

RONALDO DE ALBUQUERQUE RIBEIRO



- TUMOR FIBROHISTIOCÍTICO TRANSPLANTÁVEL EM RATOS WISTAR -
CARACTERIZAÇÃO ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ÓPTICA, MICROSCO -
PIA ELETRÔNICA, CITOQUÍMICA ENZIMÁTICA E IMUNOHISTOQUÍ -
MICA.

TRABALHO APRESENTADO COMO REQUI -
SITO FINAL À COORDENAÇÃO DO CUR -
SO DE ESPECIALIZAÇÃO EM HEMATO -
LOGIA E HEMOTERAPIA (CONVÊNIO -
UFC-MEC-BID 111).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

1986

À memória de meu pai,
um homem como poucos.

À minha mãe e irmãos
pelo que representam
na minha vida.

Este trabalho representa um esforço conjunto de 3 Universidades e portanto, de muitos.

Ao Prof. Roberto Wagner Bezerra de Araújo, pelo espírito científico na observação do tumor original, sem o qual não estaríamos realizando este trabalho.

Aos meus orientadores Prof. Manassés Claudino Fonteles (UFC), Prof. Francisco Valdeci Ferreira (UFC), Prof. Sérgio Zucolloto (USP-RP) e Prof. Carlos Bacchi (UNESP-BOTUCATU), pelo exemplo que com certeza influenciou na minha formação científica.

Aos dedicados mestres Drs. Murilo Martins e Helena Pi - tombeira pelo muito que nos ensinaram ao longo do Curso o que por certo nos guiou na elaboração da presente pesquisa.

A Profa. Dra. Therezinha Fereira Lorenzi (HC-USP) pe - los valiosos ensinamentos e sugestões no tópico relativo a citotquímica enzimática.

Ao Prof. Marcos A. Rossi (Departamento de Patologia-USP-RP) pela realização do excelente trabalho de Microscopia eletrônica inclusive documentação fotográfica.

Ao monitor e amigo Marcelo Chagas Leitão pela ajuda na difícil tarefa de manutenção do tumor.

Aos amigos do Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC, Prof. Teonas Carvalho Cipriano, Prof. Dalgimar Bezerra de Menezes, Prof. Livino Pinheiro Júnior, Prof. Paulo Roberto Carvalho de Almeida pelo incentivo permanente e ajuda nas discussões e documentação fotográfica.

Aos Profs. Marcus Raimundo Vale e Francisco Hélio Rolape

la amizade e apoio.

Aos técnicos Francisco Avelino Ferreira (UFC), Laura Midori Kawasse (SUP-RP), elementos indispensáveis na realização deste trabalho.

À Sra. Rita de Cassia Sugette de Aguiar pela excelência no trabalho datilográfico.

Ao Prof. Raimundo Roberto Normando pela ajuda e incentivo que permitiram a nossa ida a Ribeirão Preto e Botucatu.

À Universidade Federal do Ceará, FAPESP e CNPq pelo auxílio financeiro.

ÍNDICE

Página

RESUMO	xiii
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Fibrohistiocitoma Maligno Humano ..	1
1.2 - Neoplasias Fibrohistiocíticas em animais experimentais	2
1.3 - Caracterização das Neoplasias Fi brohistiocíticas	3
1.4 - O Tumor	4
1.5 - Objetivos	6
2 - MATERIAL E MÉTODOS	8
2.1 - Animais Experimentais	8
2.2 - Preparação do Inóculo (transplan te)	8
2.3 - Repicagem	9
2.4 - Microscopia Óptica	9
2.5 - Microscopia Eletrônica	9
2.6 - Citoquímica Enzimática	10
2.6.1 - Alfa Naftil acetato esterase	10
a) - Princípio da reação.....	10
b) - Técnica.....	10
2.6.2 - Naftol AS cloroacetato esterase .	11
a) - Princípio da reação	11
b) - Técnica	11
2.6.3 - Fosfatase Ácida	11
a) - Princípio da reação	11
b) - Técnica	12
2.7 - Imunohistoquímica	12
a) - Princípio da reação	12
b) - Técnica	12
c) - Avaliação microscópica	13
2.8 - Crescimento Tumoral e Pesquisa de Metástase	13
3 - RESULTADOS	16
3.1 - Crescimento do Tumor e índice de pega	16

	Página
3.2 - Análise Macroscópica	16
3.3 - Microscopia Óptica	17
3.4 - Metástases	18
3.5 - Achados ultraestruturais	19
3.6 - Citoquímica e enzimática	19
3.7 - Imunohistoquímica	20
4 - DISCUSSÃO	41
5 - CONCLUSÕES	47
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

TUMOR FIBROHISTIOCÍTICO TRANSPLANTÁVEL EM RATOS WISTAR - Caracterização através da microscopia óptica, microscopia eletrônica, citoquímica enzimática e imunohistoquímica (*)

Ronaldo de Albuquerque Ribeiro(**)

RESUMO

Um tumor espontâneo e transplantável em ratos Wistar é estudado e caracterizado através da microscopia óptica, microscopia eletrônica, citoquímica enzimática e imunohistoquímica.

Os achados à microscopia óptica e eletrônica demonstraram ser o tumor, constituído por células histiocíticas-símile, principalmente, células fribroblásticas-símile e células indiferenciadas.

A citoquímica enzimática mostrou forte atividade para α -naftil acetato esterase e fosfatase ácida, sugerindo a natureza histiocítica de neoplasia.

A imunohistoquímica, através da Imunoperoxidase e usando marcadores histiocíticos (Lisozima, $\alpha 1$ Antitripsina e α anti-quimiotripsina) e de filamentos citoplasmáticos (Vimentina) mostrou atividade para lisozima e vimentina, confirmando a natureza Fibrohistiocítica do tumor.

A incidência de metástases foi baixa (3,3%). O tumor apresentou um padrão de crescimento que parece obedecer a função de GOMPERTZ.

Sugere-se portanto a inclusão do tumor na categoria dos Fibrohistiocitomas malignos (FHM).

(*) Departamento de Fisiologia e Farmacologia do CCS da UFC.
Departamento de Patologia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP-SP.
Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP - SP.

(**) Prof. Auxiliar 3 do Departamento de Fisiologia e Farmacologia - CCS da UFC.
Médico Oncologista Clínico do Hospital Universitário Walter Cantídio - FMUFC.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Fibrohistiocitoma Maligno Humano

Os fibrohistiocitomas malignos (FHM) humanos são sarcomas que ocorrem comumente nos tecidos moles profundos e menos frequentemente nos tecidos moles superficiais (2).

A ocorrência dessas neoplasias é hoje bastante reconhecida graças as descrições pioneiras de O'BRIEN & STOUT (45), os quais introduziram o conceito de tumores fibrosos malignos diferenciando do já conhecido fibrossarcoma.

Em 1978, WEISS & ENZINGER (61) baseados na análise dos achados clínico-patológicos de 200 casos de FHM, descreveram tais tumores como sendo sarcomas pleomórficos, primitivos, mostrando diferenciação parcial fibroblástica e histiocítica, indicada pela produção de colágeno e ocasional fagocitose. Reportaram ainda que, muitos tumores previamente diagnosticados como variantes pleomórficas de lipossarcoma, fibrossarcoma ou rabdomiossarcoma são provavelmente exemplos de FHM.

É hoje evidente que os FHM são os sarcomas de partes moles mais comuns na vida adulta tardia (32,50,61), tendo sido descritas várias formas distintas de apresentação dos mesmos, incluindo FHM fibroso, FHM histiocítico e FHM pleomórfico com variantes mixóide e inflamatória (15, 32).

Embora a origem histiocítica desses tumores tenha sido considerada por alguns pesquisadores (31,33) outros mais recentemente têm sugerido sua origem a partir de uma célula primitiva mesenquimal (11,15,38,55). No entanto, a precisa histo

gênea dos FHM permanece controversa havendo necessidade de maiores estudos (32).

1.2 - Neoplasias Fibrohistiocíticas em animais experimentais

O aparecimento de sarcomas de partes moles em várias cepas de ratos idosos é um fenômeno bem conhecido e registrado na literatura. Tais tumores descritos como originários de células mesenquimais, têm recebido denominações várias como fibrossarcoma, lipossarcoma, leiomiossarcoma e sarcomas indiferenciados (8,17,18). Entretanto, apenas recentemente é que o conceito de fibrohistiocitoma maligno (FHM) em cepas de ratos tem sido considerado (19,20,60).

PRADHAM (49) e colaboradores demonstraram o desenvolvimento de tumores fibrohistiocitomas-símile em ratos, com a injeção subcutânea de certos extratos de plantas. YUMOTO e MORIMOTO (64) reportaram experimentos com fibrohistiocitomas surgidos em camundongos inoculados com macrófagos transformados de medula óssea. Em adição, foi demonstrado que a administração sub-cutânea de 4 (hidroxiamino) quinolina -1-óxido em ratos, também produziu fibrohistiocitomas malignos semelhantes ao humano (36). Mais recentemente, FHM em ratos surgiram nos locais de implantação de filtros de miliporo (21).

Além disso tem-se mostrado alguns tumores de partes moles ocorrendo espontaneamente em ratos idosos com características biológicas, histológicas e ultraestruturais semelhantes às descritas nas neoplasias fibrohistiocíticas humanas (4,52)

1.3 - Caracterização das neoplasias fibrohistiocíticas

A base para o conceito de que esses tumores são parcialmente histiocíticos é suportada por observações à microscopia óptica convencional, incluindo entre outras, sinais de fagocitose; achados ultraestruturais, tais como atividade lisossômica intensa e estudos de histoquímica enzimática, demonstrando a presença de enzimas hidrolíticas como a fosfatase ácida e as esterases inespecíficas, α naftil acetato esterase ou α naftil butirato esterase (2,11,15,24,55,58)

IWASAKI (27) e colaboradores, utilizando cultura de células obtidas de fibrohistiocitomas malignos e benignos, caracterizaram funcionalmente os histiócitos através da detecção de receptores de superfície para a porção FC da imunoglobulina G, receptores de superfície para C_3 , imunofagocitose de eritrócitos opsonizados e enzimas lisossomais.

A utilização de técnicas de imunohistoquímica tem permitido localizar vários antígenos em histiócitos de tecidos normais. Alfa-1 Antitripsina (AlAT) foi demonstrada em histiócitos de fígado e tecido linfóide (26). Lisozima foi visualizada em células de KUPFFER do fígado, nos seios histiocíticos de linfonodos e em células monocitóides de medula óssea (42,42). Alfa-1-antiquimotripsina (AlACT) foi também demonstrada em tecidos linfóides, particularmente nos histiócitos da polpa e nos seios histiocíticos (43). Esses antígenos podem então ser usados como marcadores de lesões neoplásicas de natureza histiocítica.

Alguns estudos recentes têm mostrado a presença de lisozima, α -1 Antitripsina e α -1 Antiquimotripsina em fibro-

histiocitomas humanos e em outros tumores de suposta origem fibroblástica-histiocítica, utilizando-se a técnica da imunoperoxidase (7,10,34). Marcadores de microfilamentos como a vimentina, também têm sido usados no diagnóstico de sarcomas de partes moles (16).

