

Jofre Jacob da Silva Freitas
Pedro Iuri Castro da Silva
Robson José de Souza Domingues

Org.



Tumor de Ehrlich

MANUAL BÁSICO DE ONCOLOGIA EXPERIMENTAL



Manual Básico de **ONCOLOGIA** **EXPERIMENTAL** Tumor de Ehrlich

Organizadores

Pedro Iuri Castro da Silva

Jofre Jacob da Silva Freitas

Robson José de Souza Domingues

ISBN 978-85-8458-023-1



**Mestrado Profissional em cirurgia e
pesquisa experimental**

Manual Básico de
ONCOLOGIA EXPERIMENTAL
Tumor de Ehrlich

Organizadores

**Pedro Iuri Castro da Silva
Jofre Jacob da Silva Freitas
Robson José de Souza Domingues**



Universidade do Estado do Pará

Reitor	Rubens Cardoso da Silva
Vice-Reitor	Clay Anderson Chagas
Pró-Reitora de Pesquisa e Pós- Graduação	Renato da Costa Teixeira
Pró-Reitora de Graduação	Ana da Conceição Oliveira
Pró-Reitora de Extensão	Mariane Cordeiro Alves Franco
Pró-Reitor de Gestão	Carlos José Capela Bispo



Editora da Universidade do Estado do Pará

Coordenador e Editor-Chefe	Robson José de Souza Domingues
Conselho Editorial	Francisca Regina Oliveira Carneiro Joelma Cristina Parente Monteiro Alencar Josebel Akel Fares José Alberto Silva de Sá Juarez Antônio Simões Quaresma (Presidente de Honra) Lia Braga Vieira Maria das Graças da Silva Maria do Perpétuo Socorro Cardoso da Silva Marília Brasil Xavier Núbia Suely Silva Santos Pedro Franco de Sá Robson Domingues (Presidente) Tânia Regina Lobato dos Santos Valéria Marques Ferreira Normand

APRESENTAÇÃO

A produção acadêmica em um Mestrado Profissional está voltada a produção de produtos que possam responder questões específicas onde o pesquisador ou o profissional atuam. Em termos de pesquisas experimentais esses produtos podem possibilitar aperfeiçoamento de técnicas de utilização e aprimoramento na utilização dos animais de experimentação.

O modelo experimental do tumor de Ehrlich é largamente utilizado na pesquisa para avaliar os efeitos de drogas antitumorais. Contudo, não existe sua melhor utilização. A partir da necessidade de ter uma publicação com os procedimentos mais adequados para utilizar um modelo experimental de tumor, surge o “Manual Básico de Oncologia Experimental Tumor de Ehrlich”. Esse manual é direcionado principalmente aos pesquisadores que trabalham com Oncologia Experimental, com orientações detalhadas sobre o manuseio correto dos animais; os procedimentos para manutenção e inoculação das células tumorais; assim como as metodologias de avaliação do crescimento tumoral.

Um manual deste tipo permite uma utilização mais ética e com maior minimização na utilização do número de animais, pois torna desnecessário as etapas de testes experimentais que normalmente são feitos para a padronização das técnicas.

Portanto o presente manual trará grandes contribuições científicas na área de Oncologia Experimental.

Belém, 09 de outubro de 2017.

Prof. Dr. Jofre Jacob da Silva Freitas
Prof. Titular de Histologia da UEPA

A QUEM SE DEDICA

O manual básico de oncologia experimental: tumor de Ehrlich, tem a intenção de auxiliar estudantes e pesquisadores em geral sobre os principais tópicos na utilização do tumor de Ehrlich na Oncologia Experimental. Por meio dessas informações pesquisadores que se interessem nesse modelo poderão realizar o manuseio correto do animal, criopreservação e descongelamento celular adequado, além de identificar e avaliar a progressão tumoral nos animais inoculados.

AUTORES

Docentes

Jofre Jacob da Silva Freitas

Biomédico, Doutor em Biologia Celular e Tecidual pela Universidade de São Paulo (USP), Professor Titular de Histologia da Universidade do Estado do Pará (UEPA), Professor do Programa de Mestrado em Cirurgia e Pesquisa Experimental (CIPE) da Universidade do Estado do Pará (UEPA), Coordenador do Laboratório Morfofuncional do Curso de Medicina da Universidade do Estado do Pará (UEPA), Coordenador do Laboratório de Morfofisiologia Aplicada a Saúde da Universidade do Estado do Pará (CCBS-UEPA)

Robson José de Souza Domingues

Biólogo, Doutor em Ciências Biológicas Anatomia Botucatu- UNESP, Professor de Morfofuncional da Universidade do Estado do Pará (UEPA), Professor Titular do curso de Medicina da Universidade do Estado do Pará (UEPA), Professor-Orientador do Mestrado Ensino em saúde - da Universidade do Estado do Pará (UEPA)

Kátia Simone Kietzer

Graduada em Fisioterapia, Doutora em Neurociências e Biologia Celular pela Universidade Federal do Pará (UFPA), Professora Adjunta de Anatomia Humana da Universidade do Estado do Pará (UEPA), Professora do Programa de Mestrado em Cirurgia e Pesquisa Experimental (CIPE) da Universidade do Estado do Pará (UEPA)

Anderson Bentes de Lima

Farmacêutico, Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal do Pará (UFPA), Professor assistente II da Universidade do Estado do Pará (UEPA), Professor do Programa de Mestrado em Cirurgia e Pesquisa experimental (CIPE) da Universidade do Estado do Pará (UEPA)

Mário Arthur da Costa Leal

Médico veterinário, Mestre em Ciência Animal pela Universidade Federal do Pará (UFPA), Técnico responsável pelo biotério da Universidade do Estado do Pará (UEPA), Professor Horista na disciplina de anatomia e fisiologia de animais de laboratório da Universidade do Estado do Pará (UEPA).

Rosivaldo dos Santos Borges

Farmacêutico-Bioquímico, Pós-doutor no Instituto de Química de São Carlos-Universidade de São Paulo em Química Quântica e Medicinal, Professor associado da Universidade Federal do Pará (UFPA), Coordenador do Núcleo de estudos e eleição de moléculas bioativas – NESBio (UFPA)

Marcus Vinicius Henriques Brito

Médico, Doutor em Técnicas Operatórias e Cirurgia Experimental pela Universidade Federal de São Paulo, Professor titular da Universidade do Estado do Pará (UEPA), Coordenador do Programa de Mestrado Profissional em Cirurgia e Pesquisa experimental (CIPE) da Universidade do Estado do Pará (UEPA)

Pós-Graduando

Pedro Iuri Castro da Silva

Graduado em Fisioterapia pela Universidade do Estado do Pará (UEPA), Pós-graduando do Programa de Mestrado Profissional em Cirurgia e Pesquisa Experimental (CIPE) da Universidade do Estado do Pará (UEPA), Coordenador da Linha de Pesquisa em Aplicações Celulares e Moleculares em Fisioterapia do Laboratório de Morfofisiologia Aplicada à Saúde

Graduandos

Renata Cunha Silva

Graduando do curso de terapia ocupacional da Universidade do Estado do Pará (UEPA), Coordenadora Geral Discente do Laboratório de Morfofisiologia Aplicada à Saúde da Universidade do Estado do Pará (UEPA), Estagiário do Laboratório de Morfofisiologia Aplicada à Saúde da Universidade do Estado do Pará (UEPA)

Lucas José do Nascimento Cruz

Graduando do curso de biomedicina da Universidade do Estado do Pará (UEPA), Estagiário do Laboratório de Morfofisiologia Aplicada à Saúde da Universidade do Estado do Pará (UEPA)

Emmanuel Arthur Albuquerque Aragão

Graduando do curso de biomedicina da Universidade do Estado do Pará (UEPA), Estagiário do Laboratório de Morfofisiologia Aplicada à Saúde da Universidade do Estado do Pará (UEPA)

Lucas Meireles Matos

Graduando do curso de fisioterapia da Universidade do Estado do Pará (UEPA), Estagiário do Laboratório de Morfofisiologia Aplicada à Saúde da Universidade do Estado do Pará (UEPA)

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

ENTENDENDO O CÂNCER: DE CONCEITO À MECANISMOS GENÉTICOS 10

Conceito.....	10
Tipos.....	10
Classificação quanto ao comportamento biológico.....	10
Classificação quanto à invasividade.....	11
Epidemiologia	11
Mecanismos genéticos do câncer.....	13
Referências.....	15

CAPÍTULO 2

O CUIDADO E O USO DE CAMUNDONGO NO MODELO TUMORAL DE EHRLICH 16

Utilização de animais em pesquisa experimental.....	16
Principais características de camundongos.....	17
Bem-estar animal.....	17
Microambiente.....	19
Macroambiente.....	20
Manipulação do camundongo.....	21
Vias de administração.....	24
Métodos de eutanásia.....	24
Referências.....	27

CAPÍTULO 3

TUMOR DE EHRLICH: UM MODELO EXPERIMENTAL CENTENÁRIO 24

Histórico	24
Características	30
Formas de desenvolvimento	30
Forma sólida.....	31
Forma ascítica.....	32
Referências	36

CAPÍTULO 4

TÉCNICAS DE CRIOPRESERVAÇÃO E DESCONGELAMENTO DE CÉLULAS TUMORAIS 37

Objetivos da criopreservação celular.....	37
Congelamento celular.....	37
Protocolo básico de congelamento celular.....	39
Descongelamento celular.....	40
Referências.....	42

CAPÍTULO 5

INDUZINDO CÂNCER DE FORMA EXPERIMENTAL: INOCULAÇÃO TUMORAL 43

Contagem e viabilidade celular para a inoculação tumoral.....	43
Vias de inoculação tumoral.....	48
Inoculação por via subcutânea.....	48
Inoculação por via intramuscular.....	49
Inoculação por via intraperitoneal.....	49
Referências	51

CAPÍTULO 6

CRESCIMENTO DO TUMOR DE EHRLICH: FORMAS DE AVALIAÇÃO 53

Avaliação do crescimento tumoral para a forma ascítica.....	53
Avaliação do crescimento tumoral pela variação do peso corporal	53
Avaliação do crescimento tumoral pela variação da circunferência abdominal	54
Avaliação do crescimento tumoral pelo volume da ascite, volume de células compactadas e células por milímetro (ml).....	55
Avaliação do crescimento tumoral para a forma sólida.....	56
Avaliação do volume tumoral.....	56
Avaliação da angiogênese tumoral.....	57
Avaliação da sobrevida	57
Referências.....	60

ENTENDENDO O CÂNCER: DE CONCEITO À MECANISMOS GENÉTICOS

Pedro Iuri Castro da Silva, Emmanuel Arthur Albuquerque Aragão, Lucas Meireles Matos, Lucas José do Nascimento Cruz, Mário Arthur da Costa Leal, Renata Cunha Silva Rosivaldo dos Santos Borges, Anderson Bentes de Lima, Kátia Simone Kietzer, Robson José de Souza Domingues, Jofre Jacob da Silva Freitas

1 CONCEITO

O câncer caracteriza-se por ser uma doença multifatorial, resultado de sequências de mutações ou alterações genéticas, cujas causas variam desde erros aleatórios na replicação do DNA à indução por meio de agentes mutagênicos, como a radiação, substâncias químicas ou infecções virais. As células cancerígenas proliferam-se rapidamente, invadindo tecidos e órgãos e formando tumores malignos com alta capacidade de metástase, isto é, de disseminação para outras regiões do corpo.

