tumores sólidos animais, mantidos por passagem *in vivo*, foi provavelmente importante. A utilização de células cultivadas *in vitro* como fonte para o inóculo (como no trabalho de Morreale) poderia dar origem a tumores genó e/ou fenotipicamente diferentes, com características diversas de invasividade. O presente modelo configura, assim, uma

ferramenta em potencial para a pesquisa de mecanismos de invasividade e migração tumoral celular no SNC, comparando-se mais a modelos de crescimento tumoral cerebral primário do que secundário.

Devido ao grande número de células tumorais infiltradas e invadindo estruturas neuronais ou não, neste modelo, além da grande atividade tumoral na área de CAT, com formação de nódulos satélites e modificações na estrutura do parênquima cerebral induzidas pelo crescimento neoplásico, não se espera que este modelo seja especialmente sensível a QT sistêmica. Em especial, as células neoplásicas infiltrando o parênquima do CAT seriam expostas a concentrações subefetivas de drogas antineoplásicas, uma vez que a BHE nesta área, embora modificada, ainda mantém grande parte da sua capacidade de excluir vários grupos de substâncias do meio extracelular do SNC. Dessa forma, espera-se teoricamente um “escape”, da QT, das células neoplásicas que infiltram o CAT, o que levaria provavelmente a regressões tumorais parciais e temporárias, mesmo insignificantes, após QT sistêmica.

Metástases tumorais não foram observadas em nenhum órgão examinado (pulmões, fígado, rins). As lesões encontradas em alguns pulmões poderiam tratar-se de microimplantes metastáticos tumorais, todavia não puderam ser identificadas como tais pela presença de células inflamatórias em quantidade no local. A diferenciação entre os tipos celulares e a comprovação de possíveis micrometástases pulmonares poderia ser possível com imunohistoquímica utilizando marcadores específicos. No entanto, o crescimento de tumores no s.c. de animais inoculados com fragmentos de pulmão de um animal portador de tumor cerebral indica fortemente que os pulmões dos animais inoculados com tumor intracerebral continham micrometástases indetectáveis pela histologia com H-E. A hipótese da disseminação hematogênica do tumor inoculado no cérebro é reforçada pelo achado, em uma única colheita de sangue de um dos animais experimentais, de células em tudo morfológicamente semelhantes às células tumorais, perfazendo cerca de 5% das células nucleadas circulantes no sangue periférico daquele animal. Por outro lado, a fonte das células tumorais que deram origem aos tumores s.c. oriundos de fragmentos pulmonares transplantados poderia não ser micrometástases

pulmonares, mas as células presentes no sangue contido nos fragmentos de órgãos. Dessa forma, a presença de células tumorais circulantes (disseminação hematogênica) não necessariamente prova a existência de micro-implantes secundários indetectáveis.

A origem das células tumorais metastáticas, neste modelo, poderia ser o próprio tumor central, o qual demonstrava angiogênese tumoral e infiltrados celulares neoplásicos perivasculares; células tumorais infiltrando o eixo de inoculação até estruturas extraneurais (crânio ósseo, s.c., etc); ou ainda células tumorais infiltrando as meninges. Este último achado foi quase homogêneo em todos os tumores, tanto naqueles analisados após 12 ou mais dias de evolução quanto naqueles analisados no 7<sup>o</sup> DPI ou 9<sup>o</sup> DPI. As vias propostas de acesso das células neoplásicas ao espaço leptomeníngeo são: (1) extensão direta a partir de metástases no parênquima cerebral; (2) disseminação por vias axonais ou perineuro; (3) disseminação hematogênica (BALM & HAMMACK, 1996). A carcinomatose leptomeníngea é uma complicação que pode afetar até 20% dos pacientes com determinados tipos histológicos de câncer. Os tumores mais comumente disseminados para as meninges são os carcinomas (mama e pulmão) e o melanoma. Associa-se com uma morbidade elevada e maior mortalidade por causas neurológicas (até 58%), com sobrevida reduzida, nos pacientes acometidos, exigindo tratamento específico e agressivo. Hidrocefalia ocorre em apenas 16% dos casos (BALM & HAMMACK, 1996).

A presença de infiltrado tumoral leptomeníngeo neste modelo pode indicar uma fonte potencial de disseminação hematogênica e metástase à distância e um fator importante na redução da sobrevida do animal. No entanto, a disseminação hematogênica provavelmente não teve, ela mesma, impacto na sobrevida dos animais, uma vez que não foram observadas metástases macro ou microscópicas em nenhum órgão, as quais pudessem afetar funções orgânicas impondo morbidade associada. A invasão leptomeníngea em si, na verdade, poderia ter um efeito de aumentar a morbidade neurológica e piorar a sobrevida no modelo. Por outro lado, este modelo pode servir para estudar fenômenos associados à metastização neoplásica cerebral tanto parenquimatosa quanto leptomeníngea, além de testes de

tratamentos para esta patologia específica. Modelos animais de metástases leptomeníngicas são importantes para estudar a fisiopatologia da invasão meníngea por cânceres oriundos do SNC e extraneurais, concorrendo para o teste de novas abordagens terapêuticas. Os resultados obtidos destes modelos têm se correlacionado com situações clínicas (SCHABET & HERRLINGER, 1998).

O VTE no 7DPI foi de  $17,1 \pm 6,72 \text{ mm}^3$ , o que equivaleria, aproximadamente, a  $1,7 \times 10^7$  células tumorais. O VTE no 9DPI foi de  $67,3 \pm 19,81 \text{ mm}^3$ , equivalente, aproximadamente, a  $6,7 \times 10^7$  células tumorais.

A CS tem sido proposta para o tratamento antineoplásico como inibidora competitiva da gpP, responsável pelos fenômenos de MRD e exclusão de drogas do SNC. A CS foi testada neste modelo com o intuito de verificar a segurança de uma droga imunossupressora, possivelmente facilitadora do crescimento tumoral, em animais inoculados com tumores cerebrais experimentais. Além disso, avaliou-se alguns parâmetros hematológicos, bioquímicos e biológicos que podem alterar-se durante o tratamento com antineoplásicos e serem potencialmente afetados pelo uso de CS concomitante.

Esquemas de QT antineoplásica podem ser tóxicos a múltiplos sistemas orgânicos, como TGI (incluindo sistema hepatoesplênico), pele e fâneros, coração, pulmão, sistema hematopoiético, sistema nervoso, etc. No entanto, provavelmente a toxicidade limitante da maioria esmagadora dos quimioterápicos antineoplásicos é a mielotoxicidade. A supressão de células precursoras do sistema linfopoiético leva a anemia, plaquetopenia e neutropenia ameaçadoras à vida (CHABNER et al, 1996; DEVITA, 1997). Destas alterações hematológicas, a mais importante e que, na prática, limita o uso de esquemas anticâncer, é a neutropenia, associada com infecções oportunistas graves por germes multirresistentes (FREIFELD et al, 1997). A CS, por sua vez, tem sua principal toxicidade limitante na função renal, estando associada, especialmente se usada cronicamente, à diminuição da função renal com aumento dos níveis de creatinina sérica e diminuição da filtração glomerular (KAHAN, 1989; DIASIO & LOBUGLIO, 1996).

Os animais tratados com CS receberam uma dose única diária de 10 mg/kg,



em injeção s.c.. JETTÉ et al (1996) encontraram que, em animais, a CS nesta dose atinge equilíbrio de concentração plasmática após 5 dias de administração. Demonstraram, ainda, que o tratamento com CS aumenta a expressão de gpP em vários tecidos (rim, intestino, fígado, coração, pulmões, estômago), mas não no cérebro, com este efeito tendo seu pico no décimo dia de tratamento. Outros autores mostraram que doses de CS de 5 e 10 mg/kg/dia atingem cronicamente níveis séricos capazes de inibir a gpP, enquanto uma dose em bolo de 50 mg/kg endovenosa (e.v.) de CS pode também inibir significativamente a gpP (BURGIO et al, 1996; ABE et al, 1996). A administração de CS por via e.v., no entanto, tem-se associado, em maior grau, a efeitos colaterais neurológicos (ADAMS et al, 1987). No presente trabalho, optou-se pelo tratamento crônico com CS, iniciando-se 7 dias antes da inoculação tumoral, a fim de permitir a presença de níveis séricos capazes de inibir a gpP durante o experimento. Além disso, talvez se torne importante, no futuro, o tratamento crônico com CS pré-QT, a fim de induzir uma maior expressão da gpP tecidual em órgãos possivelmente alvo de efeitos tóxicos da QT antineoplásica.

Foram observados parâmetros histopatológicos nas lâminas de órgãos de animais tratados ou não com CS. As características de crescimento tumoral local, invasividade, e migração celular tumoral e infiltração meníngea não foram alteradas pelo tratamento com CS, em relação às descritas para os tumores cerebrais implantados em animais não tratados. O VTE no 7DPI mostrou tendência não significativa a ser menor que o dos animais do grupo Tumor (26% de redução, n.s.) nos animais tratados com CS.

O tratamento com CS não pareceu alterar a disseminação de células tumorais, assim como a evidenciada pela chance de apresentar nódulos satélites ao tumor principal. Também não pareceu haver diferença importante na chance de apresentar hemorragia intratumoral. A CS mostrou uma tendência não significativa de diminuir a chance de apresentar depósitos proteináceos semelhantes à fibrina (chance 2,5 vezes maior de ocorrer no grupo Tumor, n.s.), compatíveis com necrose fibrinóide dos tumores. Este efeito, se confirmado, poderia indicar uma inibição de mecanismos de imunidade humoral, representados pela ativação de linfócitos Ta

CD4+ e produção de anticorpos.

A chance de encontrar infiltrado de PMN foi mais de 5 vezes maior no grupo Tumor + CS, em relação ao grupo Tumor (n.s.). Se for confirmada, a tendência da CS de induzir aumento de infiltrado neutrofílico nos tumores cerebrais deste modelo permanecerá necessitando de explicação. Uma hipótese poderia ser a inibição da produção de citocinas inibitórias pelas células tumorais e/ou células do SNC no sítio tumoral, em especial TGF- $\beta$ .

Macrófagos infiltrando tumores são responsáveis por duas ações imunológicas principais: citotoxicidade tumoral inespecífica e inibição de respostas proliferativas de linfócitos T. Macrófagos são capazes de inibir a atividade linfocitária T estimulada por antígenos ou interferon gama (IFN- $\gamma$ ) em animais experimentais portadores de tumor, através da liberação sistêmica de óxido nítrico (NO) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Ao mesmo tempo, moléculas produzidas no microambiente tumoral, como IL-10, TGF- $\beta$  e prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), inibem a atividade macrofágica de produção de NO e TNF- $\alpha$ , responsáveis também pela citotoxicidade tumoral inespecífica. Dessa forma, tumores poderiam modificar a resposta celular mediada por macrófagos, de forma a inibir a atividade citotóxica no ambiente tumoral ao mesmo tempo em que estimulam a atividade inibitória sistêmica de linfócitos T (LEJEUNE et al, 1994; ALLEVA et al, 1994). A inibição da produção de TGF- $\beta$ , IL-10, ou outras citocinas inibitórias produzidas pelas células tumorais (ou ainda pelas células gliais no ambiente tumoral) poderia reverter este mecanismo de “escape imunológico” tumoral local, dando margem à uma maior resposta inflamatória no sítio tumoral.

