

DIEGO CARLOS DOS REIS

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA PROGRESSÃO TUMORAL DO
CARCINOMA MAMÁRIO MURINO 4T1 APÓS O TRATAMENTO COM
DIFERENTES DOSES DE TALIDOMIDA**

**Belo Horizonte
2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG**

FACULDADE DE MEDICINA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA PROGRESSÃO TUMORAL DO
CARCINOMA MAMÁRIO MURINO 4T1 APÓS O TRATAMENTO COM
DIFERENTES DOSES DE TALIDOMIDA**

**Belo Horizonte
2013**

DIEGO CARLOS DOS REIS

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA PROGRESSÃO TUMORAL DO
CARCINOMA MAMÁRIO MURINO 4T1 APÓS O TRATAMENTO COM
DIFERENTES DOSES DE TALIDOMIDA**

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

Orientador: Prof. Dr. Enio Ferreira



Co-orientador: Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali

**Belo Horizonte
2013**

Reis, Diego Carlos dos.
R375a Avaliação da resposta inflamatória na progressão tumoral do carcinoma mamário murino 4T1 após o tratamento com diferentes doses de talidomida [manuscrito]. / Diego Carlos dos Reis. -- Belo Horizonte: 2013.
78f.: il.
Orientador: Enio Ferreira.
Área de concentração: Patologia.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Neoplasias da Mama. 2. Talidomida/uso terapêutico. 3. Talidomida/administração & dosagem. 4. Inflamação. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Ferreira, Enio. II. Cassali, Giovanni Dantas. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.
NLM: QZ 200

Ficha de aprovação

	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA	
---	---	---

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DO ALUNO DIEGO CARLOS DOS REIS

Realizou-se, no dia 17 de dezembro de 2013, às 14:00 horas, Sala de Reuniões do Departamento de Patologia Geral C3 241, ICB, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *Avaliação da resposta inflamatória na progressão tumoral do carcinoma mamário murino 4T1 após o tratamento com diferentes doses de talidomida*, apresentada por DIEGO CARLOS DOS REIS, número de registro 2012652322, graduado no curso de BIOMEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Enio Ferreira - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), Prof(a). Geovanni Dantas Cassali (UFMG), Prof(a). Rosy Iara Maciel de Azambuja (Universidade Federal de São João Del-Rei), Prof(a). Remo de Castro Russo (Universidade Federal de Minas Gerais).

A Comissão considerou a dissertação:

- Aprovada
 Aprovada condicionalmente, sujeita a alterações, conforme folha de modificações, anexa
 Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
 Belo Horizonte, 17 de dezembro de 2013.

Enio Ferreira
Geovanni Dantas Cassali
Rosy Iara Maciel de Azambuja
Remo de Castro Russo

Abay 15/06/2016
 CONFERE COM ORIGINAL
 Centro de Pós-Graduação
 Faculdade de Medicina - UFMG

DEDICATÓRIA

E quando eu resolvi sonhar, por um instante, meus pais acharam que minhas ambições eram grandes demais para minha pequenez. Mas foi então, que, numa bela noite sonhamos todos juntos. Segurando minhas mãos eles diziam: Nada temas, estamos contigo! Hoje eu cresci, o sonho cresceu nosso sonho...

Aos meus pais, Marlene e Geraldo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade da existência nova. A espiritualidade pela sabedoria... A pai Luiz, minha eterna gratidão.

À minha família, aqueles que eu ainda no seio das moradas superiores escolhi e aqui nessa seara de labutas, os que a vida me presenteou. Marlene e Geraldo, pelo amor incondicional. Paulo e Juninho pelo apoio nas horas difíceis, pelos risos nas horas fáceis, pelo nosso amor fraternal. Nosso pequeno Davi, estrela que veio para iluminar nossa vida. Tayla, cunhada e irmã de coração.

Ao Professor Enio, orientador e amigo, pela oportunidade, amizade e dedicação. Por ter acreditado naquele aluno ainda na graduação e hoje pelos momentos intermináveis de correções, auxílios e exemplos. Meu muito obrigado.

Ao Professor Geovanni, pela orientação e oportunidade de trabalho. Pelo exemplo de pessoa batalhadora, simples e competente.

À Cristina, minha gratidão será infinita. Por acreditar em mim, até mesmo quando eu não acreditava. Pela força, companheirismo, palavras amigas...

Aos meus colegas pós-graduandos, Cecília, Cristina, Conrado, Fê, Istéfani, Karinex, Lidianne, Lili e Marina. Agradeço a ajuda e a colaboração de cada um de vocês. As horas do café, os almoços no setorial. A agradável companhia, os risos e as lamentações ao final de cada mês.

Aos alunos de iniciação científica, Giovanna, Sophia, Jaqueline, Emerson, Alice e Bruna Mattos. Pela ajuda, atenção e disponibilidade durante os intermináveis experimentos, imunohistoquímicas e análises. A ajuda de vocês foi essencial ao meu trabalho.

Aos demais alunos, Bruna Morais, Bruna Rabelo, Cássio, Clarissa, Fabiane, Fernanda Freitas, Giovana Mendes, Juliana, Luisa, Rafael e Yasmim, que não acompanharam diretamente meu trabalho, mas colaboraram de maneira gentil e sempre prestativa.

À Nicole e Ana Cândida, pela ajuda e a disponibilidade ao longo dos experimentos.

Às técnicas Gi, Mirna e Jaque, pelos blocos intermináveis e materiais ressecados, todavia vocês sempre prestativas e atenciosas.

À professora Paula Peixoto, as alunas Suzane e Poliana, eu agradeço o tempo dispensado e a disponibilidade para as análises.

Aos meus amigos de Barão de Cocais e Itabira, pela força, companheirismo, em especial agradeço a Rubia Camilo e Clarice Todeschi pela acolhida e me fazer sentir parte de um novo lar. Pricyla, Ludy, Klauder e Everton pelo apoio incondicional ao longo desses anos de amizade.

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

“Na verdade nem deveríamos estar aqui, mas estamos. São como nas grandes histórias. As que tinham mesmo importância. Eram repletas de escuridão e perigo. E, às vezes, você não queria saber o fim... Porque como podiam ter um final feliz? Como podia o mundo voltar a ser o que era depois de tudo isso? Mas, no fim, é só uma coisa passageira, até tudo passar. Um novo dia virá. E, quando o sol brilhar, brilhará ainda mais forte. Eram essas as histórias que ficavam nas lembranças, que significavam algo. Mesmo que você fosse pequeno demais para entender o porquê. Mas acho, que entendo, sim. Agora eu sei. As pessoas dessas histórias tinham várias oportunidades de voltar atrás mas não voltavam. Elas seguiam em frente, porque tinham no que se agarrar.”

The Lord of the Rings



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Patologia Comparada do Departamento de Patologia Geral – ICB / UFMG, com apoio financeiro do CNPq, FAPEMIG e CAPES.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE APÊNDICES	XII
LISTA DE ANEXOS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIV
RESUMO.....	XVII
ABSTRACT	XVIII
1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1. Talidomida: farmacologia, mecanismos de ação e efeitos colaterais	21
2.2. Inflamação e câncer	23
2.3. Tumores experimentais de mama: tumores induzidos e tumores transplantáveis	25
2.4. Talidomida, inflamação e câncer: um potencial terapêutico.....	27
3. JUSTIFICATIVA	29
4. HIPÓTESE.....	30
5. OBJETIVOS	31
5.1. Objetivo Geral.....	31
5.2. Objetivo Específico.....	31
6. MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
Artigo 1: Thalidomide-associated increase in CCL2 and macrophages inhibits lung metastasis in breast cancer model	33
7. CONCLUSÕES FINAIS	57
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
10. APÊNDICES	66

11. ANEXOS 67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da talidomida	1
Figura 2: Esquema do protocolo experimental.....	1
Artigo -Figure 1: Kinetics of 4T1 tumor growth and the effects of systemic administration of thalidomide (50, 100 and 150 mg/kg/day).....	4
Artigo -Figure 2 Anti-proliferative effect of different doses of thalidomide in lung metastases and tumor 4T1.	4
Artigo -Figure 3 . Effect of different doses of thalidomide on angiogenesis of lung metastases and 4T1 tumor.	4
Artigo -Figure 4 Immunomodulatory effect of different doses of thalidomide on cytokines levels of CCL2, TNF- α , and NAG activity in lung metastases (A, B, C) and 4T1 tumor (D, E, F).....	4
Artigo -Figure 5 Confocal immunofluorescence images showing the F4/80 protein expression in macrophages of lung metastases and 4T1 tumor. (B) and (C)	4

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A. Produção científica relacionada à dissertação no período de março de 2012 a dezembro de 2013.....	1
APÊNDICE B. Produção científica não relacionada à dissertação no período de março de 2012 a dezembro de 2013.....	4

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal – CETEA. 1

LISTA DE ABREVIATURAS

bFGF - Fator de Crescimento de Fibroblasto Básico

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CCL2 - Chemokine (C-C motif) ligand 2/Quimiocina (padrão CC) de ligante 2

CD - Cluster of Differentiation

Células NK - Células *Natural Killer*

CETEA - Comitê de Ética em Experimentação Animal

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CO₂ - Dióxido de carbono

d. p. m - Desvio padrão da média

DMBA - 7,12 dimetilbenz(a)antraceno

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO - Dimetil sulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*

ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

FAPEMIG – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais

FDA - *Food and Drug Administration*

FUNED – Fundação Ezequiel Dias do Estado de Minas Gerais

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ - Ácido sulfúrico

HE – Hematoxilina e Eosina

HTAB - *Hexa-1,6-bis-decyltrimethylammoniumbromide*

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IFN- γ – Interferon γ

I.P - Intraperitoneal

kg – Quilo

M – Mol

MCP-1 – Proteína quimiotática de monócitos-1

mg – Miligrama

μ g - Micrograma

MHC-1 – *Major histocompatibility complex* / complexo principal de histocompatibilidade

mL – Mililitro

MPO – Mieloperoxidase

mRNA – *Ácido ribonucleico mensageiro* / Messenger *ribonucleic acid*

Na₂-EDTA – Tetraacetado dissódico de etilenodiamina/Disodium ethylenediamine tetraacetate

Na₃PO₄ . Fosfato trissódico

NaCl – Cloreto de sódio

NAG- N-acetil- β -D-glucosaminidase

NF- κ β - Fator de transcrição nuclear kappa beta

OD – Densidade óptica

PBS – Tampão fosfato-salina

TAM - Macrófagos associados a tumores

TAN – Neutrófilos associados a tumores

TILs -Linfócitos infiltrantes em tumores

TMB – Tetrametibenzidina

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

TVP - Trombose venosa profunda

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

UV – Radiação ultravioleta

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

RESUMO

Dentre as propriedades da talidomida descritas na literatura, além do seu alto potencial antiangiogênico por inibição de fatores de crescimento, é demonstrado sua ação no controle de algumas neoplasias a partir da modulação de células do sistema imune. Embora os mecanismos de ação da talidomida sejam pouco esclarecidos, ensaios clínicos procuram demonstrar o efeito dessa droga no controle neoplásico. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do tratamento com diferentes doses de talidomida na resposta inflamatória associada à progressão tumoral do carcinoma mamário murino 4T1. Suspensão de células 4T1 foi inoculada em camundongos Balb/c para obtenção de tumor sólido. A partir do quinto dia de inoculação tumoral diferentes grupos de animais receberam por via oral 50 mg/kg, 100 mg/kg e 150mg/kg de talidomida, respectivamente, durante 23 dias e, ao vigésimo nono dia de inoculação tumoral os animais foram eutanasiados com a coleta do tumor e pulmão para avaliação do infiltrado inflamatório por microscopia óptica e dosagens das citocinas TNF- α , CCL2/MCP-1 e VEGF, além das enzimas NAG e MPO. Foi observado no tumor primário um aumento de células inflamatórias com padrão mononuclear e distribuídas difusamente na região peritumoral dos animais tratados com as doses de 100mg/kg e 150 mg/kg de talidomida, nas metástases pulmonares a infiltração inflamatória teve um caráter variável entre os grupos, com a maior predominância de células polimorfonucleares. Os níveis de NAG e MPO nas metástases pulmonares demonstraram um significativo aumento nos animais tratados com as maiores doses, resultado não observado no tumor primário. Foi observada uma redução significativa somente nos níveis de MCP-1 e VEGF no tumor primário após o tratamento com talidomida. Entretanto, no pulmão, foi observado um significativo aumento nos níveis de MCP-1 e TNF- α . Os resultados sugerem que a terapêutica com talidomida, quando administrada em maiores doses, possui um efeito antiangiogênico, possivelmente devido à diminuição da infiltração de macrófagos, com redução da secreção de fatores de crescimento. Nas metástases pulmonares a ação da talidomida favorece um perfil pró-inflamatório que pode estar associado a uma resposta do sistema imune as metástases.

ABSTRACT

In addition to the high antiangiogenic potential through inhibition of growth factors, the properties of thalidomide described in the literature also demonstrate control of some neoplasms by modulating the immune system. Although the mechanisms of action of thalidomide are poorly understood, clinical essays search to demonstrate the effect of this drug in neoplasm control. The aim of this work was to evaluate the effect of the treatment with different doses of thalidomide in the inflammatory response associated to tumoral progression of the 4T1 murine mammary carcinoma. A 4T1 cell suspension was inoculated in Balb/c mice in order to obtain a solid tumor. After the fifth day of inoculation, different groups of animals received 50 mg/kg, 100 mg/kg, and 150mg/kg per day of thalidomide through oral administration. Treatment continued for 23 days and on the 29th day following tumor inoculation the animals were euthanized. Primary tumor and lungs were collected for the evaluation of the inflammatory infiltrate through optical microscopy in HE and TNF- α , CCL2/MCP-1, and VEGF cytokines and NAG and MPO enzymes were evaluated. An increase in mononuclear pattern of inflammatory cells was observed in the primary tumor. These cells were diffusely distributed in the peritumoral region of animals treated with 100mg/kg and 150 mg/kg of thalidomide. In the pulmonary metastases the inflammatory infiltrate varied among groups, with polymorphonuclear cells predominating. The levels of NAG and MPO in pulmonary metastases demonstrated a significant increase in animals treated with higher doses, result not demonstrated in the primary tumor. A significant reduction was observed solely in MCP-1 and VEGF levels in the primary tumor following treatment with thalidomide. However, a significant increase in MCP-1 and TNF- α levels was observed in the lung. These results suggest that thalidomide therapy administered in higher doses possesses an antiangiogenic effect, possibly due to a decrease in macrophages reducing growth factor secretion. Thalidomide promoted a proinflammatory profile in pulmonary metastases, which may be associated to an immune system response against metastases.

