

ODILON AZEVEDO CALIAN

EFEITOS DA DOXORRUBICINA E TAMOXIFENO EM CAMUNDONGOS Balb/c  
MACHOS INOCULADOS COM TUMOR ASCÍTICO DE Ehrlich.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T	Calian, Odilon Azevedo, 1974-
C153e 2013	Efeitos da doxorrubicina e tamoxifeno em camundongos Balb/c machos inoculados com tumor ascítico de Ehrlich / Odilon Azevedo Calian. – Viçosa, MG, 2013. x, 48 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.
	Orientador: Marlene Isabel Vargas Vilorio. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa. Referências bibliográficas: f. 42-48
	1. Camundongo como animal de laboratório. 2. Quimioterapia. 3. Drogas. 4. Medicamentos - Administração. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.
	CDD 22. ed. 636.0896994

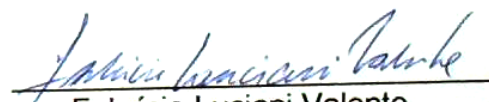
ODILON AZEVEDO CALIAN

**EFEITOS DA DOXORRUBICINA E TAMOXIFENO EM CAMUNDONGOS  
Balb/c MACHOS INOCULADOS COM TUMOR ASCÍTICO DE Ehrlich**

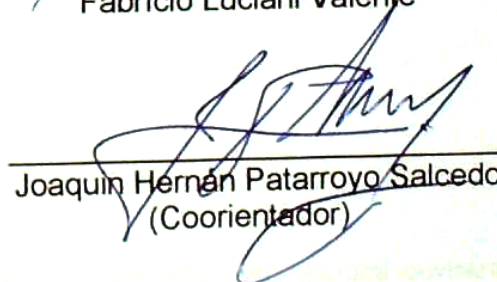
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

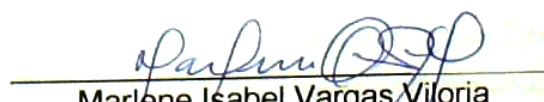
APROVADA: 05 de julho de 2013.

  
Anna Paula Baptista Ribeiro Ferreira

  
Fabrício Luciani Valente

  
Laércio dos Anjos Benjamin

  
Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo  
(Coorientador)

  
Marlene Isabel Vargas Vitoria  
(Orientadora)

“Nem olhos viram, nem ouvidos ouviram,  
nem jamais chegou ao entendimento  
humano o que Deus tem preparado para  
aqueles que o amam”.

(I Coríntios 2:7-9)

Dedico a realização deste trabalho aos meus pais, esposa e filho, pelo apoio oferecido, pela força e coragem que me deram para vencer as grandes dificuldades que tive para chegar até aqui.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma colaboraram com minha vida acadêmica, profissional e pessoal, contribuindo para tornar possível meu projeto (ou os meus projetos de vida) e fazendo dessa escolha uma realização mais plena.

À minha mãe Maria Ângela Azevedo Calian e ao meu pai Odilon da Silva Calian por todo o apoio não apenas nessa conquista, mas em todas as outras de minha vida. Obrigado também por todo carinho e compreensão extra trabalho. Amo muito vocês!

À minha esposa Graziella Paula Souza Calian, obrigado pela paciência, incentivo nas horas mais complicadas e pelos momentos mágicos.

Aos meus irmãos por todos os momentos vividos juntos, companheirismo e amizade, mesmo que em muitas ocasiões a distância aumente tanto as saudades.

Ao filho Gabriel Souza Calian, que tantas vezes esteve do meu lado, com seu jeitinho curioso e encantador.

À minha orientadora Marlene Isabel Vargas Vitoria, pela orientação, conselhos, paciência e amizade, que me fizeram crescer como pessoa e como profissional.

Ao professor Joaquin Hernan Patarroyo Salcedo, pela força e pelas oportunidades oferecidas.

À professora Márcia de Carvalho Vilela que tanto ajudou e cedeu células do Tumor de Ehrlich.

Ao professor Joao Paulo Machado pela ajuda, dicas e paciência.

A todo o pessoal do laboratório, especialmente Cláudio e Adão, e do Departamento de Veterinária, por todos os auxílios, mesmo que corridos, e bate-papos diários.

Agradecimento especial aos amigos do mestrado: Amara Manarino Andrade Goulart, Vinicius Zacarias Miranda e Paulo Victor da Silva Queiroz, pelo trabalho de todos os dias, pessoas que me fazem compreender como é atuar nessa profissão que tanto amo e que possibilita a prática de atividades de extensão em

comunidades, pelas conversas na cantina e nos corredores, pelo companheirismo nas disciplinas e pela amizade.

Ao pessoal da coordenação e à secretária Rosi, por todas as ajudinhas e conversas nas diferentes horas.

Com carinho, obrigado a todos.

## **BIOGRAFIA**

Odilon Azevedo Calian, filho de Maria Ângela Azevedo Calian e Odilon da Silva Calian, nasceu em 31/03/74, na cidade de Muriaé, Minas Gerais. É casado com Graziella de Paula Souza Calian com quem tem um filho, Gabriel.

Sua carreira acadêmica teve início em 2003, quando ingressou na graduação em Farmácia pela UNIG, se graduando em junho de 2007.

Pós graduado em Análises Clínicas em 2008 pela UNIG

Em agosto de 2010, ingressou no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, pela Universidade Federal de Viçosa – Viçosa, MG, sob a orientação da professora Marlene Isabel Vargas Vilorio, com área de concentração em Patologia Veterinária.

# SUMÁRIO

	<b>Pág.</b>
<b>RESUMO</b>	ix
<b>ABSTRACT</b>	x
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	2
2.1 Câncer, conceito e caracterização	3
2.2 Câncer de mama	3
2.2.1 Carcinogênese estrogênica no câncer de mama	3
2.2.2 Receptores hormonais em câncer de mama	4
2.3 Tumor ascítico de Erlich (TAE) como modelo experimental em camundongos	6
2.4 Quimioterapia	9
2.4.1 Agentes quimioterápicos	10
2.4.1.1 Moduladores seletivos do receptor de estrogênio (SERM)	12
2.4.1.1.1 Tamoxifeno	13
2.4.1.1.2 Farmacocinética: mecanismo de ação e metabolismo	13
2.4.2 Doxorrubicina	15
2.4.2.1 Mecanismo de ação da doxorrubicina	17
2.4.2.2 Farmacocinética da doxorrubicina	17
2.4.2.3 Indicações terapêuticas da doxorrubicina	18
2.4.2.4 Efeitos tóxicos da doxorrubicina	19
<b>3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b>	23
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	24
4.1 Normas de conduta para o uso de animais na pesquisa	24
4.2 Ativação e replicação do tumor ascítico de Ehrlich	24
4.3 Grupos experimentais	25
4.4 Análises hematológicas	26
4.5 Coleta de material para análises histológicas	26
4.6 Análises estatísticas	26
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	27
5.1 Análises hematológicas	27
5.1.1 Contagem de hemácias e hematócrito	27

5.1.2 Dosagem de hemoglobina	28
5.1.3 Contagem de leucócitos totais	29
5.1.4 Contagem de plaquetas	30
5.2 Análises histopatológicas	31
<b>6. CONCLUSÕES</b>	41
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	42

## RESUMO

CALIAN, Azevedo Odilon, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, 2013. **Efeitos da doxorubicina e tamoxifeno em camundongos Balb/c machos inoculados com tumor ascítico de Ehrlich.** Orientadora: Marlene Isabel Vargas Vilorio.

Alguns medicamentos, como o cloridrato de doxorubicina, atuam dentre outros mecanismos, desencadeando as vias da apoptose, que atingem não só o tumor, mas também as células normais do organismo. Por isso, o estudo dos efeitos colaterais dos quimioterápicos, buscando um tratamento menos agressivo para o paciente oncológico, justifica a realização deste trabalho. O objetivo foi verificar possíveis efeitos hematológicos e gastrointestinais das drogas doxorubicina e tamoxifeno quando utilizadas em terapia ou em conjunto, em camundongos machos portadores ou não do tumor ascítico de Ehrlich, com e sem terapia hormonal com cipionato de estradiol. Foram utilizados 40 camundongos Balb/C machos, divididos em grupos de 5 animais cada, totalizando-se 8 grupos. Ao final de 21 dias, foi coletado sangue para a realização de hemograma, avaliando-se parâmetros como contagem de hemácias e hematócrito, dosagem de hemoglobina, contagem de leucócitos totais e contagem de plaquetas e amostras do estômago e intestino dos animais tratados com cloridrato de doxorubicina, foram coletadas para análise histopatológica, avaliando-se quando presente, o grau das lesões no epitélio e o grau de necrose e apoptose das glândulas. A avaliação do número de hemácias e do valor do hematócrito apresentou diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) nos grupos I e VIII quando comparado aos demais grupos. A dosagem de hemoglobina demonstrou diminuição significativa no grupo I em relação aos grupos II, III, IV e V. A contagem do número de leucócitos demonstrou aumento significativo ( $p < 0,05$ ) quando se compararam os grupos I e VI com os demais grupos. As principais alterações histopatológicas evidenciadas no estômago e intestino delgado foram necrose e apoptose de glândulas e perda de epitélio de revestimento, sendo que o grupo VII demonstrou leve diminuição no grau das lesões em relação ao grupo V.

## ABSTRACT

CALIAN, Azevedo Odilon M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, 2013. **Effects of doxorubicin and tamoxifen in Balb/c male mice inoculated with Ehrlich ascites tumor.** Advisor: Marlene Isabel Vargas Vilorio.

Some drugs, such as doxorubicin, among other mechanisms act by triggering apoptosis, which not only affects the tumor but also normal cells in the body. Therefore, the study of the side effects of chemotherapy, seeking a less aggressive treatment for cancer patients, justifies this work. The objective was to investigate the hematological and gastrointestinal effects of doxorubicin and tamoxifen when used alone or in combination in male mice with or without the Ehrlich ascites tumor, with or without hormone therapy with estradiol cypionate. A total of 40 Balb / C male mice were divided into groups of 5 animals each, making 8 groups. At the end of 21 days, blood samples were collected for CBC (Complete Blood Count), aiming at evaluating parameters such as RBC count and hematocrit, hemoglobin, white blood cells count and platelets count. Samples of the stomach and intestines of the animals treated with hydrochloride doxorubicin, were also collected for histopathologic analysis, evaluating when present, the degree of damage to the epithelium and the degree of necrosis and apoptosis glands. The evaluation of the number of erythrocytes and the hematocrit value was significantly decreased ( $p < 0.05$ ) in groups I and VIII when compared to the other groups. Hemoglobin showed a significant decrease in group I in relation to groups II, III, IV and V. Counting the number of leukocytes showed a significant increase ( $p < 0.05$ ) when comparing groups I and VI with the other groups. The main histopathological changes evidenced in the stomach and small intestine were necrosis and apoptosis and loss of glands lining epithelium, and the group VII showed a slight decrease in the degree of lesions in group V.

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença de alta incidência e aproximadamente uma em cada cinco pessoas, em todo o mundo, poderá ser acometida pela mesma. Na medicina veterinária, o diagnóstico de processos neoplásicos tem aumentado, com isso, o tratamento das neoplasias têm importância fundamental, tanto na medicina humana quanto na veterinária. Assim, inúmeras pesquisas sobre novos tratamentos e também acerca do comportamento e desenvolvimento do câncer vem sendo desenvolvidas. A evolução tumoral vem sendo estudada desde 1906 com Paul Ehrlich, e para desenvolver esses estudos, muitos modelos experimentais têm surgido como ferramentas fundamentais.

A descoberta da transplantabilidade dos tumores foi de vital importância para a elucidação dos mecanismos pelos quais as neoplasias se instalam e se desenvolvem no organismo. Este processo permite; também, avaliar vários tratamentos quimioterápicos e analisar os mecanismos de escape imunológico do hospedeiro às neoplasias.

O tumor ascítico de Ehrlich (TAE) considerado como um adenocarcinoma de mama murino, é um modelo de tumor transplantável que se desenvolve na forma ascítica, quando células deste tumor são inoculadas intraperitonealmente em camundongos. Por outro lado, se estas mesmas células forem inoculadas por via subcutânea, uma massa sólida tumoral se desenvolve.

Os agentes quimioterápicos são utilizados para o tratamento de neoplasias e suas metástases, bem como para aliviar as síndromes paraneoplásicas. Alguns destes medicamentos, como o cloridrato de doxorubicina, atuam dentre outros mecanismos, desencadeando as vias da apoptose, que atingem não só o tumor, mas também as células normais do organismo. Por isso, o estudo dos efeitos colaterais dos quimioterápicos, buscando um tratamento menos agressivo para o paciente oncológico, justifica a realização deste trabalho, que utilizou como modelo experimental, camundongos machos onde a administração de cipionato de estradiol leva a diminuição da produção de testosterona, contribuindo assim para o melhor controle no estudo da influência do cipionato de estradiol no crescimento do TAE e seus efeitos hematológicos e gastrointestinais.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Câncer, conceito e caracterização

A palavra câncer tem origem do latim *câncer*, que significa caranguejo, designação dada à doença pela semelhança que existe entre as veias intumescidas ao redor do tumor, e as patas do caranguejo. Do grego *karkinos*, o termo é empregado para as úlceras neoplásicas não cicatrizantes; e *karkinōma*, para tumores malignos sólidos. Nesta perspectiva, o câncer está associado à sensação consciente ou inconsciente de ser consumido por dentro, reforçando a dimensão de doença incurável, entre outros significados (PASCOAL et al., 2010).

O câncer é definido como enfermidade multicausal crônica, com crescimento desordenado de células, que comumente invadem tecidos e órgãos, podendo se espalhar para outras regiões do corpo em forma de metástases (INCA, 2004). Sua prevenção tem tomado uma dimensão importante no campo da ciência, uma vez que foi apontada como a primeira causa de mortalidade no mundo (DOLL e PETO, 1981; WORD, 1997).

O aparecimento do câncer ocorre quando alterações genéticas interferem nos mecanismos normais de controle celular, podendo ser hereditário ou adquirido e, por isso, ser um processo de múltiplos estádios, ao nível de genótipos e fenótipos, envolvendo alterações cumulativas (BUNZ, 2001; ADAM et al., 2003).

O câncer nas últimas décadas ganhou maior dimensão, passando a ser um problema de saúde pública mundial. A estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS) para o ano de 2030 é de 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas portadoras da doença. No Brasil, o Instituto Nacional de Cancer estimou um total de 257.870 casos novos para o sexo masculino e 260.640 para o sexo feminino (INCA, 2012).

Na medicina veterinária não existem estimativas para as doenças neoplásicas, acreditando-se que em animais domésticos, como cães e gatos, a mortalidade por câncer tem sido crescente em função do aumento de suas expectativas de vida (CHALITA, 2002; LAVALLE et al., 2003).