Assim, a CS teria um paradoxal efeito pró-inflamatório local em determinados modelos tumorais, o que talvez ocorresse no modelo desenvolvido neste trabalho.

Nas lâminas, os infiltrados de PMN estão relacionados geralmente com a necrose tumoral. O aumento aparente de infiltrados de PMN pode sugerir, de fato, aumento de áreas de necrose nos tumores de animais tratados com CS. Este aumento de necrose poderia estar relacionado a um possível efeito anti-angiogênico da CS, através da inibição do brotamento endotelial (FOLKMAN, 1997).

Interessantemente, citocinas como b-FGF, VEG/PF e TNF- $\alpha$ , responsáveis pela angiogênese tumoral, demonstraram inibir a expressão de receptores de selectinas e integrinas expressados por células inflamatórias, incluindo neutrófilos. O fenômeno de angiogênese tumoral poderia, assim, acompanhar-se de menor infiltrado inflamatório tumoral devido a uma menor resposta inflamatória no endotélio associado ao tumor (GRIFFIOEN et al, 1996). A CS, através da inibição de citocinas pró-angiogênicas, poderia ao mesmo tempo reverter esta redução na resposta inflamatória da vasculatura tumoral, adicionando outro mecanismo a um possível efeito pró-inflamatório local da CS em determinados modelos tumorais.

Deve-se ressaltar, no entanto, que o efeito sistêmico esperado da CS sempre será uma imunossupressão específica da resposta mediada por linfócitos Ta CD4+, o que poderia ser evidenciado pela tendência que a CS demonstrou de inibir a presença de necrose fibrinóide nos tumores (mediada por anticorpos). Da mesma forma, também, uma possível influência da CS na migração de neutrófilos para o tumor cerebral neste modelo não necessariamente corresponderia a uma resposta imunológica funcional mais ativa. Costuma-se referir que a CS, apesar de inibir linfócitos T, não tem efeito na função de PMN (KAHAN, 1989). Estudos recentes, no entanto, sugerem que a CS pode inibir a fagocitose, quimiotaxia, produção de ERO e de proteinases pelos neutrófilos (WENZEL et al, 1991; HEMPELMANN et al, 1991; THORAT et al, 1994; CORBEL et al, 1999). Outro trabalho, no entanto, mostrou ações contraditórias da CS na função de neutrófilos, ora inibindo, ora estimulando a liberação de ERO (NGUYEN et al, 1998).

De uma forma geral, podemos concluir dos dados do presente trabalho que a CS, administrada na dose e forma utilizadas, falhou em facilitar o crescimento tumoral local e em alterar, de forma significativa, o infiltrado inflamatório formado por PMN no modelo de W256 intracerebral. Tal fato está em discordância com as informações disponíveis na literatura que indicam que o modelo de transplante intracerebral de tumor simulando metástase é análogo a um enxerto, devendo suscitar, portanto, reação imune mediada por células e sensível ao emprego da CS. Novos experimentos, com marcação específica de células inflamatórias e vasculares, além de marcadores funcionais de resposta inflamatória, serão

necessários para definir, neste modelo, a influência da CS no infiltrado celular imune e na angiogênese tumorais.

Um fato que poderia explicar a aparente falta de atividade imunomoduladora da CS neste modelo de tumor do SNC seria sua baixa penetração na BHE (FAHR, 1993; SAKATA et al, 1994). A CS não se concentra nos compartimentos do SNC, muito embora seja uma droga altamente lipofílica (SAKATA et al, 1994). Como já se descreveu na introdução, a CS é ativamente captada pela gpP presente na face luminal da BHE, o que impede sua concentração dentro do tecido nervoso. Isto torna improvável alguma atividade imunomoduladora da CS ao nível do SNC, nas doses utilizadas. Apesar disto, são descritos efeitos colaterais da CS no SNC em cerca de 20-30% dos pacientes receptores de transplantes, incluindo tremores, parestesias, depressão, sonolência e convulsões (em até 25% dos pacientes) (ADAMS et al, 1987; KAHAN, 1989). Estudos experimentais, da mesma forma, mostram paradoxalmente efeito da CS em eventos imunológicos e inflamatórios no SNC, como protetora em lesões pós-isquêmicas (WAKITA et al, 1995). Além disso, apesar de formar um endotélio com permeabilidade menor que o endotélio vascular sistêmico, tumores implantados no SNC não reproduzem a BHE, com sua baixa permeabilidade seletiva característica. Isto foi demonstrado, entre outros modelos, após implantação de W256 intracerebral (GROOTHUIS & VICK, 1982).

Não houve variações, em relação ao grupo SHAM, nos valores de hemácias, hematócrito ou hemoglobina nos animais dos grupos Tumor, Tumor + CS, CS ou CrEL. As médias e IC95% dos valores encontrados estão dentro dos limites de IC95% de valores normais de referência publicados. Em geral, a anemia associada ao câncer deve-se à infiltração da MO por células neoplásicas ou a uma menor produção eritrocitária medular multifatorial (anemia das doenças crônicas). Os tumores que mais freqüentemente metastizam para a MO são os de pulmão, mama e próstata, mas a maioria das neoplasias malignas demonstra esta capacidade (ERSLEV, 1995a; ERSLEV, 1995b). O uso de CS não se associa com alterações hematimétricas (BOREL, 1991).

Não houve variações, em relação ao grupo SHAM, nos valores de plaquetas nos animais dos grupos Tumor, CS ou CrEL. Os animais do grupo Tumor + CS

mostraram uma tendência não significativa de diminuir o número de plaquetas em relação ao grupo SHAM. Comparando-se com os valores de referência publicados, animais dos grupos Tumor + CS e CS apresentaram uma chance maior de ter plaquetopenia, não significativa. Assim como anemia, a infiltração neoplásica medular pode promover plaquetopenia importante (CHABNER et al, 1996; DEVITA, 1997). A administração de CS pode ter efeito de ativar a cascata da coagulação e aumentar a agregação plaquetária, chegando a induzir, em casos extremos, complicações sistêmicas como síndrome hemolítico-urêmica e coagulação intravascular disseminada. Isto poderia explicar uma tendência do tratamento da CS em induzir queda do número de plaquetas e plaquetopenia, por coagulopatia de consumo (KAHAN, 1989).

Neutrófilos, também conhecidos como leucócitos polimorfonucleares (PMN), constituem a primeira linha de defesa contra agentes infecciosos ou substâncias “não próprias” que penetram através das barreiras físicas do organismo. Uma vez que uma resposta inflamatória se inicia, neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas ao sítio de infecção ou lesão. Eles são capazes de destruir bactérias, fungos, protozoários, vírus, células infectadas por vírus e células tumorais. Seu papel principal constitui a fagocitose de agentes infecciosos, promovendo a destruição inespecífica de agentes ofensivos, enquanto o sistema imune monta uma resposta imunológica específica baseada em anticorpos e citotoxicidade direta. Normalmente, neutrófilos encontram-se localizados em estreita relação com as paredes da microvasculatura, através de selectinas que se ligam a resíduos específicos de carboidratos no endotélio (os neutrófilos encontram-se marginados). A ativação destes neutrófilos deve-se à sua exposição a fatores ativadores e quimiotáticos, como IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , GM-CSF, G-CSF, produzidos por células no local da lesão, linfócitos ativados, e pelos próprios neutrófilos ativados. Citocinas inibitórias, como IL-4 e IL-10, por sua vez, inibem a atividade de neutrófilos (STVRTINOVA et al, 1995). Neutrófilos participam das reações de rejeição de transplantes, especialmente na rejeição com necrose vascular fibrinóide e na rejeição hiperimune, contribuindo para lesão vascular e isquemia dos tecidos transplantados (SELL et al, 1996).

Neutrofilia é definida como o aumento da contagem absoluta de neutrófilos (somando-se formas jovens e maduras) acima de um valor de referência pré-definido (neste trabalho utilizaram-se valores publicados de normalidade para ratos albinos). Suas causas básicas podem ser: (1) aumento na proliferação celular, (2) liberação acelerada de células da MO para a circulação periférica, (3) mobilização do conjunto (*pool*) de células não circulantes (marginadas) para a circulação periférica (demarginação), (4) diminuição da migração de neutrófilos da circulação para os tecidos, (5) uma combinação destes mecanismos. Condições associadas à neutrofilia incluem liberação de epinefrina ou cortisol endógenos (induzida por estresse, exercícios, etc), infecções por bactérias gram negativas, câncer (devido à liberação de fatores estimulantes de colônia e/ou quimiotáticos, ou ainda necrose tumoral ou infecção), patologias auto-imunes (complexos antígeno-anticorpo, ativação do complemento), doenças inflamatórias crônicas. Em pacientes com câncer, neutrofilia é sinal de mau prognóstico (DALE, 1995).

Linfopenia é definida como a contagem absoluta de linfócitos abaixo de um valor de referência pré-definido (neste trabalho utilizaram-se valores publicados de normalidade para ratos albinos). Em geral, deve-se a diminuição no número de linfócitos  $Ta\ CD4+$ , uma vez que mais de 80% dos linfócitos circulantes são T e, destes, 2/3 são  $CD4+$ . Causas de linfopenia adquirida incluem: doenças infecciosas (SIDA, doenças virais, tuberculose ativa), pós-cirurgia (por redistribuição linfocitária), glicocorticóides (talvez por redistribuição, além de destruição celular), patologias sistêmicas (lúpus, sarcoidose, queimaduras, etc) (KIPPS, 1995).

Monócitos no sangue são células em trânsito. Sua função fisiológica localiza-se nos tecidos, onde participam na inflamação (incluindo reações granulomatosas crônicas e reparo tecidual), em reações imunológicas (incluindo hipersensibilidade retardada) e em reações a neoplasias e enxertos. Administração de glicocorticóides, interferon- $\alpha$  ( $IFN\tilde{\alpha}$ ) ou  $TNF\text{-}\alpha$ , além de doenças inflamatórias crônicas, podem associar-se a diminuição do número de monócitos. Em pacientes portadores de neoplasias sólidas, 20% apresentam monocitose (LICHTMAN, 1995).

Eosinófilos são principalmente células teciduais, existindo cerca de 100 a 500 eosinófilos em tecidos para cada célula circulante. Têm um papel tanto em

produzir lesão tecidual quanto em amenizar respostas inflamatórias, parecendo ter um papel acessório em reações mediadas por células T. Podem aumentar em algumas neoplasias e após administração de IL-2. Infecções agudas, glicocorticóides e epinefrina podem diminuir sua contagem (WARDLAW & KAY, 1995).

O mecanismo de aumento de neutrófilos circulantes nos animais inoculados com tumor deve ser a presença de estímulo inflamatório na forma das células tumorais necróticas ou antígenos do CPH classe I (uma vez que o tumor foi transplantado). Isto explicaria a resposta observada nestes animais, basicamente às custas de aumento de células neutrofílicas e maior chance de neutrofilia em relação ao grupo SHAM, com queda na participação relativa de linfócitos e valores totais de leucócitos inalterados, traduzindo mobilização de neutrófilos por estímulo inflamatório agudo. Animais inoculados com tumor, tratados ou não, todavia, apresentaram também maior chance de desenvolver linfopenia absoluta. Isto poderia dever-se à agressão representada pelo trauma cirúrgico e manuseio dos animais para procedimentos, induzindo redistribuição de linfócitos. A tendência para aumento de eosinófilos nos animais inoculados por tumor pode ser meramente casual, ou pode representar uma participação destas células na resposta inflamatória neste modelo de neoplasia.

