

CENTRO UNIVERSITÁRIO DO SUL DE MINAS - UNIS/MG

BIOMEDICINA

MONIQUE SILVA DE OLIVEIRA

STEFÂNIA QUÉSIA PETRIN

**ESTUDO DO CRESCIMENTO DO MELANOMA MURINO EM
CAMUNDONGOS C57BL/6 QUANDO DESAFIADOS POR DUAS VIAS
DE TRANSPLANTES CELULARES**

**Varginha
2006**

G16,994

0982E

xx-1

2006

EF

**MONIQUE SILVA DE OLIVEIRA
STEFÂNIA QUÉSIA PETRIN**

*Câncer
Melanoma murino*

**ESTUDO DO CRESCIMENTO DO MELANOMA MURINO EM
CAMUNDONGOS C57BL/6 QUANDO DESAFIADOS POR DUAS VIAS
DE TRANSPLANTES CELULARES**

Monografia apresentada ao curso de
Biomedicina do Centro Universitário do
Sul de Minas – UNIS/MG, como
requisito para obtenção do grau de
bacharel, sob orientação da Prof.^a
Rosemairy L. Mendes.

**Varginha
2006**

FOLHA DE APROVAÇÃO
MONIQUE SILVA DE OLIVEIRA
STEFÂNIA QUÉSIA PETRIN

ESTUDO DO CRESCIMENTO DO MELANOMA MURINO EM
CAMUNDONGOS C57BL/6 QUANDO DESAFIADOS POR DUAS VIAS
DE TRANSPLANTES CELULARES

Monografia apresentada ao curso de biomedicina do Centro Universitário do Sul de Minas – UNIS/MG, como pré-requisito para obtenção do grau de bacharel pela Banca Examinadora composta pelos membros:

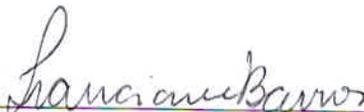
Aprovado – Conceito A B C

Reprovado

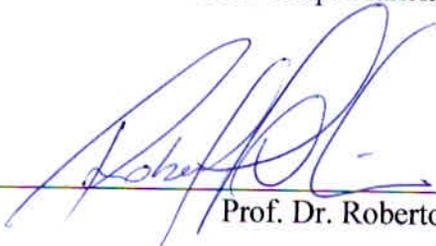
Data / /



Prof.^a Ms. Rosemary L. Mendes



Prof.^a Esp. Franciane Barros



Prof. Dr. Roberto Maciel

OBS.:

RESUMO

OLIVEIRA, Monique Silva de; PETRIN, Stefânia Quésia. **Estudo do crescimento do melanoma murino em camundongos C57BL/6 quando desafiados por duas vias de transplantes celulares.** 2006. 39f. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação)-Centro Universitário do Sul de Minas, Varginha, 2006.

Os cânceres, hoje, estão entre as causas de maior número de óbitos em todo o mundo. O melanoma maligno é uma neoplasia relativamente comum que, não há muito tempo, era considerada quase uniformemente fatal. O presente estudo visa observar a diferença no desenvolvimento do melanoma murino, assim como a sobrevivência dos animais quando utilizadas duas vias distintas de inoculação. O experimento consistiu na inoculação de células tumorais, as B16F10, pelas vias subcutânea e endovenosa, nos camundongos C57BL/6 objetivando analisar e verificar a diferença no desenvolvimento dos tumores subcutâneo e a formação de metástases pulmonares. Estudo baseia-se na injeção de células tumorais no dorso dos animais para que haja o desenvolvimento do tumor subcutâneo e no transplante, das mesmas, na veia da cauda dos camundongos para que ocorra a formação de metástases. Nas duas fases do experimento, os camundongos C57BL/6 separados em grupos receberam diferentes doses. Observou-se que a formação de tumores subcutâneos é dose-dependente, e que a sobrevivência dos animais está diretamente relacionada com a dose de células inoculadas. A presença de metástases nos pulmões ocorreu apenas nos pulmões, reforçando dados de literatura que mostram que a linhagem celular B16F10 quando inoculada na veia da cauda de camundongos C57BL/6 coloniza somente este órgão.

Palavras-chave: Melanoma. Subcutâneo. Metástases. Inoculação. C57BL/6. B16F10.

ABSTRACT

The cancers, today, are between the causes of bigger number of deaths in everybody. The malignant melanoma is a relatively common neoplasia that does not have much time, was considered almost uniformly fatal. The present study it aims at to observe the difference in the development of the murino melanoma, as well as the supervened one of the animals when used two distinct ways of inoculation. The experiment consisted of the inoculation of tumorais cells, B16F10, them ways, subcutaneous and endovenous; in mice C57BL/6 objectifying to analyze and to verify the difference in the pulmonary development of the tumors subcutaneous and formation of metastases. The study it is based on the injection of tumorais cells n the back of the animals so that it has the development of the sucutaneous tumors is dose-dependent, and that the supervened one of the animals directly is related with the dose of inoculated cells. The presence of metastases in the lung occurred only in the lung, strengthening given of literature that theyshow that cellular ancestry B16F10 when inoculated in the vein of the tail of mice C57BL/6 only colonizes this agency.

Keywords: Melanoma. Subcutaneous. Metastases. Inoculation. C57BL/6. B16F10.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Dimensões dos nódulos tumorais	25
Figura 2 - Camundongo C57BL/6 com tumor subcutâneo	26
Figura 3 - Crescimento tumoral subcutâneo	26
Figura 4 - Gráfico representativo do crescimento tumoral 10^5 células.....	27
Figura 5 - Gráfico com a representação do crescimento tumoral 10^4 células	28
Figura 6 - Gráfico representativo do crescimento tumoral 10^3 células.....	29
Figura 7 - Gráfico de curva de sobrevida dos animais	30
Figura 8 - Fotomicrografias comparativa	32
Figura 9 - Vista panorâmica de um corte de pulmão	33
Figura 10 - Corte histológico do pulmão do camundongo	34
Figura 11 - Corte pulmonar do camundongo	34
Figura 12 - Células tumorais no corte de pulmão de camundongo C57BL6	35

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	7
1 CÂNCER.....	9
2 METÁSTASES.....	11
2.1 Vias de disseminação.....	14
2.1.1 Vias linfáticas	14
2.1.2 Via sangüínea.....	14
2.1.3 Outras vias de disseminação	14
3 MELANOMA.....	16
4 CRESCIMENTO TUMORAL	19
4.1 Comportamento das células malignas <i>in vitro</i>	19
4.2 Biologia do crescimento tumoral.....	20
4.3 Angiogênese.....	20
4.4 Modelos experimentais.....	21
5 MATERIAL E MÉTODOS	22
5.1 Animais.....	22
5.2 Células B16F10.....	22
5.3 Tripsinização.....	22
5.4 Contagem do número de células viáveis.....	23
5.5 Transplante primário com a linhagem tumoral B16F10.....	23
5.5.1 Transplante subcutâneo.....	23
5.5.2 Transplante endovenoso	24
5.6 Cálculo do volume tumoral.....	24
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
6.1 Implantação subcutânea.....	26
6.1.1 Concentração celular 10^5	27
6.1.2 Concentração celular 10^4	27
6.1.3 Concentração 10^3	28
6.2 Implantação endovenosa – modelo de metástase	31
CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS.....	37

INTRODUÇÃO

Um conjunto de mais de cem tipos de doenças recebem o nome de câncer ou tumores malignos, pois apresenta em comum o crescimento celular autônomo e a capacidade de invadir órgãos e tecidos. Estas mesmas células podem espalhar-se para outras regiões do corpo, caracterizando as metástases.

O melanoma é um câncer derivado dos melanócitos, que são as células produtoras de melanina, substância responsável, por exemplo, pela determinação da cor da pele. Os fatores de risco para o desenvolvimento deste câncer são: a pele clara, a exposição excessiva ao sol, a história prévia de câncer de pele, história familiar de nevo congênito, idade (após os 15 anos as chances para este tipo de câncer aumentam), xeroderma pigmentoso (doença congênita que se caracteriza pela total intolerância ao sol, onde ocorrem queimaduras externas e tumores múltiplos) e nevo displásico (lesões escuras de pele com alterações celulares pré-cancerosas). A prevenção pode ser feita evitando-se exposição excessiva ao sol e o uso de protetor solar. O sucesso da terapia contra o melanoma depende do estágio em que este foi detectado.

Apesar de o melanoma representar 4% do número total de cânceres, segundo dados do Instituto do Câncer, o INCA, 2006, ele apresenta um alto grau de metastatização e conseqüentemente grande parte dos acometidos podem ser levados a óbito. Pelo exposto, percebeu-se a importância de entender e conhecer melhor como ocorre o desenvolvimento dos tumores malignos do tipo melanoma.

Este estudo avaliou a diferença no desenvolvimento do melanoma murino, bem como na sobrevivência dos animais, quando utilizadas duas vias distintas de transplantes das células tumorais. Os cânceres, hoje em dia, estão entre as causas de maior número de óbitos no mundo inteiro. Trata-se de um assunto de interesse geral e, além disso, os procedimentos experimentais são de realização relativamente simples, além de adequar-se a realidade de pesquisa da instituição onde se realiza.

A realização desta pesquisa justificou-se pela possibilidade de tentar conhecer e entender melhor como ocorre o processo de crescimento e metastatização do melanoma, no modelo murino C57BL/6.

O objetivo geral do estudo foi avaliar a biologia tumoral, para compreender o crescimento do tumor quando camundongos C57BL/6 são desafiados pelas células tumorais

por duas vias de inoculação distintas. Os objetivos específicos foram avaliar as possíveis diferenças no crescimento do melanoma murino, B16F10 *in vivo* e verificar a taxa de sobrevida dos animais e sítios preferenciais de metástases quando desafiados por vias distintas de transplantes de células malignas, subcutânea e endovenosa.