1.2 TIPOS

Os tipos de câncer são classificados de acordo com os tecidos afetados inicialmente pela doença, como o carcinoma, que possui origem em células epiteliais e o sarcoma, cujo início se dá em tecidos conjuntivos. Considerado questão prioritária de saúde pública, o câncer é uma das principais causas de morbimortalidade a nível mundial, sendo que os tipos de câncer mais incidentes, são os de pulmão, mama, intestino e próstata.

1.3 CLASSIFICAÇÃO QUANTO AO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO

As neoplasias podem ser classificadas de acordo com seu comportamento biológico em benignas e malignas. Os critérios para essa divisão incluem encapsulação, crescimento, mitose, morfologia, antigenicidade e metástases, sendo de maior segurança no diagnóstico as características morfológicas. Quando estas

diferenças não são facilmente definidas, diz-se que a neoplasia é limítrofe ou borderline.

As neoplasias benignas frequentemente possuem uma pseudocápsula fibrosa, resultado da compressão de tecidos vizinhos devido ao crescimento expansivo e bem delimitado em pequena velocidade. Os tumores benignos são denominados bem diferenciados por serem semelhantes ao tecido de origem, as mitoses são raras e atípicas e não há presença de antigenicidade e metástase.

As neoplasias malignas, por sua vez, não apresentam pseudocápsula e possuem crescimento infiltrativo rápido, com mitoses atípicas e frequentes. As células são pouco diferenciadas, ou seja, diferentes do tecido de origem e, portanto, possuem a capacidade de produzir antígenos. Além disso, as metástases são frequentes, o que torna os tumores malignos capazes de promover sua disseminação e implantação à distância.

1.4 CLASSIFICAÇÃO QUANTO À INVASIVIDADE

Com exceção das neoplasias do sistema sanguíneo, os cânceres podem ser classificados em in situ, estágio em que as células tumorais apenas se desenvolvem no interior do órgão de origem, sem ultrapassar os limites definidos pela membrana basal, é invasivo, no qual outras camadas celulares do órgão são invadidas e ocorre disseminação para outros tecidos do corpo através das correntes sanguínea ou linfática.

1.5 EPIDEMIOLOGIA

A partir do documento *World Agency for Research on Cancer* (IARC), da Organização mundial de Saúde (OMS) discute-se que nas próximas décadas, o impacto do câncer na população corresponda a 80% dos mais de 20 milhões de novos casos estimados para 2025. Ainda segundo o documento, a estimativa mundial realizada em 2012 apontou que dos 14 milhões de casos estimados, mais de 60% ocorreram em países em desenvolvimento. Para a mortalidade, a situação faz-se pior quando se consta que dos 8 milhões de óbitos previstos, 70% ocorrerão nestes países.

Nesta estimativa, os tipos de câncer mais incidentes no mundo foram pulmão (1,8 milhão), o câncer de mama (1,7 milhão), intestino (1,4 milhão) e próstata (1,1 milhão). Nos homens os mais frequentes foram pulmão (16,7%), próstata (15%), intestino (10%), estômago (8,5%) e fígado (7,5%). Nas mulheres, as maiores freqüências foram mama (25,2%), intestino (9,2%), pulmão (8,7%), colo do útero (7,9%) e estômago (4,8%).

Comparando a dados da América Latina e do Caribe, os últimos estudos em 2012 pela IARC apontaram as ocorrências de 1,1 milhão de novos casos de câncer, sendo em homens o mais incidente o câncer de Próstata (152 mil casos) e em mulheres o câncer de mama (152 mil), seguido pelo câncer de Colo do útero, enquanto o câncer de pulmão é o segundo mais estimado para homens, verificando assim 12,2% e 9,8% dos casos, respectivamente.

Segundo o Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), a estimativa para o Brasil no biênio de 2016-2017, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos de câncer, com exceção dos casos de câncer não melanoma (o que corresponde a aproximadamente 180 mil casos), espera-se que ocorra em torno de 420 mil novos casos de câncer. O perfil observado incluiu-se nos casos mencionados da América Latina e do Caribe remetidos pela IARC, onde o câncer de próstata em homens e o de mama em mulheres serão os mais frequentes e tem como perspectiva 61 mil e 58 mil casos, respectivamente.

Na região norte, as estimativas de 2016 por 100 mil habitantes, segundo sexo e localização primária do câncer, a região teria 21.460 mil novos casos de neoplasias, enquanto 11.060 acometeram os homens e aproximadamente 10.430 afetaram as mulheres. Dentre os tipos de câncer mais frequente, observa-se a continuidade de incidência do câncer de próstata em homens (2.470 casos) e o câncer de estômago (970 casos). Enquanto nas mulheres o câncer do colo de útero (1970 casos) fora o mais estimado, seguido pelo câncer de mama (em torno de 1810 casos). A figura 1 mostra o total de neoplasias com suas respectivas localizações por incidência no sexo:

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	2.470	28,6%	Homens 		Colo do Útero	1.970	23,1%
Estômago	970	11,2%			Mama Feminina	1.810	21,2%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	680	7,9%			Cólon e Reto	480	5,6%
Cólon e Reto	440	5,1%			Estômago	480	5,6%
Bexiga	370	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	410	4,8%
Leucemias	310	3,6%			Glândula Tireoide	270	3,2%
Cavidade Oral	290	3,4%			Leucemias	250	2,9%
Laringe	250	2,9%			Ovário	250	2,9%
Linfoma não Hodgkin	230	2,7%			Corpo do Útero	230	2,7%
Sistema Nervoso Central	230	2,7%			Sistema Nervoso Central	190	2,2%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 01: Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma. **Fonte:** INCA, 2016.

No Pará, os casos se assemelham quando relacionados à situação da região norte do país, e nos homens os maiores casos de câncer são de próstata, traqueia, brônquios, pulmão, colo e reto. Em Belém, os casos de câncer de próstata chegam a 340 mil novos casos. Outros índices a cima de 100 mil casos ainda se enquadram nos casos de alta incidência como o câncer de pulmão (270 casos no Pará e 100 casos em Belém) e câncer de estômago (460 casos no Pará e 160 em Belém).

Enquanto as mulheres, os casos mais frequentes são majoritariamente o câncer de mama (830 casos no Pará e 410 em Belém) e o câncer de colo do útero (820 casos no Pará e 260 casos em Belém), câncer de estômago (230 casos no Pará e 100 casos em Belém). No Total, a estimativa era de novos 9.200 casos por 100 mil habitantes no estado do Pará, e em Belém 3.290.

1.6 MECANISMOS GENÉTICOS DO CÂNCER

De modo geral, o câncer é uma doença genética, uma vez que o fenótipo tumoral resulta de alterações genéticas ou epigenéticas em uma célula, podem conferir vantagens seletivas que serão transmitidas a células-filha. Tais alterações podem resultar de múltiplas etapas e podendo envolver dezenas, até centenas, de genes, por meio de mutações gênicas, quebras e perdas cromossômicas, ampliações gênicas, instabilidade genômica e mecanismos epigenéticos supracitados.

Outra alteração frequente é o polimorfismo, que trata-se de variações na sequência de DNA que podem criar ou destruir sítios de reconhecimento de enzimas de restrição e parecem estar associados a apenas uma base. A frequência de alelos heterozigotos para o polimorfismo genético ocorre em mais de 2% da população. Algumas dessas alterações ocorrerão em sequências não codificadoras do gene, que na maioria dos casos não terão efeito em suas funções; outras ocorrerão em sequências codificadoras, levando à produção de proteínas defeituosas. Deste modo, em alguns casos o polimorfismo genético pode aumentar a suscetibilidade ao câncer.

Os proto-oncogenes são um grupo de genes que fazem com que as células normais se tornem cancerosas em decorrência de mutações. As mutações proto-oncogênicas são tipicamente de natureza dominante, e a versão que sofreu mutação do proto-oncogene é chamada oncogene. Muitas vezes, os proto-oncogenes codificam proteínas que funcionam para estimular a divisão celular, inibindo a diferenciação celular que impedem a morte celular.

Todos estes processos são importantes para o desenvolvimento humano normal e para a manutenção de tecidos e órgãos. Os oncogenes, no entanto, exibem tipicamente uma produção aumentada dessas proteínas que levam ao aumento da divisão celular e a diminuição da diferenciação celular e a inibição da morte celular. Em conjunto, esses fenótipos definem células cancerígenas.

Estes genes precisam ter dois alelos alterados para induzir o câncer. Um desses supressores é conhecido como o gene p53, um supressor tumoral clássico têm a característica de ser expresso quando o DNA sofre algum tipo de dano, onde a proteína p53 se liga ao local danificado do DNA e interrompe as células na fase G do ciclo celular, ativando mecanismos de reparo do DNA ou mesmo de apoptose.

REFERÊNCIAS

AMORIM, A. R. **Genética do câncer**. 2002. Monografia - Centro Universitário de Brasília, Brasília.

BASTOS, C. E. M. C. **Alterações genéticas e epigenéticas em meningiomas na população paraense**. 2013. 93 f. Tese (doutorado em neurociência e biologia celular) – instituto de ciências biológicas, universidade federal do Pará, Belém, 2013.

CERRANO, R et al. Oncogenes, genes supressores de tumores, microRNAs e o desenvolvimento de tumores. **Especial Oncologia**. 2015; v.71(1): 4-10.

DANTAS, E. L. R. et al. Genética do Câncer Hereditário. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 2009; 55(3): 263-269.

INCA. ABC do câncer: **Abordagens básicas para o controle do câncer**. Rio de Janeiro: CEDC, 2011. 128 p.

INCA. **Ações de enfermagem para o controle do câncer: Uma proposta de integração ensino-serviço**. 3º edição. Rio de Janeiro: CEDC, 2008. 628 p.

INCA. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. 1ª Edição. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde. 2015. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf> . Acesso: 13 de Abril de 2017, às 13:21h.

LIMA, J. M. et al. Estudo do polimorfismo genético no gene p53 (códon 72) em câncer colorretal. **Arquivos de Gastroenterologia**. 2006; v. 43 (1): 8-13.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Oncologia: Manual de bases técnicas**. 21. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 135 p.

ONUCHIC, A. C.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. **Revista de Medicina**. 2010; v.1(89): p.21-31.

VIDEIRA, R. S et al. Oncogenes e desenvolvimento no câncer. **Arquivos de Ciências da Saúde**. 2002; v.6 (1): 71-76.

O CUIDADO E O USO DE CAMUNDONGO NO MODELO TUMORAL DE EHRLICH

Pedro Iuri Castro da Silva, Renata Cunha Silva, Lucas José do Nascimento Cruz, Mário Arthur da Costa Leal, Rosivaldo dos Santos Borges, Anderson Bentes de Lima, Kátia Simone Kietzer, Robson José de Souza Domingues, Jofre Jacob da Silva Freitas

2.1 UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS EM PESQUISA EXPERIMENTAL

A espécie mais utilizada para o tumor de Ehrlich é o camundongo, visto que esse tipo de tumor é espécie-específico. O camundongo faz parte da classe Mammalia, ordem Rodentia, família Muridae, gênero *Mus* e espécie *Mus musculus*. Possui diversas linhagens sendo a Swiss a mais utilizada, uma linhagem heterogênea (*outbrad*), com fenótipo albino e caracterizada por baixa consanguinidade.