## 2.2 Câncer de mama

O câncer da mama é a neoplasia maligna mais comum entre as mulheres dos países desenvolvidos, representando aproximadamente 20% de todos os tumores malignos. Ele é descrito como o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o primeiro entre as mulheres e, segundo estimativa do Instituto Nacional de Câncer, o número de novos casos esperados para o Brasil em 2012 é de 52.680, com projeção de 52 casos para cada 100 mil mulheres (INCA, 2012). Embora a investigação esteja cada vez mais desenvolvida, esta enfermidade continua a ter taxas de mortalidade elevadas em todo o mundo (GROSCLAUDE et al., 2007). De acordo com a literatura oncológica, o câncer de mama em mulheres antes dos 35 anos de idade é relativamente raro, acima dessa faixa etária sua incidência é crescente, rápida e progressiva. (INCA, 2012).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), foi registrado um aumento de 10 vezes do câncer de mama feminino nas décadas de 60 e 70 nas taxas de incidência ajustadas por idade nos Registros de Câncer de Base Populacional de diversos continentes. No Brasil, é a primeira causa de morte por câncer na população feminina, principalmente na faixa etária entre 40 e 69 anos e, em países do Ocidente, entre todas as causas de óbito, o câncer de mama feminino é o mais comum em mulheres abaixo da idade de 50 anos (SILVA, 2008).

O diagnóstico e o tratamento dos diferentes tipos de câncer, em todas as idades, sofreram expressivos avanços nos últimos 20 anos, possibilitando maior tempo de sobrevida aos pacientes, principalmente nas mulheres com câncer de mama. Métodos de imagem modernos e de biologia celular, bem como análises bioquímicas têm permitido diagnósticos mais apurados, acompanhamento adequado e avaliação do prognóstico dos pacientes. Além disso, Silva (2008) também destaca a importância do constante surgimento de medicamentos quimioterápicos mais eficazes e o emprego do esquema combinado de drogas.

### 2.2.1 Carcinogênese estrogênica no câncer de mama

Segundo Van Der Hage et al. (2001), desde os primeiros relatos sobre câncer de mama, há um aumento bastante consistente do risco associado a níveis séricos

elevados de estrogênio endógeno, teoria que foi consolidada definitivamente por Yager e Davidson, (2006) ao mostrar que, em animais experimentais, o tratamento com estrogênio leva ao desenvolvimento de tumores mamários, renais, hepáticos e uterinos. Quando em conjunto, estas observações confirmam a hipótese de que o estrogênio é um carcinógeno para a glândula mamária. Os mecanismos pelos quais os estrógenos contribuem em cada fase do processo carcinogênico (iniciação, promoção e progressão) são complexos.

Segundo os mesmos autores, as evidências sugerem a participação de metabólitos estrogênicos genotóxicos, de sinalização genômica e não genômica, mediada por receptores de estrogênio, que afetam a proliferação celular e a apoptose no tecido mamário. A amplitude com que essas duas vias contribuem para a carcinogênese estrogênica e os caminhos pelos quais polimorfismos genéticos e fatores ambientais modificam os efeitos destas vias ainda requerem análises mais aprofundadas.

Mesmo assim, o conhecimento sobre o papel central do estrogênio no câncer de mama já leva ao desenvolvimento de ações preventivas e terapêuticas, as quais bloqueiam a função de receptores hormonais ou reduzem drasticamente os níveis de estrogênio endógeno através da inibição de sua síntese (YAGER e DAVIDSON, 2006).

## 2.2.2 Receptores hormonais em câncer de mama

Os receptores hormonais são proteínas nucleares encontradas nas células do epitélio mamário que controlam a mediação dos efeitos do estrogênio e da progesterona neste epitélio. A sua positividade está associada a um menor risco de recidiva e aumento da sobrevivência (MANN et al., 2005).

Os receptores mais estudados no carcinoma da mama são os de estrogênio e os de progesterona. Como sucede com outros hormônios esteroides, o estrogênio e a progesterona penetram na célula onde se combinam com os seus ligantes e induzem a transcrição do ADN no núcleo (EISENBERG e KOIFMAN, 2001).

Chang et al. (1999) definiram o papel da imunoexpressão dos receptores hormonais como fator prognóstico, menos claro do que o comprometimento linfonodal e o tamanho do tumor inicial, mas associado a uma maior sobrevida.

Akhani et al. (2002) observaram um baixo nível de expressão de receptor de estrogênio em cânceres de mama familiares, particularmente aqueles associados às mutações do gene BRCA1 (gene humano que pertence à classe de genes conhecida como genes supressores de tumor), gene que regula o ciclo celular e previne a proliferação descontrolada.

A positividade na expressão do receptor de estrogênio está relacionada a longos intervalos livres da doença e maior sobrevida global, mas somente em pacientes com câncer de mama operável (TAUCHER et al., 2003). Outro estudo realizado por Giordano et al. (2003), com 187 pacientes que apresentavam tumores localmente avançados, encontrou que a não expressão de receptor de estrogênio e progesterona está associada com uma menor sobrevida global, utilizando-se de análise uni-variada.

Foulkes et al. (2004) ressaltam que o receptor de estrogênio está inversamente correlacionado com o grau tumoral. Esta observação é comprovada quando se observam os cânceres familiares, pois devido aos tumores associados às mutações de BRCA1 e BRCA2 serem em sua grande maioria de alto grau, eles são com maior frequência receptores de estrogênio negativos.

Chakravarthy et al. (2006) em seu estudo demonstraram que não há relação entre o receptor de progesterona e a resposta patológica ao tratamento, embora os receptores hormonais se mostrassem cada dia mais relacionados à resposta sistêmica das terapias adjuvantes.

Em análise multivariada, a imunexpressão dos receptores de estrogênio e progesterona permanecem fatores prognósticos independentes com um significativo impacto na sobrevida global dos pacientes (VAN DER HAGE et al., 2007).

Mais importante do que prognóstico favorável, a presença dos receptores de estrogênio e progesterona é fator altamente preditivo de resposta ao tratamento endócrino, neoadjuvante, adjuvante e paliativo. Esses tratamentos incluem os Moduladores seletivos do receptor de estrogênio (SERM), tais como o tamoxifeno, àblação ovariana que pode ser química ou cirúrgica, os inibidores da aromatase como o anastrozol, e os inibidores irreversíveis do receptor de estrogênio, como por exemplo o fulvestranto, já que aproximadamente 60% a 75% dos carcinomas mamários são hormônio-dependente positivos para receptor de estrogênio e/ou progesterona (ITO, 2007; HARRIS et al., 2007).

Doentes com tumores positivos para os receptores de progesterona e estrogénio apresentam um maior intervalo de tempo livre de progressão e maior sobrevivência, e também, uma maior probabilidade de resposta à terapia hormonal (EISENBERG, 2004).

Foi descrito que 30% das mulheres em pré-menopausa e 60% em pós-menopausa com câncer da mama, apresentam valores mensuráveis de receptores estrogênicos (COTTERCHIO et al., 2003). O valor prognóstico dos receptores hormonais é mais elevado nas mulheres na fase pós-menopausa.

Doentes que apresentam negatividade para ambos os receptores (estrogénio e progesterona) mostraram um prognóstico mais grave do que aqueles que manifestaram negatividade em apenas um dos receptores. Logo, a manifestação destes receptores é vantajosa em termos de sobrevivência livre de progressão e de sobrevivência global com taxas que variam entre 10 a 15%, o que beneficia os doentes com receptores hormonais positivos (ALLRED, 2008).

Santen et al. (2007) afirmaram que os SERM representam o maior avanço terapêutico na prática clínica, demonstrando eficácia no tratamento e prevenção dos cânceres de mama receptores de estrogênio positivos.

### 2.3 Tumor ascítico de Ehrlich (TAE) como modelo experimental em camundongos

Paul Ehrlich introduziu o tumor de Ehrlich em 1886 e, em 1906 foi descrito como um carcinoma mamário de camundongos fêmeas. O termo ascite vem do grego *askites*, que significa bexiga, barriga ou bolsa (DAGLI, 1989; RIZZO, 2000).

Inicialmente, o tumor de Ehrlich foi desenvolvido experimentalmente sob a forma sólida, sendo inoculado em animais da mesma espécie. Somente em 1932, sugeriram a forma ascítica para este tumor, ou seja, o acúmulo de líquido na cavidade peritoneal (RIZZO, 2000). Três causas dão origem a esta resposta patológica: a primeira é devido a um aumento da pressão venosa que se estende aos capilares do peritônio, causando a transudação de líquido para o abdome; a segunda ocorre quando há o aumento da pressão (de 5 a 10 mm de Hg) nos sinusóides hepáticos, resultando em transudação pela própria superfície do fígado; a terceira causa de ascite pode ser atribuída à diminuição da pressão coloidosmótica

do plasma. Em alguns casos, as três causas podem se manifestar simultaneamente (HAUSBERGER et al., 2001).

A utilização de tumores transplantáveis na forma ascítica tem sido um recurso bastante utilizado por pesquisadores pela facilidade na padronização do número de células a serem inoculadas, pela quantificação do crescimento, pela regressão da massa tumoral, por permitir o estudo comparativo com os mesmos métodos desenvolvidos para a pesquisa de células na corrente sanguínea e demais fluidos corporais, e por fim, pelo rápido desenvolvimento da neoplasia que restringe o tempo de estudo (DAGLI et al., 1989; SAAD-HOSSNE et al., 2004; SILVA et al., 2006).

A literatura indica que os primeiros relatos de transplante de neoplasias são de 1773, quando Peyrilhe inoculou material extraído de neoplasias mamárias humanas sob a pele de cães. Devido às suas características e facilidade de manuseio experimental, o tumor de Ehrlich começou a ser largamente usado para a chamada Oncologia Experimental (DAWE, 1982).

De modo geral, é bastante aplicado em estudos básicos de biologia tumoral, ou para a investigação de novas modalidades terapêuticas, como cirúrgica, medicamentosa e radioterápica. Atualmente, já existem catalogados uma variedade de tumores experimentais (SAAD-HOSSNE, 2002).

O tumor de Ehrlich se desenvolve com duas variáveis de comportamento, de conformidade com o local do implante. Quando a inoculação de suas células é feita na cavidade peritoneal, este cresce em suspensão, traduzindo-se na forma ascítica do referido tumor. Contudo, quando a inoculação de células é feita no tecido subcutâneo de qualquer localização do tegumento do animal, este cresce sob a forma sólida. Por essa razão, é que se justifica a denominação, habitualmente usada, de forma sólida ou ascítica do tumor (GUERRA, 1983).

Histologicamente, o tumor sólido de Ehrlich apresenta extensas áreas de necrose, oriundas da morte das células neoplásicas, a qual é bastante intensa já na primeira semana pós-inoculação. Intensa atipia e células extremamente anaplásicas são também comumente vistas no tumor. O tumor possui poucas células inflamatórias e estroma escasso. Alto índice mitótico e de invasividade também caracterizam essa neoplasia (GABAI et al., 1995; DAGLI, 1989).

Segundo Oliveira et al. (2003), quando observado em microscópio de luz, é

evidente a presença de células epiteliais neoplásicas arranjadas concentricamente a um foco de necrose do tipo coagulativa. Essas células exibem intenso pleomorfismo, hipercromatismo nuclear e alteração da relação núcleo-citoplasma. Células multinucleadas com núcleos também podem ser identificadas e, muitas vezes, apresentam-se em formas agigantadas, evidenciando ainda mais a intensa atipia nuclear, com citoplasma bastante amplo. Já o estroma é escasso, com pouca vascularização.

Estima-se que 10% de todos os casos de ascite em humanos são de origem neoplásica, sendo em sua maioria provenientes de tumores gastrointestinais ou ovarianos (SAAD-HOSSNE, 2002).

Várias doenças estão associadas à ascite, dentre elas a carcinomatose peritoneal que causa exsudação de fluido proteináceo das células tumorais, fazendo com que o líquido extracelular entre na cavidade peritoneal para restabelecer o balanço osmótico. Em metástases maciças no fígado e no carcinoma hepatocelular, ocorre hipertensão portal secundária, desencadeando um mecanismo semelhante ao da cirrose, ocasionando um aumento dos níveis de óxido nítrico, podendo causar uma vasodilatação que simula o decréscimo no volume arterial efetivo e possivelmente, leva ao aumento do hormônio retentor de sódio, aldosterona, com consequente diminuição da filtração renal. A ascite quilosa, secundária ao linfoma maligno, aparece como consequência da obstrução dos linfonodos pelo tumor e pela ruptura dos vasos linfáticos (HAUSBERGER et al., 2001).

Segundo Dagli (2002), o exame histoquímico de uma gota de líquido ascítico do tumor de Ehrlichs revela células pleomórficas, com diâmetros 2 a 3 vezes superiores ao das hemácias do camundongo, que contêm numerosas gotículas de tamanho variável com material birrefringente em seu interior. Essas gotículas são lipídeos, que estão presentes devido a um processo degenerativo que leva ao acúmulo lipídico no interior da célula ou a uma desregulação genômica que provoca a intensificação da produção de lipídios pelas células. O tumor ascítico de Ehrlich pode ser transplantado para qualquer linhagem de camundongo, provavelmente devido à perda da expressão do MHC. Esta característica exclui o principal papel do linfócito T citotóxico durante o desenvolvimento do tumor, indicando que talvez a imunidade celular não seja o principal mecanismo de defesa do hospedeiro contra o tumor ascítico de Ehrlich (BERGAMI-SANTOS et al., 2004).

Segundo Gentile (2001), não há ocorrência de metástases no coração, rins, adrenais, fígado ou baço. Além disso, é sabido que as células do tumor de Ehrlich podem ser inoculadas por via intravenosa, sendo de grande utilidade nos estudos sobre migração de células e desenvolvimento de metástases, visto que na forma sólida não há ocorrência de crescimento secundário.

Dentre outros modelos, o tumor ascítico de Ehrlich é utilizado para auxiliar na investigação de novas modalidades terapêuticas em biologia tumoral e principalmente, na fisiopatologia do câncer e das metástases (RIZZO, 2000; SAAD-HOSSNE, 2002).

## 2.4 Quimioterapia

O termo “quimioterapia” foi criado por Ehrlich no início do século XX para descrever o uso de compostos químicos sintéticos contra agentes infecciosos. Este termo foi ampliado para incluir os “antibióticos”, substâncias produzidas por alguns microorganismos que eliminam outros microorganismos ou inibem seu crescimento. Além disso, abrange o uso de compostos químicos, tanto os naturais quanto os sintéticos para inibir o crescimento de células malignas ou cancerosas do corpo (KATZUNG et al., 1998)

A quimioterapia consiste no emprego de substâncias químicas isoladas ou em combinação com a finalidade de eliminar neoplasias malignas. É uma modalidade de tratamento sistêmico do doente oncológico, mais recente que a cirurgia e a radioterapia (RUBENS e COLLEMAN, 1999). Dentre suas indicações, a quimioterapia é utilizada em neoplasias quimiossensíveis, não cirúrgicas, sistêmicas ou metastáticas (COUTO, 2006). Assim, a aplicação de agentes antineoplásicos pode ter diferentes objetivos terapêuticos. O tratamento curativo tem a pretensão de erradicar a doença, impedindo assim seu reaparecimento, enquanto o paliativo objetiva aliviar sintomas causados pela neoplasia, visando à melhora da qualidade de vida do paciente (CHU e De VITAN, 2004; BITTENCOURT et al., 2010).