O tratamento com CS não pareceu modificar as alterações observadas na leucometria de animais inoculados com tumor cerebral. O único efeito significativo do tratamento isolado com CS foi uma chance aumentada de neutrofilia absoluta em relação ao controle. O mecanismo do aumento de neutrófilos circulantes e tendência à diminuição de células linfomononucleares em animais do grupo CS pode dever-se ao poderoso efeito inibidor que a CS tem sobre linfócitos Ta CD4+ produtores de IL-2, inibindo, dessa forma, a ativação, multiplicação e mobilização de linfócitos e células mononucleares (SELL et al, 1996) e talvez inibindo a produção de fatores quimiotáticos para granulócitos (MROWIETZ et al, 1991; CORBEL et al, 1999). Este último efeito, provavelmente mediado também pela inibição de linfócitos Ta, poderia explicar a tendência ao aumento periférico do número de neutrófilos, através da inibição de sua quimiotaxia e migração. A CS também demonstra efeito

de diminuir a expressão de moléculas de adesão, entre as quais se encontram selectinas e integrinas, responsáveis pela adesão dos neutrófilos ao endotélio (WALLACE et al, 1992; COCKERILL et al, 1995). Dessa forma, ela poderia induzir mobilização do conjunto de neutrófilos marginados (demarginação) aumentando seu número na circulação periférica. Embora seja descrito que o efeito da CS em linfócitos T seja impedir sua ativação, e não redução do número de células circulantes (KAHAN, 1989), pelo menos uma fonte sugere a possibilidade de efeito citotóxico direto da CS sobre linfócitos, com potencial para linfopenia (HUSS et al, 1995). O efeito da CS em reverter o aumento não significativo de eosinófilos associado à inoculação tumoral poderia dever-se ao bloqueio da liberação de IL-2.

O efeito da inoculação de CrEL, que mostrou leve tendência não significativa de diminuir os valores de linfócitos em relação ao controle, poderia dever-se à ativação do eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal pelo estresse do manuseio sofrido pelo animal.

Os resultados indicam que as alterações encontradas no perfil hematológico (leucograma parcial) de animais inoculados com tumor e /ou tratados com CS condizem com uma variação concomitante das quantidades e relações entre neutrófilos e linfócitos. O aumento de neutrófilos foi acompanhado pela queda de linfócitos, o que explica porque o número total de leucócitos não variou de um grupo para outro.

Este aumento absoluto e relativo de neutrófilos pode indicar a ocorrência de inflamação aguda, como no caso de infecções, doenças inflamatórias (doenças auto-imunes, trauma com destruição tecidual e algumas neoplasias, entre outras causas). A inoculação tumoral promoveria neutrofilia principalmente estimulando a demarginação, migração e produção de células de linhagem granulocítica, especialmente neutrófilos, devido ao estímulo inflamatório agudo. O tratamento com CS promoveria neutrofilia principalmente através da inibição da ativação de células da linhagem linfomonocitária, além de promover demarginação e diminuir a migração de neutrófilos para os tecidos, devido a seus efeitos inibitórios nas citocinas inflamatórias e moléculas de adesão.



Alterações na leucometria podem sugerir a ocorrência de infecções sistêmicas. A literatura descreve que os principais critérios leucométricos capazes de indicar a ocorrência de infecção bacteriana são a leucocitose e presença em excesso de formas jovens de granulócitos (bastões, metamielócitos e mielócitos) no esfregaço do sangue periférico (MANROE et al, 1979; WEINBERG et al, 1985; STRAUSBAUGH, 1987). Já a neutrofilia isolada não constitui indicação significativa de infecção bacteriana, podendo refletir qualquer estímulo inflamatório ou ainda outros estímulos (CAMPANELLA et al, 1999). No presente trabalho, nenhum animal apresentou leucocitose, nem formas jovens de granulócitos no esfregaço periférico de sangue, independente de ter apresentado ou não neutrofilia ou linfopenia. Isso sugere que os animais não apresentaram infecção com repercussão sistêmica, ou por outro lado, se ocorreu infecção localizada em ferida cirúrgica em alguns animais (como sugerido pela macroscopia de necrópsias), esta intercorrência não interferiu com as leituras parciais de leucócitos dos animais.

Foi estudado o peso dos órgãos dos animais dos diversos grupos experimentais. Os órgãos analisados foram o cérebro (o qual recebeu o implante tumoral), os pulmões (principal sítio de implantes secundários no caso de formação de metástases), os fígados e os rins (possíveis alvos de efeitos metabólicos ou tóxicos da inoculação tumoral ou dos tratamentos realizados).

O aumento de peso dos cérebros certamente liga-se ao crescimento tumoral local, podendo associar-se também a ocorrência de edema cerebral. O peso dos pulmões pode ser utilizado como medida quantitativa de disseminação tumoral em modelos de metástase (SAVA et al, 1999). Assim, o aumento do peso pulmonar estaria diretamente relacionado à carga tumoral metastática. Neste modelo, não houve evidências significantes de metástase pulmonar, nem macroscópicas, nem em relação ao peso pulmonar, nem microscópicas.

Os animais do grupo Tumor + CS mostraram uma tendência idêntica a aumentar os pesos dos diversos órgãos testados em relação ao grupo SHAM, porém de magnitude algo menor em relação ao grupo Tumor. A média dos pesos dos cérebros dos animais do grupo Tumor + CS não mostrou ser significativamente diferente daquela dos animais do grupo Tumor (apenas 7% menor, n.s.). A medida

do peso dos cérebros dos animais não reflete com precisão o edema cerebral. Em todo caso, um suposto efeito antiedematogênico da CS seria improvável, uma vez que ela não inibe respostas imunológicas inespecíficas (KAHAN, 1989; SELL et al, 1996).

A caquexia induzida pela patologia neoplásica maligna é caracterizada por febre, perda de peso e catabolismo intenso. Diversas citocinas produzidas pelos tumores respondem por efeitos específicos da caquexia tumoral, embora a mais importante seja o TNF- $\alpha$ , anteriormente conhecido como caquexina (SELL et al, 1996). Alterações no nível de insulina plasmática e na capacidade de oxidação hepática de ácidos graxos poderiam responder por parte da síndrome de caquexia tumoral (SEELAENDER & CURI, 1994). A inoculação de tumor W256 mostrou modificar o metabolismo de glicose e lipídios dietéticos nos animais hospedeiros, além de induzir hipercalcemia, perda de massa óssea e osteoporose (ROSA et al, 1993a; ROSA et al, 1993b; TORRES et al, 1993; WAKI et al, 1995). Tumores W256 intracerebrais demonstraram ainda captar, de forma diferenciada, lipídios essenciais da circulação (NARIAI et al, 1994) além de diminuir o metabolismo e utilização de glicose pelo córtex ipsilateral (YAMADA et al, 1983). Estes efeitos metabólicos do tumor W256 podem contribuir para a caquexia apresentada pelos animais.

Sem dúvida, o tratamento com CS não inibiu a caquexia tumoral neste modelo, ao contrário, tornou-a mais precoce. Apesar da CS inibir a produção das citocinas responsáveis pela caquexia tumoral, inclusive o TNF- $\alpha$ , outros fatores poderiam ser responsáveis pela “caquexia” induzida pela CS neste modelo. Animais do grupo CS demonstraram uma tendência não significativa de diminuir o peso em relação ao grupo SHAM na primeira semana e tenderam a manter o mesmo peso inicial no dia do sacrifício, ao contrário do grupo SHAM, onde ocorreu uma óbvia tendência a aumento contínuo de peso. Alterações metabólicas ou comportamentais poderiam estar envolvidas na tendência à perda de peso nos animais tratados com CS. O tratamento com doses terapêuticas de CS induz alterações na absorção de glicose e nutrientes pelo intestino, enquanto altas doses de CS chegam a induzir perda de peso em animais (SIGALET et al, 1992). Outros efeitos metabólicos da

administração de CS incluem osteopenia possivelmente reversível por estrógenos e hipercolesterolemia (JOFFE et al, 1992; MANN et al, 1996; LAUFER, 1992). Vários trabalhos mostraram que a CS aumenta a atividade motora de animais com e sem lesões dos núcleos da base (BORLONGAN et al, 1995; BORLONGAN et al, 1996; BORLONGAN et al, 1999b). Além disso, outros efeitos comportamentais, como inibição de condicionamento por opióides e modificações emocionais, foram observados em animais (SUZUKI et al, 1993; VON HORSTEN et al, 1998; BORLONGAN et al, 1999a). Autores demonstraram efeitos da CS no SNC, em sistemas que medeiam resposta analgésica, após administração sistêmica (FRANCISCHI et al, 1997). A CS poderia alterar a resposta comportamental e/ou metabólica dos animais ao estresse induzido pela inoculação e crescimento tumoral. Isto chama a atenção para o cuidado com o estado nutricional de pacientes com patologia maligna que venham a fazer uso de esquemas com CS.

Glicocorticóides são drogas com efeito análogo ao do cortisol, esteróide natural produzido pela glândula adrenal. Seus efeitos são numerosos e multissistêmicos, incluindo: alterações no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios, manutenção de equilíbrio hidroeletrolítico, além de preservação da função de múltiplos sistemas (cardiovascular, imunológico, renal, esquelético, endócrino e nervoso). Além disso, através de mecanismos ainda não bem compreendidos, os glicocorticóides são responsáveis pela capacidade de resistir a diversos estresses orgânicos, como mudanças ambientais e estímulos nocivos. Os principais usos farmacológicos dos glicocorticóides são como imunodepressores e antiinflamatórios. Corticosteróides alteram profundamente a resposta imune de linfócitos, o que é importante para sua ação antiinflamatória. Eles são capazes de inibir a inflamação iniciada por uma série de eventos diversos, como estímulos químicos, mecânicos, infecciosos, imunológicos, etc (SCHIMMER & PARKER, 1996).

Dexametasona é um derivado sintético 9 $\alpha$ -fluorado da hidrocortisona, com atividade glicocorticóide cerca de 25 vezes maior que esta. Uma substituição na posição C16 do anel D torna a dexametasona praticamente desprovida de efeito mineralocorticóide (SCHIMMER & PARKER, 1996). Ela é o corticosteróide

preferido para tratar edema cerebral associado a tumores, por aparentemente induzir menos psicose, como referido na introdução deste trabalho.