1. INTRODUÇÃO

A talidomida é um potente fármaco não barbitúrico, sedativo-hipnótico, sintetizado pela *Chemie Grünenthal* em 1954. Em 1956, a talidomida foi introduzida na Alemanha para o tratamento de enjoos matinais em mulheres grávidas. Todavia, sua utilização foi proibida anos seguintes pelo *Food and Drug Administration (FDA)* devido à associação do seu uso ao nascimento de criança com deformações em extremidades distais e órgãos internos (ELEUTHERAKIS-PAPAIKOVOU; BAMIAS; DIMOPOULOS, 2004). Posteriormente, D'Amato *et al.* (1994) demonstraria que a teratogenicidade da talidomida devia-se a inibição do *Basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF), importante fator de crescimento relacionado ao período de formação e desenvolvimento do embrião. Contudo, o mecanismo de ação da talidomida relacionado à teratogenicidade, só foi descrito em 2010, quando a proteína cereblon foi mostrada para ser um alvo terapêutico da talidomida (ITO *et al.*, 2010; STEWART, 2014).

Além dos efeitos teratogênicos, em 1965, a talidomida foi mostrada para possuir ação anti-inflamatória em um paciente com eritema nodoso hansênico. Neste paciente, o emprego da talidomida para o tratamento de sintomas relacionados à falta de sono levou também a inibição do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), principal mediador pró-inflamatório dessa doença (VIANNA *et al.*, 2013). A partir de então, o emprego da talidomida em outras condições inflamatórias crônicas e agudas demonstrou o benefício dessa droga em inibir diversos mediadores inflamatórios e/ou modulando-os, interferindo assim com a resposta imune às agressões (LEE *et al.*, 2004; YASUI *et al.*, 2005; ASANO *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2010; HERNANDEZ *et al.*, 2011; AMIRSHAHROKHI, 2013).

Devido seu alto potencial antiangiogênico, a talidomida também foi avaliada para o tratamento de diversos cânceres, que são altamente dependentes da neovascularização. Seu efeito terapêutico já foi avaliado no mieloma múltiplo (BITTENCOURT *et al.*, 2004), glioma (FINE *et al.*, 2003); glioblastoma multiforme (BAUMANN, 2004) e outros tumores sólidos, como tumor de mama (EISEN *et al.*, 2000), fígado (ESCUDIER *et al.*, 2002) e pâncreas (MAPLES *et al.*, 2004).

A utilização de modelos experimentais na oncologia têm fornecido resultados importantes para avaliação do potencial terapêutico de novos fármacos e também de fármacos já

estabelecidos no mercado. Dentre os modelos experimentais transplantáveis em oncologia mamária destaca-se o carcinoma mamário murino 4T1, que consiste de um adenocarcinoma mamário originado de um camundongo Balb/c fêmea. O tumor 4T1 é uma linhagem altamente tumorigênica e invasiva, que metastatiza espontaneamente para os mesmos tecidos e órgãos que no câncer de mama humano. Sendo assim, este tumor equipara-se na mulher ao câncer de mama de estágio IV, onde se pode encontrar metástase regional e à distância. Os principais órgãos e tecidos acometidos são linfonodos, pulmão, fígado, ossos e cérebro. (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2001).

Diante do exposto, estudos envolvendo os efeitos imunomodulatórios da talidomida tornam-se importantes para melhor compreendermos a sua ação sobre o sistema imune e como este pode atuar sobre o crescimento, progressão e metastatização do câncer de mama.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Talidomida: farmacologia, mecanismos de ação e efeitos colaterais.

Farmacologia

A talidomida é um derivado sintético do ácido glutâmico, contendo dois anéis amidas e um único centro quiral (Figura 1). É encontrada na mistura racêmica de dois isômeros (R) e (S) que apresentam distintas ações farmacológicas. A máxima concentração sérica para uma dose oral de 200 mg é obtida em média de 4 horas e sua hidrólise não enzimática resulta em diversos metabólitos que são reabsorvidos na urina e parte do fármaco é excretado intacto nas fezes. O *clearance* da talidomida é primariamente não renal e o tempo de meia vida dos seus dois isômeros é de 4,6 e 4,8 horas, respectivamente (ELEUTHERAKIS-PAPAIKOVOU; BAMIAS; DIMOPOULOS, 2004; TEO; STIRLING; ZELDIS, 2005).

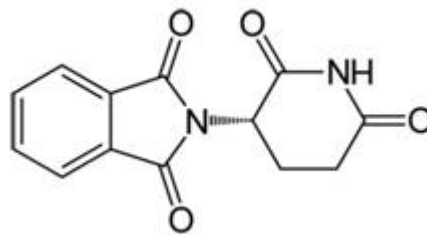


Figura 1: Estrutura química da talidomida.

Mecanismos de ação

Os mecanismos de ação da talidomida permaneceram pouco compreendidos durante meio século, contudo, recentemente o efeito teratogênico da talidomida foi demonstrado para estar associado a sua ligação à proteína cereblon (ITO et al., 2010), assim como de seus derivados imunomoduladores - a pomalidomida e a lenalidomida (ZHU et al., 2011). A proteína cereblon em humanos é codificada pelo gene CRBN. Mutações no gene CRBN é associada com um retardo mental não-sindrômico autossômico recessivo, que possivelmente tem relação com uma desregulação dos canais de sódio-potássio no cérebro. Cereblon forma um complexo proteico com a proteína ubiquitina E3, proteína de ligação ao DNA danificado (DDB1), culina-4A (CUL4-A) e ao regulador de culina (ROC1). Acredita-se que a proteína cereblon se ligue a outros substratos proteicos nesse complexo, orientando esses substratos a

proteólise (LEE et al., 2011). No mieloma múltiplo, a diminuição da expressão de cereblon tem sido mostrada para ser um fator de resistência à terapêutica com talidomida e seus derivados (KORTUM et al., 2015).

Em relação aos efeitos imunomoduladores da talidomida, a sua ação tem sido associada a sua capacidade de inibição da síntese de TNF- α por degradação do seu ácido ribonucleico mensageiro (*mRNA*) (MOREIRA et al., 1993) e do bloqueio do fator de transcrição nuclear kappa b (NF- κ B) (LIN et al., 2006; HERNANDEZ et al., 2011), além de regular negativamente moléculas de superfície celular (PENG et al., 2006) e de ativar linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+ (HASLETT et al., 1998).

Efeitos colaterais

A talidomida é sabidamente um fármaco com potencial teratogênico, portanto sua utilização em gestantes é contraindicada. Homens em terapêutica com talidomida também são aconselhados a utilizar preservativo durante as relações sexuais, devido à capacidade de eliminação do fármaco de forma intacta no esperma (ELEUTHERAKIS-PAPAIKOVOU; BAMIAS; DIMOPOULOS, 2004).

Como a talidomida foi introduzida, a princípio, devido ao seu potencial sedativo, efeitos colaterais com sedação são encontrados após sua utilização. Esses efeitos são facilmente minimizados com a administração da talidomida cerca de 3-4 horas antes de dormir. A constipação é frequentemente associada após sua utilização e pode ser minimizadas com o uso de laxantes e a ingestão de muitas fibras. Ressecamento da pele e prurido podem também ser observados, sendo facilmente minimizadas com cremes hidratantes sem álcool e por fim lesões mais graves de pele são menos comuns (ELEUTHERAKIS-PAPAIKOVOU; BAMIAS; DIMOPOULOS, 2004).

A trombose venosa profunda (TVP) e neuropatia periférica são os efeitos colaterais mais graves, que estão diretamente associados ao aumento de dose desse fármaco (CARRIER et al., 2011; ROBAK et al., 2012). O aumento de plaquetas e a ativação de fatores coagulantes foram demonstrados nesses pacientes (HOSHI et al., 2011).

2.2. Inflamação e câncer

Nas repostas teciduais a lesões, uma rede complexa de mediadores são produzidos e células inflamatórias são recrutadas para o sítio de lesão no intuito de combater o agente causal. Leucócitos ativados (eosinófilos, neutrófilos e monócitos) migram dos vasos sanguíneos para os tecidos em resposta aos mediadores inflamatórios. O endotélio passa a expressar mais moléculas de superfície para facilitar a adesão, rolamento e diapedese dos leucócitos. A matriz extracelular com seus fibroblastos e células estromais, fornecem o meio de sustentação para os leucócitos migrarem para os sítios de lesão. Neutrófilos geralmente são as primeiras células efetoras encontradas nos sítios inflamatórios, em seguida, monócitos deixam os vasos e se diferenciam em macrófagos teciduais. Mastócitos também possuem um papel importante nas respostas inflamatórias, com a produção de diversos mediadores inflamatórios, como histamina, citocinas e proteases, além de diversos mediadores lipídicos (COUNSSENS; WERB, 2002).

O balanço na produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento em ambientes de lesão tecidual são eventos cruciais para a geração, manutenção e resolução dos processos inflamatórios. Em inflamações crônicas, onde se observa uma persistência na manutenção do processo inflamatório, sendo decorrente ou não da presença do agente lesivo, por vezes, é observado um risco elevado ao surgimento de câncer. A ideia de que a inflamação esteja associada ao surgimento de câncer é antiga, foi em 1863 que Rudolf Virchow associou a infiltração de células inflamatórias a tecidos neoplásicos em sítios de inflamação crônica (BALKWILL; MANTOVANI, 2001; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010). Hoje é estimado que pelo menos 25% de todos os cânceres encontram-se associados com infecções e reações inflamatórias (EIRO; VIZOSO, 2012).

A inflamação aguda e crônica pode ser um agente causal para o desenvolvimento de uma variedade de cânceres, quanto mais à inflamação persistir maior será o risco de câncer. Neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos são vistos para produzir os fatores solúveis necessários para a proliferação das células neoplásicas, todavia as próprias células neoplásicas também são capazes de produzir esses fatores (MANTOVANI, 2009; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010).

Os mediadores inflamatórios incluem os metabólitos do ácido araquidônico, citocinas, quimiocinas e os radicais livres. A exposição crônica a esses mediadores leva ao aumento da proliferação celular, ativação de oncogenes e angiogênese com redução ou perda do controle do crescimento normal celular. Modelos animais fornecem evidências experimentais de que a inflamação crônica pode promover o câncer e também elucidam os mecanismos envolvidos na carcinogênese experimental (SHACTER; WEITZMAN, 2002).

O sistema imune possui um papel importante durante todas as etapas de carcinogênese (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010). A tentativa de combate às células transformadas, que possuem um fenótipo alterado, é detectada a partir da expressão de marcadores moleculares ou marcadores antigênicos que são reconhecidos pelas células imunes efectoras com consequente destruição. Células *Natural Killer* (NK), componente efector importante da imunidade inata, reconhecem essas células transformadas e as destroem por citotoxicidade direta ou também, pela produção de interferon- γ (IFN- γ) que ativam as células da imunidade adaptativa (linfócitos T e B) que irão combater as células neoplásicas (KAWAMATA *et al.*, 2006; DEWAN *et al.*, 2007).

O reconhecimento de clones celulares neoplásicos pelo sistema imune com sua posterior destruição é denominado imunovigilância. A imunidade inata e adaptativa fornecem os sistemas necessários para o controle do surgimento dos cânceres. Todavia, muitas células neoplásicas adquirem mecanismos de escapes tumorais, como a perda de expressão de MHC-I e/ou a secreção de substâncias que recrutam determinados perfis celulares que possuem características imunossupressoras (LIM *et al.*, 2010). Dentre essas células, os linfócitos T regulatórios e macrófagos polarizados do tipo M2 são demonstrados por favorecer o crescimento neoplásico, pela imunossupressão de linfócitos T citotóxicos CD8+, linfócitos T helper CD4+ e células NK e também da secreção de fatores de crescimento (REZENDE *et al.*, 2010; BISWAS; ALLAVENA; MANTOVANI, 2013; TANG, 2013).

Além disso, tumores estabelecidos produzem diversos mediadores que alteram o microambiente neoplásico. Esses quimiotratantes recrutam leucócitos específicos, que resultam em um ambiente favorável ao crescimento neoplásico (SHACTER; WEITZMAN, 2002). De maneira contrária, a infiltração de células inflamatórias nos tumores também se correlaciona com um fator antineoplásico em diversas neoplasias (KIM *et al.*, 2011; LIM *et al.*, 2010; RUFFELL *et al.*, 2011). Em tumores de mama, a presença de linfócitos infiltrantes

em tumores (TILs) correlaciona com fator prognóstico favorável, outros tumores como o câncer de ovário a infiltração de células inflamatórias é correlacionado com pior prognóstico e maiores taxas de proliferação neoplásica (NESS; COTTREAU, 1999; MACCIÓ; MADEDDU, 2012). Diante disso, a inflamação nos diversos cânceres tem demonstrado prognóstico variável, principalmente relacionado ao perfil das células encontradas (BOHLING; ALLISON, 2008; ESTRELA-LIMA *et al.*, 2010; TINDAL *et al.*, 2010; SHIELS *et al.*, 2013).

2.3. Tumores experimentais de mama: tumores induzidos e tumores transplantáveis

Modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* têm sido bastante utilizados na oncologia a fim de se conhecer os mecanismos envolvidos durante todas as etapas da carcinogênese, desde a iniciação, promoção, progressão e disseminação metastática (WATANABE *et al.*, 1992; BURDALL *et al.*, 2003; BARROS *et al.*, 2004).

Os modelos experimentais *in vivo* utilizados podem ser obtidos através da indução por algum agente carcinogênico, capaz de induzir a transformação neoplásica, ou a inoculação de células neoplásicas já estabelecidas em cultura celular (HENNIGHAUSEN, 2000; PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2001; BARROS *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2007).

O risco de desenvolvimento de câncer após a exposição a determinadas substâncias forneceram os primeiros dados da carcinogênese humana (WAALKES, 2000). Os modelos experimentais de indução com carcinógenos já bem estabelecidos vieram a esclarecer as transformações celulares fenotípicas e genotípicas ocorridas até o surgimento dos cânceres (IMAOKA *et al.*, 2013).

Diversos agentes ou substâncias são capazes de induzir alterações no DNA celular. Substâncias químicas, vírus e radiação UV são os principais indutores de transformação celular (IMAOKA *et al.*, 2013). Dentre os modelos experimentais oncológicos, a indução de tumores de mama pelo 7,12 dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) consiste de um modelo bastante utilizado para os estudos de carcinogênese, biologia dos tumores e avaliação de fármacos com potencial antineoplásico. O DMBA quando administrado em cobaias é metabolizado em diversos tipos de tecidos, os éxidos formados, são os metabólitos ativos capazes de lesar o DNA das células, sendo o principal evento de iniciação da carcinogênese. As lesões neoplásicas originadas na mama de ratas após a administração com DMBA

compara-se, em humanos, com neoplasias originadas nas unidades ducto-lobulares, validando assim o modelo utilizado (BARROS *et al.*, 2004).

