

MARIA LAURA MEDEIROS ASSEF

ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS DO SARCOMA 180
TRATADO COM A α -D-GLUCANA
DO LÍQUEN *Ramalina celastri*

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Morfologia, área de concentração Biologia Celular, do Departamento de Biologia Celular do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

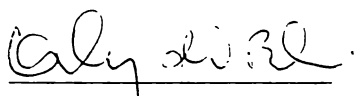
CURITIBA

1998

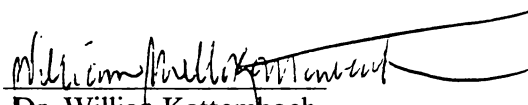
PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOLOGIA
BIOLOGIA CELULAR
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PARECER

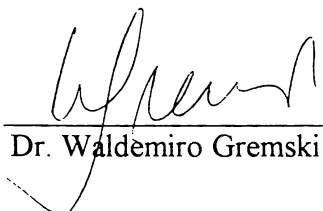
A Comissão Examinadora de Dissertação de mestrado
“ASPECTOS ESTRUTURAIS DO SARCOMA 180 TRATADO COM A
 α -D-GLUCANA DO LÍQUEN *Ramalina celatри*”, de autoria da Pós-Graduanda
MARIA LAURA MEDEIROS ASSEF, composta pelos Professores: Dra. Dorly de
Freitas Buchi (como orientadora), Dr. Willian Kattembach e Waldemiro Gremski, atribui
individualmente as seguintes notas: Dra. Dorly de Freitas Buchi, nota 10.0 (DE2); Dr.
Willian Kattembach, nota 10.0 (DE2) e Waldemiro Gremski, nota 10.0 (DE2). De
acordo com o Regimento interno do curso, a candidata foi aprovada com a nota: 10.0
(DE2), para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas. Curitiba,
30 de julho de 1998.



Dra. Dorly de Freitas Buchi



Dr. Willian Kattembach



Dr. Waldemiro Gremski

MARIA LAURA MEDEIROS ASSEF

ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS DO SARCOMA 180
TRATADO COM A α -D-GLUCANA
DO LÍQUEN *Ramalina celastri*

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Morfologia, área de concentração Biologia Celular, do Departamento de Biologia Celular do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

ORIENTADORA:

Dra. Dorly de Freitas Buchi

Universidade Federal do Paraná

Setor de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Celular

CURITIBA

1998

Ao Julio, exemplo de paciência e dedicação, que muito me estimula na realização de minha vida.

Aos nossos filhos, Fernanda e Vinicius, pela alegria que transmitem.

Aos meus pais, Luiz Adauto e Lourdes, pelo carinho e confiança fundamentais neste processo de crescimento.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Dra. Dorly de Freitas Buchi, pelas sugestões que muito contribuíram para a realização deste trabalho. Sua competência e segurança foram fundamentais para o êxito de mais esta etapa em minha vida profissional. Obrigado por sua amizade e compreensão.

Ao Prof. Dr. Waldemiro Gremski, profissional ímpar, por sua dedicação à Universidade e por quem tenho respeito e admiração.

Aos meus amigos do Laboratório, Mariana Piemonte, Jayme Bordini Jr., Daniella Grando, Ana Paula Azambuja e Rodrigo Bagatelli, pelo mutirão que fizeram para a realização deste trabalho. A alegria e o bom humor sempre foram marcantes durante nossa convivência.

À Prof^a Dra. Edith Fanta, que colocou à minha disposição o Fotomicroscópio de seu Laboratório e a Prof^a Sônia Grotzner pelo incentivo.

À Prof^a Dra. Maria Célia Jamur, pelas sugestões e realização das fotografias com Polarização no Fotomicroscópio do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

Ao Prof. Dr. Marcello Iacomini, por ceder a glucana utilizada nos experimentos.

Ao Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga, por suas sugestões decisivas e valiosa colaboração, cedendo os anticorpos para a realização da Imunohistoquímica.

À Ana Maria Carneiro Leão, pelo constante apoio, conselhos e sugestões. Suas informações científicas foram muito valiosas.

Ao Sr. Herculano Salviano dos Reis, que juntamente com as Senhoras Rosalina de Moraes e Eliane Regina Mendes muito contribuíram na confecção das lâminas histológicas.

Aos Professores e funcionários da PUC-PR, em especial aos Professores Alberto Accioly Veiga, Rubens Viana e Nelson Trevisan, pela confiança no meu trabalho e à Prof^a Silvana Cirio, por suas sugestões e permanente incentivo.

À Ana Cristina S. Greca, pela sua constante presença. Sua amizade é um presente que guardo com muito carinho.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Morfologia., por mais esta oportunidade.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Biologia Celular, em especial ao amigo Prof. Alécio Grzybowski, por seu apoio constante.

Ao Prof. Pedro Domingues Lanzieri, por me indicar o caminho da Histologia, ainda na Graduação e à Prof^a. Maria de Lourdes Zanardine de Camargo, que muito contribuiu na minha formação em Técnicas Histológicas, na Pós-Graduação.

Aos meus irmãos e cunhados, Luiz Henrique e Fátima, Sergio e Myrian, Kathia e Carlos Antônio, pela torcida que muito me estimulou.

Às amigas Claudia Tanhorffer, Ana Lúcia Tararthuch e Vera Lúcia dos Santos, pela solidariedade e amizade.

À Fabíola Stevan e Juliana Menestrine, pelas sugestões e apoio durante nossa convivência.

Aos amigos Tienne, Lourdes, Lud, Laura e Carlos, pessoas queridas que sempre estiveram ao meu lado.

À querida Rose, pela incansável ajuda na organização de minha casa, cuidando com carinho dos meus pequenos, deixando maravilhosos bolos e pudins para adoçar a minha alma.

À Isabella Elias Fernandes, da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas, pelo auxílio contínuo ao material bibliográfico.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 NEOPLASIA	1
1.2 SARCOMA 180	5
1.3 POLISSACARÍDEOS.....	7
1.4 MATRIZ EXTRACELULAR.....	9
1.4.1 Integrinas	9
1.4.2 Fibronectina	10
1.4.3 Laminina	10
2. JUSTIFICATIVA	12
3. OBJETIVOS	13
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1 MATERIAL.....	14
4.1.1 Animais	14
4.1.2 Tumor.....	14
4.1.3 Polissacarídeo	14
4.1.4 Reagentes.....	14
4.1.5 Equipamentos	15
4.2 MÉTODOS	16

4.2.1 Seleção dos animais	16
4.2.2 Preparo das células	16
4.2.3 Implantação do S-180	16
4.2.4 Tratamento com o polissacarídeo	17
4.2.5 Acompanhamento do desenvolvimento do S- 180 e coleta do material	17
4.2.6 Estatística	17
4.2.7 Microscopia de Luz	18
5. RESULTADOS	23
5.1 ASPECTOS ESTRUTURAIS DOS TUMORES NOS ANIMAIS CONTROLE DE 7 DIAS.....	23
5.2 ASPECTOS ESTRUTURAIS DOS TUMORES NOS ANIMAIS CONTROLE DE 35 DIAS.....	24
5.3 ASPECTOS ESTRUTURAIS DOS TUMORES NOS ANIMAIS TRATADOS COM A α -D-GLUCANA DE 7 DIAS.....	24
5.4 ASPECTOS ESTRUTURAIS DOS TUMORES NOS ANIMAIS TRATADOS COM A α -D-GLUCANA DE 35 DIAS.....	25
5.5 ASPECTOS IMUNOHISTOQUÍMICOS DOS TUMORES NOS ANIMAIS CONTROLE E TRATADO COM A α -D-GLUCANA:.....	26
5.5.1 Imunomarcção para Laminina.....	26
5.5.2 Imunomarcção para Fibronectina	26
5.6 ESTATÍSTICA	27
5.6.1 Volume Tumoral Médio	27
5.6.2 Inibição do crescimento	27
6. DISCUSSÃO	51
7. CONCLUSÕES	55

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
--	-----------

ABREVIATURAS E SIGLAS

α -Glu - (1→3)(1→4) α -D-glucana

BSA - Soro albumina bovina

DAB - 3,3 Diaminobenzidina

EHS - Tumor de Engelbreth - Holm - Swarm

FN - Fibronectina

Fig. - Figura

HeLa - Linhagem celular humana de carcinoma de colo uterino

kg - Quilograma

LN - Laminina

M - Molar

mg - miligrama

ml - mililitro

mm - milímetro

mm³ - milímetro cúbico

mM - milimolar

μ m - micrômetro

PAS - Ácido Periódico e Reativo de Schiff

PBS - Salina tamponada com fosfatos

p/v - Proporção peso/volume

R. celastri - Líquen Ramalina celastri

RGD - Oligopeptídeo Arginina-Glicina-Ácido aspártico

S-180 - Sarcoma 180

SD - Desvio Padrão

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01: Visão macroscópica do S-180 controle com 35 dias.	31
FIGURA 02: Visão panorâmica do S-180 controle com 7 dias.	32
FIGURA 03: Neoangiogênese no S-180 controle com 7 dias.	33
FIGURA 04: Infiltrado inflamatório no S-180 controle com 7 dias.	33
FIGURA 05: Vaso sanguíneo com leucócitos no S180 controle com 7 dias.	34
FIGURA 06: Célula tumoral entre fibras de Tecido Conjuntivo no S180 controle com 7 dias.	34
FIGURA 07: Fibras de Tecido Conjuntivo no S-180 controle com 7 dias.	35
FIGURA 08: Células tumorais do S-180 tratado com a α -Glu com 7 dias.	36
FIGURA 09: Infiltrado inflamatório do S-180 tratado com a α -Glu com 7 dias.	36
FIGURA 10: Vaso sanguíneo com leucócitos no S-180 tratado com α -Glu com 7 dias.	37
FIGURA 11: Células tumorais do S-180 controle com 35 dias.	37
FIGURA 12: Mitose de célula tumoral no S-180 controle com 35 dias.	38
FIGURA 13: Focos de calcificação no S-180 controle com 35 dias.	38
FIGURA 14: Células tumorais aderidas ao vaso sanguíneo no S-180 controle com 35 dias.	39
FIGURA 15: Células inflamatórias no S-180 tratado com α -Glu com 35 dias.	39
FIGURA 16: Mitose em célula tumoral do S-180 tratado com α -Glu com 35 dias. ...	40
FIGURA 17: Células tumorais no S-180 tratado com α -Glu com 35 dias.	40
FIGURA 18 a e b: Células tumorais no S-180 tratado com a α -Glu com 35 dias. ...	41
FIGURA 19: Fibras de Tecido Conjuntivo no S-180 tratado com α -Glu com 35 dias.	42

FIGURA 20: Utilização de anticorpo anti-LN no S-180 controle com 35 dias.....	43
FIGURA 21: Tumor EHS - controle positivo para o anticorpo anti-LN.	43
FIGURA 22: S-180 utilizado como controle para o anticorpo anti-FN.	44
FIGURA 23: Utilização de anticorpo anti-FN no S-180 controle com 7 dias.....	45
FIGURA 24: Utilização de anticorpo anti-FN no S-180 controle com 7 dias.....	45
FIGURA 25: Utilização de anticorpo anti-FN no S-180 tratado com a α -Glu com 7 dias	46
FIGURA 26: Utilização de anticorpo anti-FN no S-180 tratado com a α -Glu com 7 dias.	46
FIGURA 27: Utilização de anticorpo anti-FN no S-180 controle com 35 dias.....	47
FIGURA 28: Utilização de anticorpo anti-FN no S-180 controle com 35 dias.....	47
FIGURA 29: Utilização de anticorpo anti-FN no S-180 tratado com a α -Glu com 35 dias	48
FIGURA 30: Utilização de anticorpo anti-FN no S-180 tratado com a α -Glu com 35 dias	48
FIGURA 31: Curva de crescimento do S-180 controle e tratado com a α -Glu de <i>R. celastri</i>	49
FIGURA 32: Gráfico do Percentual de inibição do crescimento do S-180 nos grupos controle e tratado ao longo de 35 dias.	50

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Volume Tumoral Médio.....	27
TABELA 2: Inibição do Crescimento.....	28
TABELA 3: Análise de Variância para o Fator de Inibição.....	28

RESUMO

Estudos anteriores demonstraram que polissacarídeos do líquen *Ramalina celastri* são responsáveis pela inibição parcial ou total do Sarcoma 180 (S-180). Objetivamos com este trabalho avaliar sob ponto de vista histológico e imunohistoquímico as células deste tumor após o tratamento com a α -D-glucana extraída deste líquen. O modelo tumoral foi inoculado subcutaneamente em camundongos albinos suíços fêmeas. Após 24 horas, iniciou-se o tratamento. A cada 7 dias, durante 5 semanas, os tumores eram medidos e fixados em Líquido de Bouin e emblocados em parafina histológica. Foram utilizadas metodologias de coloração para microscopia de luz e para a imunohistoquímica os cortes foram incubados com anticorpos policlonais que reconhecem FN e LN e detectados com anticorpo secundário complexado com peroxidase.

O estudo estatístico mostrou inibição do crescimento tumoral e diminuição do volume tumoral médio ao longo dos 35 dias nos animais tratados com a α -D-glucana. Observou-se vasos sangüíneos neoformados e infiltrado inflamatório, sendo mais intenso nos animais tratados, sugerindo um papel estimulante do sistema de defesa para a substância, mecanismo que ainda não foi totalmente esclarecido. Figuras sugestivas de apoptose foram encontradas nos animais tratados, o que já havia sido relatado por outros autores que utilizaram esta glucana em células HeLa.

Com relação à imunomarcação, os cortes se apresentaram negativos para LN, sugerindo uma provável natureza não epitelial, visto que ainda há dúvidas sobre o tecido de origem destas células. Com relação a FN, observou-se positividade em todos os cortes. Nos tumores controle, a marcação foi mais intensa entre as células tumorais sugerindo ação na adesão destas células, enquanto que nos tratados, a marcação ocorreu no tecido conjuntivo adjacente, sugerindo ação na migração de células de defesa, provavelmente induzida pelo polissacarídeo.

ABSTRACT

Previous studies demonstrated that the polysaccharide of the Lichen *Ramalina celastri* is responsible for partial or total inhibition of Sarcoma 180 (S-180). We aimed in this work to evaluate under a histological and an immunohistochemical point of view, the cells of this tumor after the treatment with α -D-glucana extracted from this lichen. The tumoral model was subcutaneously inoculated in Swiss albino female mice. After 24 hours, we initiated the treatment. Every 7th day, for 5 weeks, the tumors were measured and the animals were sacrificed. The tumors were fixed in Liquid of Bouin and embedded in paraffin. Staining methodologies were used and for the immunohistochemical, the tumors were incubated with polyclonal antibodies against FN and LN and developed with a secondary antibody conjugated with peroxidase.

Statistical study showed significant results in inhibition of the tumoral growth and decreasing tumor mass after 35 days with α -D-glucan treatment.

It was observed neovascularization and infiltrated inflammatory, what was more intense in the α -D-glucan treated groups, suggesting a stimulating role in the defense system for this substance. Suggestive apoptosis bodies were found in the treated groups, what had already been told by other authors that used this glucan in HeLa cells culture model.

Related to the immunohistochemistry, the control and treated tumors were negative for LN, suggesting a probable non epithelial nature, because there are still doubts on the origin of S-180. FN was expressed in all groups. In the control groups, there were more intense FN expression margin tumors cells, suggesting the action of this molecule in these cells adhesion. While in the treated groups, the FN in connective tissue appeared more intense, suggesting to FN playing a role as an important for inflammatory cells adhesion and migration, probably induced by the polysaccharide treatment.

1. INTRODUÇÃO

1.1 NEOPLASIA

Intensa investigação tem sido dirigida à compreensão da biologia da célula tumoral já que isto é objeto de grande interesse para a humanidade. Alguns estudos visam esclarecer os mecanismos pelos quais as células normais se transformam em tumorais bem como conhecer e entender o comportamento destas células.

Em tecido normal a velocidade de formação de novas células é contrabalançada por mecanismos fisiológicos que levam a sua destruição. Estes mecanismos, que são responsáveis pelo equilíbrio da massa tecidual, são totalmente controlados pelo organismo que, deste modo, mantém os órgãos e tecidos dentro das proporções geneticamente programadas para cada espécie. A ruptura deste equilíbrio no sentido da excessiva produção de células anormais na composição genética e no comportamento biológico, desenvolve massas celulares de estrutura atípica, denominadas neoplasias (Catanzaro Guimarães, 1982). Sir Rupert Willis, oncologista britânico, foi quem conseguiu definir melhor o termo neoplasia: “Uma neoplasia é uma massa anormal de tecido, cujo crescimento ultrapassa e se mostra descoordenado quando comparado ao dos tecidos normais e persiste da mesma maneira excessiva após o estímulo que evocou todas as mudanças ter cessado” (Willis, 1952).

As diferenças entre as células neoplásicas e as normais podem ser divididas em: (1) propriedades de crescimento alteradas *in vitro* e *in vivo* (apresentam proliferação desregulada, falha de maturação, transplantabilidade); (2) alterações morfológicas e metabólicas (relacionadas ao processo de diferenciação); (3) alterações cariotípicas; (4) alterações antigênicas; e (5) alterações da superfície e da membrana da célula (perda de inibição por contato) (Cotran *et al.*, 1994).

Os tumores apresentam dois componentes principais básicos: o parênquima que é constituído pelas células neoplásicas em proliferação e o estroma que é formado pelo tecido conjuntivo e vasos sanguíneos, cujo desenvolvimento é

estimulado pela célula tumoral de forma que seja sempre abastecida de nutrientes e oxigênio para seu crescimento (Alberts *et al.*, 1994)

Quando comparadas com as normais, muitas alterações significantes podem ser encontradas nas células tumorais, tais como: diferenças no controle de crescimento celular, na morfologia, nas interações célula-célula, na estrutura do citoesqueleto e na expressão gênica. As células tumorais podem ser distinguidas das células normais por exames microscópicos. A microscopia de luz, apesar de sua limitação, permite estudar tecidos de uma forma geral. Morfologicamente, as células tumorais exibem características de células de rápido crescimento, como razão entre núcleo e citoplasma alta, nucléolo proeminente, muitas mitoses e relativamente poucas estruturas especializadas (Darnell *et al.*, 1995).

Geralmente, existem critérios biológicos que permitem diferenciar os tumores benignos dos malignos. Os tumores benignos têm por característica apresentar um crescimento lento e expansivo, alcançando em geral grandes proporções, podendo comprimir os tecidos adjacentes. Normalmente, esses tumores possuem contornos definidos, sendo circunscritos por uma cápsula de tecido conjuntivo indicando ausência de invasão sobre o tecido normal adjacente. Deste modo, pela remoção cirúrgica da massa tumoral, é possível obter-se cura. Por outro lado, os tumores malignos possuem crescimento rápido e infiltrativo. As células neoplásicas malignas proliferam-se mais intensamente na periferia do tumor, formando saliências ou brotos que se estendem de modo desigual destruindo o tecido circunjacente e definindo um crescimento desordenado para a massa tumoral (Stevens, 1996). Pode acontecer das células periféricas se destacarem formando focos de crescimento distantes da massa principal, disseminando-se para outras regiões do organismo através de vasos sanguíneos ou linfáticos em processo denominado metástase, tornando difícil sua erradicação (Fidler, 1991; Nicolson, 1989). A invasividade e a formação de metástases são características importantes na diferenciação entre um tumor benigno e um tumor maligno. As células tumorais atuam se reproduzindo em detrimento das normais e quando invasivos, invadem territórios reservados para outras células. Como consequência, acabam por provocar significativos danos aos tecidos (Alberts, 1994).

Outra característica no que se refere à diferença entre tumores malignos e tumores benignos está no grau de diferenciação; os tumores malignos são pouco diferenciados ou indiferenciados, enquanto que os tumores benignos são bem diferenciados, sendo constituídos por células semelhantes às células do tecido de origem.

Na maioria dos casos, o exame histopatológico é o método ideal para distinguir um tumor benigno de um maligno. Em geral, os tumores benignos apresentam células com núcleos relativamente pequenos, citoplasma abundante e raras mitoses. As células dos tumores malignos por sua vez, apresentam variações importantes de forma e volume, sendo seus núcleos volumosos em relação ao citoplasma.. Existem habitualmente grandes nucléolos, refletindo a atividade sintética dessas células. Uma característica morfológica importante nos tumores malignos é a presença de figuras de mitose atípicas ou anômalas. Nas mitoses atípicas, podem-se organizar fusos mitóticos multipolares com formação de várias placas equatoriais, originando as mitoses multipolares. Os cromossomos podem se duplicar mas não se separar, originando células hipercromáticas (hiperplóides), ou seja, células com maior número de cromossomos que as células normais, ou ainda, pode acontecer que um ou mais cromossomos não se separe totalmente, havendo uma distribuição desequilibrada durante a anáfase, do que resulta a formação de figuras mitóticas assimétricas, originando células aneuplóides (Cotran *et al.*, 1994).

Quanto à histogênese, as neoplasias são classificadas segundo sua derivação dos diversos tecidos matrizes. A regra geral consiste em nomear o tecido de origem seguido do sufixo *oma*. A base histogenética é presumida de semelhança histológica, ou seja, o tecido de origem é deduzido pela semelhança do parênquima neoplásico com o tecido normal. Desta forma em sentido genérico, os carcinomas designam tumores malignos derivados do epitélio, enquanto os sarcomas, os tumores malignos de origem conjuntiva (Catanzaro Guimarães, 1982).

O termo neoangiogênese se refere ao desenvolvimento de novos vasos sangüíneos. O estímulo que promove este fenômeno pode ser proveniente diretamente das células tumorais ou indiretamente das células inflamatórias que são

atraídas para o local. Sugere-se que a habilidade de formar novos vasos sanguíneos seja um pré-requisito para o desenvolvimento tumoral (Blood; Zetter, 1990). Desta forma, a célula tumoral pode estimular o desenvolvimento dos vasos sanguíneos para que ela seja sempre abastecida de nutrientes e oxigênio para o seu crescimento. Estudos em Microscopia de Luz e Imunohistoquímica concluíram que o número e a densidade de microvasos em tumores malignos está diretamente relacionado com seu potencial de invasão e de produzir metástases (Fidler; Ellis, 1994). As células endoteliais dos vasos sanguíneos de tumores se dividem rapidamente, diferentemente do que ocorre em tecidos normais. Esta divisão é induzida por fatores angiogênicos tais como o fator de crescimento do endotélio vascular (EVGF, Endothelial Vascular Growth Factor)(Hanahan, 1997).

Quando o suprimento sanguíneo é inadequado, ocorre queda na produção de energia pelas mitocôndrias devido a falta de oxigênio e glicose. Desta forma, alguns tipos de proteínas transportadoras de membrana passam a não funcionar de maneira satisfatória, provocando um desequilíbrio iônico dentro da célula. A concentração intracelular de íons Ca^{++} é normalmente baixa, na ordem de 10^{-7}M , quando comparado a concentração extracelular que aparece em torno de 10^{-3}M . Nas células normais, os íons Ca^{++} encontram-se armazenados no retículo endoplasmático e nas mitocôndrias. A entrada de íons Ca^{++} no citoplasma, ocorre devido a permeabilidade aumentada dos canais para estes íons, que assim ativam sistemas enzimáticos como as fosfolipases endógenas, as quais por sua vez, vão modificar os fosfolípídeos das membranas ou as proteases, que acabam por desestruturar o citoesqueleto. Com a diminuição da eficácia da bomba Na^+K^+ ATPase, devido a depleção de ATP, ocorre entrada de Na^+ juntamente com água que se acumula nas cisternas do retículo endoplasmático provocando a tumefação da célula. Este fato provoca dispersão de ribossomos e polirribossomos acarretando uma queda funcional na síntese de proteínas. Com a falta de oxigênio, o mecanismo de produção de energia fica restrito a glicólise, fazendo com que o pH intracelular fique baixo devido a produção excessiva de lactatos. A ação de enzimas sobre as membranas, faz com que ocorra ruptura de lisossomos com liberação de suas enzimas para o citoplasma que encontram um meio de pH ácido para suas

atividades. Desta forma, ocorre então uma digestão enzimática dos componentes celulares, desencadeando a dissolução da célula. Os eventos bioquímicos e fisiológicos descritos até aqui, levam a um dano irreversível ocasionando a morte celular. Como primeiro evento observado em cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina, as células necrosadas normalmente apresentam-se com eosinofilia citoplasmática, núcleo pequeno e intensamente basofílico (picnose), indicando cessação de transcrição de DNA. A partir de então, induzido por nucleases, ocorre fragmentação nuclear (cariorrexe) e posteriormente sua dissolução (cariólise). A célula se transforma em uma massa de proteínas parcialmente desnaturadas com citoplasma fortemente eosinofílico (Montenegro; Franco, 1995).

