

TUMORES EXPERIMENTAIS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Padronização de modelo em roedores utilizando a linhagem 9L

Custódio Michailowsky¹, Flávio Key Miura¹, Ângela C. do Valle², Shigueko Sonohara³, Thales D'Alessandro Meneguini⁴, Ana Maria C. Tsanaclis⁵

RESUMO – Grande variedade de modelos experimentais foram estabelecidos em neuro-oncologia durante as últimas décadas, a fim de estudar a biologia tumoral e a eficiência de novas drogas e novos tratamentos em gliomas malignos humanos. Embora estes modelos estejam bem caracterizados e sejam facilmente reproduzíveis e aplicáveis, há limitações quanto ao seu uso e à resposta obtida, principalmente quando utilizados para monitorização de tratamentos. A proposta deste estudo é padronizar modelo de tumor cerebral glial experimental e detectar variáveis que possam influenciar o seu desenvolvimento. Células 9L foram inoculadas na substância branca do cérebro em 48 ratos machos Sprague-Dawley; destes, 25 animais receberam eletrodos corticais para realização de eletroencefalografia. Os animais eram avaliados diariamente por observação neurológica. Vinte e quatro ratos desenvolveram tumor – 10 animais morreram ou no pós-operatório imediato ou durante a evolução; 14 animais não desenvolveram tumor. Macroscopicamente, o tumor parecia bem delimitado; características de malignidade e extensa infiltração foram observadas à microscopia de luz; o diagnóstico foi o de astrocitoma maligno. A utilização de técnica estereotáxica e a infusão de pequeno volume de suspensão celular por um tempo longo de infusão foram considerados importantes para o bom desenvolvimento do tumor. Procedimentos que merecem atenção são: contagem precisa das células na câmara de Neubauer, agitação constante da suspensão de células a serem inoculadas e fixação precisa da profundidade de inoculação. O modelo experimental desenvolvido no presente trabalho mostrou ser de execução relativamente fácil, com custo razoável e reprodutível.

PALAVRA-CHAVE: Glioma 9L, neoplasia cerebral experimental, ratos Sprague-Dawley, técnica de inoculação de tumores experimentais, tumores cerebrais.

Experimental tumors of the central nervous system: standardisation of a model in rats using the 9L glioma cells

ABSTRACT – A number of experimental models have been established during the last decades in order to study tumor biology and the effects of treatment or manipulation of the microenvironment of malignant glial tumors. Even though those models have been well characterised and are, to a certain extent, easily reproducible, there are limitations as to their use and to the interpretation of the results. The aim of this study is to standardize a model of a malignant glial tumor and detect possible events able to modify its development. 9L cells were inoculated intracerebrally in 48 Sprague-Dawley rats; from these, 25 animals were also implanted with a device containing electrodes for the registration of the electroencephalogram. Animals were daily evaluated by neurologic examination. Twenty four animals developed tumor – 10 animals died either in the immediate post-operative period or during evolution; 14 animals did not develop tumor. Macroscopically the tumor was well demarcated from the adjacent brain; by light microscopy the tumor exhibited malignant characteristics as well as extensive infiltration of the brain parenchyma. Diagnosis was that of a malignant astrocytoma. The use of the stereotaxic frame and care to infuse a small volume of liquid containing cells during a period of 120 seconds were the most important procedures to obtain success in the model. Additional care should be taken in counting cells in the Neubauer camera and in maintaining cells in constant agitation before injecting the tumor-containing solution. The model here developed was efficient besides being of low cost and of relatively easy execution.

KEY WORDS: 9L glioma, experimental brain neoplasm, Sprague-Dawley rats, inoculation technique of experimental tumors, brain tumors.

Laboratório de Neuropatologia Experimental, Neurofisiologia Experimental e Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo SP, Brasil: ¹Médico-Pós-graduando do Departamento de Patologia; ²Professora-assistente do Laboratório de Neurofisiologia Experimental; ³Professora-assistente do Laboratório de Oncologia Experimental; ⁴Bolsista do CNPq e estudante de graduação; ⁵Docente do Departamento de Patologia. Fonte financiadora: FAPESP (para AMCT).

Recebido 8 Julho 2002, recebido na forma final 4 Outubro 2002. Aceito 23 Outubro 2002.

Dra. Ana Maria C. Tsanaclis - Departamento de Patologia - Avenida Dr. Arnaldo 455/1121 - 01246-010 São Paulo SP - Brasil.

O conhecimento incompleto da patogênese e da etiologia dos tumores malignos primários do sistema nervoso central (SNC), em humanos, faz com que a maioria de pacientes com diagnóstico destas lesões apresentem sobrevida média menor do que 1 ano¹. Por isso, modelos experimentais de gliomas são desenvolvidos em várias espécies de animais com a finalidade de estudar tanto a biologia tumoral como a resposta a várias modalidades de tratamento - terapia gênica, imunoterapia, radioterapia e quimioterapia².