É comum a associação da quimioterapia a outras formas de tratamento, como por exemplo, cirurgia, radioterapia, hormonioterapia e imunoterapia. Alguns tipos e formas de tratamento quimioterápico são indicados de acordo com o objetivo do tratamento: curativo, terapia adjuvante e paliativa, terapia neo-adjuvante (CHU e De

VITAN, 2004; BONASSA, 2005; COUTO, 2006).

A terapia adjuvante é indicada após retirada completa do tumor ou após radioterapia curativa, ou ainda na ausência de metástase detectáveis. A terapia neoadjuvante é administrada antes da realização da cirurgia definitiva e tem como objetivo reduzir a massa tumoral permitindo uma cirurgia de menor porte. (WOODLOCK e LOUGHNER, 1995; FAIR et al., 1997). Em algumas neoplasias, a redução do tamanho da massa tumoral permite tratamento cirúrgico menos mutilante e/ou reduz a chance de recorrência (BITTENCOURT et al., 2010).

Segundo Bittencourt et al. (2010), grande parte dos agentes quimioterápicos antineoplásicos agem sobre o ácido desoxirribonucleico (DNA), não permitindo a duplicação celular. Contudo, é indispensável a descrição dos mecanismos de ação que fazem referência à fase de duplicação do DNA no ciclo celular, que por sua vez pode ser dividido em interfase e mitose; a primeira é composta pelas fases  $G_1$  (intercalar), S (síntese do DNA) e  $G_2$  (intercalar), e a segunda corresponde à fase M (mitose). A fase  $G_1$  é a fase pré-sintética; S é a fase de síntese celular, cujo objetivo é duplicar os componentes celulares, especialmente o DNA;  $G_2$  é a fase pós-síntese, intervalo que se segue à síntese do DNA; M é a fase de mitose, na qual a célula se divide em duas. Essas podem entrar no ciclo em  $G_1$  ou passar ao estágio  $G_0$ , período não-proliferativo (SILVA, 2006; ALBERTS et al., 2009). Os antineoplásicos podem atuar em todas as fases do ciclo celular ou em uma específica, e devem, por princípio, acarretar a morte celular (BITTENCOURT et al., 2010).

#### 2.4.1 Agentes quimioterápicos

Muitos quimioterápicos têm sido amplamente utilizados na prática da quimioterapia e podem ser classificados de acordo com sua estrutura química e função, ou de acordo com sua especificidade no ciclo celular (ANELLI, 1996; BONASSA, 2005).

De acordo com sua estrutura química e função, os quimioterápicos são classificados em agentes alquilantes, que são quimioterápicos capazes de causar alterações nas cadeias do DNA celular, impedindo sua replicação em qualquer fase do ciclo e em agentes antimetabólitos, que são aqueles que estruturalmente se assemelham aos metabólitos naturais, essenciais ao funcionamento celular,

incorporando-se à célula e transmitindo mensagens errôneas, bloqueando assim a produção de enzimas necessárias à síntese de substâncias fundamentais ou interpondo-se às cadeias do DNA e RNA, especificamente na fase "S" da divisão celular, quando se dá a síntese do DNA (RIZZO, 2000).

Agentes antibióticos antitumorais são agentes resultantes da fermentação de fungos que possuem propriedades citotóxicas, interferindo na síntese de ácidos nucleicos através da intercalação, impedindo a duplicação e separação das cadeias de DNA e RNA nesta fase específica do ciclo celular. Nitrosuriais são agentes pertencentes ao grupo de quimioterápicos que têm, provavelmente, ação similar à dos agentes alquilantes, sendo lipossolúveis e passando assim pela barreira hematoquímica. Alguns atuam em fases específicas do ciclo celular, outros não, sendo capazes de agredir células tanto em repouso como em processo de divisão ativa. Agentes alcaloides são inibidores mitóticos que atuam especificamente sobre células em fase de mitose, impedindo a formação dos microtúbulos, estruturas responsáveis pela polarização dos cromossomos, indispensável no processo de divisão celular. Agentes diversos, grupo de agentes antineoplásicos com mecanismos de ação variados, geralmente desconhecidos, diferentes dos descritos anteriormente, com características e toxicidades diversas entre si. Agentes hormonais são utilizados em terapias do câncer com a finalidade de deter crescimento tumoral (ANELLI, 1996).

Muitos tumores para crescer e funcionar dependem dos níveis hormonais, principalmente os tumores de mama, próstata, útero e tireoide. A manipulação de hormônios tem a finalidade de inibir o crescimento desses tumores. No entanto, tem finalidade mais paliativa que curativa (BONASSA, 2005).

A terapêutica hormonal é utilizada de duas maneiras: a primeira delas, por meio da adição de hormônios após cirurgia ablativa de uma glândula cujo hormônio favorece o crescimento do tumor; a segunda consiste na administração de agentes anti-hormonais que inibem a produção ou efeito de hormônios naturais. Os principais agentes hormonais são os antiestrogênicos, progestágenos, androgênicos, corticosteroides, estrogênicos e agentes antiadrenais (BOSTWICK et al., 1994; COOKSON et al., 1997).

Tendo em vista que alguns agentes quimioterápicos atuam em fases específicas do ciclo celular e outros não, uma segunda classificação destes os

agrupa em ciclo celular específico e ciclo celular não específico. Os quimioterápicos que agredem células em determinada fase, são os de ciclo celular específico, geralmente de síntese ou mitose, sendo eficientes no tratamento de tumores com grande número de células em processo de divisão ativa e rápida (ANELLI, 1996; BONASSA, 2005). Aqueles de ciclo celular não-específico agredem as células independentemente da fase em que se encontrem, atuando sobre a fração proliferativa e não-proliferativa do tumor. Assim, não é necessária uma alta taxa de crescimento tumoral para que a droga seja efetiva. No entanto, é necessário que haja divisão celular, pois a atuação da droga se dá neste processo (GOLDHIRSCH et al., 2001; BONASSA, 2005).

#### 2.4.1.1 Moduladores seletivos do receptor de estrogênio (SERM)

Os Moduladores Seletivos do Receptor de Estrogênio (SERM) são substâncias ou antiestrógenos que possibilitam a inibição da ação estrogênica desde a esteroidogênese até a fase de transcrição dos genes controlados pela formação do complexo estrogênio-receptor (FOLGUEIRA e BRENTANI, 2003).

Os SERM são compostos não hormonais que competem com o estrogênio pelo seu receptor, fazendo ligação entre estes, com alta afinidade, o que desencadeia alterações conformacionais que resultam em efeito agonista, agonista parcial ou antagonista, de acordo com a localização do SERM no tecido. São agonistas do estrogênio principalmente nos ossos; no tecido mamário atuam principalmente como antagonistas (PARK e JORDAN, 2002).

Segundo Folgueira e Brentani (2003), os diferentes efeitos desencadeados pela ação dos SERM nos tecidos podem estar ligados à presença dos diferentes receptores de estrogênio (REa e REb) expressos nestes órgãos.

De acordo com Diez-Perez (2006) no grupo dos SERM existem mais de setenta moléculas divididas em cinco grupos químicos, que são os trifeniletílenos, benzotiofenos, tetrahidronaftílenos, indols e benzopiranos. Levenson e Jordan (1999) explicam que entre os citados, os fármacos mais comumente usados são: o tamoxifeno, o clomifeno e o toremifeno. Sendo eles os mais indicados para o tratamento e prevenção de carcinoma mamário.

#### 2.4.1.1.1 Tamoxifeno

O tamoxifeno (TAM) é um fármaco amplamente utilizado no tratamento do câncer de mama em pacientes com tumores que possuam a presença de receptores de estrogênio (RE) (AHSEN et al., 2009; TEUNISSEN et al., 2009). Seu uso foi liberado em 1977, e há mais de 25 anos é tida como a principal terapia endócrina adjuvante para o tratamento dessa neoplasia. Recentemente seu emprego foi introduzido na prevenção do desenvolvimento do carcinoma mamário em pacientes saudáveis sob alto risco (DESTA et al., 2004).

A terapia preventiva com o TAM tem aumentado significativamente a sobrevida das pacientes livres da doença, representando uma diminuição de mortalidade em aproximadamente 31% e as recorrências em 50% (DALE et al., 2007; AHSEN et al., 2009). Estima-se que a vida de meio milhão de mulheres já foi salva com o seu uso (SCHROTH et al., 2009).

#### 2.4.1.1.2 Farmacocinética: mecanismo de ação e metabolismo

O TAM é um agente antiestrogênico não esteroideal, indicado com frequência no tratamento de câncer de mama que apresentam receptores para estrógeno. É bastante empregado na terapia adjuvante sistêmica que ocorre após o tratamento cirúrgico ou quimioterápico convencional. Também é empregado como agente protetor das doenças coronarianas, graças à sua capacidade de impedir a formação das placas de aterosclerose (MOURIDSEN e PALSHOF, 1978).

Na ausência do TAM, o estrogênio estimularia o crescimento das células do tecido mamário maligno através da ligação com o sítio receptor de estrogênio e da interação com o DNA da célula, alterando a atividade do gene e promovendo o crescimento celular. No entanto, apesar da ação antiestrogênica depender da orientação de sua cadeia lateral (alquilaminoetóxi), o TAM também pode apresentar atividade estrogênica. Na conformação *trans* possui ação antiestrogênica, e na conformação *cis* tem atividade estrogênica predominante. Seu efeito também parece depender do estado do receptor estrogênico, dos níveis de estrogênio circulantes e do tecido alvo (DALE, 2004).

Em geral, os efeitos colaterais do TAM são moderados, como alterações no

metabolismo das lipoproteínas. No entanto, vários estudos descreveram pequenas mudanças na concentração de lipoproteínas plasmáticas, sendo que alguns relatos demonstram que o tamoxifeno é capaz de induzir hipertrigliceridemia em portadoras de câncer de mama (BERTELLI et al., 1988; KUSAMA, et al., 2004). Efeitos adversos do TAM como náuseas, vômitos e ondas de calor, estão relacionados às ações antiestrogênicas do fármaco (GRAHAME-SMITH e ARONSON, 2002).

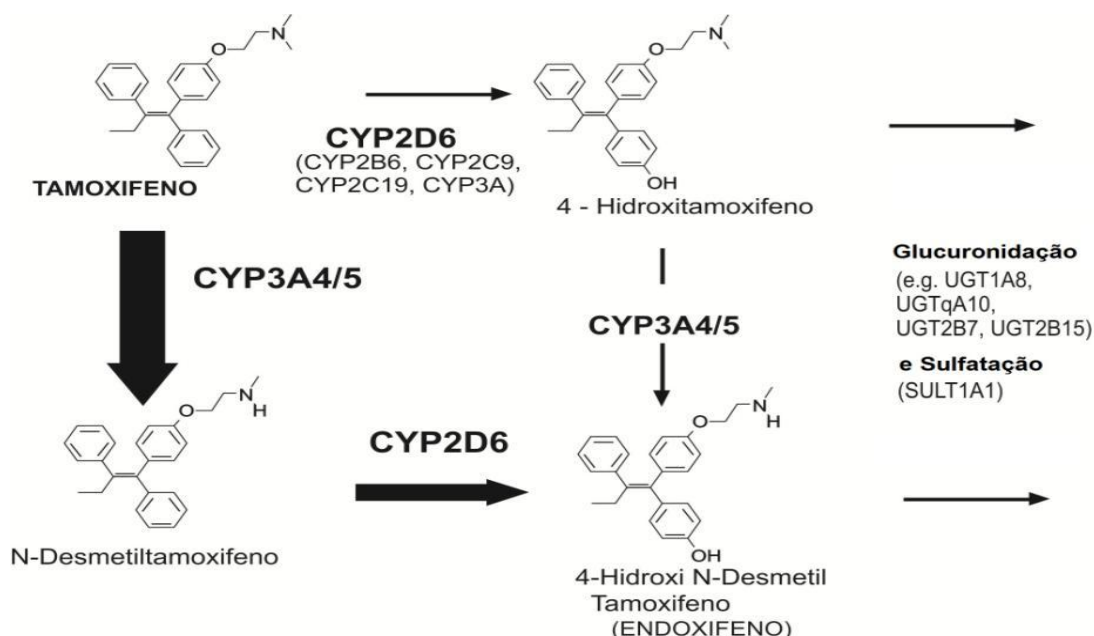
Dentre os efeitos adversos, a maior preocupação na administração do tamoxifeno é com relação ao seu potencial de causar câncer endometrial, pois há evidências de que no útero esse fármaco desenvolve atividade agonista parcial do estrogênio, estimulando a proliferação das células endometriais (WILLIAMS e STANCEL, 1996).

Os efeitos esporádicos em alguns casos apresentam sintomas que podem ser diagnosticados com menor frequência, como por exemplo, irregularidades menstruais, sangramento e corrimento vaginais, prurido vulvar e dermatites. O tamoxifeno também pode provocar a retenção de líquidos, aumentar a dor de tumores e, em mulheres com metástase óssea pode ocasionalmente causar hipercalemia (CHABNER et al., 1996; GRAHAME-SMITH e ARONSON, 2002).

A comercialização do TAM é feita na forma de comprimidos com dosagens de 10 e 20mg de isômero *trans* puro ou como citrato de tamoxifeno. Recomenda-se uma dose diária de 20mg em dose única ou fracionada, ou seja, dois comprimidos de 10mg. Após a administração oral, o fármaco apresenta concentração sérica máxima em torno de 4 a 7 horas e tempo de meia-vida de sete dias. Devido à longa meia-vida dos metabólitos (14 dias), com uma dose típica de 20mg de TAM é alcançado um equilíbrio dinâmico no período de três a quatro meses. A excreção ocorre predominantemente nas fezes, sendo mínima a excreção pela urina (AHSEN et al., 2009). Teunissen et al. (2009) explicam que o TAM é metabolizado principalmente por enzimas hepáticas do sistema citocromo P450 em muitos metabólitos primários e secundários. Alguns metabólitos do TAM formados *in vivo* são mais ativos do que o próprio fármaco; por isso, ele pode ser considerado um pró-fármaco.

A figura 1 demonstra as principais vias do metabolismo do TAM, onde encontra-se a via primária de N-demetilação, que produz inicialmente o N-desmetiltamoxifeno (NDT), catalisada pelas enzimas CYP3A4 e CYP3A5.

Posteriormente, o NDT passa por múltiplas oxidações a diferentes metabólitos, dentre os quais se destaca a hidroxilação pela CYP2D6 a endoxifeno (EDF) (KLEIN, 2001). Outra importante via de metabolização do TAM é a 4-hidroxilação catalizada inicialmente pela enzima CYP2D6 e seguida por outras isoenzimas. Esta via forma o 4-hidroxitamoxifeno (HTF), que assim como o EDF possui atividade antiestrogênica de 30 a 100 vezes mais potente que o TAM. As concentrações plasmáticas do EDF são aproximadamente 6 vezes maiores do que as concentrações do HTF, que representam cerca de 2 a 5 % das concentrações de TAM, sendo assim o principal responsável pelos efeitos terapêuticos do tamoxifeno (NEWMAN et al., 2008; TEUNISSEN et al., 2009).