No campo da patologia de tumores experimentais, entretanto, técnicas de imunohistoquímica não têm sido largamente utilizadas. Apenas recentemente BARSOUN e colaboradores (4) caracterizaram um grupo de vinte sarcomas histiocíticos em ratos Wistar através da técnica da imunoperoxidação.

1.4 - O Tumor

BEZERRA DE ARAÚJO (5) e colaboradores, em 1980, descreveram o aparecimento espontâneo de um tumor na região correspondente a da glândula salivar de um rato adulto, albino, Wistar, pertencente à colônia do Biotério do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da UFC. O animal ficou em observação por 30 dias, quando a massa tumoral já comprometia o olho direito e estava ulcerada (Fig. 1). Foi então sacrificado e, após ressecção completa do tumor, fragmentos foram utilizados para estudo histopatológico e para o transplante em 5 ratos receptores Wistar, pela técnica do Trocarter. Não foram encontradas metástases. Segundo os autores, ao exame microscópico o tumor apresentava extensas áreas de necrose e era constituído basicamente de 2 tipos celulares: a) - células arredondadas pequenas, hipercromáticas, com escasso citoplasma e b) - cé-

lulas de aspecto fusiforme, com abundante citoplasma eosinofílico. Descreveram ainda, a presença de cartilagem, áreas mi-xóides, glandulares, e mesmo glândulas sebáceas. As mitoses eram frequentes, principalmente nas zonas de predomínio das células fusiformes.

Para os 5 primeiros transplantes, a neoplasia ficou mantida basicamente às custas das células fusiformes. Reportaram ainda que, em virtude do grande pleomorfismo histológico do neoplasma não foi possível enquadrá-la em nenhum dos tipos descritos na literatura e por isso o tumor foi denominado de TEGS-2047, significando Tumor Espontâneo na Região da Glândula Salivar e 2047 o seu número de registro.

Após as 10 primeiras repicagens o tumor passou a ser mantido no Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC, através de transplantes subcutâneos, pela técnica do Trocarter (23), encontrando-se até o início desse estudo na sua 115a. passagem.

TROMPIERI, 1984 (Tese de Mestrado-UFC), descreveu características histológicas semelhantes às descritas por BEZERRA DE ARAÚJO et al. para o tumor TEGS-2047 sem, no entanto, enquadrá-lo em alguma categoria histológica ou mesmo propor alguma classificação para o mesmo.

Há portanto, necessidade de um estudo morfológico mais profundo, usando técnicas outras além da microscopia óptica usual, na tentativa de caracterizar tal neoplasia. Supomos então, pelo padrão histológico descrito até agora, que o tumor original poderia ser uma neoplasia de partes moles ou mesmo um Fibrohistiocitoma, que é o mais comum tumor de partes moles descrito em ratos (19).

1.5 - Objetivos:

1 - Demonstrar a suposta natureza fibrohistiocítica do tumor TEGS-2047 através da microscopia óptica, microscopia eletrônica, citoquímica enzimática e imunohistoquímica.

2 - Pesquisar o aparecimento de metástases.

3 - Estudar a dinâmica do seu crescimento.



FIGURA 1 - Tumor TEGS-2047 original, observado por BEZERRA DE ARAÚJO em
1980. Foto tirada no dia do sacrifício do animal.
(Gentileza do Prof. Roberto Wagner Bezerra de Araújo).

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Animais Experimentais

Ratos Wistar, adultos, machos, com peso médio de 120 g com 30 a 50 dias de nascidos, homozigotos e provenientes da colônia do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Todos foram mantidos em condições semelhantes em relação ao ambiente, recebendo água e ração "coelhex". Ao todo, utilizamos 50 ratos.

2.2 - Preparação do inóculo (transplante)

Os animais doadores com 14 dias de evolução do tumor (TEGS-2047), foram sacrificados por inalação com éter etílico, em condições ótimas de assepsia, mediante esterilização da pele com solução de álcool iodado. A seguir foi feita uma incisão na pele que recobre o tumor, tendo sido este completamente excisado. Após a exérese, o material foi colocado em placa de Petri contendo 19 ml de Ringer Lactato e 1,0 ml de cloranfenicol (Sintomicetina-Lepetit) em solução de 100 mg/ml, para lavagem.

Em seguida, as partes necrosadas do tumor foram retiradas e o restante, já totalmente limpo, foi transferido para outra placa de Petri com as mesmas soluções da anterior, para manutenção. Após esse procedimento, foi feito o recorte dos fragmentos com tamanho de 1,0 x 0,4 cm.

O Ringer-Lactato foi usado com a finalidade de manter as células neoplásicas com vitalidade, enquanto que o cloran-

fenicol foi adicionado na intenção de inibir a proliferação bacteriana.

2.3 - Repicagem

Os animais receptores foram submetidos a anestesia com éter etílico e feita assepsia da pele com álcool etílico. Os fragmentos obtidos conforme descrição anterior, foram então transplantados por via subcutânea na região lombar por meio da técnica com Trocarter (23).

2.4 - Microscopia Óptica

Fragmentos de 10 tumores foram retirados, fixados em formaldeído a 10% com Tampão fosfato de sódio durante 24 horas, incluídos em parafina e cortados (5 μ m) por micrótomo comum. O método de coloração utilizado foi o da Hematoxilina-Eosina, sendo que, em algumas lamínas utilizou-se o PAS (Ácido Periódico de Schiff), o Tricrômio de Masson e a impregnação de prata para reticulina. O material foi examinado e fotografado em microscópio Zeiss standart.

2.5 - Microscopia Eletrônica

Amostras de 2 tumores, selecionados ao acaso, foram cortadas com bisturi em pequenos fragmentos e desengordurados e imersos em aldeído glutárico (Sigma Chemical Co., grade I, sol. aquosa a 25%) a 2,5% em Tampão fosfato 0.1M o pH 7,3 a temperatura de 40°C. A seguir foram recortados em blocos de 1mm³ a 40°C. Em seguida foram lavados em Tampão fos

fato (3 lavagens, 10 min cada) e deixados no mesmo durante a noite. Foram então submetidos a osmiação (pós-fixação), em solução de tetróxido de osmio a 1% em Tampão fosfato 0,1M (pH 7,3) durante 2 horas a 49°C, desidratados em concentrações crescentes de acetona e incluídos em araldite. Foram então realizados cortes ultra-finos com navalha de diamante em ultra-microtomo Sorval UT 5000, montados em grades de 200 "Mesh" duplamente co rados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinadores e fotografadas em microscópio eletrônico ZEISS EM 109 a 80 KV.

2.6 - Citoquímica enzimática

Amostras de 2 tumores selecionados ao acaso foram utilizadas para preparações através de "Imprints" e a seguir coradas para verificação da atividade das seguintes enzimas: alfa naftil acetato esterase, fosfatase ácida e naftol AS cloroacetato esterase.

2.6.1 - Alfa Naftil acetato esterase ou Alfa-Nae (Esterase inespecífica)

a) - Princípio da reação:

A esterase inespecífica hidrolisa o substrato alfa-naftil acetato que dá um precipitado de grânulos azuis se o sal diazônico usado for o Fast Blue BB e marrom avermelhado se for o Fast Garnet GBC ou a pararosaanilina (39,41,63).

A atividade desta enzima é demonstrada em monócitos e monoblastes (40).

b) - Técnica:

A técnica utilizada no nosso estudo foi a descrita por

LI et al., 1973 (40) e modificada por LORENZI et al., 1985 (39) utilizando como sal diazônico a pararosaanilina em pH 7,5.

2.6.2 - Naftol AS cloroacetato esterase

a) - Princípio da reação:

A reação se baseia na hidrólise do substrato naftol AS cloroacetato pela enzima cloroacetato-esterase em presença de um sal diazônico, a pararosaanilina, com a formação de grânulos vermelho-brilhantes no citoplasma. A reação é positiva na série granulocítica neutrófila, do mielócito até o segmentado. É também fortemente positiva nos mastócitos. Nos ~~monócitos~~ e basófilos é fraca ou negativa, sendo negativa nas demais células (39,40,41,63).

b) - Técnica:

A técnica utilizada foi a descrita por LI et al., 1973 (40), modificado por LORENZI et al., 1985 (39) sendo o sal diazônico empregado a pararosaanilina em pH 7,62.

2.6.3 - Fosfatase ácida:

a) - Princípio da reação:

As fosfatases ácidas constituem um grupo heterogêneo de isoenzimas que hidrolisam ésteres-fosfatos em meio ácido, liberando naftóis que se acoplam a sais diazônicos. O produto resultante é um precipitado colorido que mostra o local de atividade da enzima. O substrato utilizado é o naftol AS - B1-fosfato e o produto da reação é constituído por grânulos vermelho vivo, quando se usa o sal Fast Garnet GBC ou a pararosaanili -

na e azul quando se usa o sal Fast Blue BB. A reação é fortemente positiva nos linfócitos "T" e linfoblastos "T", moderadamente positiva nos plasmócitos e megacariócitos e monócitos, fraca na série granulocítica neutrofílica e nos eritroblastos e fracamente positiva ou negativa nas células blásticas mielóides e eritroblastos imaturos (28,39,41,61).

b) - Técnica:

A técnica utilizada foi a descrita por BARKA, 1962, (3) YAM, 1970 (63) e LORENZI, 1985 (39) utilizando-se como sal diazônico a pararosanilina em pH 7,62.

2.7 Imunohistoquímica:

a) - Princípio da reação:

A técnica de imunoperoxidase é um método imunológico que pode ser usado para a demonstração de várias substâncias em secções de tecidos e utiliza anticorpos marcados ou não marcados e uma enzima muito estável, a peroxidase "horseradish". A diaminobenzidina, substrato mais utilizado, é polimerizada na presença da peroxidase para formar um polímero instável de cor castanha o qual é depositado no sítio da reação antígeno - anticorpo (25,56).

b) - Técnica:

Amostras de 2 tumores selecionados ao acaso foram fixados em formaldeído a 4% tamponado com fosfato de sódio durante 24 horas e rotineiramente embebidos em parafina. Cortes de

Sum de espessura foram corados para AIAT, AIACT, Lisozima e Vimentina utilizando-se como técnica de imunoperoxidase o método indireto do Complexo Avidina-Biotina descrito por Falini & Taylor, 1983 (11). (Fig. 2).

Os antisoros para AIAT, AIACT, Lisozima e Vimentina, cultivadas em coelhos, foram obtidos de Dakoimmunoglobulins AS, Denmark e usados numa diluição de 1:300, 1:600 e 1:1000.

Outros reagentes usados incluem antiglobulina de coelho cultivada em cabra (Dakoimmunoglobulins AS, Denmark), o Complexo Avidina - Biotina cultivado em coelho (Dakoimmunoglobulins AS, Denmark) e a 3,3'-diaminobenzidina (Sigma).

Para os controles positivos foram utilizados tecidos de fígado humano deficiente em AIAT, obtidos do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu.

c) - Avaliação microscópica:

As reações examinadas foram consideradas positivas ou negativas. Somente granulações características intracitoplasmáticas de cor castanha foram registradas como positivas. Em áreas com necrose, uma difusa coloração marrom no material necrótico foi geralmente encontrado. Esta reação é inespecífica e foi registrada como negativa.