O tumor cerebral mais frequente, totalizando 15-20% de todas as neoplasias intracranianas, é o glioblastoma multiforme (GBM). O GBM pode se apresentar tanto como lesão primária, denominado glioblastoma *de novo*, como também pode ser o resultado final da transformação maligna progressiva de um astrocitoma ou, mais raramente, de um oligodendroglioma³. GBM pode se manifestar em qualquer idade, mas preferencialmente afeta adultos, com pico de incidência entre 45 e 70 anos de idade, mostrando preponderância em homens de 2:1 a 3:1 em relação às mulheres^{1,4}. GBM ocorre mais frequentemente na substância branca dos hemisférios cerebrais, sendo o lobo temporal o mais acometido (31%), seguido do parietal (24%), frontal (23%) e occipital (16%)^{1,3,4}. Mesmo apresentando fatores prognósticos favoráveis, como ausência de necrose, idade jovem e ressecção cirúrgica total, apenas 5% dos pacientes sobrevivem até 5 anos^{1,3,4}. Algumas linhagens celulares de glioma em ratos foram induzidas por injeções sistêmicas ou transplacentárias de nitrosurêias; destas, as linhagens 9L e C6 são as mais empregadas para o desenvolvimento de tumores experimentais^{2,5,8}.

As células 9L foram originalmente induzidas por injeções sistêmicas semanais na dose de 5mg/ Kg de N-Nitrosometiluréia (NMU) por um período de 8 meses em ratos machos Fischer 344⁶. Esta linhagem celular cresce tanto *in vitro* como *in vivo*. Em culturas, as células apresentam tempo de duplicação entre 18 e 20 horas⁷. Os primeiros estudos experimentais desenvolveram tumores subcutâneos e intracerebrais com características de glioma maligno humano^{7,8}. A inoculação intracerebral de 4×10^4 células deve desenvolver um tumor em todos animais singênicos com um período de sobrevida médio de 23 dias; os sintomas aparecem 5 a 6 dias antes do óbito⁷. A interpretação dos resultados obtidos com os modelos experimentais deve, entretanto, ser feita levando-se em conta que o crescimento tumoral pode ser influenciado pela técnica de inoculação empregada, pela linhagem do animal e também pela origem das células^{2,9}.

Nossos objetivos neste estudo são: a) padronizar a técnica de inoculação intracerebral em ratos, utilizando células 9L (murinas) com a finalidade de desenvolver tumor cerebral; b) identificar possíveis fatores que influenciam os resultados finais deste modelo.

MÉTODOS

Células

Células 9L (doadas pelo Dr. Shusuke Moriuchi, Departamento de Neurocirurgia da Universidade de Osaka, Japão) foram cultivadas no Laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina da USP. As células foram mantidas em meio Dulbecco Modificado (Eagle) (DMEM), soro fetal bovino (SFB) a 10%, 50ig/ml de ampicilina + estreptomicina a 37°C em estufa contendo 5% CO₂.

As células foram removidas dos frascos de cultura com solução de tripsina 0,2%/EDTA 0,02% em PBS, de culturas, com confluência máxima de 90%. A viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão de tripan blue. O número de células foi contado em câmara de Neubauer. Quando da preparação para inoculação no encéfalo dos ratos, as células foram lavadas com meio DMEM sem SFB e suspensas numa concentração de 2×10^7 céls/ml e uma alíquota de 5µl (1×10^5 células) desta suspensão foi inoculada em cada animal (Fig 1A).

Animais

Utilizamos ratos machos da linhagem Sprague-Dawley adultos, provenientes de 6 casais adquiridos do Centro de Bioterismo da UNICAMP e que foram acasalados no Centro de Bioterismo da FMUSP para formação de colônias. Os animais foram tratados conforme o regulamento do próprio centro.

Após a inoculação intracerebral do tumor, os ratos permaneciam dentro ou do Laboratório de Neuropatologia Experimental do Departamento de Patologia ou do Laboratório de Neurofisiologia Experimental para observação neurológica diária.