A apoptose é um tipo de morte celular caracterizada por alterações morfológicas diferenciadas, como a formação de projeções citoplasmáticas contendo organelas celulares, volume celular diminuído, cromatina condensada e degradação do DNA devido a endonucleases. Este processo culmina com a fragmentação da célula em corpos apoptóticos, de tamanhos variáveis, ligados ou não à membrana, que podem ou não apresentar cromatina, os quais são rapidamente fagocitados.. Neste caso não ocorre resposta inflamatória, característica da necrose. Consequentemente, a apoptose serve como mecanismo de limpeza e eficiência para a eliminação de células indesejadas. A regulação da apoptose envolve tanto interações de sinais extracelulares, quanto de sensibilidade intrínseca da célula. Assim, a apoptose não é somente induzida por fatores fisiológicos mas pode também ser deflagrada por quimioterapia e radioterapia (Staunton; Gaffney, 1995; Verhaegen, 1998)

1.2 SARCOMA 180:

O Sarcoma 180 (S-180), também conhecido como Tumor de Crocker, é um tumor indiferenciado descoberto em 26 de outubro de 1914. O tumor primário foi encontrado em ratos albinos machos na região axilar direita e diagnosticado na época como carcinoma, mas o tecido de origem não foi especificado, não se sabendo se tratava-se de uma neoplasia cutânea ou mamária. O tumor pode ser

transplantado por inoculação subcutânea, intramuscular ou intraperitoneal. Ele cresce rapidamente em 90 a 100% dos animais inoculados, ocorrendo regressão natural em aproximadamente 8 a 10% destes. Depois de sucessivos transplantes subcutâneos o padrão histológico do tumor apresentou variações de forma a mostrar aspecto de carcinoma e de sarcoma. As células tumorais tem aproximadamente o mesmo tamanho, com forma variável. O citoplasma é basófilo e o núcleo hipercromático. Constatou-se a presença de algumas fibras reticulares entre as células tumorais e ausência de fibras colágenas, as quais apareciam somente no estroma que dividia o tumor. A região central do tumor é necrótica. Foi observada a ausência de cápsula. O tumor invade o músculo estriado esquelético, o tecido adiposo, nervos e vasos sanguíneos adjacentes(Stewart *et al.*, 1959).

Aparentemente, o S-180 cresce mais rapidamente em animais jovens do que em animais adultos. Nos tumores de 20 dias, as medidas dos tumores dos camundongos jovens foram o dobro das dos adultos (Bischoff; Long, 1936).

O S-180 se infiltra nas estruturas vizinhas e no tecido celular subcutâneo podendo dar origem a novos tumores. Ele aparece como uma massa sólida, com escasso estroma e numerosas mitoses típicas e atípicas. Suas células se arranjam em ninhos ou cordões com fibrilas colágenas interpostas. Entre os ninhos de células tumorais, são vistas áreas necróticas, que são maiores quanto maior é a idade do tumor. As células são de forma poliédrica com escassa variação de tamanho e os núcleos aparecem em posição central no citoplasma que se mostra levemente basófilo. O tumor se encontra rodeado por tecido conjuntivo que envia septos para dentro da massa tumoral. Não foi observada a existência de fibras elásticas. Vasos sanguíneos foram encontrados no estroma (Zuckerberg, 1972)

Quando observadas em microscopia eletrônica, as células do S-180 apresentam contatos fechados nas regiões intercelulares. Deste modo pode-se concluir que a presença de especializações características da periferia de células epiteliais, permite a identificação do S-180 como carcinoma. (Zuckerberg, 1973).

Animais portadores de S-180 tratados com o antibiótico Sporamicina mostraram regressão tumoral acentuada e grande infiltração de monócitos,

linfócitos e macrófagos após 20 dias de tratamento. No 5º dia após a administração da droga além de expansão e lise do citoplasma, ocorreu expansão do núcleo e nucléolo das células tumorais. No 7º dia as células tumorais sofreram degeneração. No 10º dia, nos animais que não receberam tratamento, foi possível observar infiltração de linfócitos ao redor do tumor e uma região necrótica na parte central. O tecido tumoral se infiltrava pelo tecido normal adjacente (Kawakubo *et al.*, 1980).

Com relação a ulceração da pele, esta se produz geralmente ao redor do 28º dia após a inoculação subcutânea, e os animais morrem neste mesmo tempo (Zuckerberg, 1972).

1.3 POLISSACARÍDEOS:

Os líquens consistem da associação de fungos e algas. O conhecimento da composição química de líquens se torna necessário já que estes são utilizados como matéria prima para medicamentos e alimentos (Czeczuga e Skult, 1988). Dentre os grupos de substâncias químicas presentes encontram-se os carboidratos (Berzelius, 1815; Culberson, 1969; Pueyo, 1980 a, 1980 b, 1981). Entre os polissacarídeos encontrados em grandes quantidades nos líquens destacam-se as glucanas (Gorin *et al.*, 1993).

Certos polissacarídeos podem apresentar atividade biológica, variando bastante quanto a sua composição e, conseqüentemente, em suas estruturas químicas e propriedades físicas. A atividade anti-tumoral tem sido documentada em alguns polissacarídeos isolados das mais diversas fontes, tais como: fungos (Mizuno *et al.*, 1995), algas marinhas (Noda *et al.*, 1990), líquens (Pereira *et al.*, 1994) e plantas superiores (Pienta *et al.*, 1995). Além disso, estas moléculas apresentam baixa toxicidade *in vivo* (Mizuno *et al.*, 1992). Certos polissacarídeos são considerados modificadores da resposta imunológica. As (1→3),(1→6)-β-D glucanas estimulam sistematicamente o sistema imunológico, resultando em atividade anti-tumoral, anti-bacteriana, anti-viral, anti-coagulante e de cicatrização (Bohn e BeMiller, 1995).

Recentes avanços na pesquisa dos polímeros de carboidratos têm mostrado que além das funções metabólicas e estruturais, estas moléculas exercem importantes funções na matriz extracelular (Schuppan *et al.* 1992), nos processos de reconhecimento e na adesão celular (Durand, 1992; Pardi *et al.*, 1992; Hogg; Landis, 1993; Mackay; Imhof, 1993), entre outros. Além disso, os polissacarídeos estão envolvidos em outras situações fisiológicas, como a ação estimulatória do sistema imunológico (Suzuki *et al.*, 1985; Arinaga *et al.*, 1992; Johnson *et al.*, 1992; Ross; Vetvicka, 1993) e a inibição de metástases tumorais (Parish *et al.*, 1987; Coombe *et al.*, 1987; Parish; Snowden, 1988).

Desde as primeiras descobertas sobre as diferenças metabólicas entre células normais e tumorais, o interesse em se aplicar este conhecimento na terapêutica do câncer tem aumentado. Alguns tipos de drogas quimioterápicas são citotóxicas e podem agir em fases específicas do ciclo celular, exercendo assim sua atividade em células que se encontram em processo de divisão tais como as células neoplásicas, já que estas apresentam alto índice de proliferação (Calabresi; Chabner, 1991). Porém a utilização destas drogas, na maioria dos casos causa importantes efeitos nocivos também ao metabolismo de células normais, limitando assim este tipo de terapia.

A α -D-glucana extraída de *Ramalina celastri* (*R. celastri*) apresenta ligações glicosídicas do tipo (1 $\rightarrow$ 3) e (1 $\rightarrow$ 4), na proporção de 3:1, o que foi observado por Ressonância Nuclear Magnética de ^{13}C (Miceno, 1991). A (1 $\rightarrow$ 3) e (1 $\rightarrow$ 4) α -D-glucana (α -Glu), apresentou efeito citotóxico sobre células HeLa provocando apoptose o que foi observado através de microscopia de luz e microscopia eletrônica (Carneiro Leão *et al.*, 1997).

A α -Glu foi testada frente ao Sarcoma 180 em uma única aplicação intraperitoneal 24 horas após a implantação do tumor e a dose de 200 mg.kg $^{-1}$ foi a que apresentou resultados mais significativos em relação a atividade anti-tumoral. Nesta dose, o percentual de inibição do crescimento do S-180 foi de 81% nos animais tratados de 35 dias. (Carneiro Leão, 1998).

1.4 MATRIZ EXTRACELULAR

Os tecidos são formados por células e por um espaço extracelular composto por uma rede de macromoléculas, secretadas pelas próprias células, denominado de matriz extracelular. As duas classes principais de macromoléculas extracelulares que formam a matriz são as cadeias de polissacarídeos e as proteínas fibrosas que podem se apresentar de duas formas funcionais: as estruturais, como por exemplo o colágeno e a elastina, ou as adesivas, caso da fibronectina e da laminina (Alberts *et al.*, 1994). Esta matriz desempenha um papel muito ativo e complexo na regulação do comportamento das células com as quais faz contato, influenciando o seu crescimento, migração, adesão, proliferação, forma e função.

O mecanismo pelo qual a célula entra em contato com a matriz extracelular, desencadeando assim os processos biológicos produzidos por esta, é denominado adesão celular. Para que ocorra este mecanismo, é necessário a interação entre os componentes da matriz, os receptores destes nas células e as proteínas do citoesqueleto que se associam com estes receptores (Yamada; Miyamoto, 1995; Clark; Brugge, 1995). A adesão das células umas às outras e à matriz parece ser fator fundamental para o desenvolvimento embriológico, para a atuação de células da resposta inflamatória, na formação de metástases, bem como com outros processos de origem invasiva e degenerativa (Liotta *et al.*, 1986).

1.4.1 Integrinas

A maioria das funções biológicas atribuídas aos componentes da matriz estão vinculadas às interações destas moléculas com as células através de receptores presentes na superfície das mesmas, e destes os mais extensamente caracterizados são os constituintes da família das integrinas. As integrinas são glicoproteínas transmembranas heterodiméricas, compostas por duas subunidades α e β associadas não covalentemente e expressas na maioria das células. Uma característica muito importante das integrinas é a sua capacidade de reconhecer proteínas da matriz extracelular, reconhecimento que é feito por ambas as cadeias e ocorre pela interação com o peptídeo RGD (arginina-glicina-ácido aspártico)

(Ruoslahti,1997). A seqüência RGD está presente na fibronectina, no fibrinogênio, na vitronectina, na laminina e no colágeno tipo I. No caso da laminina, esta seqüência parece não estar envolvida no seu reconhecimento pelas integrinas (Kühn, 1994).

1.4.2 Fibronectina

A Fibronectina (FN) é uma glicoproteína adesiva presente na forma insolúvel na matriz extracelular e na forma solúvel no plasma sanguíneo, que parece exercer papel na interação da matriz com as células e das células umas com às outras. Apresenta massa molecular que varia de 400 a 440 kD e é composta por duas cadeias polipeptídicas similares denominadas A e B, que se apresentam unidas por duas pontes dissulfeto nas porções carboxi-terminal de ambas as cadeias. Apresenta vários domínios de ligação para diferentes moléculas como o colágeno, glicosaminoglicanos, heparina e com a superfície celular através das integrinas, permitindo que esta molécula desempenhe diversas funções, tais como adesão, migração, crescimento e diferenciação celular e organização da matriz extracelular (Ruoslahti, 1988 e Veiga *et al*, 1996).

Existe um alto grau de homologia entre a FN de várias espécies, mas a estrutura da molécula varia de acordo com o tipo celular que a expressa devido ao fato de derivarem de um único gene cujo RNA pré-mensageiro sofre processamento alternativo gerando diferentes mRNAs, o que permite que a célula produza o tipo de FN mais adequado para as necessidades do tecido (Schwarzbauer, 1991).

O sítio de ligação da FN com as integrinas se localiza no peptídeo RGD (arginina-glicina-ácido aspártico), presente na molécula de FN. O reconhecimento desta seqüência determina os fenômenos de adesão celular (Akiyama *et al*, 1990).

1.4.3 Laminina

A laminina (LN) é uma glicoproteína adesiva específica de membrana basal (tipo especializado de matriz extracelular). Ela foi originalmente isolada do tumor murino EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) (Timpl *et al*, 1979). É uma das principais

proteínas não colagênicas da matriz extracelular. Apresenta-se composta de três subunidades (cadeias α , β e γ), ligadas por pontes dissulfeto formando uma estrutura cruciforme (Akiyama *et al*, 1990).

Devido a existência de diversas isoformas de laminina, esta molécula aparece envolvida em uma grande variedade de processos biológicos, tais como, na diferenciação, adesão, migração e proliferação celular (Trygvasson, 1993), além de ser um importante fator quimiotático nos processos de migração celulares tumorais e metastáticos (Zetter, 1990). Quando associada a outros componentes, participa da arquitetura molecular da matriz extracelular (Yurchenco *et al*, 1992).

A laminina apresenta vários sítios de ligação para diferentes moléculas, entre elas pode-se citar o colágeno tipo IV, diversas integrinas, heparina e proteoglicanos além da entactina (Mercúrio, 1995).

2. JUSTIFICATIVA

O modelo do Sarcoma 180 tem sido pesquisado em diversos laboratórios pela facilidade de manutenção da linhagem tumoral em animais de biotério, portanto um modelo experimental de relativo baixo custo. Além disso o comportamento destas células tumorais, suas mitoses típicas e atípicas, assemelham-se às de outras células anaplásicas. Isto se torna importante na medida que se procura avaliar novos modificadores da resposta biológica e se estuda diferentes tratamentos para neoplasias, inclusive os quimioterápicos.

Este trabalho investiga a atividade biológica de polissacarídeos de líquens, mais especificamente da (1→3) (1→4) α -D-glucana, substância esta que se acredita ter atividade anti-tumoral sobre o S-180, ampliando o campo de estudo a respeito de compostos que apresentem algum mecanismo de ação sobre células neoplásicas ou sobre a matriz extracelular onde estão inseridas.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar sob o ponto de vista histológico as células do Sarcoma 180 na forma sólida e o tecido conjuntivo circunjacente, após o tratamento com a (1→3)(1→4) α -D-glucana extraída do Líquen *Ramalina celastri*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Observar e descrever o aspecto macroscópico dos tumores nos animais controle e tratado com a α -D-glucana
2. Através da utilização de Microscopia de Luz e de Polarização, observar e descrever:
 - * a morfologia das células tumorais dos animais controle e tratado com a α -D-glucana
 - * aspectos do processo inflamatório nas áreas periféricas dos tumores nos animais controle e tratado com a α -D-glucana
 - * aspectos morfológicos das áreas necróticas centrais;
 - * a distribuição das fibras do tecido conjuntivo adjacente ao tumor e nas regiões entre as células tumorais nos animais controle e tratado com a α -D-glucana;
3. Comparar a matriz extracelular dos tumores controle e tratado com a α -D-glucana, com a utilização de Técnicas de imunohistoquímica para fibronectina e laminina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*), suíços, albinos, fêmeas, com idade entre 28 e 32 dias e peso médio de 21g do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

4.1.2 Tumor

O modelo tumoral empregado foi o Sarcoma 180, obtido do Instituto Nacional do Câncer, RJ e mantido através de passagens intra-peritoneais semanais em camundongos no Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

4.1.3 Polissacarídeo

A (1→3)(1→4) α -D-glucana (α -Glu) foi extraída e purificada do Líquen *Ramalina celastri* (coletado na região de Curitiba-PR) de acordo com Miceno, (1991), pelo Laboratório de Química de Carboidratos coordenado pelo Prof. Dr. Marcello Iacomini do Departamento de Bioquímica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

4.1.4 Reagentes

Os reagentes utilizados foram de grau analítico das seguintes procedências:

Merck - Álcool Etílico, Polymont, Hematoxilina, Eosina Amarelada, Azul de Anilina, Fucsina Ácida, Ácido Fosfomolibdico, Floxina, Ácido Pícrico

Reagen - Xileno, Benzeno, Parafina Histológica, Formaldeído,

Cinética Química - Ácido Acético Glacial

Nuclear - Ácido Fosfotúngstico, Sirius red

Sigma - Organocilana, BSA

Os anticorpos policlonais que reconhecem monoespecificamente a laminina e os anticorpos policlonais que reconhecem monoespecificamente a fibronectina, foram obtidos em coelhos através de injeções intramusculares a cada 21 dias destas proteínas purificadas, utilizando-se poliacrilamida como adjuvante da resposta imune. O protocolo foi baseado em Harlow e Lane de 1988. Os respectivos soros foram testados quanto a suas especificidades através de reações de Dot-blot e reações de Western-blot, além de reações de imunohistoquímica. Esse protocolo foi realizado pelo Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga no Laboratório de Matriz Extracelular coordenado pelo Prof. Dr. Waldemiro Gremski do Departamento de Biologia Celular do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

O anticorpo secundário cabra anti-IgG de coelho complexado com peroxidase foi adquirido junto ao Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.

4.1.5 Equipamentos

Balança Digital Sartorius

Banho Maria Fanem Modelo 100

Capela Permutation

Estufa Fabbe Modelo 119

Fotomicroscópio Axiophot Zeiss Modelo 7082

Fotomicroscópio Olympus Modelo BHS

Micrótomo Americal Optical Modelo 820 (Espencer)

Navalha Leica 16cm/c

pHmetro Micronal

Placa Aquecedora Quimis Modelo 313/11

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Seleção dos animais

Os camundongos foram selecionados considerando-se peso, idade, e aspecto geral. Os lotes foram constituídos de 25 animais para o grupo controle e 25 para o grupo tratado com o polissacarídeo. Ambos os grupos foram alimentados normalmente com ração e água e mantidos no Biotério sob condições adequadas de luz e temperatura.

4.2.2 Preparo das células

Aspirou-se o líquido ascítico dos animais que mantinham a linhagem tumoral. Este líquido de cor âmbar foi colocado em tubo de ensaio estéril no gelo, o que auxilia a viabilidade das células. Posteriormente, centrifugou-se durante aproximadamente 3 minutos a 70g, o que possibilitou a separação das células do líquido ascítico. Retirou-se o precipitado e realizou-se diluições de 1:400 em solução de NaCl 150 mM. A partir desta solução foi realizado o teste de viabilidade celular que consiste da técnica do corante vital Azul de Tripán (Phillips, 1973). Este corante preparado a 0,04% (p/v) penetra apenas em células em que a membrana plasmática perdeu a sua integridade. As células coradas portanto, foram consideradas como não viáveis. Neste trabalho foram utilizados somente as suspensões celulares com viabilidade acima de 95%.

A contagem das células foi realizada em Câmara de Neubauer, de forma a implantar-se $5,0 \times 10^6$ células/ animal, número este estipulado para o desenvolvimento do S-180 (Yamada *et al*, 1984; Kishida *et al.*, 1989).

4.2.3 Implantação do S-180

Fêz-se uma injeção subcutânea de 0,1 ml da solução ($5,0 \times 10^6$ células/animal) na região inter-escapular direita de todos os animais.

4.2.4 Tratamento com o polissacarídeo

O tratamento foi realizado 24 horas após a implantação do tumor. Os animais controle numerados de 1 a 25, receberam 0,5 ml de solução de NaCl 150 mM estéril via intra-peritoneal. Os animais tratados numerados de 26 a 50, receberam 0,5 ml da solução de α -Glu (200 mg.kg⁻¹ em NaCl 150mM) também de forma intraperitoneal.

4.2.5 Acompanhamento do desenvolvimento do S- 180 e coleta do material:

Para acompanhamento e avaliação final dos efeitos dos polissacarídeos nos animais tratados utilizou-se a metodologia recomendada por Bradner *et al.*(1958).

O acompanhamento foi realizado durante 35 dias através da observação do estado geral dos animais controle e tratado. Semanalmente, antes da coleta do material para exame anatomo-histopatológico, foram realizadas medidas perpendiculares nos tumores com um paquímetro. A coleta foi realizada através de incisão na região inter-escapular dos animais previamente anestesiados com éter nos 7°, 14°, 21°, 28° e no 35° dias após o tratamento com o polissacarídeo.

A cada semana, 5 animais do grupo controle e 5 animais do grupo tratado eram sacrificados perfazendo um total de 50 animais. Utilizou-se para resultados em Microscopia de Luz, os tumores dos animais de 7 e 35 dias pois os intermediários apresentaram morfologia semelhantes.

4.2.6 Estatística

Os valores obtidos pelas medidas perpendiculares foram utilizados para calcular o volume tumoral médio (VTM) segundo a fórmula:

$$VTM = C(L)^2/2,$$

onde: VTM, Volume Tumoral Médio (mm³); C, Comprimento da massa tumoral (mm); e L, Largura da massa tumoral (mm) (Ren *et al.*, 1995) (Teste de Tukey, p>0,05).

O percentual de inibição do crescimento do tumor foi calculado através do número de animais que não desenvolveram o S-180 em relação ao número total de animais de cada grupo.

O teste de significância realizado neste experimento foi o da ANOVA (Análise da Variância para um fator e teste de Student: $p > 0,05$; Microsoft Excel - Versão 7.0).

4.2.7 Microscopia de Luz

4.2.7.1 Fixação

Após a retirada, os tumores foram pesados em balança analítica e imediatamente colocados em recipientes com Fluido de Bouin por 24 horas à temperatura ambiente (Culling *et al.* 1985). O excesso de fixador foi removido em lavagens sucessivas em álcool etílico 70%.

4.2.7.2 Desidratação

A desidratação foi realizada em série crescente de álcool etílico (70%, 80%, 90%, 95% e em quatro séries de álcool etílico, durante 1 hora em cada.

4.2.7.3 Diafanização

A diafanização foi efetuada em banhos de benzol. O procedimento se deu da seguinte maneira:

Álcool Absoluto + Benzol (1:1) - 1 hora

Benzol - 40 minutos

Benzol - 30 minutos

Benzol - 20 minutos

4.2.7.4 Impregnação e Inclusão

A impregnação foi realizada em dois banhos de parafina histológica com duração de 2 horas cada um, em estufa de 58 à 60°C. A inclusão foi realizada em parafina histológica .

Foram obtidos cortes de 4µm de espessura em micrótomo, que posteriormente foram distendidos em placa aquecedora em lâminas de vidro de 1mm de espessura, previamente cobertas com Albumina de Mayer (Culling *et al.*, 1985).

4.2.7.5 Coloração

Foram realizadas as seguintes técnicas de coloração:

- Hematoxilina - Eosina (Beçak; Paulete, 1976)
- Tricrômico de Masson (Langeron, 1949)
- Tricrômico de Picrosirius - Hematoxilina (Junqueira *et al.*, 1979)
- PAS (Beçak; Paulete, 1976)

Cada técnica utilizada tinha por objetivo evidenciar determinada estrutura ou tipo celular específico.

Considerando-se que as técnicas de Hematoxilina-Eosina, Tricrômico de Masson e PAS são hoje universalmente adotadas não será detalhada a sequência metodológica da coloração. Em relação ao Tricrômico de Picrosirius-Hematoxilina (Junqueira *et al.*, 1979), torna-se necessário mencionar que, após o material ser seccionado, os cortes histológicos foram desparafinados e hidratados sendo imersos então, na solução de Picrosirius (solução I) por 1 hora. Posteriormente, foram lavados em água corrente e corados pela Hematoxilina de Harris (solução II) durante dois minutos. Seguiu-se a lavagem em água corrente e a desidratação em álcool etílico.

Solução I - Picrosirius

Adiciona-se 0,1 g de Sirius - Red em 100 ml de solução saturada de ácido pícrico.

Solução II - Hematoxilina de Harris

É a Hematoxilina comumente utilizada nos laboratórios de Histotecnologia.

Este método, associado à microscopia de polarização, permite evidenciar as fibras colágenas presentes em tecidos animais.

4.2.7.6 Imunomarcacão com Peroxidase para componentes da Matriz Extracelular:

a) Fibronectina

Para detecção de fibronectina na matriz extracelular do Sarcoma 180, foram utilizados cortes histológicos dos tumores controles e tratados de 7 dias e 35 dias .

O anticorpo primário policlonal monoespecífico anti-fibronectina foi produzido e gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga do Laboratório de Matriz Extracelular coordenado pelo Prof. Dr. Waldemiro Gremski do Departamento de Biologia Celular do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

As lâminas que receberam os cortes foram previamente cobertas com organocilana . A desparafinização foi realizada em xilol durante 24 horas, e a hidratação em série decrescente de álcool etílico (100%, 95%, 80% e 70%) durante 10 minutos em cada solução. Para o bloqueio dos aldeídos livres foi utilizado uma solução contendo hidróxido de amônio em álcool 95%, em câmara úmida, no intervalo do álcool 95% e 80%. Posteriormente, foram realizados dois banhos de água destilada durante 5 minutos cada. A partir disso, as lâminas foram transferidas para câmara úmida, sendo lavadas em solução de lavagem (PBS pH 7,2 com BSA

1% e Tween 20 a 0,01%). O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com uma gota de peróxido de hidrogênio a 10V (comercial) sobre o corte durante 5 minutos. Posteriormente os cortes receberam banho na solução de lavagem permanecendo nesta solução por mais 30 minutos para o bloqueio dos sítios antigênicos. A incubação com o anticorpo primário policlonal diluído na solução de lavagem descrita acima, foi realizada à 4°C por 18 horas na proporção de 1:500. Para o controle foi omitido o anticorpo primário e em seu lugar o corte recebeu solução de lavagem nas mesmas condições. Após a incubação, os cortes foram lavados três vezes durante 5 minutos, para então receberem o anticorpo secundário conjugado com peroxidase, diluído em PBS pH 7,2 na proporção de 1:50, durante 2 horas. Novamente as lâminas contendo os cortes receberam três banhos na solução de lavagem, de 10 minutos cada. A revelação foi realizada em solução de 3,3 Diaminobenzidina (DAB), (5µl de DAB em 1,25ml de PBS pH 7,2 e 5µl de peróxido de hidrogênio a 0,5%), em ambiente escuro. Após a revelação da peroxidase (os cortes apresentaram coloração castanha) foi realizado um banho em solução de lavagem por 10 minutos. Posteriormente, os cortes foram lavados em água destilada e corados em Hematoxilina de Harris durante 10 segundos, sendo então lavados em água de torneira e desidratados em série crescente de álcool etílico (70%, 80%, 95%, 2x de 100%). A diafanização foi realizada em xilol e a montagem em Entellan.

b) Laminina

Para detecção de laminina na matriz extracelular do S-180 foram utilizados cortes histológicos dos tumores controle e tratado de 7 dias e 35 dias.