1 CÂNCER

O termo neoplasia (*neo*; novo e *plasis*; crescimento) significa literalmente crescimento novo. O termo tumor foi originalmente aplicado ao intumescimento causado pela inflamação. As neoplasias também podem induzir intumescimentos; entretanto, com o decorrer do tempo, o uso não neoplásico do termo tumor foi abandonado, de modo que, na atualidade, o termo é sinônimo de neoplasia (Cotran, 2000). A palavra câncer é o termo comum utilizado para referir-se a todos os tumores malignos. Embora as origens antigas deste termo sejam um tanto incertas, eles, provavelmente, derivam do latim caranguejo, presumivelmente pelo fato de um câncer aderir a qualquer parte e agarrar-se de modo obstinado como um caranguejo. Dentre os vários tipos de câncer o melanoma representa apenas 4%, mas é considerado muito grave devido à sua alta capacidade de metastatização (AZEVEDO, 1992; COTRAN, 2000; CRIADO, 1999; PINHEIRO, 2003; SAAD-HOSSNE, 2004).

Uma característica fundamental das neoplasias é a capacidade das células tumorais proliferarem autonomamente, em oposição ao que ocorre com todos os tipos celulares normais. O controle da replicação celular é mantido por um sistema bastante integrado e complexo, sendo vários genes responsáveis pela manutenção do controle da proliferação celular em condições normais, que mantêm os níveis homeostáticos normais nas populações celulares. É justamente este controle que as células neoplásicas perdem e conseqüentemente tem sua multiplicação acelerada (GREEN, 1994; MANOLIDIS, 1997).

Outra importante característica das células tumorais é a perda da adesividade, o que permite sua disseminação por todo organismo. A terceira e importante característica neoplásica é o crescimento infiltrativo o que praticamente impossibilita a definição dos limites tumorais. A capacidade de infiltrar tecidos adjacentes, que em última análise irá proporcionar a formação de metástases (crescimento secundário), é devido a menor adesividade, entre a célula-célula e célula-matriz extracelular, modificação no citoesqueleto e perda da inibição por contato apresentado pelas células cancerosas (DAMATO, 2001; GREEN, 1994; MANOLIDIS, 1997).

A perda da adesividade e a capacidade de infiltração estão diretamente associadas. As células tumorais são menos exigentes que as células normais, ou seja, devido a alterações gênicas na carcinogênese as células tumorais captam aminoácidos e realizam a glicólise com

maior eficiência e rapidez que as células normais. Esta perda da adesividade é devida aos seguintes mecanismos: 1) modificações e irregularidades na membrana plasmática; 2) diminuição ou ausência de estruturas juncionais; 3) redução de moléculas de adesão entre células, como as caderinas; 4) diminuição da fibronectina, que fixa as células ao interstício; 5) grande eletronegatividade na face externa da membrana plasmática, aumentando a repulsão eletrostática entre as células; 6) diminuição dos íons Ca^{++} nas células, que, em condições normais, atuam neutralizando as cargas negativas; 7) liberação de enzimas proteolíticas que alteram o glicocálice; 8) irregularidades nas microvilosidades, que diminuem o contato entre as células; 9) aumento do ácido siálico nas proteínas da membrana plasmática, que diminui a adesividade das células ao colágeno e a fibronectina (COTRAN, 2000).

Devido a estas características é que a remoção dos tumores na maioria das vezes consiste também na remoção de áreas adjacentes ao tumor, regiões onde não estão presentes as células tumorais, mas por estarem localizadas próximas ao local dos tumores são retiradas para maior segurança, mas esta remoção não impede que haja uma recidiva tumoral (CARMICHAEL, 1992).

Segundo estimativa do Instituto do câncer do Rio de Janeiro (INCA, 2006), somente no estado de Minas Gerais surge cerca de 22.350 novos casos em homens e 22.660 em mulheres, por ano. Existem vários grupos de pesquisa sobre o câncer, porém, ainda há muito a se descobrir para se alcançar um aumento na taxa de sobrevivência dos pacientes, e terapias mais eficazes e menos prejudiciais para aumentar a qualidade de vida do paciente.

2 METÁSTASES

A fundamental característica que distingue um tumor maligno do benigno é o poder de disseminação e de formar metástases. As metástases são importante causa de morte do indivíduo canceroso, apesar dos enormes progressos alcançados na terapêutica do câncer. O poder de disseminação das células e a capacidade de originar novas colônias estão interligados, embora nem sempre isto implique metastatização. Trata-se de processos sucessivos, só ocorrendo metástase depois de ter havido invasão, embora esta possa começar precocemente. Metástase é, com certeza, o selo definitivo de malignidade e um sinal de mau prognóstico. Quando surgem metástases, quase sempre o tumor é incurável. Em muitos pacientes, a primeira manifestação clínica de um câncer está relacionada com suas metástases (CHAMMAS, 1997; WAGMAN, 1993).

O processo complexo de formação de metástases depende de inúmeras interações entre as células malignas e componentes dos tecidos normais do hospedeiro, especialmente do estroma. Ela envolve: deslocamento das células da massa tumoral original, deslocamento dessas células através da matriz extracelular, invasão de vasos linfáticos ou sanguíneos, sobrevivência das células na circulação, adesão ao endotélio vascular no órgão aonde irão se instalar, saída dos vasos nesse órgão, proliferação no órgão invadido e indução de vasos para o suprimento sanguíneo de novas colônias. Esses processos ou etapas dependem de alterações na expressão de oncogenes e genes supressores de tumor e de sinais gerados no estroma, não só o tumor com também do órgão onde a metástase se instala. Entre as células existentes em uma neoplasia, somente aquelas que desenvolvem essas propriedades podem ter chance de originar metástases (CHAMMAS, 1997; DOCI, 1991; WAGMAN, 1993).

O deslocamento das células tumorais da massa principal ocorre por duas razões: 1) os sinais que induzem a proliferação celular em geral inibem as ligações mediadas pelas caderinas. Ativação dos receptores de fatores de crescimento induz modificações em proteínas que se refletem na conformação espacial das caderinas, facilitando a perda da adesividade entre as células. Além disso, após a mitose a persistência do estímulo sobre os receptores para fatores de crescimento mantém as modificações nas proteínas associadas às caderinas, dificultando o rearranjo da união homotípicadas (entre as caderinas) nas células proliferadas; 2) durante a progressão da neoplasia são produzidos fatores de crescimento que alteram a

diferenciação, prejudicando o desenvolvimento de estruturas de adesão celular (COTRAN, 2000; EVANS, 1992;).

A locomoção, orientada por fatores quimiotáticos na célula tumoral, pode se originar: a) na própria célula cancerosa; b) no estroma, a partir da degradação de componentes da matriz; c) em células do estroma, que produzem quimiocinas diversas que podem encontrar receptores nas células tumorais e orientar a sua movimentação. A destruição enzimática da matriz e as modificações nela induzidas por ação das células tumorais sobre as células do estroma facilitam o deslocamento das células tumorais (FOSTER, 1998).

As células malignas precisam se locomover ativamente para sua migração através da membrana basal, do conjuntivo intersticial e da parede dos vasos, este processo é favorecido pela ação de enzimas hidrolíticas do grupo das metaloproteases que desestruturam a rede de macromoléculas presentes no caminho. Tais enzimas são produzidas pelas próprias células tumorais ou por células normais induzidas pelas células malignas (FOSTER, 1998).

A membrana basal consiste a primeira barreira que a célula maligna encontra. Para transpô-la, as células neoplásicas secretam colagenase IV, havendo correlação entre a quantidade dessa enzima e a capacidade de originar metástases. Agentes que inibem especificamente a colagenase IV ou bloqueiam sua síntese reduzem a invasão celular *in vitro* (BRASILEIRO FILHO, 2003).

A invasão dos vasos sanguíneos ou linfáticos, que vencem a barreira basal, ocorre quando as células malignas penetram na luz dos mesmos, especialmente nos capilares e vênulas de parede mais fina. Os brotos de células tumorais podem, então, crescer na luz e soltar células isoladas ou grupos de células que formam êmbolos tumorais facilmente observados nos preparos histológicos rotineiros dos órgãos de pacientes com tumores em fase avançada. Os vasos linfáticos são facilmente permeáveis por terem parede mais fina. Como a angiogênese no tumor é intensa, são observados vasos neoformados de parede fina que têm células tumorais participando com o endotélio no forramento da luz vascular, fenômeno que deve facilitar a penetração das células na circulação desde as fases mais precoces de evolução da neoplasia (BRASILEIRO FILHO, 2003; EVANS, 1992).

Ao cair na circulação, às células neoplásicas precisam se evadir dos mecanismos de defesa inatos e adaptativos representados por anticorpos, células citotóxicas naturais (T CD8+) e macrófagos. Os subclones que desenvolvem essa capacidade sobrevivem e têm

chance de aderir ao endotélio nos vasos sanguíneos do órgão-alvo (BRASILEIRO FILHO, 2003).

A ação de quimiotáticos produzidos no estroma do órgão-alvo ou no próprio endotélio vascular é responsável pela transmigração ou diapedese da célula cancerosas. Uma vez atravessada a parede, a última etapa do processo de metastatização é o crescimento secundário no novo local. Para isso, as células neoplásicas necessitam continuar sua atividade proliferativa para formar uma nova colônia, o que depende de fatores de crescimento existentes no órgão-alvo e da capacidade da célula neoplásica de induzir angiogênese. Se esta não acontece, as células neoplásicas proliferam, mas a metástase não cresce, porque não há desenvolvimento de vasos sanguíneos necessários para suprir a nova colônia; nesse caso, há equilíbrio entre as células proliferadas e mortas, e a metástase não se desenvolve. Micrometástases podem permanecer dormentes por muito tempo e voltar a crescer quando a capacidade angiogênica é estabelecida, às vezes anos depois da retirada do tumor primitivo (SANTOS, 2003).

