

CRISTINA MARIA DE SOUZA

**CARCINOMA MAMÁRIO MURINO 4T1: CARACTERÍSTICAS
MORFOLÓGICAS, IMUNOFENOTÍPICAS, BIOQUÍMICAS E
ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS COM TALIDOMIDA/ CARBOPLATINA**

Belo Horizonte

2013

CRISTINA MARIA DE SOUZA

**CARCINOMA MAMÁRIO MURINO 4T1: CARACTERÍSTICAS
MORFOLÓGICAS, IMUNOFENOTÍPICAS, BIOQUÍMICAS E
ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS COM TALIDOMIDA/ CARBOPLATINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Patologia Investigativa
Orientador: Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali
Co-Orientadora: Profa. Dra. Mônica Diniz Ferreira

**Belo Horizonte
Faculdade de Medicina - UFMG
2013**

043

Souza, Cristina Maria de.

Carcinoma mamário murino 4T1: características morfológicas, imunofenotípicas, bioquímicas e ensaios pré-clínicos com talidomida/carboplatina [manuscrito] / Cristina Maria de Souza. – 2013.

138 f.: il. ; 29,5 cm.

Orientador: Geovanni Dantas Cassali. Co-orientadora: Mônica Diniz Ferreira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Neoplasias da mama. 2. Células 4T1. 3. Mamas - Câncer - Teses. 4. Talidomida - Teses. 5. Glândulas mamárias - Câncer - Teses. 6. Neovascularização - Teses. 7. Inflamação - Teses. 8. Imunohistoquímica - Teses. 9. Patologia - Teses. I. Casalli, Geovani Dantas. II. Ferreira, Mônica Alves Neves Diniz. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Medicina. IV. Título.

CDU: 618.19-006.6



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Batesi 191 - sala 531
Belo Horizonte - MG - CEP 31130-000
Fone: (31) 3409-9651 FAX: (31) 3408-6640
http://www.ufmg.br



ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO de **CRISTINA MARIA DE SOUZA**, nº de registro 2009687829. As quatorze horas do dia **1º de março de dois mil e treze**, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de defesa de tese, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG, para julgar o trabalho intitulado: **"CARCINOMA MAMÁRIO MURINO 4T1: CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, IMUNOFENOTÍPICAS, BIOQUÍMICAS E ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS COM TALIDOMIDA/CARBOPLATINA"**, requisito final para a obtenção do grau de doutor em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG - Área de Concentração em Patologia Geral. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Giovanni Dantas Cassali, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final passou a palavra a candidata para apresentação do seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Giovanni Dantas Cassali/Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Mônica Alves Neves Diniz Ferreira/Coordenadora	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Enio Ferreira	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovado</u>
Prof. Luciola da Silva Barcelos	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Prof. Maria Lucia Zaidan Dagi	Instituição: USP	Indicação: <u>aprovado</u>
Prof. Herdge Fukumasu	Instituição: USP	Indicação: <u>Aprovada</u>

Pelas indicações, a candidata foi considerada APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 1º de março de 2013.

Prof. Giovanni Dantas Cassali _____
 Prof. Mônica Alves Neves Diniz Ferreira _____
 Prof. Enio Ferreira _____
 Prof. Luciola da Silva Barcelos _____
 Prof. Maria Lucia Zaidan Dagi _____
 Prof. Herdge Fukumasu _____
 Prof. Rosa Maria Esteves Arantes (Coordenadora) _____

Obs.: Esta documentação tem validade somente a assinatura e o carimbo da Coordenadora

Prof. Rosa Maria Esteves Arantes
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Patologia
Faculdade de Medicina - UFMG

CONFERE COM ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação
Faculdade de Medicina - UFMG