A linhagem Swiss é descendente de cruzamentos aleatórios, assim como ocorre com os seres humanos, conferindo a esses animais variada constituição genética com heterozigose de 99% e características como animais mais resistentes, menor variação de comportamento em relação ao meio e boas taxas reprodutivas.



Figura 02: camundongo *Mus Musculus*. Fonte: autor.

Apesar da crescente substituição do uso de animais de laboratório, estes ainda são tidos como importantes para o desenvolvimento de pesquisas, o modelo *in*

vivo fornece a pesquisa fenômenos fisiológicos, fisiopatológicos e farmacológicos ainda não replicados de forma satisfatória em laboratório por modelos *in vitro*, tanto que a experimentação animal vem sendo bastante útil para desenvolver tratamentos de diversas patologias, inclusive o câncer.

Dessa forma, ter conhecimento da fisiologia, comportamento, necessidades e características da espécie envolvida, assim como o manejo e o transporte cuidadoso e adequado, são de suma importância para evitar o estresse, afim de possibilitar a promoção do bem-estar animal e obter dados de pesquisas confiáveis e satisfatórios.

2.2 PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DE CAMUNDONGOS

Quadro 01: Parâmetros fisiológicos e metabólicos de camundongos. **Fonte:** autor.

Parâmetros	Valores
Período de vida	1,5 a 3 anos
Peso corporal do macho	20 a 30 g
Peso corporal da fêmea	25 a 40 g
Necessidade de alimento	15g/100g de peso-animal/dia
Necessidade de água	15 ml/100g de peso-animal/dia
Gestação	19-21 dias
Tamanho da ninhada	10-12 filhotes
Peso ao nascer	1-2 g
Temperatura corpórea retal	36,5 a 38,0 °C
Frequência respiratória	60-220 mpm
Frequência Cardíaca	325 a 780 bpm

2.3 BEM-ESTAR ANIMAL

Antes de iniciar qualquer procedimento de pesquisa em oncologia experimental ou qualquer outra área da experimentação animal, deve-se assegurar o bem-estar dos animais. Os animais apresentam necessidades fisiológicas e comportamentais específicas de sua espécie, são seres sencientes, sensíveis a dor, capazes de sentir angústias e compreender o meio em que estão inseridos.

É importante que o pesquisador seja capaz de identificar o animal que esteja apresentando comportamento de dor. Os sinais e sintomas do comportamento doloroso compreendem inapetência, caquexia, prostração, postura curvada, isolamento, vocalização, piloereção, entre outros.

O bem-estar animal pode ser entendido como o estado em relação as suas tentativas de se adaptar o seu meio ambiente. Quando esse bem-estar não é atingido ou não pode ser mantido podem desencadear em distresse ou estresse com possíveis manifestações comportamentais anormais como estereotípias (comportamentos repetidos de padrão simples) e surgimento de doenças. Esse mal-estar pode levar a variação de resultados na pesquisa gerando dados não confiáveis.

Esses animais são sociáveis e apreciam o convívio em grupo. Apresentam, dentro de uma determinada gaiola, uma hierarquia social, na qual cada animal tem seu papel como dominante e dominado. Nos biotérios, deve se primar pela formação e manutenção de uma colônia com os mesmos animais por gaiolas, visto que a inserção ou a retirada de animais envolve esforço adicional para restabelecer novos grupos.

O camundongo é uma espécie que necessita da interação social para seu desenvolvimento, desde o primeiro contato com a mãe até o convívio desses animais em uma colônia estabelecida, para definir comportamentos como acasalamento, maternidade, agressividade, marcação de território entre outros.

O isolamento destes animais é caracterizado como maus-tratos, animais nesta condição apresentam sinais de ansiedade e agressividade, além de interferir no sistema imunológico e possíveis surgimentos de doenças.

O comportamento hierárquico pode ser observado quando um camundongo se estabelece como dominante em relação aos demais, este apresenta um comportamento de dominância, conhecido como “barbearing”, caracterizado quando animal dominante realiza a tricotomia dos seus companheiros submissos em várias regiões. Esse comportamento pode estar associado ao excesso de animais na gaiola, a idade de desmame ou a dieta. Pode-se observar que ao retirar o animal dominante de uma colônia, outro assumirá essa função.

A área de alojamento dos camundongos deve ser levada em consideração, atentando para as necessidades básicas desta espécie. Ter espaço suficiente para a

movimentação corporal, livre acesso a água e alimento, manter grupos para interação social e cuidado com a densidade populacional por gaiolas, regularidade e adequação do manejo sanitário, conferindo condições de bem-estar para a espécie.

2.4 MICROAMBIENTE

É importante avaliar o microambiente para garantir um controle adequado da colônia. A avaliação do microambiente compreende a gaiola em que os animais estão alojados, envolve tipo de gaiola, tamanho da gaiola, grade de contenção, bebedouro e qualidade da água, qualidade da ração, tipo de cama e densidade populacional.

Para evitar brigas entre os camundongos é importante assegurar a compatibilidade entre machos adultos (animais criados juntos desde o desmame) e obedecida a densidade populacional máxima por gaiola de 5 animais. Mesmo assegurando esses cuidados, ainda podem ocorrer brigas o que culmina em ferimentos na cauda, na região lombar, olhos, membros e outras regiões.



Figura 03: Camundongos em gaiola apropriada com densidade populacional de 5 animais.

Fonte: autor.

Uma das formas de diminuir o comportamento agressivo é enriquecer o ambiente, adequar o número de animais por gaiola, e verificar a ocorrência de disputa alimentar. Quando não são tomados esses cuidados esses animais podem não ser adequados para a pesquisa oncológica, pois a indução tumoral irá degenerar ainda mais seu estado.

2.5 MACROAMBIENTE

O macroambiente recebe igual importância para se garantir um controle adequado da colônia. As instalações prediais diferenciando a área limpa de área suja e características de construção como teto, piso, parede, portas, corredores, exaustores e sistemas de ventilação, conferem condições para o monitoramento adequado da temperatura, ventilação, umidade relativa do ar, luminosidade e ruídos que caracterizam o macroambiente.

Camundongos são animais pequenos que possuem grande área de superfície por grama de peso corpóreo, resultando em mudanças fisiológicas em respostas a variação de temperatura do ambiente. Por não possuírem glândulas sudoríparas, não conseguem regular tão bem, como os grandes mamíferos, a temperatura corporal, sendo intolerantes ao calor.

Variações de temperatura podem causar estresse, queda de resistência e maior suscetibilidade a infecções, acarretando problemas respiratórios em animais mantidos em altas umidades e/ou baixas temperaturas. Quando mantidos em baixas temperaturas, os camundongos apresentam constrição dos capilares superficiais, piloereção, postura enrodilhada, aumento da ingestão de alimentos e da construção de ninhos. Esse tipo de comportamento pode trazer viés a pesquisa quando se quer avaliar a ingestão de alimentos na síndrome caquexia/anorexia.

O ciclo circadiano dos camundongos segue o padrão de ciclo claro/escuro, geralmente o utilizado é o de 12 horas claro e 12 horas escuro. Esse controle de luz faz-se necessário por que a luminosidade intensa pode afetar a fisiologia, morfologia e o comportamento desses animais, deixando-os estressados, além disso, em longo prazo, pode causar lesões em retinas de animais albinos que são mais sensíveis a luz.

A luminosidade também pode afetar o comportamento alimentar desta espécie. Segundo alguns autores o camundongo, muito embora tenha hábitos

noturnos, pode alimentar-se durante o dia, consumindo a maior quantidade de sua alimentação no período de luz.

Os camundongos apresentam como sentido mais desenvolvido o olfato. Por meio desse sentido, esses animais, são capazes de reconhecer territórios demarcados por odores naturais e urinas, identificar alimentos, membros do sexo oposto, intrusos e reconhecer odores das pessoas que limpam sua gaiola e lhes fornece alimento. Odores fortes como perfumes, anestésicos voláteis e presença de sangue fresco em aventais ou sobre a bancada podem tornar os animais estressados e agressivos. É importante não mudar a pessoa que realiza a troca das gaiolas. A troca das gaiolas deve ser realizada com periodicidade de no mínimo 2 vezes na semana.

Os cuidados devem ser tomados para evitar o estresse gerado por alterações ou inadequação do manejo. Um sinal de que está ocorrendo algo errado é o aparecimento da cromodaciorreia que é a secreção de um pigmento de coloração avermelhada nos olhos e no nariz, indicando sofrimento ou estresse. Esses sintomas podem ser provocados pela liberação de amônia, oriunda dos excrementos dos animais, no ambiente por falta de troca das gaiolas, falta de ventilação ambiental ou pela liberação de gases irritantes produzidos por produtos de limpeza.

2.6 MANIPULAÇÃO DO CAMUNDONGO

O conhecimento técnico para manipulação do camundongo é imprescindível nos projetos de pesquisa em oncologia, seja na troca de gaiolas ou na administração de substâncias. Os responsáveis pela pesquisa devem possuir segurança no momento da manipulação do animal para diminuir o risco de acidentes e garantir a segurança do animal e pessoal.

O método mais utilizado para troca de gaiolas é segurar o camundongo pela base da cauda e transferi-lo de forma segura e rápida da gaiola suja para a gaiola limpa.

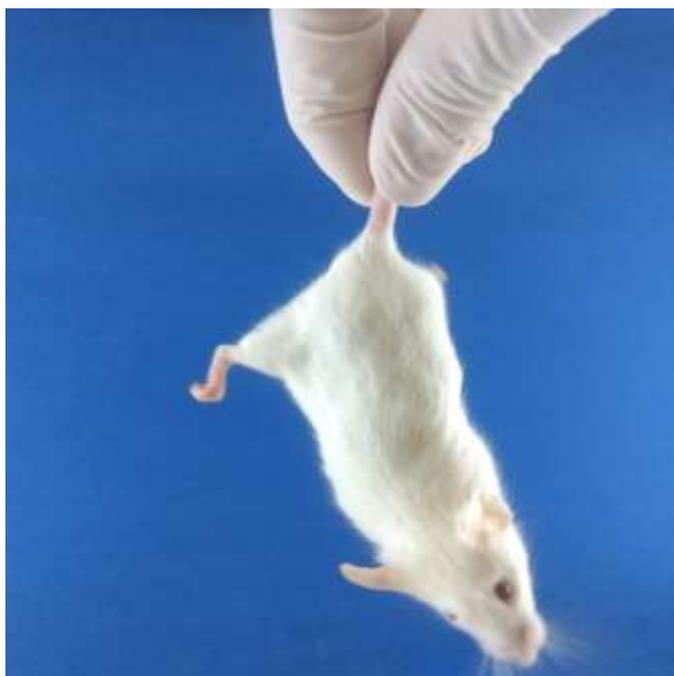


Figura 04: manipulação do camundongo para a troca de gaiolas. **Fonte:** autor.

