

**AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DE METÁSTASES
IMPLANTADAS EM CAMUNDONGOS NUDE ATRAVÉS
DA ULTRASSONOGRAFIA**

CAROLINE CORRÊA DE TULLIO AUGUSTO ROQUE

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre em
Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Eduardo Nóbrega Pereira Lima

Coorientador: Dr. Rubens Chojniak

São Paulo

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Roque, Caroline Corrêa de Tullio Augusto

Avaliação evolutiva de metástases implantadas em camundongos nude através da ultrassonografia / Caroline Corrêa de Tullio Augusto

Roque – São Paulo, 2017.

37p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Eduardo Nóbrega Pereira Lima

Descritores: 1. Evolução Molecular Direcionada/veterinária/Directed Molecular Evolution/veterinary. 2. Animais de Laboratório/Animals, Laboratory. 3. Camundongos/Mice. 3. Cavidade Abdominal/ultrassonografia/Abdominal Cavity/ultrasonography. 4. Metástase Neoplásica/Neoplasia Metastasis.

DEDICATÓRIA

Para mim, o intuito de uma tese deve ir além de um título. A ciência é sedente de informações, por essa razão, dedico essa tese à todos pesquisadores e profissionais da saúde.

AGRADECIMENTOS

Acreditava que fazer uma tese de mestrado era algo inatingível. Por inúmeras vezes ousava dizer que jamais seria capaz. Realmente jamais teria conseguido se estivesse sozinha nessa caminhada.

Tudo começou, e continuou, com a ajuda do meu Deus. Ele evidenciou, em meio a uma grande lista de pesquisadores, o nome do Dr. Rubens Chojniak, o qual muito gentil e humildemente me recebeu em seu escritório, e sem saber nada a meu respeito, confiou em mim se tornando meu coorientador com sua incontestável capacidade de orientar.

Através do excelentíssimo Dr. Rubens fui apresentada ao Dr. Eduardo Nóbrega Pereira Lima, o qual se tornou meu orientador, o fazendo com maestria.

Aos poucos, profissionais maravilhosos foram aparecendo nessa trajetória somando e contribuindo ativamente nesse projeto.

O Dr. Tiago Gós abriu as portas do CIPE sempre me auxiliando em absolutamente tudo que foi necessário; o aluno de doutorado, também meu marido, Bruno Roque, parceiro ativo desse projeto ajudando em todo procedimento burocrático e técnico; as patologistas Dras. Patrícia Peresi e Dra Maria Dirlei Begnami patologistas que fizeram todo o processamento das amostras hepáticas dos camundongos e posterior análise histopatológica contribuindo de uma maneira única nesse trabalho.

Agradeço às Dras.: Adriana Trapé; Cláudia Matsunaga Martin; Ludmilla Thomé Domingos Chinen; Paula Nicole Vieira Pinto Babosa e Sônia Marta Moriguchi que compuseram a banca me ajudando com muita sabedoria e paciência.

Agradeço muito a toda equipe da pós-graduação e a bibliotecária Sueli por sempre me ajudar prontamente tirando todas as minhas dúvidas e auxiliando em cada etapa; minhas duas colegas de mestrado, Marília Zendron e Marieta Cunha, pela parceria de todos os dias, me ajudando e estimulando a cada obstáculo que aparecia.

À minha equipe de trabalho de Santos, em especial a médica veterinária Cátia Banjai, pois sem eles eu não conseguiria abrir mão da rotina para me dedicar ao mestrado.

Por fim, porém não menos importante, agradeço de coração aos meus pais Cybele e Luiz Maurício e meus irmãos Bruno e Camila, que tanto torceram e acreditaram em mim, mesmo quando eu me julgava incapaz. Infelizmente meu pai não teve a oportunidade de ver a conclusão desse trabalho, pois hoje está nos braços do Senhor.

RESUMO

Roque CCTA. **Avaliação da acurácia de metástases implantadas em camundongos nude através da ultrassonografia.** São Paulo; 2017. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

A pesquisa translacional é pilar central no entendimento do câncer e na sua progressão. Camundongo imunodeficiente é o modelo animal comumente empregado no estudo de tumores humanos transplantados ortotopicamente. O exame ultrassonográfico emerge como método viável na mensuração de tumores implantados na cavidade abdominal. O objetivo desse estudo foi avaliar achados ultrassonográficos de tumores hepáticos implantados em camundongos, utilizando transdutor de 13 MHz e correlacioná-los com os achados anatomopatológicos. Foram obtidas cirurgicamente, amostras tumorais de metástases hepáticas de câncer colorretal proveniente de pacientes. Um fragmento de 1mm³ foi confeccionado e implantado no parênquima hepático de camundongos nude. Ao todo foram utilizados 38 animais. Todos os camundongos foram, ultrassonograficamente, monitorados mensalmente até eutanásia. Dos 38 camundongos implantados 11 apresentaram crescimento tumoral. O exame ultrassonográfico detectou lesões nodulares nos 11 animais macroscopicamente positivos e foi capaz de identificar os padrões de tumores enxertados. A ultrassonografia é um método viável e não invasivo, para avaliar parênquima hepático de camundongos nude. Neste estudo, o método obteve 100% de sensibilidade e especificidade na detecção e caracterização de lesões nodulares em parênquima hepático.

SUMMARY

Roque CCTA. **[Ultrasonography accuracy of liver metastasis xenograft in nude mice]**. São Paulo; 2017. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Translational research is key to understanding cancer and its progression. The immunodeficient mouse is the animal model usually employed for studying orthotopically implanted human tumors, and ultrasonography has emerged as a viable method for measuring tumors implanted into the abdominal cavity. The objective of this study was to evaluate findings from ultrasonography of hepatic tumors implanted into mice, using a 13 MHz transducer, and to correlate these findings with the results of pathological examinations. Tumor samples from hepatic metastases of colorectal cancer were obtained surgically from patients, and 1mm³ fragments were implanted into the hepatic parenchyma of nude mice. A total of 38 animals were used. All of the mice were monitored monthly by ultrasonography until sacrifice. Of the 38 mice implanted 11 showed tumor growth. Ultrasonography detected nodular lesions in the 11 macroscopically positive animals, and was able to identify the patterns of the grafted tumors. Ultrasonography is a viable, and non-invasive, method for evaluating the hepatic parenchyma of nude mice. In this study, the method showed 100% sensitivity and specificity in detecting and characterizing nodular lesions in the hepatic parenchyma.

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELA

Figura 1	Implantação de fragmento tumoral em camundongo.....	15
Figura 2	Exame ultrassonográfico.....	17
Figura 3	Imagens ultrassonográficas.....	18
Figura 4	Todo órgão hepático de camundongos, removido, com presença de neoplasias morfológicamente variadas.....	22
Figura 5	Imagem ultrassonográfica de um parênquima hepático normoecogênico homogêneo.....	24
Quadro 1	Medida referente ao maior eixo tumoral visualizado através do método ultrassonográfico.....	25
Quadro 2	Quantidade de camundongo por amostra de paciente e respectivas taxas de sucesso no crescimento tumoral.....	27
Tabela 1	Distribuição conjunta de ultrassonografia segundo a macroscopia.....	26

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Ultrassonografia	1
1.2	Enxertia Tumoral	6
2	JUSTIFICATIVA.....	8
3	OBJETIVO	11
3.1	Objetivo Primário	11
3.2	Objetivo Secundário	11
4	MATERIAL	12
4.1	Modelo Animal.....	12
4.2	Seleção Dos Pacientes	12
4.3	Confecção Do Xenoenxerto.....	13
4.4	Avaliação Ultrassonográfica	15
4.5	Eutanásia.....	19
4.6	Estudo Anatomopatológico.....	19
4.7	Análise Estatística	20
5	RESULTADOS.....	21
5.1	Evolução da População.....	21
5.2	Tumores Presentes na Amostra	21
5.3	Achados Macroscópicos.....	21
5.4	Achados Histopatológicos	22
5.5	Detecção pela Ultrassonografia.....	22
5.6	Dimensões.....	24
5.7	Tempo de Crescimento Tumoral	25
5.8	Acurácia.....	25
5.9	Taxa De Sucesso por Amostra de Paciente	26

