

**LIZA HELENA RAMOS NERY**

**EFICÁCIA DA DEXAMETASONA E DA DOXORRUBICINA NO  
TUMOR DE EHRLICH TRANSPLANTADO EM CAMUNDONGOS  
BALB/c**

Tese 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  
2004**

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

T

N456e  
2004

Nery, Liza Helena Ramos, 1966-

Eficácia da dexametasona e da doxorrubicina no tumor de Ehrlich trasplantedo em camundongos BALB/c / Liza Helena Ramos Nery. – Viçosa : UFV, 2004.  
xv, 71f. : il. ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Marlene Isabel Vargas Vilorio  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 52-68

1. Tumores - Tratamento. 2. Apoptose - Efeito da dexametasona. 3. Apoptose - Efeito da doxorrubicina. 4. Fator de necrose de tumor - Efeito da dexametasona. 5. Fator de necrose de tumor - Efeito da doxorrubicina. 6. Tumores - Quimioterapia. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 636.0896994

**LIZA HELENA RAMOS NERY**

**EFICÁCIA DA DEXAMETASONA E DA DOXORRUBICINA NO  
TUMOR DE EHRLICH TRANSPLANTADO EM CAMUNDONGOS  
BALB/c**

Tese 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: 10 de dezembro de 2004**

---

Prof. João Carlos P. da Silva  
(Conselheiro)

---

Prof. Cláudio César Fonseca

---

Prof. José Antônio Viana

---

Prof. Laércio dos A. Benjamin

---

Prof<sup>ª</sup>. Marlene Isabel Vargas Vitoria  
(Orientadora)

## **AGRADECIMENTO**

A Deus pela minha vida.

Aos animais, pela pureza do olhar.

À minha mãe, sempre ao meu lado, contribuindo para minha consolidação como pessoa.

Ao meu pai, que mesmo a seu modo, contribuiu para minha formação.

Aos meus irmãos Lívia e Lídson, sempre torcendo pelas minhas realizações.

À Universidade Federal de Viçosa, que me acolheu na graduação e mestrado e à coordenação do Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária que possibilitaram a realização deste curso.

À prof<sup>ra</sup>. Marlene Isabel Vargas Vilorio pela oportunidade e toda orientação, amizade e momentos de apoio, que serão levados para todos os momentos da minha vida.

Ao prof. Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo pelo apoio e tão calorosa acolhida, possibilitando meu crescimento profissional e pessoal, meu muito obrigada por tantos ensinamentos.

Ao médico patologista José do Carmo Lopes Moreira pela colaboração imprescindível para a conclusão deste trabalho.

Ao prof. João Carlos Pereira da Silva, pela atenção e colaboração neste trabalho.

Aos prof. José Antônio Viana e Sérgio Luiz Pinto da Mata pela colaboração e atenção.

Ao prof. Marcelo José Vilela, pelas células utilizadas neste trabalho.

Ao prof. Eduardo Paulino da Costa, pela colaboração nos dados estatísticos.

À profª. Cristina Chaves Dias, pelas preciosas dicas.

À profª. Rilene, ao prof. Cláudio Fonseca e a profª. Andréa Pacheco, pelo apoio.

À profª. Maria do Carmo pelos animais e espaço cedidos no Biotério (UFV) para a realização dos experimentos.

À Ana Paula grande colaboradora e amiga, um agradecimento especial.

À Sandra e Fernanda pela grande amizade.

Aos amigos Ferdinan, Carlos, Fabrício e Luiz pela colaboração.

Aos amigos do mestrado: Michelle, Cristina, Célber, Larissa, Irma, Ester, Sidimar, Carol, Carla, Maize, Priscilla, Lílian, Tércia, Luiz, Rener, Breno pelas agradáveis e divertidas horas de convivência.

Ao Sérgio Aguiar Leitão pelo auxílio nas correções.

À Margareth pelos lanches nas horas de aperto.

Aos funcionários Cláudio e Adão do laboratório de histopatologia por toda colaboração.

Aos funcionários Rose, Heloisa, Clélia, Geraldinho, Luiz Márcio, Lucinda, Maninha, Camilo, Raimundo (*in memoriam*), Marcinho, Juliano, Sr Adão, Sérgio, João, Tuim, Toninho, muito obrigada.

Obrigada a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

LIZA HELENA RAMOS NERY, filha de José Edson Sá Fortes Nery e Teresa Maria Ramos Nery, nasceu em Santos Dumont, MG, em 13 de junho de 1966.

Concluiu o curso de graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa, em fevereiro de 1995.

Atuou como Clínica de Pequenos Animais de Fevereiro de 1995 a julho de 2002.

Em setembro de 2002 foi aceita no programa de Pós Graduação do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, onde deu início aos trabalhos do mestrado na área de Patologia e Biologia Molecular.

## CONTEÚDO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo Geral.....	3
2.2. Objetivos Específicos.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1. Câncer.....	4
3.2. Ciclo Celular.....	5
3.3. Genética Molecular do Câncer.....	7
3.3.1. Genes supressores de tumor.....	7
3.3.2. Proto-oncogenes e oncogenes.....	8
3.4. Morte Celular.....	10
3.4.1. Necrose.....	11
3.4.2. Apoptose.....	12
3.5. Tumor ascítico de Ehrlich como modelo experimental em camundongos BALB/c.....	17
3.6. História da Quimioterapia.....	20

3.7. Quimioterapia e câncer.....	21
3.8. Agentes quimioterápicos.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1. Animais.....	27
4.2. Obtenção, manutenção e transplante do tumor ascítico de Ehrlich (TAE).....	28
4.3. Grupos e protocolos de tratamento.....	28
4.4. Eutanásia dos camundongos e coleta de material para histopatologia....	29
4.5. Manutenção e estabilização das células do TAE <i>in vitro</i> para realização da curva de crescimento e tratamentos.....	31
4.6. Cálculo da porcentagem de inibição de crescimento para os grupos tratados com DEX e DOX.....	32
4.7. Análise estatística.....	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1. Avaliação <i>in vivo</i> do TAE após tratamentos com dexametasona e doxorrubicina.....	33
5.2. Avaliação macroscópica e histológica do TAE após tratamentos com dexametasona e com doxorrubicina.....	39
6. CONCLUSÕES.....	50
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	51
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
ANEXO.....	69

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

- AIF – Fator indutor de apoptose
- ATP – Adenosina trifosfato
- CDK – Quinase dependente de ciclina
- CDK 4 - Quinase dependente de ciclina 4
- CDK 6 - Quinase dependente de ciclina 6
- Con A – Concanavalina A
- DEX – Dexametasona
- DISC – Complexo de sinalização induzindo morte
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- DOX – Doxorrubicina
- FC – Fração de crescimento
- G0 – Fase de repouso
- G1 – Gap 1 ou lacuna 1
- G2 – Gap 2 ou lacuna 2
- HLH – Hélice giro hélice
- IAP – Proteína indutora de apoptose
- IL – Intralesional
- IL-2 – Interleucina 2
- IM – Índice mitótico
- INCA – Instituto Nacional do Câncer
- IV – Intravenoso

LZ – Leucine zipper  
M – Mitose  
NF- $\kappa$ B – Fator nuclear  $\kappa$ B  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
PBS – Tampão fosfato salino  
R – Restrição  
RB – Retinoblastoma  
RNAm – Ácido ribonucléico mensageiro  
RNAs – Ácido ribonucléico sintetizador  
RNA t – Ácido ribonucléico transportador  
S – Síntese  
SFB – Soro fetal bovino  
SMAC – Cluster supramolecular de ativação  
TAE – Tumor ascítico de Ehrlich  
TD – Tempo de duplicação  
TLM – Tumor-linfonodo-metástase  
TNF – Fator de necrose tumoral  
UFV – Universidade Federal de Viçosa  
mM – Milimolar  
 $\mu$ M – Micromolar

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Curva da evolução da massa tumoral dos grupos tratados com dexametasona e controle.....	34
<b>Figura 2.</b>	Curva da evolução da massa tumoral do grupo II tratado com doxorubicina e controle.....	37
<b>Figura 3.</b>	Curva de inibição de crescimento após tratamentos com dexametasona e doxorubicina <i>in vitro</i> em relação ao controle.....	38
<b>Figura 4.</b>	Curva-padrão de crescimento do TAE e com Concanavalina A (Con A - mitógeno).....	39
<b>Figura 5.</b>	Camundongo portador do TAE mostrando intensa vascularização (seta amarela) no tecido subcutâneo, infiltrando a massa tumoral (seta preta).....	46
<b>Figura 6.</b>	Tumor de Ehrlich na região subcutânea de um camundongo....	46
<b>Figura 7.</b>	Fotomicrografia da massa tumoral de um camundongo grupo III tratado com dexametasona, apresentando angiogenese (seta preta) e infiltrado inflamatório (mononucleares) extra-tumoral (setas amarelas). H&E. 400X.....	47

- Figura 8.** Fotomicrografia do tumor de Ehrlich tratado com doxorrubicina em um camundongo do grupo II, apresentando alta densidade celular, núcleos volumosos, pleomórficos, com nucleólos evidentes, presença de figuras de mitose (setas amarelas). H&E, 520X..... 47
- Figura 9.** Fotomicrografia do tumor de Ehrlich após tratamento com dexametasona em um camundongo do grupo I, apresentando extensas áreas de necrose (setas pretas). H&E, 400X..... 48
- Figura 10.** Fotomicrografia do linfonodo braquial de um camundongo portador do tumor de Ehrlich apresentando hiperplasia reacional com formação de centro germinativo (seta preta). H&E, 260X..... 48
- Figura 11.** Fotomicrografias do tumor de Ehrlich coradas com laranja de acridina apresentando corpos apoptóticos (setas). A. grupo III (sem tratamento), B. grupo II (tratamento com doxorrubicina), C. grupo V (tratamento com dexametasona), 400X..... 49

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Grupos e protocolo de tratamento quimioterápico.....	27
<b>Tabela 2.</b>	Análise da morfometria da massa tumoral após tratamento com dexametasona.....	33
<b>Tabela 3.</b>	Análise da morfometria da massa tumoral após tratamento com doxorubicina.....	35
<b>Tabela 4.</b>	Análise qualitativa dos parâmetros histológicos do tumor de Ehrlich.....	41

## RESUMO

NERY, Liza Helena Ramos. M.S., Universidade Federal de Viçosa, Dezembro de 2004.  
**Eficácia da dexametasona e da doxorrubicina no tumor de Ehrlich transplantado em camundongos BALB/c.** Orientadora: Marlene Isabel Vargas Vitoria. Conselheiros: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo e João Carlos Pereira da Silva.

Todos os anos surgem milhares de novos casos de câncer em seres humanos em todo o mundo. No Brasil, em torno de 460.000 são notificados a cada ano. Na medicina veterinária tem-se observado um aumento dos casos de neoplasias, principalmente entre os animais de estimação, devido à elevação da expectativa de vida de cães e gatos, o que tem levado à necessidade de estudar e implantar novos esquemas de tratamento dessas neoplasias. A descoberta da transplantabilidade dos tumores favoreceu o estudo do comportamento de vários tipos de câncer. O tumor ascítico de Ehrlich (TAE) inoculado na região interescapular de camundongos BALB/c foi o modelo experimental utilizado para se avaliar o comportamento quimioterápico da dexametasona (DEX) injetada intralesional nas doses de 0,1mg/cm<sup>3</sup> e 0,2mg/cm<sup>3</sup> de massa tumoral a cada 48 h num total de três aplicações, e a doxorrubicina (DOX) na dose de 25mg/m<sup>2</sup> com intervalos de 15 dias em duas aplicações. Estes quimioterápicos também foram estudados “in vitro” na cultura de células do TAE. A DEX foi utilizada nas concentrações de 1,0 e 2,0 µM, e a DOX nas doses de 0,5mg/ml e 1,0mg/ml de meio RPMI-1640 completo, para verificar a porcentagem de inibição do crescimento pelas drogas. A redução macroscópica da massa tumoral foi avaliada através da medição com paquímetro analógico

imediatamente antes de cada tratamento e após a última seção quimioterápica. Para a avaliação histológica do TAE após tratamentos, foram utilizadas sessões coradas com hematoxilina-eosina. Os seguintes parâmetros foram observados: densidade da população celular, ocorrência de mitose, corpos apoptóticos e intensidade do infiltrado inflamatório. A detecção de corpos apoptóticos foi por imunofluorescência corados pelo laranja de acridina, onde se observaram inúmeros corpos apoptóticos nos dois tratamentos. Os resultados da morfometria tumoral evidenciaram um efeito pronunciado da DEX, na redução da massa tumoral. O tratamento pela DOX não apresentou redução macroscópica; porém, notou-se uma inibição de crescimento no grupo tratado em relação ao controle. O tratamento da cultura de células do TAE mostrou que a DEX tem efeito mais precoce evidenciando a presença de receptores para glicocorticóides; entretanto, as células tratadas com DOX responderam ao tratamento a partir de 24 h, confirmando a necessidade de ciclos de tratamento mais longos para este tumor. A análise histológica após os tratamentos confirmou as características deste tumor como: presença de necrose, pequena quantidade de células inflamatórias, estroma escasso. No entanto não foi possível determinar se a presença de necrose é característica natural do tumor ou se ocorreu aumento pela ação dos quimioterápicos.

## ABSTRACT

NERY, Liza Helena Ramos. M.S., Universidade Federal de Viçosa, December of 2004.  
**Effectiveness of dexamethasone and doxorubicin in Ehrlich tumor of as transplanted in mice BALB/c.** Advisor: Marlene Isabel Vargas Vitoria. Committee Members: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo and João Carlos Pereira da Silva.

Every year, thousands of new cases of cancer appear all around the world in human beings. In Brazil around 460.000 are notified every year. In the veterinary medicine an increase of the cases of neoplasias has been noted, mainly among the pets, due to elevation of the expectative of life in dogs and cats. These aspects show the necessity to study and to implant new protocols for treatment of these tumors. The discovery of the transplantation of the tumors favoured the study of the behaviour of several cancers. The Ehrlich ascites tumor (EAT), was the model used in mice BALB/c inoculated with this tumor in the interescapular subcutaneous region, growing in the solid form, to evaluate the behaviour chemotherapyc of the dexamethasone (DEX) and doxorubicin (DOX) used into the lesion. DEX was used in 0,1mg/cm<sup>3</sup> and 0,2mg/cm<sup>3</sup> of tumoral mass to each 48 h in three applications. DOX was used in two doses of 25mg/m<sup>2</sup> with intervals of 15 days between the two applications. These chemotherapycs were also studies "in vitro" in the cell culture of TAE, being DEX in the concentrations of 1 and 2 µM and DOX in the 0,5mg/ml and 1,0mg/ml of complete RPMI-1640 medium. To verify the percentage of inhibition of the cell growth for the drugs, the times established for the counting of the cells were 1, 2, 3and 24 hours after the drugs administration. The macroscopic reduction of the tumoral mass was evaluated immediately through the measurement with analogical pachemetric before each treatment and after the last chemotherapic section. To histological evaluation of TAE after treatments slides were

stained with hematoxylin-eosin. The following parameters were observed: density of the cellular population, occurrence of mitosis, apoptotic bodies, and intensity of the inflammatory cells. The detection of the apoptotic bodies was done by the immunofluorescence assay with acridin orange, where the presence of the innumerable apoptotic bodies can be observed in the two treatments. The results of the morphometry of the tumor show a sharp effect of DEX in the reduction of the tumoral mass. In the treatment for DOX did not have macroscopic reduction; however inhibition of growth in the treated group in relation to the control group was noticed. The treatment of the cell culture of TAE showed that DEX has more precocious effect evidencing that these cells possess receptors for glucocorticoid. The cells treated with DOX answered to the treatment after 24 h, confirming the necessity of longer treatment cycles for this tumor. The histological analysis after the treatments confirmed the characteristics of this tumor. However, it was not possible to determine if the necrosis occurrence is a natural characteristic of the tumor or if the necrosis increase was an action of the chemotherapy.

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença de alta incidência e aproximadamente uma em cada cinco pessoas, em todo o mundo, poderá vir a morrer de câncer. Na medicina veterinária, os animais de estimação têm alcançado uma sobrevida maior, o que vem aumentando a ocorrência de processos neoplásicos entre estes animais. Considerando estes fatores o tratamento das neoplasias tem uma importância fundamental, tanto na medicina humana quanto na veterinária, o que tem estimulado inúmeras pesquisas sobre novos tratamentos e também acerca do comportamento e desenvolvimento do câncer (DAGLI, 1989). Para desenvolver esses estudos muitos modelos experimentais têm surgido como ferramentas fundamentais. Vários pesquisadores, entre eles Paul Ehrlich em 1906, vêm estudando a evolução tumoral (DAGLI, 1989).

A descoberta da transplantabilidade dos tumores (JUBB & KENNEDY, 1993) 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. Se estas mesmas células forem inoculadas por via subcutânea, uma massa sólida se desenvolverá (DAGLI, 1989).

Considerado como uma patologia com envolvimento genético, o câncer é transmitido para as células normais devido a mutações ao longo dos anos. Estas mutações estão 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 (RAIS et al., 1999). A presença de alterações na forma e número de cromossomos, a perda das propriedades de adesividade célula-célula e a falha no controle da proliferação celular levam a um crescimento descontrolado e a deleção de proto-oncogenes como o p53 e bcl-2, os quais estão envolvidos no controle negativo do ciclo celular e na regulação da apoptose ou morte celular programada (ZHIVOTOVYSKY & ORRENIUS, 2003).

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 da apoptose, constituindo-se assim em uma quimioterapia menos agressiva para o paciente oncológico (DAGLI, 2002).

Neste trabalho pretendeu-se avaliar a eficácia da dexametasona e da doxorrubicina como medicamentos indutores de apoptose e/ou necrose e, como conseqüência, a redução da massa tumoral, tendo como modelo experimental o tumor ascítico de Ehrlich em camundongos BALB/c.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar a eficácia quimioterápica da dexametasona e da doxorubicina no TAE *in vitro* e na sua forma sólida em camundongos BALB/c.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Quantificar a redução da massa tumoral.
- Observar a ocorrência de apoptose pela presença de corpos apoptóticos e/ou necrose em decorrência do efeito quimioterápico da dexametasona e da doxorubicina *in vivo*.
- Quantificar as figuras mitóticas.
- Verificar a ocorrência de células inflamatórias.
- Avaliar o efeito *in vitro* dos quimioterápicos na cultura de células do TAE.

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1. Câncer**

Tumor, sinônimo de neoplasma ou blastoma, é o crescimento anormal de tecidos, no qual as células com um distúrbio genético passam a se reproduzir mais rapidamente do que as células normais. O tumor é dito maligno quando seu crescimento é muito acelerado e desorganizado e com tendências a metastatizar (ADAM et al., 2003; SARASIN, 2003).

A palavra câncer é derivada do latim e significa caranguejo. Este nome foi dado a essa doença devido à semelhança com que este crustáceo se adere firmemente a qualquer lugar, assim como o tumor se adere ao local do corpo onde se desenvolve (BOLD et al., 1997).

O câncer ocorre quando alterações genéticas interferem nos mecanismos normais de controle do crescimento celular. Estas alterações podem ser herdadas ou adquiridas e, por isso, entende-se que a carcinogênese é um processo de múltiplos estádios, ao nível de genótipo e fenótipo, que envolvem alterações cumulativas (FHEHN, 1997; ALTIERI, 2001; BUNZ, 2001; ADAM et al., 2003).

O câncer representa um dos maiores problemas de doença no mundo (JEMAL & WARD, 2003). Estimativas da incidência de morbidade por câncer, realizadas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), prevê para 2005 aproximadamente 460.000 casos de câncer no Brasil, constituindo-se na terceira causa de morte, seguindo os acidentes de trânsito e as doenças cardíacas.

Na medicina veterinária não há estimativas tão precisas, mas acredita-se que principalmente nos animais de companhia, cães e gatos, a mortalidade pelo câncer alcance um índice bastante expressivo devido ao aumento da expectativa de vida destes animais (CHALITA, 2002; LAVALLE et al., 2003).