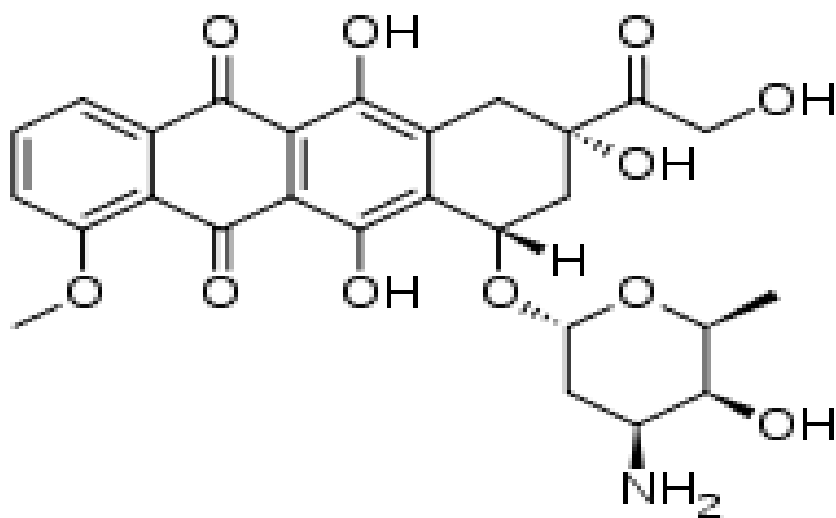
**Figura 1:** Principais vias de metabolismo do Tamoxifeno destacando-se a via N-demetilação, que demonstra a catálise pelas enzimas CYP3A4, CYP3A5 e CYP2D6 resultando no endoxifeno, e a via 4-hidroxilação, que demonstra a catálise inicial pela enzima CYP2D6 seguida catálises pelas isoenzimas CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 e CYP3A, resultando no 4-hidroxitamoxifeno. Fonte (NEWMAN et al., 2008).

#### 2.4.2 Doxorrubicina

O cloridrato de doxorrubicina é um antibiótico do grupo das antraciclinas, isolado a partir de culturas fúngicas de *Streptomyces peucetius caesius* (DOROSHOW, 1996; SILVA et al., 2004; WITHROW, 2007) utilizado em diversos tipos de câncer como antineoplásico.

Seu uso começou clinicamente na década de 1960, e representa uma das

classes mais empregadas de agentes antineoplásicos, sendo muito utilizada em oncologia humana e, em menor extensão, em oncologia veterinária (DOROSHOW, 1996; STEWART e RATAIN, 1997). As antraciclinas se resumem em anéis com um glicídeo não-usual, a daunosamida, unidos por ligações glicosídicas (Figura 2). Os agentes citotóxicos desta classe possuem quinona ou hidroquinona nos anéis adjacentes, que funcionam como agentes receptores e doadores de elétrons (CHABNER et al., 2001).



**Figura 2:** Estrutura química da doxorubicina (C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>11</sub>). Em evidência, os anéis de daunosamida unidos por ligações glicosídicas (WITHROW, 2007).

A doxorubicina tem uma extensa atividade antitumoral (WITHROW, 2007). Dentre as neoplasias mais frequentemente tratadas com este quimioterápico, podem-se citar os linfomas, os sarcomas osteogênicos, o carcinoma testicular, o hemangiossarcoma, o carcinoma de tireoide, os carcinomas mamários, o carcinoma de células escamosas, entre outros tumores sólidos. Este fármaco também é utilizado para tratar a leucemia mielóide aguda e a leucemia linfocítica aguda (RODASKI e DE NARDI, 2004).

A doxorubicina não apresenta interações antagonicas com outros quimioterápicos rotineiramente utilizados. Além disso, esta droga é ativa em diferentes protocolos de administração utilizando-se amplos esquemas de dosagens. Assim, a combinação de uma ampla atividade antineoplásica, a falta de antagonismo com outros agentes quimioterápicos, e a flexibilidade nas dosagens e protocolos, fazem da doxorubicina um fármaco muito útil que pode ser utilizado isoladamente ou em combinações com outras drogas no combate a tumores (DOROSHOW,

1996).

#### 2.4.2.1 Mecanismo de ação da doxorubicina

A doxorubicina atua tanto nas células em divisão quanto nas células na fase de repouso. Assim, ela é um agente não-específico do ciclo celular. No entanto, sua principal ação citotóxica é observada durante a fase S do ciclo celular (SUSANECK, 1983; RODASKI e DE NARDI, 2004).

Sua ação farmacológica ocorre por diferentes mecanismos, incluindo reações de oxidação e redução, com formação de radicais livres e intercalação com o DNA da célula, levando à inibição da síntese protéica (SUSANECK, 1983; CHABNER et al., 2001; WITHROW, 2007). As quebras do DNA são causadas pela união da droga ao DNA e à enzima topoisomerase II, que tem um papel importante na liberação das cadeias de DNA e na condensação dos cromossomos.

A doxorubicina também se liga às membranas celulares, alterando suas funções e atuando como um agente doador e receptor de elétrons, gerando radicais livres que são potentes agentes alquilantes tanto nos tecidos neoplásicos quanto nos tecidos normais. Além disso, a molécula reage com a citocromo P450 redutase na presença de NADPH para produzir ânions de radicais superóxidos que são altamente destrutivos para a célula. Os radicais gerados incluem peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, que atacam o DNA e oxidam as suas bases. Assim, as defesas enzimáticas, como superóxido dismutase e catalase são importantes na proteção celular contra a toxicidade da doxorubicina (DOROSHOW, 1996; CHABNER et al., 2001).

#### 2.4.2.2 Farmacocinética da doxorubicina

A farmacocinética da doxorubicina está diretamente associada a sua ligação nas diferentes células, sendo rapidamente eliminada do sangue e distribuída nos tecidos, seguindo um modelo trifásico (HAHN e RICHARDSON, 1995; RODASKI e DE NARDI, 2004).

A primeira fase, que dura aproximadamente 10 minutos, representa a rápida distribuição da droga nos tecidos (SUSANECK, 1983). Durante esta fase, os níveis

da droga caem rapidamente uma vez que a doxorubicina atinge todos os órgãos, principalmente o coração, os rins, os pulmões, o fígado e o baço (DOROSHOW, 1996). A segunda fase, que dura aproximadamente três horas, representa a saída da droga, antes alojada nos órgãos, de volta para o sistema vascular (SUSANECK, 1983). Nesta fase, 75% da doxorubicina está ligada às proteínas plasmáticas (DOROSHOW, 1996). No entanto, a ligação às proteínas é provavelmente irrelevante, já que a hipoalbuminemia não aumenta a exposição sistêmica da doxorubicina (STEWART e RATAIN, 1997). Assim, com a ligação extensiva das antraciclinas ao DNA e às proteínas, a fração livre da droga é muito pequena tanto no plasma quanto nas células (DOROSHOW, 1996). Durante a fase final, os níveis da droga e seus metabólitos permanecem constantes durante um longo período de tempo (aproximadamente 30 horas) (SUSANECK, 1983).

A doxorubicina não transpõe a barreira hematoencefálica (STEWART e RATAIN, 1997; CHABNER et al., 2001; WITHROW, 2007). A sua meia-vida em humanos varia de três a 30 horas, e a metabolização é essencialmente hepática (BITTENCOURT et al., 2010; CHABNER et al., 2001). O doxorubicinol é o principal metabólito e também possui alguma atividade antineoplásica (BITTENCOURT et al., 2010). Aproximadamente, 50% da droga é excretada pela bile em até sete dias, tanto como doxorubicina quanto como seus metabólitos. Menos de 10% da droga administrada é eliminada na urina (DOROSHOW, 1996; BITTENCOURT et al., 2010).

Não há evidências da presença de circulação entero-hepática (STEWART e RATAIN, 1997). Embora a principal via de eliminação da doxorubicina ocorra pelo metabolismo hepático e excreção biliar, reduções de dose em pacientes com função hepática comprometida ainda são discutidas. No entanto, alguns autores recomendam uma redução de 50% na dose inicial de doxorubicina em pacientes com disfunção hepática (CHABNER et al., 2001).

#### 2.4.2.3 Indicações terapêuticas da doxorubicina

A doxorubicina é largamente indicada como agente quimioterápico como monoterapia ou em união com outras drogas para potencializar seus efeitos sobre as neoplasias (FONSECA et al., 2000). Suas principais indicações terapêuticas em

veterinária incluem as neoplasias hematopoiéticas, como as leucemias e os linfomas, os carcinomas mamários e de tireoide, e alguns sarcomas, como o osteossarcoma, hemangiossarcoma e fibrossarcoma (LANORE e DELPRAT, 2004). Na medicina humana suas indicações também incluem os carcinomas torácicos e carcinoma de pequenas células dos pulmões, bem como sarcomas em crianças e adultos (CHABNER et al., 2001). Suas dosagens variam de acordo com as indicações, protocolos, tamanho e espécie do animal (RODASKI e DE NARDI, 2004).

#### 2.4.2.4 Efeitos tóxicos da doxorubicina

A doxorubicina está disponível apenas para administração por via endovenosa (CHABNER et al., 2001), uma vez que não é estável em suco gástrico e também não é absorvida pelo trato gastrointestinal (BITTENCOURT et al., 2010). Além disso, o extravasamento da droga para o tecido subcutâneo implica em uma ação vesicante local severa resultando em necrose tecidual (CHABNER et al., 2001).

Pacientes que recebem doxorubicina, desde que cuidadosamente monitorados, toleram bem seus efeitos adversos. Apesar dos mesmos serem muitos, não devem desencorajar o uso desse fármaco na terapia do câncer (RODASKI e DE NARDI, 2004).

A doxorubicina tem por característica interferir na integridade de tecidos com rápida replicação celular, como a medula óssea, os tecidos linfóides, o epitélio gastrointestinal, a epiderme e as células germinativas gonadais, por uma forte ligação ao DNA, limitando a síntese celular de ácidos nucleicos e proteínas. Além disso, também é comum ocorrer dano ao miocárdio em virtude de uma ou mais alterações bioquímicas (VAN VLEET e FERRANS, 1980).

Sua toxicidade é classificada em aguda, de curta-duração e crônica. A toxicidade aguda é caracterizada por sinais de hipersensibilidade, como eritema cutâneo, vômitos, hipotensão, arritmias cardíacas e anafilaxia. Os efeitos de curta duração são observados nas duas primeiras semanas após a administração da doxorubicina e incluem transtornos gastrointestinais e hematológicos. A toxicidade crônica deste quimioterápico inclui perda de pelos, atrofia testicular e cardiotoxicidade (SUSANECK, 1983). Assim, a toxicidade da doxorubicina envolve

principalmente alterações hematológicas, gastrintestinais, cardiocirculatórias e dermatológicas (HAHN e RICHARDSON, 1995; RODASKI e DE NARDI, 2004; WITHROW, 2007).

A toxicidade hematológica é o efeito adverso mais comum da quimioterapia. As citopenias que ocorrem podem ser graves e com potenciais riscos à vida, indicando a necessidade de suspensão temporária ou permanente do fármaco (COUTO, 2006). A toxicidade hematológica da doxorrubicina corresponde à aplasia de medula óssea dose-dependente; ela é reversível e atinge principalmente a linhagem granulocítica (LANORE e DELPRAT, 2004).

Em virtude da meia-vida das células, a neutropenia ocorre inicialmente, seguida de trombocitopenia. A anemia induzida pela doxiquimioterapia é incomum, e geralmente ocorre três a quatro meses após o início do tratamento (COUTO, 2006). Outros fatores relacionados com o paciente como a desnutrição, a idade avançada, a disfunção orgânica concomitante e a quimioterapia anterior, juntamente com os fatores relacionados com o tumor, como infiltração de medula óssea e metástase disseminada, podem também interferir no grau de mielossupressão, bem como na presença e intensidade da anemia (CANÇADO e CHIATTONE, 2002; COUTO, 2006).

O momento em que há alteração hematológica (neutropenia) mais severa com o uso da doxorrubicina ocorre de 7 a 14 dias após o tratamento, e a recuperação medular acontece após 21 dias da administração da droga (VAN VLEET e FERRANS, 1980; LANORE e DELPRAT, 2004; RODASKI e DE NARDI, 2004). Embora a trombocitopenia seja provavelmente tão comum quanto à neutropenia, ela raramente é grave o suficiente para causar hemorragia espontânea (contagem de plaquetas inferior a  $30 \times 10^3$  células/ $f\mu\text{L}$ ) (COUTO, 2006).

A doxorrubicina pode causar tanto anemia não regenerativa, por seu efeito tóxico nos precursores dos eritrócitos na medula óssea, quanto anemia regenerativa, pelo aumento na destruição de poiquilócitos. O mecanismo exato de como a doxorrubicina produz alterações na morfologia dos eritrócitos ainda não está totalmente esclarecido, mas pode estar associado à geração de radicais livres resultando em peroxidação da membrana lipídica, inibição da atividade da bomba de sódio e potássio dependente de ATP, e alterações no transporte de cálcio e equilíbrio eletrolítico intracelular (BADYLAK et al., 1985; O'KEEFE e SCHAEFFER,

1992).

Estudos têm demonstrado que a doxorrubicina e, especialmente, seu metabólito doxorrubicinol, alteram o metabolismo energético dos eritrócitos, estimulando a via das pentoses fosfato a produzir mais NADPH, necessário para a oxidação destes fármacos. Os metabólitos da doxorrubicina também inibem a ação das enzimas glutathione peroxidase e superóxido dimutase nos eritrócitos, levando a um acúmulo de radicais livres (MISITI et al., 2003).

A monitoração hematológica é o meio mais eficaz de prevenir ou antecipar os efeitos graves da doxorrubicina, que pode levar à septicemia. Por isso, hemogramas controles são realizados, no mínimo de sete a 10 dias após o início da terapia, e antes de cada aplicação. O tratamento deve ser suspenso temporariamente se a contagem de leucócitos totais for inferior a 4000 células/ $\mu\text{L}$ , se a de neutrófilos for inferior a 2500 células/ $\mu\text{L}$  ou se a contagem de plaquetas diminuir para menos de  $50 \times 10^3$  células/ $f\mu\text{L}$  (LANORE e DELPRAT, 2004; RODASKI e DE NARDI, 2004; COUTO, 2006). O tratamento deve ser reinstituído após o número de células sanguíneas se apresentarem normais (RODASKI e DE NARDI, 2004). Neste caso, recomenda-se utilizar apenas 75% da dose inicial, aumentando-se gradualmente a dose por duas a três sessões, até que a dose inicialmente recomendada seja alcançada (COUTO, 2006).

Outra resposta adversa comum causada pela doxorrubicina é a toxicidade gastrointestinal, que pode se manifestar sob duas formas: uma mais branda, cujos sinais incluem anorexia, náusea, vômitos e diarreia; e outra forma mais severa, levando a uma gastroenterocolite hemorrágica (LANORE e DELPRAT, 2004). Essa toxicidade gastrointestinal resulta em parte, do efeito citotóxico da droga sobre as células gastrointestinais que se encontram em rápida divisão. Além disso, acredita-se que, especialmente a gastroenterocolite hemorrágica, também seja induzida pela liberação de histamina após a administração do fármaco (OGILVIE et al., 1991).

Os sinais de anorexia, vômitos e diarreia típica de intestino delgado são brandos e geralmente sem gravidade. Esses sinais aparecem dois a três dias após a administração e regredem com tratamento sintomático (LANORE e DELPRAT, 2004).