O anticorpo primário policlonal monoespecífico anti-laminina foi produzido e gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga do Laboratório de Matriz Extracelular coordenado pelo Prof. Dr. Waldemiro Gremski do Departamento de Biologia Celular do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

O procedimento para marcação da laminina foi realizado nas mesmas condições que da fibronectina, alterando-se apenas o anticorpo primário.

Como controle positivo utilizou-se lâmina histológica contendo corte de EHS, tumor intensamente positivo para laminina.

Observação:

Todas as técnicas foram fotografadas no Fotomicroscópio Olympus do Laboratório de Impacto Ambiental coordenado pela Prof^a. Dra. Edith Fanta do Departamento de Biologia Celular do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná e no Fotomicroscópio Axiophot Zeiss do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

5. RESULTADOS

5.1 ASPECTOS ESTRUTURAIS DOS TUMORES NOS ANIMAIS CONTROLE DE 7 DIAS:

Todos os animais deste grupo desenvolveram o tumor. A pele apresentava-se íntegra na região de crescimento do mesmo, não se observando ulceração. Macroscopicamente, houve aumento de volume do tumor em todos os animais. Os tumores apresentavam um aspecto pálido e nodular.

Com a utilização das técnicas de Tricrômico de Masson e Hematoxilina-Eosina, é possível através da microscopia de luz observar que o tumor é densamente celular. As células neoplásicas dispõem-se formando cordões ou ninhos entremeados por delgadas trabéculas de conjuntivo. Em geral as células são poliédricas com núcleos grandes e claros de forma arredondada a ovalada. A cromatina é homogênea, e o nucléolo evidente, às vezes múltiplos. Os limites nucleares são definidos e o citoplasma é levemente basófilo. As figuras de mitose são frequentes, aparecendo principalmente metáfases e anáfases, bem como as atípicas multipolares. A média geral de mitoses é em torno de 7,8 por campo observando-se em objetiva de 40x. As células neoplásicas aparecem invadindo músculo estriado esquelético, nervos, tecido conjuntivo e adiposo adjacentes (fig. 2). De forma geral existem áreas irregulares de necrose de coagulação que se apresentam dividindo as regiões tumorais (fig. 2). Nestas áreas observa-se uma infiltração predominantemente neutrofílica. O tecido conjuntivo que está ao redor do tumor se mostra frouxo com muitos macrófagos, linfócitos, plasmócitos e raros mastócitos (fig. 3 e 4). Também no tecido conjuntivo limítrofe do tumor encontram-se células neoplásicas isoladas, em possível processo de invasão (fig. 6). É frequente se observar vasos sanguíneos neoformados (fig.3) e vasos dilatados, com muitos leucócitos em sua luz (fig. 4 e 5).

Através do Método Tricrômico de Picrosírius - Hematoxilina e a utilização de Microscopia de Polarização, detectou-se escassa presença de fibras de tecido conjuntivo por entre as células tumorais (fig. 7b).

5.2 ASPECTOS ESTRUTURAIS DOS TUMORES NOS ANIMAIS CONTROLE DE 35 DIAS:

Todos os animais desenvolveram o tumor. Na pele observou-se ulceração no local da implantação do tumor (fig. 1). Macroscopicamente, após a sua retirada, o tumor apresentava coloração clara e aspecto nodular. Uma pequena região acinzentada aparecia no local da ulceração.

Os cortes com os tumores corados pelo Tricrômico de Masson e Hematoxilina-Eosina e observadas ao Microscópio de luz mostram variação de forma e volume celular, além de muitas células multinucleadas (fig. 11). Há reação inflamatória com predominância de neutrófilos além de macrófagos e de linfócitos. Ainda no tecido conjuntivo que delimita o tumor é possível encontrar células neoplásicas isoladas e em contato com os vasos sanguíneos (fig. 14).

As figuras de mitose apareceram com bastante frequência, em média 12 por campo analisado em objetiva de 40x (fig. 11 e 12).

Através de microscopia de polarização, nas lâminas coradas pelo Tricrômico de Picrosírius-Hematoxilina foi possível constatar a existência de fibras de tecido conjuntivo apesar de estarem em pequena quantidade entre as células tumorais.

Na região central do tumor foi possível observar extensa área de necrose de coagulação com alguns focos de calcificação (fig. 13).

5.3 ASPECTOS ESTRUTURAIS DOS TUMORES NOS ANIMAIS TRATADOS COM A α -D-GLUCANA COM 7 DIAS:

Em 40% dos animais não houve crescimento do tumor. A pele no local de implantação do tumor se apresentava íntegra, sem presença de lesões. Os tumores tinham aspecto pálido e nodular

Microscopicamente, o tumor era densamente celular mostrando escasso tecido conjuntivo frouxo (fig. 08). As células neoplásicas se apresentam em cordões ou ninhos, entremeadas com delgadas trabéculas de conjuntivo. As células apresentam discreta variação de forma e volume, os núcleos são claros e os

nucléolos evidentes. O citoplasma é levemente basofílico (fig. 8). As figuras de mitose são frequentes, aparecendo em média 8,4 por campo em objetiva de 40x. É possível observar a invasão no tecido muscular estriado esquelético, nervos, conjuntivo e adiposo adjacentes. Existem áreas de necrose de coagulação confluentes, em geral localizado na região central do tumor. O tecido conjuntivo que fica ao redor da massa tumoral se apresenta frouxo infiltrado por macrófagos, linfócitos e neutrófilos. Nesta região ocorre a presença de vasos neoformados (fig. 9). Os vasos sanguíneos aparecem dilatados com leucócitos no seu interior e na adjacência, sugerindo intenso recrutamento de células inflamatórias (fig. 10). A Microscopia de Polarização evidenciou poucas fibras de tecido conjuntivo entre as células tumorais.

5.4 ASPECTOS ESTRUTURAIS DOS TUMORES NOS ANIMAIS TRATADOS COM A α -D-GLUCANA COM 35 DIAS

Em 20% dos animais não houve crescimento do tumor. Na pele foi possível observar uma região ulcerada no local da implantação do tumor. Macroscopicamente, o tumor apresentava coloração clara e aspecto nodular, exceto na região da ulceração que se apresentava acinzentada.

Os cortes de tumores corados pelo Tricrômico de Masson e Hematoxilina-Eosina e observados ao Microscópio de Luz, mostram variação de forma e volume celular. Nas regiões centrais do tumor é possível encontrar áreas de necrose de coagulação, mas também áreas típicas com imagens que sugerem apoptose como porções citoplasmáticas e núcleos chanfrados e/ou subdivididos (fig. 18a e 18b).

As figuras de mitose típicas e atípicas aparecem com frequência (fig. 16 e 19a), em média de 12,3 por campo analisado em objetiva de 40x

Foi possível observar um infiltrado inflamatório marcante com grande quantidade de células delimitando o tumor (fig. 15). Células tumorais gigantes multinucleadas e células com citoplasma intensamente corados são abundantes (fig. 17).

Ao se observar as lâminas coradas com Tricrômico de Picrosirius-Hematoxilina, constatou-se escassa quantidade de fibras de tecido conjuntivo entre as células tumorais (fig. 19a e 19b).

5.5 ASPECTOS IMUNOHISTOQUÍMICOS DOS TUMORES NOS ANIMAIS CONTROLE E TRATADO COM A α -D-GLUCANA:

5.5.1 Imunomarcção para Laminina

Foram utilizados anticorpos anti-laminina que mostraram intensa marcação nas lâminas de controle positivo, contendo o tumor EHS (fig. 21), mas não foi possível detectar reação positiva nas lâminas contendo o Sarcoma 180 (fig. 20)

5.5.2 Imunomarcção para Fibronectina

A reação foi negativa nas lâminas em que o anticorpo primário (anti-fibronectina) foi omitido (fig. 22). A reação foi positiva em todas as lâminas contendo o tumor, tanto de 7, quanto de 35 dias de desenvolvimento do tumor, tanto no grupo controle, quanto no tratado com a α -Glu. Houve variação na intensidade e nos parâmetros de organização na reação positiva para a fibronectina. Nos tumores dos animais controle, a reação foi positiva tanto entre as células tumorais como no tecido conjuntivo adjacente, mas foi mais intensa entre as células tumorais nos animais de 35 dias (fig.27). Nos animais tratados a reação foi mais intensa no tecido conjuntivo adjacente ao tumor e maior nos animais de 35 dias (observar figuras 25 e 26 para animais de 7 dias e figuras 29 e 30 para animais de 35 dias). Tanto entre as células tumorais, quanto no conjuntivo dos animais tratados com a α -Glu, a marcação adquiriu um aspecto fibroso e não difuso como nos animais controle. Observar as figuras 25,26,29 e 30.

5.6 ESTATÍSTICA

5.6.1 Volume Tumoral Médio

Baseado no teste estatístico utilizado, com relação ao volume tumoral médio (VTM), os resultados obtidos ao longo dos 35 dias após a inoculação da α -Glu, mostram diferença significativa entre os animais controle e tratado com o polissacarídeo (fig. 31). Os animais tratados apresentam menor VTM que os animais controle (Teste de Análise de Variância e Teste de Tukey: $p > 0,05$)

TABELA 01

Volume Tumoral Médio

Tempo em dias	Volume Tumoral Médio		Desvio Padrão (SD)	
	controle	tratado	controle	tratado
0	0	0	0	0
7	271,6	213,8	164	146
14	453,2	279,7	307	193
21	494,2	204,3	438	132
28	990,1	320,9	559	201
35	1.104,4	463,6	698	224

5.6.2 Inibição do crescimento

O percentual de inibição do crescimento do tumor em todos os animais tanto controle como tratado com a α -Glu, também se mostra estatisticamente significativa, com inibição de crescimento de 8% nos animais controle e de 36 % nos animais tratados (fig 32). (Teste de Análise de Variância para Fator Único, com nível de confiança acima de 95%: $p > 0,05$)

TABELA 02

Inibição do Crescimento

Tempo em dias	No. de animais sem S-180 no final do experimento	
	controle	tratado
7	0	2
14	0	1
21	0	2
28	2	3
35	0	1
	2/25	9/25

TABELA 03

Análise de Variância para o fator Inibição do S-180

RESUMO

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
Controle	5	2	0,4	0,8
Tratado	5	9	1,8	0,7

ANOVA

Fonte de Variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	4,9	1	4,9	6,5333	0,0339	5,3176
Dentro dos grupos	6	8	0,75			
Total	10,9	9				

Observação:

As técnicas de Azul de Toluidina e PAS não mostraram reações significativas nem nos tumores controle nem nos tratados com a α -Glu.

DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

FIGURA 01 Visão macroscópica do S-180 controle com 35 dias.

- a) Visão externa do tumor apresentando ulceração na pele (seta).
- b) Aspecto macroscópico subcutâneo do tumor (seta).



FIGURA 02 Visão panorâmica do S-180 controle com 7 dias.

Observa-se a pele (P), as regiões de necrose (N) e as células tumorais (CT).

Microscopia de Luz. Coloração: Tricrômico de Masson. Barra: 600µm

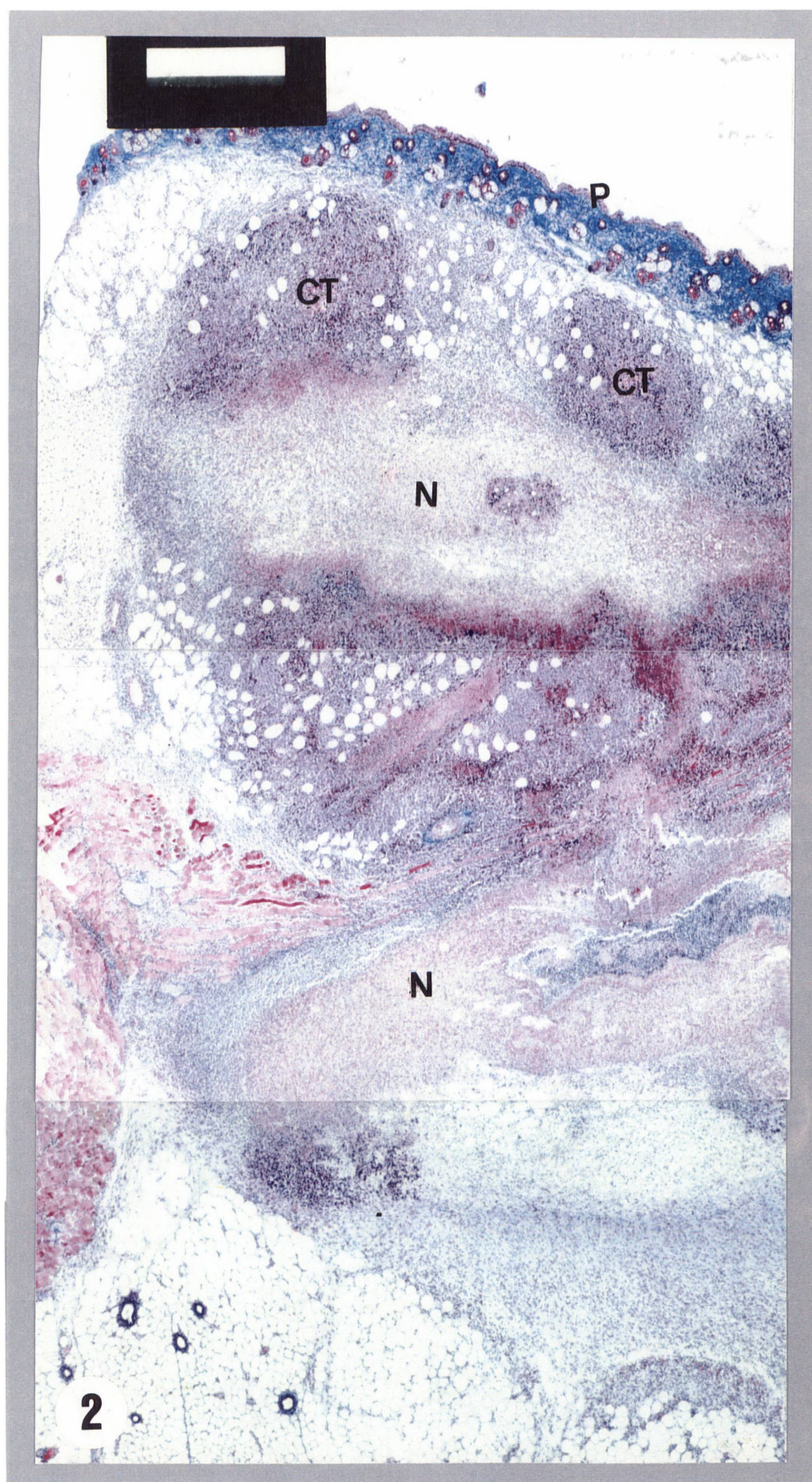


FIGURA 03 Neoangiogênese no S-180 controle com 7 dias.

Capilares (setas).

Microscopia de Luz. Coloração: Tricrômico de Masson. Barra: 500 μ m

FIGURA 04 Infiltrado inflamatório no S-180 controle com 7 dias.

(VS) Vasos sanguíneos com leucócitos no seu interior; (IF) infiltrado inflamatório.

Microscopia de Luz. Coloração: H / E. Barra: 100 μ m

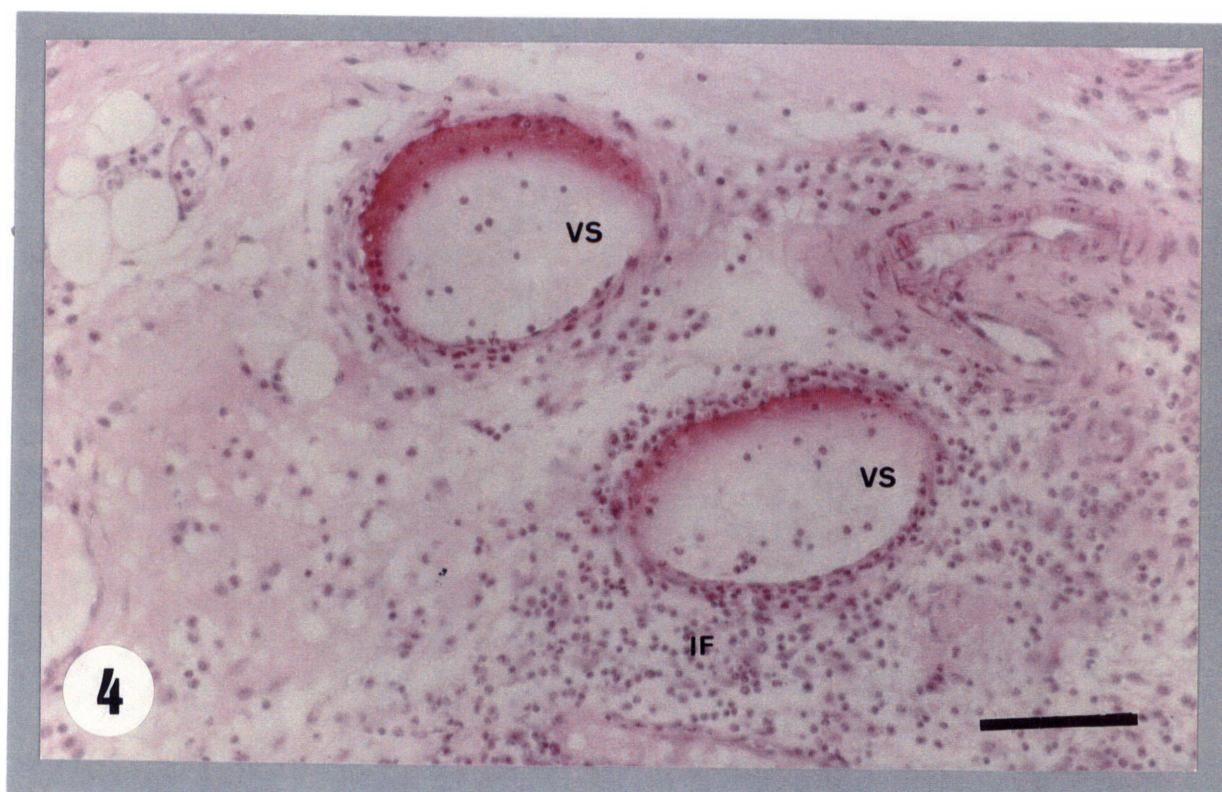
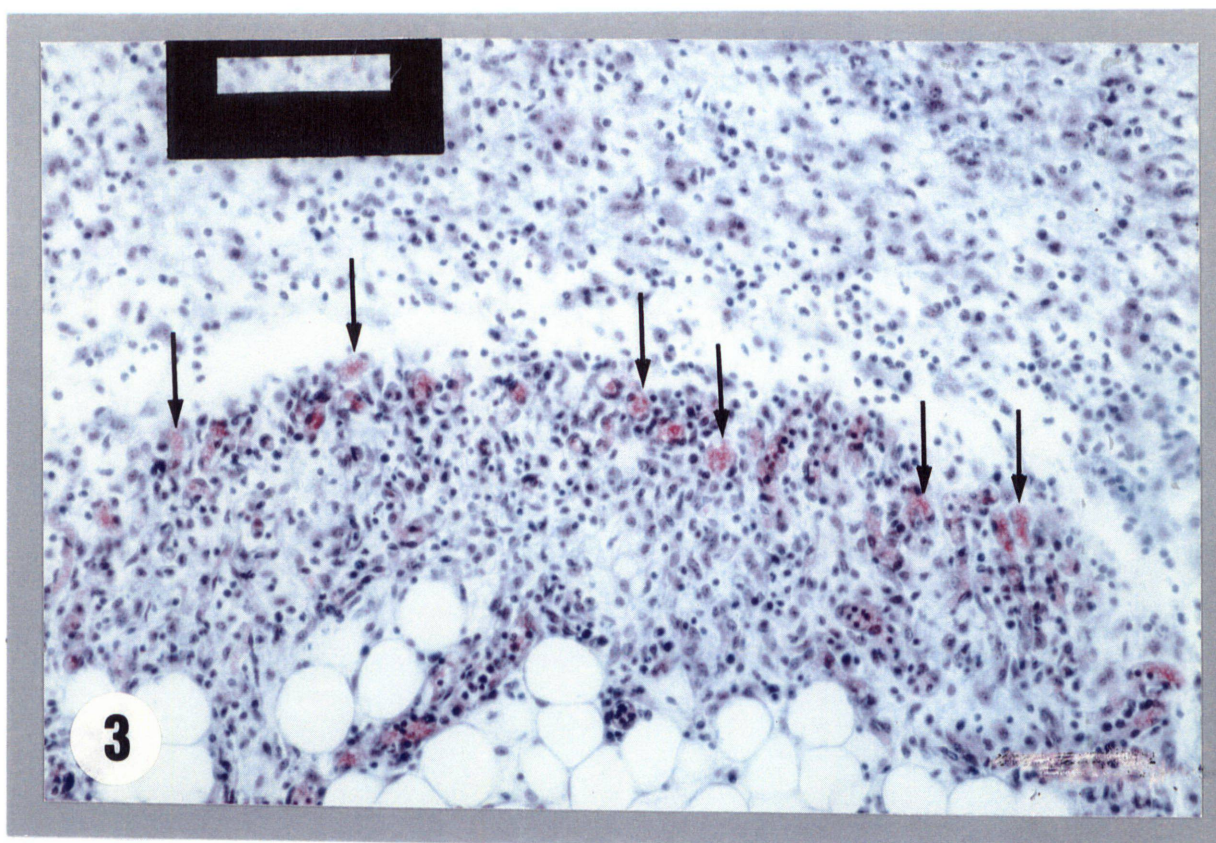


FIGURA 05 Vaso sanguíneo com leucócitos no S180 controle com 7 dias.

Leucócitos (setas) dentro de vaso sanguíneo.

Microscopia de Luz. Coloração: H / E. Barra: 10 μ m

FIGURA 06 Célula tumoral entre fibras de Tecido Conjuntivo no S180 controle com 7 dias.

Observa-se, macrófago (seta fina) e células tumorais (seta grossa).

Microscopia de Luz. Coloração: H / E. Barra: 10 μ m

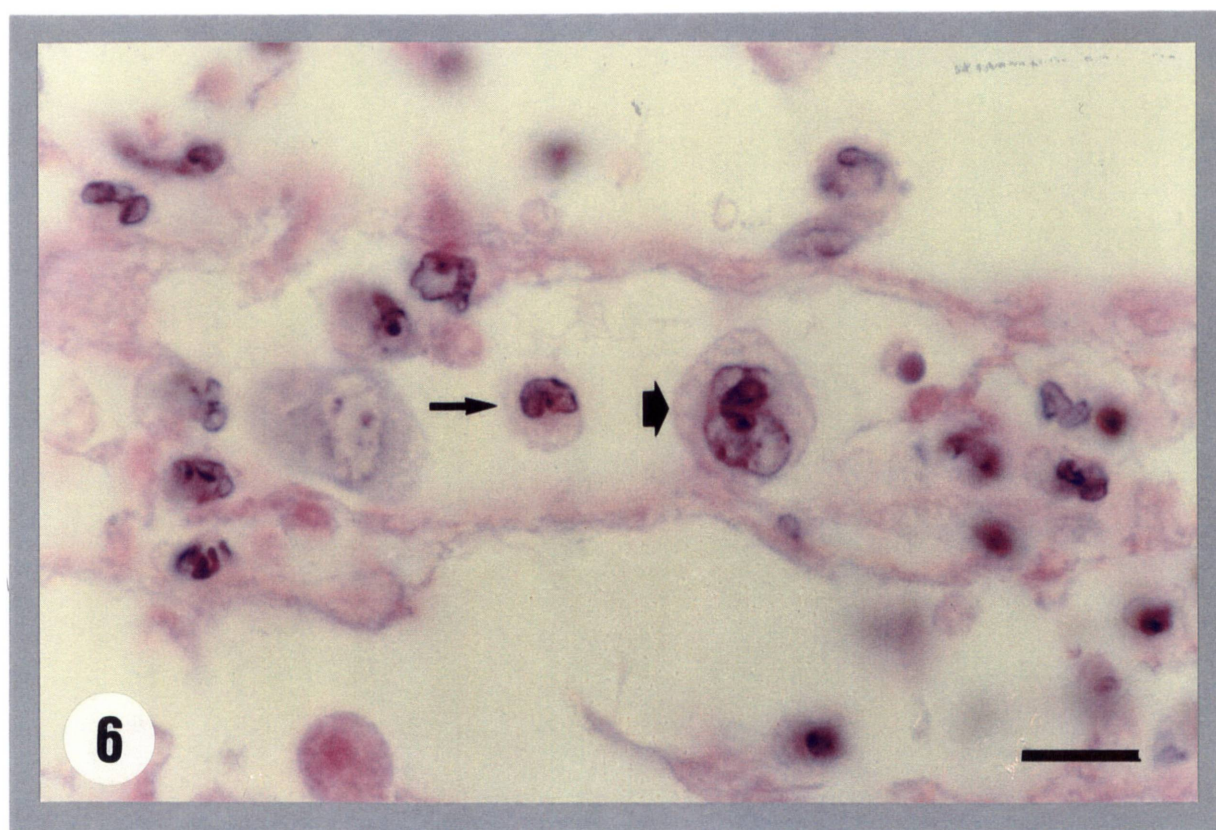
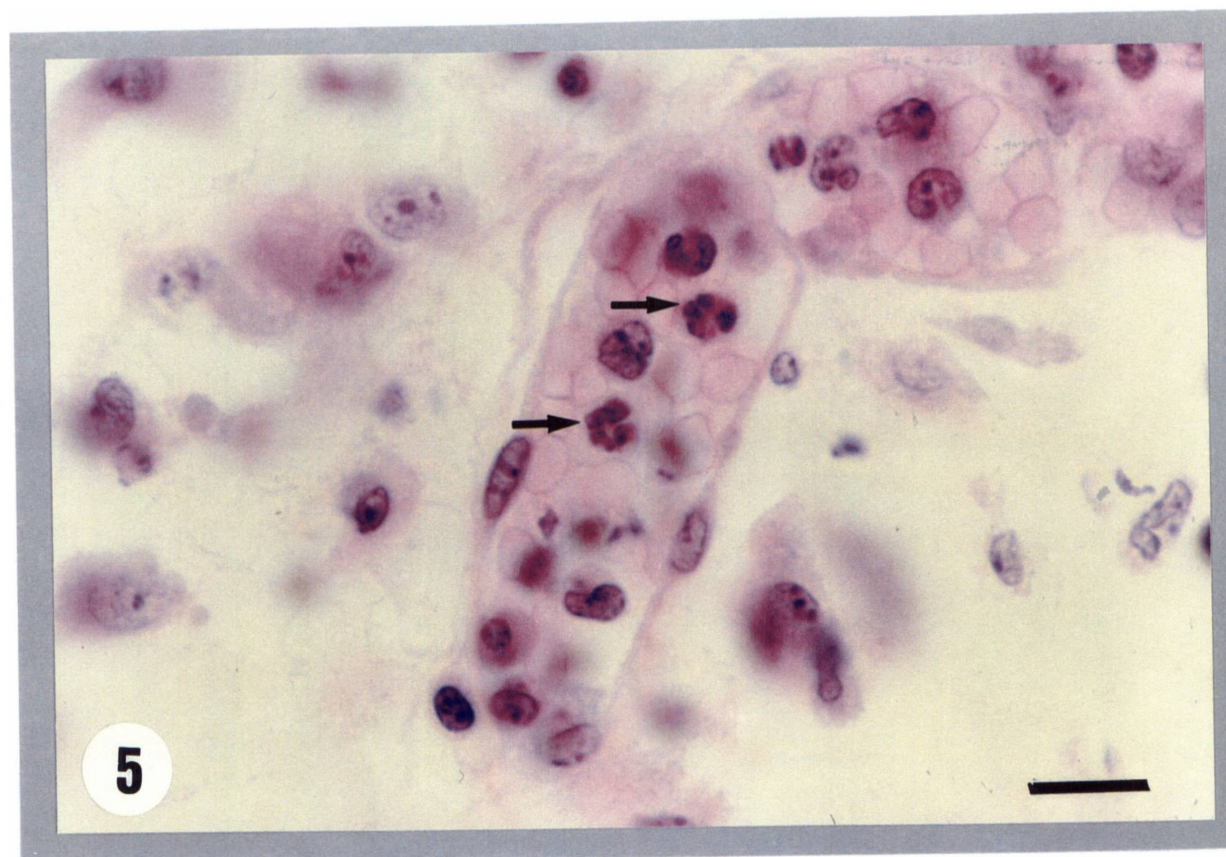


FIGURA 07 Fibras de Tecido Conjuntivo no S-180 controle com 7 dias.

a) No subcutâneo observa-se região de células tumorais (CT), região de infiltrado inflamatório (IF) e região de necrose (N).