### **3.2. Ciclo celular**

O ciclo celular se inicia quando fatores de crescimento ligam-se a receptores de membrana, os quais ativam proteínas transdutoras de sinais. Uma vez que estes sinais chegam ao núcleo, os fatores de regulação nuclear são ativados, iniciando-se a transcrição do DNA e culminando com a divisão celular. O ciclo se desenvolve nas seguintes etapas, denominadas de fases: G0 (repouso), G1 (*gap* ou lacuna 1), S (síntese), G2 (*gap* 2) e M (mitose) (RAIS et al., 1999; SARASIN, 2003).

Na fase G0 as células mantêm suas funções a nível basal; na fase G1, a célula acumula no citoplasma os materiais necessários para o desdobramento do DNA. Após a fase G1 há uma pausa, denominada ponto R (Restrição) ou primeira parada, na qual haverá uma checagem da fita de DNA, antes da progressão do ciclo. Se houver alguma anormalidade na informação genética a mesma deverá ser reparada durante esta parada, caso contrário, a célula não poderá prosseguir. Na fase S ocorre a replicação do DNA e na fase G2, há o armazenamento dos materiais necessários para a mitose. Por último ocorre a fase M onde acontece a duplicação da célula. As duas células-filhas com igual número de cromossomos da célula-mãe, que sofreram mitose entram em fase G1 e podem reiniciar o ciclo celular ou alternativamente parar o ciclo celular, temporária ou definitivamente. Outro processo de controle da divisão celular é a contagem do número de telômeros que induz a célula a se dividir. Neste mecanismo, as pontas dos cromossomos (telômeros) determinam o número de divisões, e no momento apropriado iniciam senescência e morte; Estes mecanismos sugerem uma tentativa de imortalização da célula cancerosa (RAIS et al., 1999).

A progressão do ciclo celular é controlada por um grupo de proteínas reguladoras denominadas quinases dependentes de ciclina (CDK). Estas, são enzimas que se ligam a outras proteínas ativadoras denominadas de ciclinas e ambas agem através de reação de fosforilação em outros substratos, os quais inibem ou ativam fases específicas

do ciclo celular. Assim, para a célula entrar na fase G1, age a ciclina D ligada à CDK4 ou à CDK6; após o ponto R, ainda na fase G1, age a ciclina E ligada a CDK 2. Na fase S age a ciclina A, na fase G2 as ciclinas A e B e na fase M a ciclina B, ligadas às CDKs correspondentes (MERCATANTE et al., 2002; BLAGOSKLONNY, 2003).

Uma vez ocorrida à divisão celular, cada célula contém informações específicas na fita de DNA, as quais são transcritas em nível nuclear para a fita de ácido ribonucléico mensageiro (RNAm). Este RNAm leva as informações até o citoplasma, mais especificamente até os ribossomos, onde com o auxílio do RNA de transferência (RNAt) e do RNA de síntese (RNAs) ocorre a síntese de proteínas. Cada célula é programada para cumprir suas funções e terminar o seu ciclo de vida com a morte celular programada, denominada de apoptose (LEHNINGER et al, 1991).

A apoptose é, na realidade, um processo controlado geneticamente, que atua na remoção de células indesejáveis cujo processo está envolvido tanto em funções fisiológicas quanto patológicas (BOHM & SHILD, 2003). Os avanços da biologia molecular permitiram a identificação de genes que intervêm no crescimento celular, possibilitando o melhor conhecimento do processo da carcinogênese humana. Duas classes de genes têm sido identificadas: os supressores de tumor e os oncogenes (BOLD et al, 1997; RONILSON et al., 2002).

Um clone celular é considerado neoplásico quando apresenta as seguintes características: perda de controle da proliferação e da divisão celular, imortalização pela ação da enzima telomerase, presença de alterações na forma e no número de cromossomos, perda das propriedades adesivas da membrana plasmática que permite o reconhecimento célula-célula e a inibição por contato do movimento e crescimento celular. Além destas, perda da função e capacidade de diferenciação ou especialização, capacidade de atingir tecidos vizinhos e formar metástases e capacidade de induzir a formação de novos vasos sanguíneos, angiogênese (SCHMITT, 1991; BLAGOSKLONNY, 2003).

### 3.3. Genética molecular do câncer

#### 3.3.1 Genes supressores de tumor

Os genes que codificam proteínas capazes de regular o crescimento celular, evitando o comportamento maligno das células, são conhecidos como genes supressores de tumor. Quando estes genes apresentam mutações podem perder sua função por deleção de um dos alelos, ao que se denomina perda da heterozigose. Atualmente, são conhecidos cerca de dez destes genes, entre eles o p53, que talvez seja o gene supressor mais estudado. As suas mutações já foram descritas em vários tipos de câncer humano, incluindo o câncer de mama, colo uterino, cólon, pulmão, fígado, próstata, bexiga e pele (BOLD et al., 1997; ROELS et al., 2000; JORDE et al., 2000; VOLSDEN, 2002; DECKER et al., 2003). O gene p53 é considerado como defesa do organismo contra a formação de um câncer porque ele protege a informação genética das células, motivo pelo qual foi chamado de “guardião do genoma” (LANE, 2004). Este gene codifica uma proteína nuclear de 53 kilodaltons (Kd), se localiza no cromossomo 17p13.1 e tem a função de controlar o ciclo celular (DECKER et al., 2003; LANE, 2004).

A expressão de p53 na forma selvagem ou *wild* se faz através de proteínas que têm meia-vida curta, e nesta condição, é dificilmente detectado por métodos imunohistoquímicos (LANE et al., 2004). Quando existe algum dano do DNA, o gene p53 é ativado, parando o ciclo celular no ponto R no final da fase G1, para permitir que o DNA se recupere antes de prosseguir o ciclo. Assim, o gene p53, através de sua proteína envia sinais para outros genes chamados inibidores de CDK/ciclina, como o p16, p27 e p21 levando à parada do ciclo celular. Se houver reparo do DNA, o p21 sinaliza para o complexo CDK/ciclina para prosseguir o ciclo. A degradação do DNA ocorre devido à ação de uma endonuclease cálcio-dependente (ZHOU et al., 2003). Em condições normais, se não houver reparação do DNA, o gene p53 sinaliza para outros genes reguladores, como bax, bcl-2 e c-myc e há indução de apoptose, eliminando a célula com a informação genética defeituosa (LEWIS et al., 2002, BLAGOSKLONNY, 2003; DECKER et al., 2003).

A ação conjunta dos genes c-myc, bax e bcl-2, resultam em maior ou menor propensão à morte celular programada (BUNZ, 2001). No entanto, sabe-se que as mutações do gene p53 podem ocorrer após dano ao DNA, seja por fontes endógenas ou exógenas, como a radiação ultravioleta, no caso do câncer de pele; por dieta com

aflatoxina, no câncer de fígado; e por fumo, no câncer de pulmão e esôfago (DECKER et al., 2003).

A forma mutante do gene p53 coexiste com a forma normal (selvagem), codificando proteínas mutante e normal ao mesmo tempo, as quais formam um oligômero complexo. Neste oligômero pode haver predomínio da função da proteína mutante sobre a normal, porém a função supressora ainda é mantida parcialmente, pois mantidas porcentagens variáveis de apoptose. No entanto, com o tempo, a perda da apoptose causa instabilidade do genoma pela perpetuação de genes que sofreram mutações levando à perda da heterozigose, ou seja, à deleção do braço curto do cromossomo 17, restando somente a proteína p53 mutante, cuja função não regula o ciclo celular (WEICHSELBAUM et al., 2000; BUNZ, 2001; AWADA et al., 2003).

Estas mutações podem causar instabilidade no genoma e em consequência há mutações no gene p53. Neste caso, a proteína p53, codificada pelo gene com alteração genética, passa a ser bem mais longa, o que a torna detectável por métodos imunohistoquímicos (BOLD et al., 1997; LI et al., 2003). A mutação do gene p53 também pode ser hereditária, como na Síndrome de Li-Fraumeni, na qual os membros da mesma família desenvolvem múltiplos tumores (KUPERWASER et al, 2000).

### **3.3.2. Proto-oncogenes e oncogenes**

Os proto-oncogenes são genes celulares que promovem o crescimento e diferenciação normal da célula. Estes genes quando mutados tornam-se amplificados no número de cópias e funcionam como promotores da expansão clonal da célula tumoral, passando a serem denominados de oncogenes (ZORNIG et al., 2001). Nestas condições, as onco-proteínas codificadas por estes genes são responsáveis pela proliferação anormal das células que uma vez desreguladas, superam a parada do ciclo celular no ponto R, onde seria feita a checagem do DNA. Assim, se houver dano ao genoma, não haverá tempo suficiente para sua reparação, tampouco haverá tempo para a célula danificada entrar no processo de apoptose. Deste modo, as alterações do genoma serão herdadas pelo clone celular após a divisão, perpetuando os danos no DNA (ZHAUG et al., 2003).

Sabe-se que para ocorrer a transformação maligna de células em cultura requerem-se duas ou mais alterações de oncogenes e freqüentemente são necessárias

quatro a seis diferentes genes alterados para o crescimento tumoral. Isto sugere que os oncogenes individualmente não seriam capazes de causar tumores malignos e, assim, muitos tumores não poderiam ser explicados apenas por alterações nestes genes (ZORNIG et al., 2001).

Blagosklonny (2003) comenta que mutações herdadas, responsáveis por predisposições pessoais ou familiares, também estão relacionadas aos oncogenes. Atualmente, são conhecidos mais de 60 oncogenes associados a tumores humanos. Existem várias classificações para os oncogenes, uma delas os divide em: 1) fatores de crescimento; 2) receptores de fatores de crescimento; 3) transdutores de sinal; 4) fatores de transcrição nuclear e 5) receptores de membrana (HUANG & OLIFF, 2001).

O oncogene *c-myc* foi um dos primeiros a ser estudado e inicialmente descrito em leucemia mielóide (RENNER et al., 2003), mas a mutação deste gene já foi descrita no carcinoma de colo uterino. Ele se localiza no cromossomo 8q24, tem 3 exons, codifica uma proteína nuclear de 62 kilodaltons e tem vida média de alguns minutos. Em condições normais o proto-oncogene *c-myc* é um conhecido fator transcricional que age regulando a progressão do ciclo celular. Codifica uma fosfoproteína nuclear, na qual há domínios de interação proteína-proteína tipo *helix-loop-helix* (HLH) e *leucine zipper* (LZ). Em outras palavras, a proteína *c-myc* pode ligar-se a outra proteína HLH-LZ denominada Max. A associação da proteína *c-myc* com a proteína Max, aumentaria a afinidade de ligação ao DNA (ZORNIG et al., 2001).

Existe uma hipótese de que durante a fase G1 do ciclo, a expressão protéica de *c-Myc* está sob controle do gene supressor de tumor Rb (Retinoblastoma) e de ciclinas. O gene *c-myc* tem sido apontado como um importante fator indutor de apoptose. Quando o gene *c-myc* está amplificado, tem efeito inibidor sobre o gene p53 e a ciclina D1 no início do ciclo celular, enquanto tem efeito estimulador sobre as ciclinas A e E (DEBATIN, 2004). Assim, a elevada expressão da proteína *c-Myc* é capaz de superar a parada do ciclo na fase G1/S causada pela proteína p53, bem como neutralizar o efeito da quinase dependente da ciclina D1. Deste modo, a proteína *c-Myc*, passa a ter função paradoxal, na progressão do ciclo celular (HAMNER, 2000).

Outro grupo de pro-oncogenes são a família Bcl-2 que compreende membros pró e anti-apoptóticos. Dentre estes membros, são pró-apoptóticas Bax, Bak e Bok e anti-apoptóticos Bcl-2, Bcl-xL. A proteína Bcl-xL, por exemplo, regula o potencial de membrana e o volume das mitocôndrias e também é capaz de formar um canal de íons na membrana lipídica. A proteína Bcl-2 presente na membrana mitocondrial externa,

bloqueia a apoptose por inibir a liberação do citocromo c que atua como um importante co-fator para ativação de Apaf-1, que se localiza no citosol e que ativa as caspases (BIAW et al., 2001; AMSTERDAN & SASSON, 2002; RENNER et al., 2003; DEBATIN, 2004).

A associação paradoxal entre os genes c-myc e bcl-2, inibindo a apoptose, pode bloquear a função supressora do gene p53 (HAMNER, 2000; BLAGOSKLONNY, 2003).

### **3.4. Morte celular**

A morte celular é um fenômeno que por muitos anos foi negligenciado cientificamente devido a se acreditar que outros processos biológicos, tais como ativação, proliferação e diferenciação estariam envolvidas neste mecanismo de morte celulares. A noção predominante sugeria que a morte celular seria apenas um processo degenerativo produzido durante situações patológicas (SOINI et al., 1998).

Em 1858, alguns pesquisadores chegaram a considerar a morte celular como um processo estritamente patológico, ocorrendo apenas em circunstâncias anormais, como no caso de doenças. Neste caso a morte celular era provocada por injúrias e o seu estudo promoveu melhor entendimento dos eventos celulares envolvidos em algumas doenças. Já em 1951, alguns pesquisadores consideraram a morte celular como fenômeno fisiológico, necessário para o desenvolvimento normal e manutenção da forma dos tecidos, estudando preferencialmente os tecidos embrionários. Nos anos 70, outro grupo de pesquisadores analisando a alta frequência de morte celular nos tumores, relacionou esta morte com fenômenos homeostáticos, reguladores do número de células para promover equilíbrio entre a perda e o ganho celular (BOHM & SHILD, 2003).

Ao longo de todos estes anos, o fenômeno de morte celular tem sido muito estudado, atraindo a atenção de inúmeros pesquisadores em diversos campos do conhecimento, entretanto, muitos problemas surgem quando se tenta entender o processo e os mecanismos da morte celular. Várias tentativas foram feitas para tentar classificar e caracterizar os possíveis tipos de morte celular, de acordo com sua função para os seres vivos, a morfologia das células atingidas e os aspectos bioquímicos de sua ocorrência. Resumidamente, os tipos de morte celular são: necrose e morte celular programada ou apoptose, que envolvem um programa genético na sua execução. Somente em

mamíferos, a morte celular programada e a apoptose são consideradas sinônimos (SOINI et al., 1998).

Embora a morte celular durante o desenvolvimento do organismo já tivesse sido sugerida há mais de um século, foi a classificação bioquímica e morfológica proposta por Kerr em 1972 que começou a esclarecer e definir o papel fisiológico desse fenômeno, diferenciando necrose de apoptose (BOHM & SHILD, 2003; ZHIVOTOVSKY & ORRENIUS, 2003).

### **3.4.1. Necrose**

A necrose, uma das expressões morfológicas da morte celular, refere-se a um espectro de alterações morfológicas que se seguem à morte celular em um tecido vivo. Ela é resultante em grande parte, da ação progressiva de enzimas sobre a célula letalmente lesada, que se caracteriza pela morte celular causada por injúrias no tecido, constituindo-se num processo não mediado por ATP, ou seja, passivo, levando à ruptura da célula. Há descontinuidade da membrana citoplasmática e extravasamento de material antigênico que induz à reação inflamatória, intensificando o dano tecidual. A morfologia é decorrente do resultado de dois processos: digestão enzimática que se traduz microscopicamente como uma necrose de liquefação e a desnaturação de proteínas que origina a necrose de coagulação. Na necrose de coagulação os contornos celulares são preservados por algum tempo enquanto que na necrose de liquefação a célula é completamente digerida. As alterações nucleares aparecem sob a forma de um dentre três padrões: a basofilia da cromatina pode diminuir (cariólise), uma alteração que supostamente se reflete na atividade da DNase. Um segundo padrão é a picnose, caracterizada pela retração nuclear e aumento da basofilia. Aqui o DNA aparentemente se condensa em uma massa sólida, basofílica. No terceiro padrão, conhecido como cariorrexe, o núcleo picnótico ou parcialmente picnótico sofre fragmentação. Com o tempo, um dia ou dois, o núcleo na célula necrótica desaparece totalmente (BRASILEIRO et al., 1998; COTRANS et al., 2000; BOHM & SHILD, 2003).

### 3.4.2. Apoptose

O termo apoptose foi introduzido por Kerr em 1972, sendo uma palavra de origem grega que significa cair em pedaços *fall of*. É um processo fisiológico essencial para o desenvolvimento e evolução dos tecidos. Inúmeros fenômenos biológicos se devem a mecanismos de morte celular programada controlado pelas células, como por exemplo, a metamorfose de larvas de anfíbio (perda da cauda de girinos), atrofia de rins devido à obstrução de ductos excretores, a eliminação de membranas interdigitais durante a embriogênese, a involução das glândulas mamárias após o período de lactação. Células cancerosas podem não apresentar mecanismos de morte celular programada, fato que leva ao crescimento descontrolado das células tumorais (BOHM & SHILD, 2003; BULTGVILIT & GOKE, 2003; ZHIVOTOVSKY & ORRENIUS, 2003).

A apoptose é caracterizada por processos mediados por ATP como a ativação de caspases (Cysteine ASPartASES) que são proteases que catalisam uma série de reações hidrolíticas, provocando a clivagem e inativação de proteínas que protegem as células da morte. Danos genéticos sutis sinalizam as células a morrer por apoptose, enquanto danos severos destroem a habilidade das células em produzir ATP eliminando-as por necrose (REED, 2000; BOHM & SHILD, 2003; LEYTIN & FREDMAN, 2003).

Tem-se estimado que 50 a 70 bilhões de células pereçam a cada dia no adulto decorrente da apoptose, um processo pelo qual, em um ano, cada indivíduo produzirá e erradicará uma massa de células igual ao peso do corpo inteiro. Este processo precisa estar altamente regulado, já que defeitos na maquinaria apoptótica, aumentam a sobrevivência da célula e podem contribuir para expansão de células anormais. A sobrevivência de células por tempo indeterminado também cria um ambiente permissivo para instabilidade genética e acúmulo de mutações. Além disso, defeitos nos mecanismos apoptóticos conferem resistência à quimioterapia, radiação e destruição imunomediada (DUKE *et al.*, 1996; ANDREEFF *et al.*, 2000).

Com o advento da biologia molecular, o estudo da morte celular programada atingiu o campo da genética molecular. A expressão de vários genes tem sido associada à indução de morte celular em uma grande variedade de vertebrados e invertebrados. Os genes envolvidos no controle da morte celular programada estão começando a serem identificados e os estudos sobre eles foram realizados inicialmente no nematóide *Caenorhabditis elegans*, um organismo bastante simples do ponto de vista estrutural e

fisiológico que produz durante o seu desenvolvimento, 1090 células somáticas, das quais invariavelmente 131 morrem por um mecanismo inicialmente denominado de morte celular programada. Por sua semelhança morfológica e bioquímica ao processo fisiológico de morte celular descrito paralelamente em mamíferos e definido como apoptose. Pesquisas demonstram grande homologia dos genes clonados em *C. elegans* com os outros organismos, mostrando que estes genes foram conservados evolutivamente (SOINI et al., 1998; BOHM & SHILD, 2003; WANG et al., 2003).

A apoptose é caracterizada por uma série de modificações celulares que podem ser vistas ao microscópio de luz. Microscopicamente ocorre fragmentação nuclear e celular em vesículas apoptóticas e a formação dos corpos apoptóticos. Diferente da necrose, não existe liberação do conteúdo celular para o interstício e, portanto, não se observa inflamação ao redor da célula morta. Outro fato importante é a fragmentação internucleossômica do DNA, sem nenhuma especificidade de seqüência, porém mais intensamente na cromatina em configuração aberta; consequência da atividade de uma endonuclease. Essa fragmentação característica do genoma pode ser identificada *in situ* pela técnica de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidil transferase Uracil Nick End Labeling*) (BROWN et al., 1993; MCDONNELL et al., 1995; MOFFAT et al., 2000; LOWE & LIN, 2000).