2.8 - Crescimento Tumoral e Pesquisa de Metástases:

Utilizou-se 40 ratos Wistar, machos, inoculados com o tumor conforme descrição anterior. Os animais foram acompanhados por 27 dias, sendo pesados de 3 em 3 dias, e os diâmetros

maiores e menores dos seus respectivos tumores mensurados com paquímetro, para cálculo do volume tumoral. No 9º dia após o inóculo tumoral, 10 animais, escolhidos ao acaso, foram sacrificados por deslocamento da coluna cervical. Após constatada a morte, em cada um foi feita uma incisão do púbis ao mento e toda região exposta sofreu detalhado exame macroscópico para pesquisa de metástases. Amostras selecionadas do fígado, pulmão e gânglios linfáticos foram encaminhadas para exame histopatológico. Os tumores foram excisados e pesados em balança Mettler. O mesmo procedimento foi realizado com 10 animais no 18º dia e 10 animais no 27º dia.

Para os cálculos do volume tumoral usou-se o procedimento descrito por FRINDEL & MALAISE (14), 1967, no qual os diâmetros maiores e menores (D e d) são medidos, a espessura do tumor é desprezada e leva-se em consideração, a dupla espessura da pele que recobre o tumor (2 x 0,5mm). Sendo assim, o volume tumoral (em mm³) foi calculado pela seguinte fórmula:

$$V = 4/3 \pi \left(\frac{D + d - 1}{2} \right)^3$$

No tratamento estatístico dos dados experimentais calcularam-se a média ($\bar{X}$), e o desvio padrão (s) utilizando-se as fórmulas:

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{n}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

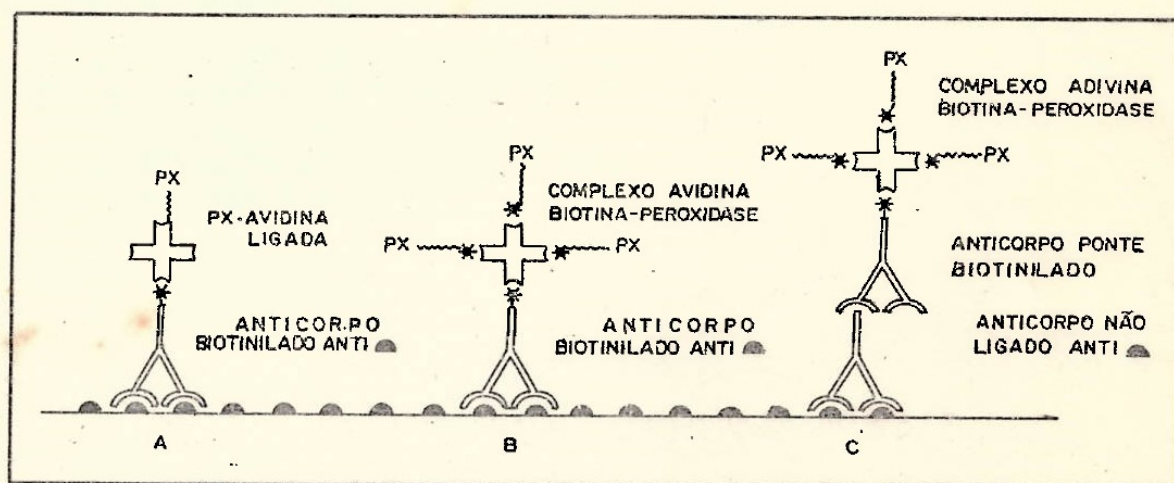


FIGURA 2 - Técnica de imunoperoxidase indireta utilizando o Complexo Avidina-Biotina: Os semi-círculos sólidos indicam os antígenos; PX indica peroxidase; asteriscos, a Biotina e a cruz, Avidina.

3 - RESULTADOS

3.1 - Crescimento do tumor e índice de pega

Em 34 dos 40 ratos transplantados, o tumor tornou-se palpável no 3º dia após a introdução do inóculo tumoral, dando-nos, portanto, um índice de pega de 85%. No 6º e 9º dia, o índice de pega permaneceu o mesmo. No 12º dia, no entanto, observou-se regressão quase total de 2 tumores, razão pela qual passamos a ter um índice de pega menor (80%), o qual permaneceu até o final do experimento. (Tabela 1). Necrose tumoral foi observada em um dos ratos no 11º dia, o que nos levou a sacrificar o animal precocemente e não considerá-lo na amostragem.

O tamanho dos tumores foi bastante variável: no 9º dia, o diâmetro maior variou de 1,3 a 3,6cm, no 18º dia de 1,6 a 6,2 cm e no 27º dia de 4,6 a 10 cm. Os dados referentes as médias dos diâmetros médios ($D + d/2$), volumes e pesos dos tumores, mensurados ao longo do experimento, encontram-se na Tabela 1.

A curva do crescimento do tumor (Fl 6 3) é compatível com um padrão que segue a Função de GOMPERTZ (37,53). Outros parâmetros de cinética tumoral (índice mitótico, tempo de duplicação tumoral e estudos com timidina marcada) entretanto, são necessários para melhor avaliação do crescimento do tumor, o que fugiu ao objetivo do presente estudo.

3.2 - Análise macroscópica:

A análise macroscópica que descreveremos é fruto de

de observações de 30 tumores excisados em épocas diferentes, 99, 189 e 279 dia de evolução do tumor.

Os tumores localizavam-se no tecido celular subcutâneo, eram bem delimitados e de fácil exêrese. Eram tumores de formas irregulares, com tamanhos variados (Tabela 1), boleados, pouco consistentes, de cor branco acinzentado, de superfícies externas brilhosas, revestidas por fina cápsula transparente. A vascularização externa era maior quanto mais "novo" fôsse o tumor, de forma que, os tumores excisados no 99 e 189 dia eram mais vascularizados que aqueles estudados no 279 dia, com raras exceções. (Fig. 4 e Fig. 5).

Ao corte, observou-se, extensas áreas de necrose, predominando sobre o tecido neoplásico não necrótico. A necrose era mais extensa a medida que o tumor aumentava de tamanho.

3.3 - Microscopia Óptica:

A neoplasia mostrou-se constituída por, basicamente, células fusiformes alongadas ou ovóides e arranjadas num padrão "Estoriforme ou em Redemoinho" característico. As células apresentavam citoplasma acidófilo, corado moderadamente pelo PAS. Os núcleos eram vesiculosos elípticos, ovóides, ou arredondados, apresentando em geral 1 a 2 nucleolos (Fig. 6 e 7).

Fibras de colágeno e reticulina distribuídas em grande quantidade; principalmente em volta de células individuais, foram observadas. (Figs. 8 e 9). Nenhuma estriação cruzada citoplasmática foi observada.

Extensas áreas de necrose foram visualizadas e em volta delas, células inflamatórias, principalmente linfócitos e células fusiformes histiocíticas-símile dispostas em "paliçada" (Fig. 10).

Fagocitose aparente bem como células com citoplasma espumoso ("Foam cells") foram focalmente observadas (Fig. 10).

As células fusiformes apresentavam considerável atividade mitótica, encontrando-se, na maioria dos cortes, 4 a 5 mitoses por campo (ocular 10 e objetiva 40) (Fig. 11).

A vascularização era abundante, principalmente na periferia do tumor.

3.4 - Metástase

Dos 30 ratos autopsiados sistematicamente no 9º, 18º e 27º dia de evolução do tumor, verificou-se em apenas um dos animais no 27º dia, dois nódulos metastáticos, arredondados, esbranquiçados e semi-transparentes, medindo 0,4cm e 0,2cm de diâmetro, respectivamente.

Ao exame histopatológico, as metástases mostravam um grande predomínio de células fusiformes com grandes núcleos e nucleolos evidentes assumindo disposição em feixe; ocasionalmente percebiam-se grandes células com citoplasma vacuolizado lembrando histócitos, em meio a zonas de necrose (Fig.12). Portanto, o mesmo padrão apresentado pelo tumor primário.

Amostras de fígado, baço e nódulos linfáticos deste animal foram processadas para estudo histopatológico e não apresentaram alterações.

3.5 - Achados ultraestruturais:

As preparações estudadas mostraram à microscopia eletrônica apenas células fusiformes histocíticas-símile, alongadas ou amebóides, sem junções ou membrana basal, com citoplasma apresentando mitocôndrias, gotículas de lipídios, raros microfilamentos, lisossomos secundários, fagossomos e moderada quantidade de membranas de retículo endoplasmático rugoso. Fibras de colágeno e reticulina eram abundantes nos espaços intercelulares (Fig. 13).

Os núcleos eram frouxos, alongados, indentados e ocasionalmente ovóides, apresentando nucléolo(s) bem evidentes e cromatina com marginação periférica (Fig. 14).

Foram vistas também algumas células de aspecto xantomatoso, com citoplasma totalmente preenchido por gotículas de lipídio e estruturas semelhantes a lisossomos (Fig. 15).

Ocasionalmente verificou-se células contendo abundante retículo endoplasmático rugoso, algumas vezes distendido por substância eletrôn-densa (Fig. 16).

Não foram encontradas células gigantes nem miofibrilas nas preparações estudadas.

As células são, portanto, do conjuntivo pouco diferenciado, histiocitóides.

3.6 - Citoquímica enzimática:

Os resultados da coloração citoquímica para verificação da atividade das enzimas alfa naftil acetato - esterase,

fosfatase ácida e cloroacetato esterase, estão sumarizadas na Tabela 2.

As reações foram fortemente positivas para a alfa - naftil acetato esterase, nas células tumorais fusiformes alongadas e ovóides (Fig. 17). Forte atividade para fosfatase ácida também foi demonstrada nas células tumorais (Fig. 18). A positividade das reações foi específica, visualizando-se grânulos grosseiramente espalhados no citoplasma e corados em marron.

A cloroacetato esterase não mostrou atividade em nenhuma das amostras estudadas. (Fig. 19).

3.7 - Imunohistoquímica:

Os resultados são mostrados na Tabela 3.

As 2 amostras de tumores examinados mostraram considerável positividade nas reações para Lisozima e para Vimentina. As 2 reações foram específicas apresentando granulações intracitoplasmáticas de coloração marron-castanho. As células mononucleares coraram-se com igual frequência e intensidade.

As 2 amostras apresentaram reações negativas tanto para a AIAT como para a ALACT.

Em áreas de necrose, encontrou-se, em algumas lâminas, colorações marron distribuídas difusamente entre os espaços intercelulares, o que foi traduzido como reações inespecíficas.

O nosso controle mostrou a positividade para ALAT esperada, o que nos faz crer na especificidade da reação.