Técnica Cirúrgica

Grupo I - Os animais eram pesados e anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de cetamina (Ketalar®; Cristália), na dose de 0,2 mg/ 100 g de peso e submetidos a tricotomia da porção superior da cabeça. A seguir, o crânio era fixado ao aparelho de estereotaxia David-Kopf pelas barras auriculares, introduzidas no conduto auditivo externo para impedir a mobilização da cabeça para os lados (Fig 1B). Uma incisão longitudinal e mediana na pele do crânio era feita com lâmina de bisturi nº 20, após assepsia com iodo tópico. Uma boa exposição da calota craniana para visualização adequada das suturas era realizada por dissecação subperiosteal com auxílio de uma rugina (Fig 1C). O orifício de trepanação selecionado era feito com uma broca (1/8") movida por motor (Fig 1D), conforme atlas estereotático para ratos de Paxinos-Watson¹⁰, a 2 mm da linha média (sutura sagital) e 2 mm posterior à

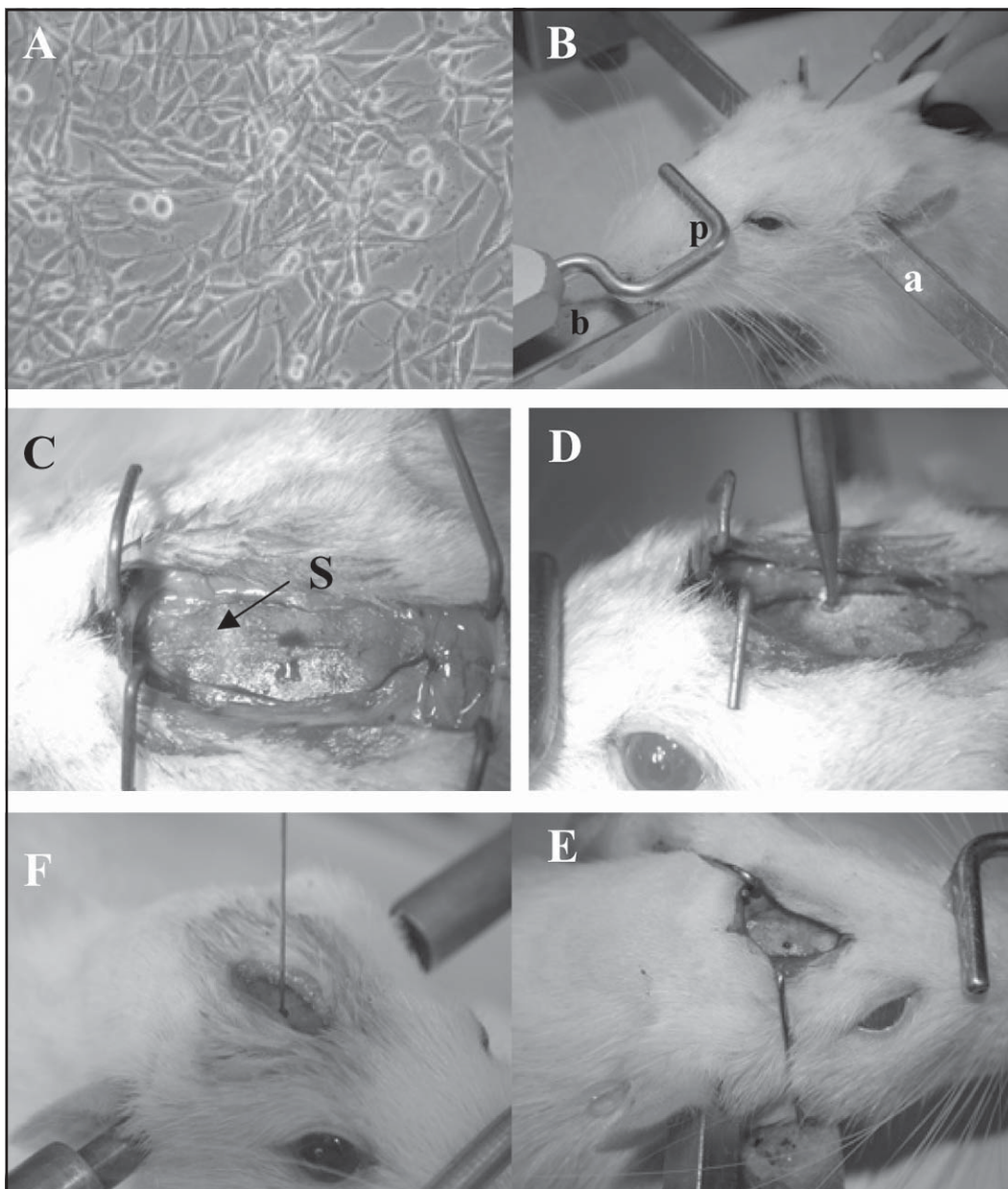


Fig 1 A) As células 9L aderidas ao fundo do frasco de cultura com confluência acima de 90%. B) A barra auricular (a) introduzida na orelha esquerda e a presilha (p) imobilizando a cabeça, impedindo movimentos verticais. O maxilar superior é mantido imóvel porque é pinçado entre a presilha superior(p) e a barra inferior (b). Utiliza-se a anestesia local afim de diminuir a dor e o sangramento. C) Exposição da calota craniana com a visualização da sutura bregmática (S) . D) Trepanação com broca elétrica na Área 3 somestésica. E) Orifício da trepanação na região parietal D. F) Ponta da seringa de Hamilton a 4mm de profundidade no córtex cerebral na área correspondente inoculando 9L.

sutura coronária, tomando-se cuidado para não lesar o córtex cerebral com a ponta da broca (Fig 1E).