Estudos de auto-radiografia quantitativa mostraram que a permeabilidade endotelial em tumores cerebrais experimentais é mais de 2 vezes maior que no CAT e mais de 10 vezes maior que no cérebro normal ipsilateral. O tratamento com dexametasona foi capaz de diminuir a permeabilidade vascular tumoral, no CAT e no córtex ipsilateral em animais com tumor cerebral implantado (SHAPIRO et al, 1990). BOUCHER et al (1997) demonstraram a presença de um gradiente de pressão do fluido intersticial (PFI) entre tumores cerebrais experimentais e o córtex normal subjacente. Em tumores até 10 mm<sup>3</sup> de diâmetro, a PFI diminui à medida que se afasta do núcleo do tumor, avançando para o córtex normal. Todavia, em tumores com mais de 16 mm<sup>3</sup>, ocorre um equilíbrio entre a PFI do tumor e do cérebro adjacente, que pode ser revertido pelo tratamento com dexametasona, restaurando um gradiente de PFI tumor-córtex. Isto indica que a terapia antiedema é em parte responsável pela diminuição da PFI tumoral. O efeito da dexametasona parece relacionar-se não apenas à diminuição do conteúdo de água livre no tumor e no córtex subjacente, mas também ao aumento de atividade noradrenérgica cerebral (CHANG et al, 1990). Sobrenadantes de culturas de células tumorais (entre elas W256) exibem capacidade de induzir aumento de permeabilidade vascular em endotélio cerebral, efeito revertido pela dexametasona e dependente de produtos da lipoxigenase (OHNISHI et al, 1990). A dexametasona é capaz de diminuir a permeabilidade endotelial cerebral na presença ou ausência de tumores, efeito independente da produção de derivados do ácido araquidônico (GRABB & GILBERT, 1995). No entanto, autores discutem a importância deste efeito na redução do edema cerebral, enfatizando mais o fluxo de líquido intersticial para fora da área tumoral (MOLNAR et al, 1995). Evidências apontam a inibição dos efeitos do VEG/PF como possível mecanismo do efeito antiedematogênico e possivelmente anti-angiogênico da dexametasona em tumores cerebrais (CRISCUOLO & BALLEUX, 1996). A influência da dexametasona nos efeitos do VEG/PF na permeabilidade vascular parece dever-se tanto a uma inibição da resposta das células endoteliais quanto a uma menor expressão de VEG/PF pelas células

tumorais (HEISS et al, 1996). A dexametasona aparentemente inibe os passos proteolíticos da angiogênese tumoral (WOLFF et al, 1993), agindo ao ligar-se em receptores de esteróides das células tumorais (WOLFF et al, 1997), contribuindo para seu efeito antitumoral. A administração sistêmica de superóxido-dismutase (SOD) mostrou efeito análogo ao da dexametasona na permeabilidade vascular e edema cerebral em modelos tumorais experimentais, indicando a participação de espécies reativas de oxigênio (ERO) na indução de edema por tumores no SNC (SHOSHAN & SIEGAL, 1996).

A diminuição da permeabilidade vascular induzida pela dexametasona pode diminuir a penetração de drogas antineoplásicas no tumor cerebral, um efeito revertido pela administração intracarotídea de análogos da bradicinina (MATSUKADO et al, 1997). Este efeito parece ser mais importante na CAT, onde a dexametasona pode reduzir significativamente a penetração de drogas anticâncer (STRAATHOF et al, 1998). O tratamento com dexametasona também foi associado ao aumento da resistência de células tumorais a antineoplásicos como o metotrexate, mediado por aumento dos níveis intracelulares de glutathione (WOLFF & JÜRGENS, 1994; WOLFF et al, 1996).

A dexametasona foi testada, neste modelo, por ser uma droga de indicação absoluta para pacientes com metástases cerebrais, para tratar edema cerebral. O efeito do tratamento de animais com tumor cerebral com dexametasona foi avaliado com duas doses, uma com efeito antiinflamatório, mas incapaz de diminuir o edema cerebral (0,3 mg/kg/dia), e outra utilizada em experimentos para inibir edema cerebral em animais (3,0 mg/kg/dia) (FRANCISCHI et al, 1997; MOLNAR et al, 1995). Comparou-se também o efeito da CS na sobrevivência de animais com tumor cerebral.

Apesar de ser uma droga imunossupressora, a CS não pareceu modificar de maneira importante a sobrevivência dos animais inoculados com tumor. Ao contrário, a dexametasona, outra droga imunossupressora, com mecanismo de ação diverso, teve comportamento dose-dependente. Numa dose menor, antiinflamatória, a dexametasona não pareceu modificar a sobrevivência dos animais. Numa dose maior, utilizada para diminuir o edema cerebral associado ao tumor, ela aumentou a chance

de mortalidade dos animais até o 12<sup>o</sup> DPI.

O efeito da dexametasona na dose de 3,0 mg/kg/dia de diminuir a chance de sobrevivência dos animais inoculados com tumor pode não se dever ao efeito imunossupressor/anti-inflamatório, uma vez que a dose de 0,3 mg/kg/dia já tem efeito imunossupressor, mas não modifica a chance do animal morrer. Os glicocorticóides têm diversos efeitos metabólicos, os quais poderiam contribuir para o efeito na sobrevida. FRANCISCHI, et al (1997) descreveram efeitos colaterais em excesso, em comparação com doses equivalentes de CS, mesmo para as doses baixas de dexametasona, sem efeito no edema cerebral. A CS, na dose utilizada neste trabalho, parece ser mais segura para os animais com tumor deste modelo do que a dexametasona na dose antiedematogênica.

Autores mostraram que animais inoculados com gliomas C6 ou 9L apresentam aumento de sobrevida e redução do crescimento tumoral quando tratados com dexametasona (WOLFF et al, 1993; WOLFF et al, 1997). Apesar disso e da larga utilização da dexametasona para tratar edema cerebral associado a metástases cerebrais, não existem trabalhos clínicos que demonstrem o benefício do tratamento isolado com corticosteróides em termos de sobrevida ou morbidade neurológica dos pacientes. No entanto, o efeito do tratamento glicocorticóide na qualidade de vida dos pacientes com tumor cerebral é notável, com recuperações aparentemente milagrosas (WEN, 1997; PATCHELL, 1997). Além disso, demonstrou-se recentemente que a resposta de pacientes com metástase cerebral ao tratamento com esteróides correlaciona-se de forma importante com o prognóstico de sobrevida (LAGERWAAD et al, 1999). Dessa forma, o fato de a dexametasona reduzir discretamente a chance dos animais sobreviverem neste modelo de forma alguma indica ausência de atividade da droga no edema cerebral ou em escores de função neurológica, estes últimos não tendo sido testados.

## 6. CONCLUSÕES

1. O modelo de tumor W256 implantado no cérebro de ratos simulando uma metástase cerebral mostrou-se bem sucedido e reprodutível, tendo sido caracterizado com mediana de sobrevida, volume tumoral estimado e tempo de duplicação, apresentando baixo índice de disseminação extracraniana local e à distância.

2. O modelo comportou-se como um tumor de características indiferenciadas, apresentando invasividade local comparada à de tumores primários do SNC, prestando-se ao estudo da migração de células tumorais no SNC.

3. O modelo apresentou-se como um misto de tumor cerebral intraparenquimatoso e carcinomatose leptomeníngea, podendo ser utilizado para estudar o comportamento e testar formas de tratamento para ambas as patologias.

4. O crescimento tumoral intracerebral induziu aumento do número de neutrófilos, maior chance de apresentar neutrofilia, maior chance de apresentar linfopenia e aumento do peso dos cérebros dos animais experimentais. Nenhum dos outros valores hematológicos, bioquímicos e biológicos foi alterado de maneira significativa.

5. O tratamento com CS de animais inoculados com tumor, não alterou nenhuma das medidas hematológicas, bioquímicas ou biológicas em relação aos animais inoculados com tumor e não tratados, exceto o peso dos animais na primeira semana após inoculação tumoral. A CS, dessa forma, induziu significativamente uma caquexia precoce nos animais inoculados com tumor cerebral.

6. O tratamento com CS de animais inoculados com tumor mostrou tendências não significantes a diminuir o volume e massa tumorais e aumentar o número de PMN infiltrantes de tumor e necrose tumoral, indicando a necessidade de posteriores estudos para caracterizar morfológica e funcionalmente a resposta inflamatória local em animais inoculados com tumor e a influência da CS, além do efeito da CS na angiogênese tumoral.

7. A CS não alterou significativamente a chance de sobrevivência de animais inoculados com tumor cerebral, ao contrário da dexametasona 3,0 mg/kg/dia, que reduziu esta chance. A CS, assim, parece ser mais segura neste modelo tumoral que uma droga largamente utilizada para tratamento de pacientes com metástase cerebral.



## 7. BIBLIOGRAFIA

ABE, Y.; OHNISHI, Y.; YOSHIMURA, M.; OTA, E.; OZEKI, Y.; OSHIKA, Y.; TOKUNAGA, T.; YAMAZAKI, H.; UEYEMA, Y.; OGATA, T.; TAMAOKI, N.; NAKAMURA, M. P-glycoprotein-mediated acquired multidrug resistance of human lung cancer cells in vivo. **Br. J. Cancer**, v. 74, p. 1929-1934, 1996.

ADAMS, D.H.; GUNSON, B.; HONIGSBERGER, L.; BUCKELS, J.; PONSFORD, S.; BOON, A.; WILLIAMS, A.; ELIAS, E. Neurological complications following liver transplantation. **Lancet**, p. 949-951, 1987.

ADAMS, R.D.; VICTOR, M.; ROPPER, A.H. Intracranial neoplasms and paraneoplastic disorders. In: \_\_\_\_\_. **Principles of Neurology**. 6 ed. USA: McGraw-Hill, 1997. cap. 41, p. 642-694.

ALLEVA, D.G.; BURGER, C.J.; ELGERT, K.D. Tumor-induced regulation of suppressor macrophage nitric oxide and TNF- $\alpha$  production. **J. Immunol.** v. 153, n. 4, p. 1674-1686, 1994.

ALLT, G.; LAWRENSEN, J.G. Is the pial microvessel a good model for blood-brain barrier studies? **Brain. Res. Review.** v. 24, p. 67-76, 1997.

ARCHER, R.K.; JEFFCOTT, L.B. Normal hematological values in rats, mice and marmosets. In: \_\_\_\_\_. **Comparative clinical haematology**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1977. cap. 15, p. 611-619.

AUSMAN, J.I.; SHAPIRO, W.R.; RALL, D.P. Studies on the chemotherapy of experimental brain tumors: development of an experimental model. **Cancer Res.** v. 30, n. 9, p. 2394-2400, 1970.

BABA, T.; CHIO, C.C.; BLACK, K.L. The effect of 5-lipoxygenase inhibition on blood-brain barrier permeability in experimental brain tumors. **J. Neurosurg.** v. 77, n. 3, p. 403-406, 1992.

BACH, F.H.; SACHS, D.H. Transplantation immunology. **N. Eng. J. Med.** v. 317, n. 8, p. 489-492, 1987.

BAETHAMNN, A.; MAIER-HAUFF, K.; SCHURER, L. Release of glutamate and of free fatty acids in vasogenic brain edema. **J. Neurosurg.** v. 70, p. 578-591, 1989.

BALM, M.; HAMMACK, J. Leptomeningeal carcinomatosis. Presenting features and prognostic factors. **Arch. Neurol.** v. 53, p. 626-632, 1996.

BARKER, C.F.; BILLINGHAM, R.E. Immunologically privileged sites. **Adv. Immunol.** v. 25, p. 1-54, 1977.

BARKER, M.; HOSHINO, T.; GURCAY, O. Development of a brain tumor animal model and its response to 1,3-bis-(2-chloroethyl)1-nitrosourea. **Cancer Res.** v. 33, p. 976-989, 1973.

BECK, W.T.; DALTON, W.S. Mechanisms of drug resistance. In: DEVITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. **Cancer: principles and practice of oncology.** 5 ed. Philadelphia (USA): Lippincott-Raven Publishers, 1997, cap. 11, p. 498-511.

BELLAMY, W.T. P-glycoproteins and multidrug resistance. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v. 36, p. 161-183, 1996.