6	DISCUSSÃO	28
7	CONCLUSÃO	33
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	34

ANEXO

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Animais-CEUA

1 INTRODUÇÃO

1.1 ULTRASSONOGRAFIA

A ultrassonografia diagnóstica é um método de imagem baseado nos princípios físicos das ondas sonoras. Em 1880 os irmãos Pierre e Jacques Curie descreveram o efeito piezoelétrico, nome originado da palavra grega “piezein” que significa pressionar, comprovando a habilidade dos cristais em converter energia mecânica – pressão - em energia elétrica (MOULD 2007; GORGAS 2011; MATTOON e NYLAND 2015), ou seja, demonstraram que os cristais de turmalina, quartzo, topázio, cana de açúcar e sal de Rochelle geravam polarização elétrica sob *stress* mecânico (MOULD 2007). A primeira aplicação prática foi um submarino sonar piezoelétrico, desenvolvido em 1917 por Paul Langevin, durante a primeira Guerra Mundial. Esse aparelho consistia num transdutor formado por cristais de quartzo cuidadosamente colados entre duas placas de aço e um hidrofone capaz de captar o retorno do eco. Esse transdutor emitia uma onda de alta frequência e, através da medição do tempo levado para receber o retorno do eco, era possível calcular a distância do objeto (MOULD 2007).

O oposto desse fenômeno é utilizado para a produção de ondas ultrassonográficas, empregando voltagem elétrica aplicada a um cristal, sendo convertida em energia mecânica provocando oscilação do cristal. Essa oscilação é transmitida para dentro do organismo na forma de onda de

ultrassom. Atualmente o cristal mais utilizado nos transdutores para a obtenção do efeito piezoelétrico é o Titanato-Zirconato de Chumbo (PZT) (GORGAS 2011).

A imagem ultrassonográfica se baseia na interação de ondas sonoras com tecidos vivos resultando na formação da imagem dos mesmos (COATNEY 2001). As ondas de ultrassom são caracterizadas pelo seu comprimento (λ), frequência (f) e amplitude (A). A frequência se refere ao número de vezes que um comprimento de onda é repetido (ciclos) num mesmo ponto por 1 segundo, usualmente descritas em unidades por segundo ou Hertz (Hz). Um ciclo por segundo equivale a 1Hz, mil ciclos por segundo corresponde a um QuiloHertz e 1 milhão de ciclos por segundo correspondente a 1 megahertz (MHz). A frequência do som detectada pelo ouvido humano varia entre 16.000 – 20.000 Hz. Os sons com frequência inferior são chamados de infrassom, e aqueles com frequência superior são chamados de ultrassom. O comprimento da onda ultrassonográfica está relacionado à distância entre dois máximos (ou mínimos) pontos consecutivos enquanto que a amplitude revela o comportamento da pressão exercida no meio - expansão ou compressão - quando a amplitude é máxima (GOLDBERG 1988; GORGAS 2011, MATTOON e NYLAND 2015).

O transdutor não atua apenas como transmissor de ondas, mas também age como receptor. Contém cristais piezoelétricos que vibram quando são expostos à pequena corrente elétrica produzindo ondas sonoras. Esses cristais também produzem pequenas correntes elétricas quando são deformados por ondas sonoras refletidas. As ondas sonoras

produzidas por estes cristais são postas num feixe e transmitidas através dos tecidos moles e órgãos alvo. Os ecos refletidos carregam energia e as transmitem para o transdutor causando compressão mecânica dos cristais piezoelétricos. Essa compressão interfere nos dipolos dentro do cristal alterando sua orientação, resultando numa tensão elétrica na superfície do cristal, que é amplificada e convertida para exibição da imagem (COATNEY 2001; GORGAS 2011). O transdutor não é capaz de receber e enviar os ecos num mesmo momento, sendo assim, 99% do tempo atua como receptor e 1% enviando os ecos (GORGAS 2011; MATTOON e NYLAND 2015).

Existem diversos modelos de transdutores. Para o exame ultrassonográfico abdominal utilizam-se transdutores lineares e convexos, nos quais os cristais são dispostos de maneira linear em sua superfície. A frequência dos transdutores depende do tamanho dos cristais utilizados. Quanto maior a frequência, ou seja, quanto menor comprimento da onda, menor o poder de penetração, porém melhor a resolução da imagem, sendo comumente utilizado para estruturas superficiais. Transdutores com baixa frequência (entre 2 a 3,5MHz) apresentam boa penetração nos tecidos, a fim de avaliar estruturas mais profundas em animais acima do peso ou em cães de raças grandes. Já os transdutores de alta frequência (entre 7,5 a 12MHz ou mais) produzem resolução de imagem ideal, porém limitada na profundidade, por apresentarem baixo poder de penetração da onda sonora (KIRCHER 2011; MATTOON e NYLAND 2015). Na ultrassonografia diagnóstica, normalmente se utiliza frequência entre 2-15MHz (10^6 ciclos por

segundo). Transdutores intravasculares possuem frequência acima de 30MHz e transdutores de biomicroscopia possuem frequência acima de 100MHz (FOSTER et al. 2000; MATTOON e NYLAND 2015).

Os médicos Douglas Howry e D. Ronderic Bliss foram pioneiros ao realizar estudos com ultrassom. Em 1949 desenvolveram o primeiro sistema com objetivo médico e em 1950 realizaram a primeira imagem médica com ultrassom (GOLDBERG 1988). O primeiro registro da ultrassonografia na medicina veterinária ocorreu em 1966, quando LINDAHL diagnosticou prenhez em ovelha. Segundo BARBERET e SAUNDERS (2010), a ultrassonografia, em pequenos animais, é o método diagnóstico de escolha para avaliação dos órgãos abdominais, incluindo pequenas estruturas como glândulas adrenais e linfonodos, bem como estruturas superficiais como, por exemplo, glândulas tireóides.

Antes do início da década de 90, artigos científicos sobre ultrassonografia eram limitados, primeiramente, às espécies de animais maiores como cães, porcos, ovelhas, primatas e bezerros. Avanços tecnológicos em imagens ultrassonográficas a partir da década de 90 permitiram a avaliação precisa de corações de ratos (TANAKA et al. 1996; COATNEY 2001) e outros órgãos alvo em roedores (GRAHAM et al. 2005; WALK et al. 2014; SPRINGER et al. 2014).

Em 1995, TURNBULL et al. foram os pioneiros a relatarem o uso da ultrassonografia de alta frequência ou biomicroscopia ultrassônica (UBM) na pesquisa translacional, a fim de observar a fenotipagem mutante do embrião de rato. Em 1999, CZARNOTA et al. descrevem a utilização da

ultrassonografia de alta frequência (40 MHz) para o monitoramento de apoptose a fim de monitorar os efeitos dos agentes quimioterápicos e outros tratamentos anticancerígenos. FOSTER et al. em 2002 realizou um estudo não invasivo em ratos vivos avaliando o desenvolvimento embrionário através da UBM. A primeira aplicação do UBM para avaliação da progressão melanoma cutâneo foi descrita em 1996 por TURNBULL et al., e outros estudos semelhantes foram descritos em 2005 por CHEUNG et al. e GRAHAM et al. que utilizaram a ultrassonografia tridimensional de alta frequência para avaliar o crescimento de metástases hepática experimentais em ratos produzidas pela injeção das seguintes células: B16F1, PAP2, HT-29 e MDA-MB-435/HAL através da veia mesentérica, no qual a ultrassonografia demonstrou ser altamente sensível na detecção de pequenas metástases, como por exemplo, 0,22mm. Em 2014, WALK et al. avaliaram alterações em linfonodos cervicais de ratos através da ultrassonografia de alta frequência. Estudo realizado por SPRINGER et al. (2014) utilizando ratos envelhecidos naturalmente relata casos de hidronefrose adquirida detectadas através da ultrassonografia de alta resolução.