Nas administrações de substâncias é necessário realizar a contenção do camundongo de forma correta, tentando minimizar ao máximo o estresse gerado por este procedimento. Para realizar a contenção manual de camundongos, deve-se apoiar o animal em uma grade, pegar a cauda pela base e puxar delicadamente para trás, fazendo com que o animal avance na grade tendendo a segura-la com as patas dianteiras.

O manipulador deve apreender com o dedo indicador e o polegar a dobra da pele do pescoço, região próxima as orelhas, enquanto a pele restante é apreendida com os outros dedos. É importante prender bem a pele solta do pescoço, para que o animal não consiga virar e morder o operador. A cauda deve ser presa entre o dedo anular e o do dedo mínimo.

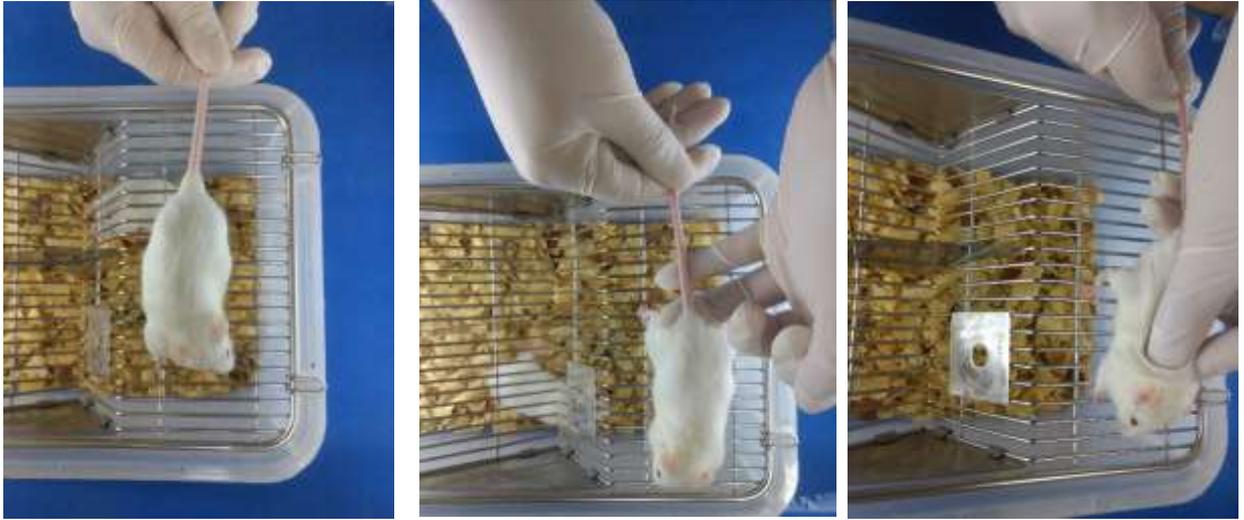


Figura 05: manipulação do camundongo para administração de substâncias. **Fonte:** autor.



Figura 06: Manipulação do camundongo para administração de substâncias. **Fonte:** autor.

2.7 VIAS DE ADMINISTRAÇÃO

Diversas vias de administração podem ser usadas sem dificuldades, inclusive a venosa e a intratecal (intracerebral). No entanto as principais vias de administração de tratamento para camundongos na oncologia experimental são: via oral e intraperitoneal. O quadro 02 apresenta as várias vias de administração de substâncias e o volume para camundongos.

Quadro 02: vias de administração de substância e volume em camundongos. **Fonte:** Ceua/Fiocruz, 2008.

Espécie/via Camundongo	Subcutânea	Intramuscular	Intraperitoneal	Endovenosa
Volume (mL)	2-3	0,03	2-3	0,2
Agulha (mm)	13 x 4,5 ou 25 x 5	13 x 4,5 ou 25 x 5	13 x 4,5 ou 25 x 5	13 x 4,5 ou 25 x 5

A administração de substâncias por via oral, por meio de gavagem, possibilita menos chances de perda de substância, visto que esses animais apresentam, limitada capacidade de vomitar devido a duas regiões do estômago (grande porção aglandular ou estômago anterior e a porção glandular) que são separadas por uma prega limitante.

2.8 MÉTODOS DE EUTANÁSIA

Eutanásia é um termo derivado do grego (*eu*= bom, *thanatos*= morte) e significa “boa morte” ou morte sem sofrimento. Uma “boa morte” é aquela na qual o animal não sente dor nem angústia.

A eutanásia em experimentos científicos com uso de animais, torna-se necessária ao final do experimento ou em outras ocorrências, tais como: bem-estar animal ameaçado, impossibilidade de utilização de medicamentos para aliviar distresse ou o sofrimento, quando o animal constitui ameaça à saúde pública ou animal, ou for objeto de ensino. Na grande maioria dos casos, a eutanásia é utilizada

para a coleta de material biológico dos animais para posteriores análises e quando finda o experimento.

O pesquisador tem por dever assegurar que a eutanásia dos animais seja realizada com o máximo de respeito, evitando morte dolorosa ou com angústia, momentos anteriores à eutanásia.

Uma boa técnica de eutanásia é aquela que resulta em rápida perda de consciência, seguida por parada cardiorrespiratória e pela perda definitiva da função cerebral, além de ausência de sinais de medo, dor ou distresse, período de tempo mínimo para que o animal fique inconsciente.

O método deve ser confiável e passível de reprodução e deve ser seguro para o pessoal envolvido, causar o mínimo de efeitos psicológicos e fisiológicos ao animal, compatível com as necessidades da pesquisa, trazer o mínimo de impacto sobre o meio ambiente, manutenção dos equipamentos utilizados deve ser fácil e periódica, deve ser realizado longe das salas de animais e o operador deve ser experiente na correta contenção e no manejo dos animais.

Ao se fala em bem-estar, deve se pensar também nos efeitos emocionais causados ao operador. As principais reações envolvem o mal-estar, distresse, dor pela perda de uma vida e desconforto. As soluções que podem ser adotadas para minimizar esse problema são: treinamento dos pesquisadores e da equipe técnica quanto aos métodos humanitários de manejo e eutanásia e seus efeitos, rodízio de pessoal, em alguns casos faz-se necessário acompanhamento psicológico, pois o método pode levar uma pessoa a ter conflito com seus princípios morais e éticos.

A principal técnica empregada na oncologia experimental é o deslocamento cervical. Nessa técnica a morte do animal se dá por meio de uma pressão na base do seu crânio, deslocando a coluna e separando o crânio da medula espinhal. Quando aplicado por pessoa treinada e capacitada é um método humanitário, caso contrário é caracterizado como maus-tratos.



Figura 07: eutanásia de camundongo por meio de deslocamento cervical. **Fonte:** autor.

Referências

BRITO, C. V. B.; GOUVEIA, E. H. H.; BRITO, E. S. M. N. Bioterismo. In: BRITO, M. V. H. (Org.). **Manejo Prático de Animais de Experimentação**. Belém: Eduepa, 2016. p. 38-44.

BRITO, C. V. B.; SOARES, R. H. F.C.; GOUVEIA, E. H. H. Contenção de animais. In: BRITO, M. V. H. (Org.). **Manejo Prático de Animais de Experimentação**. Belém: Eduepa, 2016. p. 45-61.

BRITO, M. V. H. Ética em experimentação animal. In: BRITO, M. V. H. (Org.). **Manual do curso teórico-prático de cirurgia experimental: módulo básico**. Belém: Laboratório de Cirurgia Experimental, 2015. p. 1-11.

BROOM, A.F.; FRASER. **Comportamento e bem-estar de animais domésticos**. 4ª edição. São Paulo: Editora Manole, 2010. 438 p.

CEUA-FIOCRUZ. **Manual de utilização de animais/fiocruz**. 1º edição. Rio de Janeiro, 2008.

CHORILLI, M.B. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. 2007; v. 28 (1): 11-23.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CONCEA. **Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos (2013)** – DBCA, 2013.

CROW, S.E.; WALSHAW, S.O.; BOYLE, J.E. **Manual de procedimento clínicos em cães, gatos, coelhos e roedores**. 3ª edição. São Paulo: Roca, 2011.

CUBAS et al. **Tratado de animais selvagens**. 2ª edição. São Paulo: Editora Roca, 2014. 2470 p.

DAMY, S.B. et al. Aspectos fundamentais da experimentação animal - aplicações em cirurgia experimental. **Revista da Associação Médica Brasileira**. 2010; 56(1): 103-11.

FRAJBLAT, M.; AMARAL, V.L.L.; RIVERA, E.A.B. Ciência em animais de laboratório. **Ciência e cultura**. 2008; v.60 (2): 44-46.

MATTARAIA, V.G.M.; OLIVEIRA, G.M. Comportamento de camundongos em biotério. **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**. 2012; v.1 (2): 271.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO (MCTI). **Normativas do Concea para reprodução, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica**. Brasília-DF: CONCEA , 2015.

SILVÂNIA, M.P.N. et al. **Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**. São Paulo: FCF-IQ/USP, 2013.

TABORDA, C.; MEHNERT, D.U.; SILVA, C.A. **Manual de Normas Técnicas**. 1 edição. São Paulo: USP, 2004.

ZUANON, A.; FONSECA, C. A relação do homem com os demais animais e o que se conhece deles a partir da etologia e da ciência do bem-estar animal. **Ars veterinária**. 2014; v.30 (2): 083-091.

TUMOR DE EHRLICH UM MODELO EXPERIMENTAL CENTENÁRIO

Pedro Iuri Castro da Silva, Emmanuel Arthur Albuquerque Aragão, Lucas Meireles Matos, Lucas José do Nascimento Cruz, Mário Arthur da Costa Leal, Renata Cunha Silva, Rosivaldo dos Santos Borges, Anderson Bentes de Lima, Katia Simone Kietzer, Robson José de Souza Domingues e Jofre Jacob da Silva Freitas

3.1 HISTÓRICO

O tumor de Ehrlich é caracterizado como um adenocarcinoma mamário de camundongo fêmea, sendo transplantado pela primeira vez por Paul Ehrlich em 1886 e descrito em 1909. Os primeiros experimentos com o tumor foram utilizando a forma sólida, somente em 1932 com Loewenthal e Jahn, o tumor passou a ser manipulado na forma ascítica. Após esse período, a partir de 1940, estudos forneceram padronização de mensuração e conversões adequando-o para pesquisas qualitativas e quantitativas.



Figura 08: Paul Ehrlich. **Fonte:** Nobelprize, 2014.

Os estudos com o tumor de Ehrlich foram rapidamente difundidos pelo mundo todo, sendo utilizado como modelo experimental visando elucidar a ação de

componentes físicos, químicos e biológicos sobre o crescimento, patogênese, cinética, imunologia, bioquímica e terapêutica dos tumores.

3.2 CARACTERÍSTICAS

O tumor de Ehrlich é caracterizado como um tipo espontâneo, indiferenciado, com rápido crescimento, comportamento agressivo, curto período de vida, isento de regressão espontânea e altamente transplantável. É um tumor espécie-específico que pode ser transplantado em quase todas as espécies de camundongos usados em pesquisas científicas.

As células do tumor ascítico de Ehrlich apresentam-se isoladas, grandes, arredondadas, com citoplasma delicado escasso e microvacuolizado. Há uma inversão da relação núcleo/citoplasma, com núcleos volumosos. A cromatina é granular e irregularmente distribuída com nucléolos proeminentes.

