



Ismael Dale C. Guerreiro da Silva
Luiz Henrique Gebrim
Afonso Celso Pinto Nazário
Geraldo Rodrigues de Lima

Trabalho realizado na
Disciplina de Ginecologia da
Universidade Federal de
São Paulo.

ANGIOGÊNESE INDUZIDA POR IMPLANTES DE CARCINOMA MAMÁRIO HUMANO EM CÓRNEAS DE COELHO. EFEITO DA CARTILAGEM DE TUBARÃO SOBRE A NEOFORMAÇÃO VASCULAR

Rev bras Mastol 1995; 5(3): 16-19

UNITERMOS

Angiogênese;
Câncer de mama;
Cartilagem de tubarão.

RESUMO

O efeito antiangiogênico da cartilagem de tubarão foi avaliado através da colocação de um fragmento deste tecido em íntima associação com implantes de carcinoma ductal infiltrante em córneas de coelho. A amostra constituiu-se de 4 grupos: implantes de tecido mamário normal (controle), de carcinoma ductal infiltrante, de carcinoma associado à cartilagem de tubarão e um último grupo, no qual se realizou trauma cirúrgico. Em cada grupo, foram estudadas 10 córneas. A diferença entre a angiogênese nos grupos com carcinoma (130,3 vasos/córnea) e com carcinoma e cartilagem (131,6 vasos/córnea) não mostrou diferença significativa. No grupo com parênquima normal, encontrou-se média de 42,7 vasos/córnea, valor significativamente menor do que aqueles obtidos nos implantes de carcinoma. A neovascularização no grupo com trauma cirúrgico (12,6 vasos/córnea) não diferiu estatisticamente quando comparada ao grupo controle. Os autores concluem que o uso da cartilagem de tubarão, nos moldes como é hoje comercializada, não se constitui em terapêutica confiável.

INTRODUÇÃO

A neoformação vascular induzida por neoplasias malignas é pressuposto essencial para o seu crescimento⁵. As células em transformação neoplásica vão adquirindo características peculiares; uma delas, indubitavelmente, é a sua capacidade de secretar substâncias angiogênicas no meio circundante.

De fato, a inibição de genes supressores do crescimento tumoral e a ativação de oncogenes durante o processo de malignização são etapas fundamentais, as quais, entre outras coisas, condicionam a formação e a secreção de fatores angiogênicos².

A melhor compreensão do processo angiogênico neoplásico e a estreita dependência da célula tumoral pelo oxigênio fizeram com que vários autores tentas-

sem conseguir bloqueio do aporte sanguíneo ao tumor, através de táticas antiangiogênicas.

Brem e Folkman³ demonstraram que fragmentos de cartilagem de coelhos recém-nascidos colocados ao lado de implantes de carcinoma V2 em córneas de coelho levavam à inibição do crescimento tumoral e da angiogênese. Da mesma forma, Lee e Langer¹⁰ referem bloqueio da neoformação vascular na córnea de coelhos quando se utilizaram de extratos de cartilagem.

Com o intuito de avaliar a eficácia da cartilagem de tubarão (*Sphyrna levini*) como bloqueadora da neoformação vascular induzida pelo carcinoma ductal infiltrante, realizamos implantes desse tumor em córneas de coelho deixando um fragmento de cartilagem em íntima associação com a neoplasia.

MÉTODO

Animais de experimentação

Para realizar esse estudo, utilizaram-se 22 coelhos, o que representa um total de 44 córneas avaliadas. Os animais eram fêmeas brancas da raça Nova Zelândia, virgens, com três a quatro meses de idade e pesando aproximadamente 2,5 kg.