BLACK, K.L.; HOFF, J.T.; MCGILLICUDDY, J.E. Increased leukotriene C6 and vasogenic edema surrounding brain tumors. **Ann. Neurol.** v. 19, p. 592-595, 1985.

BLACK, P.M.; LOEFFLER, J.S. Neuropathology of Central Nervous System Tumors. Divisions Of Neuropathology At Brigham And Women's Hospital And Children's Hospital (Boston, Ma). In: \_\_\_\_\_. **Cancer of the nervous system**. USA: Blackwell Science, 1997. cap. 2, p. 25-53.

BLACK, P.M.; LOEFFLER, J.S. Preface. In: \_\_\_\_\_. **Cancer of the nervous system**. USA, Blackwell Science, 1997, p. xv.

BLASBERG, R.G.; SHAPIRO, W.R.; MOLNAR, P.; PATLAK, C.S.; FENSTERMACHER, J.D. Local blood-to-tissue transport in Walker 256 metastatic brain tumors. **J. Neurooncol.** v. 2, n. 3, p. 205-218, 1984.

BLASBERG, R.G.; SHAPIRO, W.R.; MOLNAR, P.; PATLAK, C.S.; FENSTERMACHER, J.D. Local blood flow in Walker 256 metastatic brain tumors. **J. Neurooncol.** v. 2, n. 3, p. 195-204, 1984.

BOHNEN, N.I.; RADHAKRISHNAN, K.; O'NEILL, B.P.; KURLAND, L.T. Descriptive and analytic epidemiology of brain tumors. In: BLACK, P.M.; LOEFFLER, J.S. **Cancer of the nervous system**. USA: Blackwell Science, 1997. cap. 1, p. 3-24.

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

BOREL, J.F. Cyclosporine. In: DALE, M.; FOREMAN, J.C.; FAN, T.D. **Textbook of Immunopharmacology**. 3 ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994. p. 320-330.

BORLONGAN, C.V.; FREEMAN, T.B.; HAUSER, R.A.; CAHILL, D.W.; SANBERG, P.R. Cyclosporine-A increases locomotor activity in rats with 6-hydroxydopamine-induced hemiparkinsonism: relevance to neural transplantation.

**Surg. Neurol.** v. 46, n. 4, p. 384-388, 1996.

BORLONGAN, C.V.; FREEMAN, T.B.; SCORCIA, T.A.; SHERMAN, K.A.; OLANOW, W.C.; CAHILL, D.W.; SANBERG, P.R. Cyclosporine-A increases spontaneous and dopamine agonist-induced locomotor behavior in normal rats. **Cell. Transplant.** v. 4, n. 1, p. 65-73, 1995.

BORLONGAN, C.V.; KWANBARA, Y.; FUJISAKI, T.; WATANABE, S. Cyclosporine-A reduces spontaneous place preference in adult rats. **Neurosci. Lett.** v. 267, n. 3, p. 169-172, 1999a.

BORLONGAN, C.V.; STAHL, C.E.; FUJISAKI, T.; SANBERG, P.R.; WATANABE, S. Cyclosporine A-induced hyperactivity in rats: is it mediated by immunosuppression, neurotrophism, or both? **Cell. Transplant.** v. 8, n. 1, p. 153-159, 1999b.

BOUCHER, Y.; SALEHI, H.; WITWER, B.; HARSH, G.R. 4<sup>th</sup>, JAIN, R.K. Interstitial fluid pressure in intracranial tumours in patients and in rodents. **Br. J. Cancer.** v. 75, n. 6, p. 829-836, 1997.

BURGIO, D.E.; GOSLAND, M.P.; McNAMARA, P.J. Modulation effects of cyclosporine on etoposide pharmacokinetics and CNS distribution in the rat utilizing microdialysis. **Biochem. Pharmacol.** v. 51, n. 7, p. 987-992, 1996.

BURT, R.K.; THORGEIRSSON, S.S. Coinduction of MDR-1 multidrug-resistance and cytochrome P-450 genes in rat liver by xenobiotics. **J. Natl. Cancer Inst.** v. 80, n. 17, p. 1383-1386, 1988.

CAMPANELLA, N.; PERGOLINI, M.; DAHER, W.; MORACA, A.; BORGOGNONI, C.; MOROSINI, P. Diagnosis of fever of unknown origin: use of Bayes theorem. **Recenti Prog. Med.** v. 90, n. 7-8, p. 387-391, 1999.

CHABNER, B.A.; ALLEGRA, C.J.; CURT, G.A.; CALABRESI, P. Antineoplastic agents. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9 ed. McGraw-Hill, 1996. cap. 51, p. 1233-1288.

CHANG, C.C.; SHINONAGA, M.; KUWABARA, T. Effect of dexamethasone on neurotransmitter amines in a rat glioma model. **Adv. Neurol.** v. 52, p. 483-489, 1990.

CHANG, D.B.; YANG, P.C.; LUH, K.T. Late survival of non-small cell lung carcinoma patients with brain metastases: influence of treatment. **Chest.** v. 101, p. 1293-1297, 1992.

COCKERILL, G.W.; BERT, A.G.; RYAN, G.R.; GAMBLE, J.R.; VADAS, M.A.; COCKERILL, P.N. Regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and E-selectin expression in endothelial cells by cyclosporin A and the T-cell transcription factor NFAT. **Blood.** v. 86, n. 7, p. 2689-2698, 1995.

COHEN, J.D.; ROBINS, H.I.; JAVID, M.J. Intracranial C6 glioma model in adult Wistar-Furth rats. **J. Neurooncol.** v. 8, p. 95-96, 1990.

COLOMBO, T.; ZUCCHETTI, M.; D'INCALCI, M. Cyclosporin A markedly changes the distribution of doxorubicin in mice and rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 269, n. 1, p. 22-27, 1994.

CORBEL, M.; LAGENTE, V.; THÈRET, N.; GERMAIN, N.; CLÈMENT, B.; BOICHOT, E. Comparative effects of betamethasone, cyclosporin and nedocromil sodium in acute pulmonary inflammation and metalloproteinase activities in bronchoalveolar lavage fluid from mice exposed to lipopolysaccharide. **Pulm. Pharmacol. Ther.** v. 12, n. 3, p. 165-171, 1999.

CORDON-CARDO, C.; O'BRIEN, J.P.; CASALS, D.; RITTMAN-GRAUER, L.; BIEDLER, J.L.; MELAMED, M.R.; BERTINO, J.R. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 86, p. 695-698, 1989.

CORNFORD, E.M.; YOUNG, D.; PAXTON, J.W.; FINLAY, G.J.; WILSON, W.R.; PARDRIDGE, W.M. Melphalan penetration of the blood-brain barrier via the neutral amino acid transporter in tumor-bearing brain. **Cancer Res.** v. 52, n. 1, p. 138-143, 1992.

CORTNER, J.; WOUDE, G.F.V. Essentials of molecular biology. In: DEVITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. **Cancer: principles and practice of oncology.** 5 ed. Philadelphia (USA): Lippincott-Raven Publishers, 1997. p. 3-33.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Neoplasia. In: \_\_\_\_\_. **Robbins' Pathologic basis of disease.** USA: W.B. Saunders, 1994. cap. 7, p. 241-304.

CRISCUOLO, G.R.; BALLEUX, J.P. Clinical neurosciences in the decade of the brain: hypotheses in neuro-oncology. VEG/PF acts upon the actin cytoskeleton and is inhibited by dexamethasone: relevance to tumor angiogenesis and vasogenic edema. **Yale J. Biol. Med.** v. 69, n. 4, p. 337-355, 1996.

DALE, D.C. Neutrophilia. In: WILLIAMS, W.J.; COYLE, T.E.; GRAZIANO, S.L.; et al. **Williams' Hematology.** 5 ed.. McGraw-Hill, 1995. cap. 82, p. 824-827.

DE GIROLAMI, U.; FRASH, M.P.; ANTHONY, D.C. The central nervous system. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Robbins' Pathologic basis of disease.** USA: W.B. Saunders, 1994. cap. 29, p. 1295-1356.

DEVITA, V.T. Jr. Principles of cancer management: chemotherapy. In: DEVITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG S.A. **Cancer: principles and practice of**

**oncology**. 5 ed. Philadelphia (USA): Lippincott-Raven Publishers, 1997. cap. 17, p. 333-345.

DIASIO, R.B.; LOBUGLIO, A.F. Immunomodulators: immusuppressive agents and immunostimulants. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9 ed. McGraw-Hill, 1996. cap. 52, p. 1291-1308.

DUFFNER, P.K.; COHEN, M.E.; MYERS, M.H.; HEISE, H.W. Survival of children with brain tumors: SEER program 1973-1980. **Neurology**. v. 36, n. 5, p. 597, 1986.

DUNN, A.J. Interactions between the nervous system and the immune system. Implications for psychopharmacology. In: BLOOM, F.E.; KUPFER, D.J. **Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress**. New York (USA): Raven Press, 1995. cap. 63, p. 719-731.

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.

ERSLEV, A.J. Anemia associated with marrow infiltration In: WILLIAMS, W.J.; COYLE, T.E.; GRAZIANO, S.L.; et al. **Williams' Hematology**. 5 ed. McGraw-Hill, 1995a. cap. 48, p. 516.

ERSLEV, A.J. Anemia of chronic disease In: WILLIAMS, W.J.; COYLE, T.E.; GRAZIANO, S.L.; et al. **Williams' Hematology**, 5 ed. McGraw-Hill, 1995b. cap. 49.

FAHR, A. Cyclosporin clinical pharmacokinetics. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 24, n. 6, p. 472-495, 1993.

FIDLER, I.J. Molecular biology of cancer: invasion and metastasis. In: DEVITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. **Cancer: principles and practice of oncology**. 5 ed. Philadelphia (USA): Lippincott-Raven Publishers, 1997. cap. 7, p. 135-152.

FISHER, E.R.; FISHER, B. Local factors affecting tumor growth. I. Effect of tissue homogenates. **Cancer Res.** v. 23, p. 1651-1657, 1964.

FISHMAN, R.A. Brain edema. **N. Engl. J. Med.** v. 293, p. 706-711, 1975.

FOLKMAN, J. Antiangiogenic therapy. In: DEVITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. **Cancer: principles and practice of oncology**. 5 ed. Philadelphia (USA): Lippincott-Raven Publishers, 1997. p. 3075-3085.

FORD, A.L.; FOULCHER, E.; LEMCKERT, F.A.; SEDGWICK, J.D. Microglia induce CD4 T lymphocyte final effector function and death. **J. Exp. Med.** v. 184, p. 1737-1745, 1996.

FRANCISCHI, J.N.; PEREIRA, L.S.M.; CASTRO, M.S. Cyclosporin inhibits hyperalgesia and edema in arthritic rats: role of the central nervous system. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 30, n. 1, p. 101-111, 1997.

FRANÇOIS, P.; VAUDAUX, P.; FOSTER, T.J.; LEW, D.P. Host-bacteria interactions in foreign body infections. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.** v. 17, n. 8, p. 514-520, 1996.

FREIFELD, A.G.; PIZZO, P.A.; WALSH, T.J. Infections in the cancer patient. In: DEVITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. **Cancer: principles and practice of oncology**. 5 ed. Philadelphia (USA): Lippincott-Raven Publishers, 1997. p. 2659-2704.



FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells**. New York (USA): Alan R. Liss, 1987. p. 124-126, 227-232.

GEYER, J.R.; BERGER, M. Central nervous system malignancies in children. **NY State J. Med.** v. 90, n. 12, p. 601-608, 1990.

GIULIAN, D.; CHEN, J.; INGEMAN, J.E.; GEORGE, J.K.; NOPONEN, M. The role of mononuclear phagocytes in wound healing after traumatic injury to adult mammalian brain. **J. Neurosci.** v. 9, n. 12, p. 4416-4429, 1989.

GOTTESMAN, M.M.; PASTAN, I. The multidrug transporter: a double-edge sword. **J. Biol. Chem.** v. 263, n. 12, p. 163, 1988.

GRABB, P.A.; GILBERT, M.R. Neoplastic and pharmacological influence on the permeability of an in vitro blood-brain barrier. **J. Neurosurg.** v. 82, n. 6, p. 1053-1058, 1995.

GRAHAM, R.M. Cyclosporine: mechanisms of action and toxicity. **Cleveland Clinic J. Med.** v. 61, n. 4, p. 308-313, 1994.

GREENE, H.S.N. The transplantation of human brain tumors to the brains of laboratory animals. **Cancer Res.** v. 13, n. 6, p. 422-437, 1953.

GREIG, N.H.; SONCRANT, T.T.; SHETTY, H.U.; MOMMA, S.; SMITH, Q.R.; RAPOPORT, S.I. Brain uptake and anticancer activities of vincristine and vinblastine are restricted by their low cerebrovascular permeability and binding to plasma constituents in rat. **Cancer Chemother. Pharmacol.** v. 26, n. 4, p. 263-268, 1990.

GRIFFIOEN, A.W.; DAMEN, C.A.; BLIJHAM, G.H.; GROENEWEGEN, G. Tumor angiogenesis is accompanied by a decreased inflammatory response of tumor-associated endothelium. **Blood**. v. 88, n. 2, p. 667-673, 1996.

GROOTHUIS, D.R.; VICK, N.A. Brain tumors and the blood-brain barrier. **Trends Neurosci**. v. 5, n. 7, p. 233-235, 1982.

GUYOT, L.L.; DOWLING, C.; DIAZ, F.G.; MICHAEL, D.B. Cerebral monitoring devices: analysis of complications. **Acta Neurochir. Suppl. (Wien)**. v. 71, p. 47-49, 1998.

HART, I.R. Adhesion receptors and cancer. In: Horton, M.A. **Molecular Biology of Cell Adhesion Molecules**. Inglaterra: John Wiley & Sons, 1996. cap. 6, p. 87-98.

HASEGAWA, H.; USHIO, Y.; HAYAKAWA, T.; YAMADA, K.; MOGAMI, H.J. Changes of the blood-brain barrier in experimental metastatic brain tumors. **Neurosurg**. v. 59, n. 2, p. 304-310, 1983.

HAY, R.; CAPUTO, J.; CHEN, T.R.; et al. **ATCC Cell Lines and Hybridomas**. 8 ed. USA: American Type Culture Collection, 1994.

HEISS, J.D.; PAPAVALASSILIOU, E.; MERRILL, M.J.; NIEMAN, L.; KNIGHTLY, J.J.; WALBRIDGE, S.; EDWARDS, N.A.; OLDFIELD, E.H. Mechanism of dexamethasone suppression of brain tumor-associated vascular permeability in rats. Involvement of the glucocorticoid receptor and vascular permeability factor. **J. Clin. Invest**. v. 98, n. 6, p. 1400-1408, 1996.

HELLMAN, S. Principles of cancer management: radiation therapy. In: DEVITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. **Cancer: principles and practice of oncology**. 5 ed. Philadelphia (USA): Lippincott-Raven Publishers, 1997. p. 307-332.

HEMPELMANN, U.; HAAG-WEBER, M.; HORL, W.H.; TSCHESCHE, H. Effect of immunosuppressive drugs on the release of metalloproteinases from human polymorphonuclear leukocytes. **Transpl. Int.** v. 4, n. 1, p. 26-30, 1991.

HIESIGER, E.M.; VOORHIES, R.M.; BASLER, G.A.; LIPSCHUTZ, L.E.; POSNER, J.B.; SHAPIRO, W.R. Opening the blood-brain and blood-tumor barriers in experimental rat brain tumors: the effect of intracarotid hyperosmolar mannitol on capillary permeability and blood flow. **Ann. Neurol.** v. 19, n. 1, p. 50-59, 1986.

HUANG, T.Y.; ARITA, N.; USHIO, Y.; HAYAKAWA, T.; YAMADA, K. **J. Neurooncol.** v. 19, n. 3, p. 245-250, 1994.

HUSS, R.; HOY, C.A.; OTTINGER, H.; GROSSE-WILDE, H.; DEEG, H.J. Cyclosporine-induced apoptosis in CD4+ T lymphocytes and computer-simulated analysis: modeling a treatment scenario for HIV infection. **Res. Immunol.** v. 146, p. 101-108, 1995.

JAMSHIDI, J.; YOSHIMINE, T.; USHIO, Y.; HAYAKAWA, T. Effects of glucocorticoid and chemotherapy on the peritumoral edema and astrocytic reaction in experimental brain tumor. **J. Neurooncol.** v. 12, n. 3, p. 197-204, 1992.

JENSEN, G.; MUNTZING, J. Differences in the growth of the walker carcinoma in sprague-dawley and wistar rats. **Z. Krebsforsch.** v. 74, p. 55-58, 1970.

JETTÉ, L.; BEAULIEU, E.; LECLERC, J.M.; BÉLIVEAU, R. Cyclosporin A treatment induces overexpression of P-glycoprotein in the kidney and other tissues. **Am. J. Physiol.** v. 270, n. 39, p. F756-F765, 1996.

JETTÉ, L.; MURPHY, G.F.; LECLERC, J.M.; BÉLIVEAU, R. Interaction of drugs with P-glycoprotein in brain capillaries. **Biochem. Pharmacol.** v. 50, n. 10, p. 1701-1709, 1995.

JOFFE, I.; KATZ, I.; JACOBS, T.; STEIN, B.; TAKIZAWA, M.; LIU, C.; BERLIN, J.; EPSTEIN, S. 17-beta-estradiol prevents osteopenia in the oophorectomized rat treated with cyclosporin-A. **Endocrinology.** v. 130, n. 3, p. 1578-1586, 1992.

KAHAN, B.D. Cyclosporine. **N. Eng. J. Med.** v. 321, n. 25, p. 1725-1738, 1989.

KHARDORI, N.; YASSIEN, M. Biofilms in device-related infections. **J. Ind. Microbiol.** v. 15, n. 3, p. 141-147, 1995.

KIPPS, T.J. Lymphocytosis and lymphocytopenia. In: WILLIAMS, W.J.; COYLE, T.E.; GRAZIANO, S.L.; et al. **Williams' Hematology.** 5 ed.. McGraw-Hill, 1995. cap. 101, p. 963-967.

KNOPF, M.P.; CSERR, H.F.; NOLAN, S.C.; WU, T.Y.; HARLING-BERG, C.J. Physiology and immunology of lymphatic drainage of interstitial and cerebrospinal fluid from the brain. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.** v. 21, p. 175-180, 1995.

KOBAYASHI, N.; ALLEN, N.; CLENDENON, N.R. An improved rat brain tumor model. **J. Neurosurg.** v. 53, p. 808-815, 1980.

KOOISTRA, K.L.; RODRIGUEZ, M.; POWIS, G.; YAKSH, T.L.; HARTY, G.J.; HILTON, J.F.; LAWS, E.R. Jr. Development of experimental models for meningeal neoplasia using intrathecal injection of 9L gliosarcoma and Walker 256 carcinosarcoma in the rat. **Cancer Res.** v. 46, n. 1, p. 317-323, 1986.

LAGERWAAD, F.J.; LEVENDAG, P.C.; NOWAK, P.J.; EIJKENBOOM, W.M.; HANSSSENS, P.E.; SCHMITZ, P.I. Identification of prognostic factors in patients with brain metastases: a review of 1292 patients. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.** v. 43, n. 4, p. 795-803, 1999.

LAMPSON, L.A.; WEN, P.; ROMAN, V.A. Disseminating tumor cells and their interactions with leukocytes visualized in the brain. **Cancer Res.** v. 52, p. 1018-1025, 1992.

LAUFER, G.; GRABLOWITZ, V.; LACZKOVICS, A.; MIHOLIC, J.; HEINZ, G.; WOLLENEK, G.; SCHREINER, W.; WOLFRAM, J.; WOLNER, E. The determinants of elevated total plasma cholesterol levels in cardiac transplant recipients administered low dose cyclosporine for immunosuppression. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 104, n. 2, p. 241-247, 1992.

LEJEUNE, P.; LAGADEC, P.; ONIER, N.; PINARD, D.; OHSHIMA, H.; JEANNIN, J.F. Nitric oxide involvement in tumor-induced immunosuppression. **J. Immunol.** v. 152, p. 5077-5083, 1994.

LEVIN, V.A.; LEIBEL, S.; GUTIN, P.H. Neoplasms of the central nervous system. In: DEVITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. **Cancer: principles and practice of oncology.** 5 ed. Philadelphia (USA): Lippincott-Raven Publishers, 1997. p. 2022-2082.

LEVIN, V.A.; PATLAK, C.S.; LANDAHL, H.D. Heuristic modeling of drug delivery to malignant brain tumors. **J. Pharmacokinet. Biopharm.** v. 8, p. 257-296, 1980.

LICHTMAN, M.A. Monocytosis and monocytopenia. In: WILLIAMS, W.J.; COYLE, T.E.; GRAZIANO, S.L.; et al. **Williams' Hematology.** 5 ed. McGraw-Hill, 1995. cap. 90, p. 881-884.

LOEFFLER, J.S.; PATCHELL, R.A.; SAWAYA, R. Metastatic brain cancer. In: DEVITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. **Cancer: principles and practice of oncology**. 5 ed. Philadelphia (USA): Lippincott-Raven Publishers, 1997. cap. 50, p. 2523-2535.

MANN, G.N.; SASS, D.A.; CHEN, H.K.; BUCHINSKY, F.J.; BRYER, H.P.; MA, Y.F.; JEE, W.S.; RUCINSKI, B.; EPSTEIN, S. Short-term systemic insulin-like growth factor-1 is unable to prevent cyclosporin A-induced osteopenia in the rat. **Calcif. Tissue Int.** v. 59, n. 1, p. 38-44, 1996.

MANROE, B.L.; WEINBERG, A.G.; ROSENFELD, C.R.; BROWNE, R. The neonatal blood count in health and disease. I. Reference values for neutrophilic cells. **J. Pediatr.** v. 95, n. 1, p. 89-98, 1979.

MAPSTONE, T.B.; WARF, B.C. Intracranial tumor in infants: characteristics, management and outcome of a contemporary series. **Neurosurgery**. v. 28, n. 3, p. 343-348, 1991.

MARKESBERY, W.R.; BROOKS, W.H.; GUPTA, G.D.; YOUNG, A.B. Treatment for patients with cerebral metastases. **Arch. Neurol.** v. 35, p. 754-756, 1978.