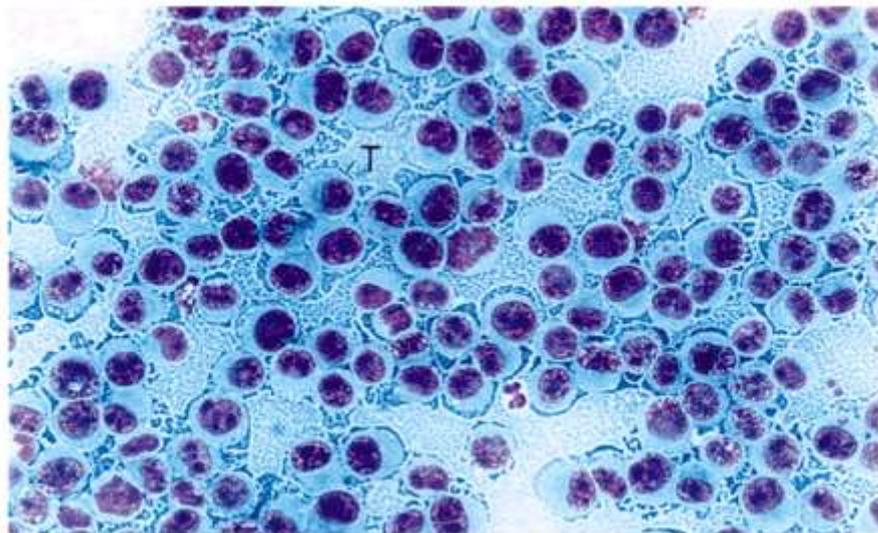


Figura 09: Morfologia das células do tumor de Ehrlich. **Fonte:** Saad-Hossne et al., 2003.

3.3 FORMAS DE DESENVOLVIMENTO

Originalmente o tumor de Ehrlich apresentava um crescimento sólido, entretanto, foi convertido para a forma ascítica por Loewenthal e Jahn, em 1932. Dessa forma, o seu desenvolvimento está relacionado a via de inoculação realizada,

podendo ser desenvolvida na forma ascítica quando inoculado na cavidade peritoneal, ou na forma sólida quando inoculado no tecido subcutâneo ou muscular.

As duas formas de desenvolvimento do tumor de Ehrlich, são marcadas por esplenomegalia, hematopoese esplênica, neutrofilia, trombocitopenia e por um aumento de macrófagos supressores. Observa-se também inibição da proliferação celular na medula óssea que deve sua intensidade dependendo do tempo de instalação do tumor. No entanto, os mecanismos que levam a essas características ainda são desconhecidos.

3.4 FORMA SÓLIDA

A obtenção na forma sólida do tumor de Ehrlich é realizada através da inoculação das células neoplásicas cultivadas na forma ascíticas subcutaneamente no dorso do camundongo ou no coxim plantar. Após a inoculação há a formação de edema e a migração de células pro-inflamatórias para o local da inoculação. A avaliação não deve ocorrer nos primeiros dias de inoculação para que não haja interferência desses fatores. Logo após a inoculação é possível observar a migração celular para os linfonodos regionais.

Após o terceiro dia de inoculação, a curva de crescimento do tumor já pode ser construída sem interferências. A inoculação realizada o dorso do camundongo desenvolve um volume bem delimitado e a consistência do tumor é fibrosa que cede à palpação. Observa-se a superfície íntegra sem qualquer sinal de inflamação ou ulceração. No coxim plantar a massa tumoral apresenta superfície lisa e formato irregular, sem qualquer evidências de ulcerações. Durante o exame físico, nota-se que a consistência é firme e fibrosa. O pico de crescimento do tumor ocorre após o sétimo dia de inoculação, nota-se o crescimento exponencial na região inoculada, o tumor continua crescendo e invadindo órgãos e sistemas.

A análise do tumor na forma sólida é realizada através do exame anatomopatológico, sendo realizado através da excisão do tumor. Após a retirada da massa tumoral, o material deve ser acondicionado em solução de formol a 10% para análise. Do ponto de vista morfológico, as células do tumor apresentam características com alto grau de atipias (anaplasia), com nucléolos evidentes e numerosos, cromatina condensada, mitoses atípicas ou aberrantes e relação núcleo-

citoplasma maior que a de células normais. O estroma é constituído por fibras colágenas e delicados capilares.

Nessa forma o óbito dos animais é em torno de 20 a 30 dias, dependendo da concentração inoculada. Sendo assim, o tumor em sua forma sólida apresenta maior tempo de vida para o animal.



Figura 10: Camundongo com tumor sólido de Ehrlich em estado inicial, 20 dias. **Fonte:** autor.



Figura 11: Camundongo com tumor sólido de Ehrlich em estado avançado, 45 dias. **Fonte:** autor.

3.5 FORMA ASCÍTICA

Quando o tumor de Ehrlich é inoculado na cavidade peritoneal, o mesmo produz ascite, sendo assim denominado Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) ou Carcinoma de Ehrlich ascítico (CEA). O líquido ascítico apresenta coloração cinza-claro, com viscosidade. O volume do líquido ascítico e o número de células tumorais aumentam progressivamente com picos de proliferação após 7 dias da inoculação. Nesse período observa-se em torno de 10 milhões de células neoplásicas em cada 0,1 ml e um volume em torno de 10 ml. O tumor ascítico apresenta homogeneidade de distribuição celular possibilitando a contagem de células e assim uma precisão quantitativa nos transplantes.



Figura 12: (a) camundongo com tumor ascítico de Ehrlich e (b) Camundongo normal.

Fonte: autor.



Figura 13: coloração do líquido ascítico. **Fonte:** autor.

A ascite se instala, principalmente, devido ao aumento da permeabilidade microvascular no peritônio dos animais portadores do tumor. Esse fato pode ser decorrente por um fator vascular produzido pelas células tumorais. Atualmente, sabe-se que esse fator não apresenta efeito nos vasos sistêmicos.

A proliferação tumoral ocorre em duas fases: na primeira há um crescimento exponencial das células, sucedida de um “plateau”, no qual o número de células é quase constante. Entre a transição das fases observa-se mudanças tanto metabólicas quanto morfológicas nas células tumorais, tais como deteriorização estrutural, diminuição da síntese de RNA e DNA, bem como do número de mitocôndrias e conseqüente declínio na concentração de ATP.

O líquido ascítico gera discreta resposta inflamatória na cavidade peritoneal. Apresentando coloração avermelhada devido à hemorragia. O óbito do animal ocorre em período variável, em média de 10 a 14 dias - dependendo da concentração inoculada - em decorrência do aumento da pressão abdominal e compressão dos órgãos adjacentes. O tempo de morte do animal pode variar devido a transplantes de forma repetida, onde há o aumento do grau de virulência e proliferação celular tumoral.



Figura 14: aspecto do abdômen de camundongo inoculado com tumor de Ehrlich. Notar a distensão abdominal. Pele abdominal dissecada. **Fonte:** autor.

REFERÊNCIAS

FECCHIO, D. et al. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. **Inflammation**. 1990; v.14 (1): 125-132.

GUERRA, J.L. **Aspecto do processo inflamatório em camundongos portadores do tumor de Ehrlich**. São Paulo, 1983. [Tese de doutorado – FMVZ da Universidade de São Paulo].

MLA: "**Paul Ehrlich - Facts**". *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2014. Web. 22 de outubro de 2017.
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1908/ehrlich-facts.html

OLIVEIRA, S.L. et al. **Efeito antagonista de PAF no número de células, apoptose, produção de PGE2 e no crescimento do tumor ascítico de Ehrlich (TAE)**. Instituto e Ciências Biomédicas, USP, Pôster 236, 2003.

OZASLAN, M. et al. Ehrlich ascites carcinoma. **African Journal of Biotechnology**. 2011; v. 10 (13): 2375-2378.

RIZZO, M.S. **Colonização preferencial e disseminação do tumor transplantável de Ehrlich em camundongos**. São Paulo, 2000. 100p. Dissertação (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo.

SAAD-HOSSNE, R.; SAAD-HOSSNE, W.; PRADO, R.G. Neoplastic ascite: effects of phenol, glycerin and acetic in Ehrlich ascite tumor. **Acta Cirurgica Brasileira**. 2003; v.18 (6):518-526.

SIGIURA, K. **Tumor transplantation: Methods of animal experimentation**. In: William I. Gay. Edição (1ª). New York and London: Academic Press: 1965. 171-222.

SRIRAM, M.I. et al. Antitumor activity of silver nanoparticles in Dalton's lymphoma ascites tumor model. **International Journal of Nanomedicine**. 2010; v.1 (1): 753–762.

TÉCNICA DE CRIOPRESERVAÇÃO E DESCONGELAMENTO DE CÉLULAS TUMORAIS

Pedro Iuri Castro da Silva, Emmanuel Arthur Albuquerque Aragão, Lucas Meireles Matos, Lucas José do Nascimento Cruz, Mário Arthur da Costa Leal, Renata Cunha Silva, Rosivaldo dos Santos Borges, Anderson Bentes de Lima, Katia Simone Kietzer, Robson José de Souza Domingues, Jofre Jacob da Silva Freitas

Para realizar a inoculação das células tumorais em camundongos é primordial que essas sejam criopreservadas de forma eficiente e descongeladas de forma apropriada.

4.1 OBJETIVOS DA CRIOPRESERVAÇÃO CELULAR

A criopreservação das células tumorais de Ehrlich tem por objetivo proteger as células das possíveis alterações em seu DNA e permite que as células sejam conservadas por um período indeterminado de tempo. Esse processo permite a retomada do seu desenvolvimento celular normal após seu armazenamento em freezer -80°C ou em nitrogênio líquido à temperatura de -196°C (forma mais usual).

4.2 TIPOS DE CONGELAMENTO CELULAR

O processo de congelamento mais utilizado é o congelamento lento. Caracterizado pela redução de 1°C por minuto, por desidratação celular gradual que reduz a formação de cristais de gelo no interior da célula. A viabilidade das células em congelamento lento é maior do que quando imersas diretamente em nitrogênio líquido, caracterizando o método rápido.

Para o processo de congelamento celular é necessário o uso de criopreservadores, solventes orgânicos, que possuem a capacidade de penetrar e proteger a membrana das células dos danos do congelamento. Os criopreservadores mais utilizados são o glicerol e o dimetilsulfóxido (DMSO), ambos

apresentam maior capacidade de penetração e proteção das células, sendo tóxicos. Agem substituindo parcialmente a água no interior da célula, aumentando a aderência do meio congelante, consequentemente reduzindo o ponto de congelamento da mesma.

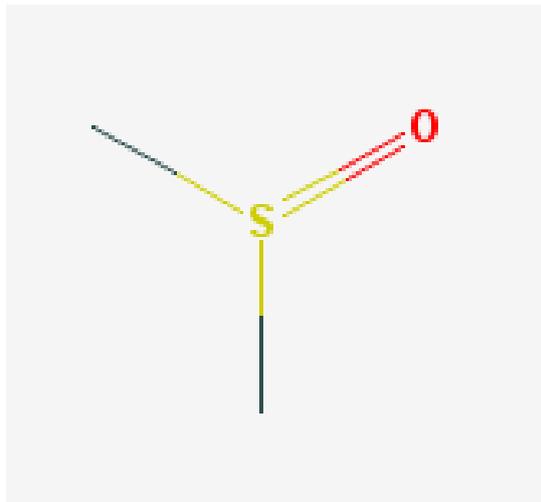


Figura 15: Fórmula estrutural do dimetilsulfóxido (DMSO). **Fonte:** PubChem, 2017.