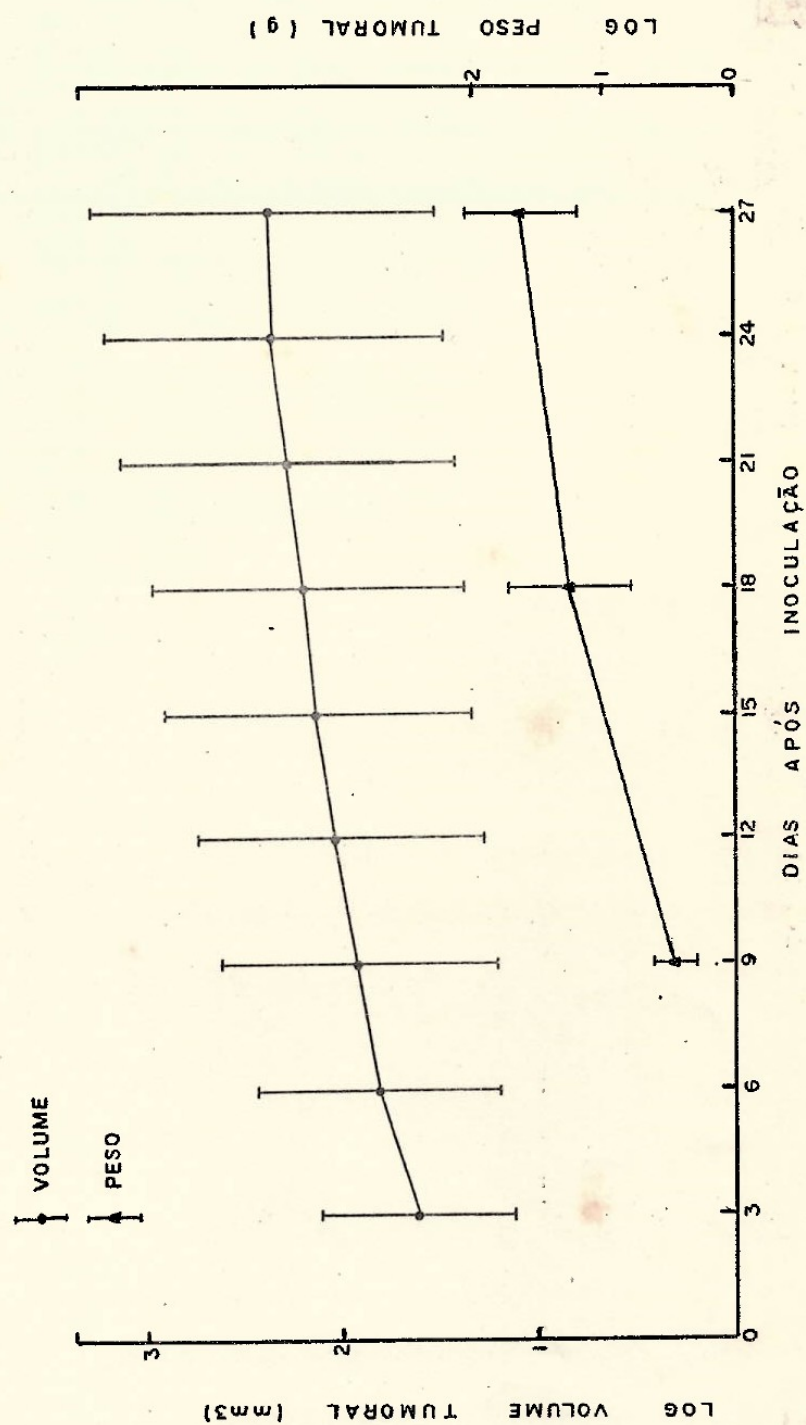


FIGURA 3 - Curva de crescimento do tumor TEGS-2047. Cada ponto representa a média dos volumes (esq.) ou pesos (dir.) dos tumores e as barras verticais o desvio padrão.

TABELA 1 - VALORES MÉDIOS OBSERVADOS NOS DIÂMETROS; VOLUMES PESOS E ÍNDICE DE PEGA DO TUMOR TEGS-2047 (*)

PARÂMETRO	DIAS APÓS O TRANSPLANTE (Nº DE ANIMAIS OBSERVADOS)									
OBSERVADO	3 (n = 34)	6 (n = 34)	9 (n = 34)	12 (n = 21)	15 (n = 21)	18 (n = 21)	21 (n = 11)	24 (n = 11)	27 (n = 11)	
Diâmetro- médio (cm)	1,05 ± 0,27	1,67 ± 0,47	2,06 ± 0,59	2,66 ± 0,72	3,17 ± 0,81	3,58 ± 0,87	4,44 ± 1,18	5,54 ± 1,18	5,83 ± 1,24	
Volume (mm ³)	41,67 ± 11,49	67,04 ± 19,41	83,98 ± 24,59	109,93 ± 29,84	131,71 ± 32,97	148,29 ± 38,15	183,54 ± 49,41	226,63 ± 53,21	228,0 ± 59,22	
Peso (g)	-	-	3,01 ± 2,17	-	-	17,8 ± 8,16	-	-	44,3 ± 23,24	
Índice de pega (%)	85	85	85	80	80	80	80	80	80	

(*) Resultados Expressos em média ± Desvio Padrão

$$\text{Diâmetro Médio} = \frac{D + d}{2} \text{ (cm)}$$

$$\text{Volume (mm}^3\text{)} = \frac{4}{3} \pi \frac{(D + d - l)}{2}$$



FIGURA 4 - Aspecto externo do tumor TEGS-2047 em rato Wistar no 18º dia após o transplante.



FIGURA 5 - Aspecto macroscópico do tumor descrito na Fig. 4. Observe o aspecto "Boleado" e a boa vascularização externa.

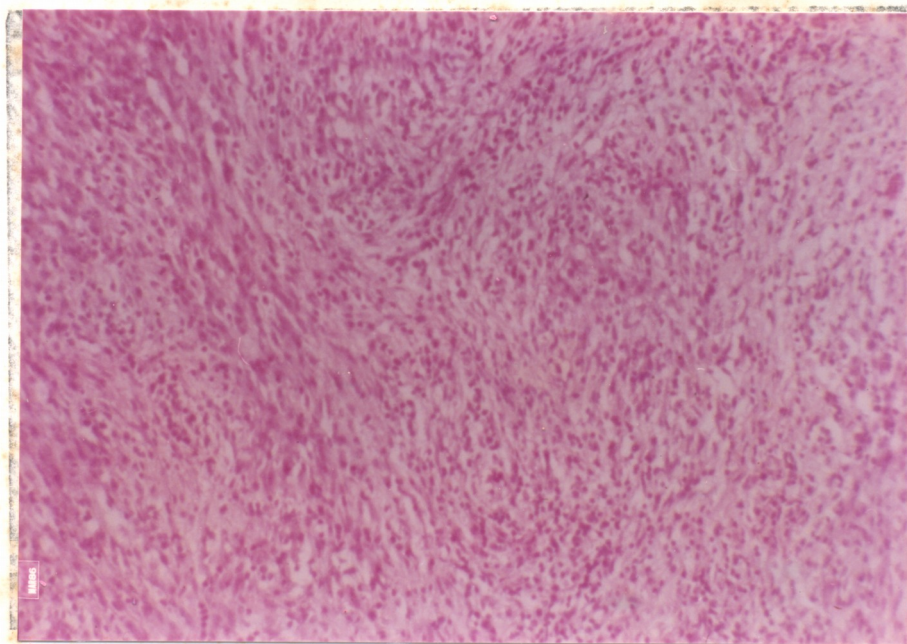


FIGURA 6 - Aspecto tumoral mostrando a grande predominância de células fusiformes arranjadas num padrão "em redemoinho" (H.E; 100 X).

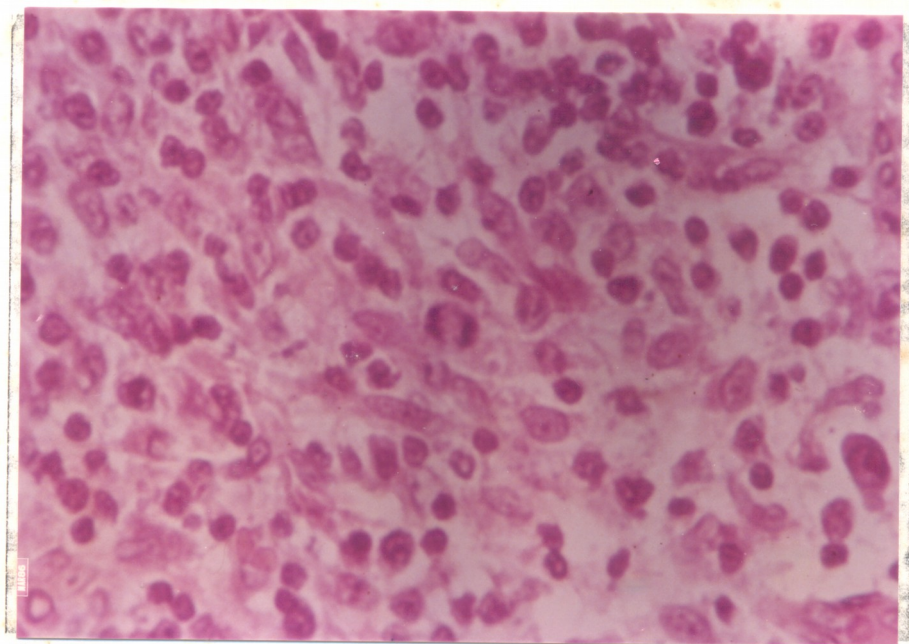


FIGURA 7 - Aspecto tumoral mostrando células fusiformes alongadas ou ovóides. Nota-se uma mitose em célula tumoral no centro da figura .
(H.E - 400 X).

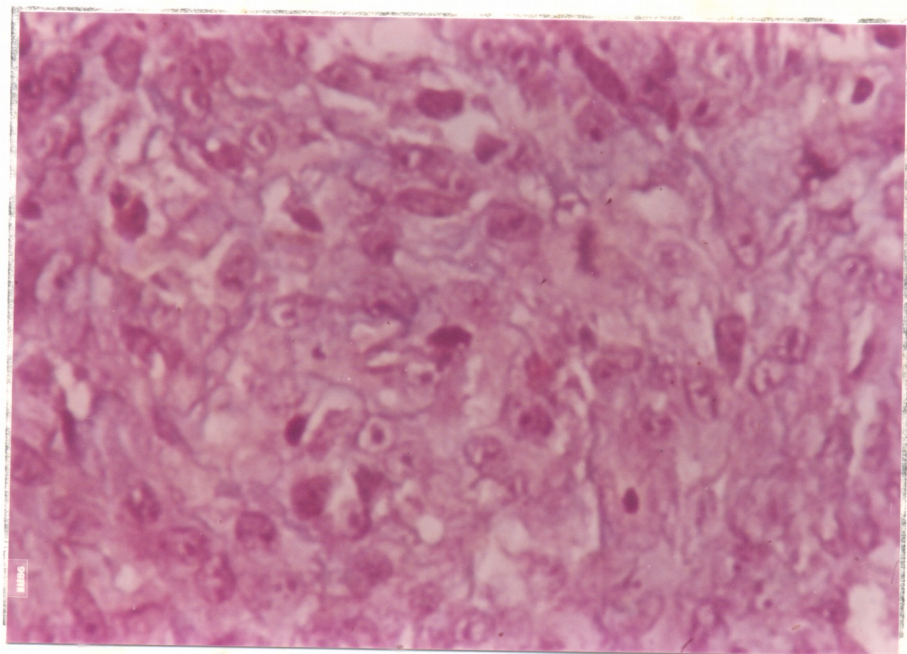


FIGURA 8 - Fibras de colágeno distribuídas entre as células fusiformes (Tri-
cromio de Masson com azul de anilina - 400 X.