Microscopia de Luz. Coloração: Picro-sirius. Barra: 100µm

b) Observa-se poucas fibras do tecido conjuntivo entre as células tumorais

Microscopia de Polarização. Coloração: Picro-sirius. Barra: 100µm

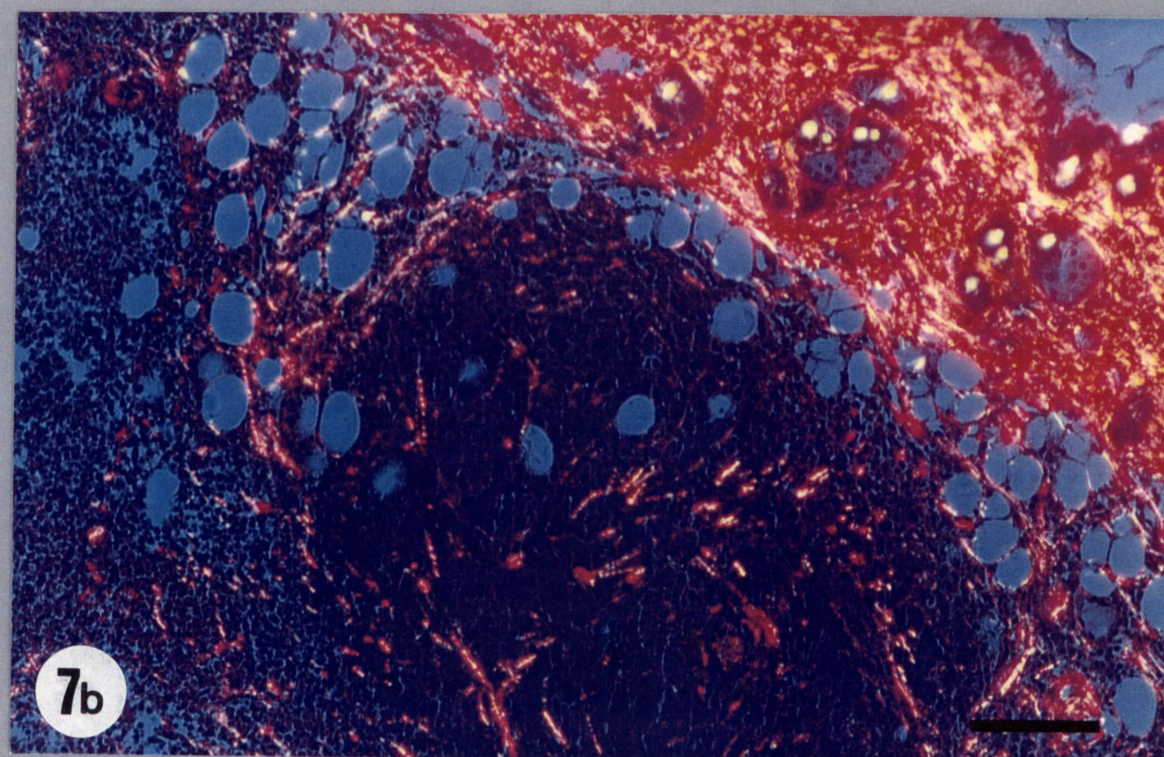
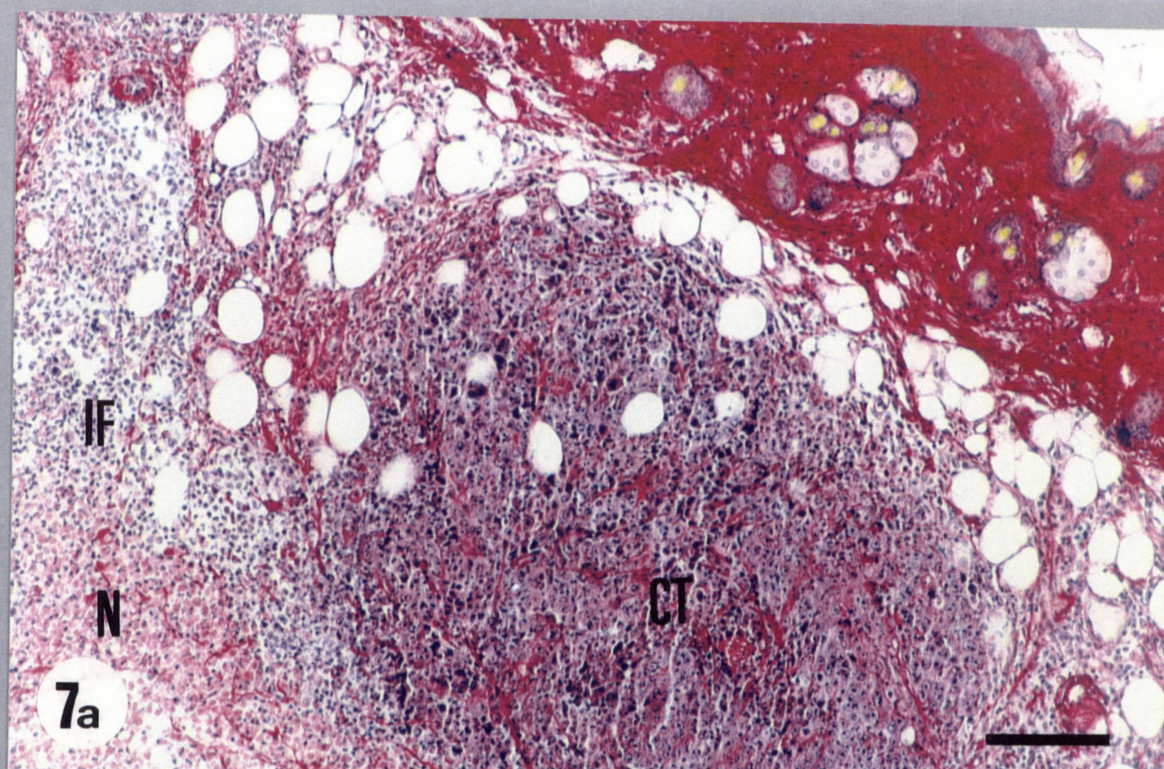


FIGURA 08 Células tumorais do S-180 tratado com a α -Glu com 7 dias.

Observa-se região de células tumorais (CT), de necrose (N) e figuras de mitose (cabeça de seta).

Microscopia de Luz. Coloração: H / E. Barra: 50 μ m

FIGURA 09 Infiltrado inflamatório do S-180 tratado com a α -Glu com 7 dias.

Observa-se região de células Inflamatórias (IF) próximas de células tumorais (CT). Presença de capilares neoformados (seta).

Microscopia de Luz. Coloração: H / E. Barra: 50 μ m

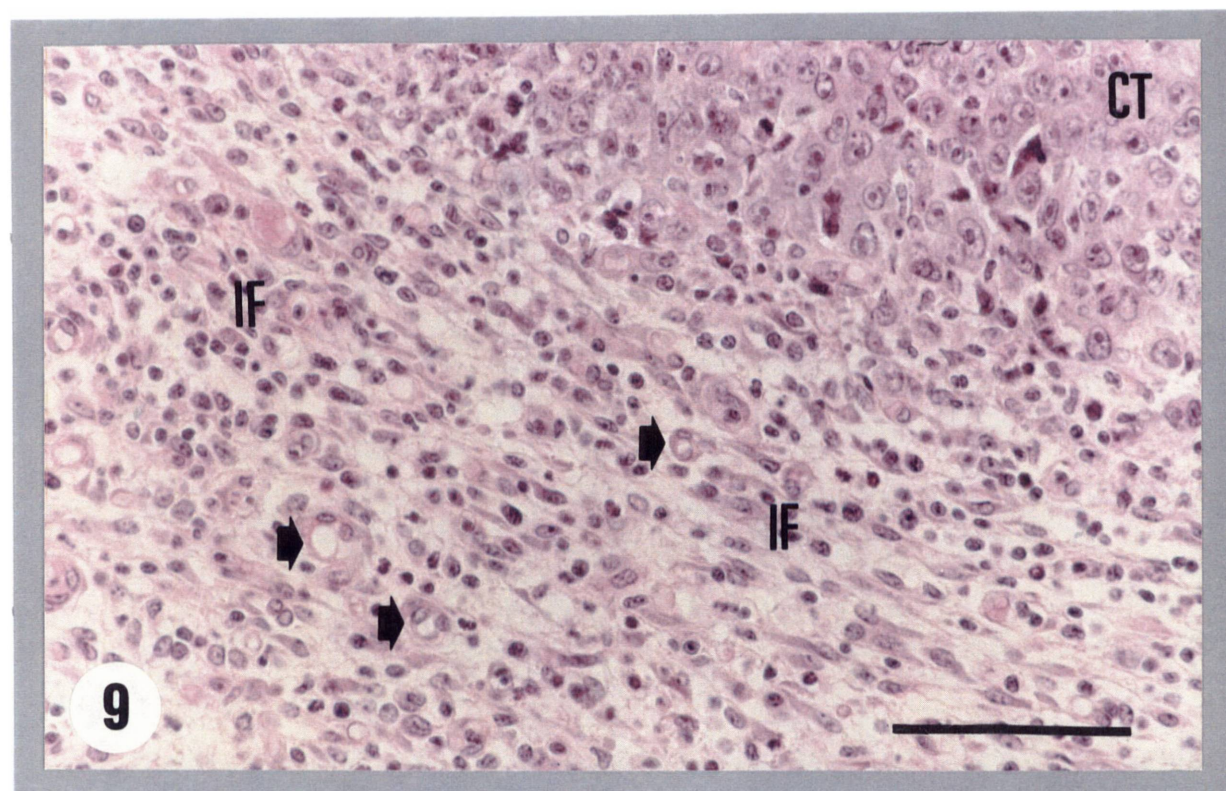
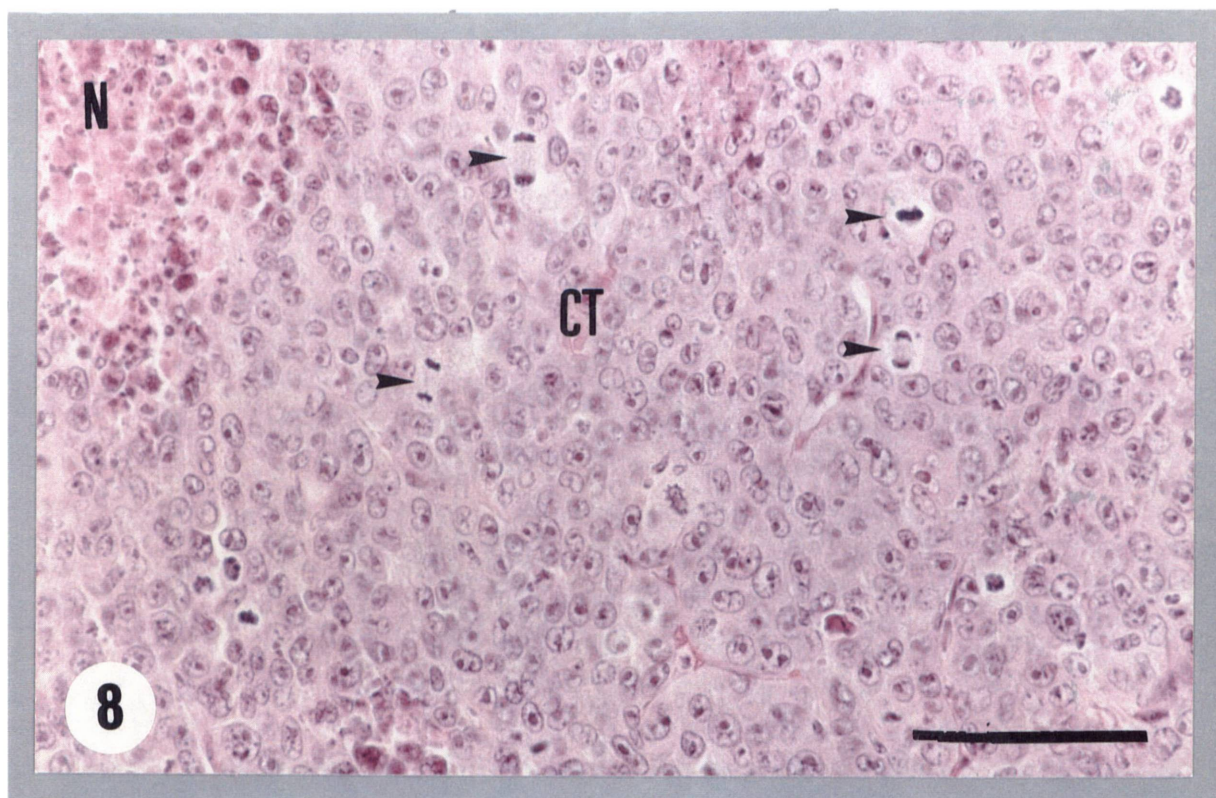


FIGURA 10 Vaso sanguíneo com leucócitos no S-180 tratado com α -Glu com 7 dias.

Observa-se grande quantidade de leucócitos dentro do vaso (VS) e um deles em processo de diapedese (seta).

Microscopia de Luz. Coloração: H / E. Barra: 10 μ m

FIGURA 11 Células tumorais do S-180 controle com 35 dias.

Observa-se região de células tumorais (CT) e figuras de mitoses típicas (cabeça de seta) e atípicas (seta grossa).

Microscopia de Luz. Coloração: H / E. Barra: 50 μ m

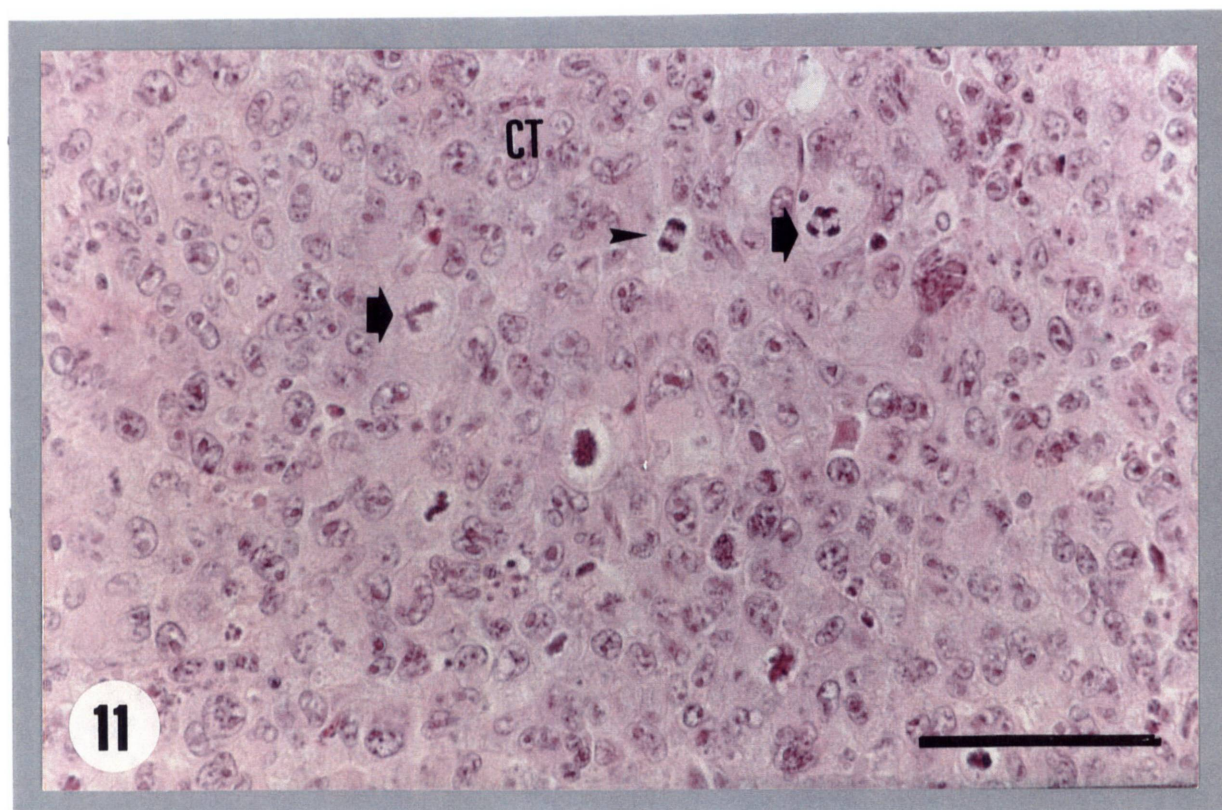
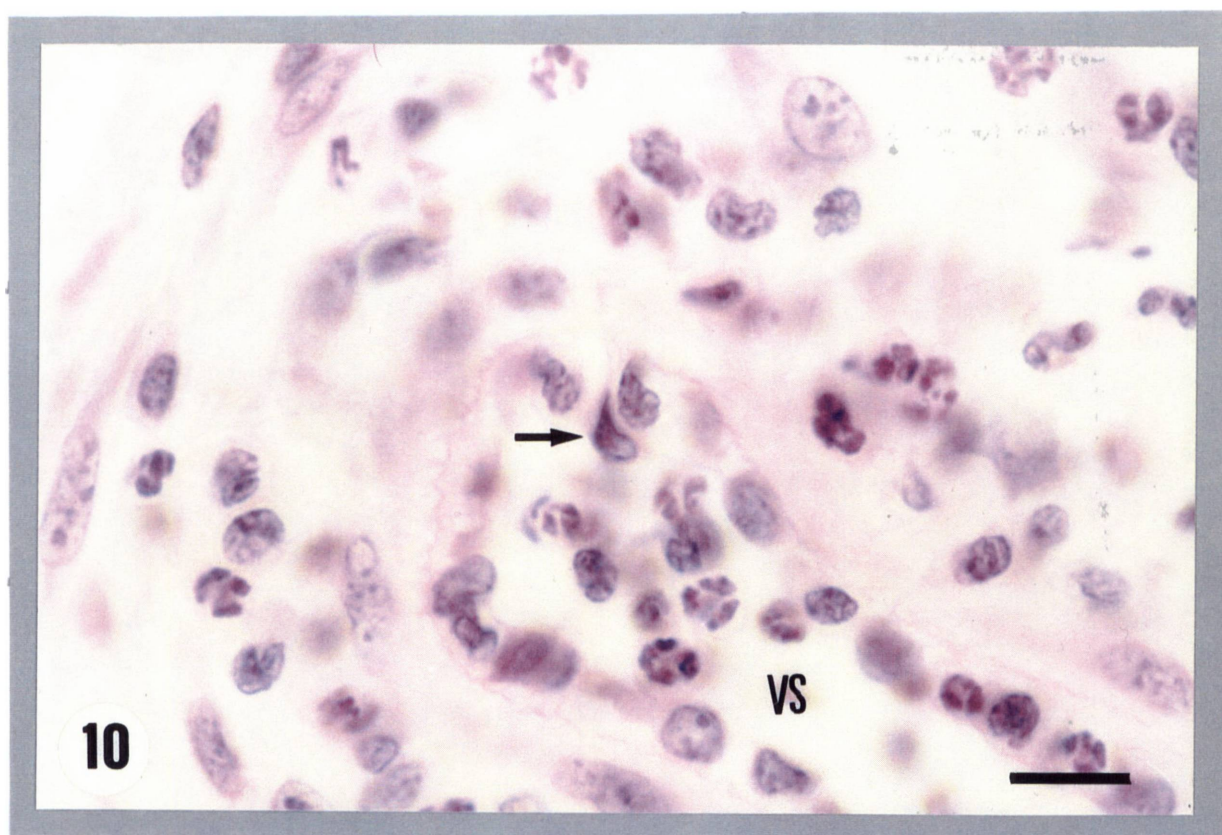


FIGURA 12 Mitose de célula tumoral no S-180 controle com 35 dias (seta).

Microscopia de Luz. Coloração: H / E. Barra: 10 μ m

FIGURA 13 Focos de calcificação no S-180 controle com 35 dias.

Região de necrose (N) com focos de calcificação (seta).