De acordo com estudos experimentais, a imensa maioria das células cancerosas na circulação morre por fatores diversos, principalmente em consequência da resposta imunitária do hospedeiro, da defesa não-imunitária e do choque mecânico que sofrem com a parede vascular. A sobrevivência das células nos vasos é, pois, um elemento muito importante no aparecimento das metástases. Experimentalmente, logo após injeção intravascular, células capazes ou incapazes de originar metástases são encontradas nos pulmões: três dias depois, porém, somente as células potencialmente metastatizantes sobrevivem, enquanto as outras são destruídas. A sobrevivência das células neoplásicas na circulação é maior quando formam agregados entre si e com plaquetas, linfócitos e fibrina. A capacidade das células tumorais de formarem agregados depende de componentes de sua superfície e lhes confere vantagem em termos de potencial metastático. Trombocitopenia ou tratamento com heparina, por exemplo, reduzem o número de metástases experimentais. Outro fator para a sobrevivência das células malignas na circulação é sua capacidade de deformação para atravessar a microcirculação. Drogas que desestruturam o citoesqueleto modificam a deformabilidade celular e alteram seu poder de originar metástases (BRASILEIRO FILHO, 2003; COTRAN, 2000; MARBACK, 1996).

2.1 Vias de disseminação

Qualquer tipo de câncer pode se disseminar por meio de diferentes vias.

2.1.1 Vias linfáticas

Como via de regra, metástases pulmonares surgem primariamente nos linfonodos do hilo pulmonar, e, somente após toda a cadeia linfonodal próxima estar comprometida é que ocorre o desenvolvimento de metástases em outros linfonodos. Sendo assim, o primeiro sitio de metástases é o linfonodo mais próximo da via de drenagem do tumor, mas esta situação apresenta algumas exceções. Em algumas ocasiões, os tumores desenvolvem-se em linfonodos não relacionados aos tumores, “saltando” o primeiro sitio de metástases (MARBACK, 1996; SOUZA, 1992).

2.1.2 Via sangüínea

O processo de metastatização não ocorre de forma aleatória e independente, são necessários estímulos quimiotáticos para o desencadeamento deste processo. As células precisam aderir ao endotélio de algum órgão e somente assim, então, tem início o processo de formação de metástases. É uma das vias que pode ser utilizada pelas células tumorais é a corrente sanguínea, uma vez que pode levá-las a qualquer parte do corpo (SOUZA, 2002).

Em vários tumores, as células neoplásicas chegam aos pulmões e começam a proliferar. E a partir deles, penetrando nas vias pulmonares, podem atingir todo o organismo (REYDI, 1992).

O número de células malignas que conseguem penetrar em um vaso sangüíneo é muito maior do que os números daquelas que originam metástases. Aliás, a presença de células malignas na circulação não indica obrigatoriamente a formação de metástases (REYDI, 1992).

2.1.3 Outras vias de disseminação

As células neoplásicas podem utilizar outras vias para disseminarem-se como ductos, canais ou até mesmo cavidades naturais existentes no corpo. Nas cavidades, o movimento dos líquidos corporais e das vísceras é capaz de deslocar as células e assim, possibilitar sua implantação em outros sítios (FOSTER, 1998).

A via peritoneal também é um meio de disseminação utilizada por tumores na busca de novos sítios de colonização. Portanto, tumores são capazes de utilizar as mais variadas vias de disseminação para desencadear o processo de metastatização (FOSTER, 1998).

Resumindo, a metástase é uma das propriedades mais importante das células maligna. Aliás, a maior gravidade do câncer depende fundamentalmente desse fato. As vias de disseminação podem ser diversas, e geralmente, o tumor secundário, se instala no órgão drenado mais próximo, como no caso dos linfonodos na via linfática e de órgãos bastante vascularizados na via sanguínea. Ao surgimento de metástases, geralmente, o tumor é tido como incurável e em muitos pacientes, a primeira manifestação clínica de um câncer está relacionada com suas metástases (FOSTER, 1998).

3 MELANOMA

O melanoma maligno é uma neoplasia relativamente comum que, não há muito tempo, era considerada quase uniformemente fatal. Embora a grande maioria dos melanomas tenha a sua origem na pele, outros locais de origem incluem a mucosa oral e anogenital, o esôfago, as meninges e, notavelmente, o olho (PINHEIRO, 2003).

Historicamente, a pigmentação da pele possui importantes implicações sociais. O desejo estético de uma pigmentação aumentada (bronzado) já produziu inúmeras alterações deletérias. A perda focal ou disseminada da pigmentação protetora normal não apenas torna os indivíduos extraordinariamente vulneráveis aos efeitos prejudiciais da luz solar, como também resulta em grave estresse emocional e, em algumas culturas, em profunda discriminação social e econômica (como no caso do vitiligo). A alteração na pigmentação preexistente da pele pode significar importantes eventos primários na pele (por exemplo, transformação maligna de um nevo) (COTRAN, 2000; MANOLIDIS, 1997; PINHEIRO, 2003; SOUZA, 1992).

Hoje em dia, em conseqüência da maior conscientização pública acerca dos primeiros sinais do melanoma cutâneo, a maioria dos casos é curada cirurgicamente. Entretanto, a incidência dessas lesões está aumentando, exigindo uma vigilância rigorosa quanto ao seu desenvolvimento (AZEVEDO, 1992; DAMATO, 2001; PINHEIRO, 2003).

A luz solar parece desempenhar um importante papel no desenvolvimento do melanoma maligno da pele. Todavia, a luz solar não parece constituir o único fator predisponente, e a presença de um nevo preexistente (exemplo: nevo displásico), fatores hereditários ou, até mesmo, a exposição a determinados carcinógenos podem desempenhar algum papel no desenvolvimento e na evolução da lesão. Os indivíduos de pigmentação clara apresentam maiores risco de desenvolver melanoma do que os indivíduos de pigmentação escura, a incidência ainda é maior em mulheres que em homens (AZEVEDO, 1992; COTRAN, 2000; DAMATO, 2001).

O diagnóstico precoce e a prevenção primária constituem as armas de maior importância para aumentar as taxas de sobrevivência da doença, pois a prevenção secundária ainda não dispõe de métodos tão eficazes. Os profissionais de saúde devem ser treinados para reconhecer as lesões suspeitas, que devem ser biopsiadas. Assim, pode-se esperar redução na incidência do melanoma e no índice de mortalidade em razão da doença (CRIADO, 1999).

O reconhecimento das lesões precursoras do melanoma cutâneo é de suma importância para sua prevenção e condução. A transformação de um nevo melanocítico congênito gigante em melanoma cutâneo é bem conhecida e normalmente ocorre durante os primeiros 20 anos de vida, com risco de, pelo menos, 6,3%. Assim sendo, sua excisão preventiva precoce é recomendada. O melanoma maligno de pele é habitualmente assintomático, embora o prurido possa constituir uma manifestação inicial. O sinal mais importante da doença consiste numa mudança de cor numa lesão pigmentada. Ao contrário dos nevos benignos (não-displásicos) os melanomas exibem notáveis variações na sua pigmentação, apresentando tonalidades de preto, castanho, vermelho, azul-escuro e cinza. Em certas ocasiões são também observadas zonas de hipopigmentação branca ou da cor da pele. As bordas dos melanomas não são lisas, arredondadas e uniformes, como aquelas nos nevos celulares, porém irregulares e freqüentemente “chanfradas”. Em resumo, os sinais clínicos de alerta do melanoma incluem: (1) aumento de nevo preexistente; (2) prurido ou dor em nevo preexistente; (3) desenvolvimento de uma nova lesão pigmentada durante a vida adulta; (4) irregularidade nas bordas de uma lesão pigmentada; e (5) coloração variegada numa lesão pigmentada (GREEN, 1994; MAIA, 2003).

Nos últimos 20 anos, o bronzeado através de lâmpadas de ultravioleta tem sido freqüente entre adolescentes e adultos jovens de pele clara. Estudos epidemiológicos realizados nos últimos 15 anos tendem a mostrar um risco aumentado de melanomas em usuários de camas de bronzeamento. Existem evidências acumuladas de que a utilização de camas de bronzeamento e a exposição à radiação solar estão associadas a um maior risco de melanoma, quando iniciada antes dos 30 anos de idade. Uma meta - análise recente confirma estes achados de que a utilização destas lâmpadas aumenta o risco de melanoma cutâneo (AZEVEDO, 1992; BAKOS, 2006; PINHEIRO, 2003).

Porém, a discussão continua grande, pois a UVA artificial também se pode somar ao de origem solar nem sempre bem registrado nos estudos clínicos. Um estudo prospectivo com usuários de fontes artificiais de bronzeamento poderá produzir melhores estimativas do uso de camas de bronzeamento, porém necessitaria da manutenção de diários precisos para registrar a exposição solar concomitante com absoluta precisão. Um estudo em larga escala com este delineamento será bastante dispendioso, muito trabalhoso e, no final, poderá resultar impraticável, por poder apresentar diversas informações (AZEVEDO, 1992; BAKOS, 2006).

Em seu estudo de 1999, Criado et al estudaram retrospectivamente a ocorrência do melanoma maligno cutâneo primário no Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo entre os anos de 1963 e 1997, objetivando analisar dados referentes a sua distribuição pela idade, sexo, raça, localização cutânea dentre outros fatores. Encontrou-se um predomínio de indivíduos brancos (98,19%) sobre negros (1,81%) e do sexo feminino (69,36%) sobre o masculino (30,63%). O sexo feminino é referido como sendo mais suscetível ao desenvolvimento de tumores cutâneos do tipo melanoma (Maia, 2003), sendo até mesmo considerado, por alguns autores, como fator de risco. A idade predominante encontrada foi entre 50 e 69 anos.

Em um estudo para verificar a relação entre o nevo melanocítico congênito pequeno e o melanoma cutâneo (Maia, 2003), dos pacientes com melanoma em estudo 21,6% resultaram da transformação de um nevo congênito melanocítico pequeno. Nenhum caso ocorreu antes dos vinte anos e não houve uma faixa etária preferencial de transformação. O nevo congênito melanocítico pequeno é precursor do melanoma cutâneo; a transformação, provavelmente, não ocorre antes da puberdade; o risco de transformação, após a puberdade, parece existir de forma homogênea por toda a vida. A sugestão, para evitar o aparecimento do melanoma é a excisão do nevo congênito antes no início da puberdade.