A gastroenterocolite raramente se desenvolve em animais que recebem quimioterapia, exceto em algumas raças de cães que são muito suscetíveis a enterocolite induzida por doxorrubicina, caracterizada pelo desenvolvimento de

diarreia hemorrágica (com ou sem vômitos), primariamente do intestino grosso, três a sete dias após a administração do fármaco (COUTO, 2006). Esta complicação também não é grave, mas é necessária a hospitalização do animal para fluidoterapia, adequação da dieta e tratamento sintomático (LANORE e DELPRAT, 2004).

### 3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Considerado como uma enfermidade com envolvimento genético, o câncer surge nas células normais devido a mutações ao longo dos anos, relacionadas com os proto-oncogenes envolvidos no crescimento celular, os quais se transformam em oncogenes tornando a célula neoplásica, levando-a a imortalização pela ação da enzima telomerase.

Agentes antineoplásicos são utilizados para o tratamento de neoplasias e suas metástases, bem como para aliviar as síndromes paraneoplásicas. Alguns destes medicamentos, dentre outros vários mecanismos, atuam também desencadeando as vias de apoptose, constituindo-se assim em uma quimioterapia menos agressiva para o paciente oncológico (DAGLI, 2002).

Este estudo busca a eficácia da doxorrubicina como medicamento indutor de apoptose e/ou necrose e, como consequência, a redução da massa tumoral, tendo como modelo experimental o tumor ascítico de Ehrlich em camundongos BALB/c. De acordo com Minotti et al. (2004), uma via de indução de apoptose pela doxorrubicina é através da inibição de Bcl-2 e da liberação do citocromo c e ativação das caspases 3 e 9, sugerindo o envolvimento mitocondrial. Trabalhos de Taucher et al. (2003) também mostram que a doxorrubicina induziu apoptose em células de osteossarcoma na fase pré G1, com despolarização do potencial da mitocôndria e liberação do citocromo c e ativação da caspase 3. O uso de camundongos machos teve o objetivo de quantificar melhor a ação do estrógeno já que em camundongos machos a conversão de testosterona a estrógeno é pequena, pois a produção de testosterona será diminuída pela infusão exógena de cipionato de estrógeno diminuindo também a testosterona disponível para a transformação em estradiol pelas células adiposas.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivos:

- Verificar possíveis efeitos hematológicos e gastrointestinais das drogas cloridrato de doxorrubicina e citrato de tamoxifeno quando utilizadas em terapia solo ou associadas.
- Avaliar o efeito antineoplásico quando utilizadas em camundongos machos portadores ou não de tumor ascítico de Ehrlich, com e sem terapia hormonal com cipionato de estradiol.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Normas de conduta para o uso de animais na pesquisa

A pesquisa foi realizada de acordo com as normas internacionais para experimentação animal, aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), protocolo número 032/2012. Durante o período experimental os animais foram mantidos no Biotério Central (UFV), em gaiolas plásticas, em sala climatizada, com controle de temperatura (24 °C) e ciclo claro-escuro de 12 horas, recebendo ração comercial balanceada para animais de laboratório e água à vontade. Os procedimentos com os animais foram realizados sob supervisão e coordenação da Médica Veterinária responsável, Dra. Marlene Isabel Vargas Vitoria, CRMV-MG 2.775.

As células tumorais foram cedidas pelo Laboratório de Patologia do Câncer do Departamento de Biologia Animal da UFV e mantidas congeladas em nitrogênio líquido.

### 4.2 Ativação e replicação do tumor ascítico de Ehrlich

Para a ativação do tumor, foram descongelados 500 µL de células em temperatura ambiente, lavadas por centrifugação com solução PBS pH 7,4 e, em seguida, inoculadas no peritônio de dois camundongos. Os camundongos inoculados foram mantidos por sete dias, tempo necessário para a replicação do tumor.

Após esse tempo, os animais foram submetidos à eutanásia e, em seguida, os mesmos foram imersos em álcool 70° por 5 minutos, quando foram retirados 3,0 mL do líquido ascítico sob condições estéreis, em capela de fluxo laminar. O líquido ascítico foi transferido para tubos de Falcon contendo três ml de PBS pH 7,4, centrifugado a 1500 G por 5,0 minutos a 4,0°C, para lavagem das células. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado, repetindo-se este procedimento por três vezes.

Posteriormente, as células foram contadas usando a técnica de exclusão pelo

azul de tripano. Após a contagem das células, foi preparada uma suspensão de  $1 \times 10^6$  cel/100µl em PBS pH 7,4, para posteriormente serem inoculadas nos camundongos dos grupos experimentais.

#### 4.3 Grupos experimentais

Foram utilizados 40 camundongos Balb/C machos, não isogênicos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa (UFV), com aproximadamente 12 semanas de idade e peso entre 25 e 30 gramas. Os camundongos foram divididos em grupos de 5 animais cada, totalizando-se 8 grupos (Tabela 1).

**Tabela 1** – Divisão dos grupos experimentais e seus respectivos tratamentos.

Grupos	Número de camundongos BALB/c	Tratamento	Dose	Número de aplicações	Intervalo de aplicações	Via
1	5	TAE	Células	1	UA	IP
2	5	CE	2 mg/kg	3	7 dias	SC
3	5	NT	NT	NT	NT	NT
4	5	CTT	10 g/kg/dia	21	Todos os dias	Gavagem
5	5	DOX	25 mg/m <sup>2</sup>	2	9 dias	IV
6	5	TAE	Células	1	UA	IP
		CE	2 mg/kg	3	7 dias	SC
		CTT	10 g/kg/dia	21	Todos os dias	Gavagem
7	5	TAE	Células	1	UA	IP
		CE	2 mg/kg	3	7 dias	SC
		DOX	25 mg/m <sup>2</sup>	2	9 dias	IV
8	5	TAE	Células	1	UA	IP
		CE	2 mg/kg	3	7dias	SC

**Legenda:** Tumor ascítico de Ehrlich (TAE), Cipionato de estradiol (CE), Citrato de tamoxifeno (CTT), Doxorubicina (DOX), Intravenosa (IV), Solução Fisiológica (SF), Subcutâneo (SB), Intraperitoneal (IP), Única Aplicação (UA), Não Tratados (NT).

#### 4.4 Análises hematológicas

Ao final dos 21 dias de acompanhamento, todos os animais foram submetidos a uma coleta de 200 microlitros de sangue através da punção do plexo venoso retro ocular, para a realização de hemograma. O sangue foi depositado em tubos com heparina e analisado por meio de contador automatizado HumaCount Plus. Os parâmetros avaliados foram contagem de hemácias, hematócrito, dosagem de hemoglobina, contagem global de leucócitos e de plaquetas.

#### 4.5 Coleta de material para análise histopatológica

Ao final do período de 21 dias de acompanhamento os animais dos grupos 3 (controle), 5 e 7 (tratados com cloridrato de doxorrubicina) foram submetidos à eutanásia e realizada a coleta de amostras do estômago e do intestino delgado para análise histopatológica. Os órgãos coletados foram imediatamente transferidos para solução fixadora de formol neutro tamponado a 10%, durante 24 horas. Em seguida, os fragmentos passaram por desidratação em soluções crescentes de etanol 70°, 80°, 90° e 100°, diafanização em xilol, inclusão em parafina, e então foram cortados em micrótomo de rotação na espessura de 5,0 µm para montagem das lâminas histológicas, que foram coradas pela técnica de hematoxilina/eosina (H&E). Nas amostras analisadas avaliou-se a perda do epitélio de revestimento, presença de necrose e/ou apoptose de células glandulares, sendo as lesões classificadas em grau 0 para ausência dos eventos, grau 1 para discreta presença, grau 2 para moderada presença, e grau 3 para intensa presença dos eventos.

#### 4.6 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram agrupados e analisados estatisticamente, e expressos em média  $\pm$  desvio padrão e as diferenças estatísticas entre os grupos, detectadas pela análise de variância (ANOVA) e o teste de contraste de Tukey, a posteriori, usando o *software* GraphPad Prism versão 5.0.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análises hematológicas

#### 5.1.1 Contagem de hemácias e hematócrito

A avaliação do número de hemácias e do hematócrito apresentou mostrou significativa nos grupos 1 (TAE) e 8 (TAE + cipionato de estradiol) quando comparado aos demais grupos ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2), diminuição essa que pode ser explicada pela presença do tumor isoladamente ou associado apenas com o estrógeno, sem envolver a administração de qualquer tipo de quimioterápico, esses resultados estão de acordo com Kusmartsev et al. (1999), onde relatam que o tumor ascítico de Ehrlich (TAE) produz alterações severas no sistema hematológico do hospedeiro, sendo frequentemente associado a anemias.

Diminuição significativa também foi observada no grupo 8 (TAE + cipionato de estradiol) em relação ao grupo 1 (TAE) (Tabela 2), demonstrando com isso que quando se fez uso do cipionato de estradiol em camundongos portadores do TAE, os mesmos tiveram uma redução ainda maior no número de hemácias e na porcentagem do hematócrito, esses resultados demonstram que o tumor ascítico de Ehrlich pode ser influenciado pelo hormônio, pois segundo Dagli (1989) e Rizzo (2000) esse tumor é primariamente um adenocarcinoma mamário do camundongo fêmea, e mesmo que seja indiferenciado, influencia os hormônios incriminados na gênese do câncer de mama, como o estrógeno. Norman e Litwack (1997) sugerem que o estrógeno promove o aumento do crescimento celular no TAE, podendo assim aumentar os efeitos adversos causados pelo tumor, como a diminuição do número de hemácias que leva à redução do hematócrito.

No período da coleta, não foi observada queda no número de hemácias e no hematócrito nos grupos 5 (DOX) e 7 (TAE+cipionato de estradiol+cloridrato de doxorubicina) (Tabela 2), contradizendo Richardson e Johnson (1997) que descrevem a hipoplasia sanguínea e a imunodepressão como principais efeitos colaterais da doxorubicina. Esse achado pode estar relacionado com o tempo da coleta das amostras sanguíneas, que foi de 96h após a administração da

doxorubicina, excedendo o tempo de meia vida da droga que, segundo Lalla et al. (2008), é de cerca de 52h. A doxorubicina é um agente hematotóxico dose e tempo dependentes (DIAS et al., 2003); assim, o resultado encontrado já demonstra uma resposta positiva da medula após a depressão celular que provavelmente ocorreu imediatamente à aplicação da droga, até as 52h seguintes.

Não houve redução no número de hemácias e na porcentagem do hematócrito no grupo 6 (TAE+cipionato de estradiol+citrato de tamoxifeno) (Tabela 2), mesmo com a presença do tumor e do estrógeno. Isso pode ser explicado pela ação do tamoxifeno, que é um inibidor da ação do estrógeno (ABDULKAREEM e ZURMI, 2011). Os grupos 2 e 4 não apresentaram alteração significativa no número de hemácias e na porcentagem do hematócrito. Sendo assim, o efeito potencializador do estrógeno sobre o tumor não aconteceu, reduzindo sua capacidade de causar anemia. Segundo Charles et al. (2009), o uso do tamoxifeno em pacientes humanas demonstrou um aumento significativo no número de eritrócitos. Esse efeito pode ter acontecido também nos camundongos tratados.

#### 5.1.2 Dosagem de hemoglobina

A dosagem de hemoglobina demonstrou diminuição significativa no grupo 1 (TAE) ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos 2 (cipionato de estradiol), 3 (controle), 4 (tamoxifeno), 5 (DOX) (Tabela 2). Esta diminuição se deve à anemia causada pelo tumor, uma alteração que é acompanhada pela diminuição do número de hemácias. Vários mecanismos foram propostos para explicar o desenvolvimento da anemia no câncer, como a diminuição da vida útil das hemácias, os níveis inadequados de eritropoetina, a reutilização defeituosa de ferro, a perda de sangue intrínseca ou iatrogênica, a falência da medula óssea, entre outros (SPIVACK, 1994; MOLITERNO E SPIVAK, 1996).

Nos grupos onde houve o uso de cloridrato de doxorubicina (grupos 5 e 7), não foi observada diminuição significativa na dosagem de hemoglobina, diferente do que relatam Richardson e Johnson (1997), que descrevem a hipoplasia sanguínea como um dos principais efeitos colaterais da doxorubicina, e que consequentemente causaria uma diminuição na dosagem de hemoglobina.

O resultado aqui encontrado pode estar relacionado com o período da coleta do material para análise já descrito anteriormente na contagem de hemácias e hematócrito.

Já no grupo 8 (TAE+estrógeno) foi observada diminuição significativa na dosagem de hemoglobina ( $p < 0,05$ ) em relação a todos os grupos, inclusive quando comparado ao grupo 1 (TAE) (Tabela 2). Esse resultado demonstra que quando se faz uso do cipionato de estradiol em camundongos portadores do TAE, os mesmos tiveram o efeito hematológico do tumor aumentado, reafirmando assim os resultados obtidos para os valores da contagem de hemácias e do teor de hematócrito, pois como já foi provado, o tumor de Ehrlich sofre potencialização quando os níveis de estrógeno estão aumentados (DAGLI,1989; RIZZO,2000).

Os grupos 1 (TAE) e 6 (TAE+cipionato de estradiol+TAM) não apresentaram diferença estatística para a dosagem da hemoglobina, mesmo com a presença do estrógeno no grupo 6, estimulando o aumento tumoral (NORMAN e LITWACK, 1997). A alteração significativa não foi observada provavelmente pela presença do tamoxifeno nesse mesmo grupo, que segundo Kinsinger et al. (2002), é um inibidor seletivo não esteroide do receptor de estrógeno, que possui um potente efeito anti-estrogênico, inibindo assim os efeitos do estrógeno e fazendo com que tenha o mesmo parâmetro do grupo 1 (TAE).

### 5.1.3 Contagem de leucócitos totais

A avaliação da contagem do número de leucócitos demonstrou aumento significativo ( $p < 0,05$ ) quando se compararam os grupos 1 (TAE) e 6 (TAE+cipionato de estradiol+TAM) aos demais grupos (Tabela 2). Segundo Morales et al., (1999), um aumento na hematopoiese extramedullar, acompanhado por neutrofilia e trombocitose, foi associada com a progressão do tumor de Ehrlich. Seguindo a hipótese de que o tamoxifeno neutraliza o estrógeno, este último não influenciou no resultado do grupo 6, quando utilizados em conjunto com o TAE, observando-se assim aumento do número de leucócitos igual ao encontrado no grupo 1.

Ainda quando se compara o grupo 7 (TAE+estrogênio+DOX) com o grupo 3 (controle), verifica-se que no grupo VII não houve aumento significativo de leucócitos pela presença do TAE. Nesse grupo, ocorreu leucopenia decorrente do tratamento

com a doxorubicina pois, como foi descrito por Dias et. al, (2003) e Dagli & Lucas (2006), a doxorubicina é um agente hematotóxico tempo e dose dependentes e dentre seus principais achados estão a leucopenia, resultado que se confirma quando se analisa o resultado obtido no grupo 5 (DOX).

O resultado da contagem de leucócitos no grupo 8 (TAE + estrógeno), não demonstrou o mesmo efeito causado pelo tumor como quando observado nos grupos 1 e 6, onde houve uma significativa leucocitose. Esse resultado pode estar relacionado com a presença do estrógeno pois, como sugerem Ferreira Neto et al. (1981), o estrógeno exógeno pode causar reação que reflete no conteúdo hematológico, sendo observado entre outras coisas, neutropenia acentuada.