“E assim, depois de muito esperar, num dia como outro qualquer, decidi triunfar...
Decidi não esperar as oportunidades e sim, eu mesmo buscá-las.
Decidi ver cada problema como uma oportunidade de encontrar uma solução.
Decidi ver cada deserto como uma possibilidade de um oásis e
cada noite como um mistério a resolver.
Decidi ver cada dia como uma nova oportunidade de ser feliz.
Naquele dia descobri que meu único rival não era mais que minhas próprias limitações e
que enfrentá-las era a única e melhor forma de superá-las.
Naquele dia, percebi que eu não era o melhor e que talvez nunca tivesse sido.
Deixei de me importar com quem ganha ou perde.
Agora me importa simplesmente saber melhor o que fazer.
Aprendi que o difícil não é chegar lá em cima, e sim deixar de subir;
e que o melhor triunfo é poder chamar alguém de amigo.
Descobri que o amor é mais do que um simples estado de enamoramento,
o amor é uma filosofia de vida.
Naquele dia deixei de ser um reflexo dos meus escassos triunfos passado
e passei a ser uma tênue luz no presente.
Aprendi que de nada vale ser luz e não iluminar o caminho dos demais.
Naquele dia, decidi trocar tantas coisas...
Naquele dia, aprendi que os sonhos existem para tornar-se realidade.
E desde aquele dia já não durmo para descansar...
agora simplesmente durmo para sonhar.”

(Walter Elias Disney)

DEDICATÓRIA

*Ao meu pai Raimundo e minha mãe Maria Inês, com
carinho e gratidão por sempre acreditarem em
mim e me apoiarem incondicionalmente.
Ao meu noivo Jânio: companheiro, amigo e verdadeiro amor.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar o meu caminho e por estar tão perto em todos os momentos, pela vida e inspiração de todos os dias; “*Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida no livro do tempo. Aquilo que colocamos nela corre por nossa conta*” - Chico Xavier.

À minha família: Pai, Mãe, Marcelo e Simone, companheiros de todos os momentos. Em especial ao meu grande amor Jânio, que durante este tempo sempre foi presente, paciente e compreensivo. **Amo vocês!**

Ao meu orientador Prof. Geovanni Cassali por todas as oportunidades concedidas, por toda paciência, bom humor e generosidade. Por fazer do *Laboratório de Patologia Comparada* um ambiente tão agradável de trabalhar e por nos unir numa grande e diversificada família. Agradeço imensamente pelos conselhos, pela amizade e compreensão durante todos os momentos dessa caminhada. Com você aprendi a ser mais forte e sua presença foi essencial nessa jornada. Este trabalho é também fruto da sua dedicação como grande pesquisador. Ah... não poderia deixar de dizer: obrigada por acreditar neste projeto e por não ter desistido de mim.

A minha co-orientadora Mônica Ferreira, um grande exemplo pessoal e profissional. Por ter me acolhido e tão pacientemente me instruiu nos primeiros experimentos. Por ter sido minha mentora, além é claro, de ser uma querida amiga. Os seus ensinamentos serão sempre recordados com zelo.

À professora Míriam Lopez do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, por colaborar tão gentilmente nos ensaios de cultura de célula em seu laboratório e pelas valiosas sugestões durante o decorrer da execução do projeto.

À professora Silvia Passos do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, por ser tão atenciosa e acolhedora. Por possibilitar a realização de diversos experimentos em seu laboratório.

Ao Prof. Remo de Castro e a Profa. Lucíola Barcelos pela ajuda nos experimentos e presente disponibilidade.

À Dra. Gleidice Lavalle e as professoras Míriam Lopez e Milene Alvarenga, pelos proveitosos comentários feitos durante o exame de qualificação. Gleidice, obrigada pelo apoio e incentivo de sempre... você é parte desta conquista!

Ao Prof. Enio pela motivação inicial da carreira docente, por toda atenção, carinho e pelos bons momentos vividos. Sua postura ética e sua carreira profissional são de minha imensa admiração e respeito. Obrigada por tudo!

Aos meus queridos colegas do *LPC*: Conrado, Karine, Cecília, Diego, Linaena, Alessandra, Angélica, Mariana, Wanessa, Liliane, Marina Rios, Nazir, Carol, Sara, Ingrid, Aline, Paulo, Viviane, Gustavo Meirelles, Érica, Renata, Rosy, Poliana, Bruno, Mel, Luciana, Tamara, Clarissa, Giovanna, Ana Maciel, Ana Paula, Yasmin, Fernanda, Jaqueline, Cássio, Bruna, Nicole, Cristiano, Olivia, Luciana, Juliana, Joice, Marina, Sofia. Agradeço a cada um de vocês, pelas várias horas que passamos juntos, as brincadeiras e as colaborações despretensiosas. Aprendi com vocês o quanto é importante trabalhar em equipe, ser tolerante e respeitar as particularidades de cada um.