Microscopia de Luz. Coloração: H / E. Barra: 50 μ m

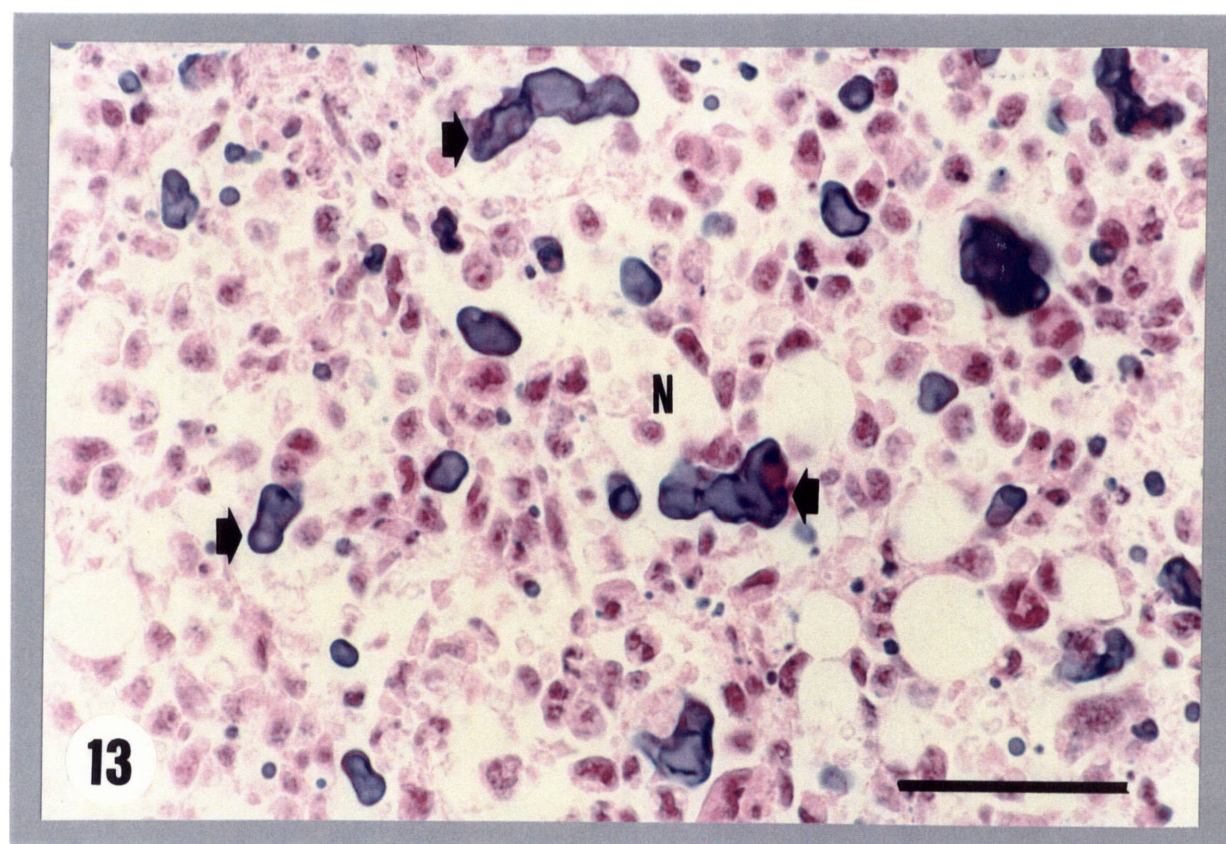
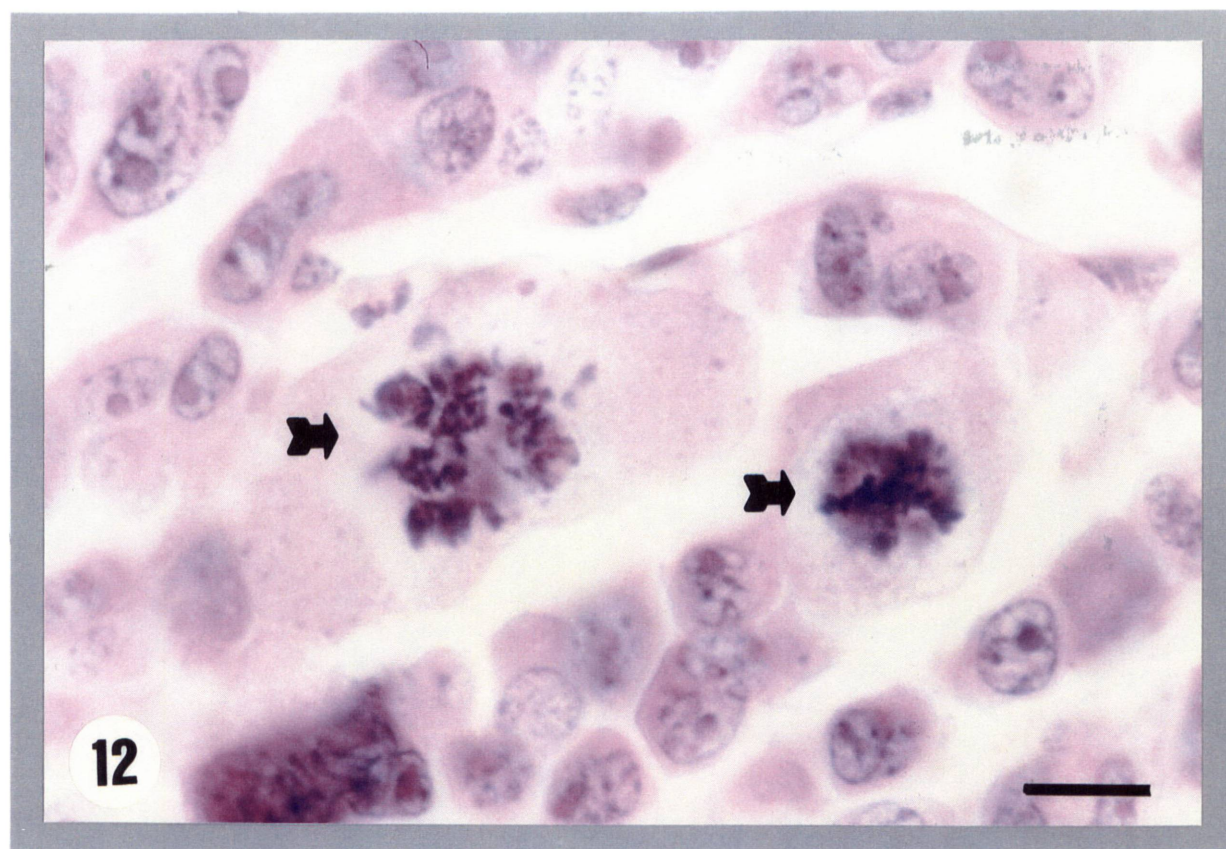


FIGURA 14 Células tumorais aderidas ao vaso sanguíneo no S-180 controle com 35 dias.

Células tumorais (seta) aderidas ao vaso sanguíneo (VS).

Microscopia de Luz. Coloração: H / E. Barra: 10 μ m

FIGURA 15 Células inflamatórias no S-180 tratado com α -Glu com 35 dias.

Células inflamatórias (IF) em grande quantidade delimitando uma região de células tumorais (CT).

Microscopia de Luz. Coloração: H / E. Barra: 50 μ m

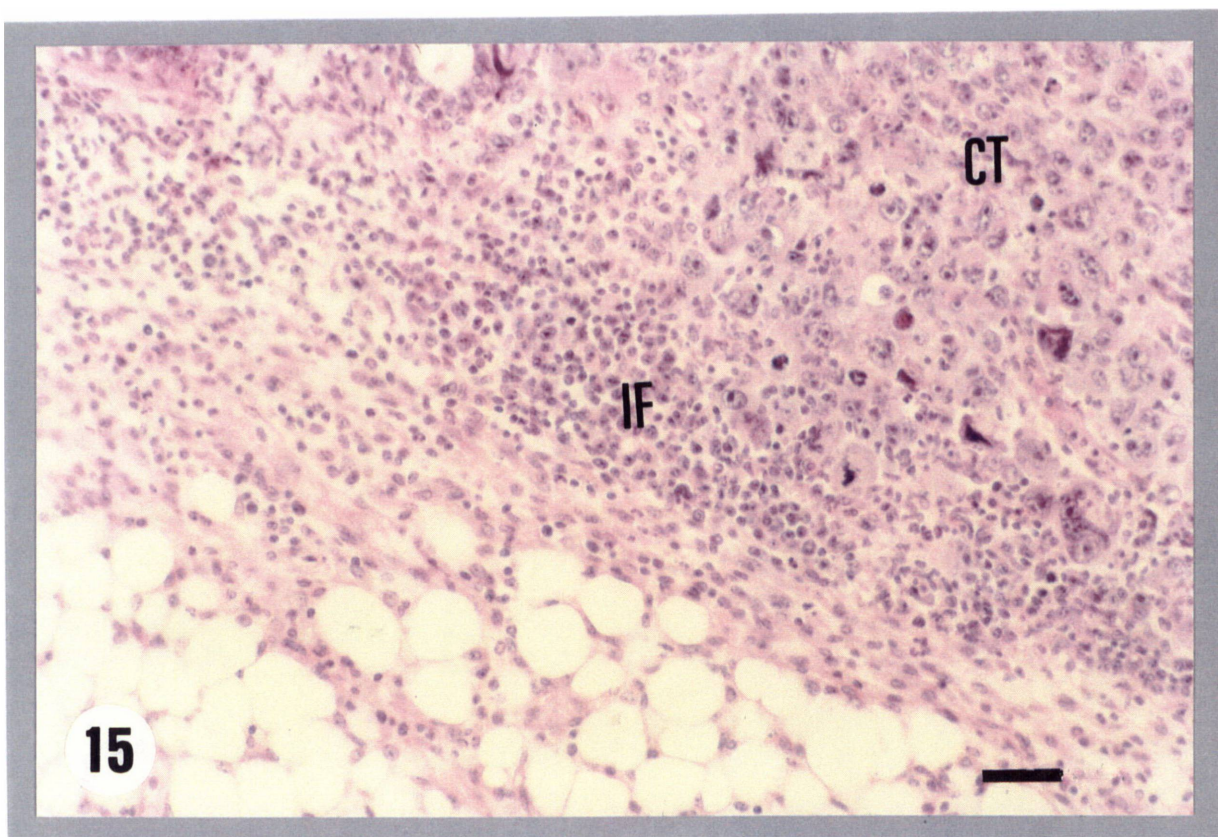
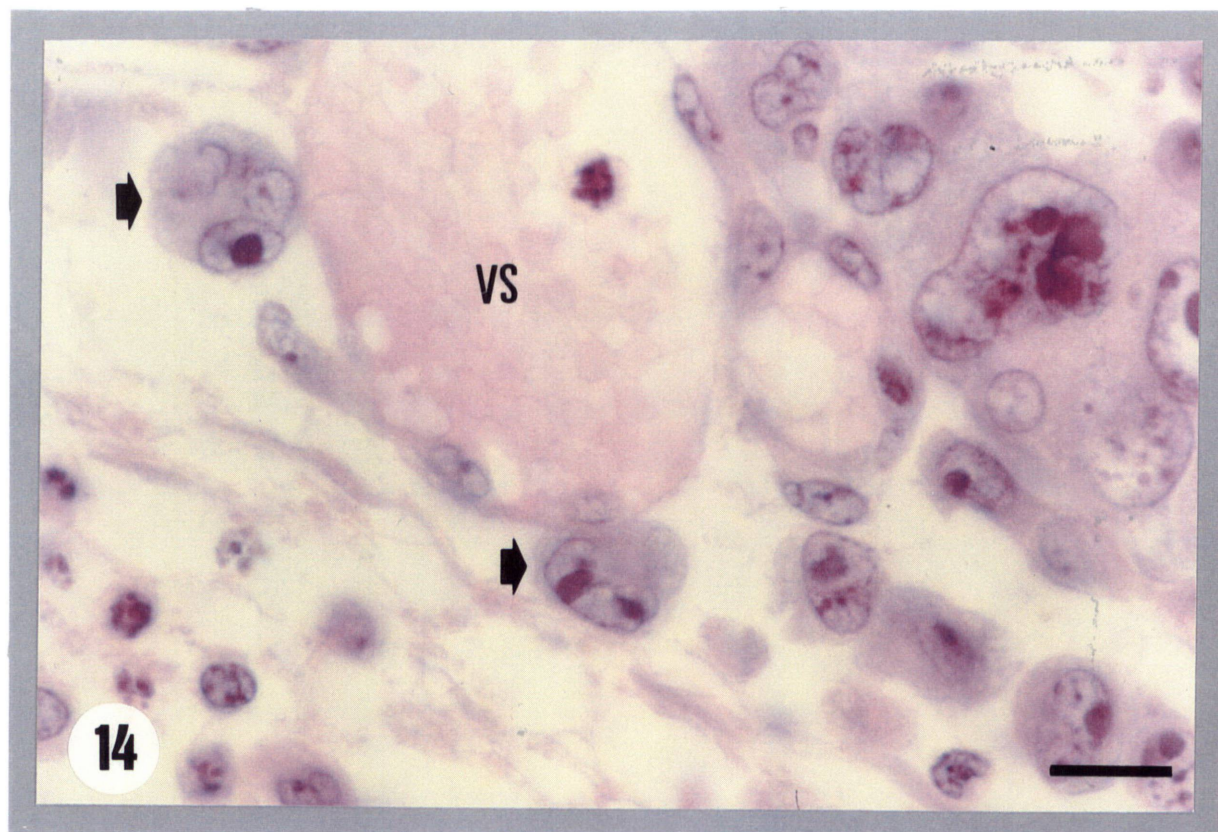


FIGURA 16 Mitose em célula tumoral do S-180 tratado com α -Glu com 35 dias.

Figuras de mitose típica (cabeça de seta) e mitose atípica (seta grossa) que talvez justifique a presença de células multinucleadas como as figuras 18 a e 18 b

Microscopia de Luz. Coloração: H / E. Barra: 50 μ m

FIGURA 17 Células tumorais no S-180 tratado com α -Glu com 35 dias.

Células tumorais com citoplasma eosinofílico (seta cheia), figuras sugestivas de apoptose (seta vazia) e projeções citoplasmáticas (cabeça de seta)

Microscopia de Luz. Coloração: H / E. Barra: 10 μ m

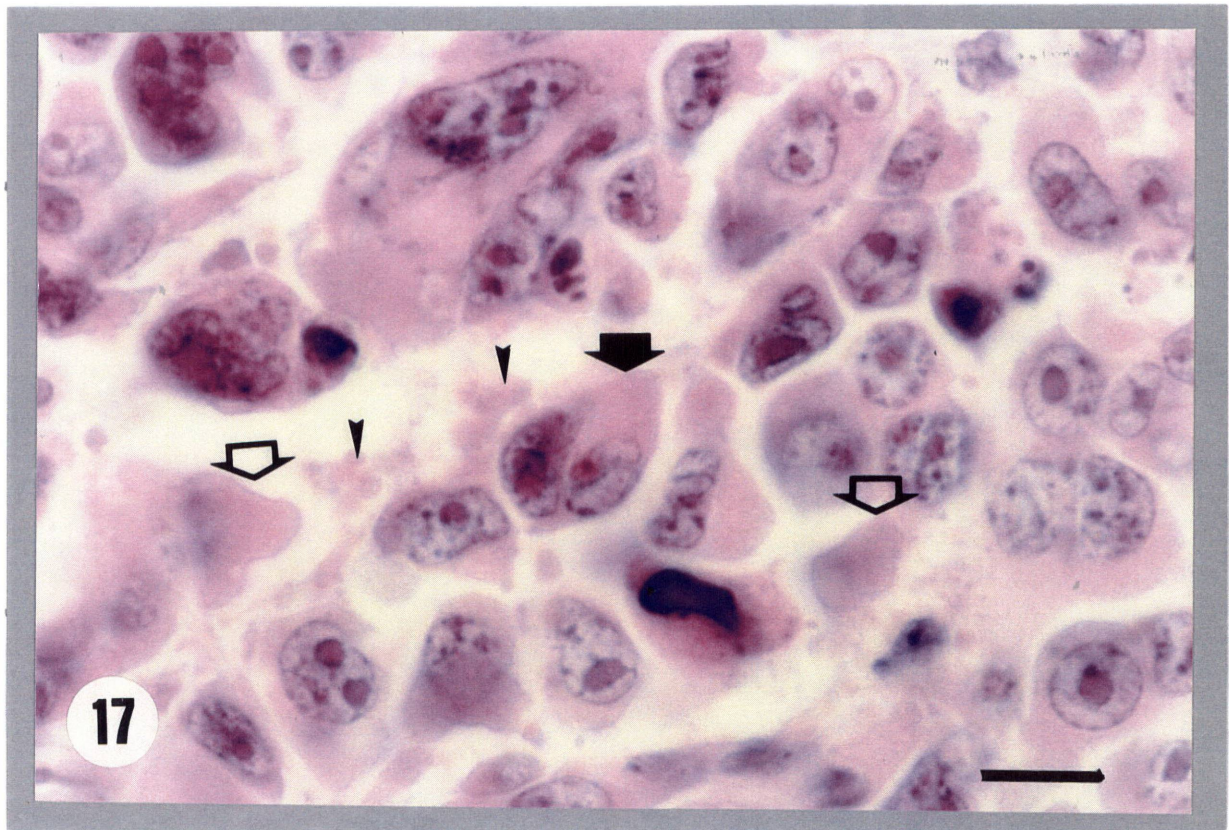
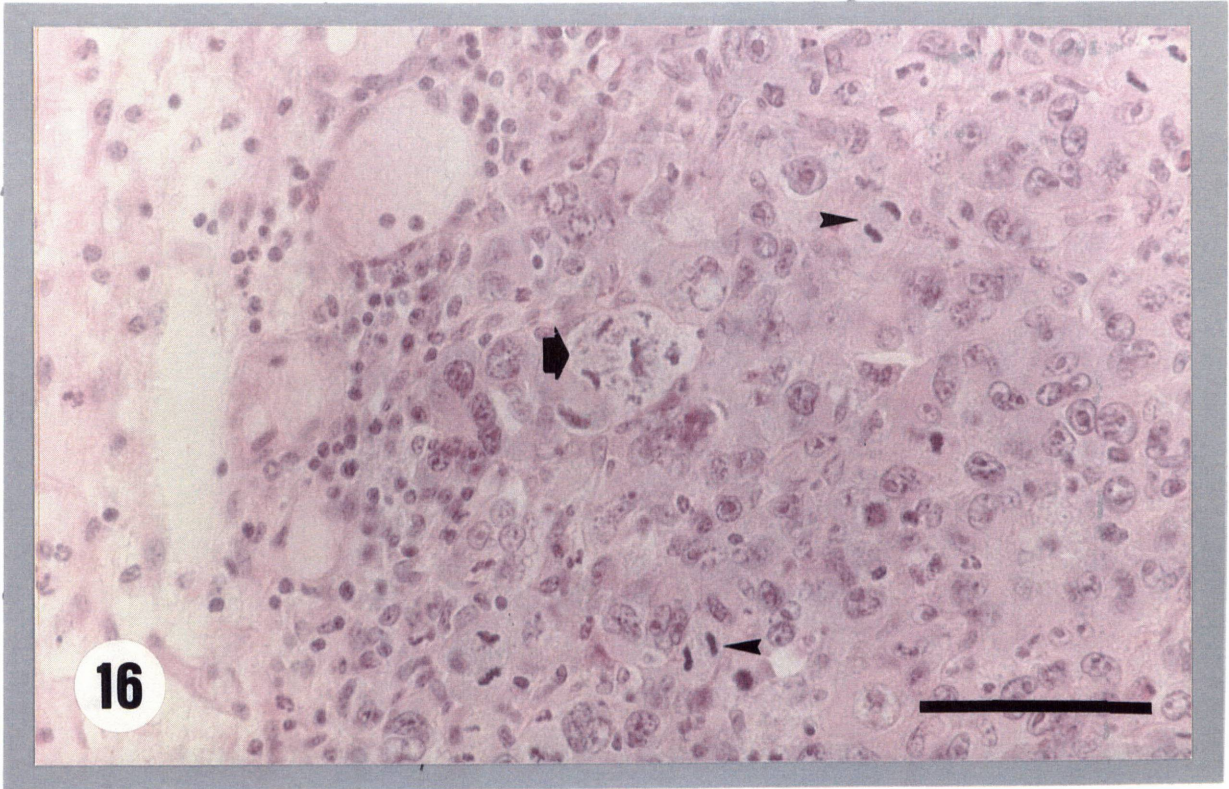


FIGURA 18 a e b Células tumorais no S-180 tratado com a α -Glu com 35 dias.

Célula tumoral contendo núcleos de diversos volumes (seta cheia) e figuras sugestivas de apoptose (seta vazia), como por exemplo porções citoplasmáticas e núcleos fragmentados.

Microscopia de Luz. Coloração: H / E. Barra: 10 μ m

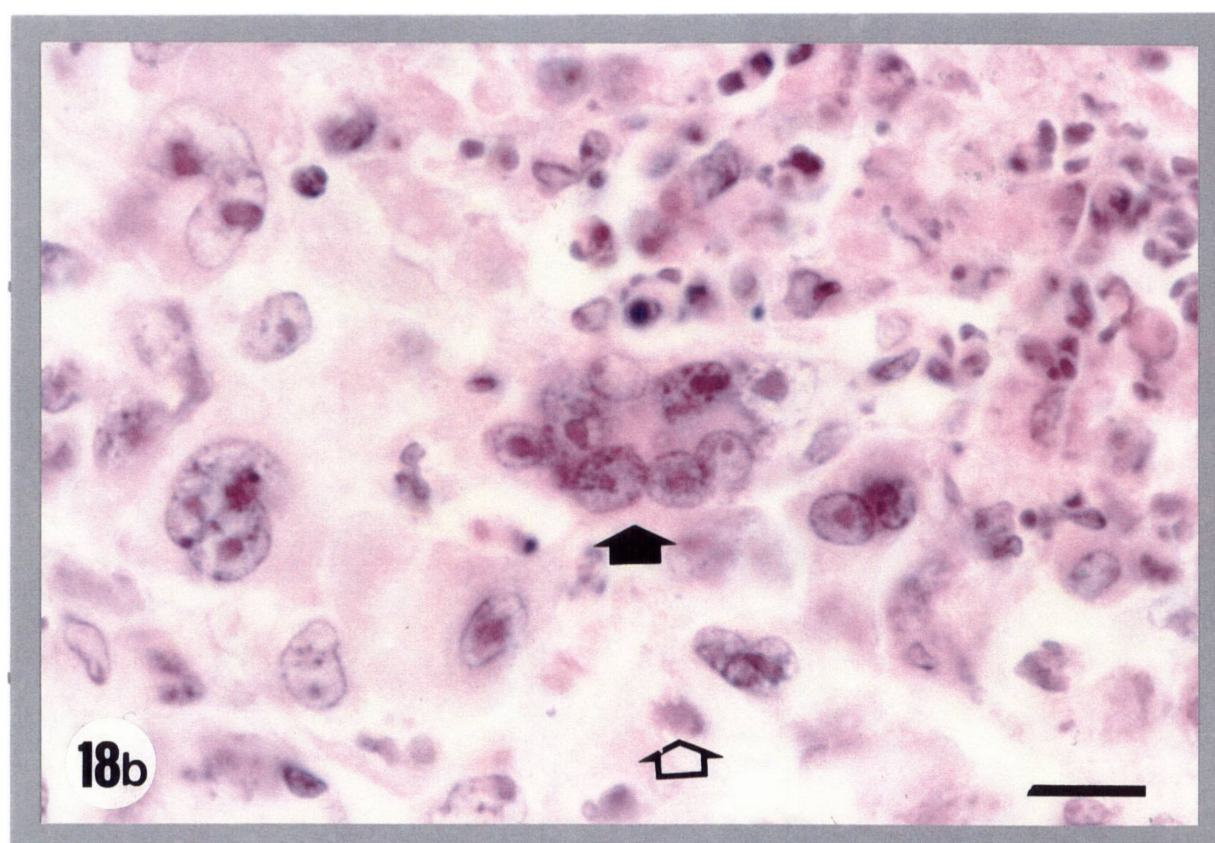
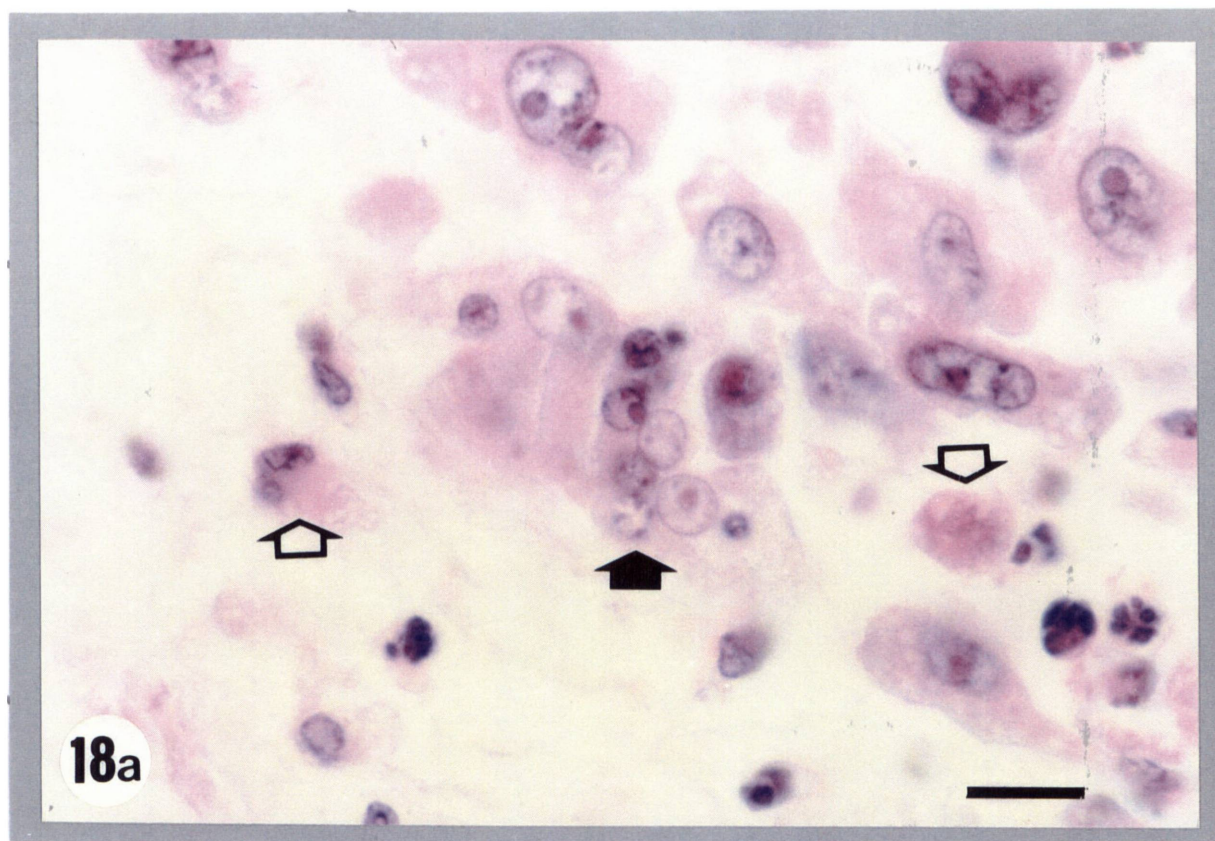


FIGURA 19 Fibras de Tecido Conjuntivo no S-180 tratado com α -Glu com 35 dias.

