



## “TUMORES ENCEFÁLICOS EXPERIMENTAIS NO RATO DE LABORATÓRIO APÓS O IMPLANTE DE CRISTAIS DE METIL-COLANTRENO NA CÓRTEX PARIETAL

(Contribuição ao estudo da carcinogênese experimental)

FELICIANO PINTO (\*\*)

As preciosas observações iniciais de Jamagiwa e Ichikawa (1915) Kenaway e Hieger (1930), Roussy e Ralieu (1930) etc. . . . , relativas à obtenção experimental de tumores em animais normais, a partir de substâncias cancerígenas, abriram amplos horizontes à pesquisa sobre a gênese dos processos neoplásicos.

A descoberta das propriedades cancerígenas do 3,4 *benzopirêno*, bem como do *colantrêno*, *metil-colantrêno*, *1,2,5,6 dibenzantracêno*, vieram facilitar sobremaneira os trabalhos experimentais no domínio da oncologia.

Dentre os diversos departamentos orgânicos utilizados em tais estudos, os órgãos nervosos e, particularmente o encéfalo, oferecem condições extre-

mamente favoráveis. Isto se deve ao fato de que aí se encontram tecidos de natureza histológica variável, oriundo de pelo menos, dois folhetos embrionários. Além disso, a frequência elevada dos tumores nervosos no homem, leva a crêr que os tecidos neurais sejam altamente sensíveis ao “estímulo” de substâncias carcinogenéticas, encontradas no organismo.

Entre o momento de aplicação da substância cancerígena e, o aparecimento do tumor, há um período de tempo variável, designado tempo de indução (Paul Stainer), dependendo da substância empregada, do tecido, da espécie animal, da dose. . .

Inúmeros pesquisadores utilizaram-se do sistema nervoso central, como campo de observação na produção experimental de tumores. Dentre estes, citam-se Weil; Oberling, Guérin e Guérin; Shear; Ivan Bertrand e J. Gruner; Peers; Ilfeld; Seligman e Shear; Bailey e colaboradores; Zimmerman e Arnold; além de outros. Coube a Arthur Weil o mérito de ter

(\*) Trabalho realizado na seção de neurocirurgia do Instituto de Câncer — Rio de Janeiro — Brasil. Apresentado ao VI Congresso Internacional de Câncer realizado entre 22-29 de julho de 1954, São Paulo, Brasil.

(\*\*) Chefe da Seção de Neurocirurgia do Instituto de Câncer — Serviço Nacional de Câncer. Rio de Janeiro — Brasil.

relatado pela primeira vez em 1938 a obtenção de tumores encefálicos no rato, injetando o *Styryl 430*.

A aplicação de gase umedecida em alcatrão, em contacto com o tecido cerebral (animal?), praticada por Roussey e Raileau, provocou necrose dos tecidos. Mais tarde, Roussy Oberling, Guérin e Guérin, aplicando cristais de benzipirêno sob a pia-mater em dez ratos, não encontraram modificações locais, observando entretanto, em três animais que sobreviveram mais de dez meses, adenomas hipofisários de tipo cromóforo. Askanazy, obteve sarcoma no rato após a injeção intraperitoneal de benzipirêno em óleo de oliva e, o implante feito no cérebro de animal homólogo resultou 8 semanas após, no aparecimento de um condroma no ventrículo lateral, medindo 5x6mm. A injeção intracerebral de 0,5 cc. de benzipirêno no coelho, resultou no desenvolvimento de um condroma medindo 13x7mm com áreas de condrossarcoma, em uma observação feita pelo mesmo autor.

Weil em 1938 obteve, carcinoma epidermoide típico em um grupo de 6 animais injetados. Nos outros cinco, formaram-se apenas granulomas.