O estabelecimento do cultivo das células neoplásicas *in vitro* possibilitou os diversos estudos das alterações genéticas ocorridas nas células transformadas. Além disso, muitos testes farmacológicos foram realizados nessas células para a avaliação do potencial terapêutico antineoplásico dessas drogas. Bastante empregadas na pesquisa, os cultivos celulares possuem as vantagens da fácil manipulação e constituem uma fonte de replicação quase infinita, além de possuir um elevado grau de homogeneidade (BURDALL *et al.*, 2002). Contudo, o ambiente *in vitro*, embora bastante controlado, não fornece a complexidade de um organismo vivo. Diante disso, modelos de oncologia experimental transplantáveis são utilizados afim de melhor mimetizar os cânceres ocorridos em humanos.

Assim, células de culturas primárias humanas são amplamente empregadas nas pesquisas. As células MCF-7 cultivadas a partir de efusão pleural de uma paciente com câncer de mama, caracterizada pela *Michigan Cancer Foundation*, atualmente consiste no perfil celular mais empregado na oncologia (BURDALL *et al.*, 2002), juntamente com outros cultivos celulares, tais como ZR-75-30, T-47D e MDA-MB-231 (ENGEL; YOUNG, 1978; SHEN *et al.*, 2009). A inoculação das células neoplásicas no tecido subcutâneo em camundongos nude (xenotransplante) possibilita a proliferação celular em um ambiente *in vivo*, uma vez que não ocorrerá rejeição. Os tumores se formam no local de inoculação, as células neoplásicas proliferam de forma similar o que ocorre em humanos, fornecendo assim um modelo adequado para os estudos de oncologia (SHEN *et al.*, 2009).

Tumores mamários também surgem espontaneamente em algumas espécies de animais, como cães, ratos e camundongos (BARROS *et al.*, 2004). O cultivo celular dos tumores primários dessas espécies também podem fornecer dados importantes sobre a carcinogênese mamária.

O tumor de Ehrlich, um tipo de tumor transplantável utilizado para avaliações experimentais, é uma neoplasia de origem epitelial maligna, correspondente ao adenocarcinoma mamário de camundongos, que cresce na forma sólida quando implantado por via subcutânea ou na forma ascítica quando inoculado no peritônio (DAGLI, 1989; DAGLI *et al.*, 1992a; DAGLI *et al.*, 1992b). O tumor de Ehrlich é reconhecido por apresentar uma forte resposta imune antitumoral, a ascite é provavelmente formada em consequência da inflamação induzida pelo

tumor, devido o aumento da permeabilidade vascular peritoneal (FASTAIA; DUMONT, 1976). A resposta imune efetiva desse tumor necessita de uma interação forte entre macrófagos, linfócitos T e linfócitos B. Entretanto este modelo apresenta baixas taxas de metástases distantes, tornando-o um modelo pouco interessante no estudo de progressão tumoral sistêmica (PELERMO-NETO; MASSOCO; SOUZA, 2003).

Outro modelo experimental muito explorado é o carcinoma mamário murino 4T1, que consiste de uma neoplasia transplantável de origem murina com alto potencial invasivo e metastático, correspondente ao câncer de mama da mulher de estágio IV (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2001). Vários estudos com esse modelo têm demonstrado resultados sobre o comportamento tumoral, terapêutica antineoplásica, além de avaliações de novos métodos diagnósticos mais eficazes para o estudo de metástases (GHAGHADA, K. B. *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2013).

As metástases do carcinoma mamário murino 4T1 ocorrem a partir da segunda semana de inoculação tumoral, os principais órgãos acometidos são linfonodos, pulmão, fígado, ossos e cérebro (BALIGA *et al.*, 2005). Em cânceres humanos, a taxa de metástases correlaciona com um fator prognóstico negativo nas pacientes diagnosticado com câncer de mama, com redução de sobrevida, maior mortalidade e morbidade. A redução do índice metastático é um fator importante nas terapias antineoplásicas (STEEG, 2006).

2.4. Talidomida, inflamação e câncer: um potencial terapêutico.

Devido à alta incidência do câncer, à letalidade e à morbidade das pacientes, os estudos de fármacos antineoplásicos consistem em uma das principais pesquisas envolvendo os modelos murinos oncológicos. A síntese de novos fármacos, no entanto, é um processo demorado e oneroso, devido às várias etapas que se seguem até comercialização. Com isso os estudos com fármacos com potencial antineoplásicos já existentes são estimulados a fim de minimizar os gastos dos testes pré-clínicos e clínicos e também disponibilizar mais rapidamente os fármacos para utilização.

A talidomida é um fármaco que já foi demonstrado para possuir potencial terapêutico em diversas doenças neoplásicas (BAUMANN, 2004; EISEN *et al.*, 2000) e não neoplásicas (BOUSCARY *et al.*, 2005; ASANO *et al.*, 2010). Atualmente na oncologia, seu uso é

indicado para casos de recidiva de mieloma múltiplo como monoterapia ou em associação com outras drogas (ROBAK; TRELINSKI; CHOJNOWSHI, 2012).

O potencial antineoplásico da talidomida é associado principalmente a sua atividade antiangiogênica. A redução na síntese de VEGF e bFGF, já foi demonstrado após múltiplos tratamentos com talidomida, com consequente redução da neovascularização tumoral (BELO *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2012). Contudo seu potencial anti-inflamatório e imunomodulador demonstrou também ser um mecanismo eficaz para o combate do crescimento neoplásico (KAWAMATA *et al.*, 2006).

No tratamento do carcinoma mamário murino 4T1, a talidomida já demonstrou ser eficaz na redução tumoral, através da diminuição da angiogênese e a inflamação tumoral (SOUZA *et al.*, 2012). A associação da talidomida com outros fármacos demonstrou ser também uma alternativa eficaz no controle neoplásico (SOUZA *et al.*, 2013). Sabendo-se da importância das células inflamatórias associada ao desenvolvimento neoplásico, fármacos com capacidade imunomodulatórias são vistas para ser possíveis alvos terapêuticos antitumorais. Nesse contexto, a talidomida já demonstrou resultados promissores, por ativar e estimular células *NK* no combate de células neoplásicas em paciente com mieloma múltiplo refratário (DAVIES *et al.*, 2001; KAWAMATA *et al.*, 2006). Em outras condições não neoplásicas a talidomida demonstrou efeito na coestimulação de linfócitos T (HASLETT *et al.*, 1998), além de também atuar sobre diversos perfis de citocinas que estão diretamente associados à ativação e modulação das células do sistema imune (LEE *et al.*, 2004; YASUI *et al.*, 2005; ASANO *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2010; HERNANDEZ *et al.*, 2011; AMIRSHAHROKHI, 2013), o que sugere a ação desse fármaco sobre outros perfis celulares. O aumento de leucócitos circulantes também foi demonstrado após o tratamento com talidomida, sugerindo um evento importante na resposta imune antitumoral (REIS *et al.*, 2014). Contudo, os estudos são escassos avaliando o efeito da talidomida sobre o infiltrado inflamatório associado ao desenvolvimento neoplásico do carcinoma mamário murino 4T1, o emprego de diversas doses sem critérios bem definidos dificultam também a avaliação e comparação dos achados terapêuticos desse fármaco.

3. JUSTIFICATIVA

O câncer de mama constitui uma importante doença em humanos e animais domésticos, sendo responsável por elevadas taxas de mortalidade e morbidade. É bem compreendido que a disseminação das células cancerosas para outros sítios, processo esse conhecido como metastatização, corresponde um passo importante para a redução da eficácia terapêutica e diminuição da sobrevida do paciente oncológico. As metástases resultam de diversos processos sequências, altamente complexos, não aleatórios e órgão seletivo. No câncer de mama, uma das principais causas de morte em todo o mundo por câncer e principal causa entre as mulheres, os órgãos prediletos para sítios de metástases são pulmão, fígado, cérebro e ossos.

Devido à alta taxa de mortalidade e morbidade relacionada às metástases do câncer de mama, sobretudo as metástases pulmonares, os estudos em oncologia experimental avaliando o efeito terapêutico de fármacos com ação sobre o sistema imune tornam-se justificáveis, uma vez que é bem documentado o papel dual das células inflamatórias infiltradas nos sítios tumorais, podendo essas, então, exibir efeito anti-tumoral ou pró-tumoral. Assim, nesse contexto se situa o presente projeto, que teve por objetivo avaliar o efeito da terapêutica com diferentes doses de talidomida no infiltrado inflamatório associado ao tumor primário e metástases pulmonares do carcinoma mamário murino 4T1.

4. HIPÓTESE

A talidomida inibe o crescimento metastático do carcinoma mamário murino 4T1 associada a uma imunomodulação de células inflamatórias infiltradas no tumor primário e suas metástases pulmonares.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da talidomida, em diferentes doses, no comportamento inflamatório associado à progressão neoplásica metastática do carcinoma mamário murino 4T1.

5.2. Objetivos específicos

- Avaliar os parâmetros clínicos hemograma completo, perfil bioquímico e peso dos camundongos inoculados com o carcinoma mamário murino de células 4T1 submetidos ao tratamento com talidomida nas doses de 50mg/kg, 100mg/kg e 150mg/kg.
- Avaliar o crescimento do carcinoma mamário murino de células 4T1 em camundongos submetidos ao tratamento com talidomida nas doses de 50mg/kg, 100mg/kg e 150mg/kg.
- Quantificar o índice proliferativo das células neoplásicas no tumor primário e metástases pulmonares do carcinoma mamário murino 4T1 submetidos ao tratamento com talidomida nas doses de 50mg/kg, 100mg/kg e 150mg/kg.
- Quantificar o número de vasos no tumor primário e metástases pulmonares do carcinoma mamário murino 4T1 submetidos ao tratamento com talidomida nas doses de 50mg/kg, 100mg/kg e 150mg/kg.
- Avaliar os níveis de NAG, MPO, TNF- α , CCL2/MCP-1 e VEGF nas amostras de tumor primário e metástases pulmonares do carcinoma mamário murino 4T1 em camundongos submetidos ao tratamento com talidomida nas doses de 50mg/kg, 100mg/kg e 150mg/kg.
- Caracterizar o comportamento inflamatório tecidual associado ao tumor primário e as metástases pulmonares do carcinoma mamário murino submetidos ao tratamento com talidomida nas doses de 50mg/kg, 100mg/kg e 150mg/kg.

6. MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estes tópicos serão apresentados na forma de um artigo científico. O presente artigo foi submetido ao periódico *Pathology, Research and Practice* (Anexo B).

Thalidomide-associated increase in CCL2 and macrophages inhibits lung metastasis in breast cancer model

Diego Carlos dos Reis^a, Sophia Gia Brandão Pinto^a, Ana Cândida Araújo e Silva^b, Giovanna Vieira Moreira^a, Emerson Soares Veloso^a, Liliane Cunha Campos^a, Paula Peixoto Campos^c, Sílvia Ligório Fialho^d, Miriam Teresa Paz Lopes^b, Michele Angela Rodrigues^{a,e}, Dawidson Assis Gomes^e, Enio Ferreira^{a*}, Geovanni Dantas Cassali^{a**^}

a Department of General Pathology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 31270-901, Brazil.

b Department of Pharmacology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 31270-901, Brazil.

c Department of Physiology and Pharmacology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 31270-901, Brazil.

d Pharmaceutical and Biotechnological Development, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, 30.510-010, Brazil.

e Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 31270-901, Brazil.

* These authors contributed equally to this work.

Correspondent author: Geovanni D. Cassali, Department of General Pathology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Antonio Carlos Avenue, 6628, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil. cassalig@icb.ufmg.br

Abbreviations

μL	Microliter
ALT	Alanine aminotransferase
AST	Aspartate aminotransferase
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FBS	Fetal bovine serum
FFPE	Formalin-fixed, paraffin-embedded
GGT	γ-glutamyl transferase
HE	Hematoxylin and Eosin
HTAB	Hexa-1,6-bis-decyltrimethylammoniumbromide
M	Mol
MCP	Chemoattractant protein-1
mL	Millilitre
MPO	Myeloperoxidase
NAG	N-acetylglucosaminidase
Nm	Nanometer
°C	Degree Celsius
OD	Optical Density
pg	Picogram
SEM	Standard Error of the Mean
THD	Thalidomide

Abstract

The potential immunomodulatory effect of thalidomide (THD) has been studied as an important strategy in the treatment of multiple myeloma, melanoma, and liver carcinoma. In this paper, the effect of administering different doses of THD in mice with murine mammary carcinoma 4T1 is assessed, identifying cell proliferation rates, angiogenic and inflammatory behavior present in the primary tumor, and lung metastases in these animals. For this, Balb/c mice were inoculated with 2.5×10^6 cells of 4T1 tumor and divided into three groups according to the daily dose of THD received (50 mg/kg, 100 mg/kg, and 150 mg/kg). The animals were treated from the fifth to the twenty-eighth day of tumor development, with subsequent euthanasia and collection of peripheral blood, the primary tumor, and lung. Treatment with THD at a dose of 150mg/kg significantly reduced the growth of 4T1 tumor. Histologic, morphometric, immunohistochemical, and immunofluorescence analyses of the primary tumor showed an increase in inflammation, reduction in the neoplastic areas, decreased neoplastic proliferative rate, and reduction of tissue macrophages in response to increased concentrations of THD. In lung metastases, a reduction in the neoplastic proliferative rate and in the number of vessels was observed, with an increase in NAG, CCL2, TNF- α levels and the number of macrophages in response to increased concentrations of THD. These results open perspectives for the immunomodulatory and antitumor effects of THD according to the tumor site and doses studied, particularly in relation to the immunomodulatory role of thalidomide in the recruitment and activation of tumor-associated macrophages.

Keywords: cancer, immunomodulatory therapy, mouse model of disease, inflammation, tumor-associated macrophages

1. Introduction

Thalidomide (THD) was introduced in Europe for the treatment of morning sickness in pregnant women, but from the 1960s, its use was banned in several countries because of its teratogenic potential [1]. However, several clinical trials have shown the effect of thalidomide in controlling multiple myeloma, glioblastoma multiforme, solid tumors, and hematologic malignant tumors [2]. It is suggested that this antineoplastic behavior is related to its immunomodulatory and anti-angiogenic capacity [1,3]. It has been observed that the use of THD promotes inhibition of inflammation, angiogenesis, and neoplastic proliferation in murine models [4,5,6].