- a) Observa-se a presença de fibras de tecido conjuntivo (seta fina) entre as células tumorais e figuras de mitose (seta grossa)

Microscopia de Luz. Coloração: Picro-sirius. Barra: 50 μ m

- b) Observa-se a presença de fibras de tecido conjuntivo entre as células tumorais.

Microscopia de Polarização. Coloração: Picro-sirius. Barra: 50 μ m

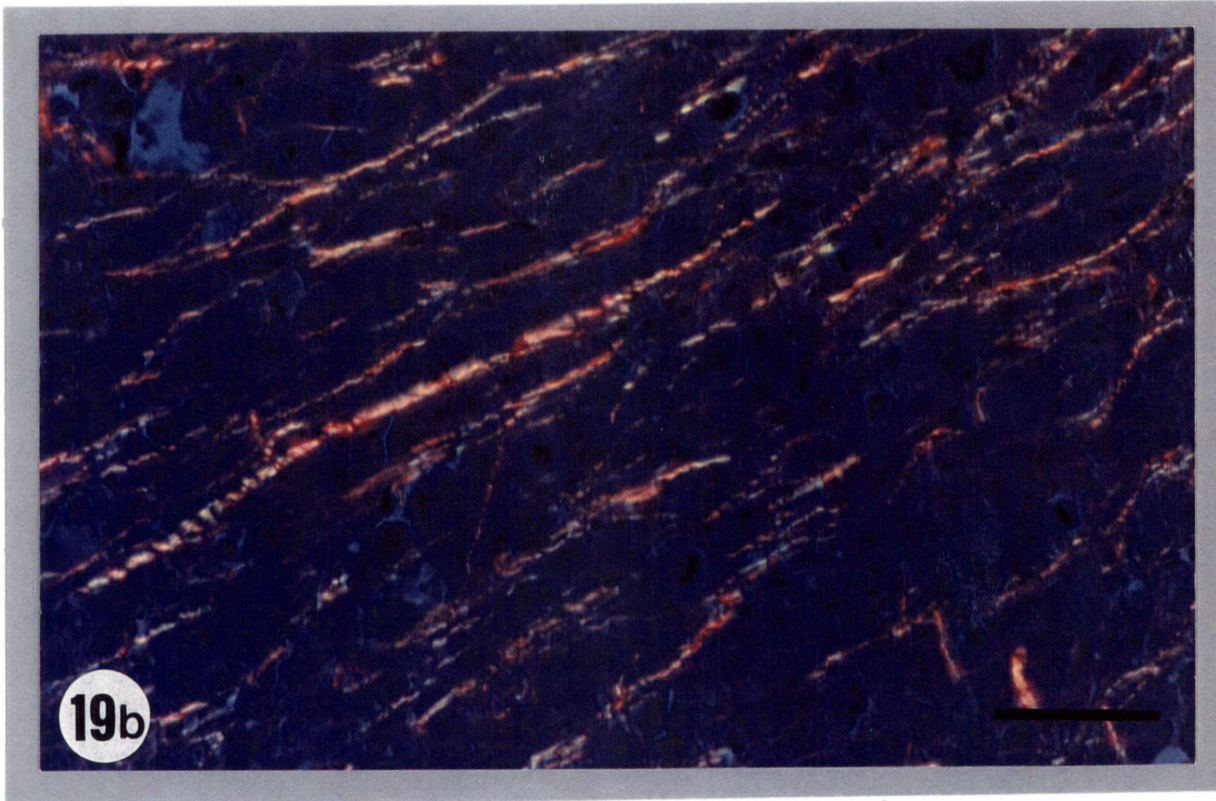
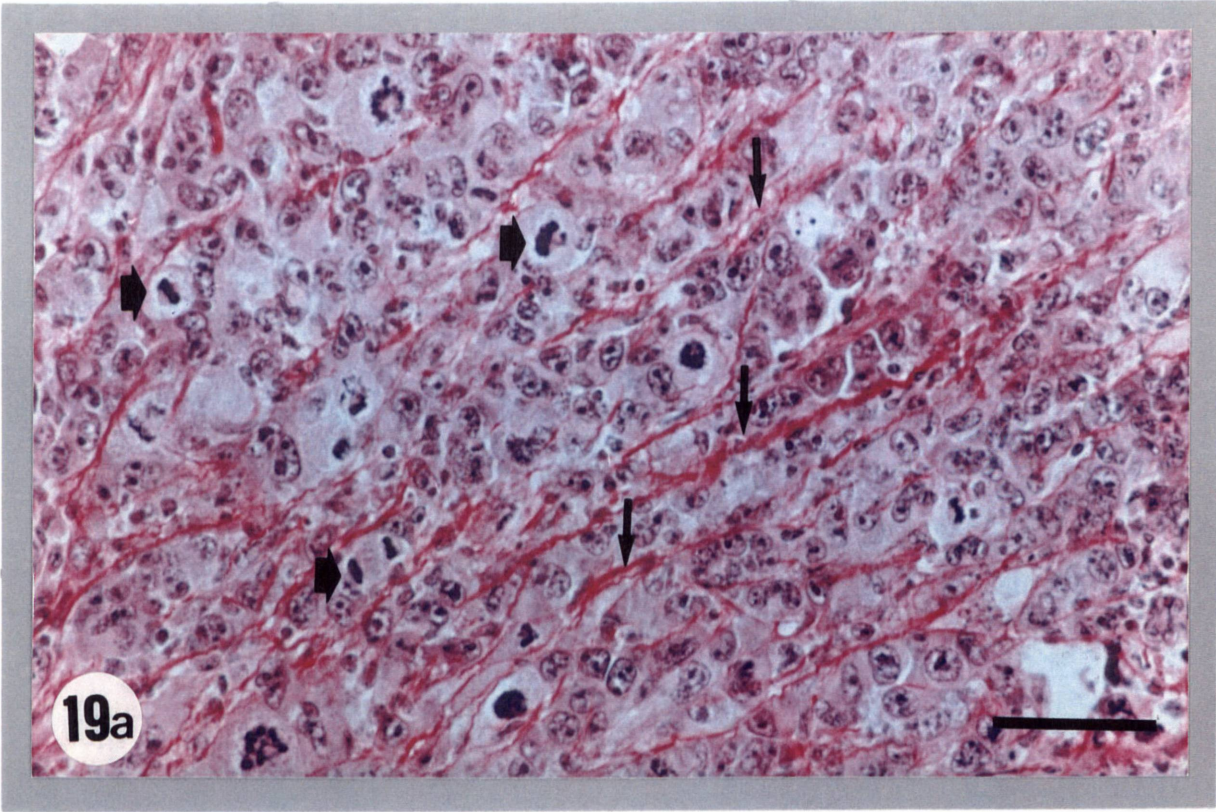


FIGURA 20 Utilização de anticorpo anti-LN no S-180 controle com 35 dias.

Observa-se ausência de marcação para LN na matriz extracelular do tumor.

Microscopia de Luz. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Barra: 10µm

FIGURA 21 Tumor EHS - controle positivo para o anticorpo anti-LN.

Observa-se a forte marcação positiva para LN nas regiões indicadas (seta).

Microscopia de Luz. Sem coloração. Barra: 10µm

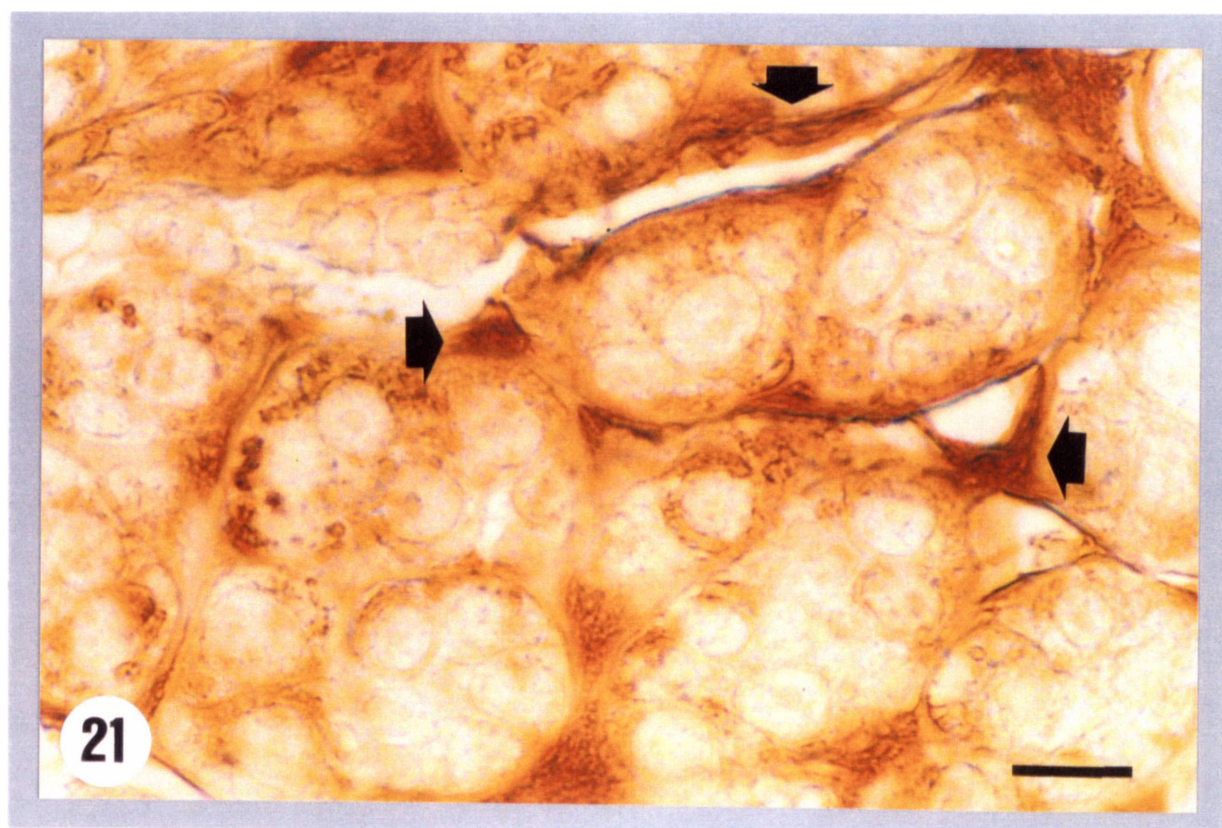
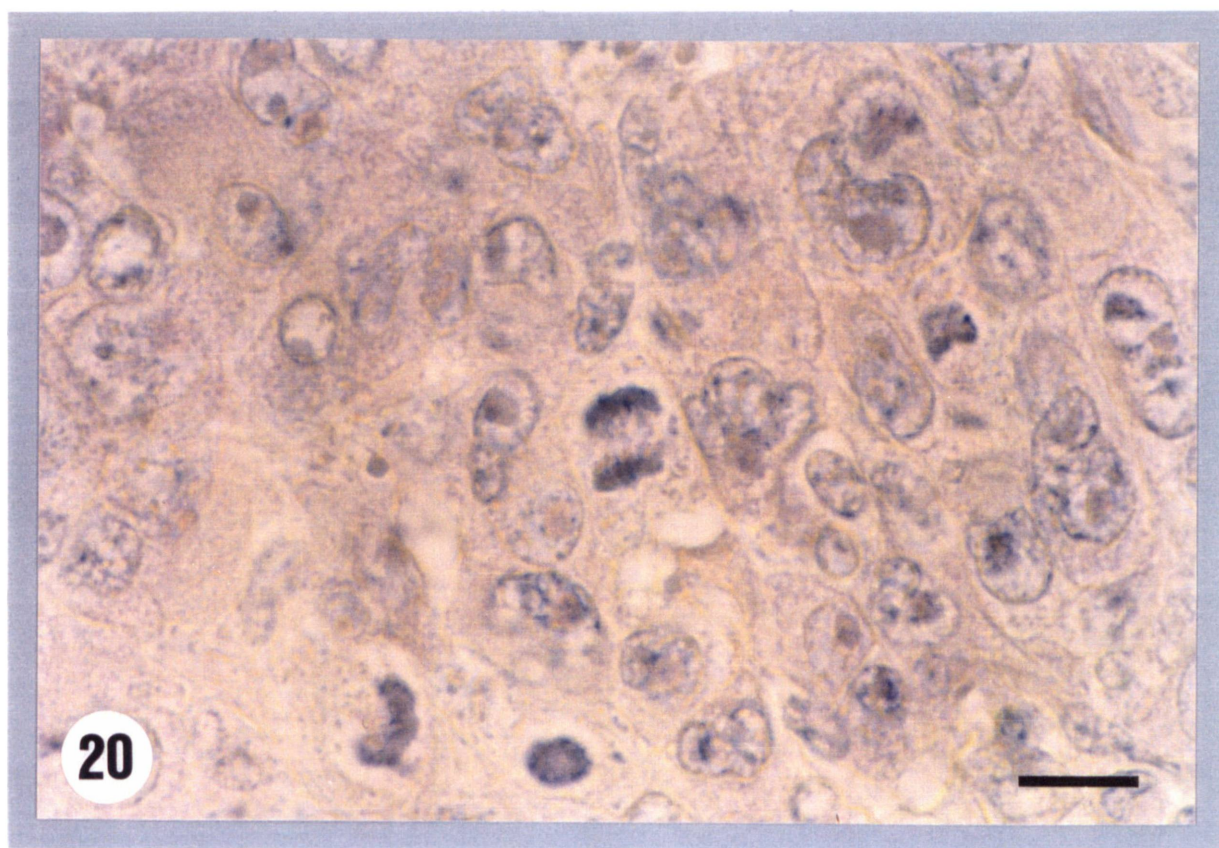


FIGURA 22 S-180 utilizado como controle para o anticorpo anti-FN.

Nestas lâminas omitiu-se o anticorpo primário.

Microscopia de Luz. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Barra:

10µm

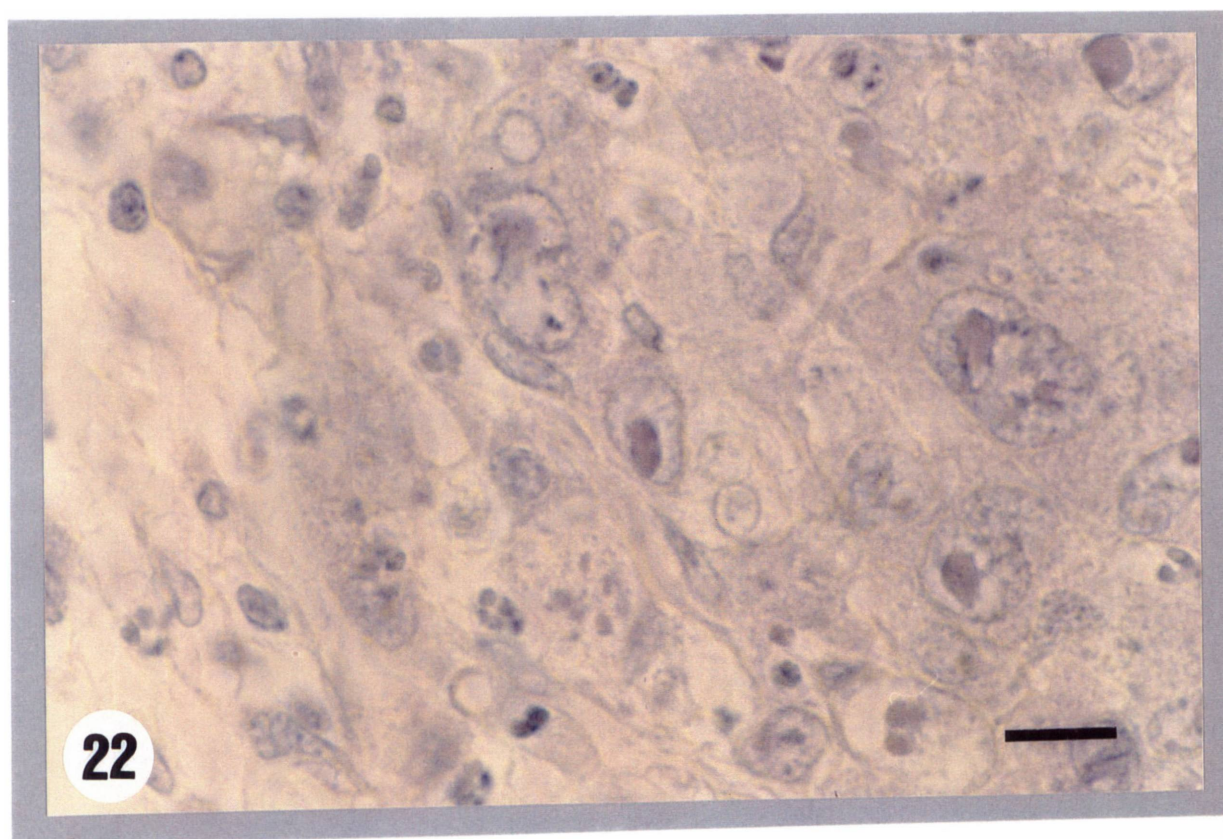


FIGURA 23 Utilização de anticorpo anti-FN no S-180 controle com 7 dias

Observa-se marcação positiva para FN na matriz extracelular (seta) entre as células tumorais

Microscopia de Luz. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Barra: 10µm

FIGURA 24 Utilização de anticorpo anti-FN no S-180 controle com 7 dias.

Observa-se marcação positiva para FN (seta) entre as células do infiltrado inflamatório que delimita o tumor.

Microscopia de Luz. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Barra: 10µm

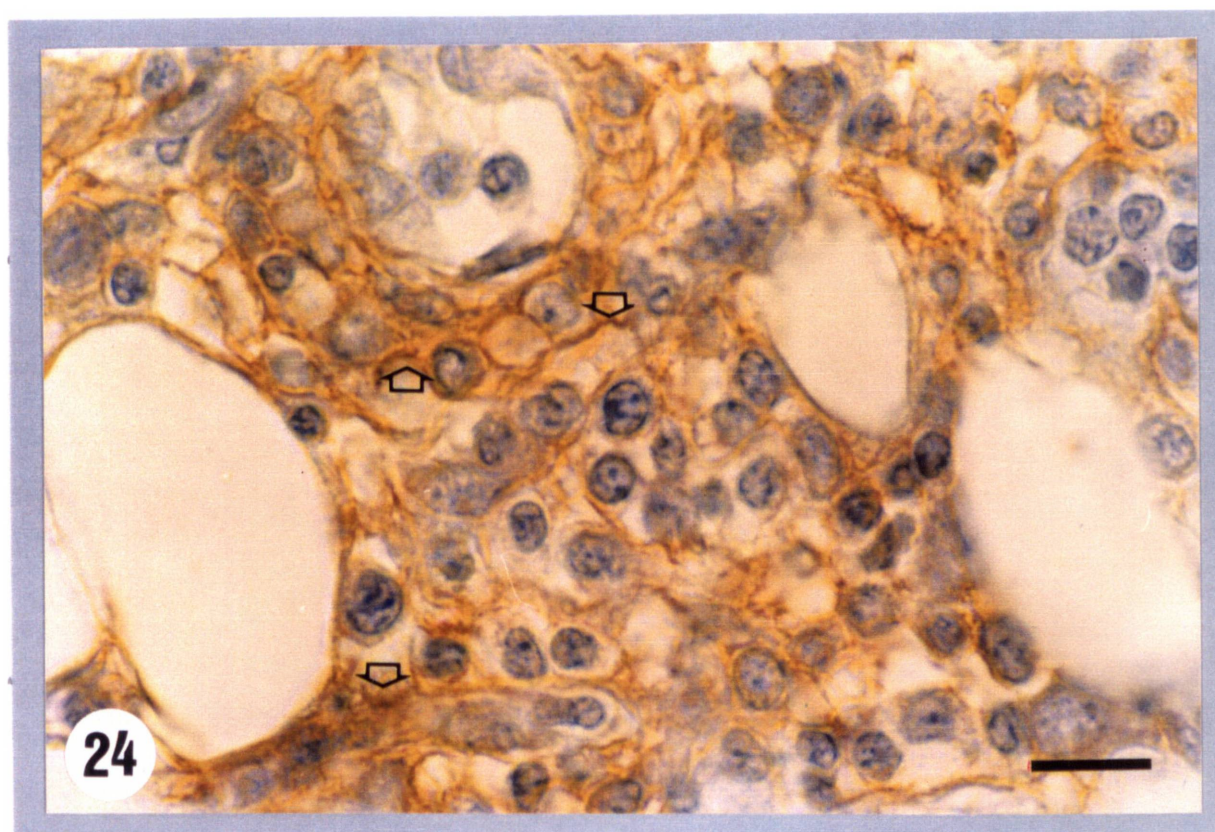
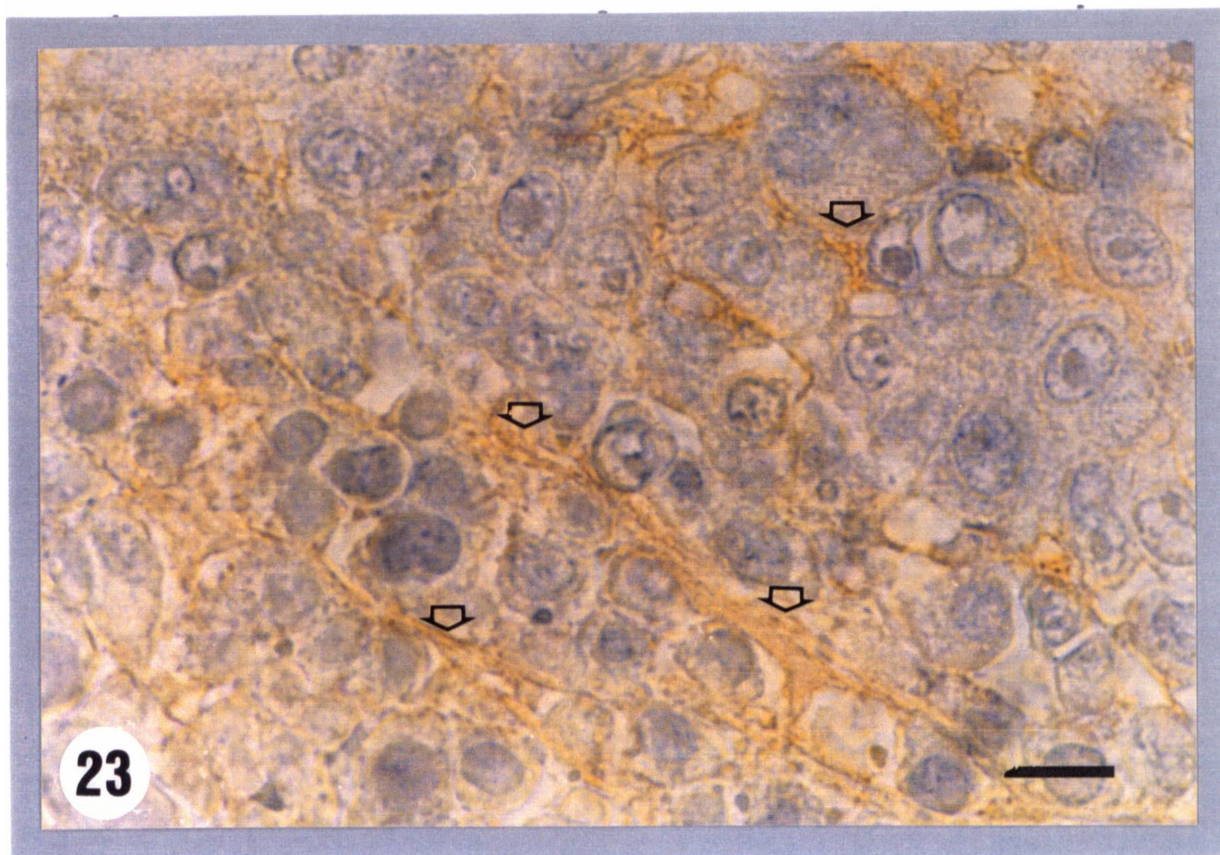


FIGURA 25 Utilização de anticorpo anti-FN no S-180 tratado com a α -Glu com 7 dias

Observa-se marcação positiva para FN (seta) entre as células tumorais.

Microscopia de Luz. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Barra: 10 μ m

FIGURA 26 Utilização de anticorpo anti-FN no S-180 tratado com a α -Glu com 7 dias.

Matriz extracelular que delimita o S-180 marcada positivamente com anticorpo anti-FN (seta).

Microscopia de Luz. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Barra: 10 μ m

OBS.: Notar a disposição fibrilar da FN nos animais tratados com a α -Glu em ambas as figuras.