Ivan Bertrand e Jean Gruner, aplicaram em coelhos, o benzipirêno cristalizado, utilizando como vetor a lanolina. Na metade dos casos examinados (?), ocorreram reações gliais com hipertrofia gigante da neuroglia, sem reação glial e sem fibrose. Os núcleos de tais células, adquiriam volume dez vezes maiores que o da astroglia normal. Compararam tais núcleos às formas gliais observadas na Enfermidade de Wilson e Pseudo-esclerose de Westphal, admitindo um determinismo

fisiopatológico análogo entre a intoxicação pelo benzipirêno e os sintomas hepatolenticulares, o que, para o autor indicava de maneira inequívoca, as relações estruturais entre os sais biliares e os hidrocarbonetos cancerígenos.

Peers em 1939, implantou pequenos cilindros de dibenzantracêno-colesterol a 5%, no cérebro de 81 camundongos. Dêstes animais, 51 sobreviveram mais de 6 meses. Não foi obtido um único glioma durante os 10 meses que se seguiram à aplicação. O autor conclui pela reação lenta ou, falta absoluta de reação dos tecidos nervosos incluindo as meninges, aos estímulos carcinogênicos de 1,2,5,6 dibenzantracêno.

Bailey e colaboradores utilizando cães, obtiveram fibrossarcoma da duramater trabalhando com metil-colantrêno.

Os mais interessantes estudos sobre o assunto, referem-se ao excelente trabalho de Seligman e Shear, os quais utilizando ratos de laboratório, obtiveram uma grande variedade de tumores cerebrais, empregando sempre o mesmo tipo de substância, a mesma dose, a mesma região de aplicação. Os estudos de Sel. e Shear, além do mais, vêm provar que os tecidos neurais são sensíveis à aplicação de substâncias cancerígenas, havendo reação de quase todos os elementos celulares que constituem os tecidos nervosos.

Em uma série de 20 animais utilizados na experiência, devidamente catalogados e observados, foram obtidas 13 respostas positivas, com um total de 11 gliomas e 2 fibrossarcomas. Os 7 animais restantes, não apresentaram qualquer reação neuroglial. Den-

tre os gliomas, o autor alinhou de acordo com sua designação:

- 2 oligodendrôgliomas.
- 1 glioblastoma multiforme.
- 1 espongioblastoma multiforme.
- 1 espongioblastoma polar.
- 2 espongioblastoma bipolares.
- 1 pinealoma.
- 1 ependimoma.
- 2 neuroepiteliomas.

Devemos assinalar que em alguns casos, o diagnóstico histológico nos pareceu duvidoso; *rato 7*, oligodendroglioma, diagnosticado como pinelaoma; *rato 11*, diagnosticado como ependimoma, embora o aspecto histológico revelando a existência de palissadas, necrose e figuras de mitose, nos faça crer em um glioblastoma; *rato 13*, diagnosticado astrocitoma fibrilar parecendo entretanto tratar-se de oligodendroglioma. Observações idênticas haviam sido feitas por Zülch em sua excelente monografia, no capítulo de tumores experimentais.

Postas de lado estas pequenas observações, o magnífico trabalho de Seligman e Shear, realizado com notável critério científico, veio mostrar, ao contrário das conclusões de Peers com o "1,2,5,6 dibenzantraceno", que o cérebro e as meninges são altamente sensíveis ao estímulo do metil-colantrêno.

O chamado tempo de indução, definido por Stainer como o período decorrido entre o momento de aplicação da substância cancerígena e o aparecimento do blastoma, variou nas observações dos citados autores de 227 dias (tempo mínimo) a 407 dias (tempo máximo). Cumpre ressaltar que o conceito de Stainer, refere-se aos tumores cutâneos, facilmente surpreendidos