Um método utilizado para confirmar a morte por apoptose é através da avaliação de padrões eletroforéticos do DNA, que formam um padrão “em escada” devido à clivagem do DNA em múltiplos fragmentos denominados corpos apoptóticos. O cálcio e as enzimas topoisomerasas, que afrouxam a torção da fita do DNA, estão envolvidos na ativação de endonucleases, pois ambas controlam a estrutura da cromatina de uma maneira que a endonuclease possa agir (MCDONNELL et al., 1995; LOWE & LIN, 2000; BOHM & SHILD, 2003).

Quatro componentes genéticos devem ser considerados em relação aos mecanismos apoptóticos: as caspases, os complexos sinalizadores de morte celular, as mitocôndrias e as proteínas da família Bcl-2 (HE et al., 1998; SOINI et al., 1998; BOHM & SHILD, 2003; CORELTAS & STRASSER, 2003).

As reações hidrolíticas centrais dos processos apoptóticos são catalisadas por uma família de proteases chamadas de caspases que apresentam um sítio ativo de cisteínas que é o aminoácido ativo. Elas são sintetizadas como pró-enzimas que são ativadas por clivagem de modo autolítico ou por outras caspases. As caspases são freqüentemente classificadas como enzimas inicializadoras ou efetoras dos processos

apoptóticos, dependendo se sua atuação se dá sobre o estímulo de sinais iniciais, ou na última etapa de destruição celular via apoptose. Caspases efetoras clivam e inativam proteínas que protegem as células da apoptose, como as proteínas reparadoras do DNA, poli (ADP ribose) polimerase, proteínas que inibem as caspases ativadoras de DNA nucleases são responsáveis pela fragmentação do DNA ou proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 (GAO & DOU, 2001; KIRKIN et al., 2004).

A apoptose é também rapidamente induzida pelos “complexos sinalizadores de morte celular” (*DISCs- de ath- inducing signaling complexes*) na membrana plasmática. DISCs são formados quando ligantes extracelulares interagem com receptores de superfície pertencentes à superfamília de genes receptores ricos em cisteínas chamados de TNF (fator de necrose tumoral) (SZLOSAREK & BALLOVILL, 2003; SHIMADA et al., 2004).

O receptor de morte Fas, também chamado CD95 ou Apo-1, é importante para a eliminação de linfócitos T ativados (T4), responsáveis pelo combate às infecções e por induzir ação de linfócitos T citotóxicos sobre as células cancerígenas. As ligações entre o Fas e seus ligantes também causam a formação de domínios de morte intracelular, devido à ligação entre receptores, levando à formação de *clusters* que agem como receptores de pró-caspases como a pró-caspase 8 a qual é ativada por processo de autoclivagem, que irá ativar uma cascata de caspases efetoras como a caspase 3, levando a célula à apoptose. Alternativamente a caspase 8 pode clivar uma proteína da família Bcl-2, chamada de Bid, promovendo apoptose (BOLD et al., 1997; OGAWA et al., 2000; BOHM & SHILD, 2003). O gene *bcl-2* (*B-cell lymphoma 2*) foi identificado no linfoma folicular humano e codifica a proteína Bcl-2 que se associa às membranas do retículo endoplasmático, envelope nuclear e membrana mitocondrial externa (HE et al., 1998; KENNEDY et al., 2001; CORELTAS & STRASSER, 2003).

As mitocôndrias vêm sendo consideradas como as organelas centrais nos processos de morte celular programada. Sinais oriundos de receptores de superfície da célula ou de sítios danificados convergem sobre a mitocôndria levando a permeabilização de ambas as membranas mitocôndrias, perda do potencial transmembrana da membrana interna da mitocôndria e liberação de proteínas relacionadas a apoptose tais como citocromo c, derivados mitocondriais ativadores de caspases e certas pró-caspases a partir do espaço intermembranas. Tem sido proposto que a liberação de proteínas indutoras de apoptose e que o colapso do potencial transmembrana mitocondrial resultam da abertura de poros, pela alteração do volume

mitocondrial e pela ruptura da membrana mitocondrial externa e conseqüentemente a liberação de proteínas presentes no espaço intermembranas que ativam as caspases do citosol (HUIGSLOOT et al., 2002; ARIMURA et al., 2003; PELICAN et al., 2003; GRUBER et al., 2004).

Peter et al. (1997) constataram que as mitocôndrias são as organelas essenciais para o metabolismo energético que ocorre durante o processo de apoptose.

Para o reconhecimento e eliminação das células apoptóticas uma mudança fundamental parece ser a exteriorização de resíduos de fosfatidilserina normalmente encontrados na face interna da membrana celular. Este parece ser um dos eventos mais precoces do processo apoptótico e é dependente da ativação das caspases. Recentemente foi descrito um receptor específico para resíduos de fosfatidilserina, denominado de PSR (*Phosphatidylserine Receptor*) (DANESI et al., 2003; ROSENQUIST, 2003).

O princípio do processo de apoptose pode acontecer por uma via intrínseca, a qual é iniciada pelo aparecimento de sinais de estresse provenientes do interior da célula. radiação, quimioterápicos, choque térmico, falta de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes, níveis aumentados de corticosteróides são alguns dos fatores que podem gerar esses sinais de estresse, cuja natureza bioquímica permanece em grande parte obscura (HUIGSLOOT et al., 2002).

Estes sinais são detectados pelas mitocôndrias que sofrem um desacoplamento da cadeia respiratória e liberam para o citosol, citocromo c, as proteínas SMAC/Diablo (*Second Mitochondria-derived of Caspases/Direct IAP-Binding protein with a Low isoelectric point*) e AIF (*Apoptosis-inducing Factor*). Por outro lado o citocromo c citoplasmático se liga a Apaf-1 e este complexo na presença de ATP (Adenosina trifosfato) ativa a caspase 9, que por sua vez ativará a caspase 3. O complexo multimolecular formado por citocromo c, Apaf -1, ATP e caspase 9 é denominado de apoptosomo executor. A SMAC é responsável pelo cancelamento da ação negativa de moléculas da família dos IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) sobre a apoptose. Esta família de inibidores endógenos de caspases é bastante conservada evolutivamente, apresentando homologia com moléculas virais. Ela é composta por moléculas que possuem de um a três domínios BIR (*Baculovirus IAP Repeats*), os quais parecem ser responsáveis pela inibição das caspases 3, 7 e 9. O papel do AIF é controverso (BUNZ, 2001; HIDEHIMA et al., 2001; FRANKLIN et al., 2002; BOHM & SHILD, 2003).

É importante ressaltar que ao nível da mitocôndria a liberação de citocromo c é mediada principalmente pelas proteínas da família Bcl-2 (BOHM & SHILD, 2003).

As proteínas da família Bcl-2 regulam a morte celular induzida por muitos estímulos apoptóticos, primariamente ao nível de mitocôndrias. Membros anti-apoptóticos desta ampla família de proteínas estão: o Bcl-xL, Bcl-W e entre os membros pró-apoptóticos incluem o Bax, Bad, Bid. Na ausência de sinais de morte, os membros da família Bcl-2 pró-apoptóticos são frequentemente “seqüestrados” por proteínas citoplasmáticas ou são associados às membranas. A atividade destas proteínas é regulada através de vários mecanismos incluindo os níveis de “seqüestros”, clivagens e fosforilação. A Bid, proteína pró-apoptótica, por exemplo, é clivada pela caspase 8, gerando uma proteína T-bid a qual se transloca à mitocôndria para interagir com a membrana mitocondrial. O citocromo c liga-se à pró-caspase 9 ocasionando a autoclivagem e ativação desta caspase a qual vai ativar a caspase 3, desencadeando uma cascata de caspases que leva a célula a morrer por apoptose (LOTTEM et al., 1999; PRATT & NIU, 2003).

Deve-se ressaltar que a resposta apoptótica das células aos agentes danificadores do DNA, como os agentes quimioterápicos, é controlada pelo gene supressor de tumor p53. Este gene provoca o acúmulo da proteína p53, a qual retarda o ciclo celular afim de que, as mutações possam ser reparadas. Caso o reparo não seja possível, a proteína induz a célula ao “suicídio”, via apoptose, prevenindo a proliferação de danos genéticos que poderiam levar ao câncer (KHUMB & JUNIOR., 2002; LEE & SCHIMITT, 2003).

A morte celular programada faz parte de diversos processos vitais, como o desenvolvimento embrionário, o controle de tumores e a regulação de populações de células do sistema imune. Alterações nos genes responsáveis pela autodestruição podem ser desastrosas. Por ser indispensável à vida, a morte da célula deve seguir um plano metuculoso. Qualquer distúrbio de sua regulação, tanto o excesso quanto à insuficiência, pode provocar uma variedade de doenças (ASHEWELL et al., 1994).

A apoptose excessiva pode causar doenças neurodegenerativas, como o mal de Alzheimer e o mal de Parkinson, lesões secundárias após isquemia, retinite pigmentosa e osteoporose. (ASHEWELL et al., 1994). Na isquemia cardíaca, o bloqueio sangüíneo leva à necrose das células que dependem do vaso afetado. Mas a destruição não termina aí: células próximas da área afetada também morrem, mais lentamente, e sua aparência sugere a ocorrência de apoptose. Parece que o conteúdo tóxico das primeiras células mortas, quando não destrói as células vizinhas por necrose ativam o processo de apoptose (REED & WARNER, 2000).

A ausência de apoptose pode levar a doenças auto-imunes, infecções viróticas prolongadas ou tumores, como o câncer. (CASTEELS et al, 1998). Infecções viróticas também podem se alongar pela ausência de apoptose. As células invadidas por vírus com frequência param ou reduzem a síntese das próprias proteínas para fabricar as dos invasores, do retrovírus. Em geral, isso bastaria para levar a apoptose muitas células, mas alguns vírus inibem o processo. O vírus *Epstein-Barr*, agente da mononucleose e associado a cânceres linfáticos, produz proteínas parecidas com a Bcl-2 inibidoras de apoptose, e moléculas que induzem maior produção dessa proteína na célula. Outros inativam ou destroem o p53, como o vírus do papiloma, principal causa do câncer de colo do útero. O vírus da varíola bovina produz uma proteína que impede a cascata de caspases. O conhecimento dessas estratégias está permitindo a criação de novas drogas, que bloqueiam a ação do vírus.

A apoptose ocorre de forma insuficiente em cânceres como linfoma folicular, carcinoma com mutação de p53, tumores dependentes de hormônios, câncer de mama, de próstata, cólon e de ovário e também nas doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico, glomerulonefrite imune e ainda nas infecções virais tais como: herpesvírus, poxvírus e adenovírus (MACVIE, 1999; SHAMNEWGATHASAN & JOTHY, 2000; LEE & SCHIMITT, 2003).

### **3.5. Tumor ascítico de Ehrlich como modelo experimental em camundongos BALB/c**

O tumor ascítico de Ehrlich foi descoberto por Paul Ehrlich em 1896 e descrito em 1906, como um carcinoma espontâneo de glândulas mamárias de camundongos fêmeas. A virulência da linhagem do TAE deveu-se às transferências seriadas daquela massa neoplásica que crescia rapidamente entre 80 a 100% dos camundongos receptores. Inicialmente, o tumor foi desenvolvido experimentalmente sob a forma sólida, sendo transplantado em animais da mesma espécie. Somente em 1932, com Loewenthal & Jahn, é que surgiu a forma ascítica, ou seja, aquela desenvolvida no peritônio de animais inoculados com células tumorais (DAGLI, 1989; MATSUZAK et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003).

A indução experimental dessa neoplasia em camundongos é feita por intermédio do transplante das células tumorais retiradas de um animal já com a neoplasia desenvolvida. Essa inoculação poderá ser feita diretamente no peritônio do receptor levando ao desenvolvimento da forma ascítica ou diretamente no subcutâneo ou no coxim plantar, ambas as localizações levando à formação do tumor sólido. No 7º dia já é possível observar expressivo crescimento da massa tumoral, que continua crescendo e invadindo os tecidos adjacentes até o 30º dia. Logo após a inoculação, observa-se a migração das células para os linfonodos regionais (GENTILE, 2001; BELO et al., 2004).

Histologicamente, o tumor ascítico de Ehrlich apresenta extensas áreas de necrose. Estas são 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 caracterizam essa neoplasia (GABAI et al., 1995; DAGLI, 1989).

Historicamente, os primeiros relatos de transplante de neoplasias datam de 1773 quando Peyrilhe inoculou material extraído de neoplasias mamárias humanas sob a pele de cão. Devido à grande facilidade de manuseio experimental, o tumor de Ehrlich tem sido extensamente aplicado à oncologia experimental. A oncologia comparada, por sua vez, procura melhorar o conhecimento das neoplasias do homem, de animais e mesmo de plantas. Dos inúmeros tumores experimentais utilizados para estudo “in vivo” em animais, o uso de tumores transplantáveis na forma ascítica tem sido um recurso útil pelas seguintes razões: facilidade na padronização do número de células a serem inoculadas; quantificação do crescimento e regressão da massa tumoral e também porque permitem o estudo comparativo com os mesmos métodos desenvolvidos para a pesquisa de células na corrente sanguínea e demais fluidos corporais (DAGLI et al., 1989; SAAD-HOSSNE et al., 2004).

Segundo Gentile (2001) a suspeita de tecido tumoral levantada no exame clínico induz o patologista a identificar no campo microscópico a presença de atipia celular e de células inflamatórias, classificando o tumor em classes (I, II, III, IV e V). A classe I é dada quando há ausência de atipia e quase nenhuma célula inflamatória. Já a classe V indica que existe intensa atipia celular e processo inflamatório, característica de neoplasias malignas.

No caso do líquido retirado da cavidade abdominal do camundongo, nota-se grande quantidade de células com características epiteliais exibindo intenso

pleomorfismo, hipercromatismo nuclear e alteração da relação núcleo-citoplasma, indicando tratar-se de classe V (PAL et al., 2001; DAGLI et al., 2002).

Segundo Dagli (2002), o exame histoquímico de uma gota de líquido ascítico do tumor de Ehrlich 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, os quais 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.

Dagli (1989) comenta que as células do tumor ascítico de Ehrlich são de origem epitelial da glândula mamária, portanto são especializadas na produção de lipídeos. Uma desregulação dessa função provavelmente poderia acarretar um acúmulo dessa substância no interior da célula. O tecido tumoral ao exame macroscópico, apresenta-se como uma massa de consistência borrachento, superfície lisa, formato irregular. Ao se incisar a massa tumoral há a presença de pontos avermelhados e áreas esbranquiçadas, que são, respectivamente, pontos hemorrágicos e áreas de necrose. Há ao redor da massa tumoral uma pseudocápsula, o que justifica seus limites bem definidos quando da visualização da mesma durante a observação cirúrgica.

Oliveira et al., (2003) relatam que quando observado em maior aumento ao 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. Observaram-se também células multinucleadas com núcleos muitas vezes, gigantes, evidenciando ainda mais intensa atipia nuclear, com citoplasma bastante amplo. O estroma é bastante escasso, com pouca vascularização.

### 3.6. História da quimioterapia

Segundo Bonassa (2004), existem evidências da utilização de drogas quimioterápicas sob a forma de sais metálicos como o arsênico, o cobre e o chumbo em civilizações antigas do Egito e da Grécia. Os primeiros registros de tratamento quimioterápico efetivo surgiram no final do século passado com a descoberta da solução de Fowler (arsenito de potássio) por Lissaver (1885) e da toxina de Coley, em 1890, que era uma combinação de produtos bacterianos. Foi no início dos anos 40 que surgiram os primeiros resultados satisfatórios com o uso de hormônios no tratamento de carcinomas da próstata e mama. Durante a 2ª guerra mundial é que se deu a descoberta dos agentes alquilantes e dos seus efeitos terapêuticos; em dezembro de 1943, um ataque aéreo alemão destruiu um depósito de gás-mostarda americano em Bari, Itália, dando origem a mielodepressão intensa entre o grupo de indivíduos contaminados. Este acontecimento despertou a atenção de um grupo de farmacologistas clínicos a serviço do Pentágono. Com a finalidade de produzir resultados terapêuticos, a droga foi então administrada num doente portador de linfoma maligno avançado e, surpreendentemente, assistiu-se a uma regressão tumoral importante, porém de curta duração. Nessa mesma época, importantes descobertas na área da nutrição e antibioticoterapia vieram possibilitar suporte clínico mais eficaz aos doentes oncológicos.

Na década de 40, Sidney Farber constatou alguns casos de remissão temporária de leucemia linfoblástica aguda em crianças, com o uso da aminopterina. A introdução da mostarda nitrogenada em 1948 pode ser considerada como o início da era moderna da quimioterapia. Nos anos 50 foram identificados os primeiros antibióticos com atividade anti-tumoral. Nas décadas de 60 e 70 inicia-se a era da quimioterapia científica, com o conhecimento da cinética celular e da ação farmacológica das drogas (RODASKI & NARDI, 2004).

Nos anos que se seguiram houve um rápido desenvolvimento da quimioterapia anti-tumoral. Atualmente, as pesquisas continuam no intuito de desenvolver novas drogas, menos tóxicas e mais ativas, com um melhor índice terapêutico a partir de agentes que atuam a nível celular interferindo no seu processo de crescimento e divisão celular. A maioria dos agentes antineoplásicos não possui especificidade, ou seja, não destrói seletiva e exclusivamente, as células tumorais. São, por isso, tóxicos para os tecidos, contudo a ênfase maior reside na descoberta de

substâncias análogas às já conhecidas, com efeitos tóxicos menos agressivos, sobretudo ao coração, pulmões, rins e sistema nervoso (TORRES et al., 1999; BRAIN et al., 1999).

Portanto, o objetivo primário da quimioterapia é a destruição das células neoplásicas, preservando as normais. Na medicina veterinária a quimioterapia é uma prática bastante recente, e utilizada principalmente em animais de companhia, cães e gatos, e as doses e os protocolos utilizados estão baseados naqueles utilizados em Medicina Humana. A excisão cirúrgica é ainda o procedimento mais utilizado em neoplasias de cães e gatos, e somente poucos tumores como o tumor venéreo transmissível era tratado por quimioterapia. O alto custo dos agentes antineoplásicos, a escassez de informações quanto às doses a serem utilizadas e as reações adversas eram fatores que limitavam essa prática na Medicina Veterinária. Porém, o aumento da demanda de proprietários de animais de companhia com algum tipo de neoplasia vêm mudando este panorama e tornando-se cada vez mais importante o conhecimento e direcionamento de pesquisas voltadas para a veterinária (DAGLI, 2002).

### **3.7. Quimioterapia e câncer**

A quimioterapia é uma modalidade de tratamento sistêmico do doente oncológico, mais recente que a cirurgia e a radioterapia e consiste no emprego de substâncias químicas, isoladas ou em combinação, com o objetivo de eliminar as neoplasias malignas (RUBENS & COLLEMAN, 1999; TERWOGT et al., 1999).

De acordo com Dagli (2002) e Rodaski & Nardi (2004) os fatores que influenciam a cinética do crescimento neoplásico são vários e de alta complexidade, porém alguns conceitos são importantes para melhor entendimento da atuação dos quimioterápicos e do desenvolvimento tumoral. Por exemplo, o índice mitótico (IM) corresponde à porcentagem de células em mitose na massa tumoral, e é estimado pela contagem do número de figuras mitóticas observadas em microscópio de luz. A fração de crescimento (FC) de um tumor traduz a proporção de células em proliferação dentro da massa tumoral. Estas são as células mais susceptíveis aos agentes quimioterápicos. O tempo de duplicação (TD) é o tempo necessário para que a população de células tumorais e conseqüentemente, o volume da massa tumoral se dupliquem. O início do crescimento tumoral o IM e a FC são altos, enquanto o TD é curto. Com o aumento da

massa tumoral em decorrência do tempo, as células neoplásicas entrarão na fase de repouso (G0), resultando em uma FC e IM menores e um TD mais longo. Estes dados representam o chamado crescimento *Gompertziano*, isto é, os tumores tendem a crescer exponencialmente durante certo tempo, assumindo posteriormente um platô. Considerando o crescimento *Gompertziano*, pode-se deduzir que os tumores muito grandes tendem a não responder satisfatoriamente aos tratamentos antineoplásicos, em contrapartida os tumores menores, que estão em atividade intensa de divisão celular, responderão satisfatoriamente à quimioterapia.