4 CRESCIMENTO TUMORAL

4.1 Comportamento das células malignas *in vitro*

Admite-se que as células possuam um tipo de “relógio” contador das reproduções já realizadas e das ainda possíveis. Células normais em cultura têm vida limitada, sendo capazes de realizar no máximo de 50-60 divisões. Essa capacidade é ainda mais reduzida com o envelhecimento do doador das células. Esse medidor está localizado no tamanho dos telômeros dos cromossomos que são longas seqüências repetitivas da subunidade TTAGGG e tendem a se encurtar a cada divisão celular. Nas células não transformadas, como a atividade basal da telomerase é baixa, o tamanho dos telômeros é progressivamente reduzido a cada ciclo reprodutivo. As células normais geralmente entram em senescência quando os telômeros são muito curtos; e quando são perdidos, as células morrem. Mas células malignas, a telomerase é expressa de forma exagerada, os telômeros não se encurtam e, com isso, não há esse mecanismo de envelhecimento celular. Ao lado da evasão da apoptose, a grande expressão da telomerase contribui para a imortalidade das células cancerosas (COTRAN, 2000; MARBACK, 1996).

Células normais em cultura multiplicam-se e locomovem-se em uma superfície até formarem uma monocamada e quando o estágio de confluência é atingido, cessa-se o seu crescimento e movimentação. Esse fenômeno recebe o nome de inibição por contato ou inibição dependente de densidade. Células malignas continuam se multiplicando mesmo atingindo esse estágio de confluência e passam a formar pilhas de células superpostas. As células normais crescem também bem aderidas à superfície do frasco de cultura e geralmente têm sua forma achatada. Células malignas são menos aderentes, desprendem-se com facilidade. Comparadas às células normais, as malignas requerem menor quantidade de soro no meio de cultura para manter seu crescimento, o que se deve à menor necessidade de fatores de crescimento. Além disso, células malignas podem sintetizar seus próprios fatores de crescimento (EVANS, 1992; WAGMAN, 1993).

Deve ainda ser considerada a independência de ancoragem das células malignas, visto que células normais necessitam de uma superfície sólida para crescerem, porém células cancerosas podem multiplicar em superfície gelatinosa, como o ágar mole. Aliás, o crescimento de células em meio semi-sólido é um dos melhores indicadores de transformação

celular, já que se correlaciona muito bem com a capacidade de originar tumores quando injetadas em animal atímico (EVANS, 1992; WAGMAN, 1993).

4.2 Biologia do crescimento tumoral

A formação de uma massa clonal pelos descendentes clonais de uma célula transformada constitui um complexo processo, influenciado por numerosos fatores. Alguns deles, como o tempo de duplicação das células tumorais, são intrínsecos às células tumorais, ao passo que outros, como a angiogênese, representam resposta do hospedeiro desencadeada pelas células tumorais ou seus produtos (FOSTER, 1998).

Em suma, o melanoma apesar de representar somente 4% dos tipos de câncer, é considerado muito grave devido a sua alta capacidade de disseminação. O sucesso da sua terapia está diretamente relacionado ao estágio em que ele é diagnosticado. Segundo o INCA para o ano de 2006 no Brasil estão previstos 2.710 novos casos em homens e 3.050 em mulheres. É necessário criar um senso comum a fim de conscientizar a população da importância do uso de protetor solar e de procurar auxílio médico aos primeiros sinais sugestivos da doença.

4.3 Angiogênese

A angiogênese nos tumores se faz por meio dos mesmos mecanismos da angiogênese que ocorre nos processos de cicatrização de feridas e nas inflamações. As células tumorais passam a produzir e excretar fatores angiogênicos, como fator de crescimento de fibroblasto (FGF), que atuam no endotélio dos capilares vizinhos induzindo sua proliferação, migração e diferenciação em novos capilares. A angiogênese é mais intensa e mais acelerada quando as células tumorais passam a produzir, por ativação de proteases da matriz, fatores de crescimento e diferenciação. A proliferação e a capacidade de deslocamento e invasão das células cancerosas também são influenciadas por esse fator de crescimento. Por essa razão, existe certa correlação entre a angiogênese e a malignidade: quanto maior a atividade angiogênica, maior é a potência de metastatização do câncer e mais rápida é a sua progressão. Fisiologicamente, este processo está presente no desenvolvimento embrionário e no crescimento ao longo dos primeiros anos. Na idade adulta observa-se no aparelho reprodutor

feminino em cada ciclo menstrual, na gravidez, na cicatrização de feridas e na seqüência de processos inflamatórios (CHAMMAS, 2003).

A angiogênese, ou o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos vem sendo considerado um alvo importante para a terapia anticâncer, já há 30 anos. Isto porque um tumor para crescer precisa de vascularização, ou seja, de vasos sanguíneos para nutri-lo (BRASILEIRO FILHO, 2003).

4.4 Modelos experimentais

Qualquer discussão a respeito do papel dos modelos animais em pesquisas biomédicas se inicia com algumas colocações básicas. A primeira, que é o principal objetivo das pesquisas, é entender os seres humanos e dessa forma gerar benefícios tanto para a qualidade de vida como para a prevenção e tratamento de doenças. A segunda é que se está em estágios iniciais de uma revolução genética que está acelerando o andamento das descobertas. Para que a revolução genética forneça os avanços esperados para se progredir na condição humana é necessária a existência de animais experimentais adequados (FAGUNDES, 2004; GODARD, 2004).

Existem três condições essenciais para que se tenha um modelo animal bem sucedido do ser humano. A primeira é a conservação evolutiva; o modelo deve ter sistemas genéticos e fisiológicos e um metabolismo que verdadeiramente se pareçam com as condições humanas. Segundo, ele deve ser um sistema tecnicamente conhecido e bem entendido, permitindo facilmente experimentos poderosos e diversificados. E, finalmente, ele deve ser praticamente exeqüível, barato e de fácil transporte de um laboratório para outro (GODARD, 2004).

As vantagens de se usar o camundongo como organismo modelo é devido às similaridades biológicas que o aproximam dos seres humanos, sendo ele um mamífero, muitas de suas vias metabólicas são similares ao homem. Além disso, estima-se que a homologia do DNA codificador entre estas duas espécies está compreendida entre 70 a 90%. Os camundongos têm um ciclo de vida relativamente curto, eles são prolíficos reprodutores e podem ser mantidos em laboratórios, permitindo, assim, um controle do meio ambiente, que é a principal contribuição deste modelo, pois em outros casos há dificuldade em se manter um controle ambiental em estudos de doenças humanas complexas (FAGUNDES, 2004; GODARD, 2004).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

O presente estudo utilizou a linhagem de camundongos C57BL/6, de seis semanas de idade provenientes do biotério da Universidade de São Paulo (USP). O motivo da escolha desta linhagem de camundongo se deve ao fato de se tratar de uma linhagem padrão para o estudo de melanoma e metástases, decorrentes desse tumor, por ser uma linhagem que desenvolveu espontaneamente o tumor, e de onde foram isoladas as células usadas, B16F10. Foram mantidos em temperatura controlada (24°C), com livre acesso a alimentação e água e ciclos claro/escuro de 12 horas.

5.2 Células B16F10

A linhagem de melanoma murino B16F10, singênica (geneticamente semelhantes aos animais) ao camundongo C57BL/6 proveniente do Instituto Ludwig de Pesquisa contra o Câncer, São Paulo, foi mantida *in vitro*.

Utilizou-se o meio de cultura RPMI (MOORE, 1969). Este meio utiliza um sistema de tamponamento com bicarbonato e concentrações modificadas de aminoácidos essenciais e vitaminas para estimular o crescimento celular. O meio foi suplementado com 10 % de soro fetal bovino, sendo acrescentados os antibióticos, penicilina e estreptomicina.

As culturas celulares foram mantidas a 5% de CO₂ e 37°C.

5.3 Tripsinização

Culturas de células subconfluentes, após descarte do meio de cultura, foram lavadas três vezes com PBS e incubadas a 37°C com solução de tampão fosfato (PBS)/ EDTA até que, sob observação microscópica, fosse detectada a dissociação das células entre si, e delas com o substrato. A reação de tripsinização foi interrompida pela adição de 5,0 ml de meio de cultura. A suspensão celular era então coletada em tubo de centrífuga e centrifugada a 1500 rpm, por 5 minutos, à temperatura ambiente. O meio sobrenadante era cuidadosamente descartado e as células ressuspensas em solução PBS. O procedimento de lavagem das células em PBS foi efetuado 3 vezes.

5.4 Contagem do número de células viáveis

As contagens das células viáveis foram efetuadas em hemocitômetro de Neubauer após o carregamento de ambas as câmaras com a suspensão celular, obtida por meio da tripsinização da cultura celular desejada. Para a determinação do número de células viáveis foi utilizado o teste de exclusão de corante, que consiste na incubação de uma alíquota de células com solução de Azul de Tripán a 0,1 % (diluição 1:1), por dez minutos a 37°C. Células hípidas excluem o corante. Para o cálculo da percentagem de células viáveis utilizou-se a fórmula:

$$\% \text{ de células viáveis} = \frac{\text{Número de células viáveis}}{\text{Número total de células totais}} \times 100$$

5.5 Transplante primário com a linhagem tumoral B16F10

O presente estudo caracterizou-se pela implantação de células malignas em camundongos por duas vias de transplantes celulares distintas.

O experimento foi dividido em duas etapas. A primeira etapa consistiu no transplante subcutâneo e a segunda no transplante endovenoso, onde diferentes dosagens de células B16F10 com 95-100% de viabilidade foram transplantadas nos animais C57BL/6, em suspensões de 100 µl, em solução tampão fosfato (PBS).