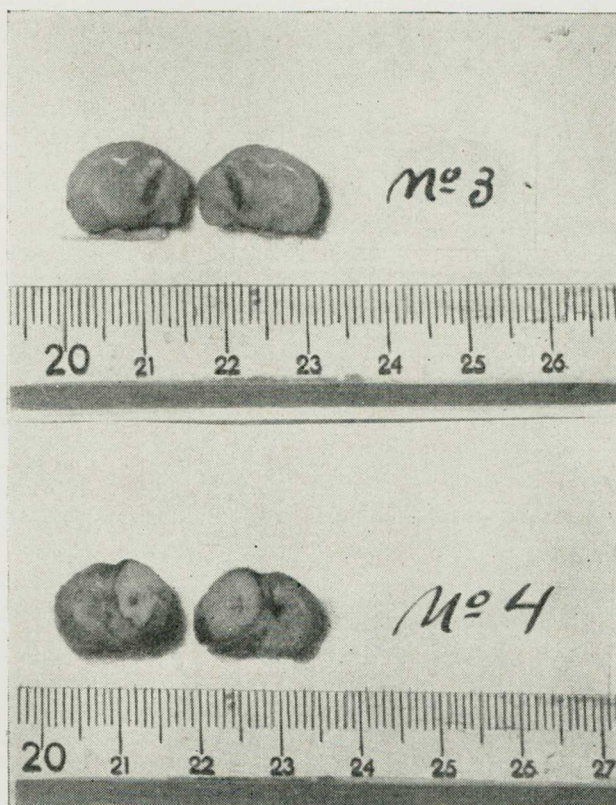
pela inspeção e palpação. No que se refere ao sistema nervoso central, o tempo de indução poderá talvez ser definido, como o período que decorre entre o momento de aplicação e o aparecimento dos primeiros sinais de doença.

Peers em 1940, estudando as respostas do sistema nervoso central à aplicação do metil-colantrêno, notou que os meduloblastomas diferenciavam-se a partir do ponto de contacto do "pellet" com a substância cinzenta da córtex. O glioblastoma, ao contrário, parecia originar-se abaixo da córtex, no ponto de contacto do hidro-carboneto com a substância branca da corôa radiada e fornix.

Muito interessantes são ainda as observações de Zimmerman e Arnold, os quais implantaram o metil-colantrêno em diversos pontos (meninges, cérebro, cerebelo...), obtendo um meduloblastoma no cérebro e, um glioblastoma no cerebelo. É curioso assinalar, que o glioblastoma é considerado como inexistente em sua localização cerebelar, no homem, salvo quando metastático.

Várias outras contribuições interessantes à neuropatologia, têm sido fornecidas pela carcinogênese experimental. Os últimos autores citados, conseguiram transplantar o glioblastoma obtido no camundongo, para o tecido subcutâneo de animais homólogos. Após uma série de linhagens sucessivas, a partir do tumor primitivo, heteromorfo, foram obtidas formas puras de ependimoma, oligodendroglioma, astrocitoma e espongioblastoma polar.

Russel, obteve dois gangliocitomas usando o metilcolantrêno; Vasquez-Lopes, após administrar o "2ace-



*Fig. 1, a e b:* Em *a* (rato n. 3), observa-se no hemisfério direito, tecido de coloração esbranquiçada, ocupando o centro semi-oval correspondente, contrastando nitidamente do tecido normal. A parte central, de coloração escura, continha restos da substância cancerígena.

Em *b* (rato n. 4), observa-se volumosa néoplasia, ocupando praticamente todo o hemisfério direito, determinando, o bombeamento das estruturas nervosas para o lado oposto. Nota-se a nítida delimitação do processo, em cujo centro existiam fragmentos de metilcolantrêno.

tylaminofluorina" obteve glioma no rato; Uehlinger, obteve "tumores cerebrais" após a implantação de tório radioativo no cérebro de ratos.

Nossas observações referem-se a um grupo de 10 animais, submetidos ao implante de "cilindros" de metil-colantrêno, de acôrdo com o método preconizado por Seligman e Shear.

Os animais utilizados, foram os ratos brancos de laboratório sem que tivessem sido submetidos a qualquer método de seleção. Elegemos sempre a região parietal direita, praticando a trepanação craneana com broca cilíndrica de aproximadamente 0,5mm de diâmetro, precedida de anestesia pelo éter. Após a abertura óssea, introduzíamos o cilindro de metil-colantrêno (o qual, de acôrdo com os cálculos de Seligman e Shear deveriam conter aproximadamente 5mg da substância) em pleno tecido cerebral, procedendo-se a seguir o fechamento da ferida operatória.