Como as neoplasias tendem a se manter durante um grande período de latência, há uma enorme tendência ao diagnóstico tardio da maioria dos cânceres, tornando mais difícil o tratamento (EYTAN et al., 1995; MACVIE, 1999; BHATTCHARYYA et al., 2003).

A classificação tumoral também é importante para que se possa instituir um protocolo de quimioterapia adequado, tornando a compreensão do comportamento biológico dos diversos tumores, mais claro para um diagnóstico e prognóstico mais precisos. Há vários sistemas de classificação, porém, a maioria baseia-se na avaliação de um envolvimento patológico local, regional e distante. Alguns sistemas incluem outros fatores como a presença ou ausência de sinais clínicos, o grau histológico do tumor e a localização. O sistema TLM (tumor-linfonodo-metástase) desenvolvido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) é o sistema padrão para avaliar a maioria dos tumores tanto na oncologia humana quanto na medicina veterinária (SILVA & CORREIA, 2002).

Devido à mutabilidade anormal da maioria das células cancerosas, as populações de células tumorais são heterogêneas em muitos aspectos e são capazes de se desenvolverem em taxas alarmantes, quando sujeitas a novas pressões de seleção. Isto agrava as dificuldades da quimioterapia. Tratamentos repetidos com drogas que são seletivamente tóxicas podem destruir a maioria das células neoplásicas, porém não todas. Geralmente uma pequena proporção é resistente e o tratamento quimioterápico favorece a evolução de células com estas características (FLORIDE et al., 1998., RODASKI & NARDI, 2004).

A eficiência para a terapia anticâncer está intimamente ligada a clones celulares, muitos tumores são inicialmente resistentes a determinados agentes quimioterápicos, outros clones ficam resistentes mesmo não tendo sido utilizado nenhum medicamento, devido às propriedades bioquímicas intrínsecas ao genótipo do tumor

após sofrer mutações a partir da administração da droga (FLORIDE et al., 1998; LITMAN et al., 1998., RODASKI & NARDI, 2004).

Há também a resistência multidrogas, onde as células que estão constantemente expostas a uma determinada droga desenvolvem resistência não só à droga que está sendo utilizada para o tratamento antineoplásico, mas também a outras ainda não utilizadas. Este fenômeno está correlacionado à mudança no cariótipo, em que as células contêm um par adicional de cromossomos duplos ou apresentam uma região corada de forma homogênea intercalada no padrão de bandas de um de seus cromossomos normais. Estas aberrações consistem na amplificação maciça do número de cópias de um pequeno segmento do genoma (EYTAN et al, 1995; ALBERTS et al., 1997).

A ocorrência de apoptose nas células tumorais é importante para inibir a proliferação destas células uma vez que elas perdem a capacidade de entrar em apoptose e proliferam de forma desregulada e intensa (SHIBATA & MATSUBARA, 2001).

Existem muitos fatores que podem induzir o processo apoptótico, como: fatores de crescimento, neurotransmissores, glicocorticóides, cálcio, toxinas bacterianas, radicais livres, agentes oxidantes, agentes mutagênicos, e outros. Dos agentes que inibem a apoptose, destacam-se os hormônios esteróides e androgênicos, o ion zinco, fatores da matriz celular e aminoácidos (LESZCZNIECKA et al., 2001; KOZLOWSKA et al., 2002).

### **3.8. Agentes quimioterápicos**

Muitos quimioterápicos têm sido amplamente utilizados na prática da quimioterapia. Os antibióticos de fermentação natural, derivados de várias espécies do gênero *Streptomyces*, estão entre estes quimioterápicos. Alguns antibióticos atuam como citocidas levando as células neoplásicas à morte e outros agem como citostáticos interferindo no crescimento celular. As antraciclinas fazem parte deste grupo de antibióticos antineoplásicos (ALTIERI, 2001; ASHIKAWA et al., 2004).

A doxorubicina é um antibiótico antitumoral antraciclínico isolado de culturas de *Streptomyces peucetius* variedade *caesius*. Ela apresenta um anel de antraciclina em sua estrutura que se intercalam entre os pares de nucleotídeos da dupla fita do DNA nas fases de transcrição e replicação. Produz radicais livres altamente reativos, que

conseqüentemente lesam a membrana celular e o DNA, induzindo lesões no miocárdio, o que limita a dose a ser administrada (BOUKET et al., 1987; ASHIKAWA et al., 2004).

A doxorubicina é ativa durante todo o ciclo celular, incluindo a interfase e tecidos de rápida proliferação. Os tecidos tumorais, células da medula óssea, mucosa gastrintestinal e oral e folículos pilosos são os mais sensíveis aos efeitos antiproliferativos da doxorubicina. Ela não é absorvida pelo trato gastrintestinal, e uma vez que o fármaco é irritante para os tecidos, deve ser administrado por via intravenosa (IV) (CHARROIS, 2004).

A doxorubicina é metabolizada principalmente pelo fígado. O seu principal metabólito é o 13-OH-doxorubicinol, que possui certo grau de atividade antitumoral. Após a administração IV, os níveis plasmáticos de doxorubicina seguem um declínio multifásico, com uma meia-vida terminal de 20 a 48 horas. A meia-vida terminal do 13-OH-doxorubicinol é similar à da doxorubicina. A depuração plasmática varia de 8 a 20 ml/min/kg e se deve principalmente ao metabolismo e à excreção biliar. Aproximadamente 40% da dose administrada é recuperada na bile ou fezes em 5 dias; 5% a 12% do fármaco e seus metabólitos aparecem na urina durante o mesmo período (BOUKET et al., 1987; CHANG et al., 2003). A dose a ser utilizada de Dox é limitada devido à sua cardiotoxicidade (KAVALIEND et al., 2001; RODASKI & NARDI, 2004).

A doxorubicina pode induzir apoptose por uma variedade de mecanismos incluindo a ativação de NF- $\kappa$ B, alquilação de macromoléculas, danos na membrana celular, mutações no DNA (SADZUKA et al., 2002; ASHIKAWA et al., 2004; WANG et al., 2004).

De acordo com Lorenzo et al. (2002), Mathiasen & Jaattela (2002), uma via de indução de apoptose pela doxorubicina é através da inibição de Bcl-2 e da liberação do citocromo c, ativação das caspases 3 e 9 sugerindo o envolvimento mitocondrial.

Segundo trabalhos de Tshang et al. (2003), a doxorubicina 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.

Recentemente Wang et al. (2004) observaram apoptose em adenocarcinoma ovariano e neoplasias gliais, pela ação da doxorubicina, através da ativação da caspase 3 e pela ação da proteína p53.

Outra classe de quimioterápicos que são utilizados no controle do câncer são os hormônios. Os mais utilizados são os esteroidais, incluindo os glicocorticóides. Eles atuam induzindo a apoptose através da estimulação de receptores de membrana,

principalmente em células como linfócitos, timócitos, mielomas, mas também por um estresse na célula tumoral que altera o potencial transmembrana (CHAUHAN et al., 2000; BONAMIM et al., 2001; AMSTERDAN & SASSON, 2002; SAKLATUALA, 2002).

Os glicocorticóides têm efeito drástico em uma variedade de células de mamíferos. Esta classe de hormônios esteroidais altera o metabolismo celular e a expressão de genes devido ao seu efeito citotóxico. Os glicocorticóides são endogenamente sintetizados pelas glândulas adrenais e atuam no catabolismo de proteínas, lipídeos, carboidratos, aumentando os níveis de açúcar no sangue. Eles também reprimem ou ativam a transcrição de genes por interação com receptores de membrana para glicocorticóides (MA & GALLO, 1998; AMSTERDAN & SASSON, 2001; AMSTERDAN & SASSON, 2002).

A maioria dos efeitos dos glicocorticóides, induzindo apoptose, tem sido relacionada aos seus receptores. Duas isoformas de receptores de glicocorticóides foram caracterizadas em linhagens de células humanas. Antes da ativação do receptor de glicocorticóide através de uma proteína ligante no citoplasma, proteína 90-KD, que ao se ligar ao hormônio permite que o mesmo migre até o núcleo onde há a transcrição dos genes envolvidos com a apoptose (KASSEL et al., 1998; MICOZ et al., 2001; CHALITA, 2002; SU et al., 2004).

A ativação do receptor de glicocorticóides envolve sua fosforilação em resíduos de fosfatidilserina que aumenta sua transativação, porém diminui sua meia-vida. Os glicocorticóides podem alterar o potencial de membrana induzindo a apoptose através da família Bcl-2, que atuam como pró e também anti-apoptoticamente (SASSON et al., 2001; YOSSEF et al., 2003).

Os mecanismos pelos quais os glicocorticóides induzem apoptose ainda não estão bem estabelecidos, mas envolve a inibição de interleucina-2 (IL-2), baixa expressão do gene c-myc e repressão dos fatores de transcrição como Apaf-1, além de alterações na transdução que envolve as quinases pela sua citotoxicidade (RONGHE et al., 2001; MALLUCI et al., 2003).

Tiplaty & Sumerfield (2000), estudando várias doses da dexametasona em pacientes com mieloma múltiplo concluíram que doses mais baixas, em torno de 1mg/kg/oral e por longos períodos, foram favoráveis à estabilização e até mesmo à redução da massa tumoral.

Renner et al. (2002) estudando células tumorais que não expressavam a proteína Bcl-2 observaram que a redução da respiração era maior nas células apoptóticas que não apoptóticas, evidenciando o efeito dos glicocorticóides na estimulação de desta proteína. Posteriormente Renner et al. (2003) observaram que células cancerosas que se encontravam na fase G1-S expostas à ação de glicocorticóides despolarizavam a mitocôndria e conseqüentemente a liberação do citocromo c, o que fazia com que estas células entrassem em apoptose.

Os corticosteróides têm sido considerados como uma opção de tratamento em pacientes com câncer de próstata por sua baixa toxicidade, boa atividade anticâncer e baixo custo (SAIKA et al., 2001).

Porém, de acordo com Flider (2002); Sledge et al. (2003), as metástases podem interferir de maneira negativa na evolução do tratamento quimioterápico, devido à síntese de novas proteínas a partir do mRNA levando as células à resistência ao tratamento.

A regulação dos genes envolvidos com apoptose através dos glicocorticóides pode ser positiva ou negativa dependendo do tipo celular envolvido. O conhecimento dos mecanismos celulares e moleculares dos glicocorticóides controlando a morte celular pode auxiliar na utilização destes medicamentos no tratamento de vários tipos de câncer (ZHU et al., 2003; SU et al., 2004).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Animais

Foram utilizados 60 camundongos da raça BALB/c não isogênicos como modelo experimental, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa (UFV), com aproximadamente 12 semanas de idade e peso entre 25 e 30 gramas. Durante o período experimental os animais foram mantidos no Biotério Central (UFV), recebendo ração comercial balanceada para animais de laboratório e a água foi oferecida *ad libitum*. Os animais foram identificados e divididos em cinco tratamentos como ilustra a tabela 1.

Tabela 1. Grupos e protocolo de tratamento quimioterápico

Grupos	Número de camundongos BALB/c	Droga	Dose	Nº aplicações	Frequência aplicações	Via
I	15	DEX	0,1 mg/cm <sup>3</sup>	3	48 horas	IL
II	16	DOX	25 mg/cm <sup>2</sup>	2	15 dias	IV
III	6	PBS pH 7,4	0,1 ml/cm <sup>3</sup>	3	48 horas	IL
IV	8	Sol. fisiolog.	0,3 ml	2	15 dias	IV
V	15	DEX	0,2 mg/cm <sup>3</sup>	3	48 horas	IL

Dexametasona (DEX), doxorubicina (DOX), intralesional (IL), intravenosa (IV), tampão fosfato (PBS)

## **4.2. Obtenção, manutenção e transplante do tumor ascítico de Ehrlich (TAE)**

As células tumorais foram cedidas pelo Laboratório de Patologia do Câncer do Departamento de Biologia Animal da UFV e mantidas na forma ascítica inoculando-se intraperitonealmente em camundongos da raça BALB/c.

Para a manutenção do TAE em laboratório, descongelou-se à temperatura ambiente uma alíquota de 500 µl das células tumorais que foram inoculadas intraperitonealmente em dois camundongos. A cada dez dias retirava-se 100 µl do líquido ascítico e se inoculava imediatamente em outro camundongo.

Para obtenção das células tumorais para transplante, os camundongos foram eutanasiados com uma superdosagem de éter etílico por inalação e em seguida imersos em álcool 70° por 5 minutos. A seguir, sob condições de esterilidade, em capela de fluxo laminar, foram retirados 3 ml de líquido ascítico da cavidade abdominal e misturados com o mesmo volume de PBS pH 7,4 e centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos a 4° C, para lavagem das células. Após centrifugação o sobrenadante era 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, preparou-se uma suspensão de  $2 \times 10^6$  cel/100µl em PBS pH 7,4 sendo imediatamente inoculada pela via subcutânea na região interescapular dos camundongos.

## **4.3. Grupos e protocolos de tratamento**

Todos os camundongos receberam a transplantação das células do TAE, pela via subcutânea na região interescapular. Os grupos foram divididos como descrito a seguir:

Grupo I - 15 animais que receberam tratamento com a dexametasona (DEX) intralesional (IL) na dose de 0,1 mg/cm<sup>3</sup> a cada 48 horas num total de 3 tratamentos.

Grupo II - 16 animais que receberam tratamento com a doxorubicina (DOX) Intravenosa (IV) na dose de 25 mg/m<sup>2</sup> a cada 15 dias num total de dois tratamentos.

Grupo III - 6 animais (controle dos tratamentos I e V) que receberam tratamento com solução de PBS pH 7,4 intralesional (IL) no volume de 0,1ml/cm<sup>3</sup> a cada 48 horas num total de três tratamentos.

Grupo IV - 8 animais (controle do tratamento II) que receberam tratamento com solução fisiológica 0,9% intravenosa (IV) na dose de 0,3ml a cada 15 dias num total de dois tratamentos.

Grupo V - 15 animais que receberam tratamento com a Dexametasona (DEX) intralesional (IL) na dose de 0,2 mg/cm<sup>3</sup> a cada 48 horas num total de três tratamentos.

Os tratamentos foram iniciados 10 dias após a transplantação tumoral. As doses da DEX para os tratamentos do TAE na forma sólida foram calculadas a partir do dimensionamento da massa tumoral com o auxílio de um paquímetro analógico com escala em cm, sendo medidos a largura, a espessura e a profundidade da massa tumoral. A partir destas medidas foi calculado o volume do tumor em cm<sup>3</sup>. A aplicação da DEX no TAE foi realizada com seringa de insulina e esta era introduzida em cinco pontos: um central e quatro laterais.

#### **4.4. Eutanásia dos camundongos e coleta do material para histopatologia**

A cada 48h após a administração da dose da dexametasona, cinco animais dos grupos I e V e dois do grupo III foram eutanasiados.

Após 72 h decorridas da primeira e segunda administração da doxorrubicina quatro camundongos dos grupos II e dois camundongos do grupo IV foram eutanasiados.

Imediatamente antes da segunda administração da doxorrubicina quatro camundongos dos grupos II e dois camundongos do grupo IV foram eutanasiados. Após 15 dias da segunda administração da doxorrubicina quatro camundongos dos grupos II e dois camundongos do grupo IV foram eutanasiados.

Após a eutanásia, os fragmentos dos tumores foram coletados e imediatamente colocados em formol neutro tamponado a 10%, sendo que após as primeiras 6 h de fixação foram recortados em fragmentos menores de aproximadamente 5mm de espessura e colocados novamente em formol por 24h. Decorrido este tempo, foram desidratados em soluções crescentes de álcoois 70°, 80°, 90° e 100%, diafanizados em xilol, incluídos em parafina, cortados em micrótomo de rotação na espessura de 5 µm e

estendidos em lâmina de vidro com polipec, sendo corados pela hematoxilina/eosina (H&E). Também foram realizados cortes de 4µm de espessura para coloração de laranja de acridina (SIGMA®), sendo colocado 50µl de solução de laranja de acridina (10mg/ml) sobre cada lâmina e imediatamente foi realizada a leitura em microscópio de fluorescência de luz verde.

A avaliação histológica da coloração pela H&E foi realizada seguindo os critérios de pontuação segundo Alvarenga (1999), que variaram de 1 a 3 em relação aos seguintes parâmetros:

- a) Densidade da população celular do tumor
  - (1) Discreta (+)
  - (2) Moderada (++)
  - (3) Intensa (+++)
  
- b) Presença de figuras mitóticas
  - (1) Grau mitótico 1 (até 10 mitoses/ 10 Campos de Maior Aumento - CMA)
  - (2) Grau mitótico 2 (11 a 20 mitoses/ 10 CMA)
  - (3) Grau mitótico 3 (> 20 mitoses/ 10 CMA)
  
- c) Presença de corpos apoptóticos
  - (1) Discreta (+)
  - (2) Moderada (++)
  - (3) Intensa (+++)
  
- d) Presença de necrose
  - (1) Discreta (+)
  - (2) Moderada (++)
  - (3) Intensa (+++)
  
- e) Presença de infiltrados inflamatórios
  - (1) Discreta (+)
  - (2) Moderada (++)
  - (3) Intensa (+++)

f) Grau nuclear

- (1) Grau nuclear 1 – núcleos de forma e tamanho uniforme, cromatina nuclear igualmente dispersa em todo o núcleo.
- (2) Grau nuclear 2 - núcleos de forma e tamanhos moderadamente irregulares, cromatina grossamente agrupada ou com aspecto nuclear vacuolado.
- (3) Grau nuclear 3 – polimorfismo nuclear intenso e nucléolo proeminente.

#### **4.5. Manutenção e estabilização das células do TAE *in vitro* para realização da curva de crescimento e tratamentos**

As células foram obtidas a partir do líquido ascítico, como descrito no item 4.2, sendo em seguida ressuspendidas em 5 ml de meio de cultura RPMI-1640 completo, contendo 10% de soro fetal bovino, 10U de penicilina, 10µg de estreptomicina, 0,025µg de anfotericina B (SIGMA®) e 2mM de glutamina. Essas foram mantidas em estufa a 37°C, com 5% CO<sub>2</sub> por 72 horas para estabilização das culturas.

Para o tratamento das células tumorais com DEX e DOX foram plaqueadas em duplicata 2x10<sup>5</sup> células em um volume final de 2,5ml de meio RPMI-1640 completo, em placa de 24 poços. Para o tratamento com dexametasona (Azium®) utilizaram-se concentrações de 0,1 µM e 0,2 µM. A doxorubicina (Adriblastina®) foi usada nas doses de 0,5µg/ml e 1,0µg/ml em poços distintos. Paralelamente e também em duplicata foram feitos controles sem tratamento com 2x10<sup>5</sup> células em um volume final de 2,5ml de meio RPMI-1640 completo e incubadas em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. A contagem das células foi realizada nos intervalos de 1, 2, 3, e 24 horas, usando o método de exclusão pelo azul de tripano.

Para realização da curva de crescimento das células tumorais foram plaqueadas em duplicata 5x10<sup>5</sup> células/2,5ml de meio RPMI-1640 completo, em placa de 24 poços e incubadas em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> por 24, 48, 72 e 96 horas. Como controle positivo usou-se a Concanavalina A (Con A - SIGMA), adicionando-se 1µl/ml de Con A. Após cada 24h, os poços eram tripsinizados, as células eram recolhidas, centrifugadas e ressuspendidas em 0,5 ml de meio RPMI-1640 completo e em seguida eram contadas usando o método de exclusão do corante azul de tripano.

#### **4.6. Cálculo da porcentagem de inibição de crescimento para os grupos tratados com Dex e Dox**

Utilizou-se para o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento celular pela Dex e Dox a fórmula:

$$\% \text{ inibição do crescimento} = 100 (1 - R/C)$$

Onde,

(R) N° de células viáveis da cultura tratada

(C) N° de células viáveis da cultura controle

(LOTAN et al., 1990 citados por DIAS, 1994).

#### **4.7. Análise estatística**

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao caso, em que as parcelas foram os tratamentos com os quimioterápicos dexametasona e a doxorubicina.