À Luciana, Tamara, Clarissa, Giovanna e Diego pela disponibilidade no auxílio à exceção do trabalho. Vocês contribuíram não só na execução de uma técnica, mas com uma palavra encorajadora ou mesmo com uma idéia inusitada. Obrigada por tudo!

Em especial gostaria de demonstrar minha gratidão a Ana Cândida, pela ajuda direta e laboriosa nos experimentos. Pela amizade e disponibilidade.

Aos colegas do *LSAT*: Luciana, Kátia, Fernanda, Dalton, Celso, Ariadne. Agradeço por todo carinho ao longo destes anos e por serem tão acolhedores e divertidos.

Aos amigos da Faculdade de Farmácia da UFMG: Elaine, André, Daniel, Samuel, Leonardo, Guilherme, Maria Emília, Raquel, Betânia e Diego pela convivência pra lá de agradável, pelas risadas intermináveis, cumplicidade e carinho que marcaram nossos dias.

Aos amigos do *CDTN*: Prof. Carlos Malamut, Danielle, Priscila, Marina, e Soraya, obrigada por todo apoio, amizade e sentimentos compartilhados!

À Gislene, Mirna, Vânia, Jaqueline, Olinda, por todo o auxílio técnico e amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, por me receberem de maneira tão acolhedora.

A todos os professores e colegas do curso de Pós-Graduação em Patologia, pois com certeza, cada momento foi único e sempre valioso.

Aos agentes financiadores desse projeto: CAPES, CNPq e FAPEMIG.



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Patologia Comparada (LPC), Laboratório de Substâncias Antitumorais (LSAT) e Laboratório de Angiogênese do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, com apoio financeiro do CNPq, FAPEMIG e CAPES.

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
ABREVIATURA E SIGLAS	xviii
LISTA DE ANEXOS	xx
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. JUSTIFICATIVA.....	26
3. HIPÓTESES.....	27
4. OBJETIVOS.....	27
4.1. Objetivo Geral	27
4.2. Objetivos específicos.....	27
5. MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
ARTIGO 1	29
KINETICS OF TUMOR GROWTH, ANGIOGENESIS, INFLAMMATION AND CYTOKINE PRODUCTION IN MICE MAMMARY CANCER 4T1	29
Abstract	30
Introduction	31
Methods	32
Results	37
Discussion	50
References	56
ARTIGO 2	61
THALIDOMIDE ATTENUATES MAMMARY CANCER ASSOCIATED-INFLAMMATION, ANGIOGENESIS AND TUMOR GROWTH IN MICE	62
Abstract	63
Introduction	64
Methods	65
Results	68
Discussion	77
References	79
ARTIGO 3	82
CARBOPLATIN DELAYS MAMMARY CANCER 4T1 GROWTH IN MICE.....	83
Abstract	84
Introduction	85
Material and Methods.....	86
Results	87
Discussion	93
References	95
ARTIGO 4.....	98
COMBINATION THERAPY WITH CARBOPLATIN AND THALIDOMIDE SUPPRESSES TUMOR GROWTH AND METASTASIS IN 4T1 MURINE BREAST CANCER MODEL	98
Abstract	99
Introduction	100
Methods	101
Results	104
Discussion	114
References	116
6. CONCLUSÕES.....	119
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	120
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
9. ANEXOS.....	126
Anexo 1: Protocolo do Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	126
Anexo 2: Instruções aos autores	127
Anexo 3: Produção científica no período de Fevereiro de 2009 a Fevereiro de 2013	133