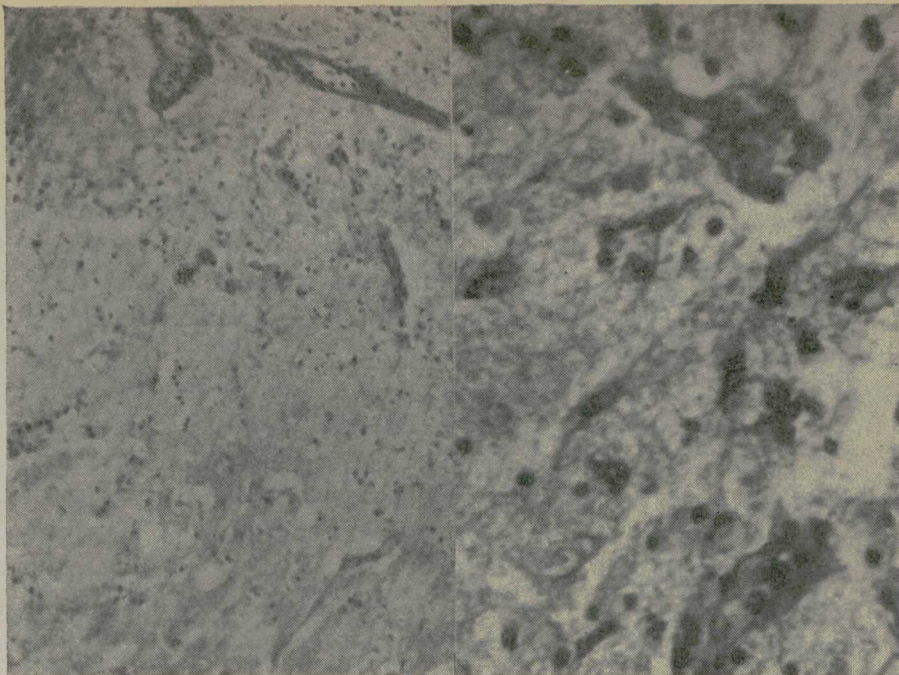
Os animais foram cuidadosamente observados tentando surpreender-se os menores sinais de doença.

O rato *n.º 3*, foi encontrado morto exatamente 30 dias após o implante. O exame da superfície cerebral, revelou a existência de lesão cortical, de contôrno circular, ao nível do lobo parietal direito. O corte frontal passando a este nível, evidenciou a presença da substância cancerígena contornada por tecido de coloração esbranquiçada, consistente, formando um anel em torno do cilindro, contrastando nitidamente com o tecido nervoso vizinho, estendendo-se em profundidade, desde o corpo caloso às regiões da base do cérebro. Ausência de fenômenos de deslocamento de massas (FIG. 1a).

O exame histológico dos preparados corados pelo método de hematoxilinaeosina, revelou zonas de aspecto microscópico distinto. Assim, notava-se na parte central uma área acelular, onde se podiam ver restos dos cristais de metil-colantrêno contornados por substância homogênea, corada em róseo. Neste ponto não se distinguia qualquer elemento celular. Este trecho transformava-se gradualmente em uma área, onde se podia observar a existência de numerosos restos celulares, a qual sofrera necrose total. Esparsamente viam-se fragmentos nucleares, tornando-se impossível distinguir a natureza histológica dos mesmos.