Os resultados obtidos a partir das medidas dos tumores após os tratamentos e o tratamento das células do TAE foram interpretados estatisticamente pela análise descritiva dos dados e a comparação das médias por meio do teste não paramétrico de permutação ou *randomization* (STELL et al., 1997), a 5% de significância.

Os resultados da histopatologia dos tumores foram interpretados mediante análise descritiva.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Avaliação *in vivo* do TAE após tratamentos com dexametasona e com doxorubicina

As médias, o desvio-padrão e o erro-padrão da média da morfometria do TAE após tratamento com dexametasona e com doxorubicina estão representados tabela 2.

Tabela 2. Análise da morfometria da massa tumoral após tratamento com dexametasona.

Parâmetros	Grupos	1ª avaliação	2ª avaliação	3ª avaliação	4ª avaliação
Média (desvio-padrão)	I	0,996 (0,467)	0,662 (0,275)	0,514 (0,325)	0,486 (0,161)
	III	0,553 (0,666)	0,513 (0,574)	0,562 (0,017)	0,565 (0,134)
	V	1,620 (1,284)	0,731 (0,356)	0,252 (0,148)	0,145 (0,176)

Grupos I e V tratados com dexametasona / grupo III com sem tratamento/ média e desvio-padrão em cm<sup>3</sup>

Com base nestes valores foi utilizado o teste de permutação para verificar o efeito da dexametasona sobre o TAE com diferença estatística significativa de 5% ( $p < 0,05$ ). Os valores obtidos no tratamento com dexametasona comparando os grupos I (DEX intralesional – menor dose) e III (PBS intralesional) não mostraram diferença estatisticamente significativas. Os grupos V (DEX intralesional – maior dose) e III (PBS intralesional) também não apresentaram diferença significativa. Porém, quando se compara a aplicação do quimioterápico nos animais de um mesmo grupo, como no caso

dos grupos I e V, o valor encontrado entre a primeira e segunda aplicação (0,028 cm<sup>3</sup>), e entre a segunda e a terceira aplicação (0,012 cm<sup>3</sup>), apresentam um resultado estatisticamente significativo, mostrando que dentro do mesmo grupo houve redução da massa tumoral, sendo evidenciado na Figura 1.

Os resultados encontrados a respeito do erro-padrão das médias podem ter sido em decorrência da grande variação das medidas dos tumores em relação ao tamanho da amostra avaliada (Tabela 2). Esta diferença de comportamento do tumor entre os animais deve-se provavelmente à variação na constituição do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC), já que os camundongos utilizados não eram isogênicos. Corroborando estes resultados Ashewell et al. (1994), em estudos realizados com tumores em camundongos, observaram que o desenvolvimento destes apresenta-se de forma diferente entre os animais isogênicos e não isogênicos.

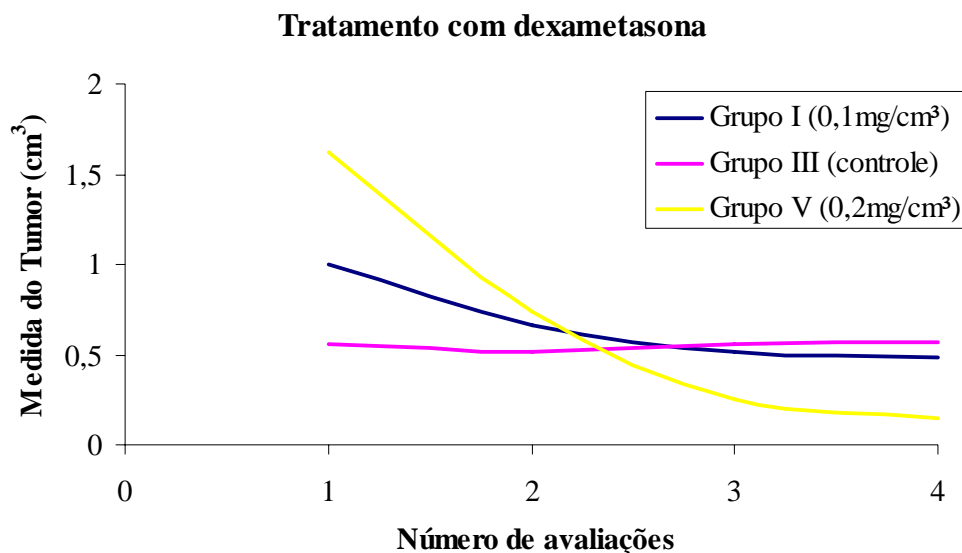


Figura 1. Curva da evolução da massa tumoral dos grupos tratados com dexametasona e controle.

De acordo com a Figura 1, pode-se observar que houve um contínuo decréscimo das dimensões do tumor nos grupos tratados com DEX intralesional (I e V) em relação à redução da massa tumoral do grupo controle, sendo que a maior redução foi expressa no grupo que recebeu a maior dose de DEX (V). Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por outros autores que também observaram a redução de tamanho de vários tumores em decorrência do tratamento com dexametasona nas doses

de 1,0 e 2,0mg/kg via oral (BROW et al., 1993; AMSTERDAN & SASSON, 2002; ALVES, 2002).

As médias morfométricas dos tumores, representadas na Tabela 2, demonstraram que na primeira avaliação do grupo I, tratado com a menor dosagem de DEX intralesional, a média foi de 0,996 cm<sup>3</sup>, enquanto que na última avaliação foi de 0,486 cm<sup>3</sup>, apresentando uma redução de 51,20%. A porcentagem de redução da massa tumoral que foi observada em cada avaliação correspondeu a: 33,53% da primeira para a segunda avaliação, 22,37% da segunda para a terceira avaliação e de 5,76% da terceira para a quarta avaliação.

No grupo V, tratado com a maior dosagem de DEX intralesional, a porcentagem das médias morfométricas dos tumores ao longo dos tratamentos foi respectivamente de 54,88%, 65,53%, 42,46%.

Os resultados obtidos do grupo III, tratado com PBS intralesional, mostraram uma redução de 7,23% na primeira avaliação, enquanto que nas outras análises houve um crescimento de 8,72% e 0,5% da segunda para a terceira e da terceira para a quarta respectivamente.

A partir destes resultados, pode-se inferir que o grupo V apresentou a maior porcentagem de redução da massa tumoral, num total de 91% entre a primeira e a quarta avaliação. Já o grupo III não apresentou alterações estatisticamente significativas em relação aos intervalos de tempo analisados (anexo 1).

Esses resultados comprovam que o tratamento com a dexametasona induziu à regressão tumoral, à semelhança do que foi descrito por Brain et al. (1999) e Zu et al. (2003) que também constataram a redução do tamanho da massa tumoral, no caso de câncer de próstata. Os mesmos autores sugeriram que esta redução era devido à indução de apoptose pela dexametasona.

Tabela 3. Análise da morfometria da massa tumoral após tratamento com doxorrubicina

Parâmetros	Grupos	1 <sup>a</sup> avaliação	2 <sup>a</sup> avaliação	3 <sup>a</sup> avaliação	4 <sup>a</sup> avaliação	5 <sup>a</sup> avaliação	6 <sup>a</sup> avaliação
Média (Desvio-padrão)	II	2,446 (1,623)	2,172 (1,725)	3,087 (1,261)	4,685 (1,522)	5,180 (1,479)	5,672 (1,924)
	IV	1,123 (0,576)	1,985 (0,601)	3,535 (0,155)	5,085 (1,046)	5,585 (0,756)	4,845 (0,176)

Grupo II tratado com doxorrubicina / grupo IV sem tratamento/ média e desvio-padrão em cm<sup>3</sup>

Os valores obtidos na análise morfométrica dos tumores do grupo tratado com DOX intravenosa (II) em relação ao grupo controle (IV) não houve diferença

significativa estatisticamente (Tabela 3). Igualmente, ao se comparar a primeira com a segunda avaliação para esse grupo (II), os resultados não demonstraram diferença significativas estatisticamente (tabela 3). Os valores das médias mostraram um aumento da massa tumoral a cada avaliação nos grupos controle e tratado com DOX (IV e II), indicando que não houve regressão da massa tumoral no grupo tratado pela doxorrubicina.

A partir desses resultados apresentados e pela análise da resposta do tumor à ação da doxorrubicina, não se observou redução da massa tumoral. Sabe-se que as células mais responsivas à maioria dos quimioterápicos encontram-se na fase G1 e S, ou seja, no início do crescimento do tumor, quando a intensidade de multiplicação celular e índice mitótico são mais intensos. Baseado nesta assertiva pode-se deduzir que a resposta observada talvez seja consequência do próprio tamanho do tumor quando do início do tratamento, indicando que houve provavelmente refratariedade do tumor à droga, concordando com os achados de Eytan et al. (1995); Floride et al. (1998); Gao & Dou (2000) e Lee & Schmitt (2003) ao estudarem resistência das células tumorais a quimioterápicos.

Entretanto, os resultados da avaliação do comportamento tumoral (Figura 2) mostraram que o grupo tratado com a doxorrubicina (II) apresentou um crescimento menor em relação ao grupo controle (IV), indicando que esta droga atuou neste tumor provavelmente nas células que se encontravam nas fases G1 e S, concordando com Rais et al. (1999) que ao estudarem o ciclo celular do TAE relataram que os tumores mais desenvolvidos apresentavam menor número de células nestas fases.

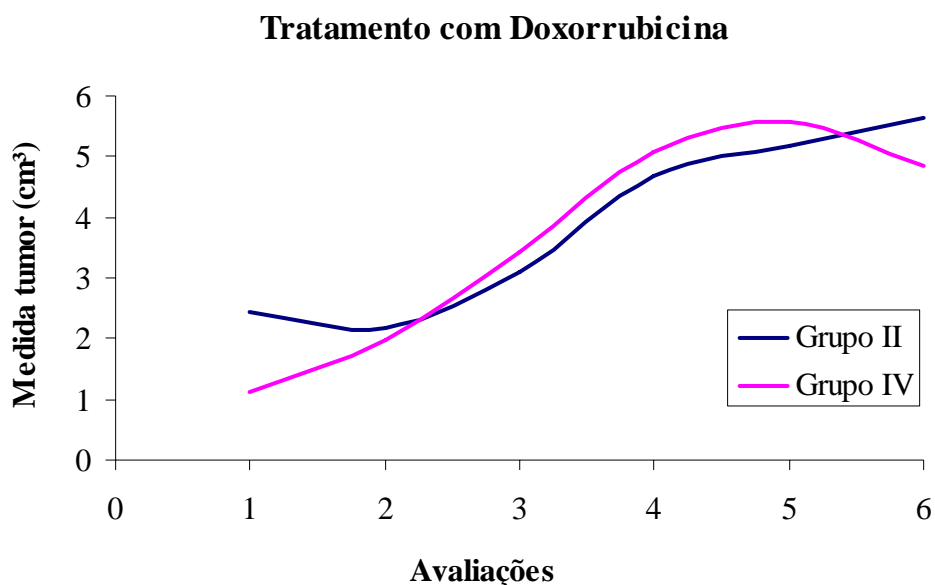


Figura 2. Curva da evolução da massa tumoral do grupo II tratado com doxorrubicina e grupo IV.

Outra explicação para esses resultados pode ser a resistência a múltiplas drogas, que está relacionada ao fenótipo de expressão da glicoproteína P, que foi relatado por Ronilson et al. (2002) quando estudaram a relação entre a glicoproteína e as antraciclina, mostrando a resistência das células tumorais a este fármaco, mesmo que não tivessem exposição prévia à droga.

O tratamento *in vitro* das células do TAE está representado na Figura 3, onde se observa a porcentagem de inibição do crescimento pela ação da dexametasona e da doxorrubicina em função do tempo.

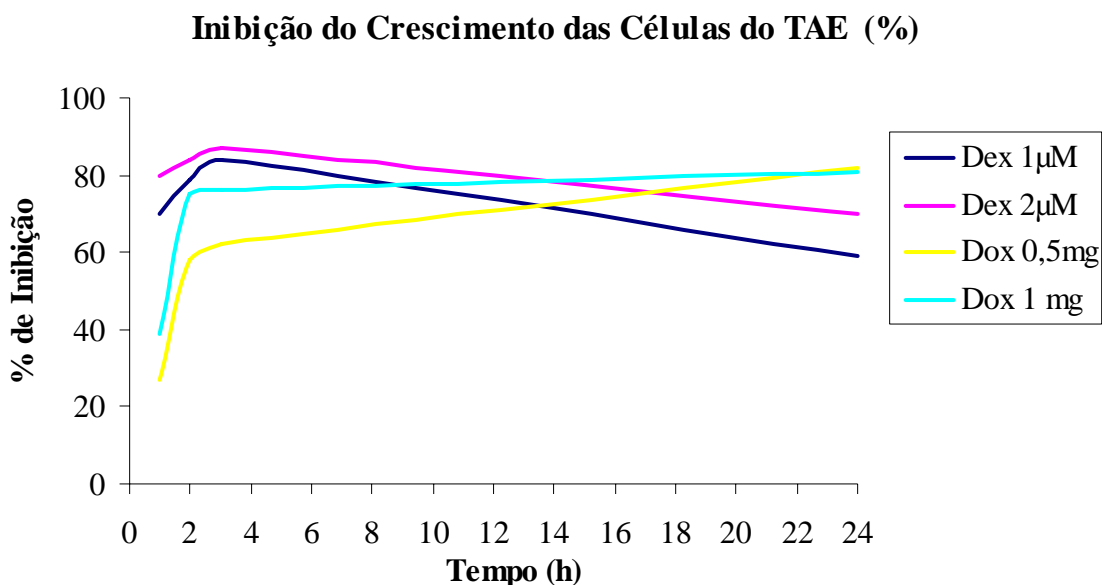


Figura 3. Curva de inibição de crescimento após tratamentos com dexametasona e doxorubicina *in vitro* em relação ao controle.

A partir do resultado das porcentagens de inibição do crescimento das células do TAE, após o tratamento com dexametasona, constatou-se que as doses utilizadas alcançaram sua máxima ação em torno de três horas pós-tratamento (Figura 3). Entretanto, ao comparar a porcentagem de inibição entre doses, o resultado indica que a concentração de 2,0µM foi 6% superior à de 1,0µM, embora não sendo estatisticamente significativo.

O decréscimo da porcentagem de inibição a partir de três horas provavelmente esteja relacionado à presença de várias populações celulares típicas deste tumor, dentre as quais pode haver subpopulações que são resistentes à dexametasona. Estes resultados estão de acordo com os achados de Chauhan et al. (2000) e Bonamin et al. (2001) que verificaram, em um mesmo tumor de origem linfocítica, a presença de células sensíveis e outras resistentes a dexametasona, sendo que esta sensibilidade também era dose-dependente.

A avaliação da porcentagem de inibição da doxorubicina (Figura 3) indicou que este quimioterápico tem um maior potencial de inibição nas células tumorais a partir de três horas (62% de inibição). Os resultados da porcentagem de inibição das doses de 0,5mg/ml e 1,0 mg/ml mostraram que a dose de 1,0mg/ml apresentou-se 10% mais efetiva, embora não sendo estatisticamente significativa. Estes resultados estão de

acordo com Ashikawa et al. (2004) que relataram achados semelhantes quando estudaram a citotoxicidade da doxorrubicina em células neoplásicas.

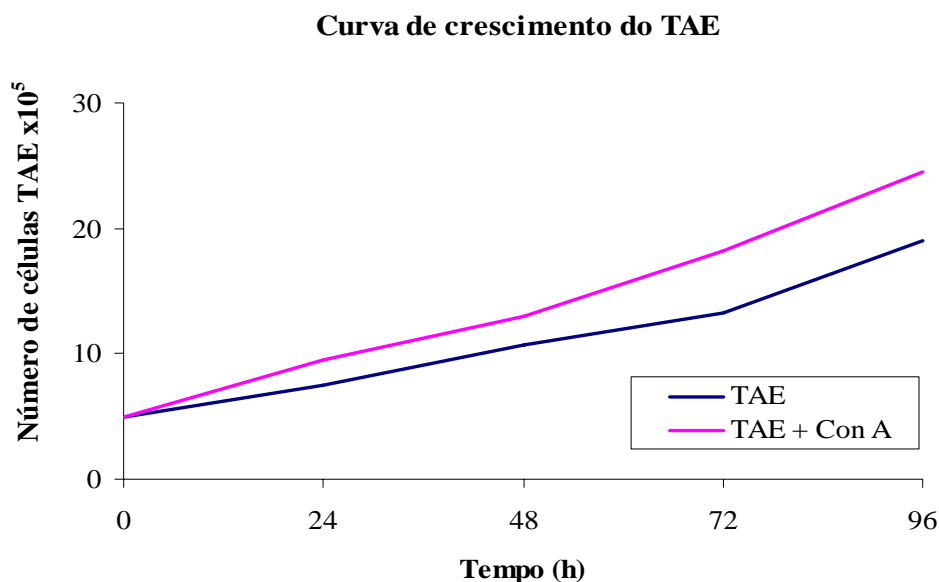


Figura 4. Curva-padrão de crescimento do TAE e com Concanavalina A (Con A - mitógeno).

A curva de crescimento do TAE apresentou intenso crescimento no período observado comportando-se de forma semelhante aos relatos descritos por Guerra (1983).

## **5.2. Avaliação macroscópica e histológica do TAE após tratamentos com dexametasona e com doxorrubicina**

Todos os animais desenvolveram massas tumorais a partir de sete dias pós-inoculação. Estas eram mais ou menos arredondadas e de tamanhos variados, localizadas na região lombar interescapular, não sendo observadas diferenças anatomopatológicas entre os tumores dos animais dos grupos tratados em relação aos grupos controle. Ao exame macroscópico a massa tumoral mostrava aspecto borrachento e superfície irregular (Figuras 5 e 6). Ao corte mostrava aparência lisa, apresentando áreas de coloração esbranquiçada, algumas das quais com diversos pontos avermelhados. Além

disso, também era possível notar que essas áreas eram circunscritas por uma camada delgada de cor rósea. Estes achados estão de acordo com aqueles que foram descritos por Dagli (1989), quando observou as características macroscópicas deste tumor.

A cinética de crescimento rápido do TAE pode estar relacionada ao número de células utilizadas na transplantação, o que permitiu provavelmente uma resposta de evasão tumoral. A este respeito, Abbas et al. (2000) consideram que a cinética do crescimento tumoral pode permitir o estabelecimento de tumores imunologicamente resistentes antes do desenvolvimento de uma resposta imune efetiva, denominada de “penetração furtiva”, onde a transplantação de pequenas quantidades de células tumorais pode levar ao estabelecimento de tumores letais, enquanto transplantes maiores do mesmo tumor são rejeitados. A resposta imune pode estar também relacionada com a seleção de células tumorais mutantes que perderam a expressão das proteínas imunogênicas, especialmente se estas forem críticas para o fenótipo maligno do tumor.

O crescimento tumoral em todos os animais se localizava no tecido subcutâneo, sendo bem delimitado e circunscrito por uma pseudocápsula fibrosa, por onde se infiltravam numerosos capilares, indicando a exigência de adequado aporte sanguíneo para nutrição do tumor (Figura 5). Essa vascularização iniciava-se dos tecidos adjacentes: muscular e subcutâneo. Todas essas observações concordam com Dagli (2000), Bhattacharyya et al. (2003) e Saad-Hossne (2004).

As análises macroscópicas dos linfonodos braquial e axilar, que drenavam a região, revelaram 100% dos animais apresentavam-se com hiperplasia destes órgãos linfóides. Estes resultados são semelhantes aos que foram encontrados por Dagli (1989), quem estudou a disseminação linfática do TAE comprovando hiperplasia dos linfonodos regionais.

A análise histológica dos tumores, referentes aos grupos controle (III e IV), caracterizou-se por apresentar uma massa neoplásica que, embora relativamente circunscrita por uma pseudocápsula de tecido conjuntivo fibroso, infiltrava-se nos tecidos adjacentes: muscular e adiposo, caracterizando a invasividade típica deste tumor. Infiltrado inflamatório moderado, predominantemente mononuclear (linfócitos, macrófagos e plasmócitos), era observado próximo a pseudocápsula (Figura 7). O padrão do crescimento tumoral é sólido, sincicial, sem a formação de túbulos e com estroma escasso. As células neoplásicas são pleomórficas, com citoplasma abundante e finamente granular, ou às vezes observando-se pequenos vacúolos. Muitas células apresentaram núcleos proeminentes, alterando-se a relação núcleo-citoplasma (Figura 8).