In this context, inflammatory cells and their chemical mediators are important components in the tumor microenvironment, which may act on different mechanisms in the growth, progression, and metastasis of tumors [7,8,9,10]. The production of several cytokines, chemokines, and other substances with different actions on the neoplastic cells have been observed in the tumor microenvironment in response to multiple inflammatory stimuli, such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α) expression, inducing apoptosis and promoting cell proliferation, angiogenesis, and metastasis [11]. Other important processes are vascular endothelial growth factor (VEGF) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) synthesis. VEGF has an angiogenic function and increases vascular permeability in the tumor microenvironment, in addition to mediating signaling of tumor cells, contributing to tumorigenesis, and acting as a chemotactic factor for macrophages [12,13]. CCL2 exerts a potent chemoattractant and stimulating action with a mitogenic effect on mononuclear cells [14,15].

Thus, studies with experimental models attempt to demonstrate the immunomodulatory action of THD as an effective therapeutic strategy in oncology [6,16]. Among these experimental oncology models is the murine mammary carcinoma 4T1, a highly tumorigenic and metastasizing transplantable line that has been used as a reference when assessing the treatment of advanced breast cancer corresponding to stage IV of human breast cancer [17]. Previous studies [5,6,18] have shown the effect of THD inhibiting cell proliferation, modulating angiogenesis and inflammation associated with the development of the primary tumor 4T1. However, the relationship between the dose of thalidomide and its role on these behaviors has not been well defined, nor has the influence of the drug on the pulmonary metastatic potential in this experimental model.

In light of the importance of the inflammatory response associated with neoplastic development and the known role of THD in immunomodulation of the tumor immune response, this study aims to evaluate the effect of different doses of THD on the inflammatory response associated with the development of metastatic murine mammary carcinoma 4T1. This study evaluated the neoplastic growth and inflammatory and angiogenic

responses in primary tumors and lung metastases of mammary carcinoma 4T1 cells in mice undergoing THD treatment at doses of 50 mg/kg, 100 mg/kg, and 150 mg/kg.

2. Materials and Methods

2.1. Cell culture

Mouse breast cancer cell line 4T1 was purchased from American Type Culture Collection (Manassas, USA). 4T1 cells were maintained in RPMI 1640 medium (Hyclone, Logan, UT) containing 10% FBS. The cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

2.2. Mice and Experimental protocol

The study was conducted in accordance with ethical principles for the use of animals in animal testing and after approval by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA/UFMG) under protocol number 262/2012.

Thirty-two female BALB/c mice were used, 45 days old, weighing \pm 20g, from the vivarium of the UFMG Institute of Biological Sciences. The animals were divided into four groups (n=8) and kept in cages with unlimited access to water and a balanced commercial brand of feed and artificially controlled lighting cycles (12 hours light/12 hours dark).

Initially, all animals were inoculated with 4T1 tumor cells (2.5×10^6) subcutaneously in the left flank area. Three groups of animals received 100 μ l of THD (Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Brazil) diluted in saline and 0.25% Tween® (Dako, Carpinteria, USA) at concentrations of 50 mg/kg, 100 mg/kg, and 150 mg/kg orally (gavage) in an independent manner, from the fifth day of tumor inoculation until the twenty-eighth day, 24 hours apart. The control group animals received 100 μ l of saline (0.9%) + Tween during the same period. The animals were weighed and the primary tumor measured every 48 hours. Tumor volume was calculated using the formula: tumor volume (mm³) = (length x width)²/2 [19]. On the twenty-ninth day of inoculation, all animals were euthanized by anesthetic overdose (sodium pentobarbital 50 mg/kg via IP) with whole blood collected in a dry tube (Vacuette®, Brazil) and blood test tubes (EDTA, Vacuette®, Brazil), for biochemical evaluation of urea, creatinine, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and γ -glutamyl transferase (GGT) and complete blood count (CBC), respectively, in addition to the completion of necroscopic examination for primary tumor and lung collection. Blood smears were made and stained with May-Grunwald-Giemsa for differential evaluation of leukocytes through an optical microscope Olympus BX50, 40x. The primary tumor and lung were collected and weighed for histopathological, biochemical and cytokine analysis.

2.3. Tissue extraction and determination of myeloperoxidase and N-acetyl- β -D-glucosaminidase activities

The extent of neutrophil accumulation in the implants was measured by assaying myeloperoxidase (MPO) activity as previously described by Ferreira *et al.* [20]. Part of the tumors was weighed, homogenized in (2 mL) pH4.7 buffer (0.1 M NaCl, 0.02 M Na₃PO₄, 0.015 M Na₂-EDTA), and centrifuged at 4 8°C at 12,000 g for 10 min. The pellets were then re-suspended in 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 5.4) containing 0.5% hexa-1,6-bis-decyltrimethylammoniumbromide (HTAB). MPO activity in the supernatant samples was assayed by measuring the change in absorbance (optical density; OD) at 450 nm using 3,30-5,50-tetramethylbenzidine (TMB) prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) in a final concentration of 1.6 mM and H₂O₂ (0.3 mM) in the sodium phosphate buffer, pH 6.0. The reaction was terminated by adding 50 mL of H₂SO₄ (4 M). Results were expressed as a change in OD per milligram of wet tissue.

The infiltration of mononuclear cells was quantified by measuring the levels of the lysosomal enzyme N-acetylglucosaminidase (NAG) present in high levels in activated macrophages [20]. The pellets were weighed, homogenized in NaCl solution (0.9% w/v) containing 0.1% v/v Triton X-100 (Promega), and centrifuged (3000 g; 10 min at 4 8°C). Samples of the resulting supernatant (100 mL) were incubated for 10 min with 100 mL p-nitrophenyl-N-acetyl-b-D-glucosaminide (Sigma) prepared in the citrate/sodium phosphate buffer (0.1 M citric acid, 0.1 M Na₂HPO₄; pH 4.5) to yield a final concentration of 2.24 mM. The reaction was stopped by adding 100 mL of 0.2 M glycine buffer (pH 10.6). Hydrolysis of the substrate was determined by measuring the absorption at 400 nm. Results were expressed as nmol/mg of wet tissue.

2.4. ELISA

The measurement of relevant pro-angiogenic and pro-inflammatory cytokines (VEGF, TNF- α , CCL2) was carried out in the supernatant (50 μ l) of homogenized tissue samples and in the serum (20 μ l) from tumor-bearing and non-tumor-bearing animals, using Immunoassay Kits (R&D Systems, Minneapolis, USA) and following the manufacturer's protocol. Briefly, dilutions of cell-free supernatants were added in duplicate to ELISA plates coated with a specific murine monoclonal antibody against cytokine, followed by adding a second horseradish peroxidase-conjugated polyclonal antibody, also against cytokine. After washing to remove any unbound antibody-enzyme reagent, a substrate solution (50 μ L of a 1:1 solution of hydrogen peroxide and tetramethylbenzidine 10mg/ml in DMSO) was added to the wells. Color development was terminated after 20 min incubation with 2N sulfuric acid (50 μ L) and color intensity was measured at 540 nm on a

spectrophotometer (E max–Molecular Devices). Standards were 0.5-log₁₀ dilutions of recombinant murine cytokines from 7.5 pg ml⁻¹ to 1000 pg ml⁻¹ (100 µl). The results were expressed as pg cytokine per mg of wet tissue or per mL.

2.5. Histopathological, histomorphometric, and metastasis evaluation

The primary tumor and lung fragments were fixed in 10% buffered formalin, processed and embedded in paraffin. Histological sections (4 µm) were stained with hematoxylin and eosin (HE) and used for histomorphological analysis of the primary tumor and pulmonary metastases identification. The inflammatory infiltrate was evaluated, with minor changes, as described by Estrela-Lima *et al.* [21]. The profile of the infiltrate was evaluated semi-quantitatively using the focal, multifocal or diffuse and weak (+), moderate (++), and intense (+++) classification. Cell profiles were classified into mononuclear, polymorphonuclear, and mixed standard. Histomorphometric analysis was carried out using the procedures described by Pereira *et al.* 2013. For histomorphometric purposes, the percentage of tumor, necrosis, inflammation (angiogenesis, hemorrhage, and edema), and normal tissue areas was calculated in 15 histologic fields, identifying 25 equidistant points per field. For analysis, histological images were obtained from the capture system with a SPOT 3.4.5 Basic® microcamera, adapted to an Olympus microscope (BX-40). The images were analyzed with use of Corel Draw® software version 7.468, with the determination of 25 equidistant points per histological field. For metastases evaluation, neoplastic cell nodules or aggregates distributed throughout the lung parenchyma, alveolar spaces, and bronchioles were considered.

2.6. Immunohistochemistry

Formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue sections (4 µm) of primary tumors and lungs were mounted on silanized slides and a peroxidase based detection system, Advance HRP, was applied (Dako, Carpinteria, California, USA). The slides were dewaxed in xylene and endogenous peroxidase activity was blocked with H₂O₂ 3% in methanol. The reagents were applied manually and immunoreactivity was ‘visualized’ by incubating the slides with 3,30-diaminobenzidine (Lab Vision DAB substrate system; Lab Vision, Fremont, California, USA) for 2 min. The details of antibodies, dilutions, antigen retrieval procedures, and incubation times are given in Table 1. For CDC47 and FVIII, skin was used as an internal positive control. Negative controls were performed using normal serum (Lab Vision Ultra V Block) in place of the primary antibody.

Table 1: Details of the immunohistochemical staining and the reagents and methods used in the study.

Target antigen	Clone	Manufacturer	Dilution	AR method	Incubation time (h)	Staining location
CDC47	47DC141	Neomarkers	1/300	Water bath (98 °C)	1	Nuclear
FVIII	A0082	Dako	1/800	Water bath (98 °C)	1	Endothelial

FVIII: Factor VII, AR: Antigen retrieval.

Analysis was performed in primary tumor and lung metastasis. Mitogenic index was performed using CDC 47. This antibody predominantly stains cells that are in the G1 and S phase of mitosis. The index for the CDC47 marker was obtained by estimating the percentage of positive cells in 500 tumor cells. Microvascular density (MVD) in hot spot areas was determined in Factor VIII antibody staining according to the method described by Maeda *et al.* [23]. Microscopic images of cross-sections were obtained with a planapochromatic objective 40 in light microscopy. The images were digitized through a Spot Insign Color microcamera adapted to an Olympus Microscope (BX-40) and transferred to an image analyzer.

2.7. Confocal microscopy

Confocal immunofluorescence was performed as previously described, with minor changes [24]. In brief, FFPE tissue sections were dewaxed, rehydrated, and unmasked in trilogy solution (Cell Marque, Koclin, CA, USA) under pressurized heating (125°C) for 20 minutes, according to the manufacturer's instructions. Next, samples were rinsed in Phosphate Buffered Saline (PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl and 10 mM phosphate buffer solution, pH 7.4) (Sigma-Aldrich, Carlsbad, CA, USA), and then incubated in PBS containing 0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) for another 20 minutes. Sections were then blocked in PBS containing 1% Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma-Aldrich) for 30 minutes. The sections were next incubated with a mouse monoclonal antibody against F4/80 to label macrophage cells (1:150, mAb BM8, Hycult Biotec, Uden, The Netherlands) overnight at 4 °C. Sections were then rinsed 3 times for 5 minutes in PBS. Subsequently, sections were incubated with Alexa Fluor[®] 488 Goat Anti-Rabbit IgG antibody (1:1000, Life Technologies) and Hoechst 33258 (1 µg/mL, Life Technologies) for 1 hour at room temperature. Next, samples were washed 3 times in PBS for 10 minutes and mounted in Prolong Gold Antifade reagent (Life Technologies). A negative control was included for all reactions and was performed by omitting primary antibodies. Images were collected using a Zeiss LSM 5 Live (Carl Zeiss, Jena, Germany) confocal microscope using an oil 40x 1.3 NA objective lens. Samples were excited at 405 nm and observed at 415-480 nm to detect Hoechst (488 nm) and at 500-525 nm to detect Alexa

Fluor 488 (532 nm). The fluorescence microscopy results were evaluated in 5 areas and 5 images were collected from each positive cell for F4/80.

2.8. Statistical analysis

Results are presented as mean \pm SEM. All data were submitted to the Kolmogorov-Smirnov normality test. Comparisons between groups were carried out using Student's t-test for unpaired data and Student-Newman-Keuls test. Correlations were carried out using by linear regression. A p-value less than 0.05 was considered significant. The statistical program used to analyze the data was GraphPad InStat version 5.0 statistic software.

3. Results

After orally administering THD for 23 consecutive days, there were no significant changes in biochemical serum indices for urea, creatinine, AST, and GGT of the treated animals as compared with the control group. Increased ALT levels were observed only in the group treated with 100 mg/kg THD ($p < 0.05$) (Table 2). As for hematological indices, a slight decrease in total leukocytes was observed in the groups treated with 100 mg/kg and 150 mg/kg of THD ($p < 0.05$) as compared with the control group without changes in other parameters (Table 3). There were no differences between the weights of the animals treated with THD and the control group.

Table 2: Mean values of biochemistry analysis Balb/c 4T1 tumor-bearing experimental and control groups treated with different doses of THD (23 days).

	Control	THD 50	THD 100	THD 150
Urea (mg/dl)	74,6	106,5	82,7	91,9
Creatinine (mg/dL)	1,9	2,7	2,4	2,7
AST (U/L)	199,1	241,5	250,6	254,1
ALT (U/L)	56,3	77,0	98,7**	84,1
GGT (U/L)	1,9	1,7	1,9	2

AST: Aspartate Aminotransferase, ALT: Alanine Aminotransferase, GGT: Gamma-glutamyltransferase. The results relate to average \pm standard deviation (** $p < 0.01$).

Table 3: Mean values of hematological Balb/c 4T1 tumor-bearing experimental and control groups treated with different doses of THD (23 days).

	Control	THD 50	THD 100	THD150
Erythrocytes (/mm ³)	8,136	7,77	8,654	9,353
Hemoglobin (g/dl)	13,24	12,76	13,96	14,89
Hematocrit (%)	42,89	40,04	47,56	50,59
MCV (fl)	49,6	49,16	54,23	53,11
White Cells (/mm ³)	8,374	7,781	6,741*	6,574*
Lymphocytes (%)	6,9	8,6	10,3	11,4
Neutrophil granulocytes (%)	85,9	84,6	81,4	81,1
Monocytes (%)	1,6	1,6	2,3	2,3
Band neutrophil (%)	1,9	2,6	3,1	2,6
Eosinophil granulocytes (%)	0,0	0,0	0,0	0,0
Basophil granulocytes (%)	0,0	0,0	0,0	0,0
Ring cell (%)	2,7	0,6	2,3	2,6
Blasts (%)	0,3	0,0	0,4	0,0
Platelets (/mm ³)	745.000	658.500	736.400	519.600

MCV: mean corpuscular volume. The results relate to average \pm standard deviation (* $p < 0.05$).