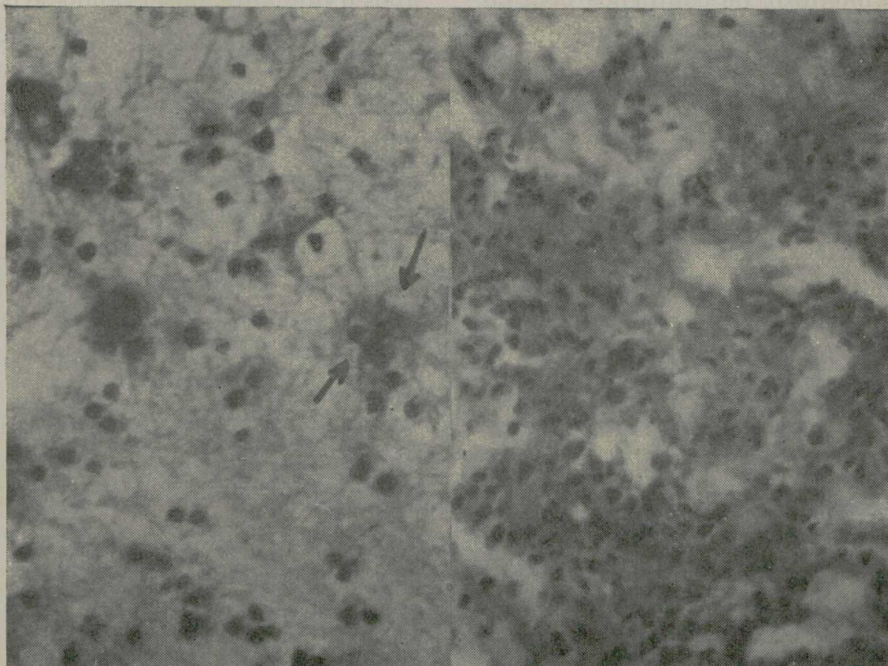
Em seguida, contornando as zonas supra citadas, encontrava-se uma terceira, caracterizada histologicamente pela intensa participação dos elementos neurogliais, com acentuada predominância de formas astrocítárias, além de fibrose glial. O tecido conjuntivo participava ativamente do fenômeno sob a forma de intensa proliferação vascular (FIG. 2.a), notando-se, particularmente nas zonas marginais, uma intensa proliferação capilar, idêntica a observada na periferia dos blastomas encefálicos de natureza glial no homem.

As células, representadas por núcleos de diversa morfologia, permitiam reconhecer elementos arredondados, hipercromáticos, identificáveis à oligodendoglia. Predominando no quadro histológico, notavam-se formas mais volumosas, ovulares, com a cromatina disposta em finos grânulos, frequentemente contornados por citoplasma pouco abundante, corando-se em róseo. O contôrno destes elementos, era irregular, poliédrico, emitindo freqüentemen-



*Fig. 2 a e b — Rato 3* a) Aspecto histológico observado em peq. aumento, nas porções correspondentes a 2a. e 3a. zona. Pode-se vêr nitidamente a zona da necrose parcial transformando-se gradualmente em um sítio onde predominam os elementos neurogliais e, conjuntivos sob forma de intensa proliferação vascular.

Em *b*, nota-se com maior aumento, a natureza histológica das células, predominando as formas astrocitárias, vendo-se com muito nitidez, três dêstes elementos. Coloração pela Hematoxilina-eosina.



*Fig. 3. a e b —* Em *a*, rato 3, observa-se com grande aumento, elementos arredondados, de núcleos hiperaromáticos (oligodendroglia) de permeio com formas celulares mais volumosas, multinucleadas. No ângulo superior externo, pode-se notar um astrocito, com núcleo excêntrico e citoplasma vacuolisado. Em *b*, rato 4. Blastoma de mediana riqueza celular, predominando as formas ovalares.

te nítidos prolongamentos de espessura e dimensões variáveis (FIG. 2b.). Era freqüente observar-se a situação excêntrica do núcleo (FIG. 3a) bem como formas multinucleares.

A predominância de formas astrocitárias, além de fibrose glial, permitiu-nos o diagnóstico de *astrocitoma fibrilar*.

O rato n.º 4 foi sacrificado 40 dias após o implante. O animal apresentava-se inativo, inapetente, movendo-se com muita dificuldade.

O exame da superfície encefálica permitia observar nítidos sinais de hipertensão intracraniana, com aumento de volume do hemisfério direito e apagamento das vascularizações cortical, em nítido contraste com o lado esquerdo.