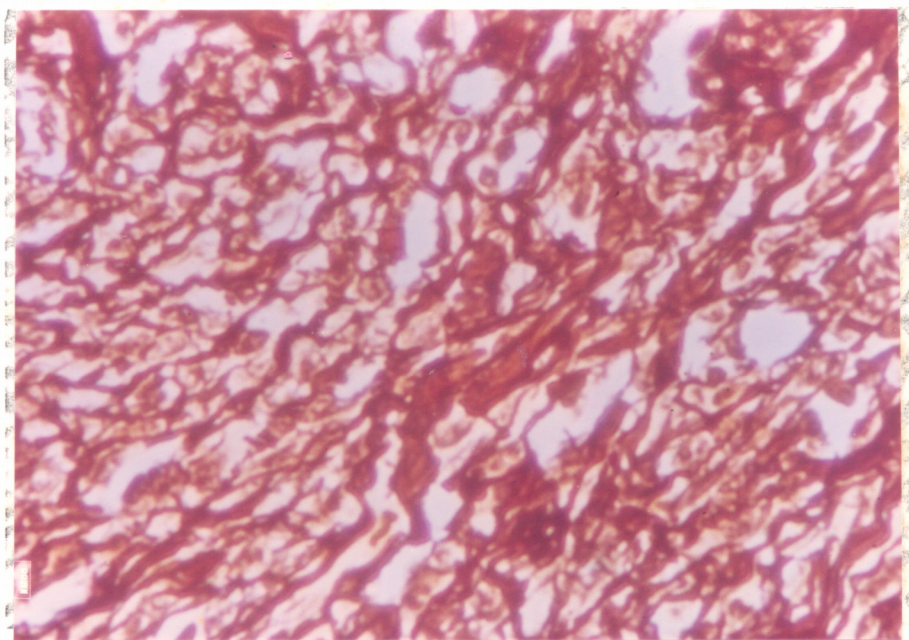


FIGURA 9 - Fibras de reticulina largamente distribuídas entre as células fusiformes (impregnação pela prata - 400 X).

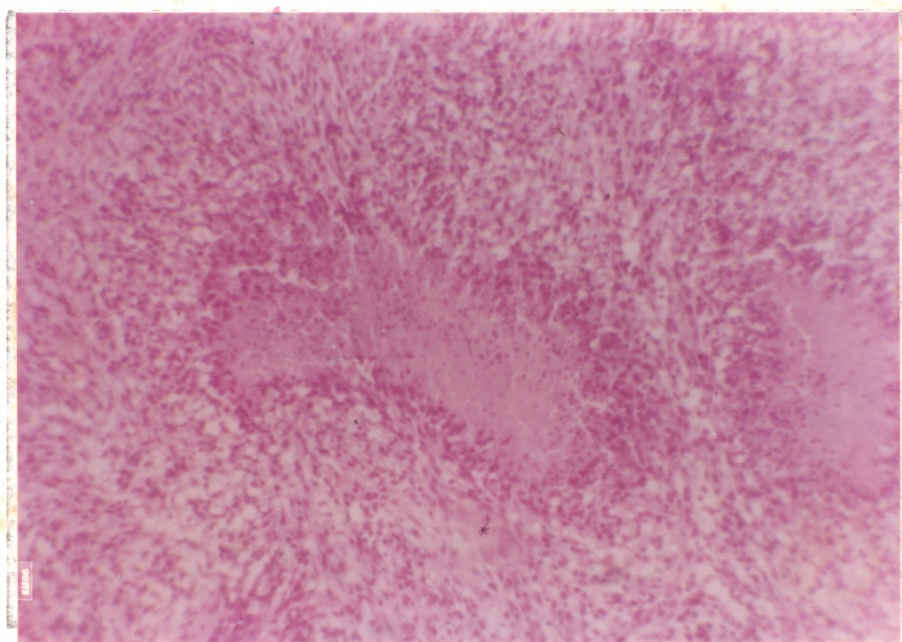


FIGURA 10 - Aspecto tumoral mostrando extensas áreas de necrose com célula fusiformes em volta formando um padrão em "paliçada". Observa-se também células inflamatórias (linfócitos) próximo as áreas de necrose bem como células maiores com citoplasma vacuolizado ("Foam Cells"). (H.E. 100 X).

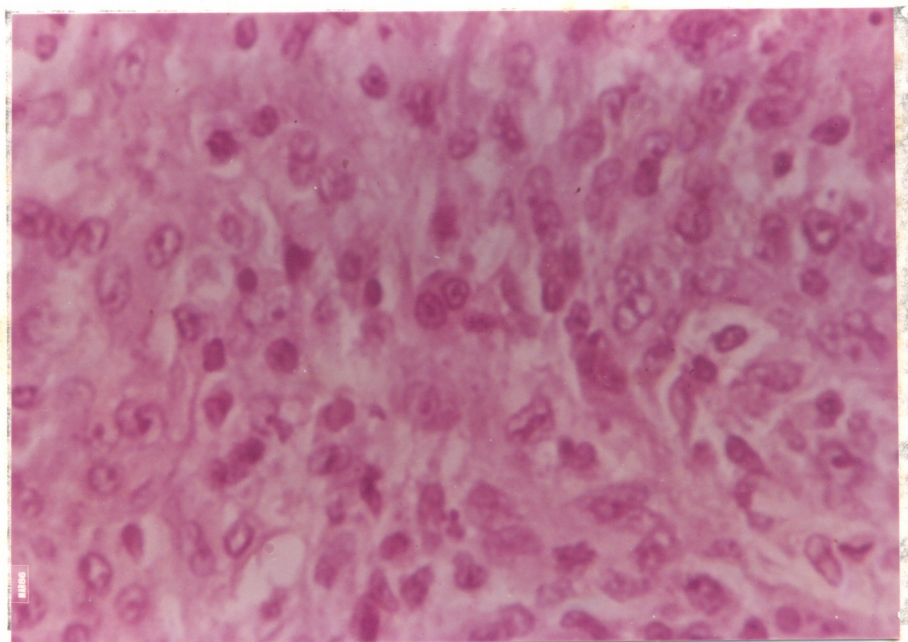


FIGURA 11 - Aspecto tumoral mostrando mitoses normais e atípicas (setas) e no centro uma célula tumoral gigante binucleada. (H.E. 400 X).

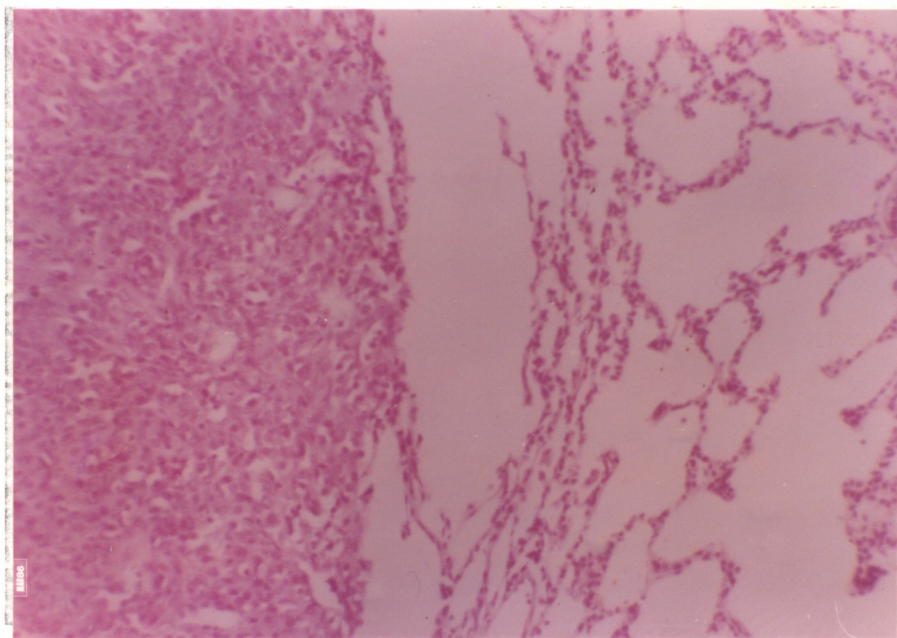


FIGURA 12 - Aspecto histológico de metástase pulmonar. Observa-se o tecido pulmonar à direita e à esquerda, o tecido metastático constituído por células fusiformes (H.E. 100 X).



FIGURA 13 - Micrografia mostrando células tumorais fusiformes e amebóides.

No citoplasma notam-se lisossomos (L), fagossomos (FA) e gotículas de lipídio. Observa-se Colágeno (C) extracelular. (ME - 7800 X).

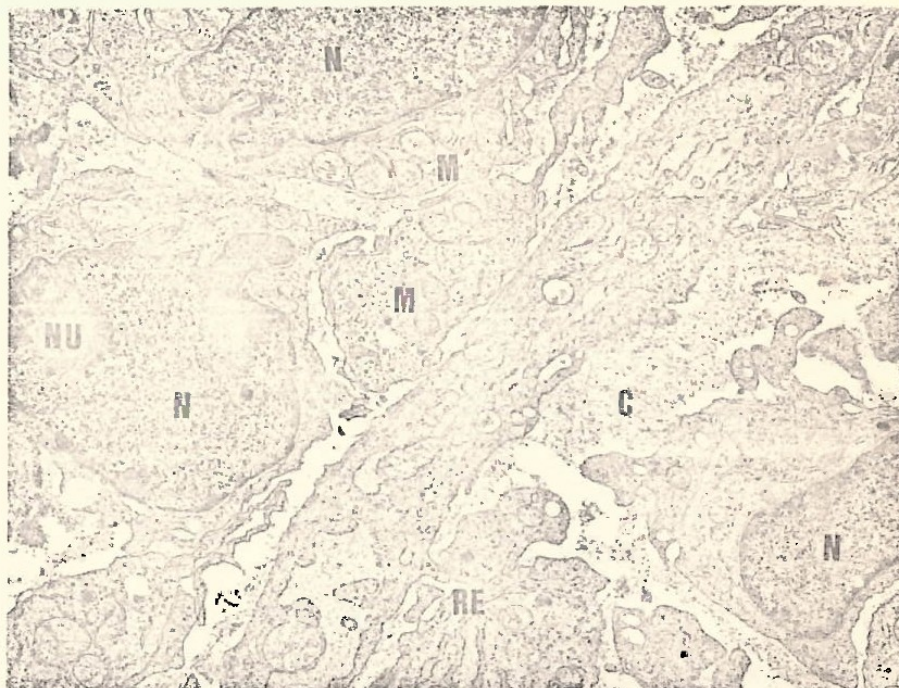


FIGURA 14 - Micrografia mostrando células histiocíticas com núcleos (N) irregulares, indentados, com nucleólos (NU) evidentes e cromatina periférica. Notam-se também mitocôndrias e membranas de retículo endoplasmático rugoso (RE) pouco desenvolvido e colágeno (C) intercelular (ME - 9100 X).