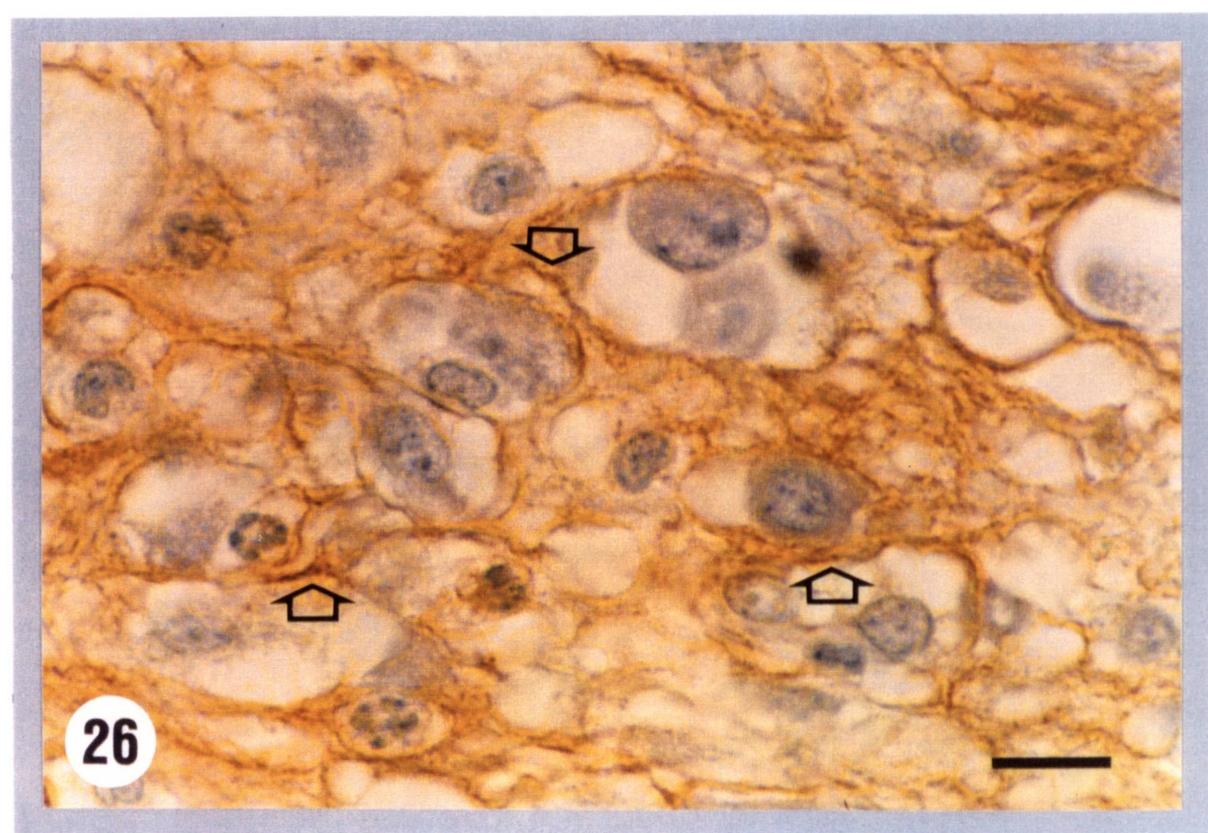
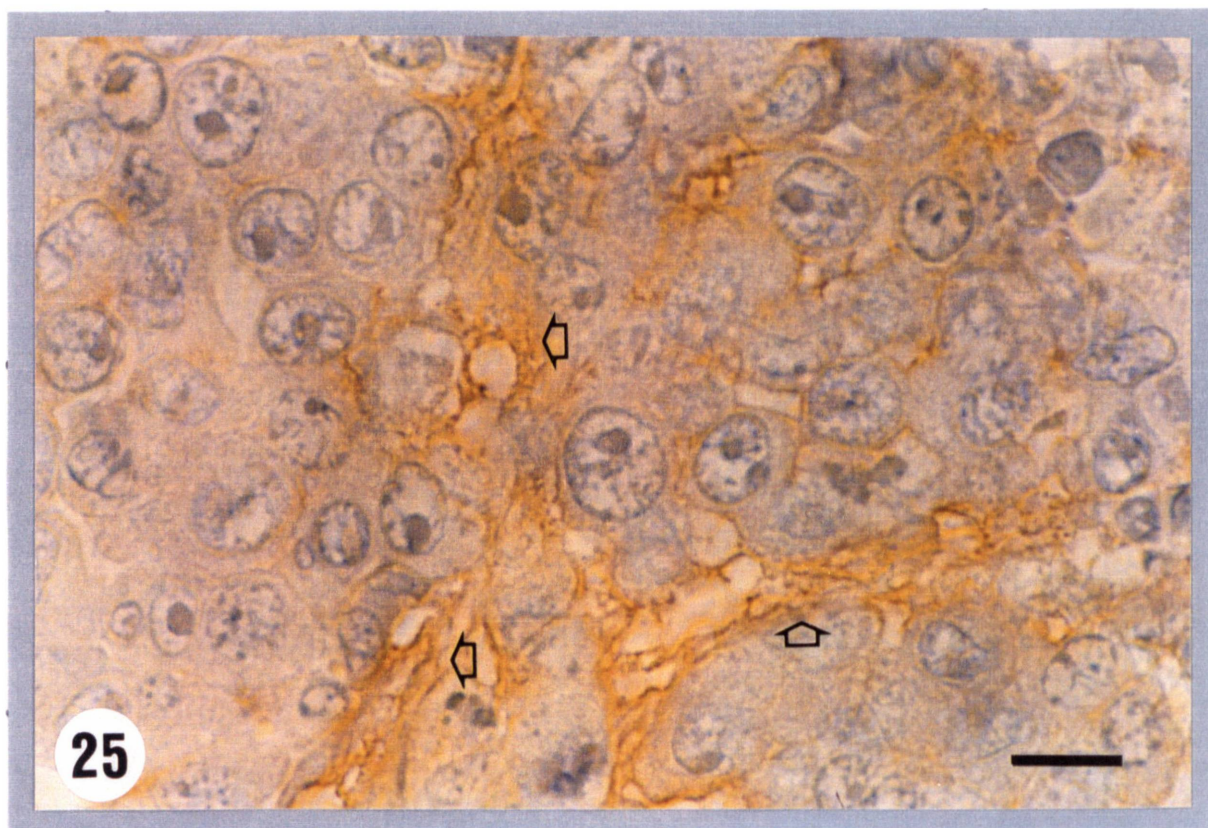


FIGURA 27 Utilização de anticorpo anti-FN no S-180 controle com 35 dias

Acentuada marcação positiva com anticorpo anti-FN (setas) entre as células tumorais.

Microscopia de Luz. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Barra: 10µm

FIGURA 28 Utilização de anticorpo anti-FN no S-180 controle com 35 dias

Matriz extracelular fracamente marcada com anticorpo anti-FN (setas).

Microscopia de Luz. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Barra: 10µm

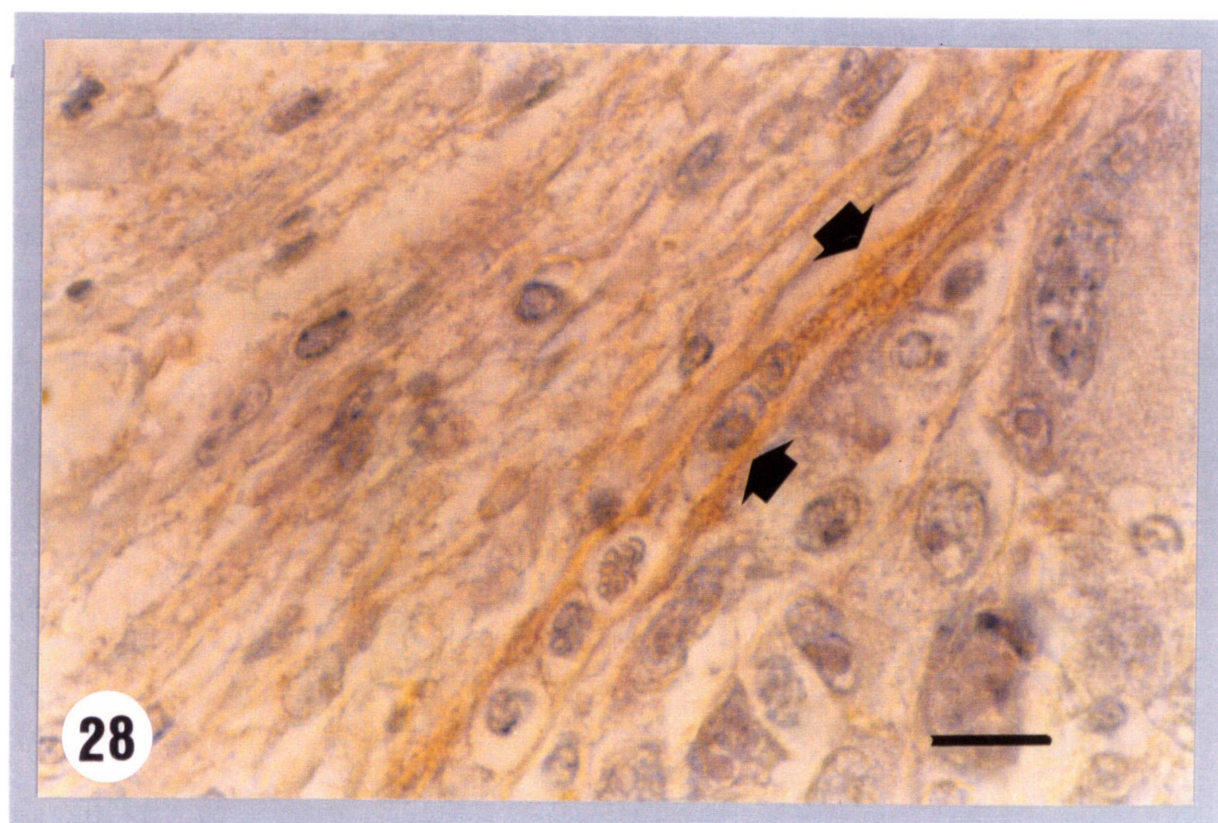
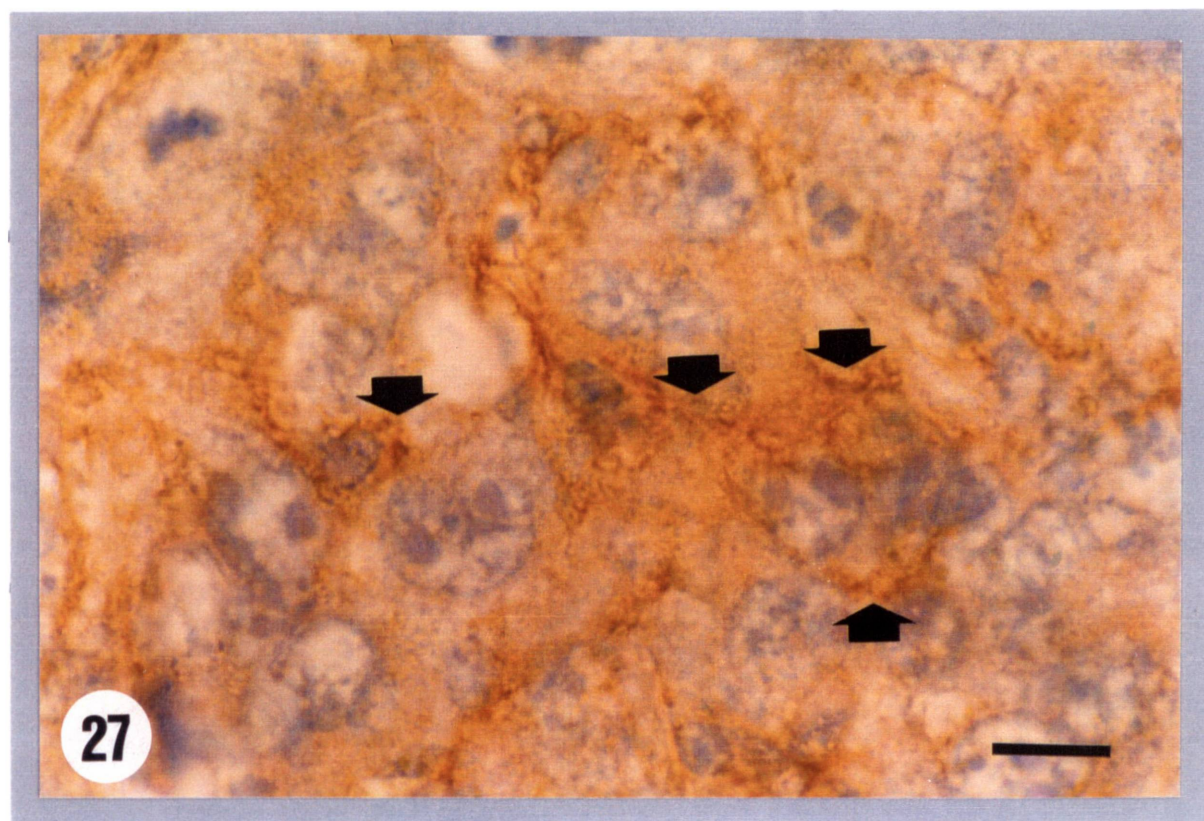


FIGURA 29 Utilização de anticorpo anti-FN no S-180 tratado com a α -Glu com 35 dias

Observa-se fraca marcação com anticorpo anti-FN (setas) entre as células tumorais.

Microscopia de Luz. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Barra: 10 μ m

FIGURA 30 Utilização de anticorpo anti-FN no S-180 tratado com a α -Glu com 35 dias

Matriz extracelular que delimita o S-180 de desenvolvimento, mostrando forte marcação com anticorpo anti-FN (setas).

Microscopia de Luz. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Barra: 10 μ m

OBS.: Notar a disposição fibrilar da FN nos animais tratados com a α -Glu em ambas as figuras.

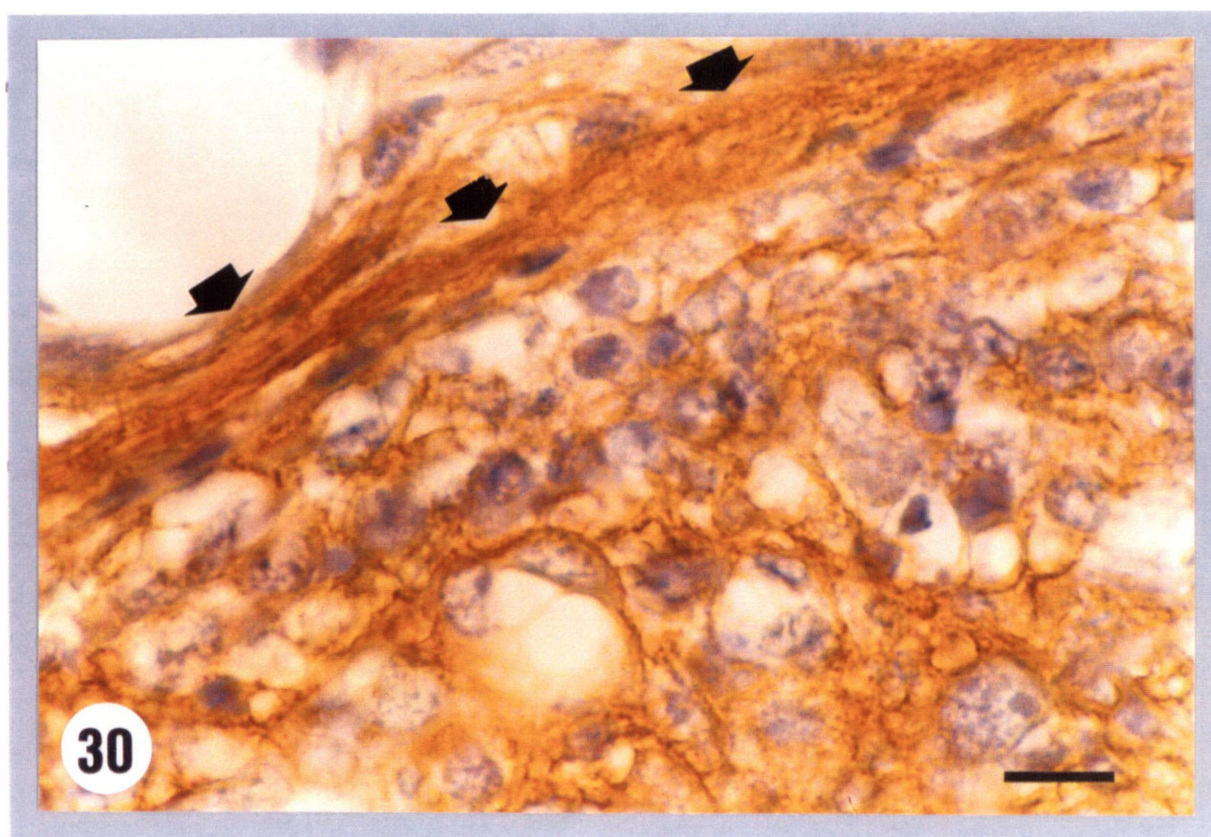
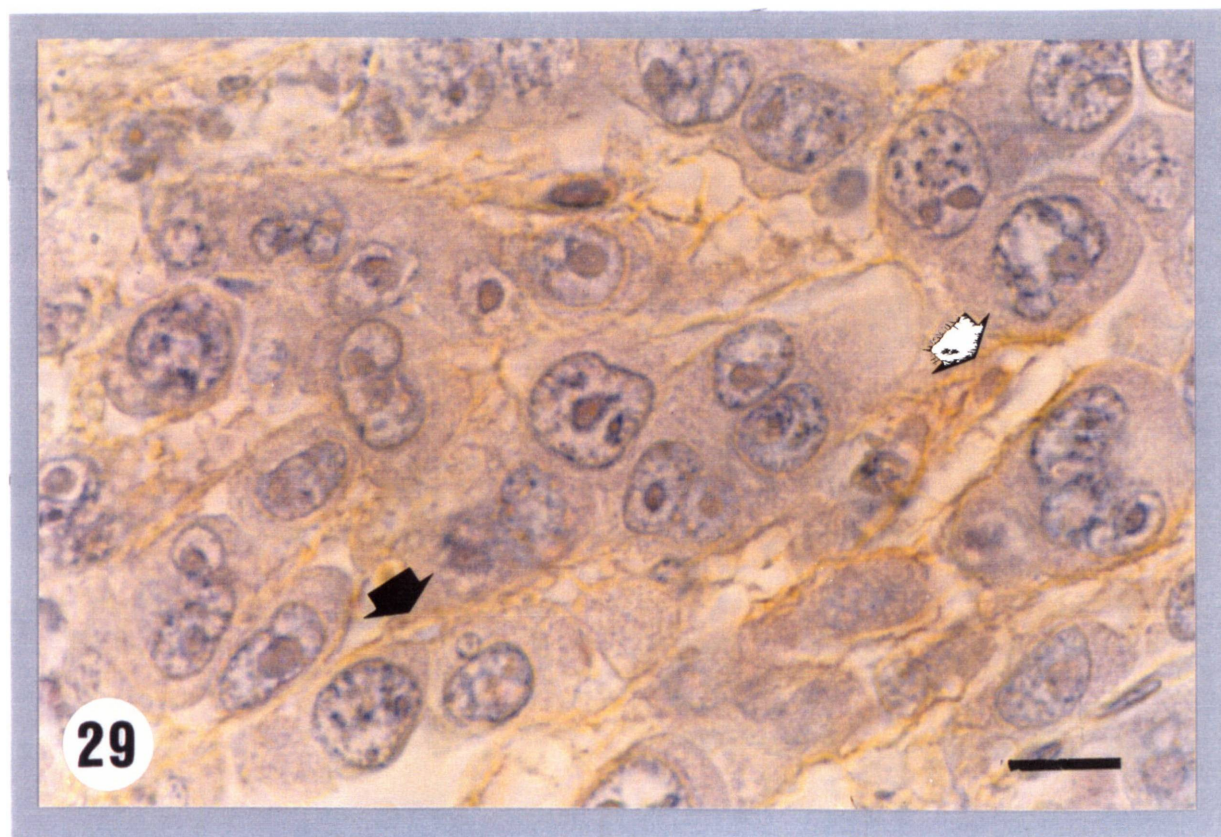


FIGURA 31 Curva de crescimento do S-180 controle e tratado com a α -Glu de *R. celastri*.

—■—, controle; —○—, tratado. VTM, Volume tumoral médio. A α -Glu foi administrada em uma única aplicação i.p., na dose de 200 mg.kg⁻¹, 24 h após a implantação do S-180. Os resultados foram obtidos ao longo de 35 dias. Letras iguais indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos (Teste de Tukey: $p > 0,05$).

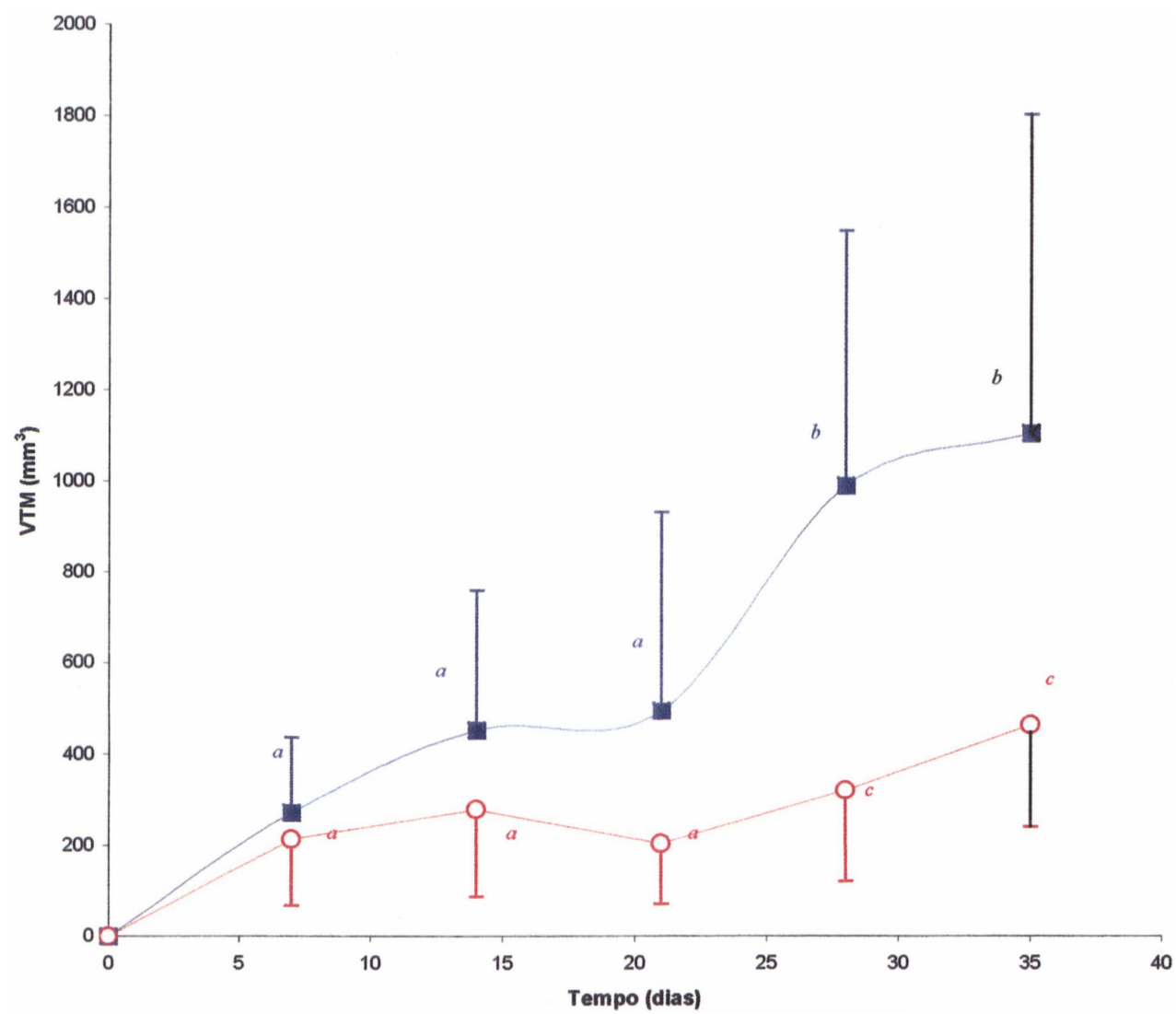
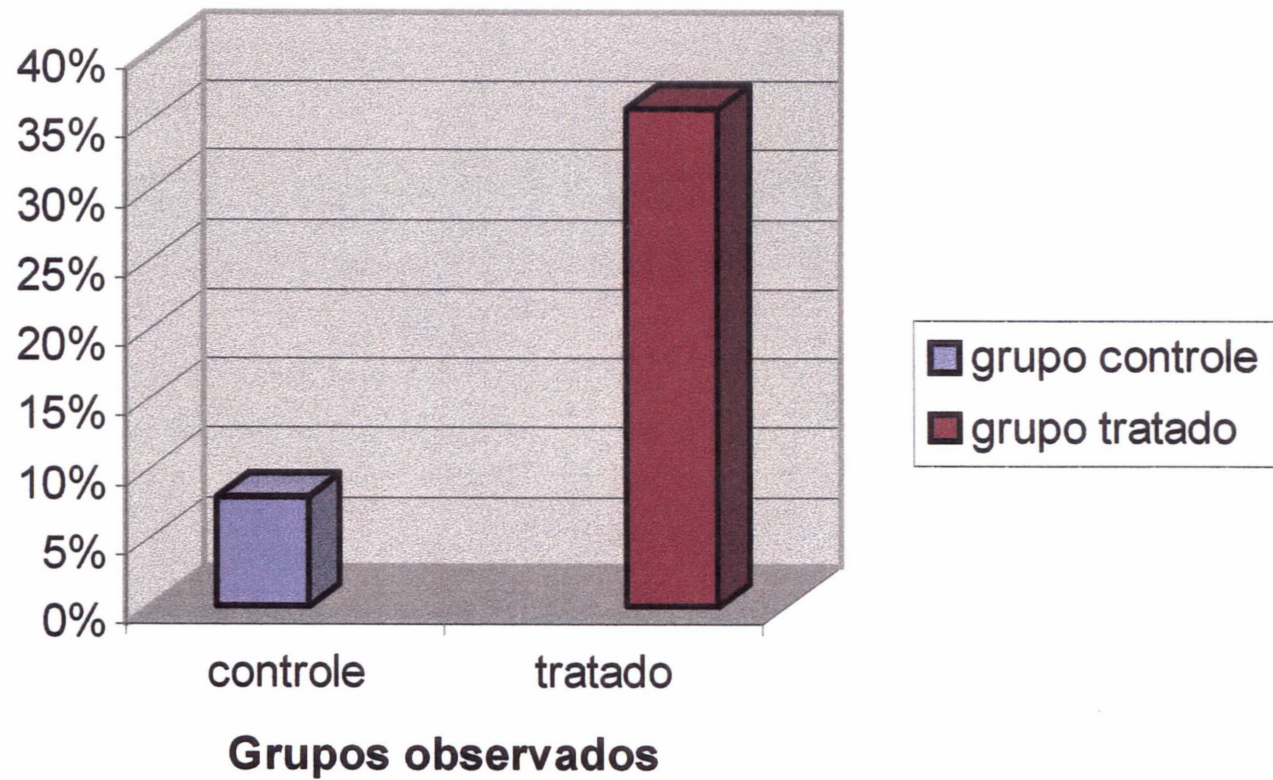


FIGURA 32 Gráfico do Percentual de inibição do crescimento do S-180 nos grupos controle e tratado ao longo de 35 dias.