Os cortes frontais revelaram a existência de volumosa massa de aspecto blastomatoso, de contornos bem circunscritos, localizada ao nível do lobo parietal direito, fazendo proeminência na superfície cerebral e estendendo-se desde a córtex da convexidade cerebral, até à base do órgão, ocupando toda a região correspondente ao centro semi-oval e núcleos basais (FIG. 1b.). Praticamente, poder-se-ia dizer, o hemisfério direito fôra substituído pela néoformação (FIG. 1b.). Presença de restos de cristais no seio do tumor. Os sinais de deslocamento de massas, eram evidentes, notando-se nítido bombeamento da face medial do hemisfério direito para o lado oposto.

A nítida delimitação do processo e o aspecto macroscópico, eram bastante sugestivos de tratar-se no caso, de um leptomenigeoma.

O exame histológico, revelou 1) zona central de liquefação, com persistência de fragmentos de cristal de me-

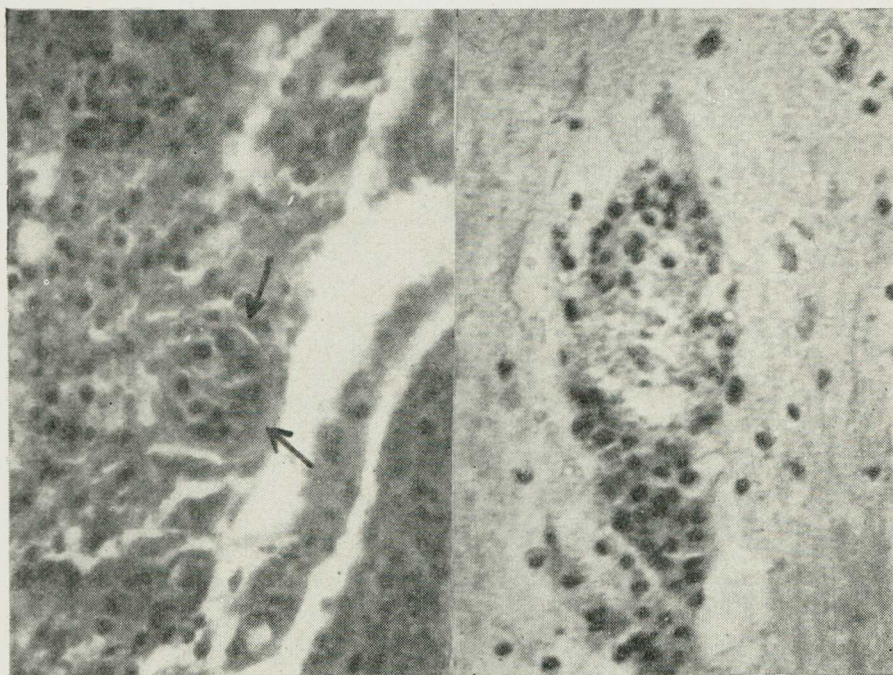
til-colantrêno. 2) zona de necrose total, observando-se numerosos restos nucleares formando um manguito em torno da zona precedente. 3) zona de proliferação celular podendo-se observar o nítido caráter conjuntivo das células que constituem esta zona. Predominam as formas ovais ou alongadas com disposição freqüentemente fusiforme (FIG. 3b), escasso citoplasma, tendência em alguns pontos para a disposição em enovelados idênticos aos observados nos leptomenigeomas humanos (FIG. 4a.). Vasos sob a forma de delicados capilares. Raras mitoses. Em alguns sítios, observava-se a existência de infiltrados perivascularres, constituídos por células redondas (FIG. 4b.). O aspecto histológico em seu conjunto, não diferia do observado nos *meningeomas de tipo endotelital*.

O rato n.º 1 foi sacrificado 15 dias após o implante, observando-se os fragmentos do cilindro de metil-colantrêno incrustados na substância nervosa. Ausência de reação parenquimatosa que pudesse sugerir atividade neoplásica. Os ratos 2 e 5 morreram logo após o implante em consequência de hemorragia ventricular. O rato 6, 53 dias após o implante foi sacrificado, constatando-se a existência de volumoso abscesso no hemisfério cerebral direito.

Os animais restantes, sacrificados sem que tivessem apresentado qualquer sintoma de doença, ao completar 90 dias após o implante, nada apresentaram de anormal do ponto de vista histológico.