Células gigantes multinucleadas e figuras mitóticas são muito freqüentes, a freqüência destas últimas podendo ser classificadas como grau mitótico três (Tabela 4).

Também se observou a ocorrência de extensas áreas de necrose de coagulação, com células mostrando citoplasma mais eosinofílico refletindo perda da basofilia e aumento da afinidade das proteínas citoplasmáticas pela eosina, com núcleos picnóticos e às vezes com acentuado grau de cariorexe (Figura 9). O aparecimento dessas áreas de necrose deve-se a baixa vascularização no interior da massa tumoral. Nestas áreas o infiltrado inflamatório era moderado (Tabela 4), com células do tipo polimorfonucleares neutrófilos, a maioria dos quais mostrando distintos graus de degeneração ou necrose (Figura 9).

Tabela 4. Análise qualitativa dos parâmetros histológicos do tumor de Ehrlich

Tratamento	GI	GIII	GV	GII	GIV
	DEX 0,1mg/cm <sup>3</sup>	Controle	DEX 0,2mg/cm <sup>3</sup>	DOX 25mg/m <sup>2</sup>	Controle
Parâmetros					
Densidade celular	2	2	2	3	3
Figuras de mitoses	2	3	2	3	3
Corpos apoptóticos	3	-	3	2	-
Necrose	3	3	3	2	2
Infiltrado inflamatório	2	2	2	2	2
Grau nuclear	3	3	3	3	3

(-) Ausência destes parâmetros. Dexametasona (DEX) / Doxorrubicina (DOX)

Todos esses achados estão de acordo com aqueles apontados por vários autores (DAGLI, 1989; GABAI et al., 1995; GENTILE, 2001; MATSUZAK et al., 2002; DAGLI et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003; BELO et al., 2004; SAAD-HOSSNE et al., 2004).

Diferentemente do que foi descrito por Dagli (1989), em nenhum dos casos analisados observaram-se pontos de calcificação e fibrose substituindo o tecido neoplásico.

Nas células que mostravam alteração da relação núcleo-citoplasma constatava-se presença de núcleos bastante volumosos, pleomórficos, com intenso grau de hipercromasia e nucléolos proeminentes, características estas que permitem classificá-

los como grau nuclear três, indicando a sua alta malignidade (COTRANS et al., 2000; ALVARENGA, 2002).

Também se verificou a ocorrência de massas tumorais de menores dimensões, próximas à principal, sendo considerados como nódulos satélites, os quais, igualmente, apresentavam pequenas áreas de necrose de distribuição geográfica. Estes achados confirmam o que foi descrito por Arimura et al. (2003).

A análise histológica dos tumores dos animais dos grupos tratados com dexametasona (I e V) e aquele que recebeu doxorrubicina (II) mostraram um padrão histológico similar ao que foi observado nos grupos controle.

Entretanto, em 60% dos animais dos grupos I e V se observou uma intensa reação inflamatória, localizada nas proximidades da pseudocápsula (Figura 7), a qual era mediada por polimorfonucleares neutrófilos, a grande maioria deles em degeneração ou mesmo em apoptose. Pesquisas mostram que a ação antiinflamatória dos glicocorticóides é exercida por dois mecanismos complementares, por um lado eles induzem a morte das células que provocaram a inflamação, neste caso específico foram os neutrófilos, e por outro eles protegem as células residentes da inflamação através do bloqueio dos sinais apoptóticos (AMSTERDAN & SASSON, 2002).

Em todos os grupos, este tumor apresentou necroses intensas, dificultando a quantificação das mesmas entre os tratamentos e os controles, como referido por Dagli (2002).

Nos grupos I e V observou-se em todos os animais uma abundância de células com núcleos com intensa hipercromasia e citoplasma densamente eosinofílico, situadas numa faixa intermediária entre as células neoplásicas aparentemente viáveis e as áreas de necrose coagulativa central, estando estes resultados de acordo com os encontrados por Gentile (2001) e Oliveira (2003).

A contagem das figuras de mitose no TAE apresentou-se de maneira intensa em todos os grupos (Figura 8), concordando com resultados obtidos por Rizzo (2000). Os tratamentos pela DEX, grupos I e V não diferiram entre si, sendo classificados como grau mitótico dois e apresentou um índice mitótico menor se comparado ao da DOX, grupo II, e também em relação aos grupos controle III e IV apresentou grau mitótico três. Estes resultados estão de acordo com Sid et al. (2004), que afirmaram que os glicocorticóides têm efeito deletério sobre as células tumorais, levando ao aumento da morte celular por apoptose, como observado pela presença de inúmeros corpos apoptóticos entre os animais dos grupos I e V evidenciados pela coloração de laranja de

acridina (Figura 11). Levando em consideração a elevada taxa mitótica das células tumorais e a sua instabilidade genética pode-se inferir que estes fatores poderiam ter favorecido a indução de apoptose. A este respeito foi descoberto, recentemente, que os glicocorticóides exercem alguns de seus efeitos via receptor de membrana diferente do intracelular clássico. Eles poderiam alterar o potencial de membrana, levando a mudança na expressão de genes, evidenciando novo mecanismo de indução de apoptose pelos glicocorticóides (AMSTERDAN & SASSON, 2002).

Os grupos II e IV apresentaram parênquima mais denso sendo classificado como intensa densidade da população celular, com grande ocorrência de mitoses, por muitas vezes bizarras e atípicas, enquanto os tratamentos I, III e V apresentaram rimas mais delgadas, sendo classificado como densidade populacional moderada, apresentando também um índice mitótico menor, o qual era proporcional a este parênquima. Esta diferença entre a relação das rimas serem mais delgadas nos grupos I, III e V e mais espessas nos grupos II e IV está intimamente relacionado ao tamanho da massa tumoral que nos grupos II e IV era maior em 60% dos animais.

A ocorrência de mitoses neste tumor está intimamente relacionada à densidade da população celular como demonstrado em estudos realizados por Oliveira (2003) quem observou que a maior densidade populacional estava diretamente relacionada com maior frequência de mitoses. Entretanto, nos tratamentos I e V que apresentaram uma menor densidade populacional e maior índice de corpos apoptóticos em relação aos grupos II, III e IV, possivelmente seja em decorrência da ação da dexametasona, caracterizando estas células neoplásicas como sendo sensíveis aos glicocorticóides, pela provável presença de receptores de membrana como descrito por Amsterdam & Sasson (2002). Brain et al. (1999), Chauhan et al. (2000) e Yossef et al. (2003) observaram a presença de receptores para esse grupo de quimioterápico em células neoplásicas de origem epitelial.

Os grupos I e V apresentaram uma nítida redução da densidade populacional em relação aos grupos II, III e IV traduzida por uma rima periférica de células neoplásicas mais delgada, distribuída ao redor das áreas de necrose, resultado que está em concordância com os apresentados por Arimura et al (2003) que estudaram a indução de apoptose nas células do tumor ascítico de Ehrlich.

Através das análises histológicas verificou-se que o tumor apresentou alto grau de desdiferenciação, caracterizada por grande número de células pleomórficas, volumosas e com citoplasma amplo, vacuolizado, nucléolos bem evidentes, elevado

índice mitótico ocorrendo com maior intensidade nos grupos II e IV em relação aos grupos I, III e V. Permitindo classificar o tumor ascítico de Ehrlich como grau histológico 3, fazendo uma analogia com a classificação segundo Alvarenga (1999) de carcinoma de mama.

A partir das avaliações histológicas nos grupos tratados com dexametasona, grupos I e V, constatou-se que não houve variação entre eles, indicando que a diferença de dosagem não interferiu nesta resposta do tumor à droga. Entretanto, ressalta-se maior ocorrência de corpos apoptóticos e menor grau de mitose, parâmetros estes que estavam relacionados à redução macroscópica da massa tumoral.

O grupo tratado com doxorrubicina (grupo II) também apresentou apoptose em grau moderado (Figura 11B), indicativa do efeito deste quimioterápico em relação ao grupo controle (IV) (Figura 11A). Este resultado, provavelmente esteja relacionado ao atraso da quimioterapia que deveria ter-se iniciado no décimo dia após a transplantação, e somente começou no décimo quinto dia. Este fato interferiu na resposta ao tratamento, porque no início do crescimento tumoral o índice mitótico e a fração de crescimento são altos enquanto o tempo de duplicação é curto. Com o passar do tempo e aumento da massa tumoral, maior número de células entraram na fase de repouso (G0) resultando em um índice mitótico e tempo de duplicação mais longo, o que caracteriza o chamado crescimento Gompertziano de acordo com estudos relatados por Floride et al (1998) e Dagli (2000) em células do TAE e como descrito por Charrois & Allen (2004) estudando a farmacologia deste quimioterápico. Outro fator provável desta interferência na resposta à quimioterapia é a resistência multidrogas, que segundo alguns autores estaria relacionada ao fenótipo da proteína P, que resulta em uma resistência cruzada ao quimioterápico mesmo que o tumor nunca tenha sido exposto a droga (GABAI, 1995; LITMAN et al., 1998).

Mesmo com a coloração da laranja de acridina, não foi possível realizar uma análise quantitativa sobre a ocorrência de corpos apoptóticos em todos os grupos estudados, devido à intensidade de necrose neste tumor. Porém estes se apresentaram visivelmente em maior número nos grupos I e V (Figura 11C) em relação ao II e aos grupos controle III e IV, onde não se observaram corpos apoptóticos. Estes resultados sugerem mais uma vez que estas células provavelmente apresentem receptores de membrana, ou o receptor clássico para glicocorticóides.

Os resultados obtidos a partir da coloração pela laranja de acridina no grupo II também foram indicativos de que a doxorrubicina induz apoptose nas células do TAE,

cujo mecanismo segundo alguns autores seria através da liberação do citocromo c pelas mitocôndrias e ativação das caspases 3 e 9 (BELO et al., 2004; CHARROIS & ALLEN, 2004).

A avaliação histológica dos linfonodos regionais (braquiais e axilares) não mostrou presença de células neoplásicas, exibindo apenas alterações hiperplásicas caracterizadas por: hiperplasia nodular, com formação de centros germinativos, proliferação de plasmócitos, mastócitos e linfócitos expandindo os seios medulares, constituindo uma hiperplasia reacional (Figura 10), o que pode caracterizar uma resposta imune adaptativa ao estímulo antigênico tumoral como descrito por Abbas (2002). Nos linfonodos analisados não foram identificadas invasões angiolinfática, nem a presença de células características deste tumor, o que sugere baixo índice metastático como observado por Rizzo (2002).

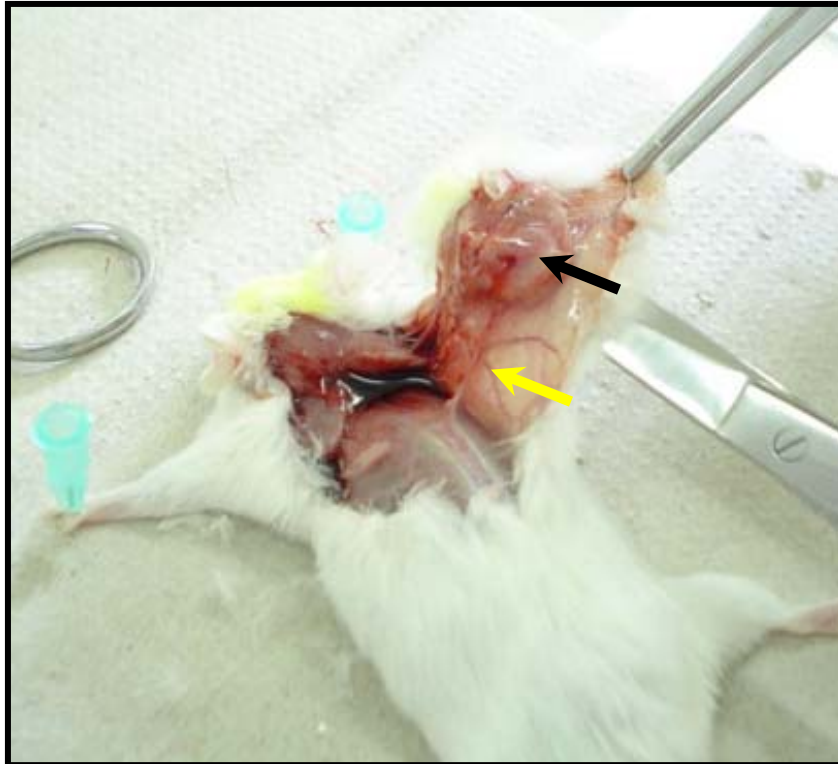


Figura 5. Camundongo portador do TAE mostrando intensa vascularização (seta amarela) no tecido subcutâneo, infiltrando a massa tumoral (seta preta).

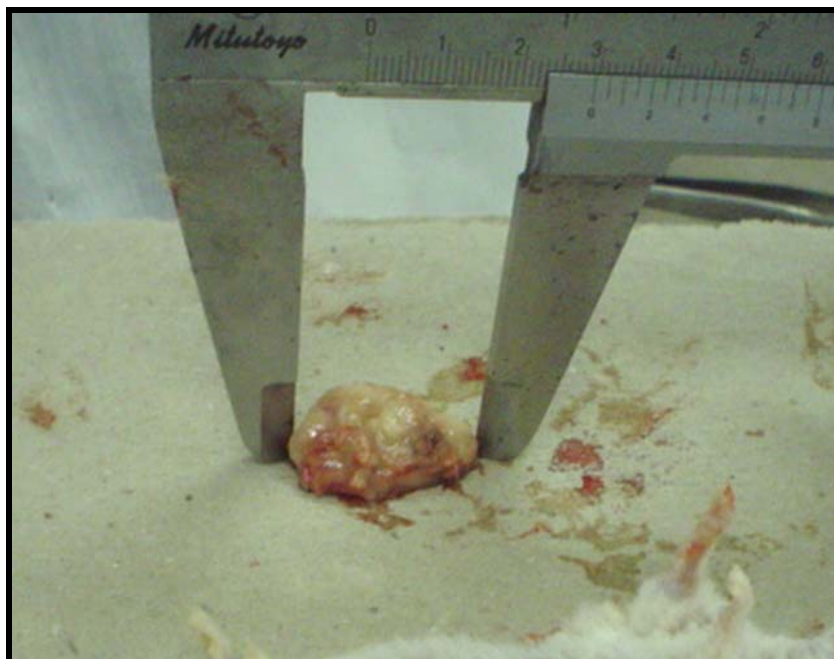


Figura 6. Tumor de Ehrlich localizado na região subcutânea de um camundongo.

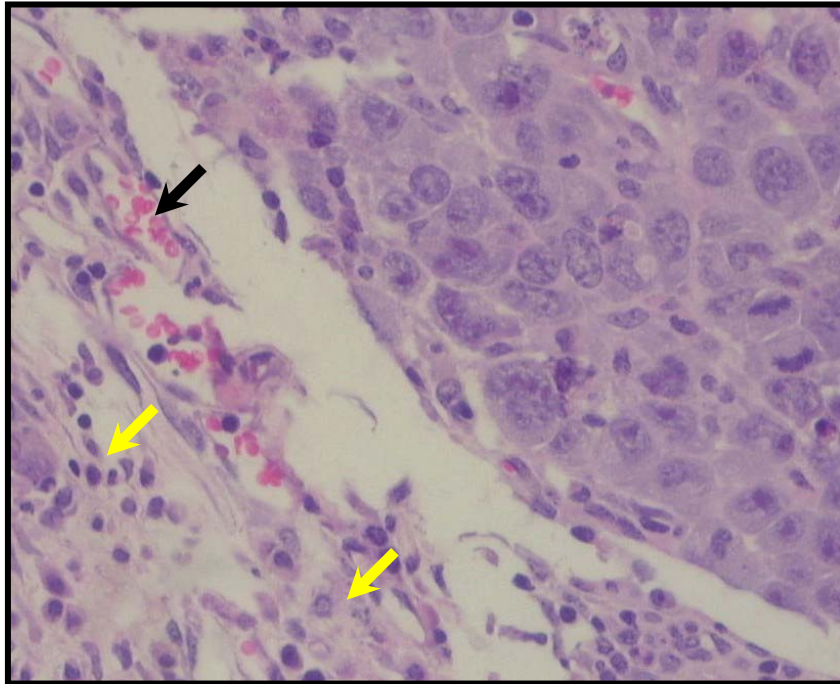


Figura 7. Fotomicrografia da massa tumoral de um camundongo do grupo III tratado com dexametasona, apresentando angiogenese (seta preta) e infiltrado inflamatório (mononucleares) extra-tumoral (setas amarelas). H&E. 400X.

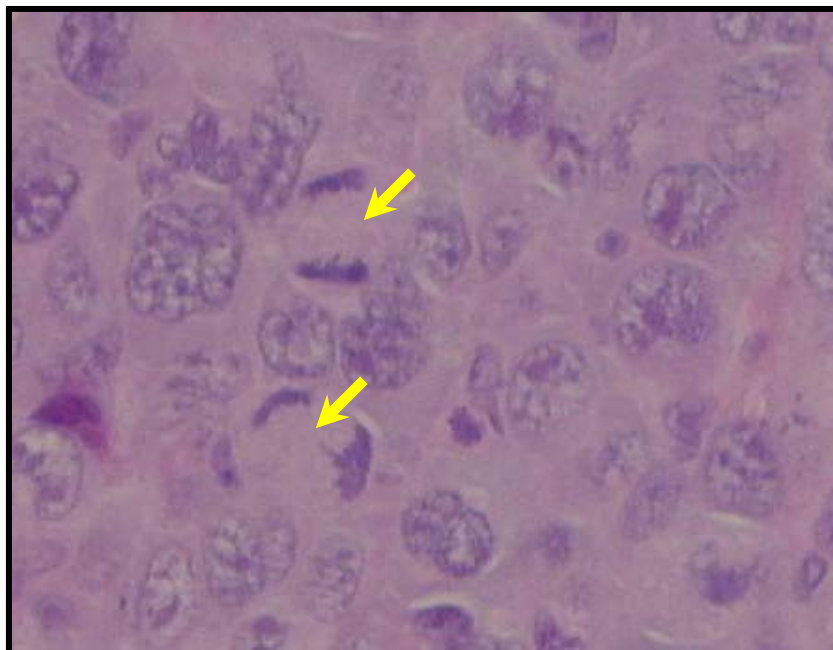


Figura 8. Fotomicrografia do tumor de Ehrlich tratado com doxorubicina, em um camundongo do grupo II, apresentando alta densidade celular, núcleos volumosos, pleomórficos, com nucleólos evidentes, presença de figuras de mitose (setas amarelas). H&E, 520X.

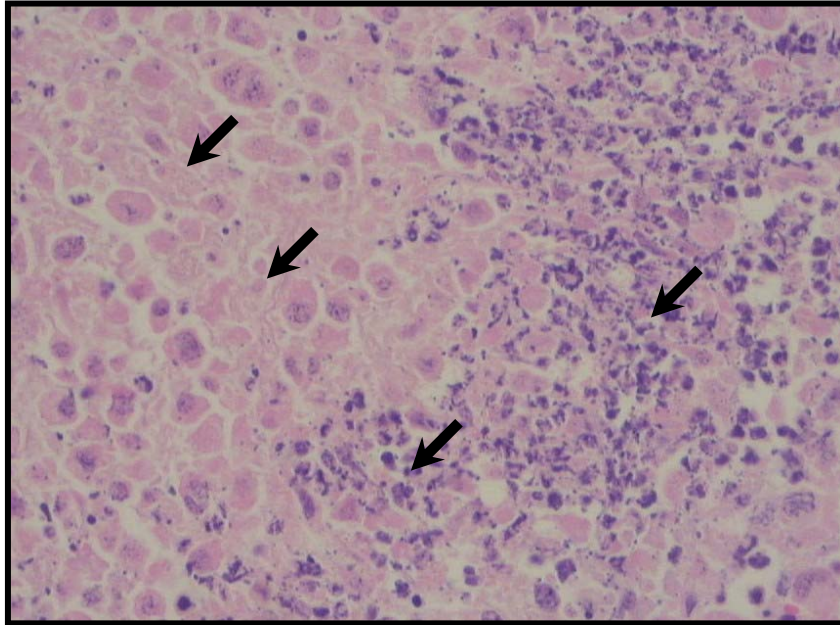


Figura 9. Fotomicrografia do tumor de Ehrlich após tratamento com dexametasona em um camundongo do grupo I, apresentando extensas áreas de necrose (setas pretas). H&E, 400X.