FIGURA 15 - Células xantomatosas típicas, com citoplasma quase totalmente preenchido por vacúolos lipídicos (LI) e também por corpos semelhantes a lisossomos (L). Acima e a esquerda aspecto de um núcleo irregular e fusiforme. (ME - 7800 X).

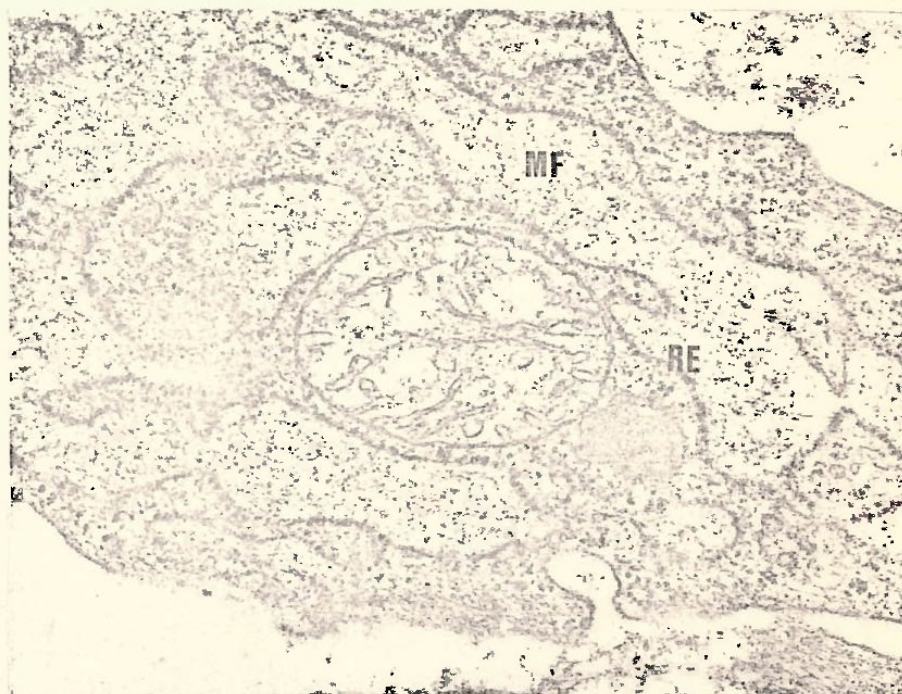


FIGURA 16 - Micrografia mostrando retículo endoplasmático rugoso (RE) grandemente desenvolvido, com dilatações formadas por substâncias eletrondensas. Notam-se também microfilamentos (MF) no citoplasma. ME - (21000 X).

TABELA 2 - RESULTADOS DA CITOQUÍMICA ENZIMÁTICA NO
TUMOR TEGS-2047 (*)

MATERIAL	COLORAÇÃO	CITOQUÍMICA	
EXAMINADO	α Naftil Acetato Esterase	Fosfatase ácida	Cloroacetato Esterase
Tumor 1	+++	+++	0
Tumor 2	+++	+++	0

(*) A Intensidade da Reação, nas Células Tumorais, Obedeceu a Seguinte Gradação:

- 0 - Nenhuma Coloração
- + - Fracamente Positiva
- ++ - Moderadamente Positiva
- +++ - Fortemente Positiva

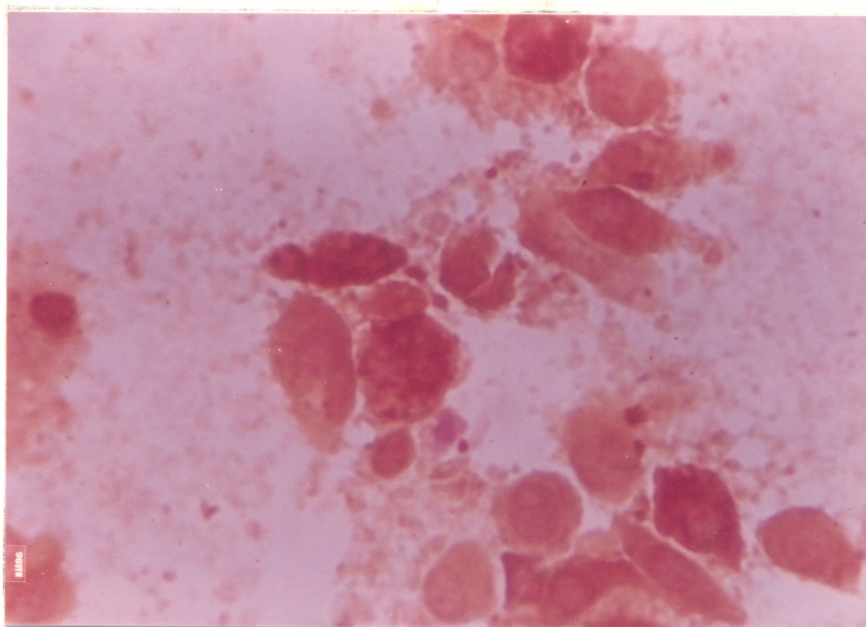


FIGURA 17 - Preparação feita através de "Imprint" e corada para alfa-naf-
til acetato esterase, mostrando forte positividade em várias
células (400 X).

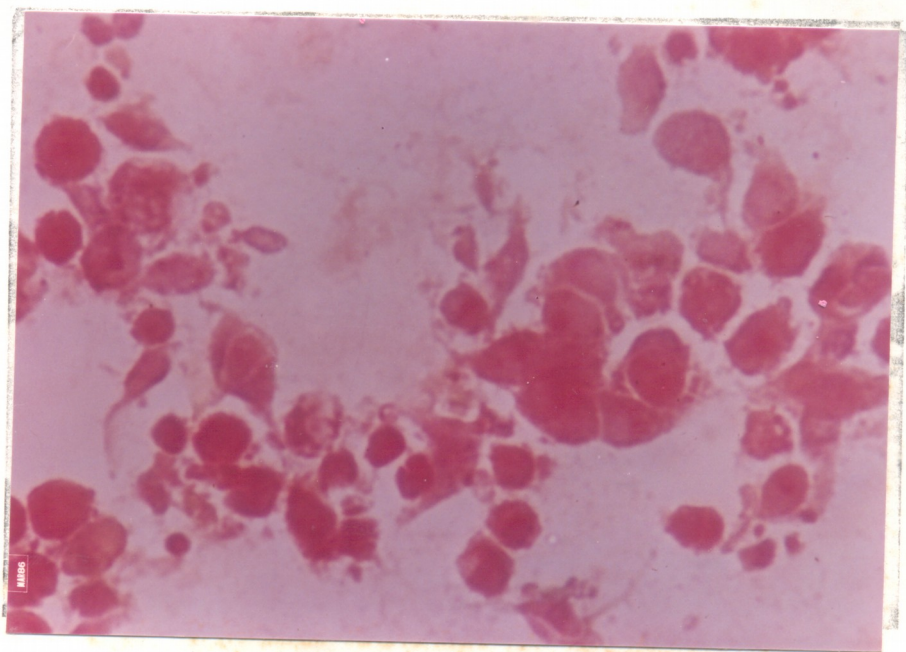


FIGURA 18 - Preparação feita através de "Imprint" e corada para fosfatase ácida, mostrando forte positividade em várias células (400 X).

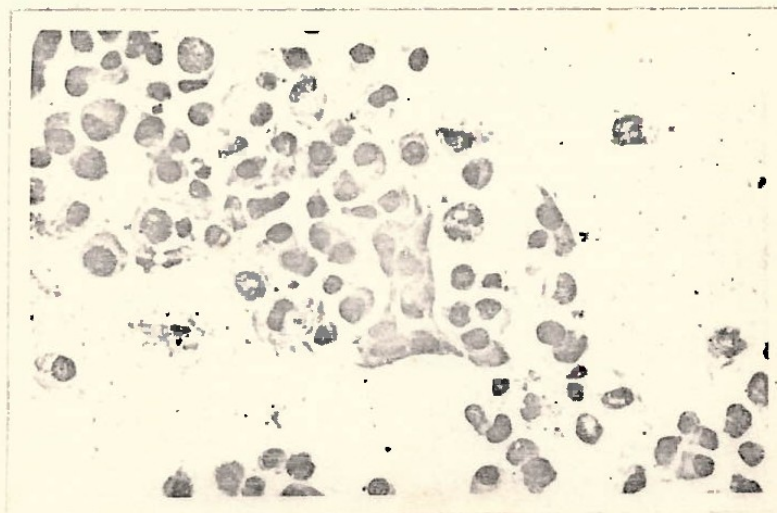


FIGURA 19 - Preparação feita através de "Imprint" e corada para cloroacetato esterase mostrando negatividade da reação em todas as células (400 X).

TABELA 3 - RESULTADOS DA COLORAÇÃO PARA IMUNOPEROXIDASE NO
TUMOR TEGS 2047 (*)

MATERIAL EXAMINADO	M A R C A D O R U T I L I Z A D O			VIMENTINA
	LISOZINA	AIAT	AIACT	
Tumor 1	+	-	-	+
Tumor 2	+	-	-	+
Controle	-	+	-	-

(*) A Reação foi Considerada positiva (+) ou Negativa (-)

AIAT - Alfa-1-Antitripsina

AIACT - Alfa-1-Antiquimiotripsina.

4 - DISCUSSÃO

O tumor transplantável descrito no presente estudo mostrou características celulares de ambos, fibroblastos e histiócitos, justificando portanto a sua inclusão na categoria de neoplasias designadas como Fibrohistiocitomas.

As características macroscópicas, a grande variação no tamanho dos tumores, bem como o seu padrão de crescimento, são achados comuns a outros tumores de partes moles experimentais, fibrohistiocíticos ou não, espontâneos ou induzidos, descritos na literatura (1,7,14,17,18,19,52,53,57).

GREAVES et al (19) avaliando 85 Fibrohistiocitomas espontâneos em ratos Sprague-Dawley, reconheceram, de acordo com o tipo celular predominantemente, 4 tipos histológicos: histiocítico (17%), pleomórfico (33%), celular (células fusiformes) - (17%) e muito fibroso (33%). Os tumores histiocíticos eram altamente malignos e a maioria produziu metástases. Os tipos pleomórfico e celular ocasionalmente levaram ao aparecimento de metástases, sendo reconhecidos como potencialmente malignos. As lesões muito fibrosas eram essencialmente benignas.

A aparência histológica geral do tumor em estudo mostrou uma estreita semelhança com o tipo celular descrito por GREAVES (19) e também com o seu correspondente humano: o grande predomínio de células fusiformes alongadas ou ovóides, o padrão "em redemoinho", uma marcada fibrose, extensas áreas de necrose, é presença de colágeno, reticulina e células inflamatórias crônicas, são características comuns a ambos Fibrohistiocitomas, humano (32,50,61) e de rato (19,21,60) (Tabela 4).

A presença de células gigantes multinucleadas ou em formas bizarras e o aparecimento frequente de metástases, comumente descritos nos FHM humanos (15,32,50,61), em FHM do tipo histiocítico em ratos (19,21,60) e em Sarcomas Histiocíticos de ratos (4,15,30,52), foram achados extremamente raros no tumor em estudo, estando de acordo com a descrição de GREAVES (19) para os FHM do tipo celular.