#### 5.1.4 Contagem de plaquetas

A avaliação do número de plaquetas demonstrou aumento significativo ( $p < 0,05$ ) quando o tumor está presente sem a aplicação de tratamento (grupo 1), ou com a aplicação de estrógeno e citrato de tamoxifeno (grupo 6), comparando-se com os grupos 2, 7 e 8 (Tabela 2). Esses resultados sugerem que o tumor tem um efeito estimulador na produção de plaquetas, como já foi descrito por alguns autores (KUSMARTSEV et al., 1999; MORALES et al, 1999), que atribuem à trombocitose a liberação do fator estimulador de colônias pelas células do tumor Ehrlich.

Porém, nos grupos onde houve a associação do tumor com estrógeno (grupos 7 e 8), o aumento do número de plaquetas não aconteceu, pois como sugerem Ferreira Neto et al. (1981), a aplicação exógena de estrógeno pode causar um efeito deletério na produção de plaquetas. Isso se confirma com a observação da diminuição do número de plaquetas no grupo onde o tratamento foi apenas o ciproionato de estradiol.

No entanto, no grupo 6 também foi feita a associação do tumor com ciproionato de estradiol. A diferença é que nesse grupo houve ainda a adição de TAM, que parece ter inibido a ação do estrógeno, resultando também no aumento significativo do número de plaquetas. Já os grupos 3, 4 e 5 não apresentaram diferença na contagem total de plaquetas. Segundo Cosman et al., (2005) e Ganz e Land, (2008) o uso do tamoxifeno induz ao aumento do número de plaquetas, o que não foi encontrado no grupo 4. Contrariamente GERSHENSON (1987) e SANTANA (1988)

relatam trombocitopenia logo após o uso da DOX.

Provavelmente não foram observadas essas alterações neste estudo, porque a coleta do sangue para análise foi feita 72h após a última aplicação do medicamento, o que proporcionou tempo para que organismo se recuperasse.

**Tabela 2:** Análises hematológicas por grupo.

Grupos	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Hemácias (mm <sup>3</sup> )	7,6±0,23	10,8±0,45	9,9±0,59	10,5±0,60	10,1±0,56	9,34±0,32	8,84±0,50	4,84±0,76
Hemoglobina (g/dl)	7,6±0,23	10,8±0,45	9,9±0,59	10,5±0,60	10,1±0,56	9,34±0,32	8,84±0,50	4,84±0,76
Leucócitos totais (mm <sup>3</sup> )	13.45±1,60	4.60±1,00	4.90±0,53	8.05±0,60	3.85±1,60	15.65±3,66	3.01±0,15	4.65±1,03
Plaquetas x 10 <sup>3</sup> (μ)	598.0±96,08	243.5±59,63	399,5±8,73	389.2±21,81	322.0±170,51	513.0±199,06	346.0±7,64	271.0±8,86

Valores expressos como média ± desvio padrão.

## 5.2 Análises Histopatológicas

As principais alterações histológicas evidenciadas no estômago e intestino delgado foram necrose e ou apoptose de glândulas e perda de epitélio de revestimento.

**Tabela 3:** Alterações histopatológicas no estômago e intestino delgado de camundongos tratados com cloridrato de doxorrubicina (grupoV) e camundongos inoculados com TAE e tratados com cloridrato de doxorrubicina e cipionato de estradiol (grupo VII).

ÓRGÃO/ ALTERAÇÕES	Grupo 5 (DOX)		Grupo 7 (TAE+cipionato de estradiol+DOX)	
	QUANTIDADE	GRAU	QUANTIDADE	GRAU
<b>ESTÔMAGO</b>				
NECROSE E/OU APOPTOSE DE GLÂNDULAS	75%	3	60%	2
	25%	2	40%	1
PERDA DO EPITÉLIO DE REVESTIMENTO	70%	2	80%	2
	30%	1	20%	3
<b>INTESTINO DELGADO</b>				
NECROSE E/OU APOPTOSE DE GLÂNDULAS	75%	2	60%	2
	25%	3	20%	1
PERDA DO EPITÉLIO DE REVESTIMENTO	50%	2	80%	2
	50%	3	20%	1

**Fonte:** Quadro de alterações histopatológicas encontradas no estômago e intestino delgado utilizando o método adaptado de Alvarenga (1999), os quais variaram de 0 a 3. Onde 0 equivale à ausência de lesão, 1 lesão leve, 2 lesão moderada e 3 lesão intensa.

A Tabela 3 apresenta um resumo dos principais achados histopatológicos deste estudo.

As avaliações histopatológicas do estômago no grupo 5 (cloridrato de doxorrubicina), demonstraram lesões intensas (grau 3) de necrose e ou apoptose de glândulas estomacais em 75% das amostras. Nas demais amostras (25%) foram observadas lesões moderadas (grau 2). A perda do epitélio de revestimento do estômago foi observada em 70% das amostras, apresentando lesões moderadas (grau 2) (tabela 3) e lesões leves (grau 1) em 30% das amostras.

Nesse mesmo grupo, a avaliação histopatológica do intestino demonstrou

necrose e/ou apoptose de glândulas com lesões moderadas (grau 2) em 75% das amostras, e lesões intensas (grau 3) em 25 % das amostras. Já a perda do epitélio de revestimento do intestino apresentou lesões moderadas (grau 2) em 50% das amostras (Figura 7), e lesões intensas (grau 3) em 50% das amostras.

Esses resultados demonstram que a doxorubicina tem efeito citotóxico sobre as células epiteliais do estômago e do intestino, pois essas células em mamíferos são altamente proliferativas (LIPKIN, 1985). Lakhani et al. (2002) e Klein (2001) relatam resultados semelhantes, e sugerem que a doxorubicina não é uma droga tumor específico e é prejudicial às células normais do epitélio gastrointestinal, induzindo apoptose ou interrupção do ciclo celular.

Sendo assim, a doxorubicina induz alterações na morfologia da mucosa gastrointestinal, causando necrose e/ou apoptose de glândulas, perda do epitélio de revestimento do estômago e do intestino levando a enterite em camundongos tratados. Os achados histopatológicos aqui encontrados estão de acordo com Green e Leeuwenburgh, (2002), que descrevem a doxorubicina (DOX) como um indutor de alterações gastrointestinais, alterações essas que podem variar em intensidade de acordo com o tempo de exposição à droga.

Ainda segundo Green e Leeuwenburgh, (2002) em seu estudo, foi observado muito pouco dano no tecido gastrointestinal após 6 horas da aplicação da DOX. Após 72h, houve perceptível degeneração das criptas intestinais. E com o tempo de 96h após a aplicação da DOX foi observado o grau máximo de lesões, encontrando-se enfraquecimento das vilosidades e perda das criptas. Os autores demonstraram também que pós 120h da aplicação da DOX, as criptas iniciam a regeneração e as vilosidades começaram a se alongar, Richardson e Johnson (1997) em seu trabalho, também demonstraram a característica de dose dependência da doxorubicina, onde no terceiro dia após a administração intravenosa da droga em camundongos, houve maior grau de destruição do epitélio intestinal, havendo diminuição da reparação, da proteção, da homeostase celular e aumento da apoptose. Já no sétimo dia após a administração aconteceu normalização destas funções, fazendo com que houvesse a reparação do mesmo tecido e interrupção do efeito tóxico da droga.

Neste estudo, avaliou-se o efeito da DOX no estômago e no intestino de camundongos quatro dias (96h) após a segunda dose de DOX, onde foram encontrar as várias lesões teciduais de grau moderado a intenso, reafirmando assim

o efeito deletério causado pela DOX no aparelho gastrointestinal levando a enterite.

A avaliação histopatológica do grupo 7 (TAE+cloridrato de doxorubicina+cipionato de estradiol) demonstrou lesões de necrose e ou apoptose de glândulas no estômago em intensidade moderada (grau 2) para 60% das amostras (Figura 7), os outros 40% das amostras observadas apresentaram lesões em intensidade discreta (grau 1) (Figuras 4, 5 e 6). Observou-se também intensa perda do epitélio de revestimento do estômago (grau 3) em 40% das amostras, moderada perda do epitélio (grau 2) em 40% das amostras (Figura 7) e ainda leve perda epitelial (grau 1) em 20% das amostras avaliadas (Figuras 4, 5 e 6).

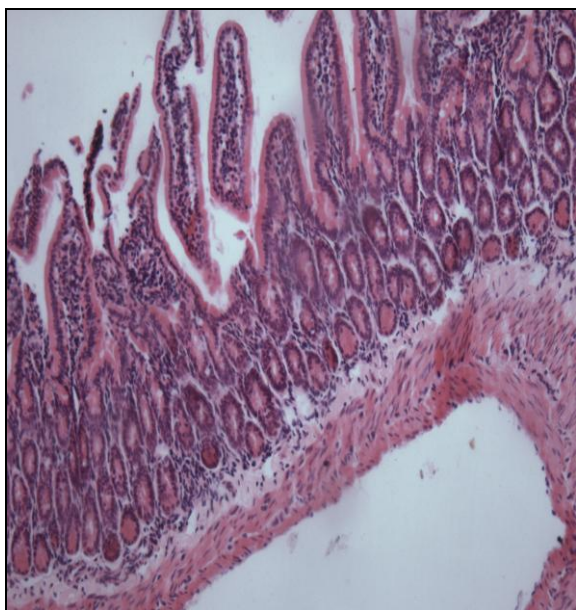
No mesmo grupo, a avaliação histopatológica do intestino demonstrou necrose e ou apoptose de glândulas em intensidade moderada (grau 2) em 60% das amostras (Figura 7), lesões leves (grau 1) em 20 % das amostras (Figuras 4, 5 e 6), e ainda ausência de lesão (grau 0) em 20% das amostras avaliadas (Figura 3). Já a perda do epitélio de revestimento intestinal se apresentou em intensidade moderada (grau 2) em 80% das amostras (Figura 7), e leve (grau 1) em 20% das amostras (Figuras 4, 5 e 6).

Apesar da atividade da doxorubicina ser derivada principalmente da inibição da topoisomerase II e da dose utilizada ser determinante para seu mecanismo de ação (SPIVACH, 1994), outros efeitos apresentam um papel importante em relação à sua atividade antitumoral, como a formação de radicais livres, com a sua capacidade de alquilar diretamente o DNA ou de induzir a formação de pontes entre as duas cadeias de DNA, a geração de radicais livres é um importante efeito secundário ligado a esta classe de medicamentos, o que limita a sua utilização clínica, já que a formação de radicais livres é uma das vias de indução de apoptose causada pela doxorubicina (SINGAL et al. 2000; GREEN e LEEUWENBURGH, 2002; CHILDS et al. 2002; MINOTTI et. al., 2004). A diminuição desses radicais pode estar ligada à diminuição da apoptose celular encontrada nos animais tratados com estrógeno.

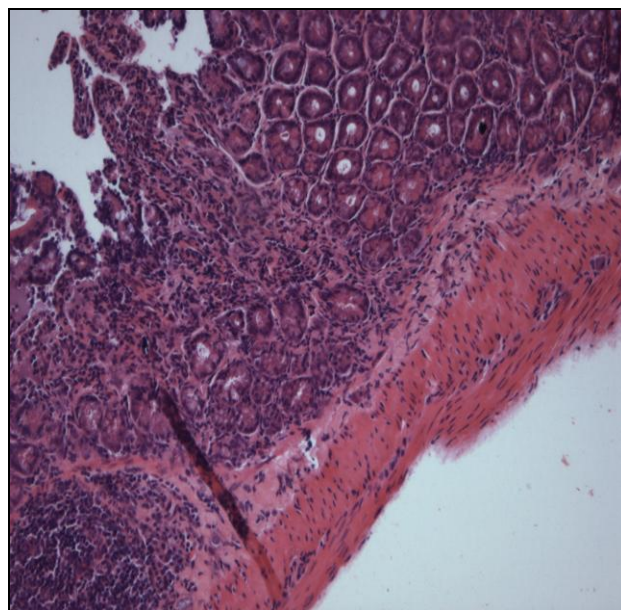
Ainda segundo Lalla et al. (2008) os radicais livres são desencadeantes de enterite em pacientes que recebem tratamento com quimioterápicos e ou radioterapia. O que reforça a hipótese de que se o estrógeno inibiu a liberação desses radicais, resulta em um efeito protetor importante na mucosa do estômago e do intestino, diminuindo assim lesões por apoptose, e a perda do epitélio de

revestimento.

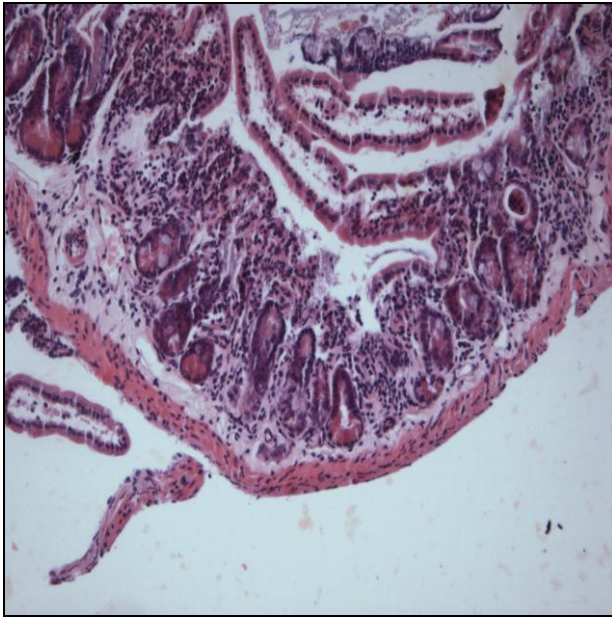
Estes resultados, quando comparados aos resultados do grupo 5, demonstram que quando se utiliza a doxorrubicina juntamente com o cipionato de estradiol há uma diminuição no grau de lesões que levaram a apoptose e necrose do estômago e do intestino. Este efeito protetor do estrógeno também foi demonstrado por Ito (2007) que comparou a toxicidade cardíaca da doxorrubicina em camundongos machos e fêmeas, relatando que houve uma diminuição da produção de radicais livres pelos camundongos fêmeas quando comparados aos machos, sugerindo que o maior nível de estrógeno reduz a produção desses radicais. Ainda, segundo Singal et al. (2000), a reposição do estrógeno em ratas castradas diminuiu o dano oxidativo, aumentando a atividade das enzimas anti-oxidantes e, conseqüentemente melhorando a função cardíaca nessas ratas.