MATSUKADO, K.; NAKANO, S.; BARTUS, R.T.; BLACK, K.L. Steroids decrease uptake of carboplatin in rat gliomas--uptake improved by intracarotid infusion of bradykinin analog, RMP-7. **J. Neurooncol.** v. 34, n. 2, p. 131-138, 1997.

MERCHANT, R.E.; MERCHANT, L.H.; COOK, S.H.S.; MCVICAR, D.W.; YOUNG, H.F. Intralesional infusion of lymphokine-activated killer (LAK) cells

and recombinant interleukin-2 (IL-2) for the treatment of patients with malignant brain tumor. **Neurosurgery**. v. 23, n. 6, p. 725-732, 1988.

MIKKELSEN, T.; EDVARDBSEN, K. Tumor invasiveness. In: BLACK, P.M.; LOEFFLER, J.S. **Cancer of the nervous system**. USA: Blackwell Science, 1997. cap. 45, p. 843-857.

MILOSAVLJEVIC, V.P.; CONRAD, C.A.; YUNG, W.K.A. Principles of chemotherapy for adult primary brain tumors. In: BLACK, P.M.; LOEFFLER, J.S. **Cancer of the nervous system**. USA: Blackwell Science, 1997. cap. 10, p. 200-212.

MOLNAR, P.; LAPIN, G.D.; GROOTHUIS, D.R. The effects of dexamethasone on experimental brain tumors: I. Transcapillary transport and blood flow in RG-2 rat gliomas. **J. Neurooncol**. v. 25, n. 1, p. 19-28, 1995.

MORAES FILHO, M.O.; FONTELES, M.C.; MATOS, F.J.A.; MORAES, M.E.A. Atividade antitumoral de plantas do Nordeste Brasileiro. **Ciência e Cultura**. v. 31, n. 7, p. 647, 1980.

MORIOKA, T.; BABA, T.; BLACK, K.L.; STREIT, W.J. Inflammatory cell infiltrates vary in experimental primary and metastatic brain tumors. **Neurosurg**. v. 30, n. 6, p. 891-896, 1992.

MORREALE, V.M.; HERMAN, B.H.; DER-MINASSIAN, V.; PALKOVITS, M.; KLUBES, P.; PERRY, D., CSIFFARY, A., LEE, A.P. A brain-tumor model utilizing stereotatic implantation of a permanent cannula. **J. Neurosurg**. v. 78, n. 6, p. 959-965, 1993.

MROWIETZ, U.; STICHERLING, M.; MIELKE, V.; SCHRÖDER, JM.; CHRISTOPHERS, E. Neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8 mRNA

expression and protein secretion by human monocytes: effect of cyclosporin A. **Cytokine**. v. 3, n. 4, p. 322-326, 1991.

NAKAGAWA, H.; FUJITA, T.; KUBO, S.; TOKIYOSHI, K.; YAMADA, M.; KANAYAMA, T.; HAGIWARA, Y.; NAKANOMYO, H.; HIRAOKA, M. Difference in CDDP penetration into CSF between selective intrarterial chemotherapy in patients with malignant glioma and intravenous or intracarotid administration in patients with metastatic brain tumor. **Cancer Chemother. Pharmacol**. v. 37, n. 4, p. 317-326, 1996.

NAKAGAWA, H.; GROOTHUIS, D.R.; PATLAK, C.S. Dexamethasone reduces brain tumor extracellular space capillary permeability: implications for diagnosis and therapy. **Neurology**. v. 34, p. 184, 1984.

NARIAI, T.; DEGEORGE, J.J.; GREIG, N.H.; GENKA, S.; RAPOPORT, S.I.; PURDON, A.D. Differences in rates of incorporation of intravenously injected radiolabeled fatty acids into phospholipids of intracerebrally implanted tumor and brain in awake rats. **Clin. Exp. Metastasis**. v. 12, n. 3, p. 213-225, 1994.

NARIAI, T.; GREIG, N.H.; DEGEORGE, J.J.; GENKA, S.; RAPOPORT, S.I. Intravenously injected radiolabelled fatty acids image brain tumour phospholipids in vivo: differential uptakes of palmitate, arachidonate and docosahexaenoate. **Clin. Exp. Metastasis**. v. 11, n. 2, p. 141-149, 1993.

NGUYEN, N.S.; PULIDO, S.M.; RIEGG, U.T. Biphasic effects of cyclosporin A on formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine stimulated responses in HL-60 cells differentiated into neutrophils. **Br. J. Pharmacol**. v. 124, n. 8, p. 1774-1780, 1998.

OHNISHI, T.; SHER, P.B.; POSNER, J.B.; SHAPIRO, W.R. Capillary permeability factor secreted by malignant brain tumor. Role in peritumoral brain



edema and possible mechanism for anti-edema effect of glucocorticoids. **J. Neurosurg.** v. 72, n. 2, p. 245-251, 1990.

OLIVEIRA, C.T.P.; BOCALLETTI, V.R.; FISCHER, A.L.; SETTANNI, F.A.P. Contribuição ao estudo dos tumores intracranianos na infância. A propósito de 519 casos. Distribuição em relação à idade, sexo, topografia e natureza. **Rev. Bras. Neurol.** v. 22, n. 4, p. 109-115, 1986.

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

PATCHELL, R.A. Brain metastases. In: BLACK, P.M.; LOEFFLER, J.S. **Cancer of the nervous system.** USA: Blackwell Science, 1997. cap. 35, p. 653-663.

PATCHELL, R.A.; TIBBS, P.R.; WALSH, J.W. A randomized trial of surgery in the treatment of single metastases to the brain. **N. Engl. J. Med.** v. 322, p. 494-500, 1990.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates.** 2 ed. Academic Press, 1986.

PERCY, A.K.; ELVEBACK, L.R.; OKAZAKI, H. Neoplasms of the central nervous system: epidemiologic considerations. **Neurology.** v. 22, n. 1, p. 40, 1972.

PERKINS, A.S.; STERN, D.F. Molecular biology of cancer: oncogenes. In: DEVITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. **Cancer: principles and practice of oncology.** 5 ed. Philadelphia (USA): Lippincott-Raven Publishers, 1997. p. 79-102.

PETERSON, D.L.; BROWN JR, W.E. Animal models for brain tumors. In: BLACK, P.M.; LOEFFLER, J.S. **Cancer of the nervous system**. USA: Blackwell Science, 1997. cap. 44, p. 829-842.

PILKINTON, G.J. The role of the extracellular matrix in neoplastic glial invasion of the nervous system. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 29, n. 9, p. 1159-1172, 1996.

ROBBINS, S.L.; KUMAR, V.; COTRAN, R.S. Mechanisms of invasion and metastasis. In: \_\_\_\_\_. **Robbins' Pathologic basis of disease**. USA: W.B. Saunders, 1994. cap. 7, p. 276-280.

ROBINSON, P.J.; RAPOPORT, S.I. Model for drug uptake by brain tumors: effects of osmotic treatment and of diffusion in brain. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** v. 10, n. 2, p. 153-161, 1990.

ROJO, D.; PINEDO, A.; CLAVIJO, E.; GARCÍA RODRIGUEZ, A.; GARCÍA, V. Analysis of risk factors associated with nosocomial bacteraemias. **J. Hosp. Infect.** v. 42, n. 2, p. 135-141, 1999.

ROSA, L.F.; DE ALMEIDA, A.F.; SAFI, D.A.; CURI, R. Metabolic and functional changes in lymphocytes and macrophages as induced by ageing. **Physiol. Behav.** v. 53, n. 4, p. 651-656, 1993.

ROSA, L.F.; GUIMARAES, A.R.; SAFI, D.A.; CURI, R.; WILLIAMS, J.F. Effects of various dietary fatty acids on enzyme activities of carbohydrate and glutamine metabolism and the metabolic response of lymphocytes and macrophages during Walker-256 ascites cell tumour growth in rats. **Biochem. Mol. Biol. Int.** v. 29, n. 1, p. 33-45, 1993.

ROSENBERG, S.A. Principles of cancer management: surgical oncology. In: DEVITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. **Cancer: principles and**

**practice of oncology.** 5 ed. Philadelphia (USA): Lippincott-Raven Publishers, 1997. p. 295-306.

ROSENKRANZ, H.S.; KLOPMAN, G. A structural analysis of the genotoxic and carcinogenic potentials of cyclosporin A. **Mutagenesis.** v. 7, n. 2, p. 115-118, 1992.

ROSSI, M.L.; JONES, N.R.; ESIRI, M.M.; HAVAS, L. Mononuclear cell infiltrate and HLA-Dr expression in intra- and extradural secondary carcinomas. **Path. Res. Pract.** v. 187, n. 1, p. 55-61, 1991.

RUSSELL, G.; GRAVELEY, R.; SEID, J.; AL-HUMIDAN, A.K.; SKJODT, H. Mechanisms of action of cyclosporine and effects on connective tissues. **Seminars in Arthritis Rheumatism.** v. 21, n. 6, Supl 3, p. 16-22, 1992.

RYFFEL, B.; MIHATSCH, M.J.; FISHER, G.L. Immunosuppression and cancer: the cyclosporin case. **Drug Chemical Toxicology.** v. 15, n. 2, p. 95-115, 1992.

SAKATA, A.; TAMAI, I.; KAWAZU, K.; DEGUCHI, Y.; OHNISHI, T.; SAHEKI, A.; TSUJI, A. In vivo evidence for ATP-dependent and P-glycoprotein-mediated transport of cyclosporin A at the blood-brain barrier. **Biochem. Pharmacol.** v. 48, n. 10, p. 1989-1992, 1994.

SAN-GALLI, F.; VRIGNAUD, P.; ROBERT, J. Assessment of the experimental model of transplanted C6 glioblastoma in Wistar rats. **J. Neurooncol.** v. 7, p. 299-304, 1989.

SAVA, G.; CLERICI, K.; CAPOZZI, I.; COCCHIETTO, M.; GAGLIARDI, R.; ALESSIO, E.; MESTRONI, G.; PERBELLINI, A. Reduction of lung metastasis by ImH[trans-RuCl<sub>4</sub>(DMSO)Im]: mechanism of the selective action investigated on mouse tumors. **Anticancer Drugs.** v. 10, n. 1, p. 129-138, 1999.

SCHABET, M.; HERRLINGER, U. Animal models of leptomeningeal metastasis. **J. Neurooncol.** v. 38, n. 2-3, p. 199-205, 1998.

SCHEINBERG, L.C.; LEVY, A.; EDELMAN, F. Is the brain an “immunologically privileged site”? **Arch. Neurol.** v. 13, n. 1, p. 283-286, 1965.

SCHIMMER, B.P.; PARKER, K.L. Adrenocortical steroids and their synthetic analogs. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics.** 9 ed. McGraw-Hill, 1996. cap. 59, p. 1459-1481.

SCHOENBERG, B.S.; CHRISTINE, B.W.; WHISNAUT, J.P. The descriptive epidemiology of primary intracranial neoplasms: the Connecticut experience. **Am. J. Epidemiol.** v. 104, p. 499-510, 1976.

SCHREK, R.; AVERY, R.C. Histological observation on transplantable rat and rabbit tumors cultivated in the chorio-allantoic membrane of chick embryos, with special reference to the walker rat tumor 256. **Am. J. Pathol.** v. 13, p. 45, 1937.

SCHWARTZ, M.S.; MORRIS, J.; SARID, J. Overexpression of oncogene products can cause tumor progression without parenchymal infiltration in the rat brain. **Cancer Res.** v. 51, p. 3595-3601, 1991.