Por muitos anos, médicos e pesquisadores, ao detectarem tumores observavam seu crescimento através de biópsia cirúrgica. Na última década, métodos como ressonância magnética, tomografia computadorizada, radiografias e ultrassonografia, vieram para revolucionar a maneira de se detectar e monitorar a progressão do câncer. Muitas dessas tecnologias foram desenvolvidas para uso humano, mas com os recentes avanços na

era genômica utilizando camundongos, o diagnóstico por imagem passou a fazer parte da pesquisa básica e translacional (WEISSLEDER 2002).

1.2 ENXERTIA TUMORAL

O uso de modelos pré-clínicos é essencial na pesquisa translacional do câncer desde o entendimento biológico da doença até o desenvolvimento de novos tratamentos (HIDALGO et al. 2014). Somado a isso, o camundongo nude se destaca como modelo ideal, pois apresenta mutação do gene *Foxn1* causando atrofia ou ausência do timo e consequentemente uma depleção de células T CD4 e CD8 prejudicando a função dos linfócitos T e B (OH et al. 2016).

A introdução desse modelo animal no crescimento de tumores humanos ocorreu em 1969 alterando os paradigmas da investigação básica e aplicada sobre o câncer (RYGAARD e POVLSEN 1969; HOFFMAN 2015).

Uma das principais premissas do desenvolvimento de modelos de xenoenxerto derivado de paciente (PDX) para a pesquisa do câncer, é a suposição de que esses modelos se assemelham fielmente ao tumor original a partir do qual foram desenvolvidos, e sua similaridade é mantida através de passagens tumorais entre camundongos (HIDALGO et al. 2014). O primeiro PDX foi realizado por RYGAARD e POVLSEN (1969) por meio da implantação subcutânea de um fragmento de câncer colorretal, de paciente de 74 anos, em camundongos nude. Observou-se crescimento tumoral compatível com adenocarcinoma bem diferenciado semelhante ao do

doador. Esses tumores cresceram encapsulados sem evidências de metástase durante 76 passagens tumorais entre camundongos, realizadas em um período de 7 anos (RYGAARD e POVLSEN 1969). O transplante ectópico é o modelo mais fácil para enxertar tumores. No entanto, esse modelo, principalmente, não consegue desenvolver metástases hepáticas, pois o microambiente subcutâneo não mimetiza o microambiente de onde a metástase foi estabelecida. Por esse motivo, WANG et al. (1982), desenvolveram um modelo animal utilizando injeção de suspensão de células de câncer colorretal em cólon descendente de nudes, sendo possível observar invasão local e metástases a distância. Esse estudo demonstrou que o comportamento tumoral se assemelhava mais ao encontrado em pacientes, do que quando implantado subcutâneamente.

O modelo de transplante ortotópico é o mais semelhante ao humano em termos de histologia, vascularização, expressão gênica e processo metastático, sendo, então, capaz de produzir metástases tornando-o superior ao transplante subcutâneo – ectópico - (KUBOTA 1994; HOFFMAN 1999, 2015; MURAKAMI et al 2016; OH et al 2016).

HOFFMAN (2015) foram os pioneiros em realizar xenoenxerto ortotópico derivado de paciente (PDOX) em camundongos nude, observando maior extensão de metástase em comparação com suspensões de células implantadas ortotopicamente. Isto, provavelmente, se dá devido à histologia intacta e à interação das células cancerígenas com o estroma do tecido tumoral implantado ortotopicamente.

2 JUSTIFICATIVA

A metástase é a principal causa de morte por câncer. O fígado é frequentemente acometido por metástases de melanoma, cólon e mama, o que faz da metástase hepática uma importante área de pesquisa. No cenário pré-clínico, a utilização de PDOX (*Patient-derived orthotopic xenograft*) é considerada padrão ouro no entendimento da biologia tumoral e na avaliação da resposta terapêutica a novos fármacos. Contudo, sem um método de imagem não invasivo para mensuração do crescimento tumoral, esta plataforma de pesquisa torna-se limitada pela incapacidade de acompanhar a progressão da lesão no animal vivo (GRAHAM et al. 2005).

A imagem ultrassonográfica ostenta excelente contraste entre os diferentes tecidos moles sem necessidade de contrastes exógenos ou radiofármacos. Ainda, trata-se de um exame mais rápido quando comparado à tomografia computadorizada (CT), ressonância magnética (MRI), tomografia por emissão de pósitrons (PET) e bioluminescência (AYERS et al. 2010). Além da ultrassonografia não utilizar radiação ionizante, é um método de baixo custo, não invasivo tornando possível a realização de exames seriados sem causar danos ou desconforto ao animal. Por outro lado, a necessidade de sedação dos camundongos para realização do exame, se apresenta como principal desvantagem. pois o decúbito dorsal não é tolerado por eles.

A ultrassonografia promove boa acurácia na mensuração de nódulos metastáticos em fígado. No modelo pré-clínico, este exame possibilitaria a investigação de metástases hepáticas transplantadas em camundongos nude, de modo não invasivo. Desta maneira, a preservação dos animais transplantados permitiria a avaliação da progressão da doença através de exames seriados (TURNBULL et al. 1996; AYERS et al. 2010; WALK et al. 2014).

Cabe ressaltar que apesar do exame ultrassonográfico de alta frequência ter maior sensibilidade na detecção de nódulos hepáticos em camundongos, seu alto custo limita a aplicabilidade de estudos comparativos em larga escala. A ultrassonografia multifrequencial, utilizada na rotina da maioria dos centros diagnósticos, emerge como uma oportunidade, ainda não explorada, de um método de imagem não invasivo na detecção de nódulos hepáticos em camundongos nude.

A relevância do presente trabalho é caracterizada pela ausência de estudos comparativos que utilize a ultrassonografia na detecção de metástases hepáticas neste modelo animal. Dada a ausência de profissionais capacitados para tal exame em camundongos nude, o estudo inter-observador não será realizado. Ainda, a implantação de fragmentos tumorais provenientes de pacientes diretamente no fígado de camundongos nude, revela o caráter inovador desta pesquisa ao se assemelhar ao modelo observado em estudos clínicos. Por fim, vale ressaltar que, a validação do exame ultrassonográfico no cenário pré-clínico abrirá novos caminhos para a pesquisa translacional no que concerne a tratamentos individuais e

personalizados. Face ao exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade do exame ultrassonográfico na detecção de tumores hepáticos implantados em camundongos imunodeficientes.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Avaliação da acurácia do exame ultrassonográfico para detecção de tumores hepáticos implantados em camundongos imunodeficientes, utilizando transdutor linear com frequência de 13MHz.

3.2 OBJETIVO SECUNDÁRIO

Comparação dos achados de necrópsia e histopatologia com as imagens obtidas pela ultrassonografia.

4 MATERIAL

4.1 MODELO ANIMAL

A espécie utilizada neste estudo foi camundongo da linhagem Nude (Balb/c) e Procedência: Charles Rivers. Foram utilizados 42 animais, machos e fêmeas, com idade aproximada de 2 a 4 meses e peso aproximado de 20 gramas. Este projeto não envolveu experimentação com animais geneticamente modificados. Os animais foram mantidos durante todo o período experimental em biotério *Specific Pathogen Free* (SPF), onde os animais estiveram livres de patógenos específicos para os quais os mesmos foram periodicamente testados. Os camundongos foram mantidos em microisoladores à temperatura controlada de 22° C e sob ciclo de luz de 12 horas, tratados com água autoclavada e ração irradiada *ad libitum* (CEUA 065/14A) (Anexo 1)

4.2 SELEÇÃO DOS PACIENTES

Seis pacientes de um hospital oncológico referência em São Paulo, foram selecionados para este estudo, dentre eles quatro homens e duas mulheres, seguindo os seguintes critérios de inclusão: Diagnóstico anatomopatológico confirmado de metástase hepática por câncer colorretal; submetidos à segmentectomia hepática; concordado em participar do estudo

através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (CEP 1950/14) (Anexo 2).