3.1. High doses of THD decrease primary tumor growth associated with increased tumor inflammatory response

To evaluate the effect of THD treatment on tumor growth, measurements were carried out throughout tumor development and the final volume of the primary tumor was calculated. A significant decrease in tumor mass was observed only after treatment with 150 mg/kg (609.60 ± 121.94 mm³) of THD as compared with the control group (850.66 ± 243.59 mm³) ($p < 0.05$) (Figure 1).

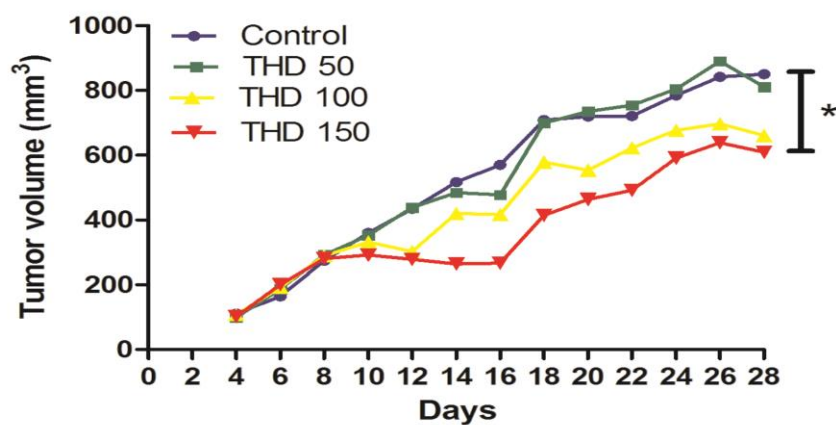


Fig. 1. Kinetics of 4T1 tumor growth and the effects of systemic administration of thalidomide (50, 100 and 150 mg/kg/day). Data are presented as mean \pm SEM. Significantly (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, t-test) different from the vehicle control.

A higher concentration of inflammatory cells in the peritumoral region in all groups was observed in the histopathological analysis of the primary tumor. The intratumoral inflammatory infiltrate in most animals was mild, consisting predominantly of mononuclear cells and often associated with areas of tissue necrosis, with a significant increase in the group treated with 150mg/kg THD ($p<0.05$) (Table 4). The histomorphometric analysis revealed a higher percentage of areas of inflammation ($r=0.6407$, $p<0.0001$) and reduction of neoplastic areas ($r=-0.2133$, $p=0.04549$) related to THD concentration. An increase in inflammation areas between the groups treated with 100 mg/kg ($p<0.01$) and 150 mg/kg ($p<0.001$) of THD and the control group was observed. Furthermore, a reduction in the tumor areas ($p<0.05$) in the group treated with 100 mg/kg and a reduction in the percentage of necrotic areas ($p<0.05$) in the group treated with 150mg/kg of THD was observed (Table 5).

Table 4: Infiltrate inflammatory analyses of tumor primary.

	Peritumoral			Intratumoral		
	Intensity	Distribution	Pattern	Intensity	Distribution	Pattern
Control	+	Difuse	Mononuclear	+	Multifocal	Mononuclear
THD 50	+	Difuse	Mixed	+	Multifocal	Mixed
THD 100	+++	Difuse	Mononuclear	+	Multifocal	Mononuclear
THD 150	+++	Difuse	Mononuclear	+++*	Multifocal	Mononuclear

Data represent mean \pm SEM ($*<0.05$) significant difference between the values of control and treated groups.

Table 5: Morphometric analysis of the percentage of neoplastic, normal tissue, inflammation, and necrosis areas in tumor.

	Neoplastic tissue		Normal tissue		Inflammation		Necrosis	
	%	SM	%	SM	%	SM	%	SM
Control	78,8	15,3	1,2	1,6	8,5	3,7	11,5	8,1
THD 50	67,1	6,3	1,4	2,9	11,3	4,2	20,3	14,0
THD 100	57,7*	18,5	1,8	2,2	16,6*	5,6	23,9	12,7
THD 150	69,1	18,1	2,0	1,4	20,6*	8,1	8,4*	15,1

Data represent mean \pm SEM ($*<0.05$) significant difference between the values of control and treated groups.

3.2. THD reduces neoplastic proliferation of primary tumor and lung metastases of the 4T1 tumor and displays different effects on tumor angiogenesis

To understand the potential antitumor mechanisms of THD in the primary tumor and lung metastases of murine mammary carcinoma 4T1, we evaluated the proliferative index by the CDC47 expression and tumor angiogenesis through the number of vessels from the FVIII expression. A lower proliferation index in neoplastic cells was observed in the primary tumor and metastases in the lung, when comparing the treated groups with the control group ($p < 0.05$) (Figure 2). A reduction of this index was observed in the primary tumor ($r = -0.5302$, $p = 0.0026$) and in lung metastases ($r = -0.6378$, $p = 0.0014$) related to the increase of THD concentration given to animals. Moreover, in the primary tumor, treatment with THD at a dose of 50mg/kg significantly reduced the number of vessels ($p < 0.05$). However, with an increase in THD dose (150mg/kg), a larger number of vessels was observed as compared to the control group ($p < 0.05$). A significant decrease in the number of vessels was observed in the lung, accompanied by increased doses of THD ($r = -0.3974$, $p = 0.0328$), with no significant differences between the mean values of the FVIII expression among the groups (Figure 3).

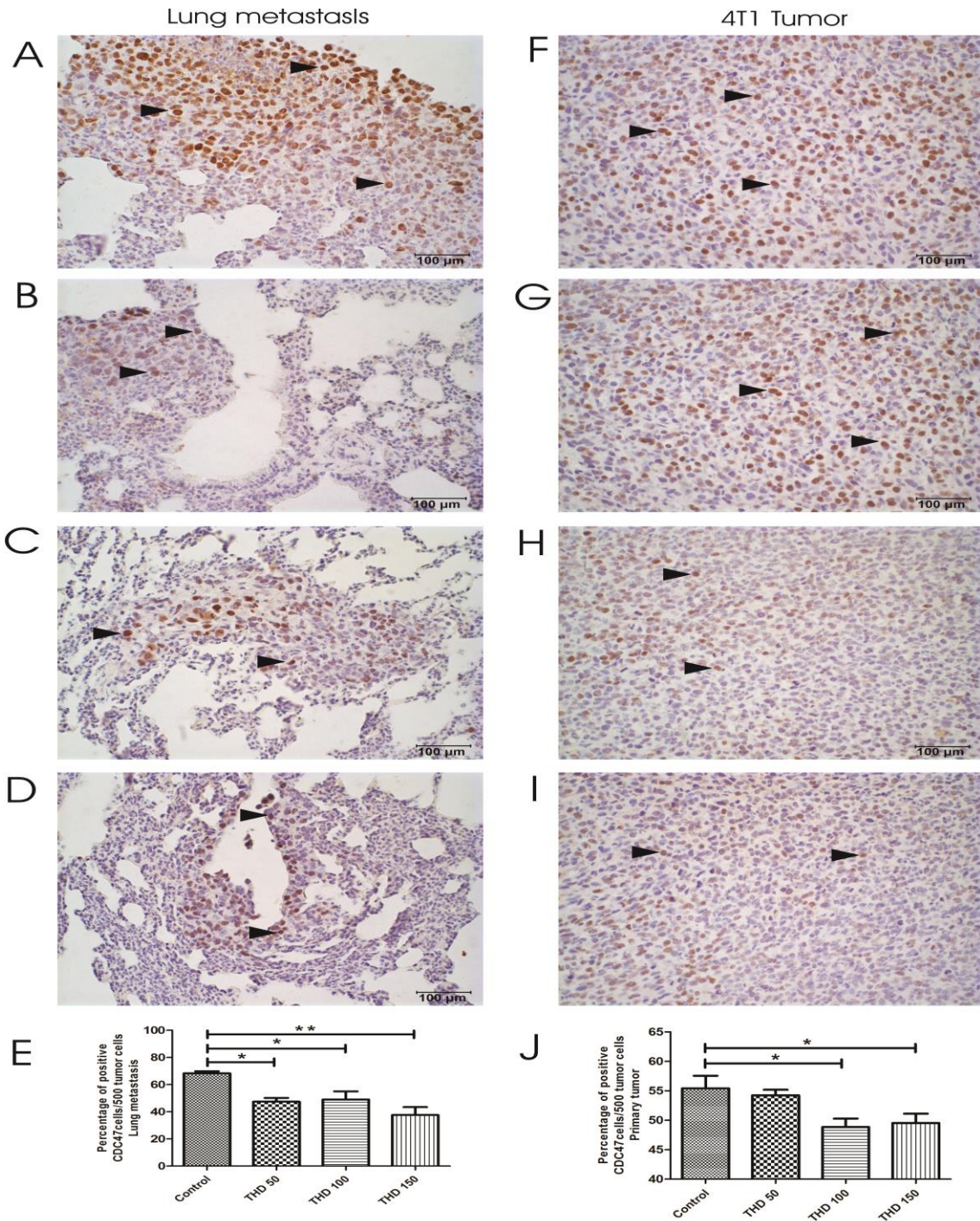


Fig. 2. Anti-proliferative effect of different doses of thalidomide in lung metastases and tumor 4T1. Representative photomicrographs of lung metastases (A, B, C, D) and tumor (F, G, H, I) cross sections. (A) and (F) control; (B) and (G) group treated with 50mg/kg/day of thalidomide; (C) and (H) group treated with 100mg/kg/day of thalidomide; (D) and (I) group treated with 150mg/kg/day of thalidomide. Data are presented as mean \pm SEM. Significantly ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, t-test) different from the vehicle control in lung metastases and 4T1 tumor ((E) and (J), respectively). Arrows head tumor cell positive CDC47.

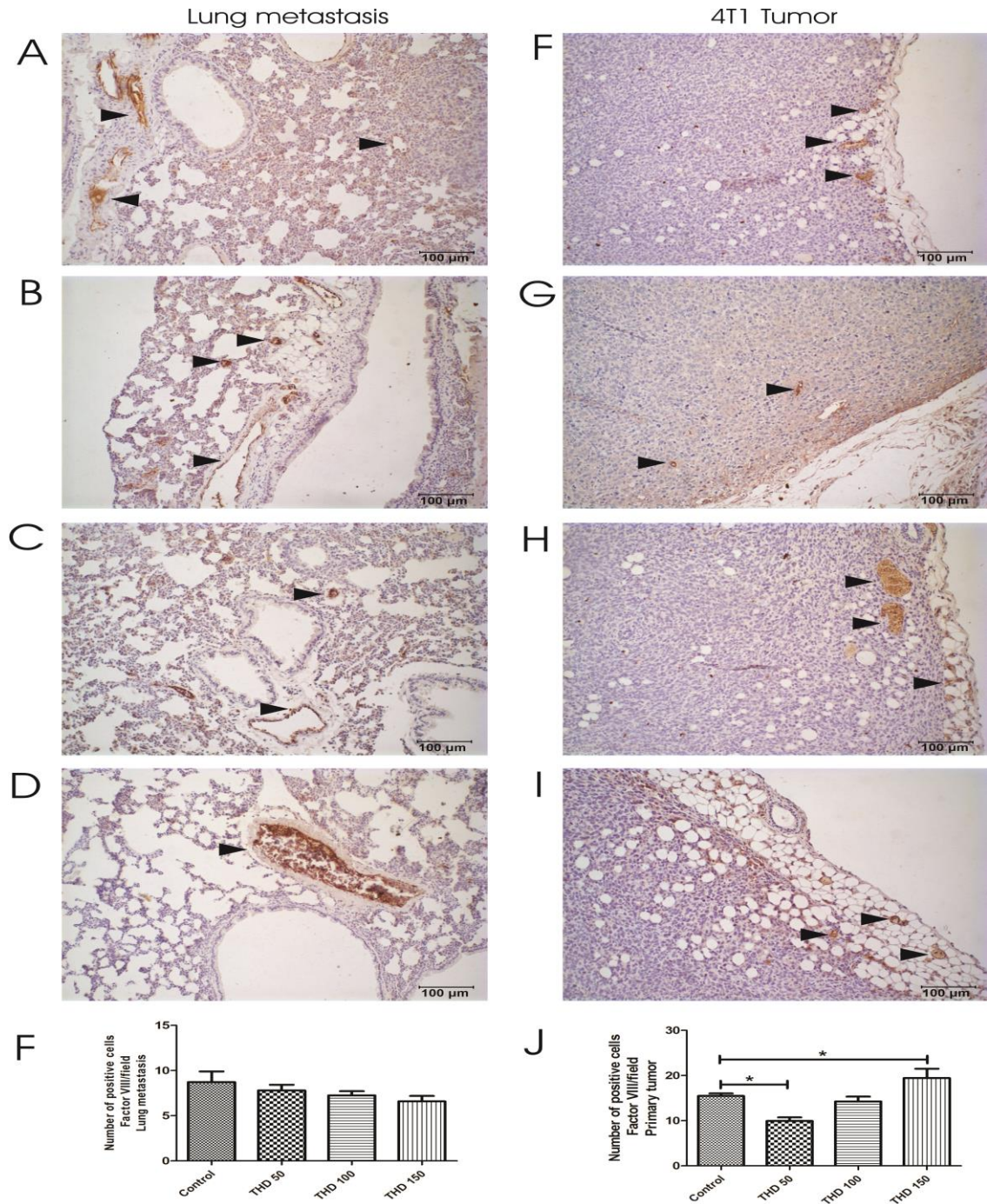
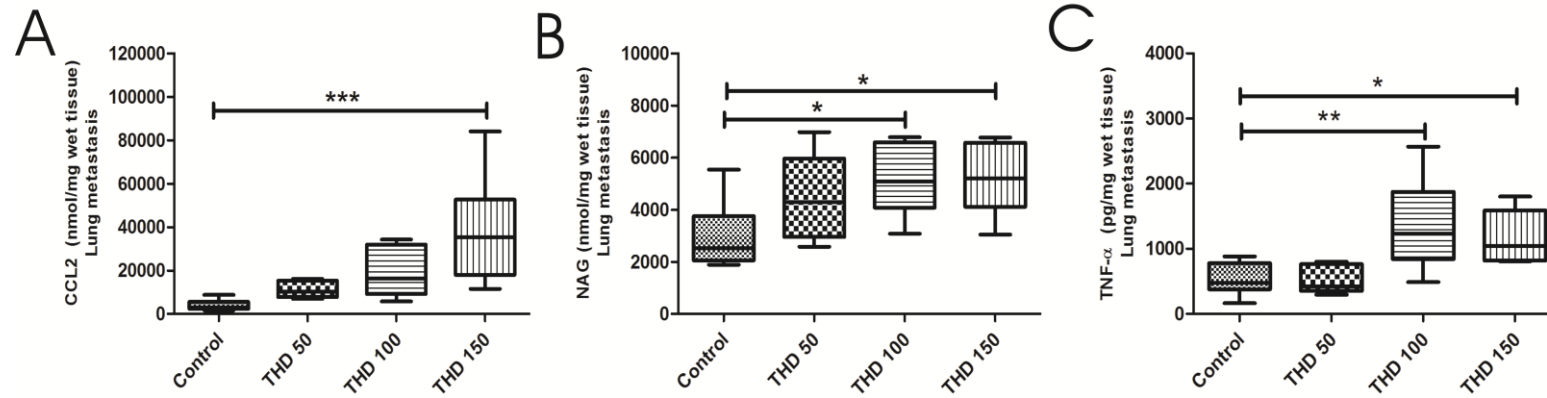


Fig. 3. Effect of different doses of thalidomide on angiogenesis of lung metastases and 4T1 tumor. Representative photomicrographs of lung metastases (A, B, C, D) and tumor (F, G, H, I) cross sections. (A) and (F) control; (B) and (G) group treated with 50mg/kg/day of thalidomide; (C) and (H) group treated with 100mg/kg/day of thalidomide; (D) and (I) group treated with 150mg/kg/day of thalidomide. (E) and (J) Data are presented as mean \pm SEM. Significantly (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, t-test) different from the vehicle control in lung metastases and 4T1 tumor, respectively. Arrows head blood vessels.