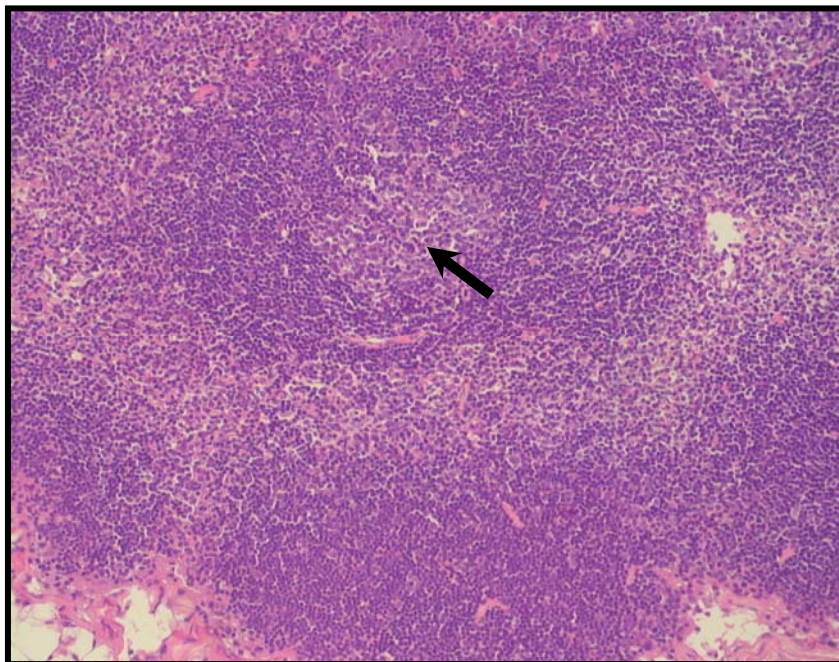


Figura 10. Fotomicrografia do linfonodo braquial de um camundongo portador do tumor de Ehrlich, apresentando hiperplasia reacional com formação de centro germinativo (seta preta). H&E, 260X.

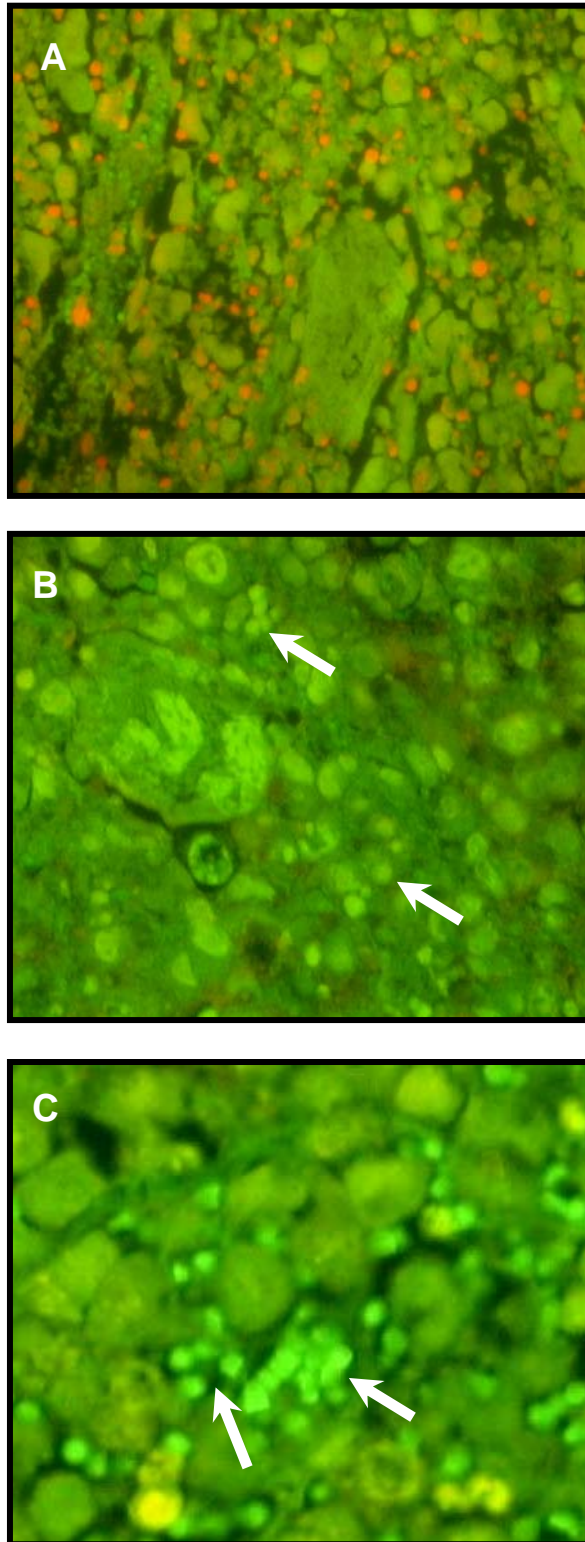


Figura 11. Fotomicrografias do tumor de Ehrlich coradas com laranja de acridina apresentando corpos apoptóticos (setas). A. grupo III (sem tratamento), B. grupo II (tratamento com doxorubicina), C. grupo V (tratamento com dexametasona), 400X.

## 6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, pôde-se concluir que:

- O tratamento com dexametasona aplicada intralesional levou à redução da massa tumoral, apresentando-se como um quimioterápico eficaz para a redução do tumor de Ehrlich.
- O tratamento com doxorubicina *in vivo* não levou à redução da massa tumoral com a dose utilizada de 25mg/m<sup>2</sup> (IV) nos dois ciclos avaliados.
- A utilização da dexametasona e da doxorubicina, no tumor de Ehrlich levou à formação de corpos apoptóticos, evidenciados através da coloração pela laranja de acridina, confirmando a indução de apoptose por estas drogas.
- As análises anatomopatológicas e histológicas do tumor de Ehrlich evidenciaram a intensa quantidade de necrose nesta neoplasia.
- A análise histológica dos linfonodos, com ausência de células características do tumor de Ehrlich, demonstrou o baixo índice metastático deste tumor.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Pela grande facilidade de transplantação, padronização e crescimento rápido do tumor ascítico de Ehrlich, este modelo favorece o estudo de vários quimioterápicos isolados ou em associação tanto *in vivo* quanto *in vitro*.
- Para o estudo de apoptose neste tumor pode-se utilizar outras técnicas como citometria de fluxo *in vitro*, marcação dos quimioterápicos, métodos imunohistoquímicos como PAP e a técnica de TUNEL.
- O tratamento do TAE pela doxorrubicina poderá ter um maior número de ciclos de quimioterapia, com o mesmo intervalo entre eles, para um melhor resultado deste fármaco.
- Iniciar os tratamentos com os quimioterápicos a partir do terceiro dia após a transplantação do tumor poderá favorecer a avaliação do efeito das drogas mais precocemente.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K., LICHMAN, A.H., POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**. 4 Ed. Revinter, 2002, p. 384-403.

ADAM, J.K., ODHAV, B., BHOOLA, K.D. Immune responses in cancer. **Pharmacology and Therapeutics**, v.1, p. 1-20, 2003.

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. **Biologia molecular da célula**. 3ed., Artes Médicas, São Paulo, SP, 1997, P. 1255-1294.

ALTIERI, D. C. The molecular basis and potential role of survival in cancer diagnosis and therapy. **Molecular Medicine**, v. 7, n. 12, p. 1-6, 2001.

ALVARENGA, M. Carcinoma de mama. In: BACCHI, C.E.et al., **Padronização de laudos histopatológicos – Sociedade Brasileira de Patologia**. 2ª ed. Reichmann & Affouso Editores, São Paulo, SP, 1999. Cap. 27, p. 193.

ALVES, R.J. Agentes anti-neoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 976-984, 2002.

AMSTERDAN, A., SASSON, R. The anti-inflammatory of glucocorticoids is mediated by cell type specific regulation of apoptosis. **Molecular Cellular Endocrinology**, v. 189, p. 1-9, 2002.

ANDREEFF, M., GODHICH, D.H., PARDEE, A.B. Cancer Biology: cell proliferation, differentiation and apoptosis. In: BAST, R.C., KUFEL, D.W., POLLOCK, R.E., WEICHSELBAUM, R.R., HOLLANA, J.F., FREI, E., GANSIER, T.S. **Cancer Medicine**. 5th ed. Canadá: BC Decker Inc, 2000. www.pubmed.com

ARIMURA, T., YUASA, A. K., WATUABE, S., SUZUKI, M., KENNED, D.O., YUASA, I.M. Role of intracellular reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction on evening primrose extract – induced apoptosis in Ehrlich tumor cells. **Chemico Biological Interactions**, v. 145, p. 337-347, 2003.

ASHEWELL, J;P., BERGER, N.A., CIDROWSKI, J.A., LANE, D.P., KORSMEYER, S.J. Coming to terms with death: apoptosis in cancer and immune development. **Immunology Today**, v. 15, n.4, p. 147-151, 1994.

ASHIKAWA, K., SHISHODIA, S., FOKT, I., PRIEBE, W., AGGARWALL, B.B. Evidence that activation of nuclear factor KB is essential for the cytotoxic effects of doxorubicin and its analogues. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, p. 353-364, 2004.

AWADA, A., CARDOSO, F., ATALAYA, G., GIULIANI, R., PICCART, M.J. The pipeline of new anticancer agents for breast cancer treatment, 2003. **Oncology and Hematology**, v. 48, p. 45-63, 2003.

BELO, A.V., BARCELO, L.S., FERREIRA, M.A.N., ENNAMANY, R., LEE, W.N.P., BOROS, L.G. Inhibition of inflammatory angiogenesis by distant subcutaneous tumor mice. **Life Science**, v. 74, p. 2827-2837, 2004.

BHATTACHARYYA, A., CHOUDHURI, T., PAL, S., CHATTOPADHYAY, S., DATTA, G.K., SA,D., DAS, T. Apoptogenic effects of black tea on Ehrlich's ascites carcinoma cell. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 1, p. 75-80, 2003.

BIAW, X., MCLHISTER, L.M., SHAO, F., SCHUMACHER, K.R., FENG, Z., PORTER, A.G., CASTLE, V.P., OPIPARIS, A.W. NF- $\kappa$ B activation mediates doxorubicin – induced cell death in n-type neuroblastoma cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 52, p. 48921-48929, 2001.

BLAGOSKLONNY, M. V. Apoptosis, proliferation, differentiation: in search of order. **Cancer Biology**, v. 13, p. 97-105, 2003.

BOHM, I., SHILD, H. Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death. **Molecular Imaging and Biology**, v. 5, n.1, p. 2-14, 2003.

BOLD, R.J., TERMULEN, P. M., MACCONEY, D.J. Apoptosis, cancer and cancer therapy. **Surgical Oncology**, v. 6, n. 3, p. 133-142, 1997.

BONAMIN, L.V., MARTINHO, K.S., NINA, A.L., CAVAGLIA, F. Very high dilutions of dexamethasone inhibit its pharmacological effects in vivo. **British Homeopathic Journal**, v. 90, p. 198-203, 2001.

BONASSA, E.M.A. **Enfermagem em Quimioterapia**. Ed. Ateneu, São Paulo, SP. 2004, 505p.

BOUKET, R.J., OLSON, R.D., BRENNER, D. E., OGUNBUNMI, E.M., INUI, M., FLISCHER, S. The major metabolite of doxorubicin is a potent inhibition of membrane-associated ion pumps. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 33, p. 15851-15856, 1987.

BRAIN, E.G.C., MISSET, J.L., ROUESSE, J. Primary chemotherapy or hormonotherapy for patients with breast cancer. **Cancer Treatment. Rew.**, v. 25, p. 187-197, 1999.

BRASILEIRO, G., GUIMARAES, R.C., BOGLIOLO, L. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: BRASILEIRO, G. **Patologia Geral**. 2 ed. Guanabara Koogan, 1998, p. 148-192.

BROWN, D.G., SUN, X., COHEN, G.M. Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 5, p. 3037-3039, 1993.

BULTGVILIT, B.L., GOKE, R. Programmed cell death protein 4 (pdc4): a novel target for antineoplastic therapy. **Biology of Cell**, v. 95, p. 515-519, 2003.

BUNZ, F. Cell death and cancer therapy. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 1, p. 337-341, 2001.

CASTEELS, K.M., GYSEMANS, C.A., WALL, BOUILLON, R., LAUREYS, M. J.M., DEPOVERE, J., MATHIEU, C. Sex difference in resistance to dexamethasone induced apoptosis in nod mice. **Diabetes**, v. 47, p. 10033-1037, 1998.

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

CHANG, H., JUNG, K., KIM, T. Mitomicin C, doxorubicin and 5-fluorouracil alone in people with curatively resected gastric cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 29, p. 131-133, 2003.

CHARROIS, G.J.R., ALLEN, T.M. Drug release and inferences the pharmacology kinetics biodistribution, therapeutic activity, and toxicity of pegylated liposomal doxorubicin formulations in murine breast cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2004, p. 234-246.

CHAUHAN, D., PANDEY, P., HIDEHIMA, T., ROSEN, S., AVIAHAM, S., KHARBANDA, S., ANDERSON, K.C., TREON, S., RAJI, N., DAVIES, F.E., SHIMAR, Y., TAI, Y. SHP<sub>2</sub> Mediates the protective effect of interleukin-6 against dexamethasone-induced apoptosis in multiple myeloma cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 36, p. 27842-27850, 2000.

CORELTAS, L., STRASSER, A. The role of the Bcl-2 protein family in cancer. **Cancer Biology**, V. 13, p. 115-123, 2003.

COTRANS, R. S., KUMAR, V., COLLINS, T. **Robbins patologia estrutural e funcional**. 6ª ed. Guanabara Koogan, 2000, p.14-22; 233-293.

DAGLI, M.L.Z. Agentes antineoplásicos. In: SPINOSA, H.S., BERNARDI, M.M., GORNEAK, S.L. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 3ª ed. Guanabara/Koogan, 2002, cap. 53, p. 581-595.

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

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

DANESI, R., BRAND, F., FOGLI, S., PAS, T.M., PAOLO,A., EURIGLIANO, G., TACCA,M. Pharmacogenectis of anticancer drug sensivity in non-small cell lung cancer. **Pharmacol. Rev**, v. 55, p. 55-57, 2003.

DEBATIN, K.M. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 53, p. 153-159, 2004.

DECKER, R.H., LEVIN, J., KRAMER,L.B., DAI, Y., GRANTS,S. Enforce expression of the tumor suppressor p53 rendus human leukemia cells (V937) more sensitive to 1-(b-d-arabinofuranosyl) cytosine (ara-c)-induced apoptosis. **Biological Pharmacology**, v. 65, p. 1997-2008, 2003.

DIAS, C.M.G.C. **Efeitos do ácido retinóico e do 17- $\beta$  estradiol sobre linhagem celular humana, derivada de carcinoma de células escamosas**. Belo Horizonte, UFMG, 1994, p.112. Dissertação (Mestrado em Medicina) – Universidade Federal de Minas Gerais, 1994.

DUKE, R., C., OJCIUS, D., M., YOUNG, J., D. Cell suicide in health and disease. **Scientific American**, v. 6, p.48-55, 1996.

EYTAN, G.D., RIGEV, R., ASSARAFAT, Y. G. The role of passive transbilayer drug movement in multidrug resistance and modulation. **The journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 22, p. 12807-12902, 1995.

FHEHN, R. Regeneration versus neoplastic growth. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 8, p. 1439-1444, 1997.

FLIDLER, I. Critical determinants of metastasis. **Cancer Biology**, v. 12, p. 89-96, 2002.

FLORIDE, A., BRUNO, T., MICCADE, S., FREDERICO, A., PAGGI, M.G. Enhancement of doxorubicin content by the antitumor drug lonidane in resistance Ehrlich ascites tumor cell through modulation of energy metabolism. **Biochemical Pharmacology**, v. 56, p. 341-349, 1998.

FRANKLIN, C.C., KREJSA, C.M., PIERCE, R., WHITE, C.C., FAUSTO, N., KAVANAGER, J.J. Caspase 3 dependent cleavage of the glutamate-L cysteine ligase catalytic subunit during apoptotic cell death. **American Journal of Pathology**, v. 160, n.5, p. 1887-1894, 2002.

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.

GAO, G., DOU, P. G1 phase – dependent expression of Bcl-2 mRNA and protein correlates with chemoresistance of human cancer cells. **Molecular Pharmacology**, v. 58, n. 5, p. 1001-1010, 2001.

GENTILE, L.F. **Modulação por PGE<sub>2</sub> no perfil de subpopulações celulares e de citocinas na evolução do tumor ascítico de Ehrlich (TAE)**. Botucatu, UNESP, 2001, 101 p. Dissertação (Mestrado em Medicina) - Universidade Estadual Paulista, 2001.

GRUBER, C., HEUKEL, M., BUDASH, W., BELKA, C., JENDROSSEK, V. Involvement of tyrosine kinase p56/ LCK in apoptosis induction by anticancer drug. **Biochemical Pharmacology**, v. 20, p. 1-14, 2004.

GUERRA, J. L. **Aspectos do processo inflamatório do tumor de Ehrlich**. São Paulo, USP, 1983, p.79. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária e Zootecnia) – Universidade de São Paulo, 1983.

HAMNER, S. **Studies on bcl-2 family apoptosis regulators in nervous system**. Sweden, Acta Universitates Upsalienses, 2000. p. 48. Dissertacion (Doctor Faculty of Medicine). Uppala University, 2000.

HE, H., MUI, T., GROSSAMAN, J., DISTELHOST, C.W. c-FOS degranulation by the proteosome an early, bcl-2 regulated step in apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 39, p. 25015-25019, 1998.

HIDESHIMA, T., CHAUAN, D., ROSEN, S., REED'LL, J. C., KHARBANDA, S., ANDERSON, K.C. Apaf-1/ cytDchrome c- independent an smac-dependent induction of apoptosis in multiple mieloma (MM) cells. **The Journal of Biological chemistry**, v.276, n.27, p. 24453-24456, 2001.

HUANG, P., OLIFF, A. Sinalling pathways in apoptosis as potential targets for cancer therapy. **Cell Biology**, v. 11, n. 8, p. 11-22, 2001.

HUIGSLOOT, M., TIJDENS, I.B., MULDER, G.J., WALTER, B.V. Differential regulation of doxorubicin-induced mitochondrial dysfunction apoptosis by Bcl-2 in mammary adenocarcinoma (MTL313) cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v.227, n. 39, p. 35869-35879, 2002.

JEMAL, A., WARD, E. Cancer statistico, 2003. **Cancer J. Clin.**, v. 53, p.5-26, 2003.

JORDE, L.B., CAREY, J.C., BAMSHAD,M.L., WHITTE, R.L. Genética do cancer. In: **Genética Médica**. Guanabara/Koogan, 2000, cap. 11, p. 197-212.

JUBB, K. V. F.; KENNEDY, N. C. Transmissible venereal tumor canine. **Pathology of Domestic Animals**, press.3, p.452, 1993.

KALIVEND, S., TROTERRUJU, S., ZHAO, H., JOSEPH, J., KALYNARAMAN, B. Doxorubicin-induced apoptosis is associated nitric-oxid syntase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 50, p. 47266-47276, 2001.