Aspirava-se do tubo "Eppendorf" um volume de 5 μ l na concentração de 10⁵ células 9L, sob agitação constante, na seringa de Hamilton de 10 μ l fixada no aparelho de estereotaxia e injetada lentamente (120 segundos) na área 3 somestésica parietal D, conforme citoarquitetura de Krieg (1946) e adaptado segundo Atlas funcional de Zilles¹¹, a 4 mm de profundidade do orifício de trepanação (Fig 1 F).

Após a retirada da agulha da seringa de Hamilton, o orifício era selado com cera de osso para evitar o refluxo das células inoculadas. A sutura da pele era feita com pontos simples com fio de sutura.

Grupo II - Neste grupo, os animais receberam implantes de eletrodos corticais para registro de eletroencefalograma (EEG), conforme o protocolo do Laboratório de Neurofisiologia Experimental^{10,11}; neste dispositivo foi mantida

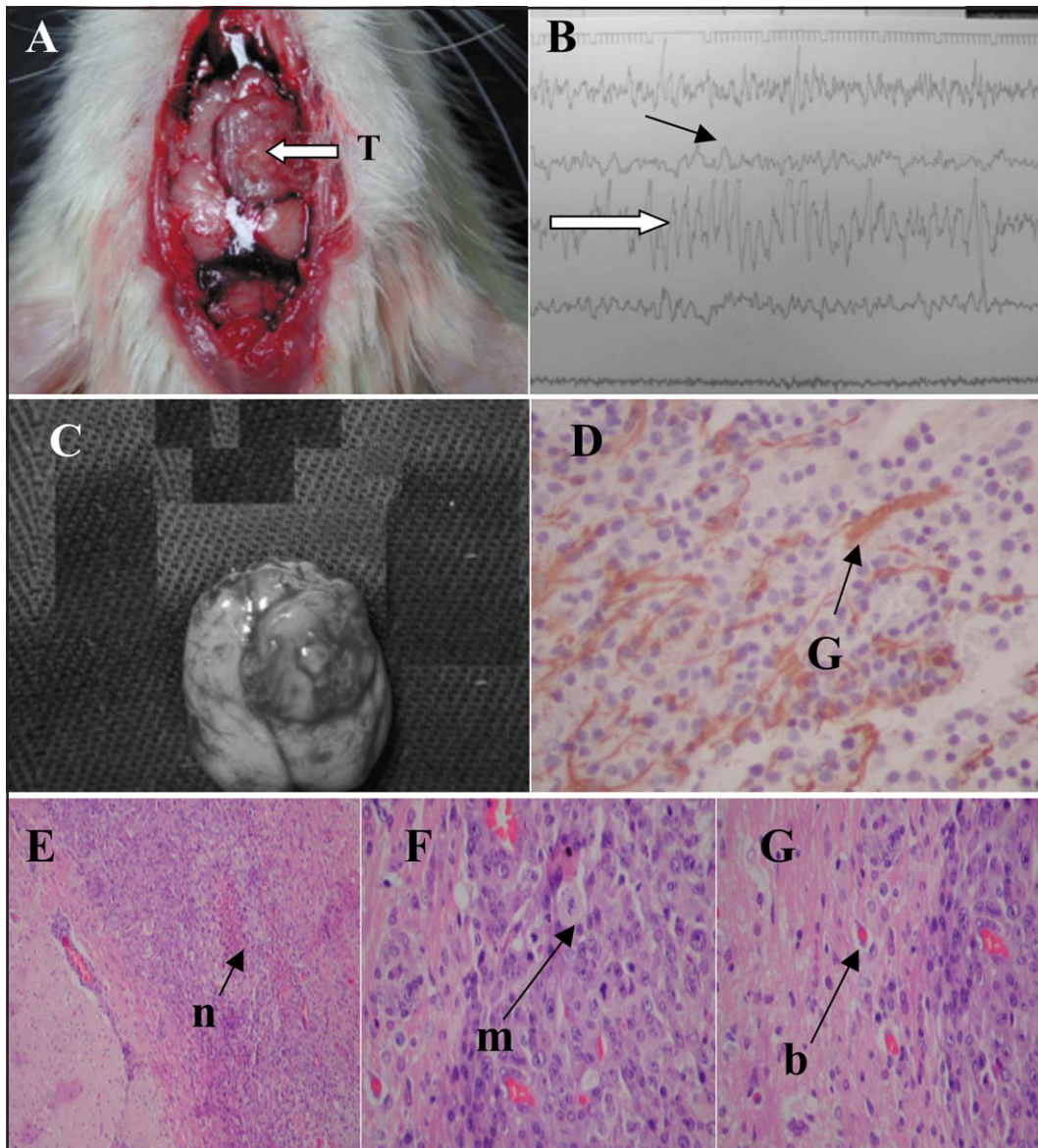


Fig 2. A) Presença de extensa lesão com componente subaracnóideo (T). B) O EEG mostrando presença de espículas-ponta -onda no hemisfério contra-lateral (seta branca) e diminuição da voltagem no hemisfério D (seta preta). C) Lesão circunscrita ao córtex, acinzentada. D) GFAP positivo (G). E) Lesão tumoral, hiper celular, presença de necrose (n). F) Mitose explosiva (m). G) Infiltração do parênquima cerebral adjacente à lesão (b).

uma cânula de inoculação lateral à saída dos eletrodos, tendo como alvo a área 3 somestésica. O processo de inoculação intracerebral das células tumorais era semelhante ao do grupo 1, exceto pela distância de penetração da ponta da agulha (mais 5 mm correspondentes ao comprimento da cânula de inoculação implantado no soquete). Após inoculação, os animais dos dois grupos permaneceram em gaiolas próprias e recebiam água e ração *ad libitum*.

Acompanhamento

Os animais eram examinados diariamente, com particular atenção dada as mudanças comportamentais manifestadas por: diminuição da agilidade; passividade; irritabilidade, diminuição da higienização, aparência relaxa-