3.3. THD promotes increased levels of NAG, CCL2, and TNF- α in lungs with 4T1 tumor metastases

To evaluate the immunomodulatory effect of thalidomide, the NAG, MPO, CCL2, VEGF, and TNF- α levels were measured in the primary tumor and in the lungs of animals inoculated with 4T1 tumor cells. Treatment with 50mg/kg of THD in the primary tumor reduced only the CCL2 levels ($p < 0.05$). However, in the lung, a positive correlation was found between increased levels of NAG ($r = 0.4308$, $p = 0.0249$), CCL2 ($r = 0.6883$, $p = 0.0001$), and TNF- α ($r = 0.5230$, $p = 0.0061$) and increasing doses of thalidomide. When comparing the levels of these markers between the treated and control groups, an increase in NAG levels between the groups treated with 100 mg/kg ($p < 0.05$) and 150 mg/kg ($p < 0.05$) of THD was observed. TNF- α levels were also increased in the groups treated with 100 mg/kg ($p < 0.01$) and 150 mg/kg ($p < 0.05$). With regard to the CCL2 levels, a significant increase was observed for the group treated with 150mg/kg ($p < 0.001$) (Figure 4). No significant changes were observed in MPO and VEGF levels in the primary tumor and lung in the animals.

Lung metastasis



4T1 Tumor

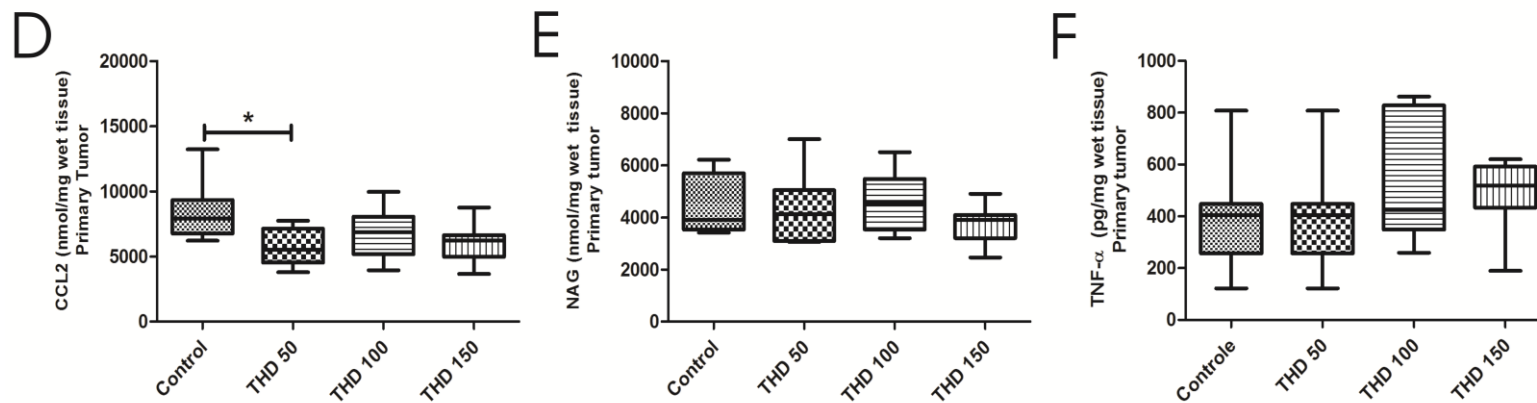


Fig. 4. Immunomodulatory effect of different doses of thalidomide on cytokines levels of CCL2, TNF- α , and NAG activity in lung metastases (A, B, C) and 4T1 tumor (D, E, F). Data are presented as mean \pm SEM. Significantly (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, t-test) different from the vehicle control.

3.4. THD promotes an increase in the number of macrophages in the lung with 4T1 tumor metastases

To assess the immunomodulatory effect of THD on the macrophage population in the primary tumor and pulmonary metastases, macrophage immunostaining was carried out by means of protein F4/80 expression [25]. In the primary tumor, an increased THD concentration was related to decrease in macrophage F4/80+ ($r=-0.4498$, $p=0.0067$). A comparison between groups also confirmed these findings, with a smaller number of macrophage F4/80+ in animals treated with doses of 50mg/kg ($p<0.05$), 100mg/kg ($p<0.01$), and 150mg/kg ($p<0.01$) of THD, as compared with the control group (Figure 6). However, corroborating previous findings, an increase in macrophage F4/80+ was observed in the lung directly related to the increased concentration of THD given to the animals ($r=0.3809$, $p=0.0049$); these results were also observed when compared to the average number of macrophages associated with lung metastases, between the treated and control groups ($p<0.05$).

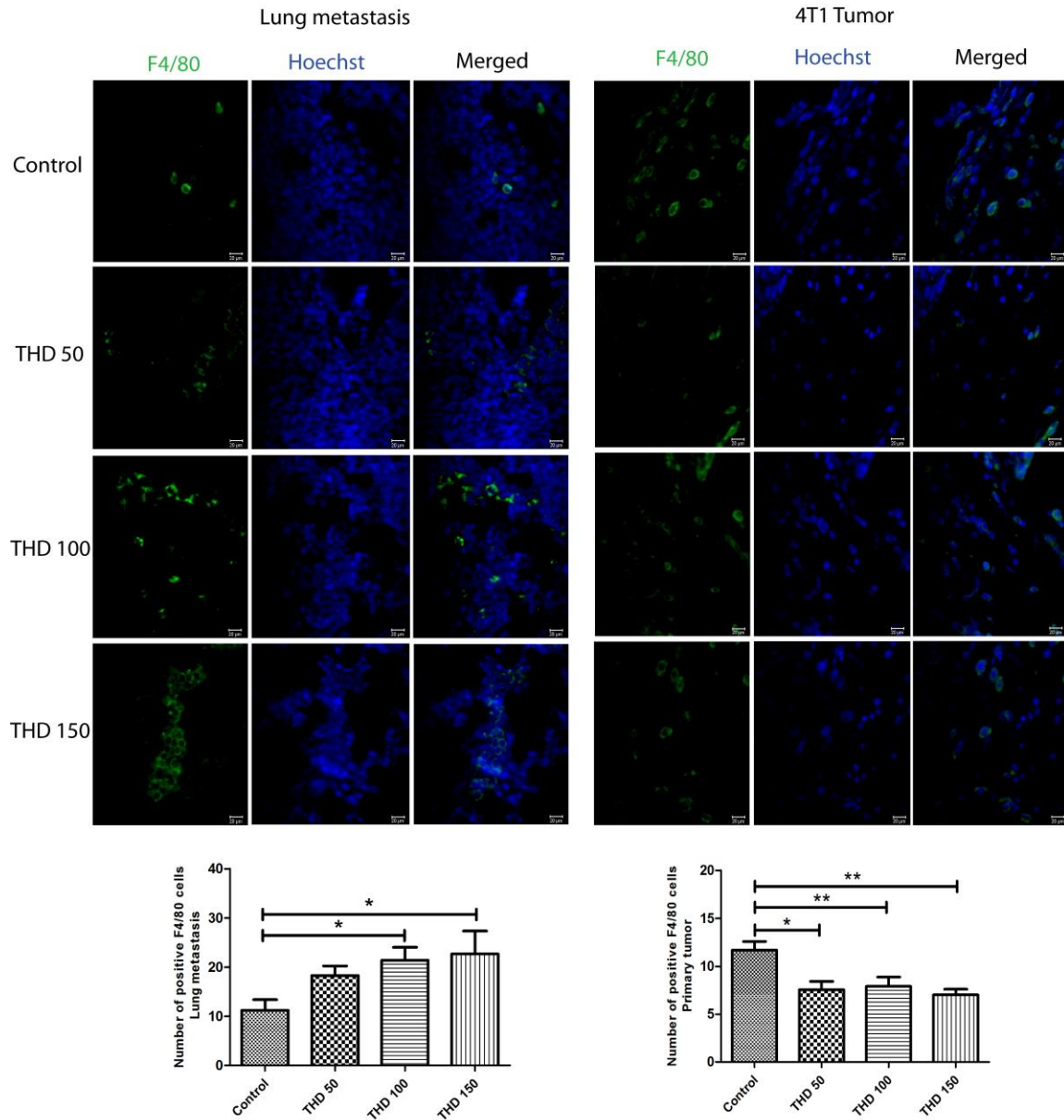


Fig. 5. Confocal immunofluorescence images showing the F4/80 protein expression in macrophages of lung metastases and 4T1 tumor. (B) and (C) Data are presented as mean \pm SEM. Significantly ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, t-test) different from the vehicle control in lung metastases and 4T1 tumor, respectively.

4. Discussion

In this study, we used the mammary carcinoma 4T1, which has a highly invasive and metastatic potential, to evaluate the effects of treatment with 50mg/kg, 100mg/kg, and 150mg/kg of THD on inflammation, angiogenesis, and neoplastic proliferation of different tumor sites. We propose to identify the possible action of THD in modulating the immune response associated with the primary tumor and its pulmonary metastases, inhibiting the metastatic neoplastic growth and/or tumor neovascularization. Our results support the idea of THD having an immunomodulatory and antitumor action that interferes with the development of the primary tumor and lung metastases of the 4T1 tumor, as there was an increase in inflammation in the primary site and lung metastases followed by a reduction in neoplastic growth and tumor cell proliferation.

Treatment with THD in human medicine has been associated with certain side effects, including peripheral neuropathy, thrombotic events, constipation, and drowsiness, particularly when used in high doses [26,27]. In this study, the evaluation of clinical and laboratory parameters did not show significant side effects after treatment with different doses of thalidomide. The administration of THD doses of 100 and 150 mg/kg was effective in controlling the neoplastic proliferation of the primary tumor and lung metastases of 4T1 murine mammary carcinoma. Moreover, this antitumor effect was shown to be accompanied by an increase in tissue inflammatory response when the same doses were used. The antitumor effect of THD has been associated with various therapeutic protocols, particularly its antiangiogenic action [28]; however, our results show that administering different doses of THD over 23 days has distinct effects on intratumor vascular formation. In our study, a THD dose of 50 mg/kg reduced the number of intratumor vessels, but at a dose of 150 mg/kg, we observed a larger number of blood vessels. An increased dose of THD correlated with a reduction in the number of blood vessels in the lung.

Tumor angiogenesis is a process through which new blood vessels are formed, important for primary tumor growth and metastasis in breast cancer [29]. However, we believe the increase in the number of vessels in primary tumors may be associated with increased local inflammation favored by therapy with thalidomide, as there was an increase in tissue inflammation and angiogenesis. This vascular neof ormation could be related to a tissue remodeling response, since it has also been demonstrated that it promotes blood vessel development [30].

The immunomodulatory effects of THD have also been shown to be an effective strategy in treating different types of cancers [16,18,31,32]. However, only important aspects of the development of the primary tumor and lung metastases of 4T1 tumors, including the assessment of cell proliferation markers, angiogenesis, and

inflammation in relation to different doses of THD were explored in this study. We observed a significant increase in NAG, CCL2, and TNF- α in metastatic lungs of 4T1 tumor when THD was administered in high doses. There was no observed correlation between the increase of therapy with THD and significant changes among the marker levels in the primary tumor. The increased expression of CCL2 and NAG shows infiltration and circulating monocyte recruitment capacity to differentiate into macrophages in the tumor sites, respectively [15]. An increased expression of TNF- α and other inflammatory cytokines, reduction in the production of angiogenic mediators, and increased phagocytic power. The study of tumor-associated macrophages (TAMs) has shown the multiple roles of these cells play in the tumor microenvironment, either favoring neoplastic growth or inhibiting it. TAMs constitute the largest component of the leukocyte infiltrate in various types of tumors and studies of these cells have shown their important prognostic and therapeutic role in several types of cancer [9,33,34,35,36]. Although phenotyping of the macrophages in M1 (anti-tumor) and M2 (pro-tumor) was not carried out, our data suggest a possible modulation of these cells in an anti-tumor profile, as a gradual increase in CCL2, NAG, TNF- α levels and the number of macrophage F4/80+ accompanied by increased THD therapy was observed in the lung and that immunomodulation is associated with a reduction in the proliferative rate of metastatic cells. We can also consider that increasing the concentration of THD dose correlated with a reduction in the number of vessels in the lung, suggesting that the macrophages did not exhibit a pro-angiogenic profile. Regarding the primary tumor, treatment with different doses of THD reduced the number of F4/80+ macrophages, although an increase of tissue inflammation associated with increased drug concentration has not been observed.

Immune cell recruitment to the tumor site has been extensively studied to recognize the role of inflammatory cells associated with the development of tumors [37,38,39]. Thus, drugs with immunomodulatory and anti-inflammatory potential are suggested as potential therapeutics in oncology [5,40,41]. In this context, THD has been shown to modulate various cytokines [42,43], and also act on different cell types such as macrophages [44], lymphocytes [45], and natural killer cells (NK) [16,31]. In this study, we have demonstrated an important action of THD in the recruitment of macrophages according to the evaluated tumor site. Our results open future prospects regarding immunomodulatory mechanisms of THD in 4T1 tumors, particularly in the drug's role in the recruitment of macrophages and modulation associated with pulmonary metastases.