Amostras tumorais

Os fragmentos de tumor foram obtidos por ocasião da cirurgia (mastectomias) a que foram submetidas mulheres portadoras de carcinoma de mama sem tratamento prévio. As amostras eram colhidas no momento da cirurgia e, para minimizar a falta de nutrientes ao tumor, eram imediatamente mergulhadas no meio de conservação Eagle's, como preconizado por Jikihara e col.⁹

Amostras de parênquima mamário não neoplásico

O parênquima mamário não neoplásico foi obtido na porção periférica de fibroadenomas extirpados sob anestesia local, segundo os critérios de Fanger e Ree⁽⁴⁾, após aprovação do Comitê de Ética do Hospital São Paulo. Uma vez obtidos, os fragmentos eram imediatamente mergulhados no meio de conservação Eagle's. Os implantes eram feitos imediatamente após a coleta do material.

Amostras de cartilagem de tubarão

Os fragmentos frescos de cartilagem de tubarão jovem (*Sphyrna levini* - tubarão-martelo) foram cedidos pelo Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP - EPM). Possuíam cerca de 2 mm³, mantidos em geladeira a -20°C.

Técnica do implante

A técnica do bolso corneano foi aquela proposta por Gimbrone e col.⁷ As coelhas eram previamente anestesiadas com 75 mg de cloridrato de ketamina intramuscular ou com 25 mg de tiopental sódico endovenoso aplicado na veia marginal da orelha. Instilamos, também, em ambas as córneas, algumas gotas de cloridrato de tetracaína, que tinham como objetivo o efeito anestésico local. Todo o procedimento foi realizado em condições assépticas com auxílio de microscópio cirúrgico.

Utilizamos 40 córneas subdivididas em 4 grupos assim designados:

Grupo A: controle (10 córneas), onde implantamos parênquima mamário normal;

Grupo B: trauma cirúrgico (10 córneas), onde o bolso corneano foi deixado vazio;

Grupo C: (10 córneas), com implantes de carcinoma ductal infiltrante;

Grupo D: (10 córneas), onde implantamos carcinoma associado à cartilagem de tubarão.

Os fragmentos de parênquima mamário normal, carcinoma e cartilagem possuíam volume aproximado de 2 mm³.

Dessa forma, em um mesmo coelho testamos as duas eventualidades, ou seja, o mesmo animal constituía o caso controle dele próprio. Utilizamos, nessa etapa do estudo, um total de 24 córneas; contudo, 4 córneas foram excluídas por apresentarem infiltrado inflamatório importante no exame histológico.

Paralelamente a este grupo, realizou-se também o implante de parênquima mamário normal (2 mm³) em outras 10 córneas (grupo A), objetivando-se obter parâmetros quantitativos da angiogênese induzida por tecidos não neoplásicos.

A neovascularização induzida pelo trauma mecânico foi avaliada em outras 10 córneas (grupo B) para que pudéssemos saber até que ponto o simples trauma interferiria em nossos resultados. Para tal, empregamos idêntica metodologia na feitura do "bolso corneano" sem, no entanto, deixar tecido em seu interior.

Método histopatológico

Realizou-se estudo histopatológico pela técnica da hematoxilina eosina (HE) das amostras que deram origem aos fragmentos implantados. Confirmamos, assim, a presença de carcinoma ductal infiltrante e parênquima mamário não neoplásico.

Ao final de 10 dias, os animais eram sacrificados e tinham seu globo ocular retirado e imediatamente fixado em solução de formol a 10%.

A região da córnea entre o implante e o limbo (região onde se formam os vasos) era retirada através de cortes perpendiculares aos capilares, interessando toda a espessura da córnea. A inclusão em parafina foi feita de maneira a oferecer cortes com visão frontal dos vasos.

Em seguida, fez-se novo estudo histopatológico, onde se avaliou a presença de infiltrado leucocitário associado aos microvasos como preconizado por Gimbrone e col.⁷ Excluímos do estudo 4 córneas, por apresentarem considerável infiltrado inflamatório; esta eventualidade obrigou-nos a realizar 4 novos implantes com intuito de igualar numericamente todos os grupos.