4.3 CONFECÇÃO DO XENOENXERTO

O fragmento tumoral foi proveniente de paciente, adquirido de amostra cirúrgica no momento em que a peça foi levada à patologia. O meio utilizado para transportar a amostra tumoral desde a centro cirúrgico até o biotério, foi *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mantido em um frasco fechado dentro de um isopor com gelo para manter a temperatura baixa. O tempo entre a coleta do fragmento até o momento da implantação, não excedia 1 (uma) hora.

Preparação do tecido tumoral do paciente para confecção de xenoenxerto para transplante:

- (i) Preparo da área de trabalho através da desinfecção de todas as superfícies da capela de fluxo laminar com A-33;
- (ii) Preparo da placa de Petri com solução de penicilina / estreptomicina, em uma diluição de 1:100 em meio HBSS;
- (iii) Animais anestesiados com solução de Ketamina/Xilazina (100mg/kg e 10mg/Kg, respectivamente) aguardando a completa sedação dos mesmos;
- (iv) Tumor transferido a uma placa de Petri estéril com HBSS e penicilina/estreptomicina;

- (v) Com auxílio de um bisturi, o tumor foi cortado em fragmentos que não ultrapassaram 1mm^3 , descartando regiões de necrose.

✓ **Transplante:**

- (i) Os camundongos anestesiados foram posicionados em decúbito dorsal (Figura 1a). Para confirmar a profundidade do plano anestésico, a região distal do membro posterior foi levemente pressionada. O procedimento prosseguia quando resposta de chute era negativa;
- (ii) Realizado antissepsia cirúrgica com iodo 2%;
- (iii) Realizado uma pequena incisão horizontal de 15 mm de comprimento, pré-retro umbilical, fazendo uso de pinças e tesouras oftálmicas;
- (iv) Dois fragmentos tumorais foram inseridos com auxílio de agulha coaxial de biópsia percutânea, perfurando e introduzindo as amostras no mesmo local do parênquima hepático, correspondente ao lobo lateral esquerdo (Figura 1b);
- (vi) O local da incisão foi fechado com sutura padrão simples separado com fio não absorvível sintético. Após o procedimento, os animais receberam analgesia com tramadol na dose de 2mg/kg por via intramuscular e monitorados até a completa recuperação da anestesia em manta aquecida. Os animais foram mantidos nos microisoladores, os quais poderiam conter até 5 camundongos, todos devidamente identificados e diariamente avaliados.

Os animais foram monitorados semanalmente até o momento em que houve perda excessiva de peso (35% perda), anorexia (perda total do apetite) e/ou hipodipsia (diminuição da ingestão de água) correlacionada com desidratação. Neste momento, foi realizado o último exame ultrassonográfico e eutanásia seguida de necrópsia para coleta de material.

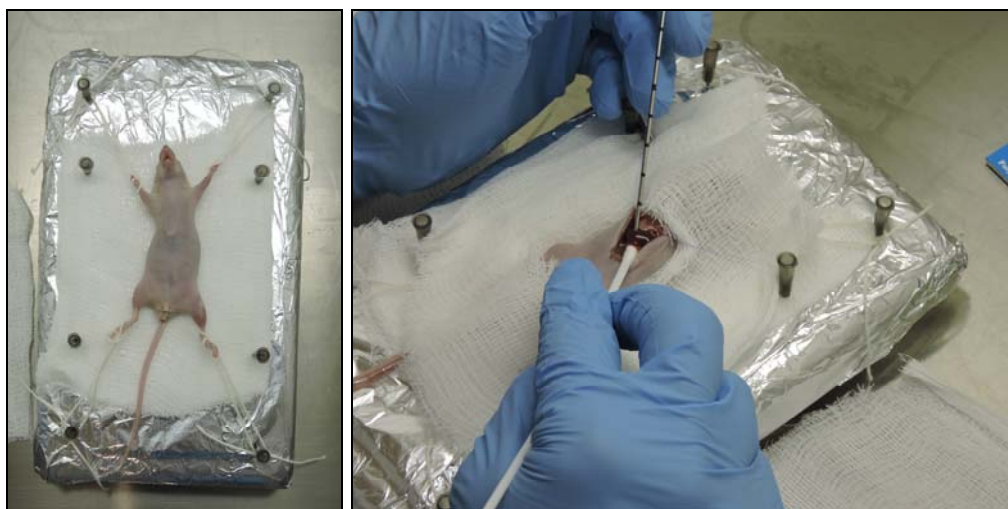


Figura 1 – Implantação de fragmento tumoral em camundongo nude (a) camundongo nude anestesiado e posicionado em decúbito dorsal; (b) fragmento de tumor sendo inserido no parênquima hepático do camundongo nude, com auxílio de agulha coaxial de biópsia percutânea.

4.4 AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA

Para a imagem ultrassonográfica foi utilizado o aparelho ultrassonográfico *My Lab Gamma* (Esaote *Healthcare* do Brasil, São Paulo). Seu transdutor linear apresenta uma frequência que varia de 4MHz até 13MHz e com campo de visão de até 50 milímetros, o que o torna mais adequado para avaliação precisa do parênquima hepático de camundongos. Para este estudo foi utilizado a frequência de 13MHz e intervalo de 30 dias

entre os exames ultrassonográficos, em virtude ao tempo de evolução dos tumores implantados o qual variou entre 43 a 294 dias.

- (i) Os animais foram submetidos à contenção química (quetamina e xilazina 100mg/kg e 10mg/Kg, respectivamente por via intra-peritoneal) (Figura 2a);
- (ii) Acomodados no interior da capela de fluxo laminar, sob uma gaze cirúrgica autoclavada, posicionados em decúbito dorsal, paralelo e à direita do aparelho ultrassonográfico de modo que todo o lado direito do camundongo ficasse mais próximo do operador (Figura 2b);
- (iii) Foi utilizado gel ultrassônico em temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) sob o ventre do animal em uma espessura de aproximadamente 1cm;
- (iv) O transdutor foi inicialmente posicionado paralelo ao animal, com a sua marcação luminosa apontada para o crânio. Na sequência uma varredura em leque, no sentido direito – esquerdo, foi realizada conferindo-lhe cortes sagitais do parênquima hepático;
- (v) Posterior a toda varredura acima descrita, o transdutor foi posicionado transversalmente ao animal, com a identificação luminosa voltara para a face direita do animal, e nova varredura, no sentido craniocaudal, por todo parênquima foi realizada;
- (vi) As imagens apareciam desde pequena área sutilmente hipoecogênica (Figura 3a) em relação ao parênquima adjacente com contornos imprecisos, caracterizadas como áreas de cicatrização tecidual, até formações sólidas, hipoecogênicas heterogêneas, contornos definidos e irregulares caracterizadas como neoplasia (Figura 3b);

- (vii) Os animais foram ultrassonograficamente caracterizados positivos na presença de uma ou mais lesões hepáticas ou negativo quando ausência de imagens nodulares. Não sendo levado em consideração neste trabalho a quantidade e localização das neoformações;
- (viii) As mensurações foram feitas em centímetros utilizando comprimento (eixo longitudinal do fígado em distância craniocaudal) e altura (eixo longitudinal do fígado em distância ventrodorsal).



Figura 2 - Exame ultrassonográfico. (a) anestésico dissociativo sendo aplicado por via intra-peritoneal em camundongo nude; (b) realização do exame ultrassonográfico abdominal em camundongo nude.