da e déficits neurológicos manifestados por distúrbios da marcha e déficits motores focais. Os animais com o soquete para suporte de eletrodos, além de serem submetidos à observação neurológica diária, realizavam exames eletroencefalográficos periódicos no eletroencefalógrafo de 21 canais Nihon-Kohden, sendo o último exame realizado no dia do sacrifício.

Os animais do grupo com monitorização EEG realizaram, em média, 4 exames: o primeiro, 10 dias após a implantação dos elétrodos corticais; o segundo e terceiro, 10 e 15 dias após a inoculação das células 9L; o quarto, no dia do sacrifício.

Os animais eram sacrificados com a administração de dose letal intraperitoneal de tiopental sódico (Tiopental®;

Cristália), 3 a 5 dias após o aparecimento dos sintomas neurológicos e seu peso era registrado. A seguir, realizava-se uma reabertura da incisão mediana na pele do crânio utilizando lâmina de bisturi nº 20; no grupo II, retirava-se o dispositivo craniano (soquete). Em seguida, realizava-se a craniectomia com goiva. Neste momento, deve-se descolar o encéfalo do osso com dissector para evitar lesões traumáticas da superfície cerebral. Após ampla craniectomia, retirava-se o encéfalo com lâmina de bisturi e tesoura seccionando-se o tronco cerebral e os bulbos olfativos (Fig.2 A).

O material, então, era fixado em solução preparada de paraformaldeído 4%+ glutaraldeído 2% por 72 horas e o encéfalo era examinado por cortes coronais de 0,4 cm de espessura; o material era processado com metodologia histológica de rotina para inclusão em parafina e obtenção de cortes que foram corados com hematoxilina-eosina e, eventualmente, submetidos a reações imuno-histoquímicas para detecção de sítios reagentes a proteína fibrilar glial ácida (GFAP).

RESULTADOS

O tempo de evolução do tumor, desde o momento da implantação até o sacrifício, variou entre 14 dias e 68 dias; a maioria foi de 21- 31 dias.

Grupo I - Foram utilizados 18 machos Sprague-Dawley. Três animais morreram no pós-operatório imediato, 2 animais foram encontrados mortos na gaiola e 7 animais deste grupo não desenvolveram lesão tumoral. Seis animais desenvolveram a lesão.