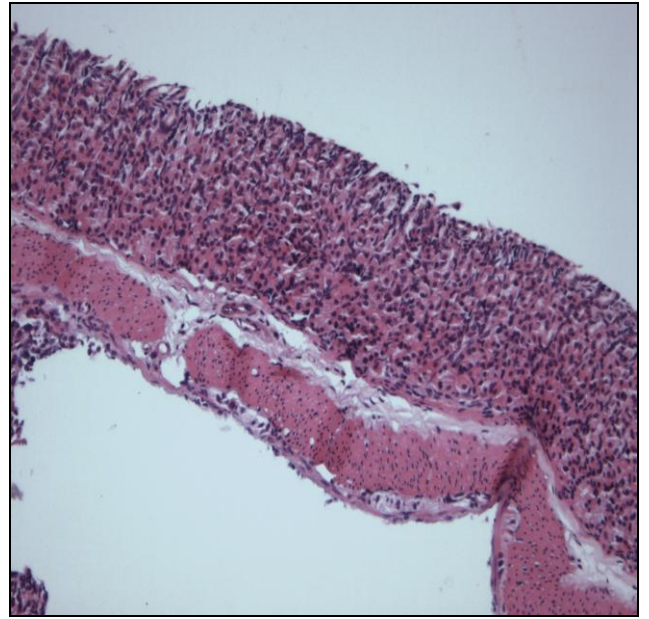
**Figura 3:** Epitélio intestinal, grupo sem tratamento, sem lesões; epitélio e criptas intestinais preservadas. HE, 10X



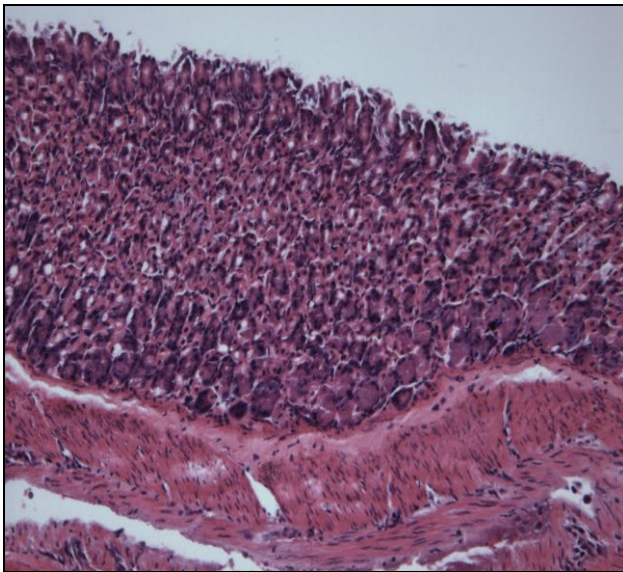
**Figura 4:** Lesão intestinal de grau 1; criptas intestinais parcialmente preservadas, perda epitelial focal. HE, 10X.



**Figura 5:** Lesão intestinal de grau 1; criptas intestinais parcialmente preservadas. HE, 10X.



**Figura 7:** Lesão gástrica de grau 2; perda do epitélio de revestimento e das vilosidades. HE, 10X.



**Figura 6:** Lesão gástrica de grau 1; perda do epitélio de revestimento e vilosidades parcialmente preservadas. HE, 10X.

## 6. CONCLUSÕES

Como descrito no presente estudo podemos concluir:

- O tumor ascítico de Ehrlich causou diminuição do número de hemácias, hematócrito e hemoglobina.
- O cipionato de estradiol potencializou os efeitos do tumor ascítico de Ehrlich.
- A presença do tumor causou aumento significativo do número de leucócitos e do número de plaquetas, não havendo influência do cipionato de estradiol nessa alteração.
- O citrato de tamoxifeno inibiu os efeitos hematológicos do cipionato de estradiol associados ao tumor ascítico de Ehrlich.
- O cloridrato de doxorrubicina quando utilizado na presença do tumor ascítico de Ehrlich resultou em leucopenia.
- Na dosagem de 25 mg/m<sup>2</sup>, o cloridrato de doxorrubicina causou toxicidade gastrointestinal nos camundongos.
- O cipionato de estradiol, quando associado ao cloridrato de doxorrubicina promoveu efeito protetor discreto no aparelho gastrointestinal, diminuindo o grau de lesões epiteliais e de necrose e/ou apoptose de glândulas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULKAREEM, I.H.; ZURMI, I.B. **Review of hormonal treatment of breast cancer Department of Trauma and Orthopedic Surgery**, Leeds University Teaching Hospital, Leeds, West Yorkshire, United Kingdom 28 de Julho de 2011.
- ADAM, J.K.; ODHAV, B.; BHOOLA, K.D. Immune responses in cancer. **Pharmacology and therapeutics**, vol. 1, p. 1-20, 2003.
- AHSEN, N.; BINDER, C.; BROCKMÖLLER, J.; OELLERICH, M. CYP2D6 and tamoxifen: pharmacogenetic reinvention of an established drug? **Journal laboratorial medical**, v.33(5), 2009.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia molecular da Célula**. 5.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2009.
- ALLRED, D.C.; HARVEY, J.M.; BERARDO, M.; CLARK, G.M.; Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. **Model Pathology**. v.11, p.155-168, 1998.
- ANELLI, T.F.M. Princípios gerais de quimioterapia antineoplásica. In: Coelho FRG (Eds.). **Curso básico de oncologia do Hospital A.C. Camargo**. Rio de Janeiro: Medsi, p.117-131, 1996.
- BADYLAK, S.F.; VAN VLEET, J.F.; HERMAN, E.H.; FERRANS, V.J.; MYERS, C.E. Poikilocytosis in dogs with chronic doxorubicin toxicosis. **Am J Vet Res**, v.46, n.2, p.505-508, 1985.
- BERGAMI-SANTOS, P.C.; MARIANO, M.; BARBUTO, J.A.M. Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. **Life Sciences**, v.75, n.2, p.245-255, 2004.
- BERTELLI, G.; PRONZATO, P.; AMOROSO, D.; CUSIMANO, M.P.; CONTE, P.F.; Adjuvant tamoxifen in primary breast cancer: influence on plasma lipids and antithrombin III levels. **Breast Cancer Research and Treatment**. v.12, p.307-310, 1988.
- BITTENCOURT, H.N.S.; RIBEIRO, A.F.T.; NEUBENSCHWANDER, L.C. Fármacos antineoplásicos. In: FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L. (Orgs.) **Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, cap.44, p.646-687, 2010.
- BONASSA, E.M.A. **Enfermagem em terapêutica oncológica**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, p.277, 2005.
- BOSTWICK, D.G.; MYERS, R.P.; OESTERLING, J.E. Staging of prostate cancer. **Sem Surg Oncol**, v.10, p.60-72, 1994.
- BUNZ, F.; Cell death and câncer therap, **Current Opinion in Pharmacology**, v. 1, p.337-341, 2001.
- CANÇADO, R.D. e CHIATTONE, C.S. Anemia da doença crônica. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v.24, p.127-136, 2002.
- CHABNER, B.A.; ALLEGRA, C.J.; CURT, G.A. **Agentes antineoplásicos**. In: HARDMAN, J. G.; J.A.; LIMBIRD, J.E.; (Ed.). Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica. 9. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, cap.51, 1996.
- CHABNER BA, RYAN DP, PAZ-ARES L, GARCIA-CARBONERO R, CALABRESI P. Antineoplastic agents. In Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed. Hardman JG, Limbird LE, Gilman A, eds. New York: McGraw-Hill. p.1389-1459, 2001.
- CHAKRAVARTHY, A. B.; KELLEY, M. C.; MCLAREN, B.; TRUICA, C. I.; BILLHEIMER, D.; MAYER, I.

A.; GRAU, A. M.; JOHNSON, D. H.; SIMPSON, J. F.; BEAUCHAMP, R. D.; JONES, C.; PIETENPOL, J. A. Neoadjuvant Concurrent Paclitaxel and Radiation in Stage II/III Breast Cancer. **Clinical Cancer Research**, Nashville, v.12, n 5, p.1570-1576, Março 2006.

CHALITA, M. C. C. Uso de corticóide prednisona na oncologia veterinária. **Shering-Plough Veterinária**.p.3-12, 2002.

CHANG, J.; POWLES, T. J.; ALLRED, D. C.; ASHLEY, S. E.; CLARK, G. M.; MAKRIS, A.; ASSERSOHN, L.; GREGORY, R. K.; OSBORNE, C. K.; DOWSETT, M. Biologic Markers as Predictors of Clinical Outcome from Systemic Therapy for Primary Operable Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, San Antonio, v.17, n.10, p.3058-3063, Outubro 1999.

CHARLES F. LACY, LORA L. ARMSTRONG, MORTON P. GOLDMAN, LEONARD L. LANCE, STUDY OF AN ANIMAL MODEL OF BLOOD HYPOPLASIA INDUCED BY THE ANTINEOPLASTIC AGENT DOXORUBICIN (ADRIBLASTINA®) **Medicamentos Lexi-comp Manole**, p.98, 2009.

CHILDS, A., PHANEUF, S., DIRKS, A., PHILLIPS, T., AND LEEUWENBURGH, C. Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome c release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity and Bcl-2:Bax ratio. **Cancer Research** v.62, p. 4592-4598. 2002.

CHU, E. e De VITAN, V.T. Cancer chemotherapy drug manual. **Jones and Bartlett Publishers**, 2004.

COOKSON, M.S; SOGANI, P.C.; RUSSO, P.; HERR, H.; DALBAGNI, G.; REUTER, V.E. et al. Pathological staging and biochemical recurrence after neoadjuvant androgen deprivation therapy in combination with radical prostatectomy in clinically localized prostate cancer: results of a phase II study. **Brazil Journal Urology**; v.79, p.432-438, 1997.

COSMAN, F.; BAZ-HECHT, M.; CUSHMAN, M.; VARDY, M. D.; CRUZ, J. D.; NIEVES, J. W.; ZION, M.; LINDSAY, R. Short-term effects of estrogen, tamoxifen and raloxifene on hemostasis: a randomized-controlled study and review of the literature. **Thrombosis Research**, v.116, p.1-13, 2005.

COTTERCHIO M, KREIGER N, THEIS B, SLOAN M, BAHL S.. Hormonal factors and the risk of breast cancer according to estrogen- and progesterone-receptor subgroup. **Cancer Epidemiology Biomarkers e Prevent**; v.12, p.1053-60, 2003.

COUTO, C.G.; Complicações da quimioterapia do câncer. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Manual de medicina interna de pequenos animais**. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, cap.80, p.829-832, 2006.

DAGLI, M. L. Z. LUCAS, S. R. R. Agentes Antineoplásicos. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L., BERNARDI, M. M. 4 ed. Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária. Guanabara Koogan p.667-686, 2006.

DAGLI, M.L.Z. **Disseminação linfática do tumor de Ehrlich: estudo experimental**. [Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária e Zootecnia]. São Paulo: Universidade de São Paulo/USP, p.148 1989.

DAGLI, M.L.Z., LORIS, S.C.S., GUERRA, J.L. Effect of B-carotene on development of the solid Ehrlich tumor in mice. **Life Science**, v.71, p.717-724, 2002.

DALE, J. FLETCHER, T.; LAVEN, M.; MASONER, D.; NOVAK, D.. The Pharmacogenetics of Tamoxifen Therapy. **Communiqué**. v.32(1), p.1-8, 2007.

DAWE, C.J. Comparative neoplasia. In: HOLLAND, J. F. & FREI III, E. **Cancer medicine**. 2. ed. Philadelphia : Lea & Febiger, p. 209,1982

DESTA, Z.; WU, G.M.; MOROCHO, A.M.; Comprehensive Evaluation of Tamoxifen Sequential

Biotransformation by the Human Cytochrome P450 System in Vitro: Prominent Roles for CYP3A and YP2D6. **Journal Pharmacology Experimental Therapy**, v.310(3), p.1062–1075, 2004.

DIAS, M. A.; SANTANA, A. E. ; SOBREIRA, M. R. F.; FILHO E. C. Estudo de um modelo animal de hipoplasia sanguínea induzida pelo agente antineoplásico doxorubicina (Adriplastina). *Ars Veterinária*, v. 19, nº 3, p. 246-253, 2003.

DIEZ-PEREZ, A. Selective estrogen receptor modulators (SERMS). **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, n. 4, p. 720-734, ago. 2006.

DOLL, R. e PETO, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **Journal of National Cancer Institute**, 66: 1191-1308, 1981.

DOROSHOW, J.H. Anthracyclines and anthracenediones. In: CHABNER, B.A.; LONGO, D.L. **Cancer chemotherapy and biotherapy**. 2<sup>nd</sup>ed. Philadelphia: Lippicott-Raven, chap.17, p.409-434. 1996.

EISENBERG, A.; **Sobrevida de cinco anos para pacientes com carcinoma ductal infiltrante de mama sem comprometimento de linfonodos axilares. Coorte Hospitalar, 1992-1996**, Tese em doutorado, Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz. 2004.

EISENBERG, A.L.A. e KOIFMAN, S. Câncer de mama: marcadores tumorais. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v.47, p.377-388, 2001.

FAIR, W.R.; COOKSON, M.S.; STROUMBAKIS, N.; COHEN, D.; APRIKIAN A.G.; WANG, Y.; The indications, rationale, and results of neoadjuvant androgen deprivation in the treatment of prostatic cancer: Memorial Sloan-Kettering Cancer Center results. **Urology**, v.(49), p.46:55, 1997.

FERREIRA NETO, J.M; VIANA, E.S; MAGALHAES, L.M. **Patologia clínica veterinária**. Belo Horizonte, Rabelo, 1981.

FOLGUEIRA, M.A.A.K. e BRENTANI, M.M. Receptores de estrógeno e progesterona em câncer de mama. In: BRENTANI, M.M.; COELHO, F.R.G.; KÓWALSKI, L.P. (Coord.). **Bases da Oncologia**. São Paulo: Tecmedd. cap.9. 2003.

FONSECA, S.M.; MACHADO, R.C.L.; PAIVA, D.R.S.; ALMEIDA, E.P.M.; MASSUNAGA, V.M.; JÚNIOR, W.R.; KOIKE, C.; TADOKORO, H. **Manual de quimioterapia antineoplásica**. Rio de Janeiro: Ed. Reichmann & Affonso 164p. 2000.

FOULKES, W.D.; BRUNET, J.S.; STEFANSSON, .IM.; STRAUME, O.; CHAPPUIS, P.O.; BÉGIN, L.R.; The prognostic implication of the basal-like (cyclin E high/p27 low/p53+/glomeruloid-microvascular-proliferation+) phenotype of BRCA1-related breast cancer. **Cancer Revist.** v.64, n.3, p.830-5, Feb. 2004.

GABAI, V.L.; ZAMULAEVA, I.V.; MOSIN, A.; YULIA, M.M.; BUDAGOVA, Y.V.; KABAKOV, A.E. Resistance of Ehrlich tumor cells to apoptosis can be due accumulation of heat shock proteins. **Cancer Letters**, v.375, p.21-26, 1995.

GANZ, P. A. LAND, S. R. Risks, benefits, and effects on quality of life of selective estrogen-receptor modulator therapy in postmenopausal women at increased risk of breast cancer. **Menopause**, v.15, p.797-803, 2008.

GENTILE, L.F. **Modulação por PGEz no perfil de subpopulações celulares e de citocinas na evolução do tumor ascítico de Ehrlich (TAE)**. Botucatu, UNESP, Dissertação (Mestrado em Medicina) -Universidade Estadual Paulista,p.101, 2001.

GERSHENSON, D.M. High dose doxorubicin infusion therapy for disseminated mixed mesodermal sarcom of the uterus. **Cancer**, v.59, n.7, p.1264-1267, 1987.