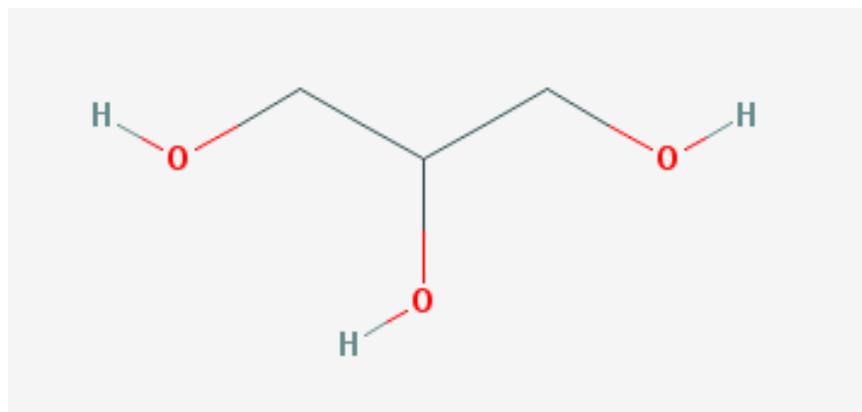


Figura 16: Fórmula estrutural do glicerol. **Fonte:** PubChem, 2017.

O principal mecanismo crioprotetor do glicerol é sua capacidade de relacionar com a água e a sua baixa dissociação com sais, o que diminui a osmolaridade do meio congelante. Além disso, suas hidroxilas são capazes de ligar-se aos oxigênios do grupo fosfato dos fosfolípídeos de membrana, dando estabilidade a mesma no ato do congelamento.

Existem duas soluções de congelamento muito utilizadas para as células tumorais de Ehrlich: a de meio completo (RPMI 1640 contendo 10% de soro bovino fetal e 10% de DMSO) ou somente em soro bovino fetal contendo 10% de DMSO ou 10% glicerol.

4.3 PROTOCOLO BÁSICO DE CONGELAMENTO CELULAR

A seguir, descreveremos um método simplificado de congelamento das células tumorais:

PROTOCOLO BÁSICO DE CONGELAMENTO CELULAR

	Realizar a eutanásia do camundongo e aspirar o líquido ascítico do tumor de Ehrlich.
	Transferir o líquido ascítico paratubos falcon e identifica-los.
	Centrifugar por 1000 rpm por 5 minutos.
	Verificar a quantidade de sobrenadante e descarta-lo. Realizar tudo em banho de gelo.
	Fazer solução congelante (mesma quantidade do sobrenadante retirado) com 90% de soro bovino fetal (SBF) e 10% de DMSO. É importante ressaltar que o SBF esteja gelado, pois em temperatura ambiente o DMSO é tóxico para as células.
	Ressuspender as células no tubo falcon, por meio de pipeta automática e, adicionar a solução de congelamento de forma lenta. Ressuspender, novamente.

	Aliquotar 1 ml de dessa solução (células e solução de congelamento) em tubos falcon e identifica-los.
	A identificação deve conter: Nome da Célula, Número da passagem da célula que está sendo congelada, Data, Nome ou iniciais do operador.
	Iniciar o procedimento de congelamento deixando os eppendorfs em temperatura de 4°C por 4 horas.
	Retirar as células dessa temperatura e deixa-las em -20°C por 20 horas ou per noite.
	Retirar as células dessa temperatura e armazená-las em -80°C ou nitrogênio líquido até o momento do descongelamento e uso.

Caso a célula tumoral não seja utilizada com frequência, o nitrogênio líquido apresenta-se como melhor ambiente de preservação celular, já que nessa temperatura, todas as reações bioquímicas nas células ficam paralisadas impedindo qualquer alteração.

4.4 DESCONGELAMENTO CELULAR

Diferentemente do processo de congelamento que deve ser lento e gradual, o descongelamento das células tumorais deve ser um processo rápido. Essa etapa é caracterizada pelo resgate do material criopreservado e retomada do metabolismo celular.

As amostras de células devem ser retiradas de seu congelamento (freezer -80°C ou nitrogênio líquido) e devem ser descongeladas em banho-maria, a 37°C, com o cuidado de não molhar a tampa do tubo, evitando contaminação da amostra com a água do banho maria.

Após o completo descongelamento as células podem: (a) serem diretamente inoculadas nos animais ou (b) podem ser ressuspendidas e centrifugadas em 1000 rpm por 5 minutos, esse processo tem o objetivo de lavar as células, eliminando o crioprotetor utilizado.

Após o descongelamento, as células devem ser inoculadas em um animal utilizado somente para a proliferação celular, visto que após o descongelamento o crescimento celular é lento. Após, o desenvolvimento no primeiro animal, as células podem ser inoculadas nos animais do estudo.

REFERÊNCIAS

GUIMARÃES, D. H. **Efeito da adição de lignina nas propriedades físicoquímicas e mecânicas de poliésteres a base de glicerol e ácidos ftálico e adípico.** Dissertação de mestrado. 97p. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

PERES, C.M.; CURI, R. **Como cultivar células.** 1ª edição. São Paulo: Guanabara Koogan, 2005. 283.

SANTOS, K.M. et al. **Evaluation of Different Methods of Cryopreservation of Ehrlich. Tumor Cells.** 2015; v.36 (2): 68-73.

Figura 17: Fórmula estrutural do azul de trypan. **Fonte:** PubChem, 2017.

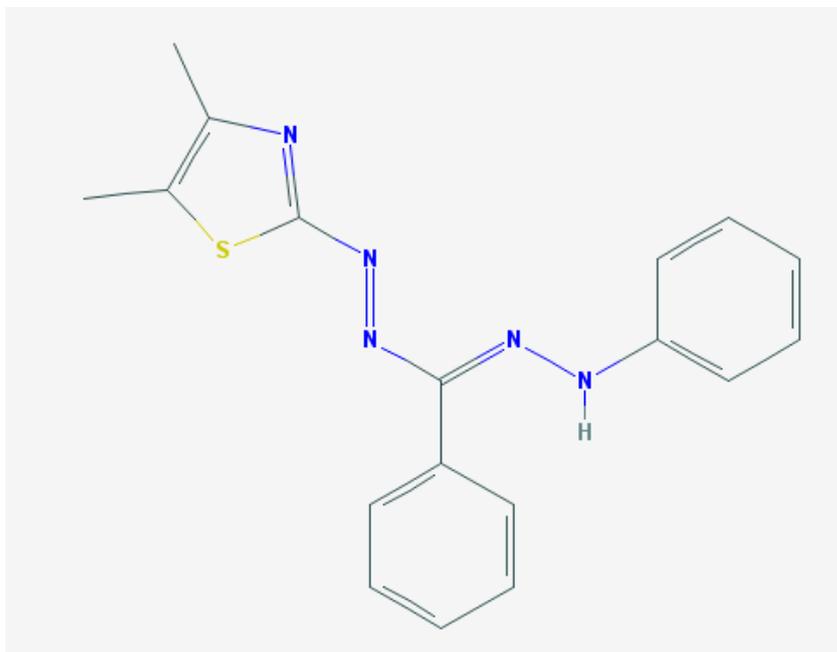


Figura 18: Fórmula estrutural do MTT. PubChem, 2017.

No método direto de avaliação da viabilidade celular, conta-se diretamente o número de células viáveis. Nesse método a contagem é realizada em câmara de Neubauer.

Antes da leitura em câmara de Neubauer, deve-se realizar a coloração das células com o Azul de Tripán. O protocolo estabelecido no Laboratório de Morfofisiologia Aplicada à Saúde utiliza 20 microlitros de líquido ascítico com 80 microlitros de solução salina (diluição de 5 vezes). Dessa solução são retirados 20 microlitros e acrescentada de 20 microlitros de solução de azul de tripan (0.5%). Dessa nova solução são retirados 20 microlitros que serão lidos na câmara de Neubauer.

O corante azul de tripan não atravessa membranas celulares integras, assim células vivas não permitem a passagem do corante, ficando transparente. As células não-viáveis ou mortas, por apresentar danos em sua membrana, permitem o influxo do corante para seu interior. Essas células coram-se de azul. Aceita-se para a inoculação uma porcentagem de 90 a 95% de células viáveis.

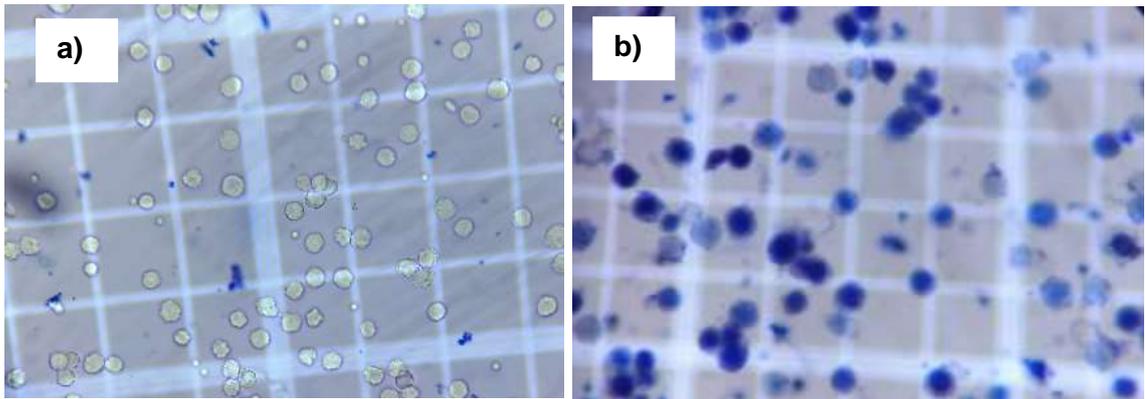


Figura 19: (a) células tumorais viáveis e em (b) células tumorais não-viáveis. **Fonte:** autor.

A câmara de Neubauer é uma lâmina de vidro com divisões que auxiliam na contagem. Possui 9 quadrados que medem 1 mm^2 de área. A contagem pode ser realizada somando as células dos quatro quadrantes externos ou somente do quadrante central. Os quadrantes externos são formados por 16 quadrados menores. Já o quadrante central é formado por mais 16 quadrados menores que por sua vez dividem-se em mais 16 quadrados, auxiliando assim a contagem.



Figura 20: Câmara de Neubauer. **Fonte:** SPLAB, 2017.