5.5.1 Transplante subcutâneo

Foram utilizados 15 animais C57BL/6, os quais foram divididos em quatro grupos. O grupo controle foi composto de três animais que receberam uma injeção de 100 µl de PBS, uma solução tampão usada como veículo para inocular as células tumorais nos diferentes grupos experimentais. Os doze animais restantes foram divididos em três grupos com quatro animais cada. O primeiro grupo de animais recebeu uma concentração celular de 10^3 , ou seja, cada camundongo recebeu 1000 células tumorais que foram ressuspensas em 100 µl de PBS. O segundo grupo recebeu 10^4 células, ou seja, cada camundongo recebeu 10.000 células

tumorais e o terceiro grupo recebeu a concentração celular de 10^5 , cada camundongo recebeu 100.000 células tumorais. Os animais foram monitorados diariamente para verificação do surgimento dos nódulos.

5.5.2 Transplante endovenoso

A segunda fase consistiu no transplante endovenoso das células tumorais pela veia lateral da cauda do camundongo para posterior verificação de metástases. Nesta etapa foram injetadas diferentes concentrações de células B16F10 na veia da cauda dos camundongos, divididos em grupos de três animais. O grupo controle composto por dois animais recebeu 100 µl de solução de PBS na veia da cauda. Três animais receberam 10^3 células (ressuspensas em 100 µl de PBS), três receberam 10^4 células e dois formaram o grupo que recebeu 10^5 células. A viabilidade celular foi verificada pelo método de exclusão do Azul de Tripán. Após doze dias do transplante, os camundongos foram sacrificados e órgãos como os pulmões, fígado e testículos foram analisados inicialmente com o auxílio de uma lupa Champion, fixados em formalina 10% e gentilmente processados para a análise microscópica na UNIFRAN.

5.6 Cálculo do volume tumoral

As dimensões do tumor subcutâneo foram obtidas utilizando-se um paquímetro (Figura 1). O cálculo do volume tumoral realizado, baseou-se em um provável crescimento elipsóide do tumor, com um diâmetro menor (D_1) que se repete em duas dimensões, e um eixo maior (D_2), utilizando-se a seguinte fórmula: $V = (D_1)^2 \times D_2 / 1000 \times 0,52$ (MORAES, 2000; TAYEK, 1986).



Figura 1 – As dimensões dos nódulos tumorais foram medidos utilizando-se o paquímetro

Os animais foram verificados a cada 24h. Os volumes tumorais obtidos foram posteriormente plotados numa curva (volume tumoral versus tempo).

Quando o volume tumoral atingia um valor pré-determinado (2000 mm^3), o animal era sacrificado evitando-se maior sofrimento ao animal. Esse volume tumoral é preconizado pelos Comitês de Ética em Pesquisa.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Implantação subcutânea

Os animais dos grupos experimentais receberam diferentes dosagens de células subcutaneamente. O primeiro nódulo perceptível apareceu no 17º dia após a implantação das células no grupo que recebeu 10^5 células. As figuras 2 e 3 apresentam o aspecto macroscópico do melanoma crescido subcutaneamente em camundongo C57BL/6.

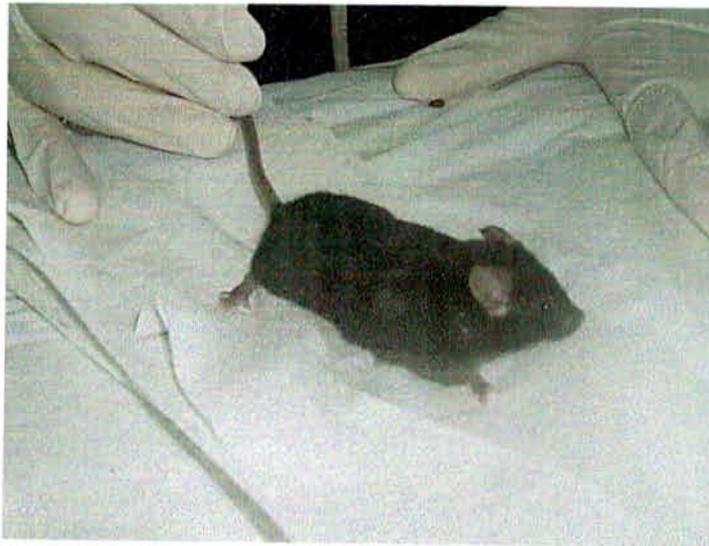


Figura 2 – Camundongo C57BL/6 (grupo 10^5) com tumor subcutâneo ao 17º dia de experimento.



Figura 3 – Crescimento tumoral subcutâneo. A massa tumoral apontada pelo bisturi corresponde ao tumor desenvolvido por um animal pertencente ao grupo 10^5 decorridos 22 dias da implantação.

6.1.1 Concentração celular 10^5

Decorridos dezessete dias do implante subcutâneo foram verificados o aparecimento dos primeiros nódulos no dorso dos camundongos que receberam a concentração de 10^5 células. A partir do vigésimo primeiro dia após a implantação das células foi possível a medição dos tumores (Figura 1). Estes continuaram sendo monitorados diariamente até atingirem um volume de 2000mm^3 (Figura 3). Após os tumores atingirem este volume (o que ocorreu vinte e quatro horas após o surgimento do nódulo), os animais foram sacrificados para evitar maiores sofrimentos aos camundongos. Um dos camundongos deste grupo experimental (camundongo 4) morreu no vigésimo primeiro dia após a implantação (provavelmente em decorrência do tumor). A figura 4 apresenta o crescimento tumoral subcutâneo dos animais que receberam 10^5 células em um gráfico, onde foram plotados o volume tumoral em função do tempo de crescimento dos tumores.

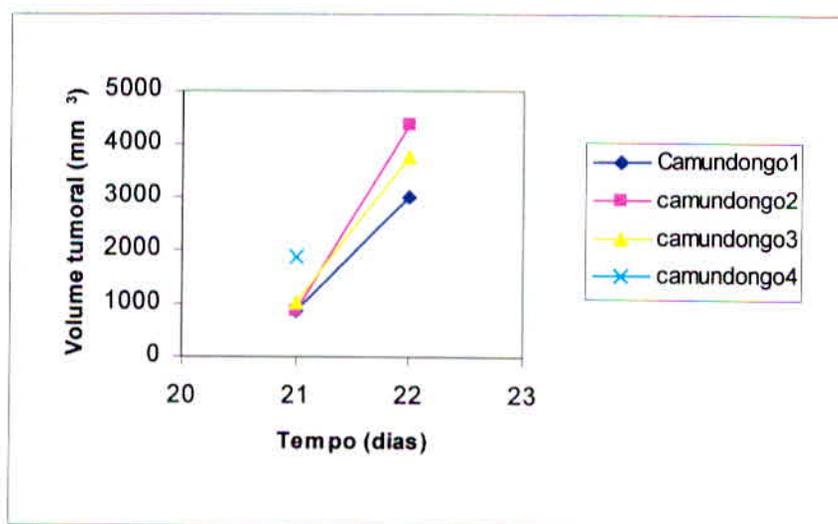


Figura 4 - Gráfico representativo do crescimento tumoral dos camundongos que foram inoculados com 10^5 células subcutaneamente

6.1.2 Concentração celular 10^4

Dos quatro camundongos que receberam subcutaneamente as concentrações de 10^4 células, apenas dois desenvolveram o tumor. O camundongo 1 desenvolveu o tumor após 35 dias da inoculação e teve uma sobrevida de quatro dias. O segundo camundongo desenvolveu o tumor somente no 49º dia sobrevivendo durante sete dias. Cada animal desenvolveu apenas

um tumor. Ambos os animais foram sacrificados quando os volumes tumorais atingiram 2000 mm^3 . Esta diferença no tempo de surgimento dos tumores, bem como o não desenvolvimento tumoral pode ser devida à resposta individual de cada organismo, sendo um mais susceptível que o outro. Os organismos dos animais podem ter se mobilizado e montado uma resposta imune protetora que, no caso dos que desenvolveram o tumor, foi capaz de retardar o surgimento do mesmo e daqueles que não desenvolveram o tumor foi capaz de impedir o desenvolvimento tumoral até o final do experimento (60 dias após a inoculação). Uma menor dose de células tumorais inoculadas, quando comparada ao grupo que recebeu 10^5 células, pode ter permitido ao sistema imunológico dos camundongos se organizarem e preparar a resposta protetora (ANDRADE, 2000; FREITAS, 2004).

A figura 5 apresenta o crescimento tumoral subcutâneo dos animais que receberam 10^4 células em gráfico. É mostrada a relação entre o volume tumoral em função do tempo de crescimento dos tumores.

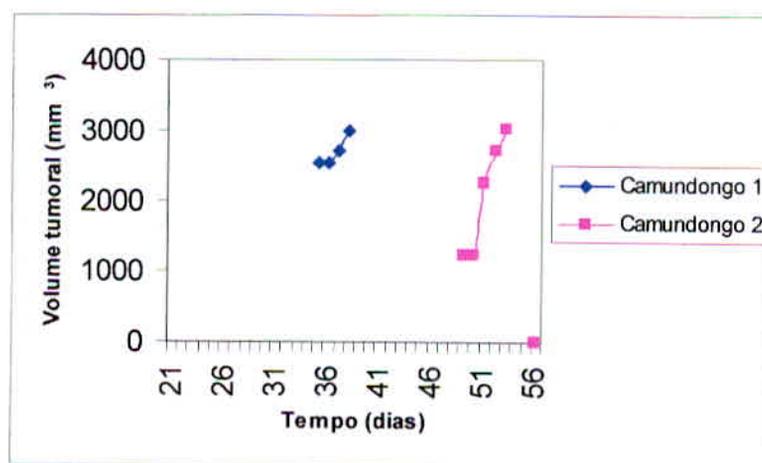


Figura 5 - Gráfico com a representação do crescimento tumoral dos camundongos que foram inoculados com 10^4 células subcutaneamente

6.1.3 Concentração 10^3

Dos quatro animais que receberam 10^3 células tumorais, apenas um desenvolveu tumor, o que ocorreu no 35º dia após o transplante. Este animal sobreviveu por apenas um dia, sendo sacrificado no 36º dia quando ultrapassou o volume tumoral máximo. Este fato ocorreu possivelmente devido à dose de células ser menor. O organismo dos outros três animais pode bloquear o crescimento dos tumores o que explica também a demora no desenvolvimento tumoral ocorrido em apenas um animal. O organismo utiliza todas as formas para inibir o

desenvolvimento dos tumores, como por exemplo, processos inflamatórios. A figura 6 traz um gráfico que apresenta o crescimento tumoral subcutâneo do animal do grupo que recebeu 10^3 células e desenvolveu o tumor. Foram plotados o volume tumoral em função do tempo de crescimento.