O grupo controle obteve 8% de inibição do crescimento do tumor enquanto o grupo tratado obteve 36% de inibição do crescimento do tumor.

Inibição do Crescimento do S-180



6. DISCUSSÃO

O estudo dos mecanismos pelos quais as células tumorais se desenvolvem, migrando ou não para outros locais de sua origem, são de grande interesse para a Ciência.

A observação histológica é um dos primeiros passos para o conhecimento de determinado tipo de tumor. Sendo assim, é uma ferramenta que não se pode descartar quando se trata de procurar soluções capazes de minimizar os malefícios que os tumores ocasionam. Segundo a Organização Mundial de Saúde, o câncer é a terceira causa de óbitos no mundo em percentual por ano (12%), ficando atrás das doenças infecciosas e causadas por parasitas (32%) e das doenças do sistema circulatório (19%) (Pastore, 1998).

Nesta discussão irá se confrontar os resultados histológicos, imunohistoquímicos e os estatísticos com relação a percentagem de inibição do desenvolvimento do Sarcoma 180, em animais controle e tratado com a α -Glu de 7 e 35 dias. Serão comparados também, os volumes tumorais médios ao longo dos 35 dias dos animais controle e tratado com o polissacarídeo. A metodologia empregada oferece segurança suficiente para a finalidade do trabalho.

É importante salientar que a literatura é escassa em relação ao estudo do S-180 no que se refere a sua morfologia, havendo dúvidas inclusive quanto à sua origem ser mesenquimal ou epitelial (Stewart, 1959; Zuckerberg, 1972 e 1973; Bischoff, 1936.)

Acredita-se que os polissacarídeos de forma geral apresentem atividade anti-tumoral, agindo de maneira direta sobre a célula tumoral exercendo ação citotóxica ou indiretamente atuando como imunomodulador (Bohn, e BeMiller, 1995). Desta forma, a α -Glu, extraída do líquen *R. celastri* foi testada frente ao S-180 para se observar prováveis alterações já que este polissacarídeo apresentou efeito citotóxico sobre células HeLa *in vitro*, ocasionando apoptose quando observadas ao Microscópio de Luz e Eletrônico (Carneiro Leão, 1997).

As ulcerações aparentes na região de implantação do tumor, tanto nos animais controle quanto nos tratados de 35 dias está de acordo com a literatura

estudada. Entretanto, foi observado que os portadores de S-180 não suportam mais que 28 dias de vida (Zuckerberg, 1972), fato que não ocorreu neste trabalho, já que os animais sobreviveram até o 35^o dia, último dia do experimento.

O S-180 apresenta inibição de crescimento natural em 8 a 10% dos animais inoculados (Stewart, 1959), o que foi comprovado neste trabalho, já que o percentual de inibição para o grupo controle foi de 8%. Já o volume tumoral médio dos animais que desenvolveram o S-180, tanto controle quanto tratado, está dentro dos padrões de crescimento, apresentando diferenças significativas por volta do 28^o dia (Carneiro Leão, 1998), quando o tumor tratado com a α -Glu, passou a crescer bem menos que o tumor controle. Assim sendo, sugere-se que o polissacarídeo utilizado esteja atuando de forma a impedir e/ou retardar o crescimento do tumor, mecanismo que, segundo a literatura, ainda não estão totalmente esclarecidos.

Foi observado, que o tumor parece ser invasivo devido ao fato de infiltrar-se nas estruturas vizinhas como músculo estriado esquelético, tecido adiposo, nervos e tecido conjuntivo de maneira geral, além de não apresentar uma cápsula de tecido conjuntivo que detenha esta expansão. Com relação às células tumorais, a basofilia citoplasmática pode indicar um certo grau de síntese, já que estas células estão se multiplicando por mitoses sucessivas, onde é possível se observar inclusive as atípicas. Isso está de acordo com outros investigadores (Stewart, 1959; Zuckerberg, 1972). Ainda que estas características não fossem suficientes para caracterizar a malignidade do S-180, a presença de células tumorais isoladas como se estivessem em um processo de migração e a provável interação destas com a membrana endotelial de vasos sanguíneos permite sugerir um mecanismo metastático (Nicolson, 1989; Blood e Zetter, 1990; Cotran, 1994; Stevens e Lowe, 1996).

A utilização dos Tricrômicos para a observação de fibras do conjuntivo foi devido ao fato de existência de discordância na literatura em relação a presença destas fibras no S-180. Através da coloração com Tricrômico de Picrosírius-Hematoxilina associada à microscopia de polarização (Junqueira, 1979) foi possível observar fibras de tecido conjuntivo. Estas apareciam em pouca quantidade entre as células tumorais, o que está de acordo com Stewart (1959). Entretanto,

Zuckerberg (1972) citou que o tecido conjuntivo que rodeava o tumor, enviava septos para dentro da massa tumoral, apesar que neste trabalho foi possível visualizar esporádicas trabéculas.

A observação de vasos sanguíneos com muitos leucócitos na sua luz, a grande quantidade de células de defesa no tecido conjuntivo adjacente ao tumor e a presença de infiltrado mononuclear, permitem sugerir que o sistema imunológico do animal está respondendo, tentando de alguma maneira reagir ao tumor que ali está se desenvolvendo (Montovani, 1992; Ross, 1993 ; Stites e Terr, 1992; Abbas, 1994; Roitt, 1992). Esta resposta inflamatória parece ser mais intensa no tecido conjuntivo que delimita o tumor nos animais tratados com a α -Glu, o que sugere que este polissacarídeo possa ser considerado um estimulante do sistema imunológico (Bohn e BeMiller, 1995).

A grande quantidade de mitoses e a presença de vasos sanguíneos neoformados sugere que estas células tumorais estejam se desenvolvendo muito rapidamente, a ponto de necessitarem destes novos vasos para suprimento de nutrientes e oxigênio. Além disso, a presença de vasos permite as células tumorais se desenvolverem e produzirem metástases mais facilmente (Blood e Zetter, 1990; Fidler, 1994).

Ao se observar o S-180 tratado com o polissacarídeo ao microscópio óptico, foi possível visualizar bem próximo a região de necrose, uma grande quantidade de restos celulares, núcleos fragmentados e porções citoplasmáticas. A presença destas estruturas é característica do mecanismo de apoptose (Verhaegen, 1998; Staunton, 1995). Isto sugere que o polissacarídeo esteja envolvido na eliminação de células indesejadas, já que foi estudado que a indução do processo de apoptose possa ser realizado por quimioterapia (Carneiro Leão, 1997; Verhaegen, 1998).

A utilização do PAS tinha por objetivo a verificação da presença da glucana no S-180 e uma possível alteração pela glucana de moléculas que possuíssem radicais aldeídos vicinais. Para essas questões a resposta foi negativa já que não houve reação do PAS nem no controle nem no tratado.

As células apresentam receptores (integrinas) em sua superfície, que se ligam à moléculas da matriz extracelular, determinando a função dos componentes desta matriz. A laminina é uma glicoproteína específica de membranas basais (Timpl, 1979), e de origem epitelial. Com a utilização de imunohistoquímica com anticorpos que reconhecem LN, o S-180 apresentou-se negativo ou a molécula não foi detectada pelo método imunohistoquímico utilizado, provavelmente sugerindo que o S-180 seja um tecido com baixa biossíntese para LN ou mesmo ausência de biossíntese da molécula. Desta forma, devido a ausência deste marcador, pode-se especular sobre a provável origem não epitelial deste tumor.

A FN é uma glicoproteína que se liga às células via integrina, produzindo alterações no citoesqueleto, de maneira que possa desempenhar seu papel na adesão, migração e organização da matriz (Ruoslahti, 1988; Veiga, et al., 1996). Desta forma, sugere-se que o fato dos tumores controle e tratado de 7 dias de desenvolvimento, apresentarem mais marcação positiva para esta molécula, na região do tecido conjuntivo que delimita a região de células tumorais, seja porque as células de defesa possam provavelmente estar tentando migrar, utilizando a FN, em direção às células tumorais de forma atuar nas mesmas. Nos animais tratados de 35 dias a reação foi mais intensa entre as células do tecido conjuntivo, mostrando uma aparência fibrilar e uma organização matricial mais espessa, indicando que o polissacarídeo possa estar atuando de forma a tentar conter o crescimento tumoral, talvez aumentando a secreção de FN para a migração de células de defesa.

7. CONCLUSÕES

1. Baseado na estatística, a inibição no crescimento do S-180 de 8% nos animais controle e de 36% nos animais tratados com a α -D-glucana, é significativa, indicando um papel importante do polissacarídeo na inibição do crescimento deste tumor.
2. Baseado na estatística, os dados sugerem haver um retardo no crescimento dos tumores dos animais tratados com a α -D-glucana, indicando um papel de atuação na contenção tumoral, a partir do 28^o dia da aplicação do polissacarídeo.
3. As imagens sugestivas de apoptose, sugerem que a α -D-glucana pode realmente estar envolvida na indução deste mecanismo.
4. Infiltrado inflamatório mais intenso nos animais tratados com a α -D-glucana na região limítrofe ao tumor, permitem supor que o polissacarídeo estimulou os mecanismos de defesa orgânicos .
5. Ausência de laminina na matriz extracelular do S180 controle e tratado com a α -D-glucana indica que esta molécula não está sendo produzida por estas células, ou produzida em pequena quantidade, abaixo da sensibilidade do ensaio.
6. A fibronectina apresenta-se com disposição fibrilar e com organização mais espessa ao redor do tumor nos animais tratados, indicando que a glucana possa estar atuando de forma a conter o crescimento tumoral via moléculas de matriz extracelular.

BIBLIOGRAFIA

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Cellular and Molecular Immunology**, 2. ed. W.B. Saunders Company, U.S.A., 1994.
- AKIYAMA, S. K.; NAGATA, K.; YAMADA, K.M. Cell surface receptors for extracellular matrix components. **Biochim. Biophys Acta**, 1031, pp. 91-110, 1990.
- ALBERTS, B. *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1994.
- ARINAGA, S.; KARIMINE, N.; TAKAMUKU, K.; *et al.* Enhanced production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by peripheral monocytes after lentinan administration in patients with gastric carcinoma. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 14, p. 43-47, 1992.
- BEÇAK, W. and PAULETE, J. **Técnicas de Citologia e Histologia**, Livros Técnicos e Científicos Editora S.A. Rio de Janeiro, v. 1-2. 1976.
- BERZELIUS, J.J. Versuche über die Mischung des Isländischen Mosses und Seine Anwendung als Nahrungsmittel. **J.Chem.phys.**, New York, v.7 p. 317-353, 1815.
- BISCHOFF, F. and LONG, M.L. Influence of age on the growth of Sarcoma 180. **Am.J.Cancer**.v.27 n.1, p.104-106, 1936.
- BLOOD, C.H. and ZETTER, B.R. Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1032, p. 89-118, 1990.
- BOHN, J. A. and BeMILLER, J.N. (1→3)-β-D Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers** v. 28, p. 3-14, 1995.
- BRADNER, W.T.; CLARKE, D. A .; STOCK, C.C. Stimulation of host defense against experimental cancer. I. Zymosan and Sarcoma 180 in mice. **Cancer Res.** Baltimore, v.18, p.347-351, 1958.

- CALABRESI, P. and CHABNER, B. A. Quimioterapia das doenças neoplásicas IN: GOODMAN GILMAN, A.; RALL, T. W.; NIES, A. S. (Eds.) **As bases farmacológicas da terapêutica**, 8. ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, p. 96-124, 1991.
- CARNEIRO LEÃO, A.M.; BUCHI, D.F.; IACOMINI, M.; GORIN, P.A.J. and OLIVEIRA, M.B.M. Cytotoxic effect against HeLa cells of polysaccharides from the lichen *Ramalina celastri*, **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v.29, n.4, pp. 503-509, 1997.
- CARNEIRO LEÃO, A. M. **Atividade anti-tumoral dos polissacarídeos nativos e quimicamente modificados do líquen *Ramalina celastri***. Curitiba, 1998. 147p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- CATANZARO GUIMARÃES, S. A. **Patologia Básica da Cavidade Bucal**, Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1982.
- CLARCK, E.A . and BRUGGE, J.S. Integrinas and signal transductional pathways: The road taken. **Science**, 268, pp. 233-239, 1995.
- COOMBE, D.R.; PARISH, C.R.; RAMSHAW, I.A.; SNOWDEN, J.M. Analysis of the inhibition of tumor metastasis by sulphated polysaccharides. **Int. J. Cancer**, v.32, p. 82-88, 1987.
- COTRAN, R.S., KUMAR, V., ROBBINS, S. L. *et al* (eds) **Robbins - Pathologic Basis of Disease**, 5. edition, W.B. Sanders Co.: Philadelphia, 1994, p. 241-304.
- CULBERSON, C. F. Chemical guide to lichen products. In:_____. **Chemical and botanical guide to lichen products**. North Carolina, University of North Carolina Press, p. 73-88, 1969.
- CULLING, C. F. A .; ALLISON, R. T.; BARR, W.T. **Cellular Pathology Technique**, London: Butlerworth CO, 1985.
- CZECZUGA, B. ; SKULT, H. Carotenoids in lichen of Southern Finland. **Ann. Bot. Fenn.**, Helsinki, v.25, p.229-232, 1988.

- DARNELL, J.; LODISH, H.; BALTIMORE, D.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P. **Molecular Cell Biology**, 3. ed. Scientific American Books, New York, 1995.
- DURAND, G. Les sélectines et leur rôle dans l'interaction des leucocytes avec les cellules endothéliales. **Médecine / Sciences**, v. 8, p. 1051-1056, 1992.
- FIDLER, I.J. Cancer Metastasis. **British Medical Bulletin**, v. 47, n.1, p.157-177, 1991.
- FIDLER, I.J. and ELLIS, L.M. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. **Cell**. 79: 185-188, 1994.
- GORIN, P. A .J.; BARON, M.; SILVA, M. L. C.; TEIXEIRA, A .Z. A .; IACOMINI, M. Lichen carbohydrates. **Ciênc. Cultura**, São Paulo, v.45, n.1, p.27-36, 1993.
- HANAHAN, D. Signaling Vascular Morphogenesis and Maintenance. **Science**, 277: p.48-50, 1997.
- HOGG, N, LANDIS, R. C. Adhesion molecules in cell interactions. **Current Opinions in Immunology**, v. 5, p. 383-392, 1993.
- JOHNSON, H. M., RUSSELL, J. K., PONTZER, C. H. Superantigens in human disease. **Scientific American**, p.42-73, April, 1992.
- JUNQUEIRA, L.C.U., BIGNOLAS, G. , BRETANI, R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochemical J.** , v.11 p.447-455, 1979.
- KAWAKUBO, Y., KOMIYAMA, K., UMEZAWA, I., NISHIYAMA, Y.. Histopathological Studies on Antitumor Effect of Sporamycin. Cell-mediated Immunity Against Allogeneic Tumor-bearing Mice. **Cancer Chemother. Pharmacol.** v. 5, p.113-118, 1980.
- KISHIDA, E., SONE, Y., MISAKI, A . Purification of an antitumor-active, branched (1→3)- β -D-Glucan from *Volvariella volvacea*, and elucidation of its fine structure. **Carbohydrate Research**, v.193, p.227-239, 1989.
- LANGERON, M. **Précis de Microscopie**. Masson et C^{ie}, Éditeurs: Paris, p. 643-646 1949.

- LIOTTA, L.A ., RAO, C.N. and WENER, U.M. Biochemical interactions of tumor cell with the basement membrane. **Ann. Rev. Biochem.**, v.55, pp. 1037-1057, 1986.
- MACKAY, C. R., IMHOF, B. A. Cell adhesion in the immune system. **Immunology Today**, v. 14, p. 99-102, 1993.
- MERCURIO, A .M. Laminin receptors: achieving specificity through cooperation. **Trends Cell Biol.** 5, pp. 419-423, 1995.
- MICENO, A . D. Galactomannan and isolichenan components of the carbohydrate-rich lichen *Ramalina ecklonii* (Spreng.) Mey and Flot. , **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v.55, p.1391-1392, 1991.
- MIZUNO, T., ANDO, M., SUGIE, R. *et al.* Antitumor activity of some polysaccharides from an edible mushroom *Ningyotake*, the fruiting body an the cultured micelium of *Polyporous confluens*. **Bioscy. Biotech. Biocem.**, v. 56, p. 34-41, 1992.
- MIZUNO, T.; KINOSHITA, T.; ZHUANG, C. U. N.; ITO, H.; MAQYUZUMI,Y. Antitumor-active heteroglycans from niohshimeji mushroom, *Tricholoma giganteum*. **Biosci. Biotechnol.Biochem.** v.59, n.4,p.568-571, 1995
- MONTENEGRO, M.R. ; FRANCO,M. **Patologia - Processos Gerais** , Editora Atheneu, 3. ed,1995.
- MONTOVANI, A .; BOTTAZZI, B.; COLOTTA, F. *et al.*, The origin and function of tumor associated macrophages. **Immunology Today**, v.13, n.7, p.265-270,1992.
- NICOLSON, G. L. Metastatic tumor cell interactions with endothelium, basement membrane and tissue **Current Opinion in Cell Biology** v.1, p. 1009-1019, 1989.
- NODA, H.; AMANO, H.; ARASHIMA, K.; NISIZAWA, K. Antitumor activity of marine algae. *Hydrobiologia*, v.204/205, p. 577-584, 1990.
- PARDI, R., INVERARDI, L., BENDER, J. R. Regulatory mechanisms in leukocyte adhesion: flexible receptors of sophisticated travelers. **Immunology Today**, v. 13, p. 224-230, 1992.

- PARISH, C.R.; COOMBE, D.R.; JAKOBSEN, K.B. et al., Evidence that sulphated polysaccharides inhibit tumor metastasis by blocking tumor-cell-derived heparanases. **Int. j. Cancer**, v.40, p. 511-518, 1987.
- PARISH, C.R. and SNOWDEN, J.McK. Sulphated polysaccharides having metastatic and/or anti-inflammatory activity. **PCT Application No WO 88/05301**, 1988.
- PASTORE, K. Na rota da cura. **Veja**, São Paulo, ed. 1546, ano 31, n.19, p.105, 1998.
- PEREIRA, E.C.; NASCIMENTO, S.C.; LIMA, R.C.; SILVA, N.H.; OLIVEIRA, A .F.M.; BANDEIRA, E.; BOITARD, M.; BERIEL, H.; VICENTE, C.; LEGAZ, M.E. Analysis of *Usnea fasciata* crude extracts with antineoplastic activity. **Tok. J. Exp. Clin. Med.**, v.19, n.1-2, p.47-52, 1994.
- PHILLIPS, H. J. Dye exclusion tests for cell viability. IN: KRUSE, M. K. (ed.) **Tissue culture, methods and applications**, Academic Press: New York, 1973 p. 406-408.
- PIENTA, K.J.; NAIK, H.; AKHTAR, A .; YAMAZAKI, K.; REPLOGLE, T.S.; LEHR, J.; DONAT, T.L.; TAIT, L.; HOGAN, V.; RAZ, A . Inhibition of spontaneous metastasis in a rat prostate cancer model by oral administration of modified citrus pectin **J. Natl. Cancer Inst.**, v.87, n.5, p.348-353, 1995.
- PUEYO G. Constituants glucidiques dans les lichens. I. Polyalcools. Revue bibliographique. **Ann. Fals. Exp. Chim.**, Paris, v.73, n.787, p.331-337, 1980 (a).
- PUEYO G. Constituants glucidiques dans les lichens. II. Oses. Revue bibliographique. **Ann. Fals. Exp. Chim.**, Paris, v.73, n.789, p.509-513, 1980 (b).
- PUEYO G. Constituants glucidiques dans les lichens. III. Osides. Revue bibliographique. **Ann. Fals. Exp. Chim.**, Paris, v.74, n.797, p.343-347, 1981.
- REN, D.L.; WANG, J.Z.; NODA, H.; AMANO, H.; OGAWA, S. The effects of an algae polysaccharide from *Gloiopeltis tenax* on transplantable tumors and immune activities in mice **Planta Med**, Ayr, v.61, p. 120-125, 1995.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**, 2. ed., Editora Manole Ltda, São Paulo, 1992.

- ROSS, W. D., VETVICKA, V. CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 92, p.181-184, 1993.
- RUOSLATHI, E. Fibronectin and its receptor. **Ann. Rev. Biochem.**57, p. 375-413, 1988.
- RUOSLAHTI, E. Integrins as signaling molecules and targets for tumor therapy. **Kidney Int.**, v.51, n.5, p. 1413-1417, 1997.
- SCHUPPAN, D. SOMASUNDARAN, R., JUST, M. The extracellular matrix: a major signal transduction network. IN: CLEMENTE, B., GUILLOZO, A. (eds) **Cellular and molecular aspects of cirrhosis**, v. 216, p.115-133, 1992.
- SCHWARZBAUER, J.E. Alternative splicing of fibronectin: three variants, three functions. **Bioessays** v.13, p.527-533, 1991.
- STAUNTON, M.J.; and GAFFNEY, E.F. Tumor type is a determinant of susceptibility to apoptosis. **American J. of Clin. Pathol.** v.103, n.3, p.300-307, 1995.
- STEWART, H. L., SNELL, K.C., DUNHAM, L.S. and SCHLYEN, S.M.: **Transplantable and transmissible tumors of animals**. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, 1959.
- STEVENS, A.;LOWE,J. **Patologia**. Editora Manole, S.P. 1. ed., 1996.
- STITES,D.P. & TERR, A .I. **Imunologia Básica**, Editora Prentice-Hall do Brasil Ltda, Rio de Janeiro, 1992.
- SUZUKI, I.,ITANI, OHNO, N. *et al.* Effect of a polysaccharide fraction from *Grifola frondosa* on immune response in mice. **Journal of Pharmacobiodynamics**, v. 8, p. 217-226, 1985.
- TIMPL, R., ROHDE, H., ROBEY, P.G., et al. Laminin, a glycoprotein from basement membrane. **J. Biol. Chem.**, 254, p. 9933-9937, 1979.
- TRYGVASSON,K. The laminin family. **Curr.Opin. Cell Biol.**, 5, p. 877-882, 1993.

- VEIGA, S.S., ELIAS, M.C.Q.B., GREMSKI, W., et al. Detection of post-translational sulfation of $\alpha_5\beta_1$ integrin and its role in integrin-fibronectin binding. **Brazil. J. Med. Biol. Res.**, 29, p. 1235-1238, 1996.
- VERHAEGEN, S. Microscopical Study of Cell Death via Apoptosis. **The Americas Microscopy and Analysis** january, p. 19-21, 1998.
- WILLIS, R. A. The spread of tumors in the human body, Butterworth & Co.: London, 1952, IN: COTRAN, R. S., KUMAR, V., ROBBINS, S. L., SCHOEN, F. J. (eds) **Robbins-Pathologic Basis of Disease**, 5. ed., W. B. Sanders Co: Philadelphia, p. 241-304, 1994,.
- YAMADA, H., KAWAGUCHI, N., OHMORI, T., TAKESHITA, Y., TANEYA, S.I., MIYAZAKI, T. Structure and antitumor activity of an alkali-soluble polysaccharide from *Cordyceps ophioglossoides*. **Carbohydrate Research**, v.125, p.107-115, 1984.
- YAMADA, K.M. and MIYAMATO, S. Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. **Curr.Opinion Cell Biol.** v.117, p.1119-1133, 1995.
- YURCHENCO, P.D., CHENG, Y.S. and COLOGNATTO, H. Laminin isoforms and independent network in basement membranes. **J. Cell Biol.**, 117, p. 1119-1133, 1992.
- ZETTER, B.R. The cellular basis of site-specific tumor metastasis. **New Eng. J. Med.**, 322, p. 605-612, 1990.
- ZUCKERBERG, C. **Estructura e Histoquímica del Sarcoma 180**. Buenos Aires, 1972. 55p. Tese (Doutorado em Medicina) - Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.
- ZUCKERBERG, C. Ultrastructure of Sarcoma 180. **Cancer Research**, v. 33, p.2278-2282, 1973.