In conclusion, this study demonstrates that therapy with THD at a concentration of 100mg/kg and 150mg/kg for a period of 23 days exhibited immunomodulatory effects on the primary tumor and pulmonary metastases, and

this response is associated with a reduction in tumor growth and reduced cell proliferation rate of cancer cells from the primary tumor and lung metastases of 4T1 murine mammary carcinoma. Furthermore, such immunomodulation in the lung is associated with increased macrophage migration through increased stimulation of CCL2, resulting in an increased number of these cells with metastases.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. S. Bhogaraju, I. Dikic, A peek into the atomic details of thalidomide's clinical effects, *Nat Struct Mol Biol.* 21(9) (2014) 739-740.
2. V. Eleutherakis-Papaiakovou, A. Bamias, M.A. Dimopoulos, Thalidomide in cancer medicine, *Ann Oncol.* 15(8) (2004) 1151-1160.
3. R.J. D'Amato, M.S. Loughnan, E. Flynn, J. Folkman, Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis, *Proc Natl Acad Sci USA.* 91(9) (1994) 4082-4085.
4. Y.M. Yang, G.J. Du, H.H. Lin, Experimental study of thalidomide for treatment of murine hepatocellular carcinoma, *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao.* 25(8) (2005) 925-928.
5. C.M. Souza, L.F. Carvalho, T.S. Vieira, A.C. Araújo e Silva et al, Thalidomide attenuates mammary cancer associated-inflammation, angiogenesis and tumor growth in mice, *Biomed Pharmacother.* 66(7) (2012) 491-498.
6. A. Israyelyan, F. Sandoval, A. Baghian, M.T. Kearney, E.J. Shannon, Thalidomide delayed the ability of 4T1 cells to amass into tumors in Balb/c mice, *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 34(3) (2012) 408-412.
7. F. Prall, T. Dührkop, V. Weirich et al, Prognostic role of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in stage III colorectal cancer with and without microsatellite instability, *Hum Pathol.* 35(7) (2004) 808-816.
8. A. Mantovani, T. Schioppa, C. Porta, P. Allavena, A. Sica, Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion, *Cancer Metastasis Rev.* 25(3) (2006) 315-322.
9. P. Allavena, C. Garlanda, M.G. Borrello, A. Sica, A. Mantovani, Pathways connecting inflammation and cancer, *Curr Opin Genet Dev.* 18(1) (2008) 3-10.
10. A.M. Murri, M. Hilmy, J. Bell, C. Wilson et al, The relationship between the systemic inflammatory response, tumour proliferative activity, T-lymphocytic and macrophage infiltration, microvessel density and survival in patients with primary operable breast cancer, *Br J Cancer.* 99(7) (2008) 1013-1019.

11. O. Hammam, O. Mahmoud, M. Zahran, A. Sayed, A Possible Role for TNF- α in Coordinating Inflammation and Angiogenesis in Chronic Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma, *Gastrointest Cancer Res.* 6(4) (2013) 107-114.
12. N. Ferrara, H.P. Gerber, J. LeCouter, The biology of VEGF and its receptors, *Nat Med.* 9(6) (2003) 669-676.
13. H.L. Goel, A.M. Mercurio, VEGF targets the tumour cell, *Nat Rev Cancer.* 13(12) (2013) 871-882.
14. T.P. Raposo, I. Pires, M.I. Carvalho, J. Prada, D.J. Argyle, F.L. Queiroga, Tumour-associated macrophages are associated with vascular endothelial growth factor expression in canine mammary tumours, *Vet Comp Oncol.* 13(4) (2013) 464-474.
15. T. Yoshimura, O.M. Howard, T. Ito et al, Monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 produced by stromal cells promotes lung metastasis of 4T1 murine breast cancer cells, *PLoS One.* 8(3) (2013) e58791.
16. A. Kawamata, D. Ito, T. Odani et al, Thalidomide suppresses melanoma growth by activating natural killer cells in mice, *Oncol Rep.* 16(6) (2006) 1231-1236.
17. B.A. Pulaski, S. Ostrand-Rosenberg, Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr Protoc Immunol.* (2001) Chapter 20:Unit 20.2.
18. D.C. Reis, C.M. Souza, L.C. Campos et al, Thalidomide promotes leukocytosis in mice inoculated with 4T1 mammary carcinoma, *J Bras Patol Med Lab.* 50 (2014) 64-66.
19. S.V. Fulzele, A. Chatterjee, M.S. Shaik, T. Jackson, M. Singh, Inhalation delivery and anti-tumor activity of celecoxib in human orthotopic non-small cell lung cancer xenograft model, *Pharm Res.* 23(9) (2006) 2094-2106.
20. M.A. Ferreira, L.S. Barcelos, M.M. Teixeira, Y.S. Bakhle, S.P. Andrade, Tumor growth, angiogenesis and inflammation in mice lacking receptors for platelet activating factor (PAF), *Life Sci.* 81(3) (2007) 210-217.
21. A. Estrela-Lima, M.S. Araújo, J.M. Costa-Neto et al, Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates, *BMC Cancer.* 10 (2010) 1-14.
22. B.G. Pereira, S.L. Fialho, C.M. Souza C, G.D. Cassali, A. Silva-Cunha, Evaluation of the effects of thalidomide-loaded biodegradable devices in solid Ehrlich tumor, *Biomed Pharmacother.* 67(2) (2013) 129-132.
23. K. Maeda, Y.S. Chung, S. Takatsuka et al, Tumour angiogenesis and tumour cell proliferation as prognostic indicators in gastric carcinoma, *Br J Cancer.* 72(2) (1995) 319-323.

24. C.O. Gamba, M.A. Rodrigues, D.A. Gomes, A. Estrela-Lima, E. Ferreira, G.D. Cassali, The Relationship Between E-Cadherin and its Transcriptional Repressors in Spontaneously Arising Canine Invasive Micropapillary Mammary Carcinoma, *J Comp Pathol.* 153(4) (2015) 256-265.
25. V. Cortez-Retamozo, M. Etzrodt, A. Newton, P.J. Rauch et al, Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils, *Proc Natl Acad Sci USA.* 109(7) (2012) 2491-2496.
26. M. Carrier, G. Le Gal, J. Tay, C. Wu, A.Y. Lee, Rates of venous thromboembolism in multiple myeloma patients undergoing immunomodulatory therapy with thalidomide or lenalidomide: a systematic review and meta-analysis, *J Thromb Haemost.* 9(4) (2011) 653-663.
27. Y. Kagoya, Y. Nannya, M. Kurokawa, Thalidomide maintenance therapy for patients with multiple myeloma: meta-analysis, *Leuk Res.* 36(8) (2012) 1016-1021.
28. Y. Liu, H. Li, O. Matsui, The antiangiogenic effect of thalidomide on occult liver metastases: an in vivo study in mice, *J Gastroenterol Hepatol.* 24(6) (2009) 1077-1081.
29. B.P. Schneider, K.D. Miller, Angiogenesis of breast cancer, *J Clin Oncol.* 23(8) (2005) 1782-1790.
30. F. Lebrin, S. Srun, K. Raymond et al, Thalidomide stimulates vessel maturation and reduces epistaxis in individuals with hereditary hemorrhagic telangiectasia, *Nat Med.* 16(4) (2010) 420-428.
31. F.E. Davies, N. Raje, T. Hideshima et al, Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma, *Blood.* 98(1) (2001) 210-216.
32. Y. Yang, Y.Q. Zhu, L. Jiang, L.F. Li, J.P. Ge, Thalidomide induces apoptosis in human oral squamous cell carcinoma cell line with altered expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), *Oral Oncol.* 47(9) (2011) 927-928.
33. K.S. Siveen, G. Kuttan, Role of macrophages in tumour progression, *Immunol Lett.* 123(9) (2009) 97-102.
34. D. Laoui, K. Movahedi, E. Van Overmeire et al, Tumor-associated macrophages in breast cancer: distinct subsets, distinct functions, *Int J Dev Biol.* 55(7-9) (2011) 861-867.
35. J. Cook, T. Hagemann, Tumour-associated macrophages and cancer, *Curr Opin Pharmacol.* 13(4) (2013) 595-601.
36. A. Mantovani, P. Allavena, The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages, *J Exp Med.* 212(4) (2015) 435-445.

37. M.Z. Dewan, H. Terunuma, M. Takada, Role of natural killer cells in hormone-independent rapid tumor formation and spontaneous metastasis of breast cancer cells *in vivo*, *Breast Cancer Res Treat.* 104(3) (2007) 267-275.
38. S.D. Bohling, K.H. Allison, Immunosuppressive regulatory T cells are associated with aggressive breast cancer phenotypes: a potential therapeutic target, *Mod Pathol.* 21(12) (2008) 1527-1532.
39. B. Ruffell, A. Au, H.S. Rugo, L.J. Esserman, E.S. Hwang, L.M. Coussens, Leukocyte composition of human breast cancer, *Proc Natl Acad Sci USA.* 109(8) (2012) 2796-2801.
40. C.M. Souza, P.A. Auler, D.C. Reis et al, Subcutaneous administration of ketoprofen delay Ehrlich solid tumor growth in mice, *Arq Bras Med Vet Zootec.* 66(5) (2014) 1376-1382.
41. H. Quach, D. Ritchie, A.K. Stewart, P. Neeson, S. Harrison, M.J. Smyth, Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDS) in multiple myeloma, *Leukemia.* 24(1) (2010) 22-32.
42. E.S. Lee, Y.A. Kim, H.J. Kwon, D. Bang, S. Lee, S. Sohn, Thalidomide upregulates macrophage inflammatory protein-1alpha in a herpes simplex virus-induced Behçet's disease-like animal model, *Arch Dermatol Res.* 296(4) (2004) 175-181.
43. V. Kumar, K. Harjai, S. Chhibber, Thalidomide treatment modulates macrophage pro-inflammatory function and cytokine levels in *Klebsiella pneumoniae* B5055 induced pneumonia in BALB/c mice, *Int Immunopharmacol.* 10(7) (2010) 777-783.
44. H.S. Lee, H.S. Kwon, D.E. Park et al, Thalidomide inhibits alternative activation of macrophages *in vivo* and *in vitro*: a potential mechanism of anti-asthmatic effect of thalidomide, *PLoS One.* 10(4) (2015) e0123094.
45. P.A. Haslett, L.G. Corral, M. Albert, G. Kaplan, Thalidomide costimulates primary human T lymphocytes, preferentially inducing proliferation, cytokine production, and cytotoxic responses in the CD8+ subset, *J Exp Med.* 187(11) (1998) 1885-1892.

7. CONCLUSÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos nesse estudo e nas condições metodológicas empregadas, podemos concluir que:

- O tratamento com diferentes doses de talidomida, nos camundongos Balb/c fêmeas inoculadas com o carcinoma mamário murino 4T1, não demonstrou efeitos colaterais consideráveis, uma vez que não foram observadas alterações nos parâmetros hematológicos, bioquímicos, comportamento e peso dos animais envolvidos neste estudo.
- O tratamento com diferentes doses de talidomida nos camundongos Balb/c fêmeas inoculadas com o carcinoma mamário murino 4T1 resulta em um menor crescimento tumoral, com redução gradativa em relação ao aumento da dose, sendo a dose mais efetiva para esse estudo a de 150mg/kg de talidomida.
- O índice proliferativo das células neoplásicas no tumor primário e metástases pulmonares do carcinoma mamário murino 4T1 mostrou significativa redução acompanhado do aumento das doses de talidomida.
- No tumor primário, o tratamento com diferentes doses de talidomida exibiu diferentes efeitos na angiogênese tumoral, contudo no pulmão o aumento das doses de talidomida mostrou-se acompanhada de uma redução gradativa no número de vasos nesse órgão.
- O tratamento com talidomida exibiu efeito imunomodulador acompanhado do aumento das doses de talidomida e tecido específico, sendo que no pulmão foi observado uma ação pró-inflamatória macrofagocítica, com aumento dos níveis de MCP-1, NAG e TNF- α .
- A administração de talidomida nos camundongos Balb/c fêmeas inoculadas com o carcinoma mamário murino 4T1 promove um aumento do infiltrado de células inflamatórias no tumor primário e metástases pulmonares, sendo esse efeito no tumor primário acompanhado de uma redução no número de macrófagos e no pulmão ocorre uma maior infiltração dessas células acompanhadas do aumento das doses de talidomida.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As células inflamatórias e citocinas encontradas em tumores têm mostrado diferentes papéis no crescimento, progressão e imunossupressão das neoplasias. Os macrófagos são componentes leucocitários relevantes no estroma de tumores sólidos. A presença de macrófagos associados à tumores (MATs) tem correlacionado com resultados diversos e diminuição de sobrevida em vários tipos de câncer. O estudo dos MATs sugere que essas células apresentem capacidade de interagir com o desenvolvimento tumoral de diferentes formas. Elas podem apresentar atividade citotóxica para as células tumorais, mas também induzir neovascularização alterando desta forma a velocidade de crescimento tumoral e a formação de metástase. Diante da importância das células inflamatórias associadas ao desenvolvimento neoplásico, muitas propostas terapêuticas imunomodulatórias são sugeridas a fim de controlar o crescimento tumoral a partir da modulação e ativação das células do sistema imune. Nesse contexto encontra-se a talidomida, uma droga já utilizada na oncologia devido ao seu alto potencial antiangiogênico, onde novos trabalhos têm demonstrado sua efetiva ação sobre células do sistema imune e o controle neoplásico. Nossos resultados demonstram um importante papel da talidomida imunomodulando o infiltrado de macrófagos tumorais na presença do carcinoma mamário murino 4T1. Contudo é necessário demonstrar a ação desse fármaco sobre a polarização dos MATs. Assim, diante dos resultados encontrados nesse trabalho, o estudo do comportamento de monócitos circulantes e TAMs no tumor primário e metástases pulmonares em modelos experimentais submetidos ao tratamento com talidomida podem fornecer informações relevantes dessa droga como proposta terapêutica complementar no tratamento do câncer de mama.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIRSHROKHI, K. Anti-inflammatory effect of thalidomide in paraquat-induced pulmonary injury in mice. *International Immunopharmacology*, v.17, p.210-215, 2013.

ASANO, T. *et al.* Thalidomide attenuates airway hyperresponsiveness and eosinophilic inflammation in a murine model of allergic asthma. *Biol. Pharm. Bull.*, v.33, n.6, p.1028-1032, 2010.

BADAMT SEREN, B. *et al.* Thalidomide inhibits interferon- γ -mediated nitric oxide production in mouse vascular endothelial cells. *Cellular Immunology*, v.270, n.1, p.19-24, 2011.