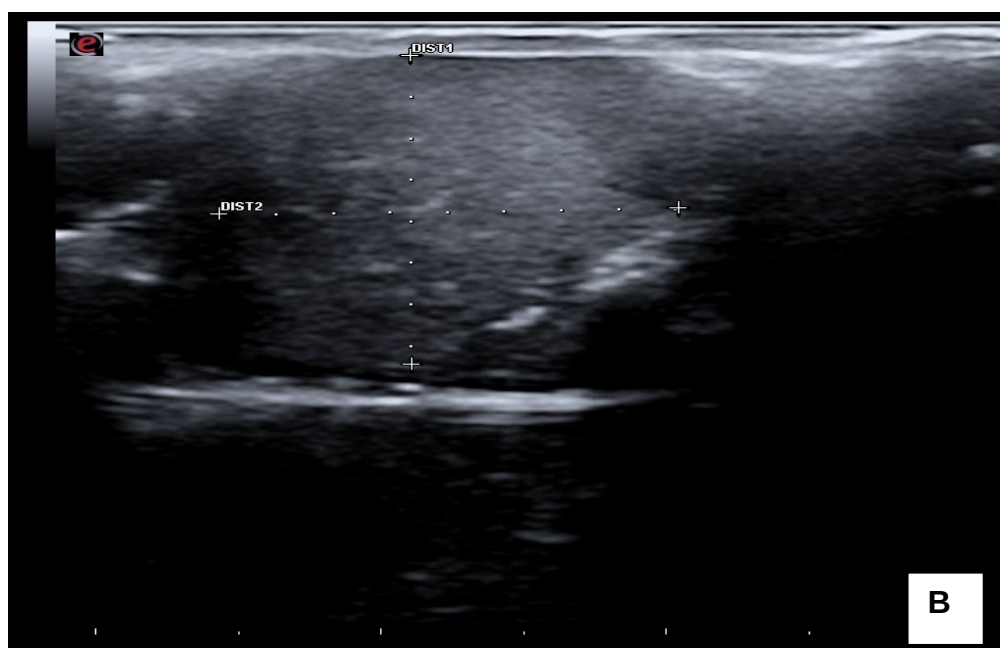
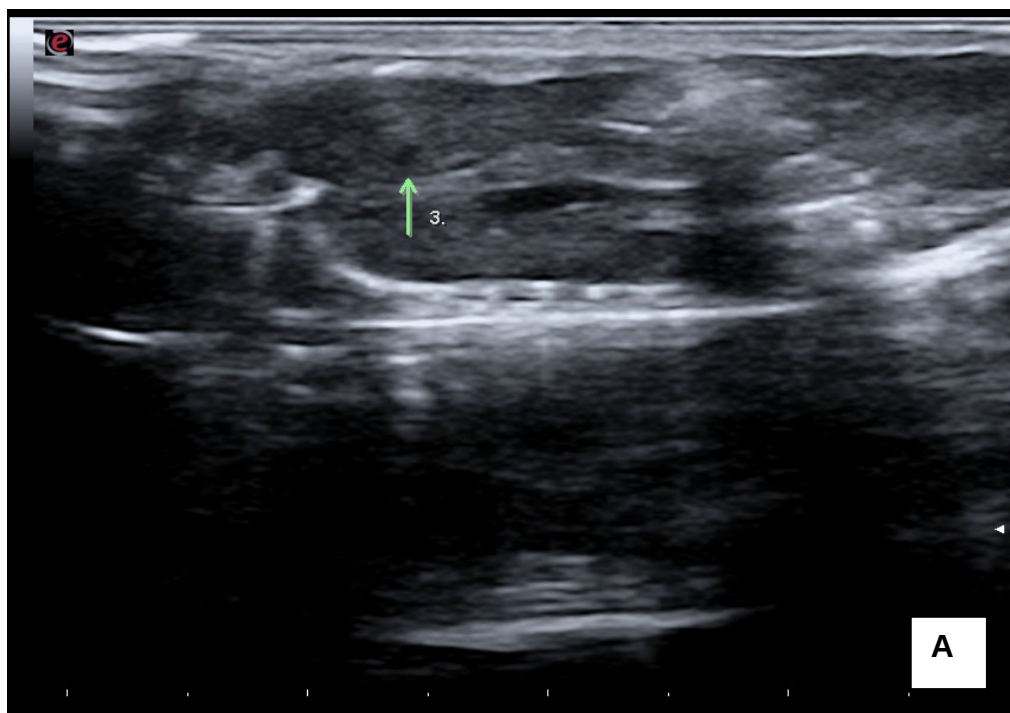


Figura 3 - Imagens ultrassonográficas (a) - Imagem ultrassonográfica de pequena formação hipoeecogênica homogênea entremeada ao parênquima hepático, medindo 1,2mm de comprimento em eixo longitudinal. (b) - grande formação sólida, ecogênica heterogênea, ocupando grande parte do parênquima hepático, medindo 17,1mm de comprimento em eixo longitudinal (distância 2).

4.5 EUTANÁSIA

Os critérios para se realizar a eutanásia nos camundongos foram os seguintes: apresentar alguma neoformação hepática através do exame ultrassonográfico; compartilhar o mesmo microisoladores de pelo menos um considerado positivo pela ultrassonografia; apresentar-se clinicamente apático ou desnutrido; exceder 1 ano dentro do estudo. Para tal procedimento administrou-se, em cada camundongo, uma maior dose de quetamina e xilazina a fim de promover depressão respiratória e consequente eutanásia dos mesmos.

4.6 ESTUDO ANATOMOPATOLÓGICO

Os animais foram submetidos à necrópsia para dissecação hepática e posterior avaliação macroscópica a fim de correlacionar com os achados ultrassonográficos. À macroscopia, uma pequena imagem esbranquiçada no local da implantação tumoral era visibilizada naqueles parênquimas que apresentaram, ao método ultrassonográfico, uma imagem não nodular, sutilmente hipoecogênica no mesmo local do implante tumoral caracterizadas como áreas de cicatrização. Todas as neoplasias sólidas ao método ultrassonográfico, também foram caracterizadas como sólidas à macroscopia. Em seguida os parênquimas hepáticos foram encaminhados para análise histopatológica com diagnóstico confirmado de carcinoma

padrão colorretal corado por *hematoxilia eosina*, realizado pela Dra Maria Dirlei Begnami e Dra Patrícia Peresi patologista desta instituição.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística foi utilizada tabela cruzada, correlacionando os resultados obtidos pela ultrassonografia com os achados macroscópicos.

5 RESULTADOS

5.1 EVOLUÇÃO DA POPULAÇÃO

Dos 42 animais implantados, 4 evoluíram a óbito decorrente de complicações anestésicas relacionadas a hipotensão e hipotermia refratária, imediatamente após o xenoenxerto ortotópico e 38 sobreviveram e fizeram parte deste estudo.

5.2 TUMORES PRESENTES NA AMOSTRA

A análise anatomopatológica pós óbito e dissecação demonstrou que tumores hepáticos se desenvolveram em 11 (28,9%) dos 38 animais da população (Tabela 1).

5.3 ACHADOS MACROSCÓPICOS

Dos 38 camundongos estudados, somente 11 apresentaram uma ou mais neoformações em parênquima hepático à macroscopia, totalizando um percentual válido de 28,9% da amostra total, e consequentemente, 71,1% foi considerado negativo por não exibirem alterações macroscópicas (Tabela 1). As neoformações hepáticas apareceram em diferentes aspectos morfológicos, dentre eles: difuso, multifocal e único (Figura 4).

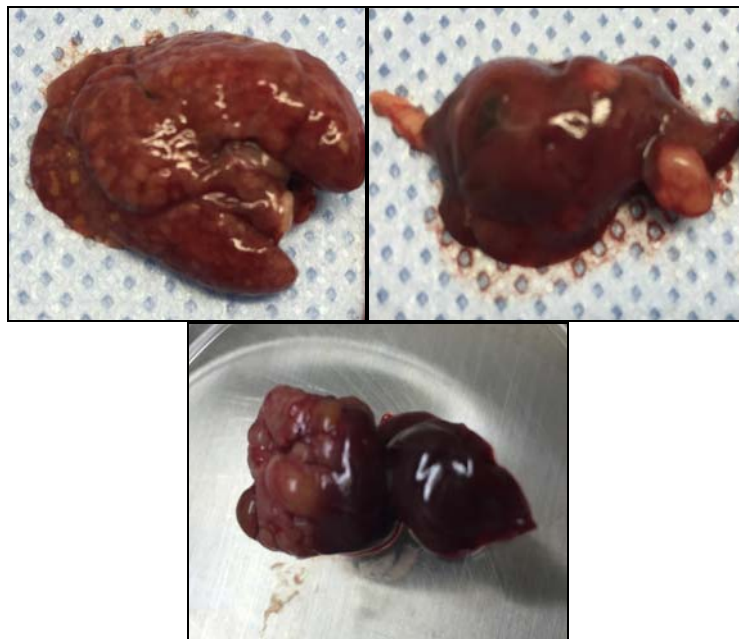


Figura 4 - Todo órgão hepático de camundongos, removido, com presença de neoplasias morfológicamente variadas: (a) difusa, (b) multifocal e (c) única.