SEELAENDER, M.C.L.; CURI, R. Metabolic aspects in cancer cachexia. **Ciência e Cultura.** v. 46, n. 1-2, p. 92-96, 1994.

SELL, S.; BERKOWER, I.; MAX, E.E. **Immunology, immunopathology and immunity.** 5 ed. Connecticut (EUA): Appleton; Lange, 1996. 1014p.

SENGER, D.R.; VAN DE WATER, L.; BROWN, L.F. Vascular permeability (VPF, VEGF) in tumor biology. **Cancer Metastasis Rev.** v. 12, p. 303-324, 1993.

SHAPIRO, W.R.; HIESIGER, E.M.; COONEY, G.A.; BASLER, G.A.; LIPSCHUTZ, L.E.; POSNER, J.B. Temporal effects of dexamethasone on blood-to-brain and blood-to-tumor transport of <sup>14</sup>C-alpha-aminoisobutyric acid in rat C6 glioma. **J. Neurooncol.** v. 8, n. 3, p. 197-204, 1990.

SHAPIRO, W.R.; VOORHIES, R.M.; HIESIGER, E.M. Pharmacokinetics of tumor cell exposure to [<sup>14</sup>C]methotrexate after intracarotid administration without and with hyperosmotic opening of the blood-brain and blood-tumor barriers in rat brain tumors: a quantitative autoradiographic study. **Cancer Res.** v. 48, p. 694-701, 1988.

SHAPIRO, WR. Treatment of neuroectodermal brain tumors. **Ann. Neurol.** v. 12, p. 231-237, 1987.

SHINONAGA, M.; CHANG, C.C.; SUZUKI, N.; SATO, M.; KUWABARA, T. Immunohistological evaluation of macrophage infiltrates in brain tumors: correlation with peritumoral edema. **J. Neurosurg.** v. 68, p. 259-265, 1988.

SHOSHAN, Y.; SIEGAL, T. Control of vasogenic edema in a brain tumor model: comparison between dexamethasone and superoxide dismutase. **Neurosurgery.** v. 39, n. 6, p. 1206-1213, 1996.

SIGALET, D.L.; KNETEMAN, N.M.; THOMSON, A.B. Reduction of nutrient absorption in normal rats by cyclosporine. **Transplantation.** v. 53, n. 5, p. 1103-1107, 1992.

SLOAN, D.J.; WOOD, M.J.; CHARLTON, H.M. The immune response to intracerebral neural grafts. **Trends Neurosci.** v. 14, n. 8, p. 341-346, 1991.

SMITH, C.A.; ANDREWS, C.M.; COLLARD, J.K.; et al. Rats and mice. In: \_\_\_\_\_. **A Color Atlas of Comparative, Diagnostic and Experimental Hematology**. Barcelona: Wolfe Publishing, 1994. cap. 1, p.9-17.

STEEL, G.G. **Growth Kinetics of Tumours**. Oxford: Clarendon Press, 1987. p. 5-55.

STEVENS, A.; KLÖTER, I.; ROGGENDORF, W. Inflammatory infiltrates and natural killer cell presence in human brain tumors. **Cancer**. v. 61, p. 738-743, 1988.

STEWART, D.J. The role of chemotherapy in the treatment of gliomas in adults. **Cancer Treat. Rev.** v. 16, p. 129-160, 1989.

STRAATHOF, C.S.; VAN DEN BENT, M.J.; MA, J.; SCHMITZ, P.I.; KROS, J.M.; STOTER, G.; VECHT, C.J.; SCHELLENS, J.H. The effect of dexamethasone on the uptake of cisplatin in 9L glioma and the area of brain around tumor. **J. Neurooncol.** v. 37, n. 1, p. 1-8, 1998.

STRAUSBAUGH, L.J. Hematologic manifestations of bacterial and fungal infections. **Hematol. Oncol. Clin. North. Am.** v. 1, n. 2, p. 185-206, 1987.

STVRTINOVA, V.; JAKUBOVSKY, J.; HULIN, I. Inflammation and fever. In: \_\_\_\_\_. **Pathophysiology: Principles of Diseases**. Slovakia online, Computing Centre, Slovak Academy of Sciences: Academic Eletronic Press, 1995. Disponível em: <<http://nic.savba.sk/logos/books/scientific/z.html>>. Acesso em jun.1999.

SUZUKI, T.; YOSHIKE, M.; FUNADA, M.; MIZOGUCHI, H.; KAMEI, J.; MISAWA, M. Effect of cyclosporine A on the morphine-induced place preference. **Neurosci. Lett.** v. 160, n. 2, p. 159-162, 1993.

TAKAHASHI, J.; FUKUMOTO, M.; IGORSHI, K. Correlations of b-FGF expression levels with the degree of malignancy and vascularity in human gliomas. **J. Neurosurg.** v. 76, p. 792-798, 1992.

TALALAY, P.; TAKANO, E.M.V.; HUGHINS. Studies on the walker tumor. I. Standardization of growth of a transplantable tumor. **Cancer Res.** v. 12, p. 834-837, 1952.

TATSUTA, T.; NAITO, M.; OH-HARA, T.; SUGAWARA, I.; TSURUO, T. Functional involvement of P-glycoprotein in blood-brain barrier. **J. Biol. Chem.** v. 267, n. 28, p. 20383-20391, 1992.

THIERY, J.P.; SASTRE-GARAU, X. Processus métastatique. **Rev. Praticien.** v. 45, n. 15, p. 1909-1919, 1995.

THORAT, S.P.; THATTE, U.M.; PAI, N.; DAHANUKAR, S.A. Inhibition of phagocytes by cyclosporin in vitro. **Q. J. Med.** v. 87, n. 5, p. 311-314, 1994.

TORRES, R.; DE LA PIEDRA, C.; RAPADO, A. Osseous and intestinal compartments in the humoral hypercalcemia of malignancy associated to Walker 256 tumor in rats. **Oncology.** v. 50, n. 2, p. 148-152, 1993.

TÓTH, K.; VAUGHAN, M.M.; PERESS, N.S.; SLOCUM, H.K.; RUSTUM, Y.M. MDR-1 P-glycoprotein is expressed by endothelial cells of newly formed capillaries in human gliomas but is not expressed in the neovasculature of other primary tumors. **Am. J. Pathol.** v. 149, n. 3, p. 853-858, 1996.

TSUKADA, Y.; FOUAD, A.; PICKREN, J.W.; LANE, W.W. Central nervous system metastasis from breast carcinoma: autopsy study. **Cancer.** v. 52, p. 2349-2354, 1983.

TZENG, J.J.; BARTH, R.F.; OROSZ, C.G.; JAMES, S.M. Phenotype and functional activity of tumor-infiltrating lymphocytes isolated from immunogenic and nonimmunogenic rat brain tumors. **Cancer Res.** v. 51, n. 9, p. 2373-2378, 1991.

VON HORSTEN, S.; EXTON, M.S.; VOGEL, J.; SCHULT, M.; NAGEL, E.; SCHMIDT, R.E.; WESTERMANN, J.; SCHEDLOWSKI, M. Cyclosporine A affects open field behavior in DA rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 60, n. 1, p. 71-76, 1998.

VRIONIS, F.D.; WU, J.K.; QI, P.; CANO, W.G.; CHERINGTON, V. J. **Neurosurg.** v. 84, n. 2, p. 250-257, 1996.

WAKI, Y.; MIYAMOTO, K.; KASUGAI, S.; OHYA, K. Osteoporosis-like changes in Walker carcinoma 256-bearing rats, not accompanied with hypercalcemia or parathyroid hormone-related protein production. **Jpn. J. Cancer Res.** v. 86, n. 5, p. 470-476, 1995.

WAKITA, H.; TOMIMOTO, H.; AKIGUCHI, I.; KIMURA, J. Protective effect of cyclosporin A on white matter changes in the rat brain after chronic cerebral hypoperfusion. **Stroke.** v. 26, n. 8, p. 1415-1422, 1995.

WALKER, A.E.; ROBINS, M.; WEINFELD, D. Epidemiology of brain tumors: the national survey of intracranial neoplasms. **Neurology.** v. 35, n. 2, p. 219-226, 1985.

WALLACE, J.L.; HOGABOAM, C.M.; KUBES, P. Immunopathology of NSAID-gastropathy: inhibitory effects of interleukin-I and cyclosporin A. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 664, p. 400-407, 1992.



WARDLAW, A.J.; KAY, A.B. Eosinophils: production, biochemistry and function. In: WILLIAMS, W.J.; COYLE, T.E.; GRAZIANO, S.L.; et al. **Williams' Hematology**. 5 ed.. McGraw-Hill, 1995. cap. 78, p. 798.

WEINBERG, A.G.; ROSENFELD, C.R.; MANROE, B.L.; BROWNE, R. Neonatal blood cell count in health and disease. II. Values for lymphocytes, monocytes, and eosinophils. **J. Pediatr.** v. 106, n. 3, p. 462-466, 1985.

WEN, P.Y. Diagnosis and management of brain tumors. In: BLACK, P.M.; LOEFFLER, J.S. **Cancer of the nervous system**. USA: Blackwell Science, 1997. cap. 5, p. 106-127.

WENZEL; SEIFERT, K.; GREENBAUM, L.; SEIFERT, R. Differential inhibition of human neutrophil activation by cyclosporins A, D, and H. Cyclosporin H is a potent and effective inhibitor of formyl peptide-induced superoxide formation. **J. Immunol.** v. 147, n. 6, p. 1940-1946, 1991.

WILSON, C.B.; NORREL, H. JR, BARKER, M. Intrathecal injection of methotrexate (NSC-470) in transplanted brain tumors. **Cancer Chemother. Rep.** v. 51, p. 1-6, 1967.

WOLFF, J.E.; JÜRGENS, H. Dexamethasone induced partial resistance to methotrexate in C6-glioma cells. **Anticancer Res.** v. 14, n. 4A, p. 1585-1588, 1994.

WOLFF, J.E.; DENECKE, J.; JÜRGENS, H. Dexamethasone induces partial resistance to cisplatin in C6 glioma cells. **Anticancer Res.** v. 16, n. 2, p. 805-809, 1996.

WOLFF, J.E.; GUERIN, C.; LATERRA, J.; BRESSLER, J.; INDURTI, R.R.; BREM, H.; GOLDSTEIN, G.W. Dexamethasone reduces vascular density and plasminogen activator activity in 9L rat brain tumors. **Brain Res.** v. 604, n. 1-2, p.

79-85, 1993.

WOLFF, J.E.; MÖLENKAMP, G.; HOTFILDER, M.; LATERRA, J. Dexamethasone inhibits glioma-induced formation of capillary like structures in vitro and angiogenesis in vivo. **Klin. Padiatr.** v. 209, n. 4, p. 275-277, 1997.

YAMADA, K.; USHIO, Y.; HAYAKAWA, T.; KATO, A.; ARITA, N.; YAMADA, N.; MOGAMI, H. Effects of methylprednisolone on tumor-induced brain edema. **No To Shinkei.** v. 35, n. 7, p. 683-689, 1983.

ZIMMERMAN, M.H.; ARNOLD, H. Experimental brain tumors: I. Tumors produced with methylcholantrene. **Cancer Res.** v. 159, n. 2, p. 919-924, 1941.

# 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](#)