Grupo II - Vinte e cinco ratos foram monitorizados com exames de EEG no total de 30 ratos. Quatro animais foram a óbito no pós-operatório imediato e um animal foi encontrado morto na gaiola, por isso foi desprezado do estudo. Dezoito animais (72%) desenvolveram tumor e o restante dos animais não apresentou tumor durante todo estudo. O registro final era feito por meio de pena com tinta que se move sobre uma folha de papel contínuo. Os resultados foram uniformes entre os animais que desenvolveram lesão: 1- o 1º registro mostrou a presença de ondas teta (θ) - resultado do estado de vigília e atenção do animal e ausência de qualquer outro tipo de onda eletroencefalográfica patológica; o 2º e 3º exames mostravam registros de espículas-onda no hemisfério D ipsilateral ao da inoculação de células tumorais, correspondendo a um foco epileptogênico, provavelmente, por causa do desenvolvimento tumoral; no 4º exame, o traçado exibe padrão irregular, a onda θ desaparece, resultado da diminuição do nível de consciência do animal, aparecimento de focos epileptogênicos no hemisfério contra-lateral

(atividade epileptógena) e ondas lentas de baixa voltagem no hemisfério direito, correspondendo a baixa atividade elétrica neuronal do tecido cerebral adjacente à lesão tumoral (Fig 2B).

Análise da variação de peso - Dos 24 ratos que desenvolveram lesão, 17 apresentaram diminuição do peso que variava 3 a 100 gramas; sete animais perderam mais de 50 gramas durante o estudo, correspondendo a perda de 15-20% do peso inicial e 10 ratos apresentaram uma diminuição menor que 50 gramas, correspondendo a média menor que 10% do peso inicial. Cinco animais ganharam peso, com variação de 5 gramas a 30 gramas.

Tamanho da lesão - O tamanho da lesão encontrada no encéfalo dos animais era geralmente extensa e se exteriorizava para a superfície cortical (Fig 2C). Macroscopicamente, apresentava-se acinzentada e aparentemente bem circunscrita, sem invasão do hemisfério contra-lateral. Os limites com o parênquima adjacente eram bem marcados e o tumor era facilmente destacável dele.

Achados histológicos - O material corado em HE mostrava tumor com alta celularidade. Estas células exibiam intenso pleomorfismo, presença de mitoses, proliferação endotelial, áreas de necrose e infiltração do tecido cerebral adjacente. O diagnóstico histológico foi o de astrocitoma maligno (Fig 2 D, E e F). A reação imuno-histoquímica com anticorpo anti GFAP mostrou sítios reagentes no citoplasma das células tumorais.

DISCUSSÃO

Há vários modelos experimentais de tumores cerebrais disponíveis na literatura e cada um apresenta qualidades específicas que podem fornecer resposta razoável a determinada questão experimental⁵. Critérios apropriados devem ser analisados nestes modelos para poder validar os objetivos de determinado estudo. Primeiro, é imprescindível que haja evidências histológicas e moleculares de diferenciação astrocítica⁵ nas células tumorais a serem implantadas, além de características de crescimento e vascularização idênticas às de um glioma^{12,13}; segundo, o comportamento biológico e genético da linhagem celular deve ser estável; terceiro, as células tumorais devem ser capazes de crescer *in vitro* e *in vivo* em animais singênicos^{12,13}; quarto, o método deve fornecer tumores em um tempo suficientemente curto que permita seu uso para determinação de eficácia

em estudos terapêuticos^{12,13}; quinto, o método tem de ser simples e fácil e deve permitir preparar grande número de animais¹²⁻¹⁴.

O modelo experimental de tumor cerebral utilizando as células 9L é amplamente empregado nos estudos de neuro-oncologia^{2,5,7,15}, principalmente na demonstração da eficácia de novas drogas e de novos protocolos para tratamento oncológico em humanos^{7,16-19}, e também para determinações tanto da biologia quanto da fisiologia tumoral^{2,5,8,9}. Os ratos Sprague-Dawley foram escolhidos para a realização do trabalho por causa de suas características peculiares: 1) na fase adulta, são grandes, dóceis, adquirem bom peso, facilitando a manipulação das avaliações diárias; 2) a espécie não apresenta crises convulsivas congênitas e, por isso, o estudo EEG e o acompanhamento com este exame complementar apresenta maior validade; 3) o animal é singênico em relação à linhagem celular empregada, ou seja, compatível com as células 9L; com isso, minimizam-se as reações inflamatórias que possam aparecer entre o hospedeiro e as células, com consequente rejeição e desaparecimento da lesão^{5,9,13}. O tumor que se desenvolve após a inoculação de células 9L é único, bem delimitado e infiltrativo, tornando a avaliação morfométrica mais fácil e real². Outras linhagens, como a C6, formam tumores mais complexos e mais rapidamente destrutivos dificultando a análise de resultados de testes terapêuticos².

Necrose com pseudopaliçada, proliferação endotelial, pleomorfismo celular e invasão tumoral do tecido cerebral perilesional foram bem destacados no estudo histológico dos tumores do presente estudo. Estas características de crescimento, juntamente com a natureza infiltrativa do tumor e a presença de sítios reagentes a anticorpo anti GFAP, apontam para a natureza glial destas células. Algumas amostras da linhagem 9L apresentam componente sarcomatoso^{5,7}, onde, além de células gliais há uma extensa reação desmoplásica com características neoplásicas diferentes do componente glial⁵. Devido à presença deste 2 componentes, esta lesão foi denominada gliosarcoma⁷. As células utilizadas no presente trabalho não desenvolveram esta característica.