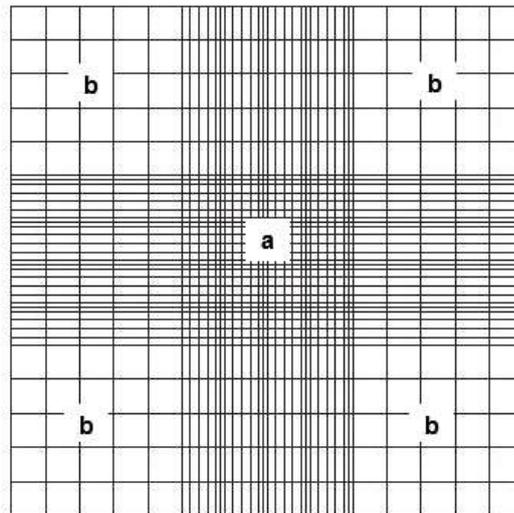


Figura 21: Quadrantes da câmara de Neubauer. Em (a) temos o quadrante central e em (b) quadrantes externos. **Fonte:** autor.

Antes de iniciar a contagem, faz-se necessário colocar uma lamínula de vidro sobre a câmara. Esta servirá como contenção para a suspensão celular que irá se formar entre a câmara e a lamínula de vidro, num espaço de 0,1 mm.

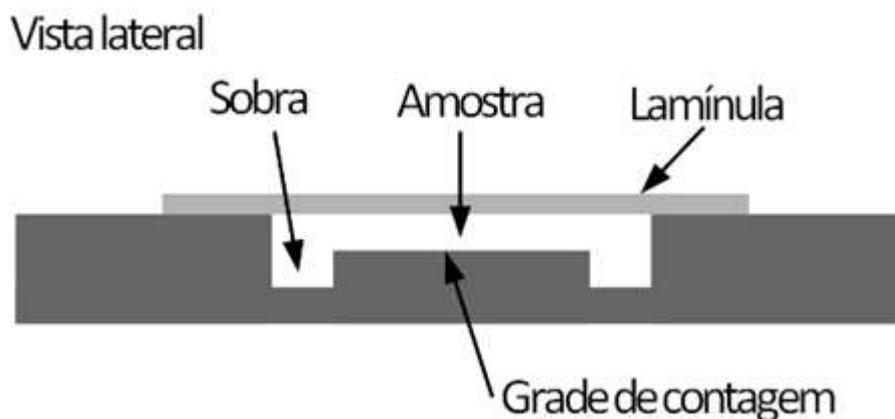


Figura 22: Vista lateral da câmara de Neubauer. **Fonte:** SPLAB, 2017.

Assim, o volume de cada quadrante será de 1 ml que equivale ao valor de células contado multiplicado por 10^4 (fator de correção da câmara). O número

contido por ml de células é dado pela fórmula: $Q1+Q2+Q3+Q4 \times 10^4 \times$ fator de diluição = nº de células / mL.

Para que não ocorra a contagem de uma célula várias vezes, deve-se realizar uma marcação de cada quadrado menor em “L” (no caso do quadrante central) ou em L nos quatro quadrantes externos maiores. As células que aparecem sobre essa linha (Esquerda e inferior) não são contadas. Esse método quantifica a concentração de células em ml. Geralmente, a concentração utilizada para a inoculação é a de 1×10^6 cel/0,5ml.

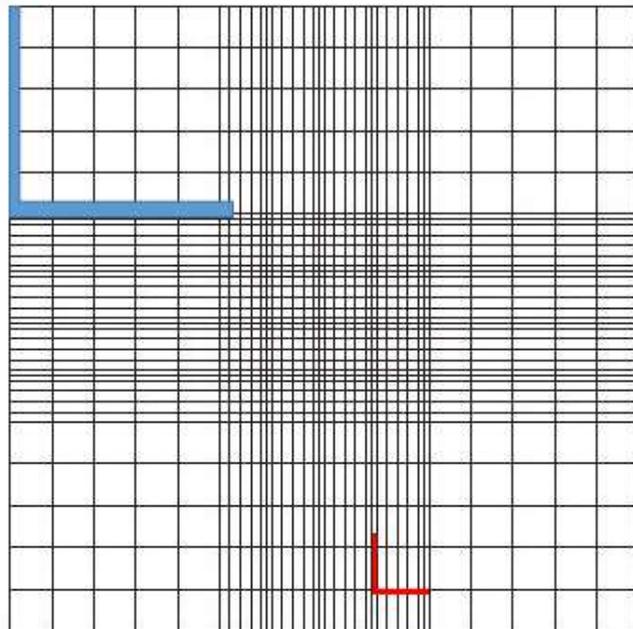


Figura 23: Divisão em “L” dos quadrantes da câmara de Neubauer. **Fonte:** autor.

O método indireto é realizado por redução do MTT. Essa substância é um sal tetrazólico e é reduzido pela desidrogenase mitocondrial de células viáveis para formar um produto azul de formazan. Essa técnica mede a respiração celular que é proporcional a quantidade de formazan produzida pelas células viáveis. A leitura é realizada em espectrofotômetro. A vantagem dessa técnica é contar somente as células viáveis o que não ocorre com o método direto de azul de trypan.

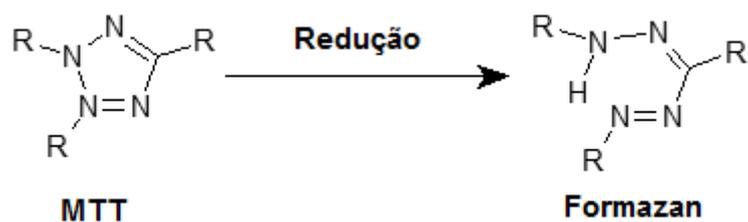


Figura 24: Redução do MTT em Formazan. **Fonte:** Adaptado de PubChem, 2017.

Após a quantificação da concentração celular e da porcentagem de células viáveis, dar-se início a fase de inoculação tumoral.

5.2 VIAS DE INOCULAÇÃO TUMORAL

A contenção do camundongo, como descrita anteriormente, é um procedimento muito importante para a realização da inoculação tumoral. Quando realizada de maneira apropriada, por pesquisador treinado e com habilidade, gera o mínimo de estresse e desconforto no animal e previne riscos para o operador.

Com a realização adequada da contenção do camundongo, o operador pode inocular o tumor pelas seguintes vias:

5.2.1 INOCULAÇÃO POR VIA SUBCUTÂNEA

Esse tipo de inoculação é fácil e raramente doloroso. Quando as células de Ehrlich são aplicadas por essa via, o tumor desenvolve-se em sua forma sólida. Geralmente, realizada na pele solta das áreas dorsolaterais dos flancos. Para esse procedimento, o animal é contido manualmente e, apoiado sobre uma toalha ou superfície limpa. A agulha é inserida sob a pele solta que é apreendida com o polegar e o indicador. Antes de injetar as células, é importante aspirar exercendo

uma pequena pressão no êmbolo da seringa para assegurar que a mesma não esteja penetrando um vaso sanguíneo. Em seguida, injeta-se as células tumorais. Um volume de 0,1 a 0,5 ml é inoculado. O número de células injetadas varia bastante na literatura especializada, contudo em média se aplica 5.0×10^6 cél/ml.

5.2.2 INOCULAÇÃO POR VIA INTRAMUSCULAR

Outra via que pode ser utilizada para o desenvolvimento da forma sólida do tumor de Ehrlich é a intramuscular. As células são injetadas no músculo da porção posterior das patas traseiras, sendo direcionadas para longe do fêmur e nervo ciático. Após a contenção manual, a agulha é inserida no músculo. Antes de injetar as células, deve-se aspirar brevemente a seringa, para certificar-se de que não haja retorno sanguíneo, no caso de a agulha penetrar um vaso sanguíneo.

A quantidade de líquido inoculado varia de 0,1 a 0,5 ml. O número de células injetadas varia bastante na literatura especializada, contudo em média se aplica 15×10^6 cél/ml.

5.2.3 INOCULAÇÃO POR VIA INTRAPERITONEAL

Imediatamente, após a contenção do camundongo, como descrito anteriormente, o animal é posicionado com sua face ventral voltada para cima. É realizada uma divisão virtual do abdômen em quatro quadrantes. Superior esquerdo e direito e, inferior esquerdo e direito. Geralmente, a injeção é aplicada no quadrante inferior esquerdo, na cavidade peritoneal entre os órgãos abdominais. Essa via suporta grandes volumes, e a quantidade de células inoculado é em média de 0,5 ml (1 a 15×10^6 cél/ml). Nessa via, o tumor desenvolve-se de forma ascítica. Esse método também é utilizado para o cultivo (repique) das células para posteriormente serem aplicadas de forma sólida ou ascítica.

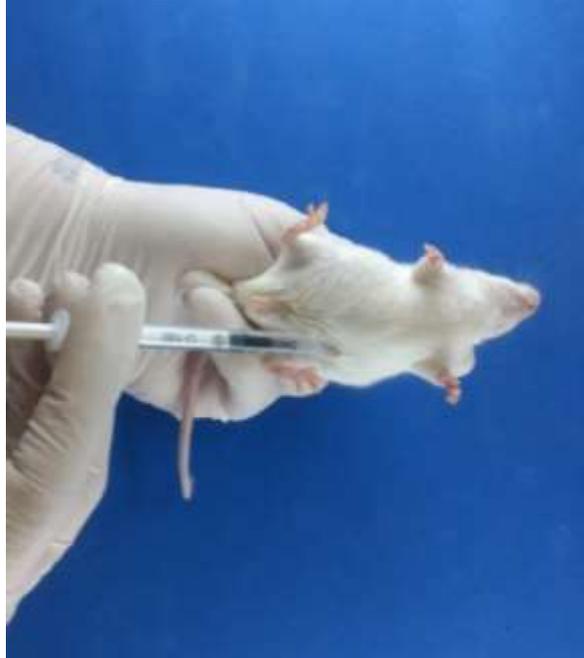


Figura 25: inoculação intraperitoneal das células do tumor de Ehrlich. **Fonte:** autor.

REFERÊNCIAS

AKEV, N. et al. Tumour Preventive Effect of Aloe vera Leaf Pulp Lectin (Aloctin I) on Ehrlich ascites Tumours in Mice. **Phytotherapy Research**. 2007; v.21 (1): 1070–1075.

ASSIS, F.A. **Efeito do selênio orgânico e da vitamina E no crescimento tumoral e na resposta imunológica ao tumor experimental de Ehrlich**. Dissertação de mestrado. 109p. Faculdade de medicina. Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

BRITO, C. V. B.; SOARES, R. H. F.C.; GOUVEIA, E. H. H. Contenção de animais. In: BRITO, M. V. H. (Org.). **Manejo Prático de Animais de Experimentação**. Belém: Eduepa, 2016. p. 45-61.

BRITO, M.V.H.; FREITAS, J.J.S. **Manutenção de tumores experimentais**. In: Marques RG. (Org). Técnica Operatória e Cirurgia Experimental. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 808-813.

FACCHINIA, J.M. et al. Antitumor activity of Pleurotus ostreatus polysaccharide fractions on Ehrlich tumor and Sarcoma 180. **International Journal of Biological Macromolecules**. 2014; v.68 (1): 72–77.

GABER, A.A. et al. Antitumor activity of two Streptomyces extracts (Ag18 & Ag20) on Ehrlich ascites tumor in mice: in vitro and in vivo studies. **Journal of Bioscience and Applied Research**. 2015; v. 1 (1): 20-29.