GIORDANO, S. H. Update on Locally Advanced Breast Cancer. **The Oncologist**, Houston, v.8, p.521-530, Agosto 2003.

GOLDHIRSCH A, GLICK JH, GELBER RD, COATES AS, SENN HJ. Meeting highlights: International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer. Seventh International Conference on Adjuvant Therapy of Primary Breast Cancer. **Journal Clinical Oncology**. v.19(18), p.3817-27, 2001.

GRAHAME-SMITH, D. G.; ARONSON, J. K. **Farmacopéia: tamoxifeno**. In:(Aut.). Tratado de Farmacologia Clínica e Farmacoterapia. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.545-546, 2002.

GREEN, P., LEEUWENBURGH, C. Mitochondrial dysfunction is an early indicator of doxorubicin-induced apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta** v.1588, p.94-101, 2002.

GROSCLAUDE P, SAUVAGE M, DAUBISSE-MARLIAC, L. FRANCE, TARN (1998-2002). In: MP Curado, B Edwards, HR Shin et al. Cancer incidence in five continents. (IARC Sci Publ No. 160, vol. IX). Lyon: **International Agency for Research on Cancer**; 2007.

GUERRA, J. L; **Aspectos do processo inflamatório em camundongos portadores do Tumor de Ehrlich..**-Tese (Doutorado em patologia experimental e comparada) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia ,Universidade de São Paulo. São Paulo, 79p.1983.

HAHN, K.A e RICHARDSON, R.C. **Cancer chemotherapy: a veterinary handbook**. Malvern: Ed. Williams & Wilkins, 255p.1995.

HARRIS L.; FRITSCH, H.; MENNEL, R.; NORTON, L.; RAVDIN, P.; Taube S et al. American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. **Journal Clinical Oncology** v.25(33), p.5287-5312, 2007.

HAUSBERGER, R.; DE BEM, R.S.; ALENCAR, B.L.F.; PEDROSO, M.L.A.; BOARETTI, A.C.; MESSIAS-REASON, L.J.T. Comportamento do sistema complemento no líquido ascítico de diferentes etiologias. **Jornal Brasileiro de Patologia**, v.37, n.3, p.187-196, 2001.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Câncer no Brasil: presente e futuro. **Revista da Associação Médica Brasileira** 2004. vol. 50, n.1, p. 1-1. Disponível em: [www.scielo.br](http://www.scielo.br). Acesso em: 5 mai 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Incidência de câncer no Brasil: estimativa 2006**. Disponível em: [www.inca.gov.br/estimativa/2006](http://www.inca.gov.br/estimativa/2006). Acesso em: 11 mai. 2012.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa de Cânceres no Brasil para o ano de 2012**. Disponível em: [www.scielo.br](http://www.scielo.br). Acessado em: 5 de maio 2012.

ITO Y. Does lapatinib, a small-molecule tyrosine kinase inhibitor, constitute a breakthrough in the treatment of breast cancer? **Breast Cancer**.v.14, n.2, p.156- 162, 2007.

KATZUNG, B. G.; SILVA, P. **Farmacologia: básica e clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.11, p.545-71, 1998.

KINSINGER, L. S.; HARRIS, R.; WOOLF, S. H. Chemoprevention of breast cancer:a summary of the evidences for the U.S. Preventive Services Task Force. **Annals of Internal Medicine**, v.137, p.59-69, 2002.

KLEIN, T. Integrating Genotype and Phenotype Information: An Overview of the PharmGKB Project. **Pharmcal Journal**. V.1, p.167-170. 2001.

KUSAMA, M.; MIYAUCHI, K.; AOYAMA, H.; SANO, M.; Effects of toremifene (TOR) and tamoxifen (TAM) on serum lipids in postmenopausal patients with breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**. v. 88, n.1, p. 1-8, 2004.

KUSMARTSEV S, RUIZ DE MORALES JMG, RULLAS J, DANILETS MG, SUBIZA JL. Sialoadhesin

expression by bone marrow macrophages derived from Ehrlich-tumor-bearing mice. **Cancer Immunology, Immunotherapy** 48(9), 493-498, 1999.

LAKHANI, S.R.; VAN DE VIJVER, M.J.; JACQUEMIER, J.; The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. **Journal Clinica Oncology**, v 20, p. 2310-2318. 2002.

LALLA RV, SONIS ST, PETERSON DE. Management of oral mucositis in patients who have cancer. **Dent Clin N Am**. V.52, pag.61-77.2008.

LANORE, D. e DELPRAT, C. **Quimioterapia anticancerígena**. São Paulo, SP: Roca;191p. 2004.

LAVALLE, G.E., ARAUJO, R.B., CARNERO, R.A. Tratamento clínico e cirúrgico de mastocitomas em cães. **Veterinary News**, v. 66, p. 4-7, 2003.

LEVENSON, A.S. e JORDAN, V.C. Selective oestrogen receptor modulation: molecular pharmacology for the millennium. **European Journal of Cancer**, Great Britain, v.35, n.14, p.1974-1985, 1999.

LIPKIN M. Growth and development of gastrointestinal cells. **Annu Rev Physiol** v.47, p.175-197, 1985.

MANN GB, FAHEY VD, FELEPPA F, BUCHANAN MR. "Reliance on Hormone Receptor Assays of Surgical Specimens May Compromised Outcome in Patient with Breast Cancer." **Journal of Clinical Oncology** p.5148-5154, 2005.

MINOTTI G, MENNA P, SALVATORELLI E, CAIRO G, GIANNI L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacol Rev**. v.56, p.185-229.2004.

MISITI, F.; GIARDINA, B.; MORDENTE, A.; CLEMENTI, M.E. The secondary alcohol and aglycone metabolites of doxorubicin alter metabolism of human erythrocytes. **Braz J Med Biol Res**, v.36, p.1643-1651, 2003.

MORALES, J.R et al.. Ehrlich tumor stimulates extramedullar hematopoiesis in mice without secreting identifiable colony-stimulating factors and without engagement of host T cells. **Exp. Hematol.**, v.27, p.1757-1767, 1999.

MOURIDSEN, H. T.; PALSHOF, T. Tamoxifen in advanced breast cancer. **Cancer Treatment Reviews**. v.5, n.3, p.131-141, 1978.

NEWMAN, W. et al. Impaired Tamoxifen Metabolism Reduces Survival in Familial Breast Cancer Patients. **Clinical Cancer Res** v.14(18), p.5913-5918, 2008.

NORMAN, A.W.; LITWACK, G. **Hormones**. 2.ed. San Diego : Academic, 558p.1997.

O'KEEFE, D.A.; SCHAEFFER, D.J. Hematologic toxicosis associated with doxorubicin administration in cats. **J Vet Intern Med**, v.6, p.276-282, 1992.

OGILVIE, G.K.; OBRADOVICH, J.E.; ELMSLIE, R.E.; VAIL, D.M.; MOORE, A.S.; CURTIS, C.R.; STRAW, R.C.; DICKINSON, K.; COOPER, M.F.; WITHROW, S.J. Toxicoses associated with administration of mitoxantrone to dogs with malignant tumors. **JAVMA**, v.198, n.9, p.1613-1617, 1991.

OLIVEIRA, S.I.; FECCHIO, D.; BRUMATTI, G.; LANDRAF, R.G.; AMARANTE-MENDES, M.G.P; JANCAR, S. **Efeito antagonista de PAF no número de células, apoptose, produção de PGE<sub>2</sub> e no crescimento do tumor ascítico de Ehrlich (TAE)**. Instituto de Ciências Biológicas, USP, Pôster 236, 2003. Disponível em: [www.uspdigital.usp.br](http://www.uspdigital.usp.br). Acessado em: 12 de abril 2012.

PARK, W.C.; JORDAN, V.C. Selective estrogen receptor modulators (Serms) and their roles in breast cancer prevention. **Trends in Molecular Medicine**, v.8, n.2, p.82-88, 2002.

PASCOAL, C.K.P.; BERGMANN, A.; RIBEIRO, M.J.P.; VIEIRA, R.J.S.; FONTOURA, H.A.; Reports of Women who Underwent the Sentinel Lymph Node Biopsy as for Guidance Received for Preventing Lymphedema: a Qualitative Study Relatos de Mujeres Sometidas a la Biopsia del Linfonodo Centinela en Cuanto a las Orientaciones Recibidas para la Prevención de Linfógena: un Estudio Cualitativo. **Revista brasileira cancerologia**, Rio de Janeiro, v.56, n.2, p.219-226, abr./jun, 2010.

RICHARDSON, D.S.; JOHNSON, S.A. Anthracyclines in haematology: preclinical studies, toxicity and delivery systems. **Blood Review.**, v.11, p.201-223, 1997.

RIZZO, M.S.; **Colonização preferencial e disseminação do tumor transplantável de Ehrlich em camundongos.** (Tese de Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo/USP, 100p. 2000.

RODASKI, S. ; DE NARDI, R.B. **Quimioterapia antineoplásica em cães e gatos.** Curitiba: Editora Maio, 307p.2004.

RUBENS, R.D. ; COLEMAN, R.E. Twenty-five years of reviewing cancer treatment **Cancer Treatment Reviews**, v.25, p.1-2, 1999.

SAAD-HOSSNE R, HOSSNE WS, PRADO RG. Efeito da solução aquosa de fenol, ácido acético e glicerina sobre o tumorascitico de Ehrlich: estudo experimental in vitro. **Acta Cir Bras [serial online]** 2004 Jan-Fev;19. Disponível em: URL:<http://www.scielo.br/acb>. acessado 03 de setembro 2012.

SAAD-HOSSNE R. Tumor hepático experimental (VX-2) em coelho: implantação domodelo no Brasil. **Acta Cir Bras [serial online]** 2002 Jul-Ago; 17. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb>. acessado em 08 de agosto de 2012.

SANTANA, A E. **Benzenismo Experimental:desenvolvimento da medula óssea ectópica.** Ribeirão Preto, Tese (Doutorado em Fisiologia) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.1988.

SANTEN, R.J.; BOYD, N.F.; CHLEBOWSKI, R.T.; CUMMINGS, S.; CUZICK, J.; DOWSETT, M.; EASTON, D.; FORBES, J.F.; KEY, T.; HANKINSON, S.E.; HOWELL, A.; INGLE, J.; Critical assessment of new risk factors for breast cancer:considerations for development of an improved risk prediction model. **Endocrine Related Cancer.** v.14, p.169-187, 2007.

SCHROTH, W.; GOETZ, M.P.; HAMANN, U.; FASCHING, P.A.; SCHMIDT, M.; WINTER, S.; FRITZ, P.; SIMON, W.; SUMAN, V.J.; AMES, M.M.; SAFGREN, S.L.; KUFFEL, M.J.; ULMER, H.U.; ;STRICK, R.; BECKMANN, M.W.; KOELBL, H.; WEINSHILBOUM, R.M.; INGLE, J.N.; EICHELBAUM, M.; SCHWAB, M.; BRAUCH, H.; Association Between CYP2D6 Polymorphisms and Outcomes Among Women with Early Stage Breast Cancer Treated with Tamoxifen. **JAMA**, Oct 7, v.302(13) p.1429-1436, 2009.

SILVA, C.E.V; CAMACHO, A.A.; NAKAGE, A.P.M.; SANTANA, A.E.; CANOLA, J.C. Efeitos cardiovasculares, hematológicos e bioquímicos do tratamento crônico experimental com doxorubicina em cães. **Ars Veterinaria**, v.20, n.2, p.185-194, 2004.

SILVA, J.M. Cromossomas, genes e hereditariedade. In: SILVA, J.M. **Bioquímica da informação genética.** (Trad. Emilia Alves). Lisboa: Publicações Ciência e Vida Ltda, cap.1, p.55-67, 2006.

SILVA, L.C. Câncer de mama e sofrimento psicológico: aspectos relacionados ao feminino. **Psicologia em Estudo**, Maringá, v. 13, n. 2, p. 231-237, abr./jun. 2008. Disponível em: [www.scielo.org](http://www.scielo.org). Acessado em 5 de maio 2012.

SINGAL, P.K., LI, T., KUMAR, D., DANELISEN, I., AND ILISKOVIC, N. Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. **Mol Cell Biochem**, v.207,p.77-86.2000.

SPIVACK, J.L.; Cancer related anemia:its causes and characteristics, **Sem. Oncol.**, v.21, p.3-8,1994.

STEWART, C.F.; RATAIN, M.J. Topoisomerase interactive agents. In: DEVITA JR, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. **Cancer: principles & practice of oncology**. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; v.2, p.452-466, 1997.

SUSANECK, S.J. Doxorubicin therapy in the dog. **JAVMA**, v.182, n.1, p.70-72, 1983.

TAUCHER, S.; RUDAS, M.; MADER, R.M. Do we need HER 2/neu testing for all patients with primary breast carcinoma? **Cancer**,v.98, p.2547-53, 2003.

TEUNISSEN, S.F.; ROSING, H.; KOORNSTRA, R.H.; LINN, S.C.; SCHELLENS, J.H.; SCHINKEL, A.H.; BEIJNEN, J.H.; Development and validation of a quantitative assay for the analysis of tamoxifen with its four main metabolites and flavonoids daidzein, genistein and glycitein in human serum using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **The Journal of Chromatography B**. v 877, p.2519-2529, 2009.

VAN VLEET, J.F. e FERRANS, V.J. Clinical observations, cutaneous lesions, and hematological alterations in chronic adriamycin intoxication in dogs with and without vitamin E and selenium supplementation. **Am J Vet Res**, v.41, n.5, p.691-699, 1980.

VAN DER HAGE, J. A.; VAN DE VELDE, C. J. H.; JULIEN, J.-P.; TUBIANA-HULIN, M.; VANDERVELDEN, C.; DUCHATEAU, L. Preoperative Chemotherapy in Primary Operable Breast Cancer: Result from the European Organization for Research and Treatment of Cancer Trial 10902. **Journal of Clinical Oncology**, Leiden, v.19, n.22, p.4224-4237, Novembro 2001.

VAN DER HAGE, J. A.; MIEOG, J. S. D.; VAN DE VIJVER, M. J.; VAN DE VELDE, C. J. H. Efficacy of Adjuvant chemotherapy according to hormone receptor status in young patients with breast cancer: a pooled analysis. **Breast Cancer Research**, Leiden, v.9, n.5, p.70 (1-9), Outubro 2007.

WILLIAMS, C.L.; STANCEL, G.M. Estrogênios e progestogênios. In: HARDMAN, J. G. et al. (Ed.). **Goodman e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, cap.57, 1996.

WITHROW, S.J. **Small animal clinical oncology**. Philadelphia: Ed. W.B. Saunders, 844p. 2007.

WOODLOCK, T.J. e LOUGHNER, J.E.; Farmacologia clínica dos agentes antineoplásicos. In: Rosenthal S, Carignan JR, Smith BD. **Oncologia prática: cuidados com o paciente**. 2 ed. Rio de Janeiro: Revinter, p.41-64, 1995.

WORD CANCER RESEARCH FUND; American Institute for Cancer Research. **Food, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective**. Washington (DC): The Institute; 670p. 1997.

YAGER, J. D. e DAVIDSON, N. E. Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer. **The New England Journal of Medicine**, Baltimore, v.354, n.3, p.270-282, Janeiro, 2006.