KASSEL, O., SCHIMDLIN, F., DUVERENELLE, C., BLAY, F., FROSSAD, N. Up and down-regulation by glicocorticoids of the constitutive expression of the mast cell growths factor sten cell factor by human lung fibroblast in culture., **Molecular Pharmacology**, v. 54, p. 1072-1079, 1998.

KENNEDY, D.O., KOJIMA, A., YANO, Y. Growth inhibitory effect of green tea extract in Ehrlich ascites tumor cells involves cytochrome c release and caspases activation. **Cancer Letters**, v. 166, p. 9-15, 2001.

KHUMB, C. E., JUNIOR, G.B.C. Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína p53 nas neoplasias linfóides. **Revista Brasileira de Hematologia.**, v. 24, n. 2, p. 111-125, 2002.

KIRKIN, V., JOOS, S., ZORNIG, M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1664, p. 229-249, 2004.

KOZLOWSKA, K., CICHOREK, M., MALGORZATA, Z., BROZES,J., WITKOWSKI, M. Heterogeneous susceptibility to spontaneous and induced apoptosis characterizes two related transplantable with different biological properties. **Pigment Cell Res.**, v. 15, p. 233-238, 2002.

KUPERWASSER, C., HURLBUT, G.D., KITTRELL, F.S., DICKSON, E.S., LAUCIRICA, R., MEDINA,D., NABER, S.P., JERRY, J. Development of spontaneous mammary tumors in Balb/C p53 heterozygous mice. **American Journal of Pathology**, v. 157, n. 6, p. 2151- 2159, 2000.

LANE, S.D. p53 from pathway to therapy. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 7, p. 1077-1081, 2004.

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

LEE, S., SCHIMITT, C. Chemotherapy response and resistance. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 13, p. 90-96, 2003.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de Bioquímica**. Ed. Sarvier, São Paulo, SP. 1991, 725p.

LESZCZYNIECKA, M., ROBERT, T., DENT, P., GRANT, S., FISHER, P.B. Differentiation therapy of human cancer basic science and clinical applications. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 90, p. 105-156, 2001.

LEWIS, J.M., TRUONG, T.N., SCHWANTS, M.A. Integrins regulate the apoptotic response to DNA damage through moderation of p53. **Cell Biology**, v.99, n. 6, p. 3627-3632, 2002.

LEYTIN, V., FREEDMAN, J. Plated apoptosis instored plated concentrates and other models. **Transfusion and Apheresis Science**., v.28, p. 285-295, 2003

LI, M., ZHOW, J.. Y., GE, Y., MATHERLY, L.H., WU, G.S. The phosphatase M KP1 is a transcriptional target of p53 involved in cell cycle regulation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 42, p. 41059-41068, 2003.

LITMAN, T., PEDERSEN, S., KRAMHOFT,B., SKOVSGAORD, T., HOFFMAMM,E.K. pH regulation in sensitive and multidrug resistant Ehrlich Ascites tumor cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 8, p. 138-150, 1998.

LORENZO, E., RUIZ, C.R., QUESADA, A.J., HERNANDEZ, A., RIVAS, <sup>a</sup>L., REDONDO, J.M. Doxorubicin induces apoptosis and CD95 gene expression in human primary endothelial cell through a p53 dependent mechanisms. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 29, p. 10883-10892, 2002.

LOTEM, J., KAMA, R., SACHS, L. Supression or induction of apoptosis by opposing pathways dow stream fron calcium activated calcineurin. **Molecular Genects**, v. 96, n. 21, p. 12016-12020, 1999.

LOWE, S.W., LIN, A.W. Apoptosis in cancer. **Carcinogenesis**, v.21, n.3, p.485-495, 2000.

MA, J., GALLO,J.M. Delivery of cytotoxic drugs from carrier cells to tumour cells by apoptosis. **Apoptosis**, v. 3, p. 195-202, 1998.

MACDONNELL, T.J., MEYN, R.E., ROBERTISON, L.E. Implications of apoptotic cell death regulation in cancer therapy. **Cancer Biology**, v. 6, p. 53-60, 1995.

MACGILL., G., FISHER., D.E. Apoptosis in tumorigenesis and cancer therapy. **Frontiers in Bioscience**, v. 2, p. 353-379, 1997.

MACVIE, J.G. Cancer treatment: the last 25 years. **Cancer treatment Reviews.**, v. 25, p. 323-331, 1999.

MALLUCI, L., WELLS, V., DATRIKAS, A., DAVIES, D. Turning cell cycle controller gene into cancer drugs. A role for an antiproliferative cytokine (BGBP). **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 1563-1569, 2003.

MATHIASSEN, I.S., JAATTELA,M. Trigering caspase-independent cell death to combat cancer. **Molecular Medicine**, v. 8, n.5, p. 1-9, 2002.

MATSUZAKI, P., AKISUE, G., OLORIS, S.C.S., DAGLI, M.L., GORNIA, K.S.L. Effect of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on the Ehrlich tumor in its ascetic form. **Life Science**, v. 74, p. 573-579, 2003.

MERCATANTE, D.R., MOHLER, J.L., KOLE, R. Cellular response to an antisense-mediated shift of Bcl-x pre-mRNA splicing and antineoplastic agents. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 51, p. 49374-49382, 2002.

MICOSZ, C.A., BRICKELEY, D. R., SHARKEY, M. S., MORAN, T.W., COZEN, S. D. Glucocorticoid receptor-mediated protection from apoptosis is associated with induction of the serine/ threonine survival kinase gene, *sgk-1*. **The Journal Biological Chemistry**, v. 276, n. 20, p. 16649-16654, 2001.

MOFFATY, J., HASHIMOTO, M., KOJIMA,A., KENNED, D.O., MURAKAMI, A., KOSHIMIZY, K., OHIGASHI,H., YUASA, I.M. Apoptosis induced by acetaxychavicol acetate in Ehrlich ascites tumor cells is associated with modulation. **Carcinogenesis**, v. 21,n. 12 p. 2151-2157, 2000.

OGAWA, M., NISHIURA, T., ORITANI, K., YOSHIDA,H., YOSHIMURA, M., OKAJIMA, Y., I, J., HASHIMOTO,K., MATSUMURA, I., TOMIYAMA, Y., MATSUZAWA, Y. Cytocines prevent dexamethasone-induced apoptosis via the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in a new multiple myeloma cell line. **Cancer research**, v 60, p. 4262-4269, 2000.

OLIVEIRA, S.I., FECCHIO, D., BRUMATTI,G., LANDRAF, R.G., AMARANTE, MG.P., JANCAR, S. Efeito antagonista de PAF no número de células, apoptose, produção de PGE2 e no crescimento do tumor ascítico de Ehrlich (TAE). Instituto de Ciências Biomédicas, USP, **Pôster 236**, 2003.

PAL, S., CHOUDHURI, T., CHATTOPADHYAY,S., BHATTACHAYA,A., DATTA,G.K., DAS,T., SA, G. Mechanisms of ancumin-induced apoptosis of Ehrlich's ascites carcinoma cells. **Biochemical and Bhiophysical Research**, v. 288, p. 658-665, 2001.

PELICAN, H., FENG, L., ZHOU,Y., CAREW,J.S., HILEMAN, E.O., PLUNKETT, W., KEATING, M.J. Inhibition of mitochondrial respiration. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 39, p. 37832-37839, 2003.

PETER, M.E., HEUFELDER,A.E., HENGARTNER,M.O. Advances in apoptosis reaserch. **The National Academy of Sciences**, v.94, p. 12736-12737, 1997.

PODOLSKY, D.K.; WEISER, M.M.; LA MONT, T.; ISSELBACHER, K.J. Galactosyltransferase and concanavalin A agglutination of cells. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 71, n. 3. p. 904-908. 1974.

PRATT, M. A., NIU, M. Bcl-2 controls caspase activation following a p-53-dependent cyclin D1-induced death signal. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 16, p. 14219-14229, 2003.

RAIS, B., COMING, B., PUIGJANER, T., BRNDERS, J.L., CRYPPY, E., SABOUREAU, D. Oxythiamine and dehydroepiandrosterone induce a G1 phase cycle arrest in Ehrlich tumor cells through inhibition of the glucose cycle. **Cancer letters**, v. 456, p. 113-118, 1999.

REED, J.C., WARNER, L. Mechanisms of apoptosis. **American Journal of Pathology**, v.57, n.5, p. 1415-1430, 2000.

RENNER, K., KOFLER, R., GNAIGH, E. Mitochondrial function in glucocorticoid triggered T-ALL cells with transgenic Bcl-2 expression. **Austrian Science**, v. 1, p. 2-5, 2002.

RENNER, C., AMBERGER, A., KONWALINKA, G., KOFLER, R., GNAIGER, E. Changes of mitochondrial respiration content and cell size after induction of apoptosis in leukemia cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 20, p. 1-9, 2003.

RIZZO, M.S. **Colonização preferencial e disseminação do tumor transplantável de Ehrlich em camundongos**. São Paulo, USP, 2000, p.100. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária e Zootecnia) – Universidade de São Paulo, 2000.

RODASKI, S., NARDI, A.B.D. **Quimioterapia antineoplásica de cães e gatos**. 1ª ed. Maio, Curitiba, PR, 2004, 307p.

ROELS, S., TILMANT, K., DUCATELL, R. p53 expression and apoptosis in melanomas of dogs. **Veterinary Science**, v. 70, p. 19-25, 2000.

RONGHE, M., BURKE, G.A.A., LOWIS,S.P., ESTLIN,E.J. Remission induction on therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: clinical and cellular pharmacology of vincristine, corticosteroids, L-asparaginase and anthracyclines. **Cancer Treatment Rew.**, v. 27, p. 327-337, 2001.

RONINSON, I.B., BROUDE, E.V., CHANG, B. It not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. **Drug Resistance**, v. 4, p. 303-313, 2002.

ROSENQUIST, M. 14-3-3 proteins in apoptosis. **Braz. J. Med. Res**, v. 36, n. 4, p. 403-408, 2003.

ROTH, J., LI, P.L., KNIBBBS,R.N., MACCALUM, D.K., SONG, Z. Differential expression of cell surface sialoglycoconyates on wild type and cultured ehrlich tumor cells as revealed by quantitate lectin gold ultrastructural cytochemistry. **Proc. Nate. Acad. Sci.**, v. 91, p. 11353-11357, 1994.

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., SAAD-HOSSNE, W., PRADO, R.G. Efeito da solução aquosa de fenol, ácido acético e glicerina sobre o tumor ascítico de Ehrlich. Estudo experimental in vitro. **Acta Cirúrgica Bras.**, v. 19, n. 1, 2004.

SADZUKA, Y., YAMASHITA, Y., SUGIYAMA, T., SONOBE, T. Efect of dihydrokainate on the antitumor activity of doxorubicin. **Cancer Letters**, v. 179, p. 157-163, 2002.

SAIKA, T., KUSAKA, N., TSUSHIMA, T., YAMATO, T., OHASHI, T., SUYAMA, B., ARATA, R., NASU, Y., KUMON, H., OKAYAMA, G. Treatment of androgen independent apoptosis prostate cancer with dexamethasone a perspective study in stage D2 patients. **International Journal of Urology**, v. 8, p. 290-294, 2001.

SAKLATUALA, J. Glucocorticoids: do we know they work? **Arthritis Research**, v. 4, n. 3, p. 1-5, 2002.

SARASIN, M. An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. **Reviews in Mutation Research**, v. 544, p. 99-106, 2003.

SASSON, R., TAJIMA, K., AMSTERDAM, A. Glucocorticoids protect against apoptosis induced by serum deprivation, cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate and p53 activation in immortalized human granulose cell: involvement of Bcl-2. **Endocrinology**, v. 142, n.2, p. 802-811, 2001.

SHAMNEWGATHASAN, M., JOTHY,S. Apoptosis anoiks and their relevance to the pathobiology of colon cancer. **Pathology International**, v. 50, p. 273-279, 2000.

SHIBATA, H., MATSUBARA, O. Apoptosis independent prognostic indicator squamous cell carcinoma of the esophage. **Pathology International**, v. 51, p. 498-503, 2001.

SHIMADA, K., MATSUYOSHI, S., NAKAMURA,M., ISHIDA,E., KISLI,M., KONISHI,N. Phosphorylation of FADD in critical for sensityve to anticancer drug – induced apoptosis. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 7, p. 1089-1097, 2004.

SCHMITT, F.C. Aspectos básicos em patologia tumoral. In: SCHWARTSMANN, G. **Oncologia Clínica**. Artes Médicas, Porto Alegre, 1991, p. 31-41.

SID, B., SARTELET, H., BELTON, G., BTAOURI, H.E., RATH,G., DELORME, N., HAYE, B., MARTINY, L. Thrombospondin 1: a multifunctional protein implicated in the regulation of tumor growth. **Oncology Hemathology**, v. 49, p. 245-258, 2004.

SILVA, J.F., CORREIA, J.J. Um caso de adenocarcinoma prostático canino de baixa agressividade: estudo dos AgNORs. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v. 98, 2003, p. 139-143.

SLEDGE, G.W., NEWBERG, D., BERNARDO, P., INGLE, J.N., MOTINO, S., ROWINSKY, E.K., WOOD, W.C. Phase III trial of doxorubicin, Paclitaxel, and combination of doxorubicin and paclitaxel as frontline chemotherapy for metastatic breast cancer: an intergroup trial (E1193). **Journal Clin. Oncol.**, v. 21, p. 588-592, 2003.

SOINI, Y., PAHKKO, P., LEHTO, V.P. Histopathological evaluation of apoptosis in cancer. **American Journal of Pathology**, v. 153, n. 4, p. 1041-1053, 1998.

STELL, R.G.D., TORRIE, J.H., DICKEY, D.A. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. 3<sup>a</sup> ed. McGraw-Hill, 1997, 666p.

SU, H., CHENG, W.T.K., CHEN, S., LIN, C., LIEN, H., CHEN, S. Mouse keratinocytes express c98, a novel gene homologous to Bcl-2, that is stimulated by insulin-like growth factor 1 and prevents dexamethasone induced apoptosis: **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1676, p. 127-137, 2004.

SZLOSAREK, P.W., BALLOVILL, F.R. Tumor necrosis factor  $\alpha$ : a potential target for the therapy of solid tumors. **Lancet. Oncology**, v. 4, p. 566-573, 2003.

TERWOGT, J.M.M., SCHELLENS, J.H.M., HUINK, W.W.B., BEIJNEN, J. Clinical pharmacology anticancer agents in relation to for mutations and administration routes cancer. **Treatment Reviews**, v. 25, p. 83-101, 1998.

TIPLATY, C. W., SUMMERFIELD, G. P. Continuous low-dose dexamethasone in relapsed or refractory multiple myeloma. **British Journal of Haematology.**, v. 111, p. 381, 2000.

TORRES, A.C., COURELAS, C.S.S., AFONSO, I.M.S. **Fármacos antineoplásicos e riscos toxicológicos**. Lisboa: UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA – UTL 1999. p 1-15.

TSHANG, W. P., CHAU, S.P.Y., KONG, S.K., FUNG, K.P., KWOK, T.T. Reactive oxygen species mediate doxorubicin induced p53-independent apoptosis. **Life Science**, v. 73, p. 2047-2058, 2003.

VOLSDEN, K.H. Activation of p53 tumor suppressor protein. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1602, p. 47-59, 2002.

WANG, S., KONOREV, E.A., KOTAMRAJU, S., JOSEPHEN, J., KALIVENDI, S. KALYANARAMAN, B. Doxorubicin induced apoptosis in normal mechanisms: intermediacy H<sub>2</sub>O and p53-dependent pathways. **The American Society for Biochemistry and Molecular Biology**, v. 1, p. 1-37, 2004.

WANG, Z., MALONE, M.H., HE, H., MACOLLE, K.S., DISTELHORSTY, C.W. Microarray analysis uncovers the induction of the proapoptotic BH3-only protein BIM in multiple models of glucocorticoid-induced apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 26, p. 23861-23867, 2003.

WEICHSELBAUM, R.R., HOLLAND, J.F., FREI, E., GANSIER, T.S. **Cancer Medicine**. 5 th ed. Canada: BC Decker Inc, 2000.

YOSSEF, J., ELBI, C., WARREN, B., YORTER, D., NAGAUER, R., MOLTENI, A., CUMIUGHAM, M.I., BADR, M. Glucocorticoid like of antihepatocarcinogen protenone are mediated via enhanced serum corticosterone levels: molecular fitting and receptor activation studies. **Journal of Carcinogenesis**, v. 2, n. 2, p. 1-8, 2003.

ZHAUG, M., GUO, R., ZHAI, Y., YANG, D. Light sensitives IFN $\gamma$ - mediated apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells leading to family members. **Cancer Letters**, v. 195, p. 201-210, 2003.

ZHIVOTOVSKY, B., ORRENIUS, S. Apoptosis and cancer: where are and where to go. **Cancer Biology**, v. 13, p. 93-95, 2003.

ZHOU, Y., MEHTA, K.R., CHOI, A.P., SCOLAVINO, S., ZANGI, X. DNA damage-induced inhibition of securin expression is mediated by p53. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n.1, p. 462-470, 2003.

ZHU, Z., JIANG, W., THOMPSON, H.J. Mechanisms by which energy restriction inhibits rat mammary carcinogenesis: in vivo effects of corticosterone on cell cycle machinery in mammary carcinoma. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 7, p. 1225-1231, 2003.

ZORNIG, M., HUEBER, A.D., BAUM, W., EVAN, G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 155, p. 1-37, 2001.

## **ANEXO**

## Anexo 1- MORFOMETRIA DO TUMOR DE EHRLICH

	GI 1ª avaliação	GI 2ª avaliação	GI 3ª avaliação	GI 4ª avaliação
Média	1,00	0,66	0,51	0,49
Mediana	0,90	0,60	0,47	0,40
Variância	0,22	0,08	0,11	0,03
Desvio-Padrão	0,47	0,28	0,33	0,16
Coefficiente de Variação	46,90	41,61	63,42	33,13
Erro-Padrão da Média	0,12	0,07	0,10	0,07

	GIII 1ª avaliação	GIII 2ª avaliação	GIII 3ª avaliação	GIII 4ª avaliação
Média	0,55	0,51	0,56	0,57
Mediana	0,27	0,35	0,57	0,57
Variância	0,44	0,33	0,00029	0,02
Desvio-Padrão	0,67	0,57	0,02	0,13
Coefficiente de Variação	120,46	111,88	3,04	23,78
Erro-Padrão da Média	0,27	0,23	0,01	0,10

	GV 1ª avaliação	GV 2ª avaliação	GV 3ª avaliação	GV 4ª avaliação
Média	1,62	0,73	0,25	0,15
Mediana	1,31	0,75	0,30	0,15
Variância	1,65	0,13	0,02	0,03
Desvio-Padrão	1,28	0,36	0,15	0,18
Coefficiente de Variação	79,30	48,72	58,86	121,91
Erro-Padrão da Média	0,52	0,15	0,07	0,13

	GII 1ª avaliação	GII 2ª avaliação	GII 3ª avaliação	GII 4ª avaliação	GII 5ª avaliação	GII 6ª avaliação
Média	2,45	2,17	3,09	4,69	5,18	5,63
Mediana	2,06	2,40	3,40	4,16	4,95	5,37
Variância	2,63	2,98	1,59	2,32	2,19	3,70
Desvio-Padrão	1,62	1,73	1,26	1,52	1,48	1,92
Coeficiente de Variação	66,35	79,42	40,87	32,50	28,57	34,19
Erro-Padrão da Média	0,42	0,86	0,63	0,54	0,74	0,96

	GIV 1ª avaliação	GIV 2ª avaliação	GIV 3ª avaliação	GIV 4ª avaliação	GIV 5ª avaliação	GIV 5ª avaliação
Média	1,12	1,99	3,92	5,09	5,59	4,85
Mediana	1,10	1,99	3,92	5,11	5,59	4,84
Variância	0,33	0,36	0,43	1,09	0,57	0,03
Desvio-Padrão	0,58	0,60	0,16	1,05	0,76	0,18
Coeficiente de Variação	51,34	30,28	19,21	20,57	13,55	3,65
Erro-Padrão da Média	0,20	0,43	0,31	0,52	0,53	0,13