5.4 ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS

Das 38 amostras hepáticas enviadas para análise histopatológica 11 (28,9%) foram confirmadas a presença de câncer colorretal decorrente do crescimento tumoral pós implantação e em 27 (71,1%) não foram encontradas células neoplásicas (Tabela 1).

5.5 DETECÇÃO PELA ULTRASSONOGRAFIA

A avaliação ultrassonográfica foi realizada em 38 camundongos, dentre eles 19 (50%) apresentaram o parênquima hepático homogêneo e normoecogênico, nos quais também não se detectou evolução de tumores através da análise anatomopatológica (Figura 5). Os outros 19 animais

(50%) apresentaram pelo menos uma neoformação a este método diagnóstico, com dimensões variando entre 1,2mm e 17,1mm no comprimento do seu eixo longitudinal. As neoformações apresentaram três aspectos diferentes:

- a) Não-nodular, hipoecogênica, ecotextura homogênea e com contornos pouco precisos, com dimensões inferiores a 3mm, compatível com área de cicatrização tecidual, sendo visualizadas em 8 (oito) camundongos histologicamente negativos. Esses achados não apresentaram evolução morfológica aos exames ultrassonográficos seriados e foram compatíveis com áreas de cicatrização tecidual, os quais mediram até 2,8mm em eixo longitudinal, distância craniocaudal.
- b) Formações sólidas com dimensões acima de 3mm visualizadas em 11 animais histologicamente positivos, das quais:
 - ✓ 8 Formações apresentavam aspecto hipoecogênico, ecotextura finamente grosseira e contornos precisos, com dimensões a partir de 3mm;
 - ✓ 3 Formações apresentaram aspecto predominantemente hipoecogênico, ecotextura heterogênea, destacando pequenas áreas puntiformes hiperecogênica esparsas (mineralização), contornos definidos e irregulares, com dimensões acima de 10mm

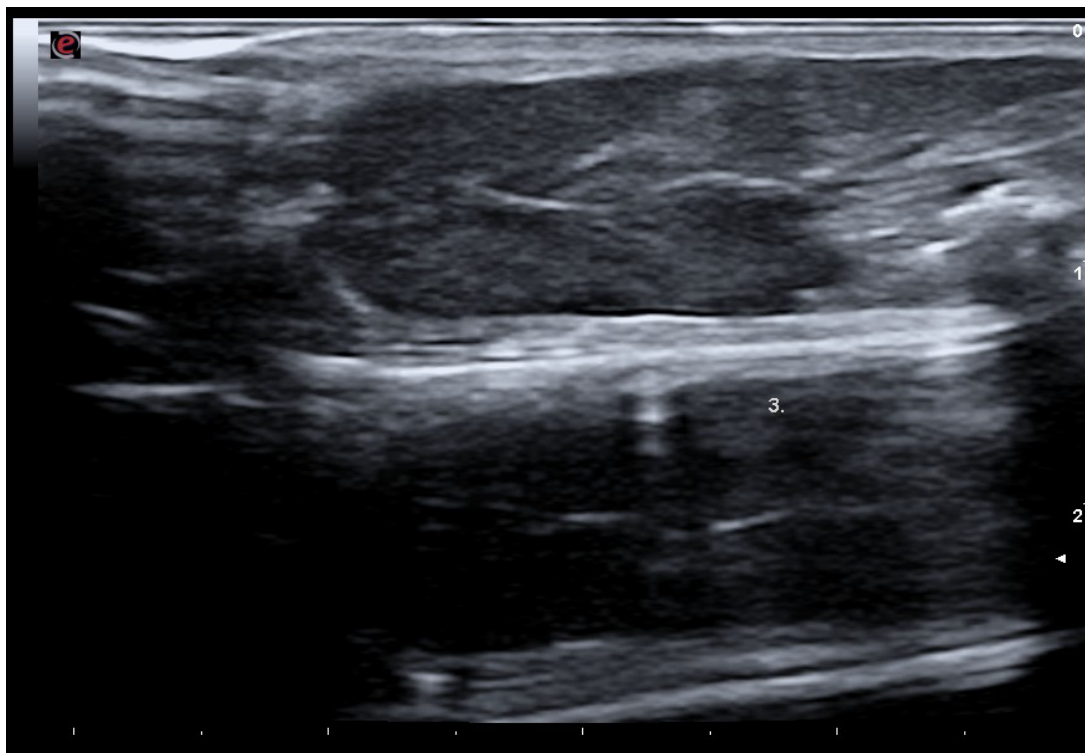


Figura 5 - Imagem ultrassonográfica de um parênquima hepático normoecogênico homogêneo.

5.6 DIMENSÕES

Oito animais apresentaram achados ultrassonográficos compatíveis com áreas de cicatrização tecidual, os quais mediram até 2,8mm em eixo longitudinal - distância craniocaudal, não apresentando progressão do seu tamanho ao longo dos exames seriados, enquanto que 11 (onze) apresentaram formações sólidas com dimensões acima de 3mm e crescimento progressivo.

As medidas, em maior eixo, dos tumores únicos e do tumor com maior dimensão quando múltiplos em mesmo parênquima, encontrados pelo método ultrassonográfico foram listados na tabela a baixo (Quadro 1), com média de 6,97mm e mediana de 4,90mm.

Quadro 1 - Medida referente ao maior eixo tumoral visualizado através do método ultrassonográfico

Camundongo	mm	Camundongo	mm	Camundongo	mm	Camundongo	mm
1	1,3	6	2,4	11	5,0	16	12,8
2	1,4	7	2,6	12	10,5	17	14,2
3	1,4	8	2,8	13	10,9	18	14,2
4	1,5	9	3,1	14	12,0	19	17,1
5	2,2	10	4,9	15	12,3		

5.7 TEMPO DE CRESCIMENTO TUMORAL

O tempo de crescimento tumoral após a implantação da amostra obtida de paciente variou de 43 a 294 dias, em virtude a heterogeneidade do fragmento tumoral. As áreas de cicatrização do parênquima hepático no local da implantação do tecido variou de 14 a 21 dias

5.8 ACURÁCIA

A capacidade da ultrassonografia em identificar os verdadeiros positivos para neoplasia nos indivíduos verdadeiramente doentes foi de 100%.

A capacidade da ultrassonografia em identificar os verdadeiros negativos para neoplasia nos indivíduos verdadeiramente sadios foi de 100%. De 27 animais macroscopicamente negativos para neoplasia hepática 19 foram caracterizados negativos por ausência de qualquer tipo de imagem ultrassonográfica em parênquima hepático e 8 foram caracterizados negativos por este método, por apresentarem no local de implantação, uma

imagem sonográfica não nodular, hipoeecogênica, com ecotextura homogênea e com contornos pouco precisos e dimensões inferiores a 3mm.

A proporção de positivos na macroscopia e os camundongos positivos na ultrassonografia foi de 100%. A proporção de sadios (negativo a macroscopia) entre os negativos pelo teste foi de 100% (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição conjunta de ultrassonografia segundo a macroscopia.