#### COMENTÁRIO

Em 10 animais utilizados nas experiências em que foi empregado o me-



*Fig. 4, a e b* — Rato 4. Em *a*, observa-se no ponto assinalado pelas setas, as células aglomeradas, adquirindo disposição psamomatosa idêntica à observada nos lepto-meningeômas humanos.

Em *b*, infiltrado perivascular, de células redondas, observado na periferia da zona necrótica.



til-colantrêno, reconhecido como um dos mais potentes carcinogênicos, foram obtidas respostas positivas em 2 animais (rato 3 e 4), após um *tempo de indução rápido*, de 30 e 40 dias respectivamente.

O exame anatômico do encéfalo do rato n.º 3 revelou nos cortes transversais tecido de coloração esbranquiçada, espesso, contornando os restos da substância cancerígena. O exame histológico evidenciou intensa proliferação glial, com participação ativa do tecido conjuntivo sob forma de capilares néo-formados. A predominância de formas astrocíticas e, fibrose glial, permitiram o diagnóstico de *astrocitoma fibrilar*.

O rato n.º 4 apresentou volumosa neoplasia parietal, deformando o hemisfério direito e determinando o bombeamento das estruturas cerebrais para o lado oposto. O exame histológico revelou blastoma de natureza conjuntiva, constituído de células fusiformes adquirindo em alguns pontos tendência à formação de enovelados. O aspecto microscópico era idêntico ao observado nos leptomeningeomas de tipo endotelial, no homem.

As observações acima, mostraram a possibilidade de obter-se de maneira relativamente rápida, tumores encefálicos de natureza histológica bem definida. Em linhas gerais, pode-se dizer que os tumores obtidos experimentalmente assemelham-se aos observados na patologia humana. As zonas de necrose central, observadas nos pontos de contacto do tecido nervoso com a substância cancerígena são facilmente explicados pela ação tóxica exercida pela mesma.

Inúmeras contribuições foram já fornecidas pelos estudos experimentais, como a possibilidade de desenvolvimento de tumores nervosos fora do sistema nervoso central em implantes subcutâneos, ao contrário do que se julgava. A histogênese e a terapêutica experimental, provavelmente, muito terão a lucrar com a evolução de tais estudos.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1 — ASKANAZY, M. — Wien klin. Wochenschr. 70: 816-822, 1937.
- 2 — BAILEY, SHIMIZU, DAVIS — Journal of Neuropath, 3, 184 (1944).
- 3 — ILFELD, FREDERIC — American J. of Cancer 1936, 26 pag. 26.
- 4 — IVAN BERTRAND e J. GRUNER — Comptes Rendus de la Soc. Biol., 1938 — Tome CXXVIII, 128, pag. 637.
- 5 — KENNAWAY E. L. — Biochem Journal — 24: 497, 1930.
- 6 — OBERLING, GUÉRIN e GUÉRIN — Comptes Rendus de la Soc. Biol., 1936, 123, 1152-1154.
- 7 — PAUL STAINER — Surgery, gynecology and obstetrics, 76, 1943.
- 8 — PEERS, JAMES H. — The American Journal of Pathology, vol. XV, March 1939, n. 2, pag. 26.
- 9 — ROUSSY e RAILEAU — cit. por Seligman e Shear.
- 10 — ZULCH, K. J. — Die Hirngeschwülste — Johann Ambrosius Berth, 1951, pag. 25.
- 11 — WEIL, ARTHUR — Arch. of Pathology, vol. 26 — Oc. 1938, n. 4 777.
- 12 — STEWART, HAROLD, L. — "Experimental brain tumors" in The Physiopathology of Cancer, Hoeber, New York, 1953, pag. 771-92.
- 13 — ARNOLD, H. and ZIMMERMAN, H. M. — Cancer Research, 3:682-685, 1953 (citado por Harold Stewart).
- 14 — RUSSEL, W. O. — Cancer Research, 5:140-151, 1945 (citado por Harold Steawrt).
- 15 — VASQUEZ-LOPES, — Nature, 156:296-297, 1945 (idêntica citação).