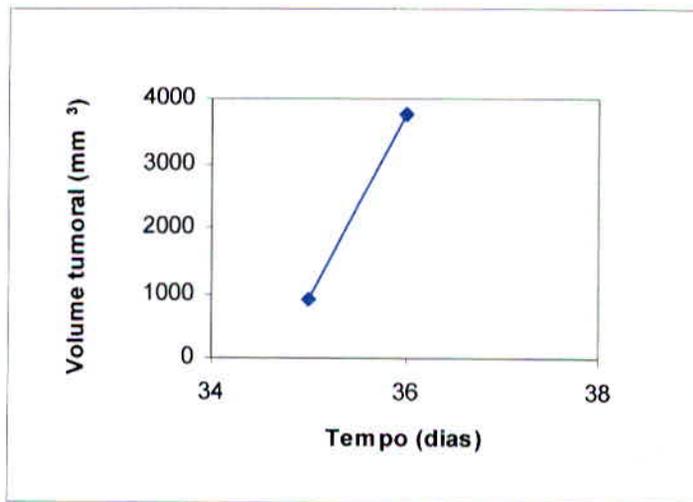


Figura 6 - Gráfico representativo do crescimento tumoral do camundongo que apresentou um crescimento tumoral no grupo experimental dos animais que foram inoculados subcutaneamente com 10^3 células

A figura abaixo compara a sobrevivência dos animais com as diferentes concentrações de células tumorais. No gráfico o eixo X está representado o tempo, em dias, a partir do momento em que as células foram inoculadas. O eixo Y mostra a porcentagem de sobrevivência das populações de cada grupo no decorrer dos dias. A curva representada na coloração rosa mostra a taxa de sobrevivência dos animais que receberam a concentração de 10^3 células. Pode-se verificar a morte do único animal do grupo a desenvolver o tumor trinta e nove dias após a inoculação das células. Sendo assim, ao final do experimento (60 dias após a inoculação) tem-se uma sobrevivência de 75% da população experimental, ou seja, três animais. A curva amarela representa a porcentagem de sobrevivência dos animais que receberam a concentração de 10^4 células onde se verifica a morte do primeiro animal ao 35º dia e o segundo animal aos 56 dias. Ao final do experimento o grupo que recebeu 10^4 células teve uma sobrevivência de 50%. A curva azul mostra o grupo de animais que recebeu 10^5 células, as perdas dos animais começaram mais cedo. O primeiro animal morreu após 21 dias da inoculação e com apenas 26 dias do experimento, todos já haviam atingido o volume máximo tumoral e, portanto, foram

sacrificados. A curva representada em azul mostra a sobrevivência do grupo controle durante o experimento, onde verifica-se que os quatro animais permaneceram vivos até o final do mesmo.

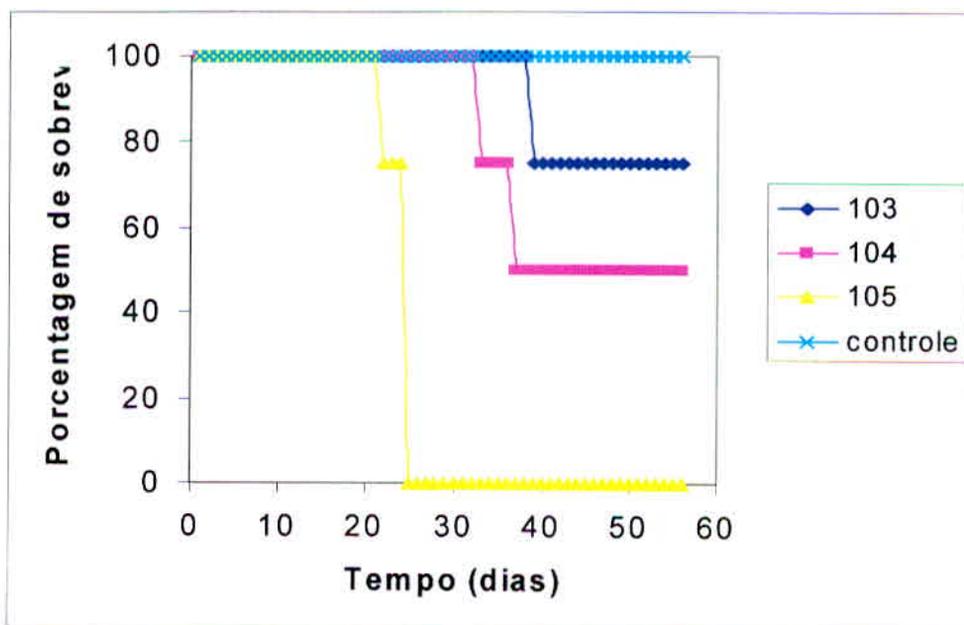


Figura 7 – Gráfico de curva de sobrevivência dos animais experimentais inoculados subcutaneamente com as células tumorais B16F10 e do grupo controle

Observando-se o surgimento de tumores nos grupos experimentais, observou-se que todos (100%) os animais do grupo que recebeu 10^5 células, metade (50%) dos animais do grupo 10^4 e apenas um animal (25%) do grupo de 10^3 apresentaram crescimento tumoral.

Analisando estes resultados pode-se propor que o crescimento tumoral é dose-dependente, ou seja, quanto maior a dose celular injetada maior é a susceptibilidade dos animais ao desenvolvimento do tumor e menor a sobrevivência, assim, quanto maior a dosagem de células iniciais, mais rápido o crescimento tumoral e maior índice de morte dos animais (figura 7). Resultados semelhantes foram obtidos por Andrade (2000) que usou o mesmo modelo de estudo. Estes resultados corroboram com os obtidos, por Fagundes e colaboradores em 2004; CRIADO, 1999; GODARD, 2000; GOLDIM, 2000, que sugeriram que este modelo animal trata-se de padrão para estudo do melanoma, por ser uma espécie com pré-disposição ao desenvolvimento de tumores, e que quanto maior a dose de células tumorais injetadas maior a chance de ele desenvolver o tumor.

6.2 Implantação endovenosa – modelo de metástase

Na segunda parte dos experimentos, foram injetadas diferentes concentrações de células endovenosamente, pela veia lateral da cauda dos animais. Essa metodologia é utilizada para induzir experimentalmente metástases tumorais pulmonares. Passados 12 dias da inoculação, todos os animais foram sacrificados e os pulmões, o fígado e os testículos foram excisados. Após a excisão, os pulmões e os demais órgãos foram analisados macroscopicamente, a olho nu e com auxílio de lupa, em busca de nódulos metastáticos que podem apresentar tanto um aspecto melanótico (apresenta cor castanho-escuro a preta, como resultado da produção de melanina pelas células tumorais) quanto amelanótico (apresenta cor branca, possivelmente pela não produção de melanina pelas células tumorais). Observou-se que os dois animais do grupo 10^5 apresentavam nódulos amelanóticos perceptíveis a olho nu.

Os pulmões, após a análise macroscópica, assim como os fígados e os testículos foram fixados em formalina 10% e gentilmente processados para a análise microscópica na UNIFRAN.

Na análise microscópica dos fígados e testículos, não foram observadas alterações celulares e/ou teciduais compatíveis com metástase quando comparados os órgãos dos animais dos grupos experimentais (independentemente das doses injetadas) com os animais do grupo controle. Esse resultado está de acordo com o que tem sido publicado (Oliveira Filho, 1997). Na figura 8, estão apresentadas fotos dos cortes histológicos obtidos dos pulmões, fígados e testículos dos animais controle e dos grupos experimentais.