			Resultado macroscopia		
			Negativo	Positivo	Total
Detecção USG	Negativo	Contagem	27	0	27
		% detecção USG	100,0%	0,0%	100,0%
		% macroscopia	100,0%	0,0%	71,1%
	Positivo	Contagem	0	11	11
		% detecção USG	0,0%	100,0%	100,0%
		% macroscopia	0,0%	100,0%	28,9%
Total		Contagem	27	11	38
		% detecção USG	71,1%	28,9%	100,0%
		% macroscopia	100,0%	100,0%	100,0%

5.9 TAXA DE SUCESSO POR AMOSTRA DE PACIENTE

O número de camundongos por amostra de paciente variou entre 3 até 10 animais, e a taxa de sucesso de implantação por amostra tumoral variou de 0 – 100%, confirmadas através da análise anatomopatológica, como demonstrado na tabela a seguir (Quadro 2). Essa variação é observada neste estudo, devido a heterogeneidade do fragmento tumoral implantado. Tais fragmentos, foram obtidos a partir de amostras cirúrgicas, de pacientes previamente expostos a pelo menos 6 (seis) ciclos

quimioterápicos, os quais apresentaram maiores taxas de necrose, fibrose, calcificações e infiltrados inflamatórios.

Quadro 2 - Quantidade de camundongo por amostra de paciente e respectivas taxas de sucesso no crescimento tumoral

Paciente	Animais	Taxa de sucesso (%) implantação por paciente	Ultrassom		Macroscópico	
			Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Paciente 1	Camundongo 1	100%	X		X	
	Camundongo 2		X		X	
	Camundongo 3		X		X	
	Camundongo 4		X		X	
Paciente 2	Camundongo 1*	20%		X		X
	Camundongo 2*			X		X
	Camundongo 3			X		X
	Camundongo 4		X		X	
	Camundongo 5		X		X	
	Camundongo 6			X		X
	Camundongo 7			X		X
	Camundongo 8*			X		X
	Camundongo 9			X		X
	Camundongo 10			X		X
Paciente 3	Camundongo 1	0%		X		X
	Camundongo 2			X		X
	Camundongo 3*			X		X
	Camundongo 4			X		X
	Camundongo 5*			X		X
	Camundongo 6*			X		X
	Camundongo 7*			X		X
Paciente 4	Camundongo 1	0%		X		X
	Camundongo 2			X		X
	Camundongo 3			X		X
	Camundongo 4			X		X
	Camundongo 5			X		X
Paciente 5	Camundongo 1*	56%		X		X
	Camundongo 2			X		X
	Camundongo 3			X		X
	Camundongo 4			X		X
	Camundongo 5		X		X	
	Camundongo 6		X		X	
	Camundongo 7		X		X	
	Camundongo 8		X		X	
	Camundongo 9		X		X	
Paciente 6	Camundongo 1	0%		X		X
	Camundongo 2			X		X
	Camundongo 3			X		X

*camundongos que apresentaram imagens ultrassonográficas não nodulares, compatíveis com área de cicatrização, em região de implantação tumoral.

6 DISCUSSÃO

A opção pelo modelo do implante tumoral ortotópico (PDOX) em camundongos imunodeficientes deu-se em razão do comportamento metastático e invasivo do tumor, mimetizando o câncer do paciente, modelo este que foi primeiramente descrito por FU et al. (1991). Tal modelo trouxe à luz um antigo paradigma: a utilização de camundongos imunodeficientes para implantação de tumores de pacientes. RYGAARD e POVLSEN (1969), introduziram esse conceito que tornar-se-ia ponte entre a pesquisa básica e a pesquisa clínica. Durante sete anos um fragmento tumoral de câncer colorretal fora implantado no subcutâneo de camundongo nude e submetido a 76 passagens tumorais. Os tumores cresceram como nódulos encapsulados e não desenvolveram a capacidade de se metastatizar. A necessidade de desenvolver modelos capazes de personalizar os tratamentos contra o câncer, permitiu que a pesquisa iniciada há pouco menos de 50 anos, fosse conduzida por outros grupos ao longo do tempo. Em outubro de 2014, a revista *Science* em reportagem de capa, emerge este assunto destacando que “Para fazer camundongos melhores espelhos do câncer humano, pesquisadores estão construindo avatares com o próprio tumor do paciente”, demonstrando a relevância deste modelo no cenário atual (FRANKEL 2014).

A ideia do modelo avatar leva em consideração a ausência de resposta imunológica do camundongo permitindo a implantação de um

fragmento tumoral humano. O modelo ortotópico por sua vez, permite que o microambiente tumoral no local implantado seja semelhante ao microambiente de onde o fragmento fora removido, neste caso, o fígado. A introdução de fragmentos tumorais dentro do parênquima hepático de camundongos nude, leva o animal a quadros de hipotensão aumentando seu sinergismo com os efeitos hipotensores da anestesia. Os quatro óbitos ocorridos durante a fase experimental do estudo foram atribuídos a hipotensão severa causada pela introdução do fragmento tumoral dentro do parênquima hepático, somados aos efeitos do *alfa-2* agonista (xilazina), reconhecidamente hipotensor. O estudo ultrassonográfico realizado por GRAHAM et al. (2005) utilizando transdutor de alta frequência (40 MHz) na avaliação de tumores hepáticos em camundongos submetidos a injeção ortotópica de linhagem celular, demonstrou alta sensibilidade na detecção de micro nodulações, corroborando com o presente trabalho que apresentou 100% de sensibilidade e especificidade. A utilização de transdutor de 13MHz no mapeamento hepático demonstrou-se viável, dentro do cenário que inclui um operador adaptado com este aparelho. Esses achados corroboram com COATNEY (2001) que descreve a capacidade de penetração da onda sonora em 3 a 4 cm, utilizando transdutores de 10 MHz. Contudo, transdutores de alta frequência (40-60 MHz) são vastamente utilizados em pesquisas que envolvem camundongos, dada sua baixa capacidade de penetração (1 - 2cm) e consequentemente maior detalhamento da imagem. A ausência de um estudo interobservador e a não utilização de um transdutor de alta frequência, capaz de promover melhor detalhamento das

lesões hepáticas, foram as principais limitações neste estudo. Vale ressaltar também como limitação, a não utilização de um transdutor de alta frequência, capaz de promover melhor detalhamento das lesões hepáticas. Ainda, no que concerne a limitações deste estudo, todos os pacientes foram submetidos a pelo menos seis ciclos de quimioterapia antes do procedimento cirúrgico. Diante disto, há um aumento de tecido fibrótico e necrótico na amostra implicando negativamente o desenvolvimento tumoral no camundongo. O número de animais utilizado por amostra tumoral de paciente também sofreu influência de acordo com a viabilidade do tecido implantado variando de 3 a 10 animais por paciente. Os critérios utilizados na confecção do fragmento tumoral se basearam em aspectos macroscópicos da amostra, removendo com auxílio de bisturi as regiões de tecido friável, não havendo, nesse estudo, análise microscópica da lesão por congelamento, imediatamente após a sua ressecção cirúrgica, o que reduziria a falha do enxerto e diminuiria o tempo de crescimento observado neste experimento. O intervalo de trinta dias foi adotado levando em consideração o tempo de evolução dos tumores implantados que variou entre 43 a 294 dias no presente estudo. Tal variação pode ser explicada pela heterogeneidade tumoral. No contexto da biologia tumoral as metástases podem apresentar diferentes graus de celularidade, necrose e fibrose em seu interior, de acordo com seu tipo histológico e perfil molecular. A eutanásia foi realizada em todos os animais da mesma caixa, quando pelo menos um apresentasse seu diagnóstico tumoral confirmado pelo exame ultrassonográfico, procedimento este também adotado por GRAHAM et al