Tabela 1

Coelhas submetidas a implantes corneanos segundo o número de vasos neoformados por córnea nos grupos A (controle), B (trauma), C (carcinoma) e D (carcinoma e cartilagem de tubarão)

	A (Controle) (n=10)	B (Trauma) (n=10)	C (Carcinoma) (n=10)	D (Carcinoma e cartilagem) (n=10)
	40	10	130	140
	59	12	142	122
	36	15	136	136
	38	16	98	118
	42	13	128	120
	50	16	132	142
	52	11	140	138
	30	10	135	129
	39	12	129	130
	41	12	132	141
Média	42,7	12,6	130,2	131,6

Análise de variância por postos de Kruskal-Wallis

(AxBxCxD)

$$H_{\text{calc}} = 32,93^* \quad H_{\text{crit}} = 7,82$$

Uma vez confirmada a ausência de infiltrado inflamatório importante em todas as lâminas partimos então para a contagem dos microvasos.

Método histométrico

Para contar os microvasos, utilizamos ocular quadriculada Carl Zeiss KPL 8X e objetiva de 10X, o que resultava em aumento final de 80X. A angiogênese foi, dessa forma, quantificada em estudo duplo-cego, onde se incluíram apenas os vasos contendo hemácias em seu interior.

Método estatístico

Para análise dos resultados foi aplicada a análise de variância por postos de Kruskal-Wallis, com a finalidade de comparar o número de vasos sanguíneos entre os quatro grupos estudados. Esta análise foi complementada pelo teste de comparações múltiplas⁸. Fixou-se em 0,05 ou 5% ($\alpha \leq 0,05$) o nível de rejeição da hipótese de nulidade, assinalando-se com um asterisco os valores significantes.

RESULTADOS

A avaliação quantitativa das 40 córneas mostrou valor médio de 42,7 vasos/córnea no grupo A com parênquima mamário normal. Este resultado foi significativamente menor do que aquele observado nos implantes de carcinoma com ou sem cartilagem, cujos valores foram, respectivamente, 130,2 vasos/córnea no grupo C e 131,6 vasos/córnea para o grupo D. A média de vasos neoformados induzidos pelo tecido não neoplásico (42,7 vasos/córnea), no grupo A, mostrou-se superior àquela ocorrida nas córneas onde o estímulo angiogênico foi exclusivamente o trauma (grupo B), com 12,6 vasos/córnea. Esta diferença, entretanto, não foi estatisticamente significativa.

O grupo com trauma (grupo B), média 12,6 vasos/córnea, também se mostrou estatisticamente menos vascularizado quando comparado aos grupos com carcinoma puro (grupo C, média 130,2 vasos/córnea) ou com cartilagem (grupo D, média 131,6 vasos/córnea).

Quando comparamos a angiogênese que surgiu nos implantes de carcinoma puro (grupo C, média 130,2 vasos/córnea) com aquela observada nos implantes de tumor e cartilagem (grupo D, média 131,6 vasos/córnea), não encontramos diferenças estatisticamente significantes (tabela 1).

DISCUSSÃO

O modelo de estudo para a neoformação vascular aqui adotado, constitui-se em metodologia confiável e já se encontra consagrado desde a metade da década de 70 quando foi pela primeira vez descrito por Gimbrone e col.⁷

Desde então, vem sendo um dos mais utilizados por todos os pesquisadores que se interessam pela angiogênese. Ainda assim, com intuito de evitar qualquer interferência do processo inflamatório em nossos resultados, excluímos 4 córneas (10%) do nosso material por constataremos presença de infiltrado inflamatório proeminente na região do implante.

A maneira por nós encontrada para investigar a possibilidade do trauma cirúrgico interferir em nossos resultados, foi realizar a feitura do bolso corneano sem, contudo, incluir tecido em seu interior. Dessa forma, conseguimos descartar a possibilidade do trauma interferir nos resultados.

Uma das nossas primeiras constatações, obtidas através desse modelo, foi demonstrar a importante capacidade angiogênica do carcinoma dutal infiltrante quando comparado ao parênquima mamário não neoplásico, onde a neoformação vascular ocorreu numa proporção pelo menos três vezes menor do que aquela observada nos implantes de carcinoma.

Constatamos, também, que a cartilagem de tubarão não mostrou nenhum efeito antiangiogênico sobre a neoformação vascular induzida pelo carcinoma dutal infiltrante, pois o número de vasos encontrados nos implantes de carcinoma com e sem cartilagem foi exatamente o mesmo.