RESUMO

O carcinoma mamário murino 4T1 é um modelo experimental muito utilizado na avaliação e melhor compreensão da biologia dos tumores. Trata-se de uma linhagem celular altamente tumorigênica e invasiva, onde são observadas metástases em diversos órgãos. O presente trabalho tem como objetivo caracterizar os aspectos morfológicos, imunofenotípicos, bioquímicos e ensaios pré-clínicos com talidomida/carboplatina no desenvolvimento do carcinoma mamário murino 4T1 em camundongos Balb/c. Para a realização deste estudo todos os animais foram inoculados com $2,5 \times 10^6$ células do carcinoma mamário 4T1 no flanco esquerdo (sub-cutâneo). Após a implantação o crescimento do tumor foi acompanhado em diferentes tempos de desenvolvimento de acordo com protocolo de estudo. Morfológicamente, o carcinoma mamário murino 4T1 apresenta proliferação epitelial maligna em arranjo sólido, com proliferação de células pleomórficas e elevado índice mitótico. Os resultados sugerem que nesse tumor experimental o índice mitótico, apoptótico e o número de vasos estão diretamente relacionados com a evolução tumoral. Na análise imuno-histoquímica determinou-se positividade para os receptores hormonais, citoqueratina AE1/AE3, receptores de proliferação celular e marcadores de vasos sanguíneos. Testes bioquímicos também foram realizados com o intuito de avaliar a participação dos processos angiogênicos e inflamatórios na progressão tumoral. Nossos resultados demonstram que citocinas pro-angiogênicas (VEGF), inflamatórias (TNF- α), macrófagos e neutrófilos participam ativamente do desenvolvimento do carcinoma mamário murino 4T1, assim como nas metástases. Com o objetivo de sugerir alternativas de terapias antitumorais, incluindo maior especificidade do agente quimioterápico, baixa toxicidade e possibilidade de associação de drogas, três ensaios foram propostos. Ao avaliar os efeitos do tratamento com talidomida (150 mg/Kg/dia) no crescimento do tumor 4T1 em camundongos Balb/c foi possível observar que a talidomida reduz o desenvolvimento neoplásico ao controlar a neovascularização e recrutamento de células inflamatórias neste tumor. Já administração de carboplatina (100mg/kg) foi capaz de reduzir em 50% o volume do tumor, o número de metástases pulmonares, a taxa de proliferação celular e vascularização dos tumores. Por fim, ao avaliar o efeito da associação talidomida/carboplatina no crescimento do tumor 4T1 foi possível observar que este esquema terapêutico provocou maior redução no tamanho do tumor e no número de metástases pulmonares quanto comparados aos tratamentos isolados e aumento na sobrevivência dos animais.

Palavras-chave: células 4T1, talidomida, carboplatina, glândula mamária, angiogênese, inflamação e imuno-histoquímica.

ABSTRACT

4T1 murine mammary carcinoma is a widely used experimental model in the evaluation and better understanding of tumor biology. This is a highly tumorigenic cell line and invasive and metastasis are observed in several organs. This study aims to characterize the morphological, immunophenotypic, biochemical and preclinical trials with thalidomide/ carboplatin in the development of murine 4T1 mammary carcinoma in Balb/c. For this study all animals were inoculated with 2.5×10^6 4T1 mammary carcinoma cells in the left flank (sub-cutaneous). After implantation tumor growth was monitored at different times of development in accordance with the study protocol. Morphologically, the 4T1 murine mammary carcinoma shows malignant epithelial proliferation in solid arrangement with proliferation of pleomorphic cells and high mitotic index. The results suggest that this experimental tumor mitotic index, and the number of apoptotic vessels are directly related to tumor evolution. The results immunohistochemical analysis demonstrated positive for hormone receptors, cytokeratin AE1/AE3, receptors, and markers of cell proliferation of blood vessels. Biochemical tests were also conducted in order to evaluate the role of angiogenic and inflammatory processes in tumor progression. Our results demonstrate that pro-angiogenic cytokines (VEGF), inflammatory (TNF- α), macrophages and neutrophils participate actively in the development of murine 4T1 mammary carcinoma, and metastases. Aiming to suggest alternative therapies including greater specificity of antitumor chemotherapeutic agent, low toxicity and possible drug combinations, three trials were proposed. When evaluating the effect of treatment with thalidomide (150 mg/kg/day) on tumor growth in mice 4T1 Balb/c was observed that thalidomide reduces neoplastic growth by controlling neovascularization and recruitment of inflammatory cells in the tumor. Already administration of carboplatin (100mg/kg) was able to reduce by 50% the tumor volume and number of pulmonary metastases, the rate of cell proliferation and vascularization of tumors. Finally, to evaluate the effect of combination thalidomide/ carboplatin in 4T1 tumor growth was observed that this treatment regimen caused greater reduction in tumor size and number of lung metastases as compared to isolated treatments and increased survival of the animals.

Keywords: 4T1 cells, thalidomide, carboplatin, mammary gland, angiogenesis, inflammation and immunohistochemical.