(2005). Ainda, segundo o autor, tal conduta minimiza falsos negativos e melhora a acurácia do exame. Os achados macroscópicos evidenciaram a presença de nódulos tumorais em fígado de onze animais, todos com seu diagnóstico confirmado pelo exame histopatológico. Os 8 animais que apresentaram lesões inferiores a 3mm em seu maior eixo - comprimento em eixo longitudinal distância craniocaudal ao método ultrassonográfico – foram posteriormente confirmados como áreas de cicatrização hepática em região de implantação tumoral. Considerando o fato de que todas as áreas de cicatrização não excederam 3mm em avaliações ultrassonográficas seriadas, torna-se importante a validação dessa informação em estudos posteriores, a fim de estabelecer um valor de corte. Todos os camundongos ultrassonograficamente positivos para neoplasia hepática, fizeram exames seriados para acompanhamento do crescimento tumoral, tiveram seu diagnóstico tumoral confirmado através da análise anatomopatológica, concluindo que a ultrassonografia é um método altamente sensível. Os demais camundongos utilizados nesse estudo foram considerados negativos através do método ultrassonográfico, por apresentaram parênquima com ecotextura e ecogenicidade habituais ou, também, pela presença de uma imagem não nodular, hipoecogênica homogênea no local da implantação tumoral, a qual não evoluía em análises ultrassonográficas seriadas, resultados estes, confirmados pelos achados anatomopatológicos. As características ultrassonográficas das neoformações hepáticas quando analisadas isoladamente em um exame pontual, não é capaz de fazer a diferenciação entre uma área de cicatrização

e neoplasia em fase inicial, por esse motivo foi possível concluir que a ultrassonografia só é um método altamente sensível e específico quando a avaliação for realizada evolutivamente.

7 CONCLUSÃO

O exame ultrassonográfico é um método viável e não invasivo, para avaliar parênquima hepático de camundongos nude. Nesse estudo, o método obteve 100% de sensibilidade e especificidade na detecção e caracterização de lesões nodulares em parênquima hepático.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ayers GD, McKinley ET, Zhao P, et al. Volume of preclinical xenograft tumors is more accurately assessed by ultrasound imaging than manual caliper measurements. **J Ultrasound Med** 2010; 29:891-901.

Barberet V, Saunders JH. Ultrasonographic examination of selected small structures in dogs and cats: thyroid glands, lymph nodes and adrenal glands. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift** 2010; 79:147-55.

Cheung AM, Brown AS, Hastie LA, et al. Three-dimensional ultrasound biomicroscopy for xenograft growth analysis. **Ultrasound Med Biol** 2005; 31:865-70.

Coatney RW. Ultrasound imaging: principles and applications in rodent research. **ILAR J** 2001; 42:233-47.

Czarnota GJ, Kolios MC, Abraham J, et al. Ultrasound imaging of apoptosis: high-resolution non-invasive monitoring of programmed cell death in vitro, in situ and in vivo. **Br J Cancer** 1999, 81:520-7.

Frankel JC, The littlest patient. **Science** 2014; 346:p.24-7.

Foster FS, Pavlin CJ, Harasiewicz KA, Christopher DA, Turnvull DH. Advances in ultrasound biomicroscopy. **Ultrasound Med Biol** 2000; 26:1-27.

Foster FS, Zhang MY, Zhou YQ, et al. A new ultrasound instrument for *in vivo* microimaging of mice. **Ultrasound Med & Biol** 2002 28:1165-72.

Fu XY, Besterman JM, Monosov A, Hoffman RM. Models of human metastatic colon cancer in nude mice orthotopically constructed by using

histologically intact patient specimens. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1991; 88:9345-9.

Golgas D. Physical principles. In: Barr F, Gaschen L, editors. **Manual of canine and feline ultrasonography**. Quedgeley: British Small Animal Association; 2011. p.1-14.

Goldberg BB, Kimmelman BA. **Medical diagnostic ultrasound: a retrospective on its 40th anniversary**. Rochester, NY: Eastman Kodak Company; 1988.

Graham KC, Wirtzfeld LA, MacKenzie LT, et al. Three-dimensional high-frequency ultrasound imaging for longitudinal evaluation of liver metastases in preclinical models. **Cancer Res** 2005; 65:5231-7.

Hidalgo M, Amant F, Biankin AV, et al. Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. **Cancer Discov** 2014; 4:998-1013.

Hoffman RM. Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic. **Invest New Drugs** 1999; 17:343-59.

Hoffman RM. Patient-derived orthotopic xenografts: better mimic of metastasis than subcutaneous xenografts. **Nat Rev Cancer** 2015; 15:451-2.

Kircher P, Patrick R. Equipment. In: Barr F, Gaschen L, editors. **Manual of canine and feline ultrasonography**. Quedgeley: British Small Animal Association; 2011. p.15-20.

Kubota T. Metastatic models of human cancer xenografted in the nude mouse: the importance of orthotopic transplantation. **J Cell Biochem** 1994; 56:4-8.

Lindahl IL. Detection of pregnancy in sheep by means of ultrasound. **Nature** 1966; 212:642-3.

Mattoon JS, Nyland TG. **Small animal diagnostic ultrasound**. 3rd ed. Missouri: Elsevier Saunders; 2005. Fundamentals of diagnostic ultrasound; p.1-49.

Mould RF. Pierre Curie 1859-1906. **Curr Oncol** 2007; 19:74-82.

Murakami T, Zhang Y, Wang X, et al. Orthotopic implantation of intact tumor tissue leads to metastasis of OCUM-2MD3 human gastric cancer in nude mice visualized in real time by intravital fluorescence imaging. **Anticancer Res** 2016; 36:2125-30.

Oh BY, Hong HK, Lee, WY, Cho YB. Animal models of colorrectal cancer with liver metastasis. **Cancer Lett** 2017; 387:114-20.

Rademacher N. Liver. In: Barr F. Gaschen L, editor. **Manual of canine and feline ultrasonography**. Quedgeley: British Small Animal Association; 2011. p.85-99.

Rygaard J, Povlsen CO. Heterotransplantation of a human malignant tumor to 'nude' mice. **Acta Pathol Microbiol Scand** 1969; 77:758-60.

Springer DA, Allen M, Hoffman V, et al. Investigation and identification of etiologies involved in the development of acquired hydronephrosis in aged laboratory mice with the use of high-frequency ultrasound imaging. **Pathobiol Aging Age Relat Dis** 2014 Aug 1; 4.

Tanaka N, Dalton N, Mao L, et al. Transthoracic echocardiography in models of cardiac disease in the mouse. **Circulation** 1996; 94:1109-17.

Turnbull DH, Bloomfield TS, Foster FS, Joyner AL. Ultrasound backscatter microscope analysis of early mouse embryonic brain development. **Proc Natl Acad Sci** 1995; 92:2239-43.

Turnbull DH, Ramsay JA, Shivji GS, et al. Ultrasound backscatter microscope analysis of mouse melanoma progression. **Ultrasound Med Biol** 1996; 22:845-53.

Walk EL, McLaughlin S, Coad J, Weed SA. Use of high frequency ultrasound to monitor cervical lymph node alterations in mice. **PLoS One** 2014; 9:e100185.

Wang WR, Sordat B, Piguet D, Sordat M. Human colon tumors in nude mice: implantation site and expression of the invasive phenotype. Sordat B, editor. **Immune-deficient animals**. Basel: Karger; 1982. p.239-45. [4th International Workshop on Immune-Deficient Animals in Experimental Research (formerly Nude Mice Workshop), Chexbres, October 31-November 3, 1982]

Weissleder R. Scaling down imaging: molecular mapping of cancer in mice. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:11-8.

**Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Animais-
CEUA**



**A.C. Camargo
Cancer Center**

São Paulo, 24 de agosto de 2015.

Ao Dr. Rubens Chojniak

Ref.: Projeto de Pesquisa no. 065/14A

Titulo: **"Avaliação evolutiva de metástases implantadas em comundongos nude através da ultrassonografia"**

Prezado (a) Doutor (a)

O projeto de pesquisa acima mencionado, foi apreciado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center em sua reunião do dia 14 de agosto de 2015. Os membros desta comissão consideraram **aprovada** a utilização de 10 animais NUDE para a realização deste projeto de pesquisa.

Pesquisador responsável: Dr. Rubens Chojniak

Aluna: Caroline Correa de Tullio Augusto

Atenciosamente,

Dra. Gláucia Hajj
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais