



**Universidade
Federal
Fluminense**

HELVÉCIO CARDOSO CORRÊA PÓVOA

**EFEITO DA TALIDOMIDA E DA PENTOXIFILINA NA
PRODUÇÃO DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA
(TNF- α) E GAMA INTERFERON (INF- γ) NA
CARCINOGENESE MAMÁRIA EM RATAS WISTAR**

Niterói 2008

HELVÉCIO CARDOSO CORRÊA PÓVOA

**EFEITO DA TALIDOMIDA E DA PENTOXIFILINA NA
PRODUÇÃO DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA
(TNF- α) E GAMA INTEFERON (INF- γ) NA
CARCINOGENESE MAMÁRIA EM RATAS W ISTAR**

Dissertação / tese apresentado ao
curso de Pós-graduação em Patologia
da Universidade Federal Fluminense

Orientador: Dr. Fernando Monteiro Aarestrup

Niterói 2008

Povoa, Helvécio Cardoso Corrêa

Efeito da talidomida e da pentoxifilina na produção do fator de necrose tumoral alfa (tnf- α) e gama inteferon (inf- γ) na carcinogênese mamária em ratas wistar / Helvécio Cardoso Corrêa Póvoa. – Niterói 2008.

94 f

Tese de Doutorado (Patologia Investigativa – Programa de Pós-Graduação em Patologia) – Universidade Federal Fluminense

Orientador: Fernando Monteiro Aarestrup

Bibliografia: f. 84 – 94

1. Carcinogênese mamária 2. TNF- α 3. Pentoxifilina 4. Talidomida. I. Universidade Federal Fluminense. II. Efeito da talidomida e da pentoxifilina na produção do fator de necrose tumoral alfa (tnf- α) e gama inteferon (inf- γ) na carcinogênese mamária em ratas Wistar.

CDD

HELVÉCIO CARDOSO CORRÊA PÓVOA

**EFEITO DA TALIDOMIDA E DA PENTOXIFILINA NA PRODUÇÃO DO
FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF- α) E GAMA INTEFERON
(INF-7) NA CARCINOGENESE MAMÁRIA EM RATAS WISTAR.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia como requisito para obtenção do Grau de Doutor. Área de concentração: Patologia Investigativa.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr(a). Beatriz Julião Vieira
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Rogério Estevan Farias
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Simão Pedro Fernandes Pereira
Faculdade de Minas

Prof^a. Dr(a). Maria Luzia da Rosa e Silva
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dr(a). Heloisa Werneck de Macedo
Universidade Federal Fluminense

SUPLENTES

Prof^a. Dr(a). Martha de Oliveira Guerra
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dr(a). Vera Maria Peters
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dr(a). Maria Angélica Guzmán Silva
Universidade Federal Fluminense

DEDICATÓRIA

Esta tese é dedicada às pessoas que me fazem querer ser melhor a cada dia!

Minha mulher Fabiana, meu filho Rafael e minha filha Clara, que em breve nascerá.

AGRADECIMENTOS

Gostaria, inicialmente, de agradecer a meu orientador Dr. Fernando Monteiro Aarestrup pela oportunidade e pela convivência durante o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a todos os Professores e colaboradores do Departamento de Patologia da UFF. Sua presteza e dedicação foram muito importantes no meu processo de formação.

A Dra. Beatriz Julião e ao Dr Rogério Esteves que contribuíram de forma primordial e decisiva para a realização deste trabalho

Ao Centro de Biologia da Reprodução - CBR/UFJF e aos recursos obtidos via FAPEMIG / Rede Mineira de Biotérios.

A minha mulher Fabiana Pires Vieira pela paciência, companheirismo, incentivo, amor e dedicação a mim conferido, mesmo nos momentos em que estive mais ausente.

Ao meu filho Rafael Vieira Póvoa que mesmo sem compreender totalmente a natureza deste trabalho soube aceitar os momentos de ausência com muito amor e carinho.

Aos meus familiares, em especial meu Pai e minha Mãe que sempre me apoiaram nas minhas escolhas.

A meus amigos, Zé Otávio, e Luciana que juntos viajamos e trabalhamos no CBR-UFJF, pelos bons momentos compartilhados.

A direção da Faculdade de Minas e da Fundação Cristiano Varella pela compreensão e apoio na realização deste trabalho.

E por último e mais importante, a Deus por ter me dado força e saúde para suportar as pressões dos momentos mais difíceis desta jornada.

RESUMO

Dentre as neoplasias malignas o câncer de mama tem sido o responsável pelos maiores índices de mortalidade no mundo, o que faz com que pesquisas para o desenvolvimento de novas terapêuticas sejam estimuladas em todo o mundo. Para tal, modelos animais são alternativas para testar estas novas possibilidades. Neste trabalho, tumores primários foram induzidos em ratas wistar através do método de gavagem gástrica, utilizando 7,12 dimetilbenzoanthraceno (DMBA), e células homólogas do tumor mais representativo foram transplantadas para outras ratas da mesma espécie. Os animais foram divididos em 3 grupos, tratados com talidomida, pentoxifilina e um grupo que não recebeu tratamento. Ainda, foi utilizada técnica de imuno-histoquímica para avaliar a multiplicação celular e o método de Ensaio imuno enzimático (ELISA) para avaliar os níveis séricos do Fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e Interferon- γ (INF- γ). Os animais tratados com talidomida tiveram desenvolvimento tumoral menor e redução dos níveis séricos de TNF- α quando comparado aqueles tratados com pentoxifilina e com os não tratados. Os níveis séricos de INF- γ não se alteraram nos animais tratados quando comparado com os animais controle. A ação da Talidomida na imunomodulação da produção de TNF- α e na redução do processo mitótico sugere essa droga como potencial e importante alternativa terapêutica no tratamento do câncer de mama.

ABSTRACT

Amongst the malignant neoplasias the breast cancer has been the responsible one for the biggest indices of mortality in the world, what it makes with that research for the development of new therapeutic is stimulated in the whole world. For such, animal models are alternative to test these new possibilities. In this work, primary tumors had been induced in rats to wistar through the gastric method of gavage, using 7,12 dimetilbenzoanthraceno (DMBA), and homologous cells of the tumor most representative had been transplanted for other rats of the same species. The animals had been divided in 3 groups, dealt with talidomide, pentoxifiline and a group that treatment did not receive. Still, Immunohistochemie technique was used to evaluate the cellular multiplication and the method of enzymatic Assay immunology (ELISA) to evaluate the serum levels of the Factor of necrosis tumoral-a (TNF-a) and Interferon- γ (INF- γ). The animals dealt with talidomide had lesser tumoral development and reduction of the serum levels of TNF-a when compared those dealing with pentoxifiline and with not treated. The serum levels of INF - γ if had not modified in the treat animals when compared with the animal ones it has controlled. The action of the talidomide in the imunomodulation of the production of TNF-a and in the reduction of the mitotic process suggests this drug as potential and important therapeutic alternative in the treatment of the breast cancer

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01	Estrutura química da talidomida	29
FIGURA 02	Estrutura química da pentoxifilina	31
FIGURA 03	Esquema Elisa direto para pesquisa de antígenos (TNF -a e IFN- γ).	52
FIGURA 04	Modelo experimental	53
FIGURA 05	Tumores mamários em ratas wistar desenvolvidos por indução com DMBA	55
FIGURA 06	Aspecto macroscópico do carcinoma mamário induzido pelo transplante de células tumorais, extraído de ratas wistar	59
FIGURA 07	Carcinoma ductal invasivo de glândula mamária de ratas com tumores desenvolvidos após transplante de células tumorais de tumores induzidos com DMBA	61
FIGURA 08	Carcinoma ductal invasivo de glândula mamária de ratas com tumores desenvolvidos após transplante de células tumorais de tumores induzidos com DMBA	62
FIGURA 09	Carcinoma ductal invasivo de glândula mamária de ratas com tumores desenvolvidos após transplante de células tumorais de tumores induzidos com DMBA	63
FIGURA 10	Imuno-histoquímica para antígeno Ki 67 dos tecidos tumorais das ratas com tumores desenvolvidos após transplante de células tumorais de tumores induzidos com DMBA	64

LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

TABELA 01	Estimativas para o ano de 2008 de número de casos novos por câncer em homens e mulheres, segundo localização primária.	23
TABELA 02	Graduação Bloom e Richardson (modificada por Elston e Ellis)	46
TABELA 03	Tempo médio de desenvolvimento de tumores após a indução com DMBA.	54
TABELA 04	Medidas dos carcinomas mamários desenvolvidos após 6 meses da indução com DMBA	56
TABELA 05	Medidas dos tumores desenvolvidos 3 semanas após o transplante do tumor induzido com DMBA	57
GRÁFICO 01	Avaliação do volume dos tumores transplantados	58
GRÁFICO 02	Média e desvio padrão da porcentagem de células Ki 67 positivas por campo microscópico, dos tumores transplantados	65
GRÁFICO 03	Análise comparativa da produção média de TNF-a, em picogramas por mililitro, de animais controle não transplantados e de animais que desenvolveram os tumores de mama após o transplante.	67
GRÁFICO 04	Análise comparativa das médias de produção de TNF-a, em picogramas por mililitro, de animais controle, animais que apresentaram tumores de mama após o transplante e que não receberam tratamento, de animais com tumores mamários transplantados tratados com talidomida e de animais transplantados tratados com pentoxifilina.	68
GRÁFICO 05	Análise comparativa da produção média de IFN- γ , em picogramas por mililitro, de animais controle não transplantados e de animais que desenvolveram tumor de mama após o transplante.	69
GRÁFICO 06	Análise comparativa da produção média de IFN- γ em picogramas por mililitro, de animais controle, animais que desenvolveram tumor de mama após o transplante e que não foram tratados, animais com tumores mamários tratados com talidomida e animais com tumores mamários tratados com pentoxifilina.	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	-	Síndrome da imunodeficiência adquirida
µg	-	micrograma
µm	-	Micrometro
AMPc	-	Monofosfato cíclico de adenosina
BCG	-	Bacilo de Calmett e Guerin
DMBA		Dimetil-benzoantraceno
DMSO	-	Dimetil sulfóxido
DNA	-	Ácido Desoxirribonucléico
ELISA	-	Ensaio imunoenzimático
FDA	-	Food and Drug Administration
HE	-	Hematoxilina e eosina
HUVEC	-	Célula endotelial de cordão umbilical
IFN-γ	-	Interferon gama
IL	-	Interleucina
INCA	-	Instituto Nacional do câncer
KCL	-	Cloreto de potássio
LPS	-	Lipopolissacarídeo
LT	-	Linfócito T
mg	-	miligrama
NFκβ	-	Fator de transcrição nuclear Kappa Beta
nm	-	Nanômetro

PBS	-	Salina tamponada com fosfato
pg	-	Picograma
RNAm	-	Ácido Ribonuclêico Mensageiro
TCR	-	Receptor de Células Tímicas
TH	-	Célula Timica Auxiliar (helper)
TNF-a	-	Fator de Necrose Tumoral alfa
TNF-R1	-	Receptor do Fator de Necrose tumoral
UFJF	-	Universidade Federal de Juiz de Fora
VEGF	-	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
	2.1- CÂNCER DE MAMA COMO UM PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA	22
	2.2- A TALIDOMIDA E PENTOXIFILINA COMO POTENCIAIS DROGAS ANTI-CÂNCER	26
	2.3- FUNDAMENTOS DA CARCINOGENESE EXPERIMENTAL	33
3	OBJETIVOS.....	40
	3.1- OBJETIVO GERAL.....	40
	3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
	4.1- ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO.....	42
	4.2- CONDIÇÕES DE CRIAÇÃO E MANEJOS DOS ANIMAIS	42
	4.3- INDUÇÃO DA CARCINOGENESE MAMÁRIA	43
	4.4- GRUPOS EXPERIMENTAIS	44
	4.5- EUTANÁSIA	45
	4.6- PROCESSAMENTO HISTOPATOLÓGICO	45
	4.7 - IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA ANTÍGENO KI67	47
	4.7.1 PREPARO DAS LÂMINAS SINALIZADAS	47
	4.7.2 PREPARO DOS CORTES HISTOLÓGICOS	48
	4.7.3 DESPARAFINIZAÇÃO E REIDRATAÇÃO	48
	4.7.4 RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA	48
	4.8- DOSAGEM DE TNF- α E INF- γ PELO MÉTODO DE ELISA	51
	4.9- ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
	4.10- MODELO EXPERIMENTAL	53
5	RESULTADOS	54
	5.1 INCIDÊNCIA DE TUMORES INDUZIDOS PELO DMBA EM RATAS WISTAR E EM ANIMAIS QUE RECEBERAM TRANSPLANTES TUMORAIS	54

5.2	CÂNCER INDUZIDO EXPERIMENTALMENTE PELO DMBA	55
5.3	AVALIAÇÃO DO VOLUME DOS TUMORES TRANSPLANTADOS NOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS	57
5.4	AVALIAÇÕES DO VOLUME DOS TUMORES TRANSPLATADOS	58
5.5	HISTOPATOLOGIA DOS TUMORES INDUZIDOS POR DMBA	60
5.6	ANÁLISES IMUNO-HISTOQUÍMICA DO TUMOR MAMÁRIO INDUZIDO POR DMBA	64
5.7	AVALIAÇÕES DOS NÍVEIS SÉRICOS DE TNF- α E INF- γ	66
6	DISCUSSÃO.....	71
7	CONCLUSÕES.....	82
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

1 - INTRODUÇÃO

O câncer de mama, dentre as neoplasias malignas, tem sido o responsável pelos maiores índices de mortalidade no mundo, tornando-se uma das grandes preocupações em saúde pública, no que diz respeito à saúde da mulher. No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, o câncer de mama representa uma das primeiras causas de óbitos em mulheres, sendo apenas superado pelas mortes provocadas por doenças cardiovasculares e causas externas, como acidentes de trânsito e violência urbana. Este fato situa o câncer de mama como a terceira causa responsável pelo grande índice de mortalidade de mulheres no país, principalmente nas regiões sul e sudeste, o que indica uma mudança no perfil de mortalidade, onde as doenças crônico-degenerativas, comparadas às doenças infecto-contagiosas que causavam muitas mortes até a década de 80, apresentam uma alta prevalência entre a população brasileira (BRASIL, Instituto Nacional do Câncer -INCA, 2008).

O INCA, órgão do Ministério da Saúde responsável, entre outras ações, pela prevenção dos mais variados tipos de câncer, admite que a maioria das ações dirigidas para o controle do câncer de mama é voltada para o

diagnóstico da lesão inicial. De acordo com esse órgão governamental, um grupo de trabalho está sendo criado para traçar estratégias de enfrentamento do câncer de mama em todo o Brasil. Essas estratégias consistem em orientar 500 mil mulheres e capacitar 100 mil profissionais da área de saúde, e, mesmo assim, ainda existe, um alto índice de mortalidade no Brasil e no Mundo.

O câncer de mama é uma doença heterogênea e complexa, como observado pelas múltiplas formas de apresentação clínica e morfológica, bem como pelas diferenças na pré e pós-menopausa, pelos diferentes graus de agressividade tumoral e pelo potencial metastático. A maioria dos tumores é monoclonal na origem, ou seja, o evento neoplásico ocorre em uma única célula que desenvolve expansão clonal. Durante esse crescimento se estabelece uma progressiva instabilidade genética, gerando uma alta taxa de mutações e resultando numa população tumoral heterogênea, multiclonal, que se expressa com diferenciações quanto ao potencial metastático, antigenicidade, receptores hormonais, quimiosensibilidade e outros (FREITAS *et al*, 1997).

Apesar de ser considerado um câncer de prognóstico moderado se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade associadas a este tumor continuam elevadas no Brasil, provavelmente porque o diagnóstico se dá em estágios avançados. Os modelos experimentais de câncer de mama são uma alternativa clássica para testar novas possibilidades terapêuticas. Os tumores mamários desenvolvem-se espontaneamente em algumas espécies animais, como por exemplo, em cães, ratos, e camundongos. Por razões práticas como a disponibilidade e a padronização dos ensaios, estudos sobre

carcinogênese experimental de mama são conduzidos predominantemente em roedores (RUSSO E RUSSO, 1996). As espécies de ratos, Sprague -Dawley e Wistar-Furth, são as mais suscetíveis à transformação induzida por carcinógenos químicos, sendo o 7,12 dimetil-benzoantraceno (DMBA) um dos indutores químicos mais ativos e extensamente utilizados neste modelo de carcinogênese.

O DMBA é um hidrocarboneto policíclico aromático, sendo considerado um carcinógeno químico potente. É derivado da combustão incompleta do carvão mineral, petróleo e tabaco (é por isso alcatrão). Ainda é um cancerígeno indireto, pois depende da ativação prévia por sistemas enzimáticos, resultando em tumores malignos e benignos, conforme a via de administração, o sítio anatômico e as células estimuladas (BRASILEIRO, 2006).

Os hidrocarbonetos derivam dos núcleos de antraceno e de fenantreno. Dependendo do tipo e do local das modificações químicas das moléculas, a potência do produto resultante é diferente. Como exemplo desse grupo tem o DMBA sendo que seu mecanismo básico é a formação de epóxidos que se ligam ao DNA e provocam transição das bases nitrogenadas adenina e guanina, ou citosina e timina. (BRASILEIRO, 2006).

O desenvolvimento de tumores experimentais a partir de carcinógenos químicos tem se mostrado pouco prático em função da demora e do crescimento errático desta neoplasia. Como forma alternativa, o transplante de tumores, particularmente o de tumores malignos de mama entre animais da

mesma espécie, vem apresentando bons resultados, sem rejeição e proporcionando uma maior incidência de tumores desenvolvidos experimentalmente (RHODEN E RHODEN, 2006).

Os transplantes de tumores malignos podem ser realizados através de fragmentos da lesão ou através de suspensão de células malignas obtidas da forma sólida do tumor, inoculadas por via intramuscular. Outras formas de transplante, também podem ser usadas, como a inoculação de células tumorais mantidas *in vitro*. Todas as vias utilizadas mostraram-se eficazes: subcutânea, intramuscular, intraperitoneal, intrapleural e endovenosa, porém após estudos destas diferentes vias, foi demonstrado que o músculo da coxa era o local ideal para o transplante de células tumorais, devido à melhor vascularização e ao crescimento tumoral uniforme e simétrico (RHODEN E RHODEN, 2006).

A resposta imunológica aos transplantes tumorais está associada ao desenvolvimento principalmente da resposta imune celular, representada pela produção de citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e o gama Interferon, (IFN- γ) (TYLBERRY, 2005; YANYING, et al., 2007).

ROBAYE *et al.* (1991) observaram que o TNF - α é um potente agente indutor de apoptose em células endoteliais. Neste mesmo trabalho, foi sugerido que a presença de necrose hemorrágica em neoplasias malignas observadas após a administração de TNF- α "in situ" pode ser devida aos efeitos deste sobre as células endoteliais que nutrem a área de tecido neoplásico. Sabe-se que essa citocina possui características imunomoduladoras, portanto, tem

como característica atuar no processo inflamatório crônico e ter significativa citotoxicidade seletiva contra células mamárias malignas em modelos animais (WAJANT *et al.*, 2003, BASU *et al.*, 2001).

O TNF- α pode-se acoplar a seus receptores de superfície (TNRF-1) induzindo uma série de eventos moleculares intracitoplasmáticos que podem culminar com a ativação do fator de transcrição nuclear Kappa β (NF κ B), levando à expressão de genes pró-inflamatórios e imunomoduladores (ASHKENAZI, DIXIT, 1998). Essas características do TNF- α têm estimulado pesquisadores a estudar o efeito dessa citocina como modulador dos sistemas de defesa contra tumores malignos e como agente anticancerígeno (SEE *et al.*, 2002; RAMAKRISHNAN *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2003).

O TNF- α pode ser inibido seletivamente pela talidomida (α -N-phthalidoglutarimide) (SAMPAIO *et al.*, 1991) que vem sendo utilizada com sucesso no tratamento de estados mórbidos inflamatórios tais como eritema nodoso, leproso, artrite reumatóide e tuberculose associada à AIDS (SARNO *et al.*, 1990). O mecanismo de ação mais provável da droga é através da via do aumento da velocidade de degradação do TNF- α Mrna (MOREIRA *et al.*, 1993; SAMPAIO *et al.*, 1991).

De acordo com o trabalho publicado por GRAU (1989) a inibição da síntese de TNF- α através da utilização de anticorpos anti-TNF mRNA interferiu no desenvolvimento da granulogênese hepática de camundongos infectados com BCG. Estes resultados despertaram a hipótese de que um mecanismo

semelhante poderia ser observado no processo de carcinogênese. AAERESTRUP *et al.* (1995) demonstraram em camundongos infectados intravenosamente com BCG, que a talidomida inibe o desenvolvimento da inflamação granulomatosa reduzindo o número e o tamanho de granulomas induzidos pelo BCG. Adicionalmente, foi demonstrado que a talidomida modula a reação inflamatória granulomatosa diminuindo os níveis de TNF- α no soro e no sítio de desenvolvimento dos granulomas.

Em modelos experimentais de angiogênese em córneas de camundongos C57B16, foi demonstrada a ação antiangiogênica da talidomida em combinação com o antiinflamatório Sulindac (VERHEUL *et al.*, 1999). Adicionalmente em modelos de carcinogênese experimental em coelhos, os resultados também evidenciaram efeito antiangiogênico, diminuindo a nutrição da massa tumoral (D' AMATO *et al.*, 1994).

A talidomida foi sintetizada primeiramente como um sedativo em 1953. Foi excepcionalmente efetiva, entre outras condições, no tratamento de enjôos matinais provocados pela gravidez. Entretanto, os efeitos teratogênicos da talidomida causaram uma das situações mais controvertidas da ciência, levando a pesquisa com substâncias análogas e com outros inibidores do TNF. Alguns derivados de phtalimida, análogos a talidomida foram descritos como potentes moduladores da produção do TNF- α em células estimuladas com éster phorbol. Um destes derivados, a pentoxifilina, é conhecida na supressão da produção de TNF- α em resposta a administração de lipopolissacarídeos

(LPS) e a indução por ácido acético 5,6 dimetilxantenona (NOEL *et al.*, 1998; CHING *et al.*, 1998).

Adicionalmente, a pentoxifilina tem sido utilizada em crianças de maneira segura, em doenças mediadas por TNF- α , por sua capacidade de inibir a ação da IL -1 sobre células polimorfonucleares assim como a ativação de linfócitos T.

Neste trabalho foi utilizado um modelo de carcinogênese química associado ao transplante de células tumorais como cenário de estudo para avaliar os efeitos da talidomida e da pentoxifilina sobre o câncer de mama induzido experimentalmente em ratas wistar. Focalizando especificamente a produção das citocinas TNF- α e INF- γ , que são consideradas mediadores cruciais no desenvolvimento da resposta imunológica celular contra tumores malignos.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer de mama como um problema de saúde pública

O câncer de mama está relacionado a distúrbios hormonais, sendo o tipo de tumor maligno mais comum nas mulheres. Este tipo de câncer é relativamente raro antes dos 35 anos de idade, mas acima desta faixa etária sua incidência cresce rápida e progressivamente. A tabela 01 representa esquematicamente os dados da epidemiologia do câncer em 2008, coletados pelo Ministério da Saúde.

Tabela 01: Estimativas para o ano de 2008 de número de casos novos por câncer em homens e mulheres, segundo localização primária.

<i>Localização Primária</i>	<i>Estimativa dos casos novos</i>		
<i>Neoplasia Maligna</i>			
	Masculino	Feminino	Total
Mama Feminina	0%	48.930	48.930
Brônquio e Pulmão	17.850	9.320	27.170
Estômago	14.970	8.230	23.200
Colo de Útero	-	19.260	19.260
Próstata	47.280	-	47.280
Cólon e Reto	11.390	13.970	25.360
Esôfago	7.970	2.610	10.580
Leucemias	5.330	4.220	9.550
Cavidade Oral	10.060	3.410	13.470
Pele Melanoma	2.710	3.050	5.760
Outras localizações	61.530	63.320	124.850

BRASIL – Ministério da Saúde – 2008

O principal tipo de câncer de mama é o carcinoma ductal, que tem origem nos ductos onde com sua disseminação pode ser chamado de carcinoma ductal infiltrante. Pacientes com esta variedade tumoral apresentam maior envolvimento linfático quando comparados aos pacientes com tipos menos freqüentes de carcinoma infiltrante de mama (ALBERTS, 1997; PETERS, 1997).

O câncer de mama pode originar-se nos ductos de tamanho intermediário ou nos ductos terminais e nos lóbulos. Na maioria dos casos, o diagnóstico de carcinoma lobular e intraductal baseiam-se mais no aspecto histológico que no local de origem. O câncer pode ser invasivo (carcinoma

ductal infiltrante, carcinoma lobular infiltrante) ou *in situ* (carcinoma ductal *in situ* ou carcinoma lobular *in situ*). Os subtipos morfológicos do carcinoma ductal invasivo podem ser descritos como cirroso, tubular, medular e mucinoso. Aproximadamente 70 a 80% dos casos são classificados como carcinoma ductal invasivo sem tipo histológico especial (FREITAS *et al*, 1997; BEREK *et al*, 1998).

O câncer de mama quando atinge o limiar de detecção clínica, em torno de 1 cm, o tumor maligno apresenta uma massa celular de aproximadamente 10^9 células e pesa cerca de 1g, tendo duplicado 30 vezes em média, com um tempo médio de duplicação que varia de 30 a 200 dias. Desse modo, uma neoplasia considerada clinicamente precoce já existiu em fase pré-clínica por um período de 2 a 17 anos, tendo evoluído $\frac{3}{4}$ de sua vida biológica antes de causar a morte no hospedeiro (BENNETT, PLUM, 1997; FREITAS *et al*, 1997).

Devido à longa fase pré-clínica de crescimento tumoral maligno e à tendência das lesões infiltrantes metastatarem precocemente, muitos oncologistas consideram o câncer de mama como uma doença sistêmica. A observação das taxas de cura e sobrevida em 10 anos tem demonstrado que o potencial metastático, muitas vezes, já se manifestou antes do diagnóstico clínico. Embora células cancerosas possam ser liberadas do tumor antes do diagnóstico, variações na capacidade deste de crescer em outros órgãos e a resposta imunológica do hospedeiro podem inibir a disseminação da doença. Quando o tumor atinge um tamanho clinicamente evidente, ele tende a crescer cada vez mais devagar, inversamente ao seu volume. Esta desaceleração

provavelmente ocorre porque o crescimento prejudica seu suprimento de sangue. (BENNETT, PLUM, 1997; FREITAS *et al*, 1997; BEREK *et al*, 1998).

Diante da constatação de que o câncer de mama é um problema de saúde pública mundial, vários institutos de pesquisa vêm procurando novas alternativas terapêuticas. Modelos experimentais deste tipo de neoplasia são difíceis de serem desenvolvidos, dificultando o teste de novas possibilidades terapêuticas.

No presente estudo, foi utilizado o modelo de transplante de células tumorais após a indução química de tumores mamários em ratas, para verificar a ação de fármacos inibidores de TNF- α sobre o desenvolvimento de câncer de mama. Espera-se que este modelo possa contribuir para o desenvolvimento de pesquisas capazes de propor novas estratégias terapêuticas para o enfrentamento deste problema de saúde pública.

2.2 A talidomida e pentoxifilina como potenciais drogas anticâncer

A talidomida tem sido utilizada em vários experimentos como inibidora da produção de TNF- α em resposta a lipopolissacarídeos (LPS) (NOEL *et al*, 1998; SEE *et al*, 2002; RAMAKRISHNAN *et al*, 2003; KIM *et al.*, 2003).

Esta droga foi sintetizada em 1953 por pesquisadores da Química Grunenthal, no oeste da Alemanha, e na época falhou no controle de crises epiléticas, mas apresentou potente efeito hipnótico e sedativo. Entre 1961 e 1962 foi retirada do mercado devido a seu caráter teratogênico (MELLIN, KATZENSTEIN, 1996).

Interessantemente, várias décadas depois, esta droga atraiu o interesse de diversos pesquisadores devido ao possível potencial para o controle e tratamento de várias doenças, incluindo hanseníase, AIDS, mieloma múltiplo, câncer e outras desordens dependentes de angiogênese (SAMPAIO *et al*, 1991; MOREIRA *et al.*, 1993; HASHIMOTO, 2002).

Em julho de 1998, a Talidomida foi aprovada nos Estados Unidos pela FDA (Food and Drug Administration) para emprego terapêutico em pacientes com eritema nodoso leproso e complicações da hanseníase (COLLIN, *et al*, 2001). Vem sendo utilizada, também, em várias condições inflamatórias tais como Lupus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide e tumores de medula óssea (TEO *et al*, 2004). SAMPAIO *et al.* (1991) demonstraram, que a

talidomida inibe seletivamente síntese de TNF- α em sangue periférico humano estimulado por bactérias em cultura. Esta ação parece ser mediada por aumento na degradação de mRNA resultando em uma redução do mesmo (MOREIRA et al, 1993).

De acordo com SCHULER *et al.* (1995), a determinação de seu mecanismo de ação *in vitro* é difícil, devido a sua baixa solubilidade e alta velocidade de hidrólise em solventes aquosos. Para alcançar concentrações *in vivo* com sucesso é necessário dissolver o fármaco em um solvente orgânico, como o dimetil sulfoxido (DMSO). Além disso, a talidomida tem uma baixa absorção após administração oral (SHANNON *et al.* 1995; GELATI *et al.* 2003).

A talidomida farmacologicamente ainda representa um enigma. É um agente imunomodulatório com um espectro de ação que até hoje ainda não está completamente dissecado pela falta de um conhecimento básico de seu mecanismo de ação, de seus metabólitos e de suas concentrações plasmáticas (KINUYA , 2002). Embora seu metabolismo não seja hepático, uma quantidade desta droga é metabolizada pelas enzimas do citocromo P450 (RAJKUMAR, 2004). Sua principal via de degradação é a clivagem hidrolítica no plasma e em outros fluidos corporais, formando vários metabólitos com excreção de uma pequena quantidade. Seu *clearance* renal é de 1,15 ml/minuto e menos de 0,7% da dose é eliminada intacta na urina (RAJKUMAR, 2004). A biodisponibilidade da via oral é alta e os alimentos não afetam a absorção ou os picos plasmáticos de concentração (RAJKUMAR, 2004; YACCOBS, 2002).

A absorção da talidomida pelo trato gastrintestinal é lenta, levando cerca de duas horas para atingir concentração plasmática máxima e mantendo uma meia vida de cinco a sete horas. Recentemente, sua utilidade clínica tem sido ampliada com base no seu efeito imunomodulatório. A chave para sua atividade biológica está na sua capacidade de modular a produção do Fator TNF- α , das interleucinas IL -6, IL -1 α e IL-10, citocinas indispensáveis para o crescimento das células do microambiente e do tumor maligno; modular a expressão das moléculas de adesão ICAM-1(CD54), VCAM-1(CD106), E-seletinas e L-seletinas e integrinas de interface entre o tumor maligno e a matrix extracelular; promover o apoptose; inibir a angiogênese pela inibição de fatores de crescimento do endotélio vascular e o fator de crescimento de fibroblastos; induzir a produção de citocinas moduladoras do tumor, como o IFN- γ e a IL-2 e a potencializar a ação dos linfócitos TCD8 (KENYCON 2004; NOOPUR, 2004; GEITZ, 2004).

Em modelos experimentais vêm sendo demonstrado que o TNF- α participa de maneira efetiva durante o processo de carcinogênese. O TNF- α é necessário nos estágios iniciais de promoção tumoral, de modo que camundongos deficientes nesta citocina são resistentes à carcinogênese cutânea (MOORE *et al.*, 1999) Alguns trabalhos vêm demonstrando o forte potencial angiogênico do TNF- α , bem como, a indução da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (YOSHIDA *et al.*, 1997; FERRER *et al.*, 1998; CAMPBELL *et al.*, 1999; GNANT *et al.*, 2000; FUJITA *et al.*, 2004).

A figura 01 representa esquematicamente a estrutura química da talidomida.

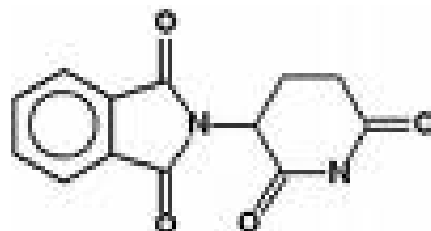


Figura 01. Estrutura química da talidomida

A modulação da produção de citocinas pela talidomida tem sido extensivamente estudada em modelos animais e humanos. Tantos estudos *in vivo* quanto *in vitro* têm demonstrado que o maior efeito da talidomida é o *dowregulation* da produção de TNF- α , o qual pode resultar na degradação acelerada do RNA mensageiro do TNF- α . A regulação da produção do TNF- α pela talidomida pode ser descrita como bi-diferencial dependendo do tipo celular, do modelo de estimulação e da concentração da droga utilizada (SAMPAIO *et al.*, 1991; HUIZINGA *et al.*, 1996, KRUSE *et al.*, 1998).

A talidomida também modula a produção de interleucina como IL1, IL2, IL4, IL5, IL6, IL10, e IL12. Resultados inconsistentes com o aumento da produção de interleucina derivadas de células T e mononucleares humanas *in vitro* pela talidomida também tem sido relatados (SHANNON *et al.*, 1995). Em pacientes com doenças imune, a administração de talidomida aumenta os

níveis plasmáticos de IL12. A talidomida também modula a produção dos Interferons. Os efeitos da talidomida na produção de citocinas (TNF- α , IL e INF) podem explicar algumas de suas eficiências clínicas (SHANNON *et al.*, 1995, NAKAMURA *et al.*, 2007).

O TNF alfa parece estar diretamente associado ao processo de apoptose (GANDHI, 1998). A indução da apoptose na célula tumoral é uma propriedade de muitas drogas anticâncer. Similarmente, a talidomida pode causar apoptose de linfócitos e neutrófilos *in vitro*. Em modelo de câncer de próstata, a talidomida diminuiu a expressão de Bcl-2, uma proteína bloqueadora da apoptose. Entretanto, outros estudos são necessários para se entender como a talidomida modula a apoptose (GUINAN *et al.*, 1998; KAUFMANN, EARNSHAW, 2000)

Os efeitos na modulação de tumores em estudos experimentais como o observado em córnea de coelhos, mostram que a talidomida tem propriedades antiangiogênicas, provavelmente por bloquear a ação de potentes fatores angiogênicos como o fator de crescimento fibroblástico (bFGF) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEFG) (RAJKUMAR *et al.*, 2003).

A pentoxifilina é um derivado da metilxantina, inicialmente utilizada para o tratamento de doenças vasculares, age sobre os eritrócitos aumentando a

deformabilidade deste por atuar na fosforilação e ligação cruzada de proteínas na membrana, além de atuar como anticoagulante plaquetário aumenta a síntese de prostaglandina, que é um importante agente vasodilatador (HASEBE *et al.*, 2000; COLLINGRIDGE, ROCKWELL, 2000).

A figura 02 representa esquematicamente a estrutura química da pentoxifilina.

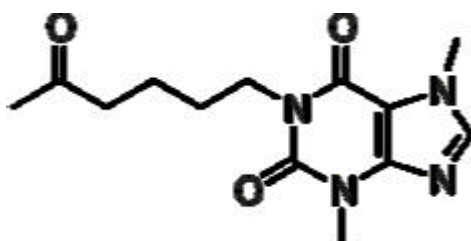


Figura 02. Estrutura química da pentoxifilina

Em concentrações elevadas pode-se verificar que este fármaco inibe a enzima fosfodiesterase. Como a fosfodiesterase hidrolisa os nucleotídeos cíclicos, essa inibição resulta em concentrações mais elevadas de AMPc intracelular. Esse efeito poderia explicar a estimulação cardíaca e o relaxamento do músculo liso produzido por estas drogas. Outro mecanismo de ação consiste na inibição dos receptores de adenosina na superfície celular. Esses receptores modulam a atividade da adenilato ciclase. Foi constatado que a adenosina provoca contração do músculo liso isolado das vias aéreas e induz a liberação de histamina por mastócitos existentes nas vias aéreas. As metilxantinas exercem efeitos sobre o sistema nervoso central, o rim e os músculos cardíacos e esqueléticos bem como sobre o músculo liso. As

metilxantinas diminuem a viscosidade do sangue e podem melhorar o fluxo sanguíneo em certas condições.

A pentoxifilina além de inibir vários mecanismos inflamatórios incluindo a cascata do complemento, a aderência dos neutrófilos e a produção de citocinas, controla a produção do TNF- α e de outras citocinas, inibindo a angiogênese. Tem atuação sobre a transcrição proteica de citocinas pró-inflamatórias. O efeito anticitocina também é exercido em parte pelo aumento do monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) que provoca também uma inibição na apoptose celular. Modula a resposta tipo Th2 com redução do TNF alfa e da IL12 e aumenta da IL10 e IL4 (KINDLER *et al*, 1989).

A talidomida e a pentoxifilina demonstraram, capacidade de inibir a secreção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e citocinas como o TNF- α produzida por macrófagos, resultando em um efeito antiangiogênico e antitumora (MOORE *et al.*, 1999).

2.3 FUNDAMENTOS DA CARCINOGENESE EXPERIMENTAL

As substâncias químicas seguras ou presumivelmente cancerígenas encontram-se amplamente distribuídas na natureza e compreendem desde alimentos naturais até compostos altamente modificados pelo homem (BRASILEIRO, 2006).

Algumas são muito potentes, outras são importantes por estarem em contato muito próximo e prolongado com o homem e os animais. Dependendo dessas duas variáveis, têm maior ou menor importância prática. Muitos carcinógenos químicos têm interesses apenas na carcinogênese experimental, outros são causa importante de cânceres humanos. Os carcinógenos químicos são divididos em 2 grandes categorias: carcinógenos diretos (são agentes alquilantes que possuem atividade eletrofílica intrínseca por isso podem provocar o câncer diretamente). A maioria das substâncias cancerígenas, contudo, precisam primeiro sofrer modificações químicas no organismo antes de se tornarem eletrofílicas e ativas (esses são considerados carcinógenos indiretos). O metabolismo destes agentes é feito por uma grande variedade de enzimas solúveis ou associadas a membranas, entre as quais as do citocromo p450 são as mais importantes (BRASILEIRO, 2006).

A partir desse metabolismo ocorre a conversão desses agentes indiretos

em carcinógenos propriamente ditos pela introdução de centros eletrofílicos na molécula inativa. Essa ativação ocorre paradoxalmente em consequência da ação do sistema de detoxificação do organismo, que tem por função tornar os elementos nocivos, solúveis em água para que sejam eliminados pela urina. Essas enzimas são capazes de oxidar compostos não reativos como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, produzindo epóxidos que são grupos muito reativos. Estes, em geral, são hidrolisados rapidamente em seus grupos hidroxilas que se ligam ao ácido glicurônico ou outros grupos, produzindo compostos muito solúveis em água, que são excretados. Eventualmente essa reação é retardada e o composto intermediário age no organismo como carcinógeno (OGA, 2003).

Esses sistemas enzimáticos sofrem influência de vários fatores endógenos e exógenos havendo variações qualitativas e quantitativas dessas enzimas em diversos tecidos, em indivíduos e em diferentes espécies, o que pode influenciar o local e o tipo de tumores. O principal mecanismo de ação dos carcinógenos químicos é a formação de compostos covalentes com o DNA aumentando a probabilidade de ocorrerem erros durante a duplicação. No entanto nem sempre uma mutação leva à formação de tumores, pois o organismo dispõe de sistemas eficazes de reparação do DNA e mecanismos de proteção pertencente à defesa inata do organismo. (BRASILEIRO, 2006).

Como exemplos de carcinógenos químicos pode-se citar:

Aminas aromáticas: nessa categoria estão alguns derivados da anilina que para produzirem tumores, devem sofrer ativação pelos hepatócitos. A beta-naftilamina é hidroxilada no fígado e depois conjugada com o ácido glicurônico, que a torna inativa como cancerígeno. No entanto, por ação de uma glicuronidase urinária, libera o composto beta-hidroxilado, que é oncogênico para o epitélio vesical, causando uroteliomas, sobretudo em trabalhadores na indústria de corantes e derivados da anilina.

Azocompostos: São derivados do azobenzeno sendo também considerado cancerígeno indireto. A grande maioria deles tem importância na carcinogênese experimental, de modo particular a hepática. Para a espécie humana tem interesse porque muitos corantes usados na industrialização de produtos alimentares pertencem a essa categoria, sendo o exemplo mais conhecido, o amarelo manteiga, que era usado para dar cor à margarina a mesma cor da manteiga.

Alquilantes: Representam um grupo heterogêneo de substâncias que têm como propriedade comum de doar um grupo alquílico (metílico ou etílico) a um substrato. São considerados carcinógenos diretos, mas são de baixa potência.

Nitrosaminas: São substâncias formadas no organismo a partir de nitritos e aminas ou amidas ingeridas com os alimentos. A importância maior das nitrosaminas é sua relação com o câncer gástrico. Compostos n-nitroso causam desaminação de ácidos nucleicos e mutações variadas.

Aflatoxinas: São produzidas por cepas de um fungo que contamina alimentos, principalmente cereais. A aflatoxina hepatocarcinogênica mais potente é a aflatoxina B1 que sofre ação de enzimas (époxi hidrolase e ou glutathione-S-transferase) e são eliminadas na urina. A falta dessas enzimas vai fazer com que o efeito mutagênico esteja aumentado, favorecendo o aparecimento do carcinoma hepatocelular.

Asbesto: A sua inalação prolongada provoca asbestose pulmonar, doença que tem interesse pelos transtornos funcionais que provoca no sistema respiratório. Ao lado disso, asbesto é causa importante de mesoteliomas e câncer broncopulmonar, especialmente quando associado ao hábito de fumar. A principal forma de contato do asbesto é a exposição de trabalhadores em indústrias de amianto

Cloreto de vinil: Experimentalmente causa angiossarcoma hepático. Há indícios de que tenha papel também na doença humana, já que trabalhadores expostos a essa substância são mais susceptíveis a esse raro tumor no fígado.

Carcinógenos inorgânicos: pode-se citar como exemplo o arsênico, cromo, níquel, ferro, sacarina e ciclamatos (não há estudos concretos que na dose consumida por humanos possa causar câncer).

Dentre os compostos químicos mais pesquisados na indução do câncer e no teste de novas drogas para a terapia do câncer é o 7,12 dimetilbenzoanthraceno (DMBA). Apesar da presença de várias pesquisas na indução da carcinogênese, paralelo ao estudo de drogas no combate ao câncer pouco se sabe como o DMBA age na indução do câncer.

Nos modelos experimentais com emprego do DMBA o desenvolvimento tumoral ocorre de acordo com o processo clássico de carcinogênese química compreendendo as fases de iniciação, promoção e progressão, sendo que o DMBA atua tanto como substância iniciadora como promotora.

No processo de carcinogênese experimental a célula para perder a capacidade de regulação celular necessita sofrer estímulos nas diferentes fases do desenvolvimento. A célula para perder esse processo de regulação celular que garante a homeostase do organismo, necessita sofrer estímulos, a partir desses estímulos esse processo passa por 3 etapas: iniciação, promoção e progressão. (ZHOU *et al.*, 2002).

No estágio de iniciação, as células sofrem o efeito dos agentes cancerígenos ou carcinógenos que provocam modificações em alguns de seus genes. Nesta fase as células se encontram, geneticamente alteradas, porém ainda não é possível se detectar um tumor clinicamente, sendo que a mesma é irreversível, pois com sua aplicação causa alteração irreversível no DNA. (AMBRUS *et al.*, 2000; INCA, 2004).

O estágio de promoção é um processo diferente da iniciação, depende do contato mais prolongado com o agente promotor, que precisa ser aplicado após o iniciador, pois ele consiste na proliferação ou expansão das células

iniciadas. É um processo reversível, pois se sua aplicação for interrompida o efeito não se manifesta (BRASILEIRO, 2006).

No estágio de progressão as células tumorais malignas tendem a invadir uma camada que dá sustentação ao tecido dos ductos mamários (membrana basal) (BRASILEIRO, 2006).

O Ki-67 (MIB -1) é um antígeno de proliferação nuclear, cujo anticorpo correspondente está expresso nas células em proliferação, durante as fases ativas do ciclo celular, tendo relação direta com a fração de crescimento da população celular. Existe correlação deste marcador com vários fatores adversos, tais como tamanho do tumor, grau histológico e ausência de expressão dos receptores hormonais (BARRA, 2006)

No modelo de carcinogênese mamária com DMBA os tumores induzidos são normalmente carcinomas ductais ou papilares, sendo também observados a formação de fibroadenomas, adenomas e papilomas típicos (RUSSO e RUSSO 1994). A ausência de metástase em neoplasias mamárias quimicamente induzidas abre a porta para especulação. De acordo com MURAD *et al* (1972), a proliferação de células epiteliais e mioepiteliais, em proporções relativamente iguais, pode ser um fator protetor de metástase. Em carcinomas humanos de mama, a proliferação ocorre, quase que exclusivamente, em células epiteliais. O DMBA é altamente lipofílico e requer a ativação metabólica para sua carcinogenicidade. Diversos tecidos, incluindo as glândulas mamárias são capazes de ativar o DMBA. O DMBA é convertido em epóxidos, metabólitos ativos com capacidade de danificar a molécula do DNA,

evento principal na iniciação da carcinogênese. Com o índice de proliferação celular mais elevado nos lóbulos, há uma atividade metabólica maior e, conseqüentemente maior formação de epóxido (CLARKE,1997; RUSSO e RUSSO, 2003).

Neste trabalho, pretende-se avaliar o efeito da talidomida e da pentoxifilina na produção do TNF- α e INF- γ na carcinogênese mamária em ratas wistar.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial da talidomida e pentoxifilina sobre o desenvolvimento do modelo de carcinogênese mamária experimental em ratas Wistar com tumor induzido quimicamente pelo DMBA.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A) Avaliar o potencial da talidomida como agente anticancerígeno utilizando o modelo de carcinogênese de mama experimental em ratas Wistar.
- B) Avaliar o potencial da pentoxifilina como agente anticancerígeno utilizando o modelo de carcinogênese de mama experimental em ratas wistar.
- C) Verificar a correlação do desenvolvimento tumoral com a expressão das moléculas TNF- α , e INF γ no soro.

- D) Analisar os efeitos da talidomida e pentoxifilina sobre os níveis séricos de $TNF\alpha$ e $INF\gamma$ em ratas Wistar submetidos à indução da carcinogênese mamária.
- E) Avaliar os efeitos da administração de talidomida ou pentoxifilina sobre o índice de proliferação celular via expressão da proteína Ki 67 nas amostras tumorais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Biologia da Reprodução – Universidade Federal de Juiz de Fora.

4.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados ratas da linhagem Wistar, com seis a oito semanas de idade, provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

4.2- CONDIÇÕES DE CRIAÇÃO E MANEJO DOS ANIMAIS

O alojamento dos ratos, no Biotério do Centro de Biologia da Reprodução – UFJF é provido de amplos basculantes telados e de dois exaustores, além de aquecedores de meio ambiente. A temperatura é mantida ao redor de 22 °C, pela ventilação natural no verão e, no inverno, com ajuda de aquecedores. A iluminação é mista – luz natural e lâmpadas fluorescentes – sendo as últimas controladas automaticamente para acenderem às 6h e

apagarem às 18h. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, providas de camas de maravalha selecionada, mas não esterilizada, mamadeira para água e cocho para ração do tipo peletizada.

Os animais foram alimentados com ração e água *ad libitum*.

4.3 INDUÇÃO DA CARCINOGENESE MAMÁRIA

Foram realizados 2 experimentos com 15 ratas submetidas à indução de carcinogênese mamária através de uma única introdução de 1 mL de solução de DMBA (Sigma, St. Louis, MO) a 5% (diluído em óleo de milho) por gavagem gástrica.

Dos 30 animais apenas seis apresentaram lesões tumorais classificadas como carcinoma ductal infiltrante. O tumor mais representativo em tamanho e velocidade de crescimento foi escolhido para o procedimento do transplante das células tumorais.

O animal que desenvolveu tumor mamário mais significativo foi sacrificado com KCl após ter sido anestesiado com tiopental (20mg/Kg) e quetamina (50 mg/kg).

Para o processamento, o tumor foi cirurgicamente removido em condições assépticas, seguido do isolamento do tecido tumoral a transferência para placa de Petri com solução de Cloranfenicol + Ringer Lactato (1/10). O tecido tumoral foi cortado em fragmentos mínimos utilizando-se tesoura e bisturi. Os fragmentos foram transferidos juntamente com a solução para um Erlenmeyer de 50 mL contendo uma bala magnética, previamente esterilizada. Após 10 minutos de agitação a 4000 rpm foram recolhidas em um tubo de

ensaio as células em suspensão e contadas com azul de tripa, corante vital, na câmara de Neubauer para posterior diluição em uma concentração final de 10^6 células por mL.

Para o procedimento de transplante das células tumorais, alíquotas de um mL contendo 10^6 células por mL em solução de Cloranfenicol + Ringer Lactato (1/10) foram injetados por via intramuscular na face interna da coxa direita das ratas Wistar (RHODEN e RHODEN, 2006).

O carcinoma se desenvolveu em aproximadamente 3 semanas em todos os animais submetidos ao procedimento de transplante de células tumorais .

4.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Após a detecção dos tumores, os 12 animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos (N=4).

- I. Grupo controle para avaliação dos níveis séricos basais (n=4)
- II. Grupo indução com DMBA (n=4)
- III. Grupo tumores transplantados com tratamento via subcutânea com 30 mg/Kg/ peso corporal de talidomida por um período de 14 dias.
(n=4)
- IV. Grupo tumores transplantados e tratados via intra-peritoneal com 100 mg/Kg/peso corporal de pentoxifilina por um período de 14 dias.
(n=4)

A talidomida (Grunenthal GMBH, Stolberg, Alemanha) foi dissolvida em dimetil sulfoxido (DMSO) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) e salina estéril e a concentração final de DMSO foi de 2% (AARESTRUP et al., 1995) e a concentração final de talidomida ficou em 90 mg/mL.

A pentoxifilina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) foi dissolvida em salina estéril para uma concentração de 150mg/mL. As vias de administração escolhidas foram escolhidas de acordo com protocolos de AARESTRUP et al (1995).

4.5 EUTANÁSIA

Amostras de sangue foram obtidas após anestesia e o total de soro isolado foi depositado em tubos tipo “ependorf” e imediatamente armazenados em “freezer” a -70°C para posterior análise das moléculas imunomoduladoras.

Todos os animais foram sacrificados conforme descrito anteriormente.

Em seguida foram autopsiados e os tumores mamários removidos e submetidos ao processamento e estudo histopatológico e imuno-histoquímico de rotina.

4.6 PROCESSAMENTO HISTOPATOLÓGICO

Os tumores foram imediatamente mantidos imersos em soluções fixadoras de formol tamponado a 10% (4g de fosfato de sódio monobásico, 6,5

g de fosfato de sódio dibásico, 100mL de formol P.A e 900 mL de água destilada) e mantidos por 24 horas a 8°C.

Após dissecação os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70%, 90% e 100%) em banhos de 1 hora cada, sendo feitos 3 banhos em álcool absoluto. Posteriormente, foram clarificados em 3 banhos em xilol de 1 hora cada e finalmente feita à impregnação em parafina em estufa a 58°C e a inclusão na parafina a temperatura ambiente. Os blocos foram então cortados em micrótomo modelo "820" Spencer com espessura de 6 µm e posteriormente foi realizado a coloração de rotina pela hematoxilina – eosina.

Os tumores foram classificados de acordo com os critérios de Bloom & Richardson (modificado por Elston e Ellis)

Tabela 02: Graduação Bloom e Richardson (modificado por Elston e Ellis)

1. Formação tubular	Escore
Maioria do tumor (>75%)	1
Grau moderado (10-75%)	2
Pouca formação (<10%)	3
2. Pleomorfismo nuclear	
Núcleos pequenos, regulares e uniformes	1
Aumento moderado de tamanho e variabilidade	2
Marcada variação e pleomorfismo	3
3. Contagem mitótica	
0-5 mitoses	1
6-10 mitoses	2
>20 mitoses	3

Graduação:

3-5 pontos: Grau I – Bem diferenciado

6-7 pontos: Grau II – Moderadamente diferenciado

7-9 pontos: Grau III – Pouco diferenciado

4.7 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA PROTEÍNAS DO ANTÍGENO KI 67

4.7.1 PREPARO DAS LÂMINAS SINALIZADAS

As lâminas foram mantidas em solução de detergente neutro a 0,5% em água, durante um período de 20 a 30 minutos, em seguida foram lavadas em água corrente por no mínimo 2 horas e lavadas em água fervente. Ao final estas foram secadas na estufa.

Foram preparadas três cubas de vidro com tampa na capela de fluxo laminar:

Imersão das lamínas em álcool absoluto por 2 minutos, descartando o excesso (1ª cuba).

Imersão em silano/álcool a 4% por 2 minutos (2ª cuba) .

Imersão em álcool absoluto por 4 vezes (3ª cuba) e posteriormente secadas na estufa, para então serem resfriadas.

4.7.2 PREPARO DOS CORTES HISTOLÓGICOS

Foram realizados cortes sucessivos, com espessura de 3 a 4 μm , dos blocos de parafina gelados através de um micrótomo, formando uma fita. Estas fitas foram levadas a banho-maria com auxílio de uma pinça, em temperatura um pouco abaixo do ponto de fusão da parafina (60° C).

Após a distensão, os cortes foram separados e então colhidos na superfície de uma lâmina e mergulhados diagonalmente dentro de banho-maria. Os cortes foram transferidos para um suporte e mantidos na estufa a 50° C por um período de 24 horas, para melhor adesão do tecido.

4.7.3 DESPARAFINIZAÇÃO E REIDRATAÇÃO

Depois de retirados da estufa, as lâminas foram mergulhadas no xilol a 60° C por 15 minutos, xilol à TA por 15 minutos para a desparafinização; álcool 100% três vezes 30 segundos para cada, álcool 95% três vezes 30 segundos cada e água deionizada por cinco vezes, concluindo a hidratação.

4.7.4 RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA

➤ DIGESTÃO DA PROTEASE:

Foi utilizada tripsina 0,1% a 37° C durante um período de 30 minutos, seguida de lavagem em água corrente destilada.

➤ **RECUPERAÇÃO DO ANTÍGENO:**

Foi utilizado o método *Steamer* onde o tampão fosfato foi aquecido até a temperatura de 96° a 99° C. Quando esta se manteve constante, as lâminas foram colocadas no tampão durante 30 a 40 minutos. Após atingirem a temperatura ambiente foram lavadas em água destilada.

➤ **BLOQUEIO DA PEROXIDASE ENDÓGENA:**

Para a realização desta foi usado uma solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% em metanol, em dois banhos de 10 minutos cada, em água corrente e destilada. Em seguida, as lâminas foram mantidas em PBS.

➤ **REAÇÃO ESTREPTAVIDINA – BIOTINA – PEROXIDASE**

Incubaram-se as lâminas com o anticorpo anti-ki67 (Novo Castra) específico diluído em tampão PBS – diluente por um período de 2 horas a uma temperatura ambiente ou 16 a 18 horas a 4° C em câmara úmida.

Após, foram lavadas em tampão PBS ou TRIS/HCL com três trocas de 5 minutos para cada. As amostras foram incubadas com o anticorpo secundário biotilado, diluído em PBS, por 30 a 60 minutos a temperatura ambiente ou 37° C em câmara úmida. Foram lavados em tampão PBS ou TRIS/HCL com três trocas de 5 minutos para cada.

Em seguida, foram incubadas com o complexo *STREPABC* diluído em tampão PBS durante 30 a 45 minutos a temperatura ambiente ou a 37° C em câmara úmida. Foram lavados em tampão PBS ou TRIS/HCL com três trocas de 5 minutos para cada.

A revelação do produto das reações de imuno-histoquímica foi realizada em solução substrato (diamino- benzidina – DAB 60mg%) durante 3 a 5 minutos a 37° C ao abrigo da luz. Logo após foram lavados em água corrente destilada. Foram contra corados com hematoxilina de Harris por 10 a 60 segundos e em seguida foram lavados em água corrente destilada.

As lâminas foram desidratadas em álcool 95%, três vezes durante 30 segundos; álcool 100% três vezes durante 30 segundos; álcool xilol por 1 minuto e xilol três vezes durante 5 minutos. Finalmente as lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá e lamínula.

O controle da reação imuno-histoquímica foi realizado omitindo-se, em alguns cortes, a etapa de incubação com o anticorpo primário. Foram obtidas imagens dos campos analisados através do sistema computadorizado de análise de imagens, AxioVision (Zeiss, Berlim, Alemanha). O número de células tumorais Ki 67 positivas foi contado em 5 campos microscópicos aleatoriamente com aumento de 400 X. Os resultados foram expressos em porcentagem de células Ki 67 positivo por campo microscópico em cada grupo.

4.8. DOSAGEM DE TNF- α E INF- γ NO SORO PELO MÉTODO DE ELISA

Placas de ELISA foram sensibilizadas com um primeiro anticorpo (2 $\mu\text{g/ml}$ de anticorpo anti-TNF- α Rat 900-K73 e 1 $\mu\text{g/ml}$ de anticorpo anti-INF- γ Rat 900-K109) (PeProtech Inc, New Jersey), diluídos em PBS, incubadas durante 16 horas a 4°C e bloqueadas com PBS- Tween 20 (PBST) + 10% SFB, por 2 horas. Após este período, as placas foram lavadas quatro vezes em PBS-T e, em seguida, adicionados o padrões de TNF- α e INF- γ recombinante de rato (PeProtech Inc, New Jersey) e as amostras dos animais utilizados no modelo experimental. As placas foram então incubadas por mais 2 horas à temperatura ambiente. Terminada a incubação as placas foram lavadas quatro vezes em PBS-T e o segundo anticorpo biotinizados (anti-TNF- α 1 $\mu\text{g/mL}$ e anti-INF- γ 0,5 $\mu\text{g/mL}$ PeProtech Inc, New Jersey) foi adicionado e incubado por mais 1 hora à temperatura ambiente. A seguir mais quatro lavagens com PBS-T foram feitas e foi adicionado o conjugado enzimático constituído do complexo streptoavidina-peroxidase, na diluição de 1/400 (SIGMA - Co, St. Louis), seguido de incubação por mais 1 hora. Após este período, a reação foi revelada pela adição do substrato contendo Tampão Citrato (pH 5,5), cromógeno OPD (1mg/mL) e água oxigenada 30% (1 $\mu\text{g/mL}$). A reação foi bloqueada com ácido sulfúrico 4N e a leitura feita em leitor de ELISA (SPECTRAMAX 250, *Molecular Devices*) a 440 nm. As amostras foram quantificadas por comparação com as curvas padrões de TNF- α e INF- γ recombinantes (1 pg - 10 ng). (Fig. 3)

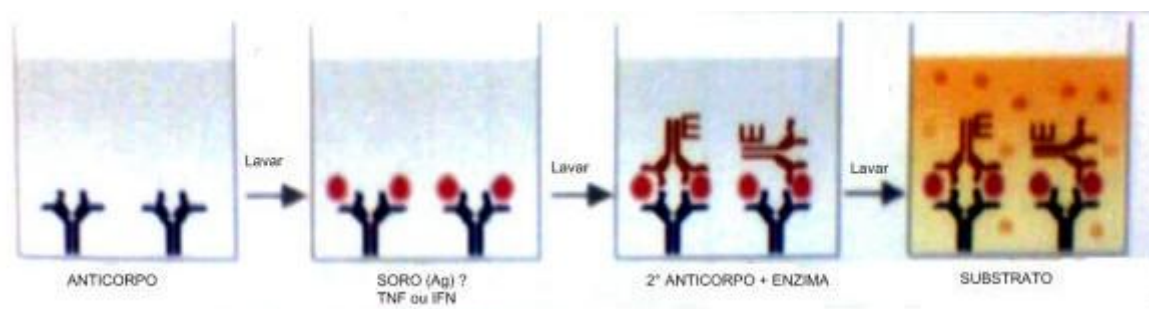


Figura 03 – Esquema Elisa direto para pesquisa de antígenos (TNF- α e IFN- γ).

4.9 ANALISE ESTATÍSTICA

Dados foram expressos em média e +/- desvio padrão. Análise estatística foi realizada por *t*-test de Student, da soma de séries, da mediana e teste U de Mann-Whitney. Foi utilizado $P < 0,05$ para indicar uma diferença estatística significativa.

5 RESULTADOS

5.1 INCIDÊNCIA DE TUMORES INDUZIDOS PELO DMBA EM RATAS WISTAR E EM ANIMAIS QUE RECEBERAM TRANSPLANTES TUMORAIS

Após um período médio de seis meses depois da indução com DMBA foram detectados tumores em um número muito pequeno de animais em relação ao número total de animais tratados com DMBA (tabela 03).

Tabela 03 . Tempo médio de desenvolvimento de tumores após a indução com DMBA ou transplantados.

EXPERIMENTO	Total de animais estudados	Animais com Câncer	Tempo de médio de desenvolvimento
I	15	1 (6.6%)*	6 meses
II	15	5 (33%)*	5 - 6 meses
III**	12	12 (100%)*	3 semanas

* Percentual de animais com câncer em relação ao total de animais tratados com DMBA. ** Indução tumoral por transplante de células.

5.2 CÂNCER INDUZIDO EXPERIMENTALMENTE PELO DMBA

A figura 05 apresenta o aspecto clínico macroscópico do tumor que apresentou o maior tamanho durante a realização do experimento. Este tumor foi escolhido para o procedimento de indução tumoral por transplante de células.



Figura 05. Tumores mamários em ratas wistar desenvolvido por indução com DMBA

Os seis tumores desenvolvidos nos animais em experimentação foram extraídos e medidos, sendo os resultados expressos na tabela abaixo (Tabela 04).

Tabela 04. Medidas dos carcinomas mamários desenvolvidos após 6 meses da indução com DMBA

TUMOR	TAMANHO (cm)
1*	5.0 x 4.5 x 1.3
2**	2.3 x 2.6 x 1.8
3**	3.2 x 2.8 x 1.6
4** ^a	6.9 x 7.4 x 2.3
5**	6.6 x 5.8 x 2.7
6**	2.1 x 0.8 x 0.6
Média	4.4 x 3.9 x 1.71

* Experimento I, ** Experimento II e ^a Tumor transferido

5.3 AVALIAÇÃO DO VOLUME DOS TUMORES DESENVOLVIDOS APÓS TRANSPLANTE DE CÉLULAS DO TUMOR INDUZIDO POR DMBA.

Nos animais que receberam transplantes foi observado 100% de desenvolvimento dos tumores.

A tabela 05 representa o tamanho das lesões tumorais desenvolvidas após 3 semanas do transplante de células tumorais obtidas do animal que apresentou o tumor induzido pelo DMBA mais representativo. Os resultados obtidos demonstram que o tratamento com talidomida reduziu significativamente ($p < 0.05$) o tamanho dos tumores quando comparados aos animais do grupo controle e tratados com pentoxifilina.

Tabela 05. Medidas (cm) dos tumores desenvolvidos 3 semanas após o transplante do tumor induzido com DMBA

TUMOR	Controle	talidomida	pentoxifilina
1	3.2 x 3.3 x 1.2	1.2 x 0.4 x 0.2	2.3 x 4.3 x 4.0
2	5.6 x 6.0 x 2.1	2.1 x 1.0 x 0.5	3.8 x 5.6 x 2.3
3	5.8 x 5.0 x 1.8	0.8 x 07 x 0.5	5.4 x 4.4 x 3.2
4	6.4 x 6.0 x 2.3	1.3 x 0.8 x 1.2	3.9 x 4.2 x 2.0
Média	5.2 x 5.0 x 1.8	1.3 x 0.7 x 0.6	3.8 x 4.6 x 2.8

5.6 AVALIAÇÃO DO VOLUME DOS TUMORES TRANSPLANTADOS

O volume dos tumores em cada animal foi avaliado individualmente. Nos resultados obtidos nos grupos que desenvolveram tumores GII, GIII e GIV, foi observada uma redução significativa no volume dos tumores de animais tratados com talidomida, quando comparado ao grupo controle e ao grupo tratado com pentoxifilina (Gráfico 02).

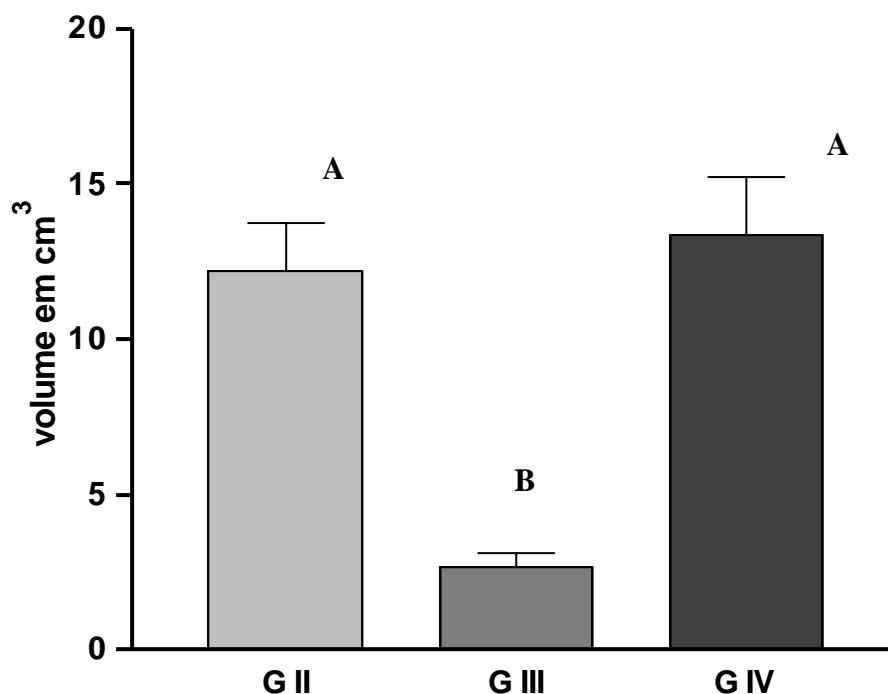


Gráfico 02. Média (n = 4) do volume, em centímetros cúbicos (cm³), dos tumores transplantados em animais que não receberam tratamento (Grupo II), em animais após o tratamento com talidomida (Grupo III) ou após o tratamento com pentoxifilina (Grupo IV). Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste U de Mann-Whitney.

A figura 06 representa o aspecto macroscópico de um tumor induzido pelo transplante de células tumorais revelando aspecto de lesão nodular, branco pardacenta de consistência firme-elástica, de aspecto variegado com áreas sólidas, apresentando regiões indicativas de necrose e hemorragia (Fig 06A e 06 B)

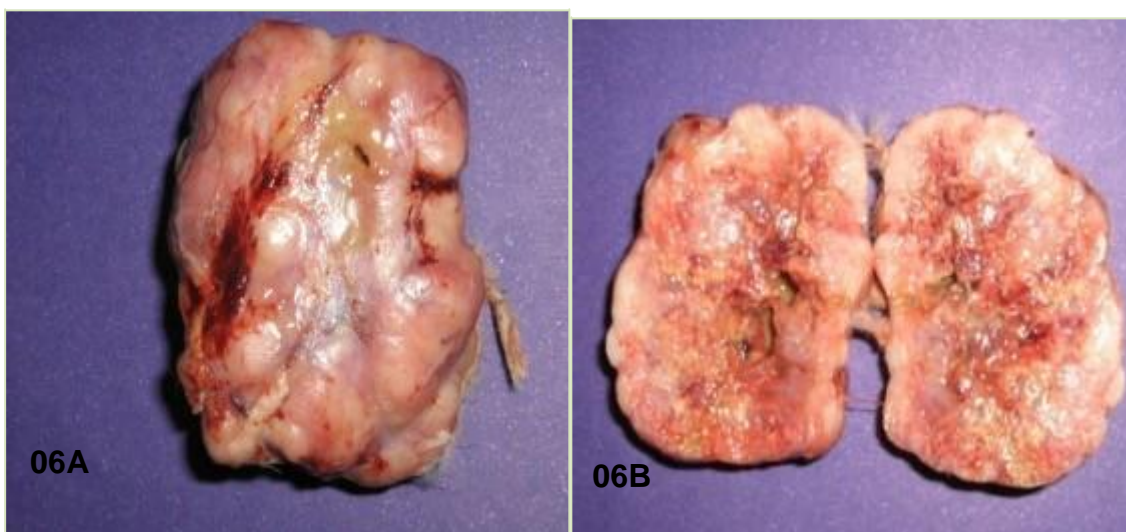


Figura 06. Aspecto macroscópico do carcinoma mamário induzido pelo transplante de células tumorais, extraído de ratas wistar.

5.4 HISTOPATOLOGIA DOS TUMORES INDUZIDOS VIA TRANSPLANTE DE CÉLULAS DE TUMOR INDUZIDO COM DMBA

Todos os tumores induzidos via transplante de células tumorais apresentaram o mesmo padrão histopatológico conforme esperado.

Os tumores desenvolvidos nos animais que receberam o transplante de células malignas foram classificados como carcinoma ductal invasivo. Utilizando o sistema de graduação de Bloom-Richardson (modificada por Elston e Ellis), eles apresentaram os seguintes escores: formação tubular = 2; pleomorfismo nuclear = 1 e índice mitótico = 2. Portanto, o somatório dos valores obtidos (= 5) permite classificar todos os tumores que apresentaram características histopatológicas semelhantes em todos os animais, como carcinoma bem diferenciado. (Grau 1).

No estudo histopatológico foram observadas células em padrão Cribriforme com figuras de mitose e pleomorfismo leve (07A). Observaram-se também, áreas sólidas com figura de mitose e polimorfismo leve (07B).

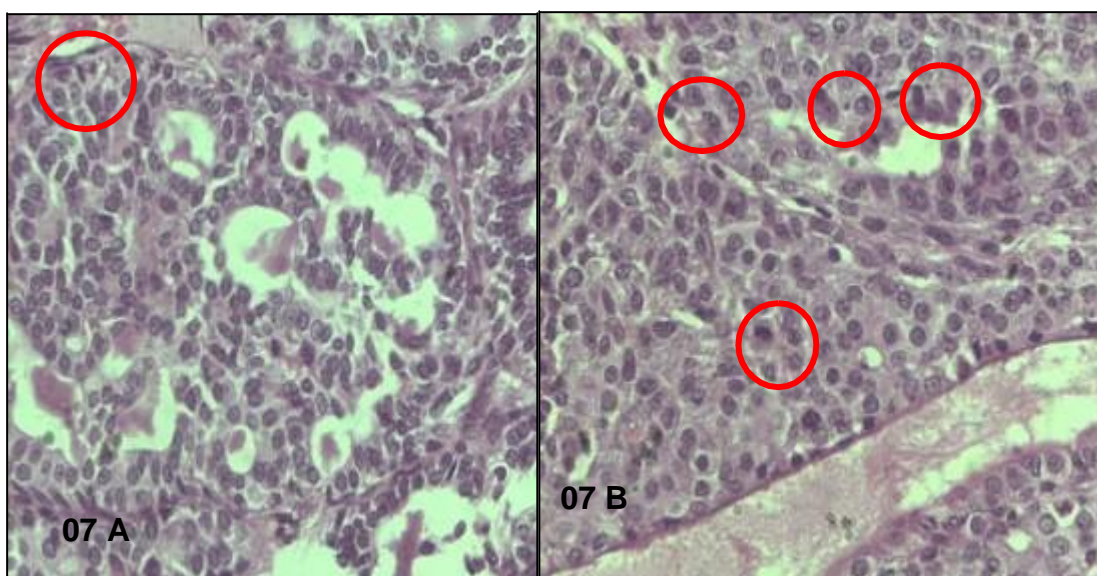


Figura 07. Carcinoma ductal invasivo de glândula mamária de ratas com tumores desenvolvidos após transplante de células do tumor induzido com DMBA. Circundado em vermelho as figuras de mitose (Coloração HE. Aumento original de 400X).

Também foram observados áreas com padrão sólido predominante associado à necrose coagulativa (08A). Na figura 08B, podem-se observar áreas tubulares com figuras de mitose e pleomorfismo leve, que são achados também geralmente observados.

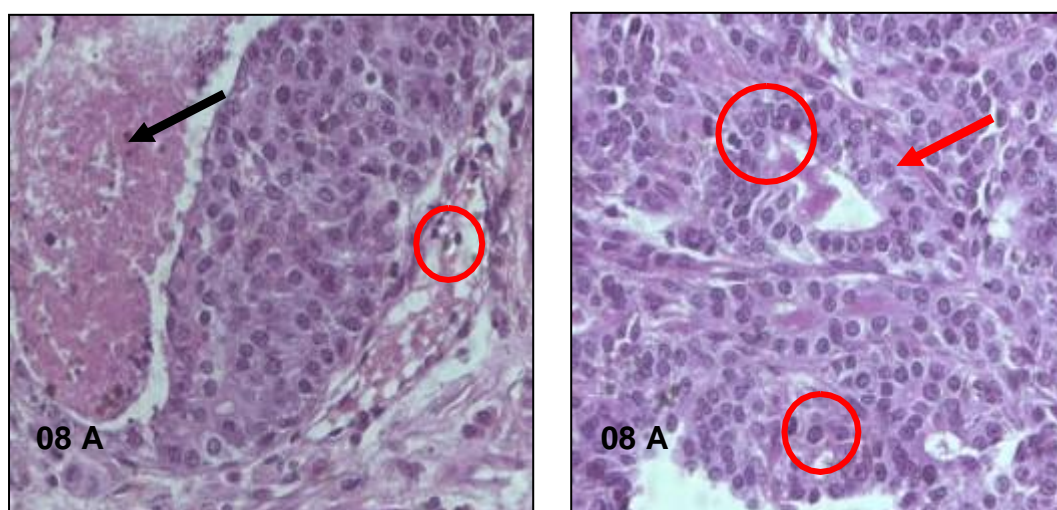


Figura 08. Carcinoma ductal invasivo de glândula mamária de ratas com tumores desenvolvidos após transplante de células do tumor induzido com DMBA. Circundado em vermelho: figuras de mitose; seta preta: necrose coagulativa; seta vermelha: área tubular (Coloração HE. Aumento original de 400X).

Na figura 09 foi observado acúmulo de células neoplásicas em meio de material necrótico e debrí celular.

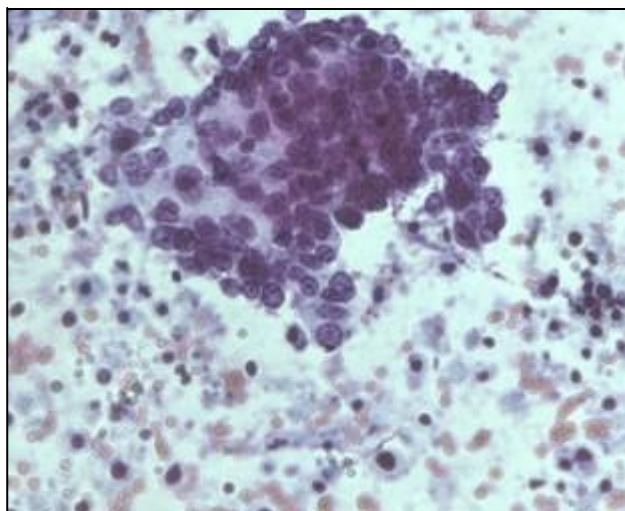


Figura 9. Carcinoma ductal invasivo de glândula mamária de ratas com tumores desenvolvidos após transplante de células do tumor induzido com DMBA. (Coloração HE. Aumento original de 400X).

Segundo BEM-HUR *et al* (2002), morfologicamente, muitos tumores exibem estruturas de carcinomas intraductal, embora a maior parte represente diferentes tipos de carcinomas ductais invasivos com ou sem necrose. Ainda, muitas vezes, o mesmo tumor apresenta áreas com diferentes estruturas: sólida e cribiforme, papilar ou mucinosa. Em muitos casos, áreas de estruturas tubulares são observadas.

5.5 ANÁLISES IMUNO-HISTOQUÍMICA DO TUMOR MAMÁRIO INDUZIDO POR TRANSPLANTE DE CÉLULAS DE TUMOR INDUZIDO POR DMBA

A figura 10 apresenta cortes histológicos com marcação intensa para o antígeno Ki 67 nos tumores mamários dos ratos controles induzidos com DMBA. Os tumores tratados com talidomida e pentoxifilina apresentaram uma marcação sensivelmente menor ($p < 0.05$) quando comparado aos controles.

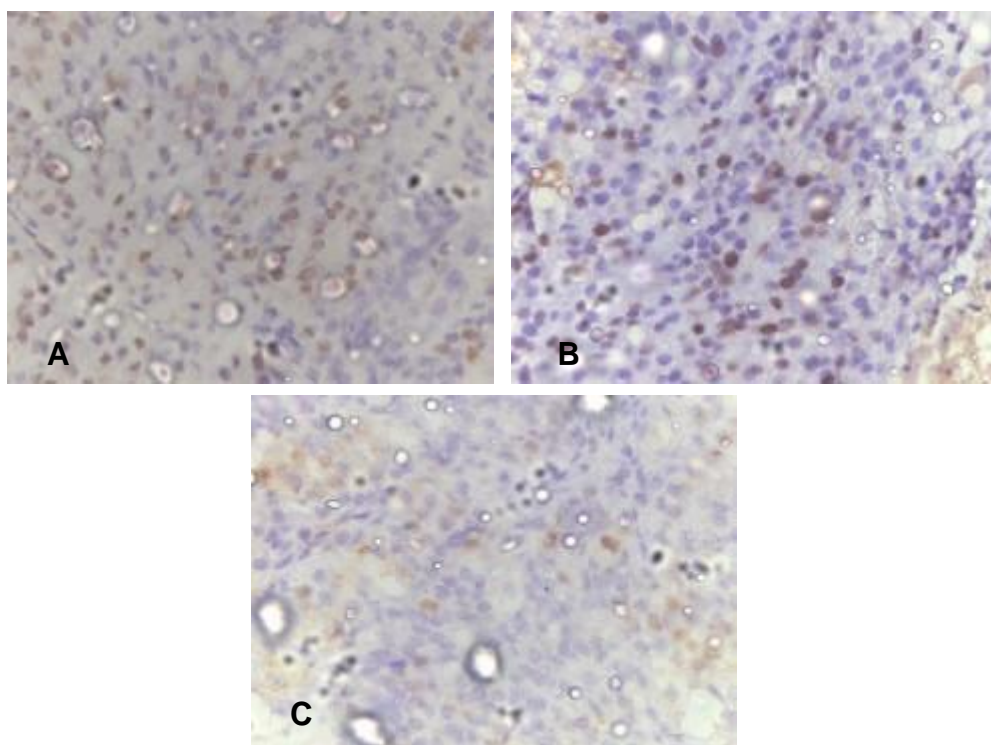


Figura 10. Imuno-histoquímica para antígeno Ki 67 dos tecidos tumorais dos ratos induzidos com DMBA. A) controle, B) tratados com pentoxifilina e C) tratados com talidomina,. A) (Aumento original de 400X)

O gráfico 01 representa a média da porcentagem de células Ki 67 positivas por campo microscópico (N = 5) com aumento de 400 X.

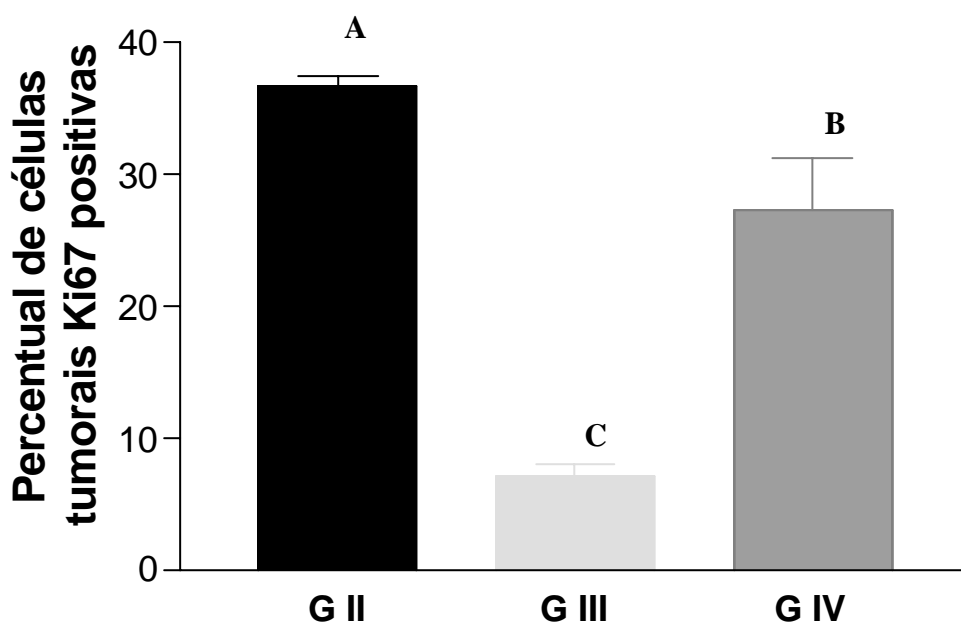


Gráfico 01. Média (n = 5) e desvio padrão da porcentagem de células Ki 67 positivas por campo microscópico, dos tumores transplantados em animais que não receberam tratamento (Grupo II), em animais após o tratamento com talidomida (Grupo III) ou após o tratamento com pentoxifilina (Grupo IV). Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste U de Mann-Whitney.

5.7 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE TNF -a E INF-?

Os níveis séricos das citocinas TNF- a e INF- ? foram detectados através do método de ELISA. O gráfico 03 representa esquematicamente a média do nível sérico basal, de TNF-a em animais que não foram submetidos à indução da carcinogênese. Grupo I comparado com a média do nível sérico obtido dos animais que receberam transplante de células tumorais Grupo II.

Foi observado que os animais que desenvolveram os tumores induzidos pela transferência de células tumorais apresentaram um nível sérico de TNF-a significativamente maior do que os animais do grupo I

No gráfico 03 são apresentados (em média \pm desvio padrão) os resultados dos níveis séricos de TNF- α nos diferentes grupos do experimento.

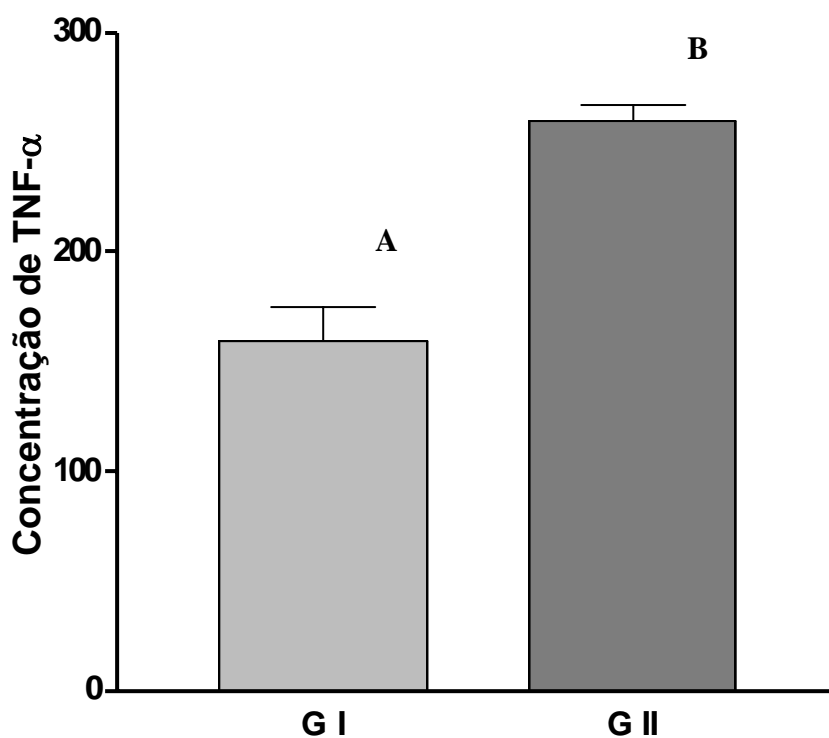


Gráfico 03: Análise comparativa da produção média de TNF- α , em picogramas por mililitro, de animais controle não transplantados (Grupo I) e de animais que desenvolveram os tumores de mama após o transplante (Grupo II). (P<0.05). Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste U de Mann-Whitney.

Os dados apresentados no gráfico 04 demonstraram que o tratamento com talidomida foi capaz de reduzir significativamente os níveis séricos do

TNF- α nos animais que desenvolveram os tumores induzidos por transplantes. Constatou-se que os níveis séricos do Grupo III e IV foram próximos dos níveis séricos basais (Grupo I).

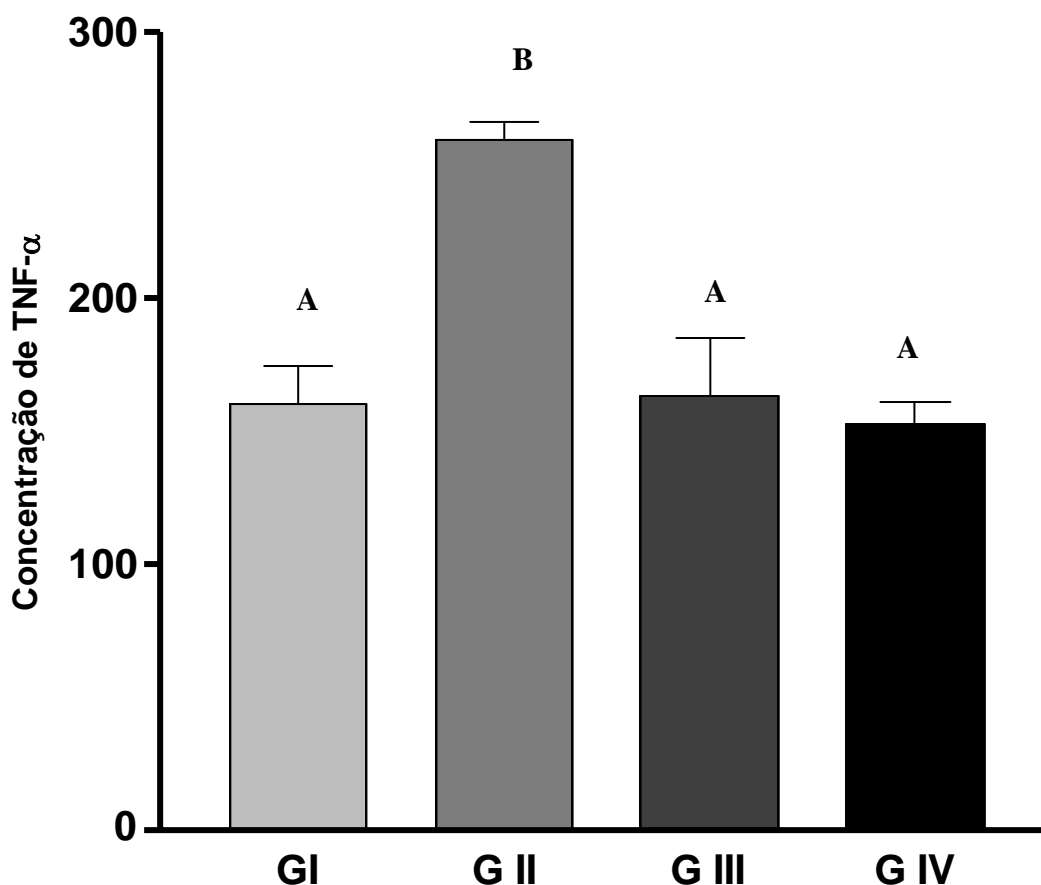


Gráfico 04: Análise comparativa das médias de produção ($n=4$) de TNF- α , em picogramas por mililitro, de animais controle (Grupo I), animais que apresentaram tumores de mama após o transplante e que não receberam tratamento (Grupo II), de animais com tumores mamários transplantados tratados com talidomida (Grupo III) e de animais transplantados tratados com pentoxifilina (Grupo IV). Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste U de Mann-Whitney.

Os níveis séricos de INF- γ foram avaliados utilizando o método de ELISA. O gráfico 05 apresenta os dados obtidos (média \pm desvio padrão) do grupo I e II, igual ao descrito anteriormente. Foi demonstrada diferença significativa entre as médias dos níveis séricos de INF- γ dos animais que desenvolveram os tumores induzidos pela transferência de células tumorais em relação aos animais do grupo I

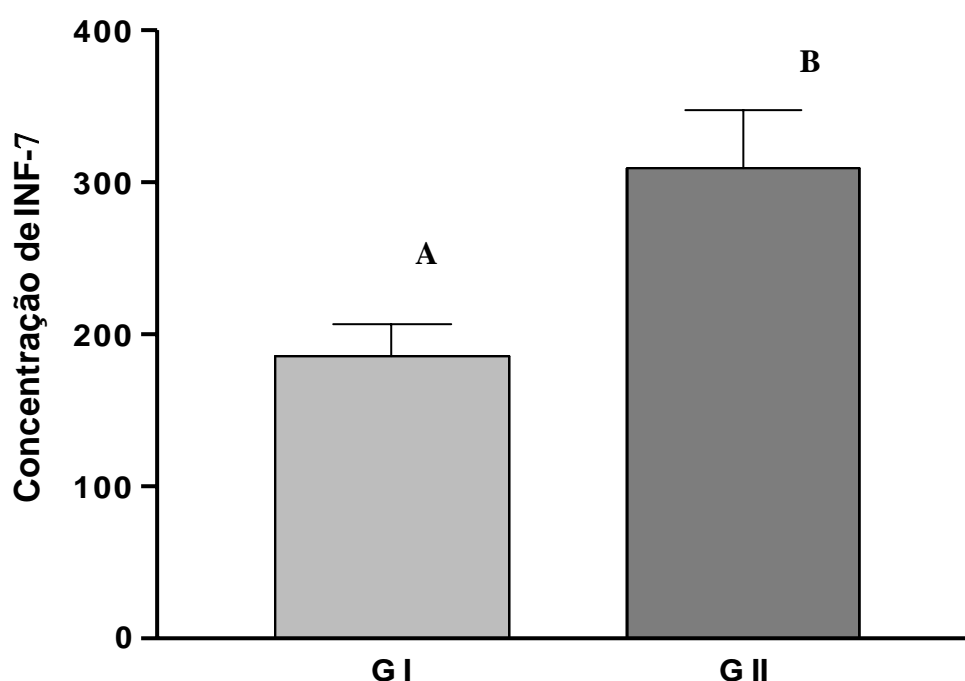


Gráfico 05: Análise comparativa da produção média (n = 4) de IFN- γ , em picogramas por mililitro, de animais controle não transplantados (Grupo I) e de animais que desenvolveram tumor de mama após o transplante (Grupo II). Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste U de Mann-Whitney.

Conforme observado no gráfico 06, animais transplantados e tratados com talidomida ou com pentoxifilina não tiveram uma redução significativa na produção do IFN- γ em relação aos animais controle transplantados e que não sofreram nenhum tratamento.

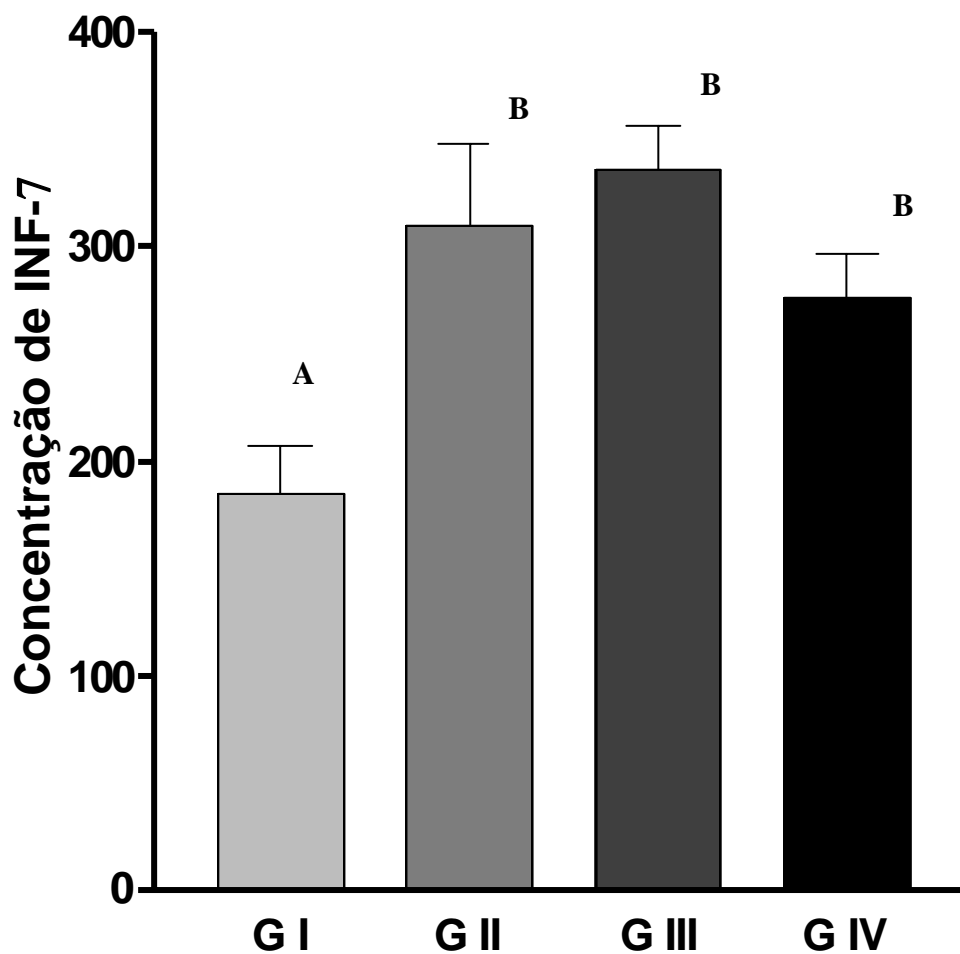


Gráfico 06: Análise comparativa da produção média ($n = 4$) de IFN- γ em picogramas por mililitro, de animais controle (Grupo I), animais que desenvolveram tumor de mama após o transplante e que não foram tratados (Grupo II), animais com tumores mamários tratados com talidomida (Grupo III) e animais com tumores mamários tratados com pentoxifilina (Grupo IV). Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste U de Mann-Whitney.

6. DISCUSSÃO

Embora seja um modelo experimental amplamente utilizado em estudos experimentais, a indução química do câncer de mama através do DMBA, apresenta limitações quanto ao percentual de animais que, efetivamente, desenvolvem o carcinoma mamário.

HILAKIVI-CLARKE *et al* (2000) observaram que um pequeno percentual de ratas Sprague Dawley induzidas com DMBA desenvolveram tumores mamários; DUSING-SWARTZ *et al* (1979) também conseguiram poucos animais BALB/cCrg1Me e BALB/cfC3HCrg1 com tumores após a indução com DMBA, demonstrando ser uma prática comum a utilização de um número muito pequeno de animais nos diferentes grupos experimentais.

Alguns autores sugerem que as glândulas mamárias apresentam-se em fases distintas de seu desenvolvimento, e os padrões de transdução de sinal operativos é inexistente nestas fases. Visto que o estrogênio e a progesterona são importantes na proliferação e na diferenciação, estimulando as sub-

populações específicas de receptores, os mensageiros secundários, e na resposta ao fator de crescimento nas populações de células mamárias faz-se necessário interpretar eficazmente os mecanismos subjacentes ao estado refratário e compreender os processos biológicos básicos envolvidos na regulação do crescimento e da diferenciação das células (GINGER *et al*, 2001; D'CRUZ *et al*, 2002).

Trabalhos demonstraram o papel importante do gene supressor do tumor (p53) na proteção hormônio-induzido. Embora o mecanismo pelo qual os hormônios ativam a função do p53 ainda seja desconhecido, é provável que o p53 seja somente um dos muitos genes que são importantes para a proteção hormônio-mediada. Trabalhos apresentando o perfil da expressão do gene demonstraram uma disposição consistente das alterações nos genes que envolvem o fator do crescimento e os reguladores da transcrição do gene da glândula mamária. Adicionalmente, dados da literatura mostraram a importância dos hormônios como um fator preventivo significativo (GINGER *et al*, 2001; D'CRUZ *et al*, 2002; WALCHNER, *et al*, 2003).

A susceptibilidade da glândula mamária à tumores induzidos por DMBA é fortemente idade-dependente, sendo máxima quando a droga é administrada aos ratos entre as idades de 45 e 60 dias, que é a idade do começo da organogênese sexual da mama com elevada taxa de proliferação dos lóbulos do tipo 1 e 2. Portanto, a possibilidade química de se induzir o câncer de mama nos ratos é maior se o DMBA for administrado nesta fase da vida dos animais.

Embora se tenha utilizado animais nessa faixa etária os resultados não foram animadores. No primeiro experimento com 15 animais, apenas 1 animal desenvolveu o tumor e no segundo experimento, também com 15 animais, apenas 6 animais desenvolveram lesões tumorais. Deste modo, além do número de animais ser pequeno, o experimento não é reproduzível na homogeneidade.

A glândula mamária é um dos poucos órgãos que não estão totalmente desenvolvidos no nascimento. Submete-se a modificações evolutivas e funcionais intensas durante a puberdade, a gravidez e a lactação (GRUBBS *et al*, 1986).

RUSSO e RUSSO (1994) descreveram o desenvolvimento do tecido humano da mama e classificaram quatro tipos diferentes de lóbulos mamários. O tipo 1 (ou virginal) é predominantemente indiferenciado e ocorre na mama de mulheres jovens antes da menarca. O tipo 2 tem uma morfologia mais complexa, sendo composto por um número mais elevado de estruturas ductulares por lóbulo. Já o tipo 3 tem em média 80 alvéolos (ductulares) e se forma sob estímulo hormonal da gestação. O tipo 4, por sua vez, é um lóbulo secretor durante a lactação. O grau de diferenciação lobular é importante na susceptibilidade ao câncer. Baseando-se em estudos da patogênese do câncer de mama humano, é possível dizer que o lóbulo tipo 1 é o local de origem das lesões pré-neoplásicas.

O DMBA é altamente lipofílico e requer a ativação metabólica para sua carcinogenicidade. Diversos tecidos são capazes de ativar o DMBA, e estes incluem a glândula mamária. O DMBA é convertido em epóxidos, metabólitos ativos com capacidade de danificar a molécula do DNA, evento principal na iniciação da carcinogênese. Com o índice de proliferação celular mais elevado nos lóbulos tipos 1 e 2, há uma atividade metabólica maior e, conseqüentemente maior formação de epóxido (CHAPLIN e DOUHERTY, 1999; RUSSO, *et al*, 2003;).

Nos organismos multicelulares a taxa de proliferação de cada tipo celular é controlada com precisão por um sistema altamente integrado que permite a replicação celular apenas dentro dos estreitos limites que mantêm a população normal em níveis homeostáticos. Como na grande maioria dos tecidos e órgãos, a divisão celular para restaurar as perdas decorrentes do processo de envelhecimento celular normal, a replicação celular é atividade essencial para o organismo. No entanto ela deve seguir um controle rígido imposto ao sistema, pois, se feita para mais ou para menos, o equilíbrio se quebra. Nas neoplasias sempre, existe proliferação celular descontrolada (RUSSO *et al.*, 2003).

Nas neoplasias em geral, ocorre paralelamente ao crescimento, perda da diferenciação ao tipo celular originário. Algumas vezes a depressão da proliferação atinge também outros genes, resultando em diferenciações

anômalas. Como resultado as células neoplásicas perdem progressivamente as características de diferenciação e se tornam, atípicas, ou seja, o metabolismo celular é desviado da diferenciação para a proliferação (BRASILEIRO, 2006).

A proliferação celular em condições normais é uma atividade complexa, depende da atuação coordenada de vários genes, os quais controlam o processo em resposta a estímulos internos e externos. A célula neoplásica sofre alteração intrínseca nos seus mecanismos regulatórios da multiplicação, adquire autonomia de crescimento e se torna independente dos controles externos.

Estudos demonstraram que o DMBA ativa o gene c-ha-ras pela indução, uma transverso de A-T no códon 61, tanto em ratos e em camundongos. Entretanto o DMBA pode também provocar o aparecimento de hiperplasias mamárias não associadas à ativação daquele oncogene. A transverso é um tipo de mutação pontual, sendo as mesmas classificadas por afetar um único par de bases e são consideradas as principais causas das doenças genéticas, esse tipo de mutação é menos freqüente, implica a substituição de uma purina por uma pirimidina ou vice versa (OGA, 2003).