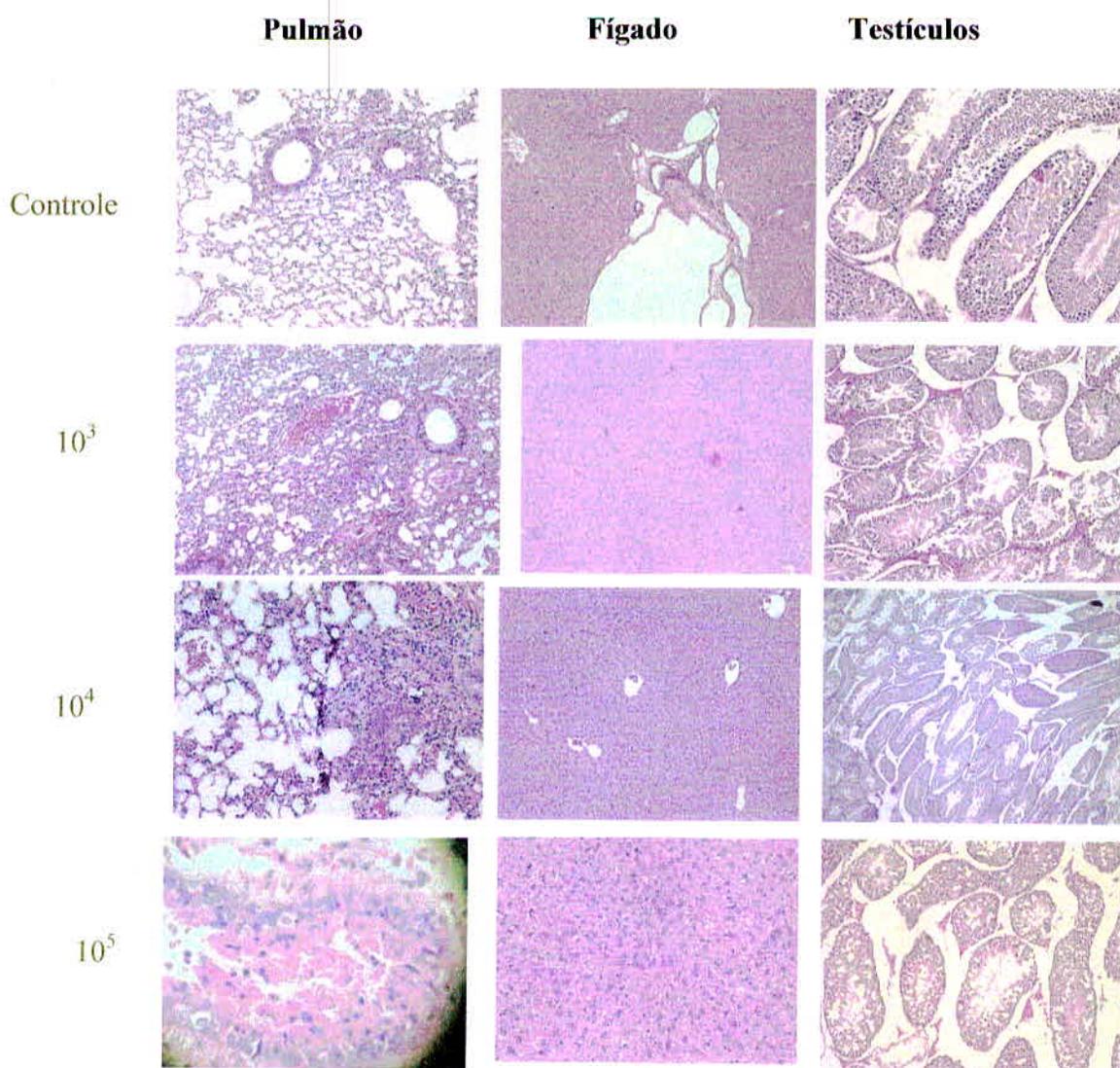


Figura 8 - Fotomicrografias comparativa dos cortes histológicos obtidos dos fígados e testículos dos animais controle e dos grupos experimentais. O aumento de todas as fotos é de 10X, exceto a foto do pulmão de concentração de células 10^5 que está em aumento de 400X. Coloração por H&E.

De acordo com a Figura 8, podemos comparar os órgãos do grupo controle com os demais animais. Verificamos a presença de metástases nos pulmões dos camundongos que receberam as células neoplásicas nas três concentrações, enquanto que nos demais órgãos não houve o aparecimento de metástases. Este fato comprovou que neste modelo experimental só há o surgimento de metástases nos pulmões enquanto os outros órgãos permanecem intactos, isto pode ter acontecido devido à aderência das células cancerosas ao endotélio vascular do órgão onde a metástase se forma. O mecanismo se faz da seguinte maneira: de um lado, as células tumorais aumentam a exposição de glicoproteínas ricas em resíduos de carboidratos,

que permitem a adesão às selectinas do endotélio; também expressam integrinas capazes de interagir com moléculas específicas do endotélio onde irão se instalar. Por esta razão a metástase se instala em um órgão e não em outros, o processo dependerá da sua compatibilidade com os órgãos. No caso do presente estudo os determinantes antigênicos das células pulmonares dos camundongos são semelhantes aos das células tumorais, o que provavelmente não acontece com outros órgãos como os testículos e fígado, que permaneceram intactos.

Esse resultado coincide com o observado por Oliveira Filho e colaboradores, em seu experimento realizado no ano de 1997 que comprovou que as células B16F10 colonizam os pulmões de camundongos C57BL/6 quando injetadas intravenosamente. O número de colônias do pulmão é uma medida potencial de metástase das células injetadas.

A Figura 9 mostra um corte de pulmão normal (grupo controle), onde se observa elementos normais do órgão.

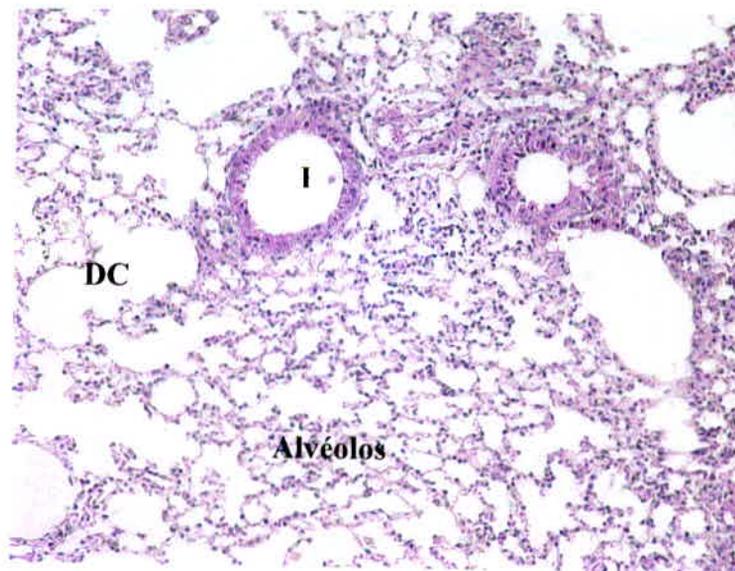


Figura 9 - Vista panorâmica de um corte de pulmão (grupo controle) onde se observa um ducto alveolar (DC), alvéolos e bronquíolos (B). Aumento de 10X. H&E.

A foto abaixo (Figura 10) mostra um corte histológico do pulmão de um dos animais que recebeu 10^3 células endovenosamente, no detalhe há um vaso com células em processo de marginação sugerindo a tentativa dessas células de realizar diapedese e atuar no tecido. Verifica-se também algumas células já no tecido o que sugere uma mobilização do organismo na tentativa de atacar possivelmente as células tumorais implantadas nos camundongos.

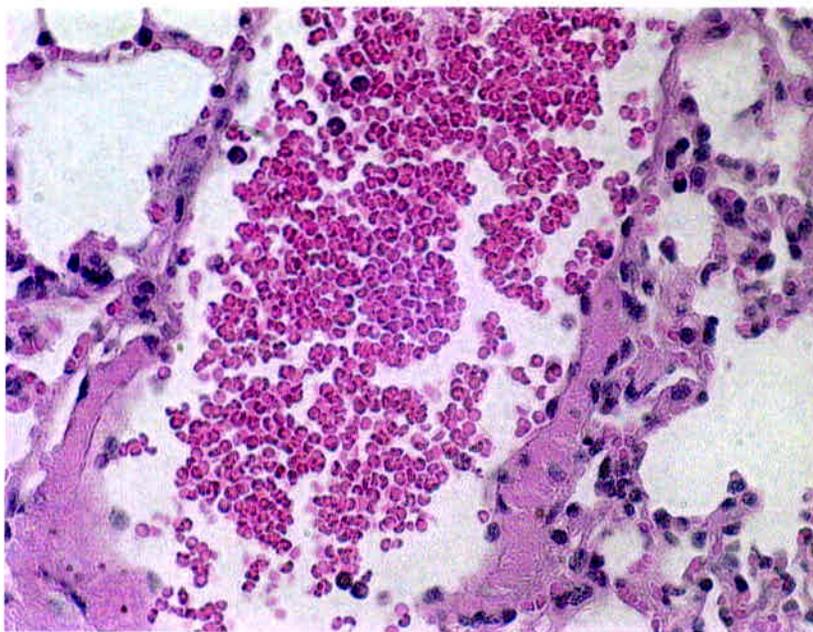


Figura 10 - Corte histológico do pulmão do camundongo do grupo 10^3 . Detalhe de um vaso. Aumento de 20X. H&E

O grupo que recebeu 10^4 células apresentou grande massa de células tumorais no parênquima pulmonar, conforme pode ser evidenciado na figura 11.

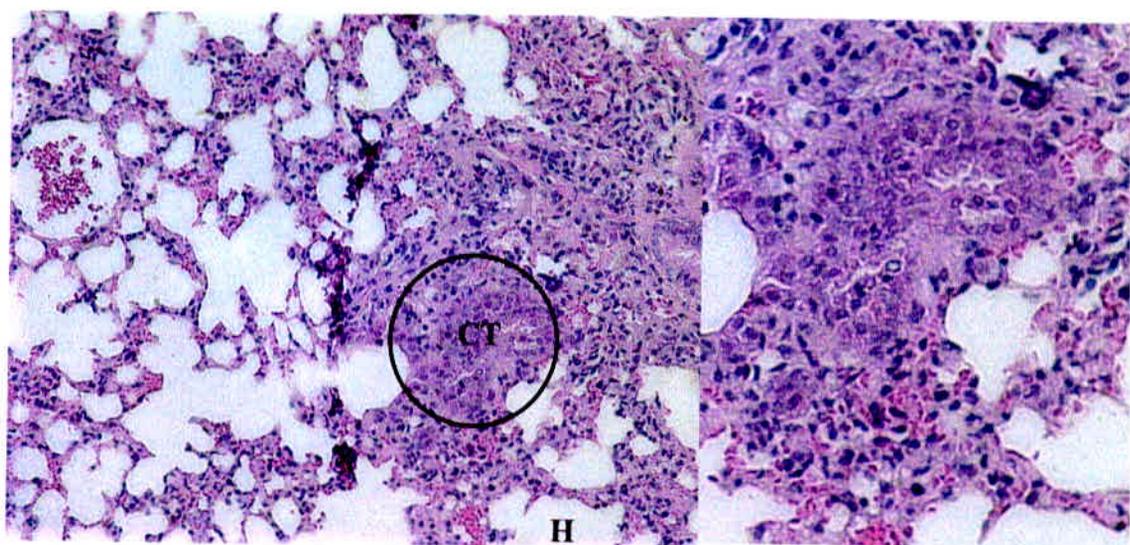


Figura 11 A e B - Em A - Corte pulmonar (12,5X) evidenciando uma grande massa de células tumorais (CT) no parênquima do órgão (delimitado na figura). Pode-se observar extensa área hemorrágica (H) e vaso hiperemiado. B - Detalhe da massa de células tumorais.