Para resultados uniformes em todos os experimentos, deve-se levar em conta outros fatores:

1) Utilização do aparelho de estereotaxia para aumentar a exatidão e a reprodutibilidade da área alvo para inoculação^{2,14,20,21}. Alguns autores preconizam a inoculação no núcleo caudado¹⁴ para diminuir a incidência de lesões extra-axiais e tornar o exa-

me clínico mais predizível e uniforme; nós utilizamos a via da substância branca sub-cortical por ser a que melhor imita a maior frequência de localização dos astrocitomas malignos no ser humano^{3,4}, já que a via preferencial de infiltração dos gliomas é a dos tratos mielínicos^{3,4}. Outros autores obtiveram bons resultados com a injeção manual das células tumorais^{14,15}; pelas razões apontadas acima, optamos por uma padronização mais precisa do local da injeção.

2) Volume de inoculação pequeno com um tempo longo de infusão - a concentração de 1×10^5 céls em $5 \mu\text{l}$ de solução por 120 segundos, parece ser a ideal para evitar crescimento tumoral extra-craniano². A presença de células no espaço sub-aracnoideo pode ser devida a: a) infiltração do espaço pelas células tumorais como parte do comportamento intrínseco das células gliais, ou b) refluxo de células tumorais para o espaço durante a infusão. Volume maior de líquido infundido no tecido cerebral pode levar a edema cerebral agudo².

3) Padronização do procedimento anestésico. Este é um passo importante na condução dos experimentos. Entretanto, mesmo tomando-se cuidado quanto à dose de anestésico e à manipulação posterior do animal para colocação no aparelho de estereotaxia, alguns animais morrem durante o ato anestésico^{7,14}. Desta maneira, para a configuração de protocolos experimentais, deve-se levar em conta este fato e adotar um número de animais compatível com resultados que possam ser tratados estatisticamente. De maneira geral, perde-se cerca de 10% de animais durante a indução anestésica⁷. Embora no presente trabalho a perda tenha sido maior, as causas foram detectadas e incluem: os animais foram submetidos a 2 anestésias, uma para implantação de eletrodos e a outra para inoculação das células tumorais. A dose de anestésico no segundo procedimento era maior para se obter um bom plano anestésico, o que aumentava a chance de matar o animal.

4) Outra causa de perda dos animais durante a manipulação pré-inoculação de células contempla o choque neurogênico causado por dor na introdução das barras auriculares no conduto auditivo externo do animal e a compressão da carótida pela barra auricular devido ao mau posicionamento da mesma¹¹.

Número significativo de animais não desenvolveu tumor 14/38 (37%). Este resultado é um pouco inferior à média descrita na literatura^{2,7,14,15}. Provavelmente, as causas deste resultado foram: contagem inadequada de células e falta de agitação constante do

tubo de "ependorf" durante a aspiração das células pela seringa de Hamilton⁷.

O tempo de evolução dos tumores neste trabalho foi, em média, 20-30 dias, precedidos por um período sintomático de 3-4 dias, ligeiramente menor do que outros relatados⁷; isto pode ser devido às características próprias da cepa de células 9L utilizada.

O exame de EEG nos animais auxiliou na determinação da evolução do crescimento tumoral. Aparecimento de focos epileptogênicos no hemisfério cerebral inoculado e alterações elétricas na área perilesional permitiram inferir sofrimento neuronal. Entretanto, não é possível determinar com precisão, por este método, quanto o tumor cresceu. Outros fatores que auxiliam na avaliação indireta do crescimento tumoral são: perda de peso e alterações comportamentais, como falta de higiene; hipoatividade e sinais neurológicos focais, que indicam que o tumor atingiu tamanho suficiente para desencadear edema cerebral ou lesar estruturas vizinhas. A fim de evitar sofrimento desnecessário do animal, ele é sacrificado quando do início dos últimos sinais.

O modelo experimental desenvolvido no presente estudo mostrou ser de execução relativamente fácil, com custo razoável e reproduzível. Desta maneira, poderá ser utilizado para experimentos que visam estudar tanto a biologia e fisiologia dos tumores primários do SNC, como angiogênese e invasão, além de ensaios terapêuticos em todas as suas modalidades.