No presente trabalho observamos que somente o tratamento com talidomida foi capaz de promover uma redução da progressão tumoral. A atividade proliferativa foi mensurada via expressão da proteína Ki 67, que teve seus níveis reduzidos significativamente nos animais tratados com talidomida

quando comparado com os animais controle.

No presente experimento os resultados demonstraram que 5 semanas após o transplante do tumor mamário houve um aumento na produção do TNF- α em animais que desenvolveram o tumor quando comparados aos animais que não receberam o transplante. Considerando a natureza da resposta imunológica Th1, este aumento já era esperado, sendo o TNF- α uma importante citocina pro - inflamatória mediadora da resposta celular. Com relação a produção de INF- γ não foi observada diferença significativa entre os animais tratados e os animais controle.

Caracteristicamente a imunidade celular é considerada o principal tipo de resposta imune contra o câncer sendo o INF- γ e o TNF- α importantes citocinas regulatórias envolvidas em diversas fases da resposta imunológica durante o desenvolvimento das neoplasias malignas. O macrófago ativado pelo INF- γ corresponde a principal célula produtora de TNF- α . O papel dos macrófagos no crescimento e progressão tumoral é complexo.

A resposta imunológica adquirida é mediada por células T que reconhecem os antígenos derivados de peptídeos tumorais através de células apresentadoras de antígenos (APC) via complexo maior de histocompatibilidade (MHC). Células tumorais podem servir de APC. Embora dependam da quantidade de MHC expressa para reprocessar antígenos (SELIGER ET AL., 2002). O reconhecimento do peptídeo pelo complexo específico receptor de células T (TCR) sinaliza para a ativação destas células

(IRVING, WEISS, 1991). A resposta imunológica às células malignas podem também ser caracterizada como sistêmicas ou loco-regional. A resposta local é representada principalmente pelos *tumor-infiltrating lymphocytes* (TIL) que se acumulam em tumores sólidos. Para alguns autores, entretanto, os tumores crescem e geram metástase independente da quantidade e aspectos funcionais dos infiltrados (WHITESIDE, 2003).

Durante a carcinogênese, um grande número de alterações genéticas e epigenéticas ocorrem, gerando, nas lesões malignas, uma série de antígenos associados a tumores (TAAs). Um ponto central na imunologia do câncer é o reconhecimento desses antígenos, dos aspectos da tolerância e da ativação da resposta imunológica. Enquanto as células do sistema imunológico geram uma grande resposta nas lesões infecciosas, os TAAs podem ser percebidos como “próprios”, e, na ausência de sinais inflamatórios de perigo, a resposta a estes antígenos pode ser fraca (WHITESIDE, 2003). No presente trabalho o transplante de células tumorais apresenta viabilidade porque os antígenos tumorais envolvidos são oriundos de animais do mesmo gênero e espécie.

Os resultados deste trabalho revelaram que a talidomida atuou como imunomodulador diminuindo significativamente o índice de proliferação celular e o tamanho dos tumores mamários transplantados nas ratas wistar. Ocorreu uma manutenção dos níveis séricos de INF- γ e uma diminuição dos níveis séricos de TNF- α nos animais tratados com talidomida e pentoxifilina. Portanto, os nossos resultados sugerem que a talidomida e pentoxifilina diminuem os níveis séricos de TNF- α sem, entretanto provocar alterações nos processos de

ativação dos macrófagos via INF- γ . Tal fato é interessante porque provavelmente não houve um “dowregulation” da imunidade celular antitumoral, visto que os níveis séricos de INF- γ foram semelhantes nos animais controle e tratados. Grandes infiltrados de TAMs estão relacionados a alto grau histológico, necrose e pior diagnóstico, numa lista de tumores, entre eles o câncer de mama (CORRAL et al., 1999). Apenas um dos trabalhos relacionou o TAMs com ausência de metástase em tumores (VOLODKO et al., 1998). Os macrófagos, em geral, não exibem citotoxicidade tumoral, a menos que estimulados por fatores como INF- γ e LPS. A citotoxicidade pode ser dividida em dois tipos: citotoxicidade tumoral mediada por macrófagos (MTC) e citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC). A primeira envolve a secreção de fatores líticos dentro da neoplasia; um exemplo de fator citotóxico liberado é o TNF- α . O ADCC é dependente de anticorpos, mas atua de maneira semelhante ao MTC na lise de células tumorais. INF- γ produzido por células T e células NK induz o macrófago a liberar oxigênio ativo, espécies nitrogenadas e óxido nítrico NO (YOUNG e HARDY, 1995).

O TNF- α atua através de vários mecanismos na resposta imune antitumoral durante o desenvolvimento da carcinogênese. O TNF- α é um importante mediador da resposta inflamatória antitumoral que por sua vez está associado à um processo de angiogênese e conseqüentemente nutrição e progressão tumoral (CARVALHO *et al*, 2007). Recentemente diversos trabalhos associam o desenvolvimento da resposta inflamatória no sítio de desenvolvimento do tumor com o aumento do risco de apresentação de tumores metastáticos (XIAO-XIA, *et al*, 2006).

Por outro lado, a produção de INF- γ pelos linfócitos induzindo a atividade de macrófagos e conseqüente produção de TNF- α e outras importantes moléculas mediadoras como óxido nítrico são fatores essenciais para o desenvolvimento da imunidade celular antitumoral. O desafio de drogas imunomoduladoras no tratamento do câncer consiste em procurar da melhor maneira possível balancear os efeitos com as diversas citocinas envolvidas na resposta imunológica tumoral (CARVALHO *et al*, 2007).

JOSEPH e ISAACS (1998) observaram uma redução 36% na produção de TNF- α em macrófagos estimulados tratados com talidomida. AARESTRUP *et al* (1995) observaram uma redução de 85% nos níveis séricos de TNF- α em animais estimulados com BCG e tratados com talidomida. Segundo MALONNE (2005) a talidomida inibe a angiogênese em parte pela inibição de NF- κ B, TNF- α , IL6 e VEGF, aumentando a apoptose e estimulando a resposta imune. D AMATO *et al* (1994) observaram que a talidomida inibiu a área de vascularização na córnea de ratos em aproximadamente 36%.

Os níveis deletérios ou protetores do TNF alfa seriam dependentes dos níveis absolutos destas citocinas (ZHANG *et al*, 2005). Citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , bloqueiam o crescimento de tumores de mama por prejudicar os sinais de receptores do fator de crescimento (BROWNE, 2002). Por outro lado, também é possível que citocinas inflamatórias possam, de fato, desempenhar um papel crucial na metástase do tumor por induzir a libertação de fatores solúveis de uma variedade de linhagens de células

tumorais que são capazes de regular a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais bem como o processo de angiogênese (SMIANTONAKI *et al* 2002 KUMAR *et al*, 2004; NOOPUR, 2004; GEITZ, 2004).

Na sua progressão, os tumores diferem dos tecidos normais tanto na composição do arsenal antigênico quanto no comportamento biológico. Do ponto de vista molecular, as células tumorais apresentam instabilidade genética e epigenética, expressão anormal de fatores de crescimento e citocinas. Nos tecidos normais, observa-se um genoma e a produção de citocinas estáveis. Os tumores apresentam novos antígenos e densidades alteradas destes antígenos, e, como consequência um potencial para indução de resposta inflamatória o que ativa a resposta imunológica inata e adquirida e a possibilidade de gerar sinais inibitórios. Muitas vezes não é necessário o aparecimento de novos antígenos para desencadear uma resposta imunológica, uma mudança de densidade de proteínas codificadas pode afetar dramaticamente a antigenicidade tumoral. Durante a cascata das metástases, com invasão dos tecidos, há perda da arquitetura normal e a elaboração de sinais pro-inflamatórios, o que pode provocar a iniciação da resposta imunológica (GNANT *et al.*, 2000; FUJITA *et al.*, 2004; WHITESIDE, 2003).

Para CHING *et al* (1998), a pentoxifilina também é conhecida como uma droga que inibe a produção de TNF- α em resposta a administração de substância como o lipopolissacarídeo bacteriano. Entretanto, segundo os autores, o mecanismo pelo qual a petoxifilina inibe a produção de TNF- α sérico

não é bem esclarecido. Em cultura de células, a inibição do TNF-a é dependente das condições de cultivo e do tipo de célula.

Níveis elevados de TNF-a são induzidos precocemente em endotoxemia em seres humanos. A presença de um grande número de receptores tipo I e II para TNF-a são fatores preditivos para a falência renal aguda em pacientes com choque séptico por endotoxinas. A utilização da pentoxifilina demonstrou ser útil na redução dos níveis séricos de TNF-a em ratos com endotoxemia por lipopolissacaríd eos atuando como um fator protetor contra a falência renal (WANG et al, 2006).

7 CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu chegar a considerações sobre um efeito modulador da pentoxifilina e da talidomida sobre carcinogênese mamária experimental

7.1 - Visto que o nível sérico de TNF- α e INF- γ foram semelhantes nos animais tratados com talidomida e pentoxifilina, podemos concluir que a redução da massa tumoral observada somente nos animais tratados com talidomida não ocorreu exclusivamente devido a modulação destas citocinas. Os animais tratados com pentoxifilina não apresentaram redução da massa tumoral embora tenha sido observada uma redução dos níveis séricos de TNF- α semelhante ao observado nos animais tratados com talidomida.

Portanto, esses resultados sugerem que a talidomida foi capaz de reduzir o tamanho dos tumores quimicamente induzidos e transplantados nos animais, não somente devido à modulação da síntese de TNF- α , mas também por outros mecanismos ainda não esclarecidos.

7.2 - O modelo de indução química de câncer de mama em ratas Wistar utilizando o DMBA por gavagem gástrica é um modelo clássico da literatura. Entretanto o número de animais que desenvolvem câncer a partir da indução foi muito reduzido e o período de tempo foi muito extenso. Sendo este modelo limitado para testar fármacos com atividade antitumoral.

7.3 - A utilização de transplantes de células tumorais de mama é uma ferramenta que possibilita um número muito grande de animais com câncer para modelos experimentais. Sendo este um excelente modelo para estudar diversos aspectos da imunologia do câncer e novas possibilidades terapêuticas.

7.4 - A talidomida foi capaz de reduzir a proliferação celular e conseqüentemente o tamanho dos tumores mamários transplantados nas ratas wistar. O mecanismo de ação pode envolver a redução dos níveis séricos de TNF- α . Entretanto, outras vias de modulação devem ser envolvidas visto que a pentoxifilina também reduziu níveis séricos de TNF- α e não apresentou redução da atividade tumoral.

7.5 - Finalmente concluiu-se que a talidomida pode ser uma importante droga a ser utilizada nos esquemas terapêuticos para o tratamento de câncer de mama. Entretanto, novos experimentos em animais e humanos devem ser realizados para confirmar essa hipótese e para melhor compreender o mecanismo de ação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F. M., GONÇALVES-DA-COSTA, S. C., SARNO, E. N. The effect of thalidomide on BCG-induced granulomas in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res**, **28**:1069-1076, 1995.

ALBERTS B, BRAYD D, LEWYS J, et al. **Biologia molecular da célula**. Porto alegre: Artes Médicas, 1997.

AMBRUS, J. L., TOUMBIS, C. A., KARAKOUSIS, C. P, *et al* . Study of antiangiogenic agents with possible therapeutic applications in neoplastic disorders and macular degeneration. **J. Med**, **31**: 278-82, 2000.

ASHKENAZI A, DIXIT VM. Deth receptors, signaling and modulation. **Science**, **281**: 1305-1308, 1998.

BALOGH GA, RUSSO IH, RUSSO J. Mutations in mismatch repairs genes are involved in te neoplastic transformation of human breast epithelial cells. **Int J Oncol.**, **23**:411-9, 2003.

BASU A, MOHANTY S, SUN B. Differential sensitivity of breast cells to tumor necrosis factor-a, involvement of protein kinase C. **Bioch and Biophy Res Commu.**, **280**: 883-891, 2001.

BEHMER, Oswaldo Arruda. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2ª ed. Manole, Barueri, SP, 2003.

BESSLER, H.; GILGAI, R.; DJALDETTI, M.; ZAHAVI, I. Effect of pentoxifylline on the phagocytic activity, cAMP levels, and superoxide anion production by monocytes and polymorphonuclear cells. **J Leuk Biol**. **40**: 747 – 754, 1986.

BEN-HUR H, KOSSOY G, ZANDBANK J, et al. Response of immune system of mammary tumor-bearing rats to cyclophosphamide and soluble low-molecular-mass tumor-associated antigens: Rate of lymphoid infiltration and distribution of T lymphocytes in tumors. **In J Mol Med.**, 9: 425-430, 2002

BENNETT, J. C.; PLUM, F. Cecil. Tratado de medicina interna. 20. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 1997.

BEREK, J. S.; ADASHI, E. Y.; HILLARD, P. A. Novak. Tratado de ginecologia. 12.ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 1998.

BRASILEIRO,G.;PEREIRA,F.E.L.;PITTELLA,J.E.H.;BAMBIRRA,E.A.;BARBOS A,A.J.A.;Patologia geral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

BORGES L G, FRÖEHLICH P E. Talidomida – Novas perspectivas para utilização como antiinflamatório, imunossupressor e antiangiogênico. **Rev Assoc Med Bras**, 49(1): 96-102, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Ação de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino - serviço. 2. ed. Rio de Janeiro: **INCA**, p380, 2008

BRASILEIRO, G.F. Patologia Geral. 3.ed. Belo Horizonte: **Guanabara Koogan**, 2006.

BROWNE, W. L., WILSON, W. R., BAGULEY, B. C., et al. Suppression of serum tumor necrosis factor-alfa by thalidomide does not lead to reversal of tumor vascular collapse and anti-tumour activity of 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic. **Anticancer Res**, **18**: 4409-13, 1998.

CALABRESE L, FLEISCHER A B J. Thalidomide: Current and potential clinical applications. **Am J Med**, 108: 487-495, 2000.

CARLIN, J.M.; BORDEN, .C.; SONDEL, P.M.; BYME, G.I. Interferon-induced indolamine 2,3- dioxygenase activity in human mononuclear phagocytes. **J Leukoc Biol.** 45: 29 – 34, 1989

CAMPBELL C L, SAVARESE D M, QUESENBERRY P J, et al. Expression of multiple angiogenic cytokines in cultured normal human prostate epithelial cells: predominance of vascular endothelial growth factor. **Int J Cancer**, 80(6): 868-874, 1999.

CARVALHO A T, SOUZA H, CARNEIRO A J, et al. Therapeutic and prophylactic in TNBS-induced colitis: Synergistic effects on TNF-alpha, VEGF production. **W. J. Gastroenterol.**, 13(15): 2166-2173, 2007.

CHAPLIN, D. J., DOUGHERTY, G. J. Tumor vasculature as a target for cancer therapy. **Br. J. Cancer**, 80: Suppl. 57-65, 1999

CHING, L-M., BROWNE, W. L., TCHERNEGOVSKI, R., *et al.* Interaction of thalidomide, phthalimide analogues of thalidomide and pentoxifylline with the anti-tumor agents 5,6-dimethylxanthenone-4acetic acid: concomitant reduction of serum tumor necrosis factor-alpha and enhancement of anti-tumor activity. **Brit. J. Cancer**, 78: 336-343, 1998.

CLARKE R. Issues in experimental design and endpoint analysis in the study of experimental cytotoxic agents in vivo in breast cancer and other models. **Breast Cancer Res Treat.**, 46:255-78, 1997

COLIGAN, J.E.; KRUISBEEK, A.M.; MARGULIES, D.H.; SHEVACH, E.M.; STROBER, W. **Curr pro immunol.** USA:John Wiley & Sons Inc., 1996.

COLLIN X, ROBERT J, WIELGOSZ G, et al. New anti-inflammatory N-pyridinyl(alkyl)pht necrosis factor-alpha production inhibitors. **Eur J Med Chem.**, 36: 639-49, 2001.

COLLINGRIDGE, D. R., ROCKWELL, S. Pentoxifylline improves the oxygenation and radiation response of BA1112 rat rhabdomyosarcomas and EMT6 mouse mammary carcinomas. **Int. J. Cancer**, 90: 256-64, 2000.

CORRAL L, HASLETT P, MULLER G. Differential Cytokine modulation and T cell activation by 2 distinct TNF-a. **J Immunol.** 163: 380-386, 1999.

D ÀMATO, R. J., LOUGHNAN, M. S., FLYNN, E., et al. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 91: 4082-5, 1994.

D'CRUZ C. M., MOODY S. E., MASTER S. R., HARTMAN J. L., KEIPER E. A., IMIELINSKI M. B., COX J. D., WANG J. Y., HA S. I., KEISTER B. A., CHODOSH L. A. Persistent parity-induced changes in growth factors, TGF- β 3, and differentiation in the rodent mammary gland. **Mol. Endocrinol.**, 16: 2034-2051, 2002.

DUSING-SWARTZ, STREITER, R.M.; REMICK, D.G.; WARD, P.A. et al. Cellular and molecular regulation of tumor necrosis factor production by pentoxifylline. **Biochem Biophys Res Commun** 155: 1230, 1988

FERRER F A, MILLER L J, ANDRAWIS R I, et al. Angiogenesis and prostate cancer: in vivo and in vitro expression of angiogenesis factors by prostate cancer cells. **Urology**, 51(1): 161-167, 1998.

FREITAS V, GOMES I, BITTENCOURT A, et al. Adult T-cell leukemia-lymphoma in a patient with HTLV-I/II associated myelopathy. **Arq Neuropsiquiatr.**, 158(2): 120-123, 1997

FUJITA K, ASAMI Y, TANAKA K, et al. Anti-angiogenic effects of thalidomide expression of apoptosis-inducible active-caspase-3 in a three-dimensional collagen gel culture of aorta. **Histochem Cell Biol**, 122: 27-33, 2004.

GANDHI A, HOLLAND PA, KNOX WF, POTEN CS, BUNDRED NJ Evidence of significant apoptosis in poorly differentiated ductal carcinoma in situ of the breast. **Br J Cancer** 78: 788-794, 1998.

GEITZ H, HANDT S, ZWINGENBERGER K. Thalidomide selectively modulates the density of cell surface m cascade. **Immunopharmacology.**, 31: 213-221, 2004.

GELATI, M., CORSINI, E., FRIGERIO, S., et al. Effects of thalidomide on parameters involved in angiogenesis: n in vitro study. **J. Neurooncol.** 64: 193-201, 2003.

GINGER M. R., GONZALEZ-RIMBUA M. F., GAY J. P., ROSEN J. M. Persistent changes in gene expression induced by estrogen and progesterone in the rat mammary gland. **Mol. Endocrinol.**, 15: 1993-2009, 2001.

GNANT, M. F., TURNER, E. M., ALEXANDER Jr, H. Effects of hyperthermia and tumor necrosis factor on inflammatory cytokine secretion and procoagulat activity in endothelial cells. **Cytokine**, 12: 339-47, 2000.

GRAU, GE.; VESIN, C.; DE GROOTE, DELACROIX, D.; GYSLER, C.; FIGUET, P.F; LAMBER, PH. Prevention of human TNF-induced cutaneous Shwartzmann reaction and acute mortality in mice treated with anti-human TNF monoclonal antibodies. **Clin. and Exp. Immunol**, 84: 411 - 414, 1989.

GRUBBS C. J, JULIANA M. M, HILL D. L, WHITAKER L. M. Suppression by pregnancy of chemically induced preneoplastic cells of the rat mammary gland. **Anticancer Res.**, 6: 2395-401, 1986.

GUINAN, P., SHAW, M., MIROCHNIK, Y., et al. Paclitaxel is more effective than thalidomide in inhibiting LNCaP tumor growth in a prostate cancer model. **Meth. Find Exp. Clin. Pharm.**, 20: 739-42, 1998.

GUTIERREZ-RODRIGUES, O.; STARUSTA-BACAL, P.; GUTIERREZ-MONTES, O. Treatment of refractory rheumatoid arthritis. The Thalidomide experience. **J. of Rheumatol** 162: 158 - 163, 1989.

HASEBE, Y., THOMSON, L. R., DOREY, C. K. Pentoxifylline inhibition of vasculogenesis in the neonatal rat retina. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 41: 2774-8, 2000.

HASHIMOTO, Y. "Structural development of biological response modifiers based on thalidomide." **Bioorg Méd Chem.** 10: 461 – 479, 2002.

HEN-I, L.; SHI-JYE, C.; WANG, D.; NAN-HSIUNG, F. Pharmacological modulation of TNF production in macrophages. **J Microbiol Immunol Infect** . 37: 8 – 15, 2004

HILAKIVI-CLARKE, MELLIN, G.W.; KATZENSTEIN, M. Thalidomide neurotoxicity and rheumatoid arthritis. **N Engl J Med.** 267: 1184 – 1193 e 1238 – 1244, 1962.

HUIZINGA, T. W. J., DIJKMANS, B. A. C., VANDERVELDE, E. A., et al. Na open study of pentoxifylline and thalidomide as adjuvant therapy in the treatment of rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, 55: 833-6, 1996.

IRVING BA WEISS A. The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. **Cell**, 64 (5): 891-901, 1991.

JOSEPH, I. B., ISAACS, J. T. Macrophage role in the anti-prostate cancer response to one class of antiangiogenic. **J. Natl. Cancer Inst.**, **90**: 1648-53, 1998.

KAUFMANN, S. H., EARNSHAW, W. C. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. **Exp. Cell. Res.**, **256**: 42-9, 2000.

KENYON, B. M., BROWNE, F., D'AMATO, R.J. Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization. **Exp. Eye. Res.**, **64**: 971-8, 2004.

KETTERHAGEN JP, QUACKENBUSH SR, HAUSHALTER RA. Tumor histology as a prognostic determinant in carcinoma of the breast. **Surg Gynecol Obstet.**, **158**(2): 120-123, 1984

KIM DM, KOO SY, JEON K, et al. Rapid induction of apoptosis by combination of Flavopiridol and tumor Necrosis Factor or TNF-related Apoptosis-inducing Ligand in Human Cancer Cells Lines. **Cancer Res.**, **63**(3): 621-626, 2003.

KINDLER V, SAPPINO AP, GRAU GE, PIGUET PF, VASSALLI P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. **Cell**. Mar 10;56(5):731-40, 1989.

KINUYA, S., KAWASHIMA, A., YOKOYAMA, K., *et al.* Cooperative effect of radioimmunotherapy and antiangiogenic therapy with thalidomide in human cancer xenografts. **J. Nucl. Med.**, **43**: 1084-9, 2002.

KOTOH, T., DHAR D. K., MASUNAGA, R. *et al.* Antiangiogenic therapy of human esophageal cancers with thalidomide in nude. **Surgery**, **125**: 536-44, 1999.

KRUSE, F. E., JOUSSEN, A. M., ROHRSCHEIDER, K., *et al.* Thalidomide inhibits corneal angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor. **Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalm.**, **236**: 461-6, 1998.

KUMAR S, WITZIG T E, RAJKUMAR S V. Thalidomid: current role in the treatment of non-plasma cell malignancies. **J Clin Oncol**, **22**(12): 2477-2488, 2004.

LUNA, L.G. **Manual of histologic attaining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3th ed. New York: McGraw- Hill Book Company, 258p. 1968

MALONNE, H., LANGER, I., KISS, R., et al. Mechanisms of tumor angiogenesis and therapeutic implications: angiogenesis inhibitors. **Clin. Exp. Metast**, **17**: 1-14, 1999.

MARRIOT J B, CLARKE I A, CZAJKA A, et al. A novel subclass of thalidomide analogues which caspase-dependent apoptosis is associated with altered expression of bcl-2. **Cancer Res.**, **63**: 592-599, 2003

MARRIOT J B, MULLER G, DALGLEISH A G. Thalidomide as na emerging immunotherapeutic agent. **Immunol Today**. **20**(12):538-540, 2003.

MELLIN, G.W.; KATZENSTEIN, M. Thalidomide neurotoxicity and rheumatoid arthritis. **N Engl J Med**. **267**: 1184 – 1193 e 1238 – 1244, 1996.

MOORE R J, OWENS D M, STAMP G, et al. Mice deficient in tumor necrosis factor- α are resistant to skin carcinogenesis. **Nat Med**, **5**(7): 828-831, 1999.

MOOS R V, STOLZ R, CERNY T, et al. Thalidomide: from tragedy to promise. **Swiss Med Wkly**, **133**: 77-87, 2003.

MOREIRA, L.A.; SAMPAIO, E.P, ZMUIDZINAS, A.; FRIND, P.; SMITH, K.A.; KAPLAN, G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor α by enhancing mRNA degradation. **J. Exp. Med**, **177**: 1675 - 1680, 1993.

MURAD T. M, VON HAAM E. Studies on mammary carcinoma induced by 7,12-dimethylbenzanthracene administration. **Cancer Res.**, **32**:1404-15, 1972

NAKAMURA T, NOGUCHI T, MIYACHI H, HASHIMOTO Y. Hydrolyzed metabolites of thalidomide: synthesis and TNF- α production-inhibitory activity. **Chem Pharm Bull**, **55** (4): 651-4, 2007.

NOEL, P.; NELSON, S.; BOKULIC, R.; BAGBY, G.; LIPPTON, H.; LIPSCOMB, G.; SUMMER, W. Pentoxifylline inhibits lipopolysaccharide-induced serum tumor necrosis factor and mortality. **Life Sci** **47**: 1023 - 1029, 1998.

NEUNER, P.; KLOSNER, G.; SCHAUER, E.; et al. Pentoxifylline *in vivo* down regulates the release of IL1 β , IL-6, IL -8 and tumor necrosis factor- α by human peripheral blood mononuclear cells. **Immunol.** 83: 262, 1994.

OGA, S.;SIQUEIRA, M.E. P. B.Fundamentos de toxicologia. 2.ed. Sao Paulo: **Atheneu**,. pag 85, 2003

OLD, L., J. Tumor necrosis factor (TNF) **Sci.** 230: 630 – 633, 1985.

PETERS, T. G., LEWIS, J. D., WILKINSON, E. J., *et al.* Danazol therapy in hormone -sensitive mammary carcinoma. **Cancer**, **40**: 2797-2800, 1997.

RAJKUMAR S V, WITZIG T E. A review of angiogenesis and antiangiogenic therapy with thalidomide in multiple myeloma. **Cancer Treat Rev**, 26: 351-362, 2004.

RAJKUMAR, S. V. Current status of thalidomide in the treatment of câncer. **Oncology (Huntingt)**, **15**: 867-74, 2001.

RAMAKRISHNAN R, WERBECK K, KHURANA K K, ET AL. Expression of interleukin-6 and Tumor Necrosis Alpha and Histopathologic Findings in Painful and Nonpainful Breast Tissue. **Breast J.**, 9(2): 91-97, 2003.

RHODEN E L, RHODEN C R. Princípios e Técnicas em Experimentação Animal. Porto Alegre, Ed. Da UFRGS, 2006.

RIENECK, K.; DIAMANT, M.; HAAHR, P.M.; SCHONHARTING, M.; BENDTZEN, K. *In vivo* immunomodulatory effects of pentoxifylline. **Immunol Lett.** 37: 131, 1993.

RUSSO I. H, RUSSO J. Developmental stage of the rat mammary gland as determinant of its susceptibility to 7,12-dimethylbenzan(a)thracene. **J Natl Cancer Inst.**, 61:1439-42, 1978.

RUSSO J, GUSTERSON B. A, ROGERS A. E, *et al.* Biology of disease: comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. **Lab Invest.**, 62:244-77, 1990.

RUSSO J, LARREF M. H, BALOGH G, *et al.* Estrogen and its metabolites are

carcinogenic agents in human breast epithelial cells. **J Steroid Biochem Mol Biol.**, 37:1-25, 2003

RUSSO J, RUSSO I.H. Experimentally induced mammary tumors in rats. **Breast Cancer Res Treat.**, 39: 7-20, 1996.

RUSSO J, RUSSO I.H. Toward a physiological approach to breast cancer prevention. **Cancer Epidemiol Biomark Prev.**, 3:353-64, 1994.

RUSSO J. RUSSO I.H. Biological and molecular bases of mammary carcinogens. **Lab Invest.**, 57:112-37, 1987.

SAMPAIO, E. P., SARNO, E. N., GALILY, R., et al. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes, **J. Exp. Med.**, **173**: 699-703, 1991.

SARNO, E.M.; GRAU, G.E.; VIEIRA, L.M.M.; NERY, A.C. Serum levels of TNF- α and IL-1 beta during leprosy reactional states. **Clin. Exp. Immunol.** 84: 103-108, 1990.

SCHULER U., EHNINGER G. Thalidomide: rationale for renewed use in immunological disorders. **Drug Saf.** 12: 364-369,1995.

SEE D, MASON S, ROSHAN R. increased Tumor Necrosis Factor alpha (TNF-alpha) and Natural Killer cell (NK) Function Using an Integrative Approach in Late Stage Cancers. **Immunol Invest**, 31(2) 137-153, 2002.

SELINGER B, CABRERA T, GARRIDO F, et al. HLA class I antigen abnormalities and immune scape by malignant cells. **Semin Cancer Biol.**, 12(1): 3-13, 2002.

SHANNON, E. J., SANDOVAL, F Thalidomide increases the synthesis of IL -2 in cultures of human mononuclear cells stimulated with concanavalin-A, staphylococcal enterotoxin A, and purified protein derivative. **Immunopharm.**, **31**: 109-16, 1995.

SHEN WH, ZHOU JH, BROUSSARD SR, FREUD GG, DANTZER R, KELLEY KW. Pro-inflammatory cytokines block growth of breast cancer tumors by

impairing the signals from a growth factor receptor. **Cancer Res.** 62: 4746-4756, 2002.

SIMIANTONAKI N, JAYASINGHE C, KIRKPATRICK CJ. Effects of pro-inflammatory stimuli on tumor cell-mediated induction of endothelial cell adhesion molecules *in vitro*. **Exp Mol Pathol** 73:46-53, 2002.

TEO S K. Properties of thalidomide and its analogues: implications for anticancer therapy. **AAPS J.**, 22: 1-9, 2005

TEO, S.K.; COLBURN, W.A.; TRACEWELL, W.G.; KOOK, K.A.; STIRLING, D.I.; JAWORSKY, M.S.; SCHEFFLER, M.A.; THOMAS, S.D.; LASKIN, O.L. Clinical pharmacokinetics of thalidomide. **Clin Pharmacokinet.** 43(5): 311 - 27, 2004.

TEICHER, B.A.; HOLDEN, S.A.; HERMAN, T.S.; EPELBAUM, R.; PARDEE, A.B.; DEZUBE, B. Efficacy of pentoxifylline as a modulator of alkylating agent activity *in vitro* and *in vivo*. **Anticancer Res.** 11(4): 1555 - 60, 1991.

TERUYA, R.; FAGUNDES, D.J., OSHIMA, C.T.F., BRASILEIRO, J.L., MARKS, M., YNOUYE, C.M., SIMÕES, M.J. The effects of pentoxifylline into the kidneys of rats in a model of unilateral hindlimb ischemia/reperfusion injury. **Acta Cir. Bras.** vol.23 (1), 2008

VERHEUL, H. M. W., PANIGRAHF, D., DÀMATO R. J. Combination oral antiangiogenic therapy with thalidomide and sulindac inhibits tumor growth in rabbits. **J. Cancer**, **79**: 114-118, 1999.

VIEIRA, B. J., DE SOUZA A. R., AARESTRUP, F. M. Tumor necrosis factor- α expression and detection of apoptosis at the site of chronic periodontitis in AIDS patients. **J. Periodont Res.** **38**: 606-610, 2003.

VOLODKO N, REINER A, RUDAS M, et al. Tumor-associated macrophages in breast cancer and their prognostic correlations. **Breast.**, 7: 99-105, 1998.

WAGNER K. U., BOULANGER C. A., HENRY M. D., SGAGIAS M., HENNIGHAUSEN L., SMITH G. H. An adjunct mammary epithelial cell population in parous females: its role in functional adaptation and tissue renewal. **Development.**, 129: 1377-1386, 2002.

WAJANT H, PFIZENMAIER K, SCHEURICH P. Tumor necrosis factor signaling. **Cell Death and Differentiation.**, 10(1): 45-65, 2003.

WALCHNER, M., MEURER, M., PLEWIG, G. Clinical and immunologic parameters during thalidomide treatment of lupus erythematosus. **Int. j. Dermatol.**, **39**: 383-8, 2000.

WHITESIDE T L. Immune responses to Malignancies. **J Allergy Clin Immunol.**, 111: 677-686, 2003.

XIAO-XIA Y, ZE-PING H, NA-LONG X, et al. A mechanistic study on reduced toxicity of irinotecan by coadministered Thalidomide, a Tumor Necrosis Factor-alpha inhibitor. **J. Phar Exp Therapeut.**, 819(1): 82-104, 2006

YACCOBS, S., JOHNSON, C. L., MAHAFFEY, S. C. *et al* . Antimyeloma efficacy of thalidomide in the SCID -hu model. **Blood**, **100**: 4162-8, 2002.

YOSHIDA, S. ONO, M., SHONO, T. et al. Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alfa -dependent angiogenesis. **Mol. Cell Biol.**, **17**: 4015-23, 1997

YOUNG H A, HARDY K J. Role of interferon-gamma in immune cell regulation. **J Leukoc boil.**, 58(4): 373-381, 1995.

ZHOU, S., KESTELL, P., TINGLE, M. D., et al. **Drugs Aging**, **19**: 85-100, 2002.