A análise dos cortes de pulmão do grupo de camundongos que recebeu 10^5 células endovenosamente apresentou grande concentração de células tumorais, evidenciadas por diferenças tintoriais e relação núcleo/citoplasma alterada, onde o núcleo ocupa quase todo o citoplasma da célula (figura 12).

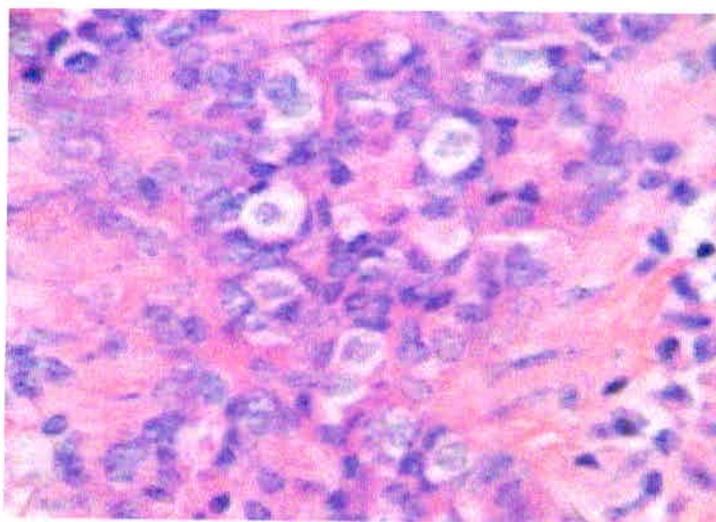


Figura 12 - Massa de células tumorais presente no corte de pulmão de camundongo C57BL6 (10^5 células tumorais por via endovenosa). Observam-se células vacuolizadas, agregação de cromatina na periferia do núcleo sugerindo apoptose celular. Há presença de alteração na relação núcleo/citoplasma. 400X

Foi possível observar o desenvolvimento de metástases tanto macro quanto microscopicamente nos pulmões dos camundongos C57BL/6 que receberam as células tumorais. Macroscopicamente puderam ser observados pontos amelanóticos sugerindo tratar-se de metástases. Microscopicamente, pela análise das lâminas, conforme exposto acima, foi possível confirmar a ocorrência de alterações sugestivas de metástases como pontos de hemorragia, vasos hiperemiados, presença de grande número de leucócitos na periferia do vaso, diferenças tintoriais, relação núcleo/citoplasma alterada entre outras.

CONCLUSÃO

No desenvolvimento tumoral, utilizando diferentes concentrações das células B16F10 foi possível avaliar como os organismos dos camundongos C57BL/6 reagiram frente às diferentes vias de implantação tumoral. Confirmou-se, conforme dados de literatura, que o desenvolvimento dos tumores está diretamente ligado a concentração de células tumorais presentes no organismo dos camundongos, ou seja, o crescimento tumoral é dose-dependente. Além disso, observou-se que a taxa de sobrevida também está diretamente relacionada ao número de células implantadas.

Na segunda fase do estudo, no transplante endovenoso de células tumorais comprovou-se que quando as células são inoculadas pela veia da cauda dos camundongos, neste modelo experimental, somente há desenvolvimento de metástases nos pulmões dos camundongos C57BL/6.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, A. G. **Estudo do papel protetor das 'heat shock proteins' em modelo de melanoma murino em camundongos selvagens e 'knock-out' para receptor de interferon gama e sua modulação por anticorpos.** 2000. 146f. Dissertação (mestrado)- Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2000.
- AZEVEDO, G. et al. Risco crescente de melanoma de pele no Brasil. **Revista de saúde pública**, São Paulo, v.26, n.4, p.290-294, ago. 1992.
- BAKOS, L. Radiação ultravioleta. **Anais brasileiros de dermatologia**, Rio de Janeiro, v.81, n.5, p.39-44, set. 2006.
- BRASIL. Ministério da saúde. **Instituto nacional de câncer.** Rio de Janeiro, RJ, 2006.
- BRASILEIRO FILHO, G. **Patologia geral.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
- CHAMMAS, R. Aspectos fisiopatológicos da disseminação de sarcomas. **Acta oncologia brasileira**, São Paulo, v.6, n.2, p.76-84, fev. 1998.
- CARMICHAEL, V. E. et al. Primary cutaneous malignant melanoma: experience of the british columbia cancer agency From 1982 to 1983. **Canadian journal of surgery**, London, 35, n.6, p. 589-597, dec. 1992.
- CRIADO, H. et al. Melanoma maligno cutâneo primário: estudo retrospectivo de 1963 a 1997 no hospital do servidor público estadual de São Paulo. **Revista da associação médica brasileira**, São Paulo, v.45, n.2, p.157-162, abr. 1999.
- CONTRAN, R. S. et al. **Patologia estrutural e funcional.** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- DAMATO, S. D. Primary melanoma of the esophagus: radiologic and clinical findings in six patients. **Radiology brasilian**, New York, v.34, n.1, p.62-62, jan. 2001.
- DOCI, R. et al. One hundred patients with hepatic metastases from colorectal cancer treated by resection: analysis of prognostic determinants. **The British journal of surgery**, Milan, v.78, n.7, p.797-801, jul. 1991.

EVANS, C.W. Cell adhesion and metastasis. **Cell biology international reports**, New Zealand, v.16, n.1, p.1-10, jan. 1992.

FAGUNDES, D. J. et al. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta cirúrgica brasileira**, São Paulo, v.19, n.3, p.59-65, mai. 2006.

FOSTER, J. H. et al. Pathology of liver metastasis. **Current problem in surgery**, Bethesda, v.18, n.3, p.157-202, mar. 1998.

FREITAS Z. F. et al. Melanoma heterogeneity: differential, invasive, metastatic properties and profiles of cathepsin B, D and L activities in subclones of the B16F10-NEX2 cell line. **Melanoma Research**, New York, v.14, n.3, p.333-344, oct. 2004.

GIGLIOR, A. D. Um novo paradigma para o tratamento do câncer. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.50, n.3, p.249-249, jul. 2004.

GODARD, A. L. B. O espelho milagroso: o poder do camundongo. **Acta cirúrgica brasileira**, São Paulo, v.20, n.2, p.28-36, jan. 2006.

GOLDIM, J. R. et al. **Pesquisa em modelos animais**. 2. ed. Porto Alegre: HCPA, 2000.

GREEN, A. A theory of size distribution of melanomas: Queensland, Australia. **Cancer Causes and Control**, Queensland, v.8, n.6, p.513-516, nov. 1994.

MAIA, M. et al. Relação entre o nevo melanocítico congênito pequeno e melanoma cutâneo. **Anais brasileiros de dermatologia**, Rio de Janeiro, v.78, n.2, p.189-195, mar. 2003.

MANOLIDIS, S. et al. Malignant mucosal melanoma of the head and neck: review of the literature and report of 14 patients. **American cancer society**, Toronto, v.80, n.8, p.1373-1386, out, 1997.

MARBACK, E. F. et al. Invasão do nervo óptico por melanoma maligno da úvea. **Arquivo brasileiro de oftalmologia**, São Paulo, v.59, n.2, p.611-613, mai. 1996.

MEIRA, A. R. Um novo paradigma para o tratamento do câncer. **Revista da associação médica brasileira**, São Paulo, v.50, n.3, p.229-251, set. 2004.

MOORE, G. E. Purified roswell park cultured antilymphocytic globulin RPMI-CALG: preparation and clinical trial. **Journal of surgical oncology**, Pennsylvania, v.1, n.2, p. 153-166, feb. 1969.

MORAES, S. P. et al. Modelo experimental de tumor de Walker. **Acta cirúrgica brasileira**, São Paulo, v.15, n.4, p.58-66, out. 2000.

OLIVEIRA FILHO, J. et al. Hyperthermia increases the metastatic potential of murine melanoma. **Brasil journal of biology**, São Paulo, v.30, n.8, p.941-945, ago. 1997.

PINHEIRO, A. M. C. Melanoma cutâneo: características clínicas, epidemiológicas e histopatológicas no hospital universitário de Brasília entre janeiro de 1994 e abril de 1999. **Anais brasileiros de dermatologia**, Rio de Janeiro, v.45, n.2, p. 179-186, mar. 2003.

REIDY, J. J. et al. Melanocytoma: nomenclature, pathogenesis, natural history and treatment. **Survey of ophthalmol**, Berlim, v.29, n.5, p.319-327, mar. 1992.

SAAD-HOSSNE, R. et al. Efeito da solução aquosa de fenol, ácido acético e glicerina sobre o tumor ascítico de Ehrlich. Estudo experimental in vitro. **Acta cirúrgica brasileira**, São Paulo, v.19, n.6, p.112-128, jan. 2004.

SANTOS, T. F. P. **Angiogênese: mecanismos e fatores reguladores**. 2003. 111f. Dissertação (mestrado)-Faculdade de Medicina de Lisboa, Lisboa, 2003.

SOUZA, A. O. et al. **Cirurgia de cabeça e pescoço: melanomas malignos (cutâneos e mucosos) em cabeça e pescoço**. São Paulo: Frontis, 1992.

TAYEK, J. A. et al. Influence of the Walker 256 carcinosarcoma on muscle, tumor, and whole-body protein synthesis and growth rate in the cancer-bearing rat. **Cancer research**, Boston, v.46, n.11, p. 5649-5654, nov. 1986.

WAGMAN, L. D. et al. A prospective, randomized evaluation of the treatment of colorectal cancer metastatic to the liver. **Journal of clinic oncology**, v.8, n.5, p. 1885-1893, jul. 1993.