As características ultraestruturais dos FHM descritos no homem estão, hoje, bem estabelecidas. FU et al (15) demonstraram a presença de células histiocíticas-símile, fibroblásticas-símile e células indiferenciadas em 4 FHM. TAXY et al (55), AGUACIL-GARCIA et al (2) e TSUMEYOSHI et al (58), posteriormente e com maior número de casos, 15, 6 e 17 respectivamente, confirmaram estes achados. Algumas características celulares, como filamentos intracitoplasmáticos, colágeno intercelular, lisossomos, fagossomos, gotículas de lipídio e células tipicamente xantamatosas, observadas por aqueles pesquisadores, foram também encontradas no nosso estudo. No entanto, material lembrando membrana basal foi demonstrado naqueles estudos, o que não ocorreu na presente investigação.

Os estudos de microscopia eletrônica realizados por outros pesquisadores (4,20,21,30,52) em tumores fibrohistiocíticos de ratos, em muito se assemelham aos descritos no parágrafo anterior.

A presença de forte atividade das enzimas alfa-naftil acetato esterase e fosfatase ácida bem como a ausência de atividade para o cloroacetato esterase são achados compatíveis com os encontrados por outros autores em FHM humanos (15,27) e de

ratos (21) e demonstra mais um dado a favor da natureza fibrohistiocítica do tumor em questão.

Nos últimos anos, um número crescente de estudos imuno-histoquímicos vêm sendo realizados na caracterização e diferenciação de vários tumores de suposta natureza fibrohistiocítica e de outros sarcomas de partes moles. Uma série de marcadores antígenicos incluindo proteínas estruturais, enzimas, inibidores enzimáticos, filamentos citoplasmáticos e outros, vêm sendo utilizados com esse objetivo (6) (Tabela 5).

A natureza fibrohistiocítica do tumor TEGS-2047 foi confirmada pela positividade encontrada nas reações de imunoperoxidase para a Lisozima e Vimentina, embora com negatividade para AIAT e AIACT. Estes achados diferem dos publicados por alguns pesquisadores com FHM humanos (6,7,10,34) (Tabela 6). nos quais a AIAT e principalmente a AIACT mostram-se como melhores marcadores da diferenciação histiocítica que a Lisozima. No entanto, BARSOUN et al (4) encontrou resultados semelhantes ao nosso, ao estudar um grupo de 20 Sarcomas Histiocíticos em ratos Wistar.

TABELA 4 - CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DOS TUMORES FIBROHISTIO-
CÍTICOS

(SOULE & ENRIQUEZ, 1972)

Células Histiocíticas-Símile (Epitelióides)

Células Fusiformes (Fibroblastos Facultativos)

Fibrogênese

Padrão Estoriforme

Células Gigantes Benignas Multinucleadas

Células Tumerais Gigantes (Geralmente Bizarrras)

Células Inflamatórias (Geralmente Linfócitos)

Células Estromais Anaplásicas

Figuras Mitóticas (Normais e Atípicas)

Características Granulomatosas

TABELA 5 - PRINCIPAIS CONSTITUINTES ANTIGÊNICOS DOS TUMORES DE PARTES MOLES (MODIFICADO, DE BROOKS, 1982).

ANTÍGENO	COMENTÁRIOS
<u>PROTEÍNAS</u>	
Fator de crescimento Insulina-Símile	Expresso em alguns sarcomas
Fibronectina	Presente provavelmente numa larga variedade de sarcomas
Colágeno	Vários tipos podem ajudar na classificação dos sarcomas
Fator VIII	Marcador específico para a diferenciação celular endotelial
Mioglobina	Marcador específico na diferenciação de musculatura estriada
Proteína básica mielínica	Marcador específico potencial na diferenciação dos nervos periféricos
<u>ENZIMAS</u>	
Colagenase	Marcador fibroblástico(?) Fator relacionado a não invasão
Lisozima	Marcador específico para certos tipos de diferenciação histiocítica
Lipoproteína Lipase	Marcador de células endoteliais (?)
Fosfatase ácida e alcalina	Marcadores específicos potenciais para a diferenciação condro-óssea
<u>INIBIDORES ENZIMÁTICOS</u>	
α 1-Antitripsina	Presente em certos sarcomas
α 1-Antiquimiotripsina	Marcador específico para certos tipos de diferenciação histiocítica
<u>MICROFILAMENTOS</u>	
Prequeratina	Marcador específico para a diferenciação epitelial e mioepitelial
Vimentina	Marcador específico para a diferenciação mesenquimal (?) e de células em divisão
Desmina	Marcador específico para a diferenciação muscular
Actina e Miosina	Presente em muitos tipos celulares
Tubulina, esquelatina, Filamina e α -actinina	Presente em muitos tipos celulares; de utilidade potencial, dependendo de maiores estudos.

TABELA 6 - RESULTADOS DE COLORAÇÃO PARA IMUNOPEROXIDASE USANDO $\alpha 1$ ANTITRIPSINA, $\alpha 1$ ANTIQUIMOTRIPSINA E LISOZIMA EM TUMORES FIBROHISTIOCÍTICOS E EM OUTROS SARCOMAS DE PARTES MOLES HUMANOS.

TIPO HISTÓRICO	AUTOR	Nº CASOS ESTUDADOS	Nº CASOS POSITIVOS		LISOZIMA
			ALAT	ALACT	
Fibrohistiocitoma Maligno	du Boulay, 1982 (10)	23	23	23	03
	Brooks, 1982 (6)	09	NR	08	NR
	Burgdorf, 1981 (7)	05	NR*	NR	0
	Kindblon, 1982 (34)				
Dermatofibrossarcoma Protuberans	Tipo Pleomórfico	22	18	12	03
	Tipo Fusiforme	05	0	03	01
	Tipo Mixóide	04	0	0	0
	du Boulay, 1982	6	3	3	0
	Burgdorf, 1981	5	NR	NR	0
	Kindblon, 1982	4	3	3	0
Dermatofibroma	du Boulay, 1982	22	6	3	3
	Burgdorf, 1982	5	NR	NR	0
Fibrossarcoma	du Boulay, 1982	4	0	0	0
	Kindblon, 1982	4	1	1	0
Lipossarcoma	du Boulay, 1982	3	0	0	0
	Kindblon, 1982	4	0	0	0
Rabdomiossarcoma	du Boulay, 1982	1	0	0	0
	Kindblon, 1982	2	0	0	0
Leiomiossarcoma	du Boulay, 1982	4	0	0	0
	Kindblon, 1982	3	0	0	0

* NR - Não realizado ALAT = $\alpha 1$ Antitripsina ALACT = $\alpha 1$ Antiquimotripsina.

5 - CONCLUSÕES

1 - O tumor transplantável TEGS-2047 mostrou características histológicas, ultraestruturais, histoquímicas e imunohistoquímicas semelhantes às descritas para os Fibrohistiocitomas malignos, humanos e principalmente para os Fibrohistiocitomas malignos de Ratos, justificando-se, portanto, a sua inclusão nesta categoria de tumores.

2 - O índice de pega do tumor em Ratos Wistar jovens, foi satisfatório, 80 a 85%.

3 - A frequência de aparecimento de metástases foi muito baixa (1 em 30). demonstrando o seu menor potencial agressivo, em comparação com outros tumores fibrohistiocíticos experimentais descritos na literatura.

4 - O tumor apresenta um padrão de crescimento que obedece a função de GOMPERTZ.

SUMMARY

A spontaneous tumor transplanted into Wistar rats has been studied and characterized through optical and electron microscopy, enzymatic cytochemistry and immunohistochemistry.

The findings from optical and electron microscopy have shown that the tumor is mainly constituted by histiocytic-like cells, fibroblastic-like cells and undifferentiated cells.

The enzymatic cytochemistry has shown a strong activity for α -naphthyl acetate esterase and acid phosphatase, suggesting the histocytic nature of this neoplasm.

The Immunohistochemistry approach immunoperoxidase method used histiocytic (lysozyme, α 1- Antichymotripsin) and cytoplasmic filaments (vimentin) markers and showed activity for lysozyme and vimentin. This confirmed the fibrohistiocytic nature of the neoplasia.

The incidence of metastasis was low (3,3%). The tumor showed a gampertzian pattern of growth.

From the findings above mentioned this tumor may be considered as a malignant fibrous histiocytoma (MFH).

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - AHERNE, W.A., CAMPLEJOHN, R.S., WRIGHT, N.A. - An Intro - duction to Cell Population Kinetics, London, Edward Arnold, 1977, p. 64-80.
- 2 - ALGUACIL-GARCIA, A., UNNI, K.K., GOELLNER, J.R. - Malignant fibrous histiocytoma: An ultrastructural study of six cases. Am. J. Clin. Pathol., 69: 121-129, 1978.
- 3 - BARKA, T., ANDERSON, P.J. - Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. J. Histochem. Cytochem., 10: 741-753, 1962.
- 4 - BARSOUM, N.J., HANNA, W., GOUGH, A.W., SMITH, G.S. STURGESS, J.M., de La IGLESIA, F.A. - Histiocytic sarcoma in Wistar rats - A light microscopic, immunohistochemical and ultrastructural study. Arch. Pathol. Lab. Med., 8: 802-807, 1984.
- 5 - BEZERRA DE ARAÚJO, R.W., PAULA, L.K.C. de A., MENEZES, D.B., POMPEU, M.N.L., FERREIRA, F.V.A., FONTELES, M.C. A Propósito de um Tumor Espontâneo na Região da Glândula Salivar de Rato Albino. Observações Preliminares. Histologia e Transplante. Rev. de Med. da Univ. Fed. do Ceará, 20 (1/2): 21-24, 1980.
- 6 - BROOKS, J.F. - Immunohistochemistry of soft tissue tumours: progress and prospects. Hum. Pathol., 13: 969-974, 1982.
- 7 - BURGDORF, W.H.C., DURAY, P., ROSAI, J. - Immunohistochemical identification of lysozyme in cutaneous lesions of alleged histiocytic nature. Am. J. Clin. Pathol., 75: 162-167, 1981.

- 8 - CARTER, R.L. - Tumours of the rat, in turusov, V.S. (ed.) - Pathology of tumours in laboratory animals. Lyons, France, International Agency for Research in Cancer., vol. 1, pp 151-168, 1973.
- 9 - DAVEY, F.R., GOLDBERG, J., STOCKMAN, J. et alii. - Immunological and cytochemical cell markers in non-Hodgkin's lymphomas. Lab. Invest., 36: 430-438, 1976.
- 10 - Du BOULAY, C.E.H. - Demonstration of alpha-1-antitrypsin and alpha-1-antichymotrypsin in fibrous histiocytomas using the immunoperoxidase technique. Am. J. Clin. Pathol., 6: 559-564, 1982.
- 11 - ENJOJI, M., HASHIMOTO, H., TSUMEYOSHI, M., IEASAKI, H. - Malignant fibrous histiocytoma - A clinical pathologic study of 130 cases. Acta Pathol. Jpn., 30: 727-741, 1980.
- 12 - FALINI, B., TAYLOR, C.P. New developments in immunoperoxidase Techniques and their application. Arch. Pathol. Lab. Med., 107: 105-115, 1983.
- 13 - FEAUX de LACROIX, W., LENNARTZ, R.J. Changes in the proliferation characteristics of a solid transplantable tumour of the mouse with time after transplantation. Cell. Tissue Kinet., 14: 135-142, 1981.
- 14 - FRINDEL, E., MALAISE, E.P., ALPEN, E. and TUBIANA, M. - Kinetics of cell proliferation of an experimental tumour. Cancer Res., 27: 1122-1131, 1967.
- 15 - FU, V.S. GABBIANE, G., KAYE, G.I., LATTES, R. - Malignant soft tissue tumours of probable histiocytic origin (Malignant fibrous histiocytomas): General considerations and electromicroscopic and tissue nature studies. Cancer, 35: 176-198, 1975.