Até o presente momento muitas estratégias antiangiogênicas já foram testadas, algumas com sucesso, como por exemplo, a utilização de heparina, de

medroxiprogesterona e de anticorpos monoclonais contra fatores angiogênicos^{1, 6, 9}.

Quando ao uso da cartilagem de tubarão, muito embora não tenhamos conseguido demonstrar a sua eficácia, não descartamos, por completo, a eventual existência de um fator antiangiogênico pelo fato desse tecido ser totalmente avascular. Acreditamos que o isolamento desse fator e a sua produção em maior quantidade poderá representar estratégia eficaz no bloqueio da angiogênese tumoral.

De fato, Møses e col.¹¹ já isolaram da cartilagem um fator de 27.650 daltons, o qual se mostrou eficaz no bloqueio da neoformação vascular em membrana cório-alantóide de ovos de galinha. Entretanto, a utilização da cartilagem de tubarão nos moldes como é hoje comercializada, inclusive em países do Primeiro Mundo, não constitui, a nosso ver, terapêutica antiangiogênica confiável.

KEY WORDS

Angiogenesis;
Breast carcinoma;
Shark cartilage.

ABSTRACT

INDUCED ANGIOGENESIS BY BREAST HUMAN CARCINOMA ON RABBIT CORNEA. EFFECT OF SHARK CARTILAGE UPON TUMOR ANGIOGENESIS

The inhibition of tumor angiogenesis mediated by shark cartilage was evaluated by an experimental model using the rabbit cornea. The authors studied 4 groups, each one with 10 rabbit corneas: normal breast tissue (control), breast human infiltrative cancer, breast cancer plus shark cartilage and surgical injury. The difference between carcinoma group (130,3 vessels/cornea) and carcinoma/shark cartilage group (131,6 vessels/cornea) didn't show statistical difference. In the normal breast group, the authors found 42,7 vessels/cornea; the difference with carcinomas groups was statistically significant. The angiogenesis observed in the surgical injury group (12,6 vessels/group) didn't show statistical difference when compared with control. The results show that shark cartilage doesn't appear to have any therapeutic effect upon tumor angiogenesis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BATTIWALLA ZF, SHETHNA YI. An antiserum to tumor angiogenesis factor: Therapeutic approach to solid tumors. *Anticancer Res* 1989; 9:1809-1814.
2. BOUCK N. Tumor angiogenesis: The role oncogenes and tumor suppressor genes. *Cancer Cells* 1990; 2:179-185.
3. BREM H, FOLKMAN J. Inhibition of tumor angiogenesis mediated by cartilage. *J Exp Med* 1975; 141:427-439.
4. FANGER H, REE HJ. Cyclic changes of human mammary gland epithelium in relation to the menstrual cycle - an ultrastructural study. *Cancer* 1974; 34:571-585.
5. FOLKMAN J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285:1182-1186.
6. FOLKMAN J, WEISS PB, JOULLIE MM. Control of angiogenesis with synthetic heparin substitutes. *Science* 1989; 243:1490-1493.
7. GIMBRONE MA, COTRAN RS, LEAPMAN SB et al. Tumor growth and neovascularization: An experimental model using the rabbit cornea. *JNCI* 1974; 52:413-427.
8. HOLLANDER M, WOLFE SA. Nonparametric statistical methods. New York: John Wiley & Sons. 1973; 503.
9. JIKIHARA H, NOBUYUKI T, YAMAMOTO R et al. Inhibition effect of medroxyprogesterone acetate on angiogenesis induced by human endometrial cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167:207-211.
10. LEE A, LANGER R. Shark cartilage contains inhibitors of tumor angiogenesis. *Science* 1983; 221:1185-1187.
11. MOSES MA, LUDHALTER J, LANGER R. Identification of an inhibitory of neovascularization from cartilage. *Science* 1990; 248:1408-1410.

Endereço para correspondência:

Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva
Rua Pedro de Toledo, 399
04039-031 - São Paulo - SP