GENTILE, L.B. et al. Modulation of Cytokines Production by Indomethacin Acute Dose during the Evolution of Ehrlich Ascites Tumor in Mice. **Mediators of Inflammation**. 2015; v. 1 (1): 1-8.

CEUA-FIOCRUZ. **Manual de utilização de animais/fiocruz**. 1º edição. Rio de Janeiro, 2008.

SAAD-HOSSNE, R.; SAAD-HOSSNE, W.; PRADO, R.G. Efeito da solução aquosa de fenol, ácido acético e glicerina sobre o tumor ascítico de Ehrlich. Estudo experimental in vitro. **Acta Cirúrgica Brasileira**. 2004; v.19 (1): 54-58.

SILVÂNIA, M.P.N. et al. **Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP.** São Paulo : FCF-IQ/USP, 2013.

TABORDA, C.; MEHNERT, D.U.; SILVA, C.A. **Manual de Normas Técnicas. Biotério de Experimentação Animal.** Ribeirão Preto – USP. 2004

CRESCIMENTO DO TUMOR DE EHRlich: FORMAS DE AVALIAÇÃO

Pedro Iuri Castro da Silva, Emmanuel Arthur Albuquerque Aragão, Lucas Meireles Matos, Lucas José do Nascimento Cruz, Mário Arthur da Costa Leal, Renata Cunha Silva, Rosivaldo dos Santos Borges, Anderson Bentes de Lima, Katia Simone Kietzer, Robson José de Souza Domingues, Jofre Jacob da Silva Freitas

A avaliação do crescimento tumoral no modelo do tumor de Ehrlich pode ser realizada por diversas metodologias de baixo custo. Essas metodologias podem ser empregadas tanto no modelo ascítico quanto no sólido.

6.1 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL PARA A FORMA ASCÍTICA

6.1.1 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL PELA VARIAÇÃO DO PESO CORPORAL

A técnica consiste em registrar o peso diariamente dos animais em balança eletrônica de precisão. A variação do peso corporal é dada pela diferença entre a medida final (após o último dia de tratamento proposto e um dia anterior a confirmação do óbito do animal, em caso de análise da sobrevivência) e a medida inicial (antes de iniciar qualquer tratamento). Sendo os resultados expressos em gramas.

O percentual de inibição do crescimento tumoral é determinado pela expressão:

$$\% \text{ Inibição do Crescimento Tumoral} = \frac{\Delta BW \text{ grupo tumor} - \Delta BW \text{ grupo tratado}}{\Delta BW \text{ grupo tumor}} \times 100$$

Onde: ΔBW é a variação do peso corporal



Figura 26: avaliação da atividade antitumoral pela variação do peso corporal. **Fonte:** autor.

6.1.2 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL PELA VARIAÇÃO DA CIRCUNFERÊNCIA ABDOMINAL

A técnica consiste em realizar mensurações diárias da circunferência abdominal com uso de fita métrica. A variação da medida da circunferência abdominal será calculada pela diferença entre a medida final e a medida inicial. Os resultados são expressos em centímetros.

Esses dados serão utilizados para determinar o percentual de inibição do crescimento tumoral, conforme a fórmula a baixo:

% Inibição do Crescimento Tumoral	$\frac{\Delta CA \text{ grupo tumor} - \Delta CA \text{ grupo tratado}}{\Delta CA \text{ grupo tumor}} \times 100$
--	--

Onde ΔCA = variação da circunferência abdominal

Para ambas as técnicas a atividade antitumoral será classificada de acordo com percentual de inibição do crescimento tumoral em:

Ausente	Percentual de inibição tumoral for igual a 0
Discreta	Percentual de inibição tumoral for $\leq 25\%$
Moderada	Percentual de inibição tumoral for $\geq 26 - 50\%$
Elevada	Percentual de inibição tumoral for $\geq 51\%$

6.1.3 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL PELO VOLUME DA ASCITE, VOLUME DE CÉLULAS COMPACTADAS E CÉLULAS POR ML.

Esse método consiste em submeter o camundongo a eutanásia e retirar o líquido ascítico. Este será colocado em proveta graduada e será determinado o seu volume. Em seguida, para a contagem do número total de células, uma alíquota de 20 microlitros do líquido ascítico deve ser diluída com solução salina (80 microlitros). A partir disso, 20 microlitros dessa suspensão celular deve ser ressuspensa com 20 microlitros de azul de tripan e o número de células determinado em câmara de Neubauer. Todo o restante do líquido ascítico deve ser transferido para tubos graduados e centrifugado em 1000 rpm por 5 minutos. O volume de células compactadas (pellet) assim como o do sobrenadante devem ser determinados por meio de um tubo graduado. A figura 27 demonstra passo a passo essa técnica.



Figura 27: avaliação da atividade antitumoral pelo volume da ascite, volume de células compactadas e células por ml. **Fonte:** autor.

6.2 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL PARA A FORMA SÓLIDA

6.2.1 AVALIAÇÃO DO VOLUME TUMORAL

A avaliação do crescimento tumoral para o tumor sólido de Ehrlich é diferente da sua forma ascítica. Essa técnica consiste em determinar o tamanho do tumor por paquímetro e dar-se pela seguinte fórmula:

$$\text{Volume: } 0,5 \times D \times d^2 \text{ mm}^3$$

Onde D é o diâmetro maior do tumor e d a menor espessura mensurada.

6.3 AVALIAÇÃO DA ANGIOGÊNESE TUMORAL

Essa técnica de avaliação da angiogênese tumoral é realizada para a forma ascítica do modelo tumoral de Ehrlich, sendo realizada após a indução da eutanásia no animal. Após a eutanásia, é feita a dissecação e retirada do tecido peritoneal do abdômen. Esse tecido é posto em uma superfície de cor sólida e fotografado, por meio de uma câmera fotográfica com distância estabelecida para todas as fotos. A quantidade de vasos, bem como seu calibre são calculados em programas de computadores especializados.



Figura 28: avaliação da angiogênese tumoral (modelo tumoral ascítico) por meio de fotografia dos vasos sanguíneos do peritônio abdominal de camundongos. **Fonte:** autor.

6.4 AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA

A avaliação da sobrevida compõe-se como um dos itens principais na avaliação da atividade antitumoral para a forma de desenvolvimento sólido quanto ascítico. Os dados da sobrevida em conjunto com os da atividade antitumoral permitem determinar a eficácia terapêutica de tratamentos propostos.

A avaliação da sobrevida inicia-se no primeiro dia da inoculação das células tumorais. Após esse período, os animais recebem o tratamento proposto por n dias, até finalizarem o mesmo. Em seguida, o número de mortes é anotado

diariamente até 30 dias, a contar do primeiro dia da inoculação. A figura abaixo demonstra a avaliação da sobrevida.

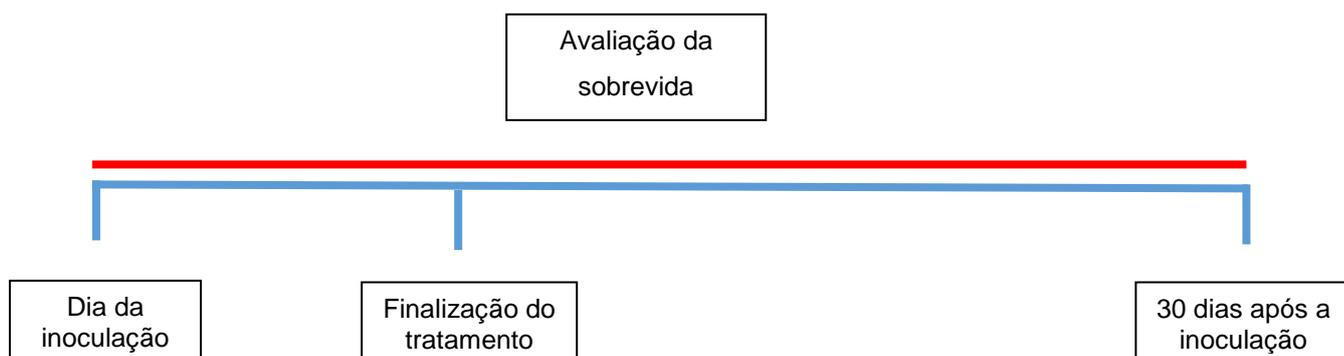


Figura 29: representação da avaliação da sobrevida de camundongos com tumor de Ehrlich. **Fonte:** autor.

A sobrevida pode ser determinada por meio de duas fórmulas descritas:

1. Tempo médio de sobrevida (TMS):

$$\text{TMS} = \frac{\sum \text{tempo de sobrevida (dias) de cada animal no grupo}}{\text{número total de animais}}$$

2. Aumento do percentual do tempo médio de sobrevida (%ILS)

$$\% \text{ILS} = \left(\frac{\text{TMS do grupo tratado} - \text{TMS do grupo controle}}{\text{TMS do grupo controle}} \right) \times 100$$

Aumento no %ILS $\geq 25\%$ sobre o grupo tumor é considerado como resposta antitumoral eficaz.

O prolongamento do tempo de vida dos animais tem sido considerado como um critério confiável para a representação de eficácia de novos protótipos antitumorais.

REFERÊNCIAS

BOTHARA, S.B.; VAIDYA, S.K. Evaluation of anticancer potential of ipomoea reniformis chois (convolvulaceae) leaves against ehrlich ascites induced cancer in mice. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**. 2015; v.1 (1): 3682-3692.

BRANDÃO, E.M. **Efeito antineoplásico do extrato aquoso do plectranthus amboinicus na forma ascítica do carcinoma de Ehrlich**. Tese de doutorado. 118f Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2012.

BREHMER, J.S. **Estudo de extratos de plantas medicinais no desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich**. Dissertação de mestrado. 60f. Universidade do Vale do Itajaí. Itajaí, 2005.

GENTILE, L.B. **Modulação por pge2 no perfil de subpopulações celulares e de citocinas na evolução do tumor ascítico de ehrlich (TAE)**. Dissertação de mestrado. 103f. Departamento de patologia. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, 2001.

MATSUZAKI, P. **Avaliação dos efeitos do extrato etanólico, resíduo butanólico e resíduo aquoso de Pfaffia paniculata sobre o crescimento do tumor de Ehrlich em suas formas ascítica e sólida**. Dissertação de mestrado. 116f. Faculdade de medicina veterinária e zootecnia. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2004.

MELLO, F.M.S. **Estudo da atividade citotóxica, antitumoral e determinação do perfil tóxico de complexos de rutênio(II)/aminoácidos em células do tumor de Ehrlich in vitro e in vivo**. Dissertação de mestrado. 96f. Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2014.

RAMOS, A.L. **Atividade imunomoduladora da alga Chlorella vulgaris em camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich**. Tese de doutorado. 98f. Faculdade de ciências médicas. Universidade estadual de Campinas. Campinas, 2008.

RICHTER, A. et al. Evaluation of the antitumor effect of lectin obtained from the latex of Euphorbia tirucalli against tumor cells of Ehrlich. **BMC Proceedings**. 2015; v.8 (1): 38.

SADEGHIANI, N. **Avaliação dos efeitos de Nanopartículas magnéticas recobertas com ácido poliaspártico no tumor sólido de Ehrlich na presença de campo magnético.** Tese de doutorado. 85f. Faculdade de medicina. Universidade de Brasília. Brasília, DF, 2008