- 16 - GABBIANI, G., KAPANCI, Y., BARAZZONE, P. et.al: Immunochemical identification of intermediate-sized filaments in human neoplastic cells: a diagnostic and for the surgical pathologist. Am J. Pathol. 104: 206-212, 1981.
- 17 - GOODMAN, D.G., WARD, J.M., SQUIRE, R.A. et. alii - Neoplastic and non-neoplastic lesions in aging F344 rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 48: 237-248, 1979.
- 18 - GOODMAN, D.G., WARD, J.M., SQUIRE, R.A. et alii - Neoplastic and non-neoplastic lesions in aging Osborne-Mendel rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 55: 433-447, 1980.
- 19 - GREAVES, P., FACCINE, J.M. - Fibrous histiocytic neoplasms spontaneously occurring in rats. Br. J. Cancer., 43: 402-411, 1981.
- 20 - GREAVES, P., MARTIN, J.M., MASSON, M.T. - Spontaneous rat malignant tumours of fibrohistiocytic origin. An ultrastructural study. Vet. Pathol., 19: 497-505, 1982.
- 21 - GREAVES, P., MARTIN, J.M., RABEMAINPIANINA, Y., Malignant fibrous histiocytoma in rats at sites of implanted millipore filters. Am. J. Pathol., 120: 207-214, 1985.
- 22 - GUESDON, J.L., TERNYNCH, T. and AVRAMEAS, S. - The use of Avidin-Biotin interaction in immunoperoxidase technics. J. Histochem. Cytochem., 27: 1131-1139, 1979.
- 23 - HAMBURGER, F. and FISHMAN, W.H. - The physiopathology of cancer. New York, A. Hoeber Harper Book, 1953.
- 24 - HARRIS, M. - The ultrastructure of benign and malignant fibrous histiocytomas. Histopathology, 4: 29-44, 1980.
- 25 - HEYDERMAN, E. - Immunoperoxidase technique in histopathology: applications methods and controls. J.Clin. Pathol., 32: 971-978, 1979.

- 26 - ISAACSON, P., JONES, D.B. et alii - Alpha-1-antitrypsin in human macrofages. J. Clin. Pathol., 34: 982-990, 1981.
- 27 - IWASAKI, H., KIKUCHI, M., TAKII, M., ENJOJI, M. - Benign and malignant fibrous histiocytoomas of the soft tissue: functional characterization of the cultured cells. Cancer, 50: 520-530, 1982.
- 28 - JAMRA, M. & LORENZI, F.F. - Leucócitos, Leucemias, Linfomas, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1983, p. 8-24.
- 29 - JEFFREE, G.M. - Enzymes of round cell tumours in bone and soft tissue: A histochemical survey. J. Pathol. 113: 101-115, 1974.
- 30 - JOHNSON, K.H., GHOBRIAL, H.K.G., BUOEN, L.C. et alii. - Non fibroblastic origin of foreign body sarcomas implicated of histological and electron microscopic studies. Cancer Res., 33: 3139-3154, 1973.
- 31 - KAUFFMAN, S.L., STOUT, A.P. - Histiocytic tumours (Fibrous xanthoma and histiocytooma) in children. Cancer, 14: 469-482, 1961.
- 32 - KEARNEY, M.M., SOULE, E.H., IVINS, J.C. - Malignant fibrous histiocytooma: A retrospective study of 167 cases. Cancer, 45: 167-118, 1980.
- 33 - KEMPSON, R.L., KYRIAKOS, M. - Fibroxanthosarcoma of the soft tissues. - A type of malignant fibrous histiocytooma. Cancer, 29: 961-976, 1972.
- 34 - KINDBLUM, L.G., JACOBSEN, G.K., JACOBSEN, M. - Immunohistochemical investigations of tumours of supposed fibroblastic-histiocytic origin. Hum. Pathol., 9: 834-840, 1982.

- 35 - KOJIRO, M., ISOMURA, T., OHTSU, N., HACHISUKA, H. et alii. - Atypical malignant histiocytosis: Its appearance as a single meningeal tumour or as multiple skin tumours. Arch. Pathol. Lab. Med., 105: 317-321, 1981.
- 36 - KONISHI, Y., MARUYANA, H., MII, Y. et alii. - Malignant fibrous histiocytomas induced by 4 - (hydroxyamino) quinoline-1-oxide in rats. J. Natl. Cancer. Inst., 68: 859-865, 1982.
- 37 - LAIRD, A.K. - Dynamics of Tumor Growth. Brit. J. Cancer., 18: 490-502, 1964.
- 38 - LAGACE, R., DELAGE, C., SEEMAYER, T.A. - Myxoid variant of malignant fibrous histiocytoma. Ultrastructure observations. Cancer, 43: 526-534, 1979.
- 39 - LORENZI, T.F., PEREIRA, E.S., GENTER, G. - Métodos de coloração das células do sangue e da medula óssea, São Paulo, Fundação Maria Cecília Souto Vidigal- Instituto de Hematologia, 1985.
- 40 - LI, C.Y., LAM, W., YAM, L.T. - Esterases in human leukocytes. J. Histochem. Cytochem., 21: 1-12, 1973.
- 41 - LI, C.Y., YAM, L.T., CROSBY, W.H. - Histochemical characterization of cellular and structural elements of the human spleen. J. Histochem. Cytochem., 20: 1049-1058, 1972.
- 42 - MASON, D.Y., TAYLOR, C.R. - The distribution of muramidase (lysozyme) in human tissues. J. Clin. Pathol., 28: 124-132, 1975.

- 43 - MOTOI, M., STEIN, H., LENNERT, K. - Demonstration of lysozyme, alfa 1 - antichymotrypsin, alfa 1 - antitrypsin, albumin, and transferrin with the immunoperoxidase method in lymphnodes cells. Virchows Arch. Cell. Pathol., 35: 73-82, 1980.
- 44 - NAMBA, K., JAFFE, E.S., SOBAN, E.J. et alli. Hairy Cell Leukemia: Enzyme histochemical characterization with stromal changes. Cancer, 39: 2323-2336, 1977.
- 45 - O'BRIAN, J.E. and STOUT, A.P. - Malignant fibrous xanthomas. Cancer, 17: 1445-1455, 1964.
- 46 - OZELLO, L., HAMELS, J. The histiocytic nature of dermatofibrosarcoma protuberans. Tissue culture and electron microscopic study. Am. J. Clin. Pathol., 65: 136-148, 1976.
- 47 - PARKER, J.W. - Immunological basis for the redefinition of malignant lymphomas. Am. J. Clin. Pathol., 72: 670-686, 1979.
- 48 - PINKUS, G.S., SARD, J.W. Profile of intracytoplasmic lysozyme in normal tissues, myeloproliferative disorders, Hairy Cell Leukemia processes: an immunoperoxidase study of paraffin sections and smears. Am. J. Pathol., 89: 351-366, 1977.
- 49 - PRADHAN, S.N., CHUNG, E.B., GHOSH, B., et alii - Potencial carcinogens: I. Carcinogenicity of some plant extracts and their Tannin-containing fractions in rats. J. Natl. Cancer Inst., 52: 1579-1582, 1974.
- 50 - SOULE, E.H., ENRIQUEZ, P. - Atypical fibrous histiocytoma, malignant fibrous histiocytoma, malignant histiocytoma and epithelioid sarcoma. A comparative study of 65 tumours. Cancer, 30: 128-143, 1972.

- 51 - SPIVAK, J.L. - Phagocytic tumor cells. Scand. J. Haemathol., 11: 253-256, 1973.
- 52 - SQUIRE, R.A., BRINKHOUSE, K.M., PEIPER, S.C. et alii. - Histiocytic sarcoma with a granuloma-like component occurring in a large colony of Sprague-Dawley rats. Am. J. Pathol., 105: 21-30, 1981.
- 53 - STEEL, G.G. - Growth kinetics of Tumours - cell population kinetics in relation to the growth and treatment of Cancer, Oxford, Clarendon Press., 1977. p. 5-52.
- 54 - TANNOCK, I.F. - A comparison of cell proliferation parameters in solid and Ascites Ehrlich Tumours. Cancer Res., 29: 1527-1534, 1969.
- 55 - TAXY, J.B., BATTIFORA, H. - Malignant fibrous histiocytoma. An electron microscopic study. Cancer, 40: 254-267, 1977.
- 56 - TAYLOR, C.R. - Immunoperoxidase techniques-Practical and theoretical aspects. Arch. Pathol. Lab. Med., 102: 113-121, 1978.
- 57 - TROMPIERI, N.M. - Um estudo morfo-Farmacológico do tumor TEGS-2047, sob o efeito de substâncias antiinflamatórias não esteróides, Fortaleza, 1984 (Tese de Mestrado - Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará).
- 58 - TSUMEYOSHI, M., ENJOJI, M., SHINOHARA, N. - Malignant fibrous histiocytoma: An electron microscopic study of 17 cases. Virchows Arch. Pathol. (Pathol. Anat.), 392: 135-145, 1981.
- 59 - TUBBS, R.R., SAVAGE, R.A. CRABTREE, R.H. et alii. - Expression of monoacytic-histiocytic cytochemical markers in epithelial neoplasia. Am. J. Clin. Pathol. 72: 789-794, 1979.

- 60 - WARD, J.M., KULWICH, B.A., REZNIK, G., BERMAN, J.J. - Malignant fibrous histiocytoma. An unusual neoplasm of soft tissue origin in the rat that is different from human counterpart. Arch. Pathol. Lab. Med., 105: 313-316, 1981.
- 61 - WEISS, S.W. and ENZINGER, F.M. - Malignant fibrous histiocytoma: an analyses of 200 cases. Cancer, 41: 2250-2266, 1978.
- 62 - WESTWOOD, F.R., LONGSTAFF, E., BUTLER, W.H. - Cellular progression of neoplastic in the subcutis of mice after implantation of 3-4-Benzpyrene. Br. J. Cancer, 39: 761-772, 1979.
- 63 - YAM, L.T., LI, C.Y. & CROSBY, W.H. - Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. Am. J. Clin. Pathol., 55: 283-290, 1971.
- 64 - YUMOTO, T., MORIMOTO, K. - Experimental approach to fibrous histiocytoma. Acta Pathol. JPN, 30: 767-778, 1980.