REFERÊNCIAS

- Davis F, Preston-Martin S. Epidemiology, incidence and survival. In Bigner DD, McLendon RE, Bruner JM (eds). Russell & Rubinstein's pathology of tumors of the nervous system. London: Arnold, 1998:5-45.
- Saini M, Bellinzona M, Meyer F, Cali G, Samii M. Morphometrical characterization of two glioma models in the brain of immunocompetent and immunodeficient rat. *J Neuro-Oncol* 1999;42:59-67.
- McLendon RE, Enterline DS, Tien RD, Thorstad WL, Bruner JM. Tumors of central neuroepithelial origin. In Bigner DD, McLendon RE, Bruner JM (eds). Russell & Rubinstein's pathology of tumors of the nervous system. London: Arnold, 1998:308-571.
- Kleihues P, Burger PC, Collins VP, Newcomb EW, Ohgaki H, Cavenee WK. Glioblastoma. In Kleihues P, Cavenee WK (eds). Pathology and genetics of the nervous system. Lyon: IARC Press, 2000:29-39.
- Sampson JH, Bigner DD. Experimental tumors and the evaluation of neurocarcinogens. In Bigner DD, McLendon RE, Bruner JM (eds). Russell & Rubinstein's pathology of tumors of the nervous system. London: Arnold, 1998:167-230.
- Benda P, Someda K, Messer J, Sweet WH. Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture. *J Neurosurg* 1971;34:310-323.
- Barker M, Hoshino T, Gurcay O, et al. Development of an animal brain tumor model and its response to therapy with 1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Cancer Res* 1973;33:976-986.
- Rubinstein LJ. Correlation of animal brain tumor models with human neuro-oncology. *National Cancer Institute Monographs* 1977;46:43-49.
- Goldbrunner RH, Wagner S, Roosen K, Tonn JC. Models for assessment of angiogenesis in gliomas. *J Neurooncol* 2000;50:53-62.
- Andersen ML, Valle AC, Timo-Iaria C, Tufik S. Princípios da implantação dos elétrodos para registro dos eletroscilogramas e dos movimentos. In Implantação de elétrodos para o estudo do ciclo vigília-sono do rato. São Paulo: UNIFESP, 2001:6-15.
- Andersen ML, Do Valle AC, Timo-Iaria C, Tufik S. Procedimentos para implantação de elétrodos detectores das oscilações elétricas do sistema nervoso e de movimentos. In Implantação de elétrodos para o estudo eletrofisiológico do ciclo vigília-sono do rato. São Paulo: UNIFESP, 2001:16-34.
- Barth RF, Moeschberger ML. Rat brain tumor models and the statistical evaluation of survival data in experimental neuro-oncology. In Chiocca EA, Breakefield XO (eds). Gene therapy for neurological disorders and brain tumors. Totowa, NJ: Humana Press, 1997: 313.
- Peterson DL, Sheridan PJ, Brown WEJ. Animal models for brain tumors: historical perspectives and future directions. *J Neurosurg* 1994;80:865-876.
- Kobayashi N, Allen N, Clendenon N, Ko LW. An improved rat brain-tumor model. *J Neurosurg* 1980; 53: 808-815.
- La Regina MC, Culbreth VO, Higashikubo R, Roti Roti JL, Spitz DR. An alternative method to stereotactic inoculation of transplantable brain tumours in large numbers of rats. *Lab Anim* 2000;34:265-271.
- Brem S, Tsanaclis AM, Zagzag D. Anticopper treatment inhibits pseudopodial protrusion and the invasive spread of 9L gliosarcoma cells in the rat brain. *Neurosurgery* 1990;26:391-396.
- Weizsaecker M, Deen DF, Rosenblum ML, Hoshino T, Gutin PH, Barker M. The 9L glioma model: description and application of an animal model. *J Neurol* 1981; 224:183-192.
- Tapscott SJ, Miller AD, Olson JM, et al. Gene therapy of the rat 9L gliosarcoma tumors by transduction with selectable genes does not require drug selection. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:8185-8189.
- Tamargo RJ, Myseros JS, Epstein JL, Yang MB, Chasin M, Brem H. Interstitial chemotherapy of the 9L gliosarcoma: controlled release polymers for drug delivery in the brain. *Cancer Res* 1993;53:329-333.
- Morreale VM, Herman BH, Der-Minassian V, et al. A brain-tumor model utilizing stereotactic implantation of a permanent cannula. *J Neurosurg* 1993;78:959-965.
- Plunkett RJ, Weber RJ, Oldfield E. Stereotactic implantation of dispersed cell suspensions into brain: a systematic appraisal of cell placement and survival. *J Neurosurg* 1988;69:228-233.

ARQ NEUROPSIQUIATR.2003 JUN:61(2-A):234-240.

Artigo: Tumores experimentais do sistema nervoso central: padronização de modelo em roedores utilizando a linhagem 9L

Page 234

Onde se lê:

Flávio Key Niura

Leia-se:

Flávio Key Miura