BALIGA, M. S.; MELETH, S.; KATIYAR, S. K. Growth inhibitory and antimetastatic effect of green tea polyphenols on metastasis-specific mouse mammary carcinoma 4T1 cells *in vitro* and *in vivo* systems. *Clinical Cancer Research*, v.11, p.1918-1927, 2005.

BARROS, A. C. S. D. *et al.* Induction of experimental mammary carcinogenesis in rats with 7,12-dimethyl(a)anthracene. *Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo*, v.59, n.5, p.257-261, 2004.

BAUMANN, F. Combined thalidomide and temozolomide treatment in patients with glioblastoma multiforme. *J. Neurooncol.*, n.67, p.191-200, 2004.

BELO, A.V. *et al.* Differential effects of thalidomide on angiogenesis and tumor growth in mice. *Inflammation*, v.25, n.2, p.91-96, 2001.

BISWAS, S. K.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. *Semin. Immunopathol.*, v.35, p.585-600, 2013.

BITTENCOUT, R. *et al.* Talidomida e mieloma múltiplo: verificação dos efeitos terapêuticos e laboratoriais através de parâmetros clínico e laboratoriais. *Ver. Bras. Hematol. Hemoter.*, v.26, n.4, p.245-255, 2004.

BOHLING, S. D.; ALLISON, K. H. Immunosuppressive regulatory T cells are associated with aggressive breast cancer phenotypes: a potential therapeutic target. *Modern Pathology*, v.21, p.1527-1532, 2008.

BOUSCARY, D. *et al.* A non-randomised dose-escalating phase-II study of thalidomide for the treatment of patients with low-risk myelodysplastic syndromes: the Thal-SMD-200 trial of the groupe Français des Myélodysplasies. *British Journal of Haematology*, v.131, p.609-618, 2005.

BURDALL, S. E. *et al.* Breast cancer cell lines: friend or foe? *Breast Cancer Research*, v.5, p.89-95, 2002.

CAMPELO, S. R. *et al.* Effects of immunomodulatory drugs on TNF- α and IL-12 production by purified epidermal Langerhans cells and peritoneal macrophages. *BMC Research Notes*, v.4, 2011.

CARRIER, M. *et al.* Rates of venous thromboembolism in multiple myeloma patients undergoing immunomodulatory therapy with thalidomide or lenalidomide: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v.9, p.653-663, 2011.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. *Nature*, v.420, p.860-867, 2002.

D'AMATO, R.J. *et al.* Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci*, v.91, p.4082-40855, 1994.

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

DAGLI, M. L. Z.; GUERRA, J. L.; SALDIVA, P. H. N. An experimental study on the lymphatic dissemination of the solid Ehrlich tumor in mice. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.29, p.97-103, 1992a.

DAGLI, M. L. Z.; SOMA, M.; GUERRA, J. L. *et al.* Lymphatic dissemination in neoplasia: determination of nuclear volume and DNA content of primitive and regional lymph node Ehrlich tumor cells. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.29, p.267-2671, 1992b.

DEWAN, M. Z. *et al.* Role of natural killer cells in hormone-independent rapid tumor formation and spontaneous metastasis of breast cancer cells in vivo. *Breast Cancer Res. Treat.*, v.104, p.267-275, 2007.

EISEN, T. *et al.* Continuous low dose thalidomide: a phase II study in advanced melanoma, renal cell, ovarian and breast cancer. *British Journal of Cancer*, v.82, n.4, p.812-817, 2000.

ELEUTHERAKIS-PAPAIAKOVOU, V.; BAMIAS, A.; DIMOPOULOS, M.A. Thalidomide in cancer medicine. *Annals of Oncology*, v.15, p.1151-1160, 2004.

ENGEL, L. W.; YOUNG, N. A. Human breast carcinoma cells in continuous culture: a review. *Cancer Research*, v.38, p.4327-4339, 1978.

ESCUDIER, B. *et al.* Phase II trial of thalidomide in renal-cell carcinoma. *Ann. Oncol.*, v.13, n. 7, p. 1029-1035, 2002.

ESTRELA-LIMA, A. *et al.* Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. *BMC Cancer*, v.10, p.256, 2010.

FASTAIA J., DUMONT, A. Pathogenesis of ascites in mice with peritoneal carcinomatosis. *J. Natl. Cancer Inst.*, v.56 p.547-549, 1976.

FERREIRA, E. *et al.* Ehrlich tumor as model to study artificial hyperthyroidism influence on breast cancer. *Pathology Research and Practice*, v.203, p.39-44, 2007.

FINE, H. *et al.* Phase II trial of thalidomide and carmustine for patients with recurrent high-grade glioma. *J. Clin. Oncol.*, v.21, p.2299-2304, 2003.

FULZELE, S. V. *et al.* Inhalation delivery and anti-tumor activity of celecoxib in human orthotopic non-small cell lung cancer xenograft model. *Pharm Res.*, v.9, p.2094-106, 2006.

GHAGHADA, K. B. *et al.* Evaluation of tumor microenvironment in an animal model using a nanoparticle contrast agent in computed tomography imaging. *Academic Radiology*, v.18, n.1, 2011.

GRIVENNIKOV, S. I. *et al.* Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, v.140, p.883-899, 2010.

HASLETT, P. A. J. *et al.* Thalidomide costimulates primary human T lymphocytes, preferentially inducing proliferation, cytokine production, and cytotoxic Responses in the CD8. *J. Exp. Med.*, v.187, n.11, p.1885-1892, 1998.

HENNIGHAUSEN, L. Mouse models for breast cancer, v.2, p.2-7, 2000.

HERNANDEZ, M.O. *et al.* Thalidomide modulates Mycobacterium leprae-induced NF- κ B pathway and lower cytokine response. *European Journal of Pharmacology*, v.670, p.272-279, 2011.

HOSHI, A. *et al.* Activation of coagulation by a thalidomide-based regimen. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, v.22, p.523-540, 2011.

IMAOKA, T. *et al.* Molecular characterization of cancer reveals interactions between ionizing radiation and chemicals on rat mammary carcinogenesis. *International Journal of Cancer*, 2013.

KAWAMATA, A. *et al.* Thalidomide suppresses melanoma growth by activating natural killer cells in mice. *Oncology reports*, v.16, p.1231-1236, 2006.

KIM, H-R. *et al.* Reduction of natural killer and natural killer T cells is not protective in cisplatin-induced acute renal failure in mice. *Nephrology*, v.16, p.545-551, 2011.

KUMAR, V.; HARJAI, K. CHHIBBER, S. Thalidomide treatment modulates macrophage pro-inflammatory function and cytokine levels in Klebsiella pneumoniae B5055 induced pneumonia in BALB/c mice. *International Immunopharmacology*, v.10, p.777-78, 2010.

- LEE, E. S. *et al.* Thalidomide upregulates macrophage inflammatory protein-1 α in a herpes simplex virus-induced Behçet's disease-like animal model. *Arch Dermatol Res.*, v.296, p.175-181, 2004.
- LIM, K. H. J. Possible significance of differences in proportions of cytotoxic T cells and B-lineage cells in the tumour-infiltrating lymphocytes of typical and atypical medullary carcinomas of the breast. *Cancer Immunity*, v.10, p.3, 2010.
- LIN, Y.C. *et al.* A novel anticancer effect of thalidomide: inhibition of intercellular adhesion molecule-1-mediated cell invasion and metastasis through suppression of nuclear factor- κ B. *Clinical Cancer Research*, v.12, p.7165-7173, 2006.
- LU, J. *et al.* Metabolism of thalidomide in liver microsomes of mice, rabbits, and humans. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.310, n.2, 2004.
- MACCIÒ, A.; MADEDDU, C. Inflammation and ovarian cancer. *Cytokine*, v.58, p.133-147, 2012.
- MAPLES, W. *et al.* Advanced pancreatic cancer: a multi-institutional trial with gemcitabine and thalidomide. *J. Clin. Oncol.*, v.22, p.4082, 2004.
- MOREIRA, A. L. *et al.* Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor α by enhancing mRNA degradation. *J. Exp. Med.*, v.177, p.1675-1680, 1993.
- NESS, R. B.; COTTREAU, C. Possible role of ovarian epithelium in ovarian cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, v.91, n.17, 1999.
- PALERMO-NETO, J.; MASSOCO, C. O.; SOUZA, W. R. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. *Brain, Behavior, and Immunity*, v.17, p.43-54, 2003.
- PENG, L. V. *et al.* Effects of thalidomide on the expression of adhesion molecules in rat liver cirrhosis. *Mediators Inflammation*, v.4, p.1-10, 2006.
- PULASKI, B. A.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Current Protocols in Immunology*, 2001.

- REIS, D. C. *et al.* Talidomida promove leucocitose em camundongos inoculados com carcinoma mamário murino 4T1. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 2013. (Artigo aceito para publicação em 2013).
- REZENDE, L. C. D. *et al.* Regulatory T cell as a target for cancer therapy. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, v.58, p.179-190, 2010.
- ROBAK, M.; TRELINSKI, J.; CHOJNOWSKI, K. Hemostatic changes after 1 month of thalidomide and dexamethasone therapy in patients with multiple myeloma. *Med. Oncol.*, 2012.
- RUFFELL, B. *et al.* Leukocyte composition of human breast cancer. *PNAS*, 2011.
- SHACTER, E.; WEITZMAN, S. A. Chronic inflammation and cancer. *Oncology (Williston Park)*, v.16, n.2, p.217-226, 2002.
- SHEN, C. *et al.* Establishment and characterization of three new human breast cancer cell lines derived from Chinese breast cancer tissues. *Cancer Cell International*, v.9, n.2, 2009.
- SHIELS, M. S. *et al.* Circulating inflammation markers and prospective risk of lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 2013.
- SOUZA, C. M. *et al.* Combination therapy with carboplatin and thalidomide suppresses tumor growth and metastasis in 4T1 murine breast cancer model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2013.
- SOUZA, C. M. *et al.* Thalidomide attenuates mammary cancer associated-inflammation, angiogenesis and tumor growth in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v.66, p.491-498, 2012.
- STEEG, P. S. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nature Medicine*, v.12, n.8, 2006.
- TANG, X. Tumor-associated macrophages as potential diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer. *Cancer Letters*, v.332, p.3-10, 2013.

TEO, S. K.; STIRLING, D. I.; ZELDIS, J. B. Thalidomide as a novel therapeutic agent: new uses for an old product. *Drug Discov. Today*, v.10, n.2, p.107-114, 2005.

TINDALL, E. A. *et al.* Inflammatory genetic markers of prostate cancer risk. *Cancers*, v.2, p.1198-1220, 2010.

VIANNA, F. S. L. *et al.* Recognition of the phenotype of thalidomide embryopathy in countries endemic for leprosy: new cases and review of the main dysmorphological findings. *Clinical Dysmorphology*, v.22, n.2, p.59-63, 2013.

WAALKES, M. P. Cadmium carcinogenesis in review. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v.79, p.241-244, 2000.

WATANABE, M. *et al.* Establishment of the human BSMZ breast cancer cell line, which overexpresses the *erbB-2* and *c-myc* genes. *Cancer Research*, v.52, p.5178-5182, 1992.

YASHUI, K. *et al.* Thalidomide as an immunotherapeutic agent: the effects on neutrophil-mediated inflammation. *Current Pharmaceutical Design*, v.11, p.395-401, 2005.

YASUI, K. Thalidomide as immunomodulatory drug: pharmacological actions and its indications. *Jpn. J. Clin. Immunol.*, v.33, p.5, p.229-233, 2010.

10. APÊNDICES

APÊNDICE A. PRODUÇÃO CIENTÍFICA RELACIONADA À DISSERTAÇÃO NO PERÍODO DE MARÇO DE 2012 A DEZEMBRO DE 2013.

RESUMOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

- **REIS, D. C.**; SILVA, I. L. D.; LUNA, A.; PINTO, S. G. B.; CAMPOS, L.C; SOUZA, C. M.; SILVA, A. C. A.; LOPES, M. T. P.; FERREIRA, E.; CASSALI, G. D. Thalidomide treatment in 4t1 murine mamary cancer: analysis of tumor growth and clinical parameters at diferent doses. *III Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental*, Tiradentes, 2013.

- ALICE LUNA; **DIEGO CARLOS DOS REIS**, ISTÉFANI LUCIENE DAYSE DA SILVA; SOPHIA GIA BRANDÃO PINTO; LILIANE CUNHA CAMPOS; CRISTINA MARIA DE SOUZA; ANA CÂNDIDA ARAÚJO E SILVA; MIRIAM TERESA PAZ LOPES; ENIO FERREIRA; GIOVANNA VIEIRA MOREIRA; NICOLLE CAMILLA RODRIGUES DA SILVA; GEOVANNI DANTAS CASSALI. Avaliação de diferentes doses de talidomida no crescimento do carcinoma mamário murino 4T1. *XXII Semana de Iniciação Científica da UFMG*, Belo Horizonte, 2013.

- SOPHIA GIA BRANDÃO PINTO; **DIEGO CARLOS DOS REIS**; GIOVANNA VIEIRA MOREIRA; MIRIAM TERESA PAZ LOPES; JAQUELINE AMORIM ARANTES; ANA CÂNDIDA ARAÚJO E SILVA; GEOVANNI DANTAS CASSALI; ENIO FERREIRA. Redução de linfócitos CD3+ após tratamento com talidomida em camundongos com carcinoma mamário murino 4T1. *XXII Semana de Iniciação Científica da UFMG*, Belo Horizonte, 2013.

- ARANTES, J. A.; **REIS, D. C.**; CAMPOS, L.C; SILVA, A. C. A.; FERREIRA, E.; CASSALI, G.D. Comportamento leucocitário sérico e tecidual em camundongos com carcinoma mamário murino 4T1 tratados com talidomida. *XV Simpósio Mineiro de Oncologia e 15º Encontro de Ex-residentes do CEOMG*, Belo Horizonte, 2013.

- PINTO, S. G. B.; **REIS, D. C.**; SOUZA, C. M.; LOPES, M. T. P.; FERREIRA, E.; CASSALI, G.D. Estudo da proliferação celular no carcinoma mamário murino 4T1 em

camundongos tratados com talidomida. *XV Simpósio Mineiro de Oncologia e 15º Encontro de Ex-residentes do CEOMG*, Belo Horizonte, 2013.

- **REIS, D. C.**; SOUZA, C. M.; FERREIRA, E.; SILVA, A. C. A.; LOPES, M. T. P.; CASSALI, G. D. Avaliação do infiltrado inflamatória do carcinoma mamário murino 4T1 após o tratamento com talidomida. *III Encontro de Patologia*, 2012.

APÊNDICE B. PRODUÇÃO CIENTÍFICA NÃO RELACIONADA À DISSERTAÇÃO NO PERÍODO DE MARÇO DE 2012 A DEZEMBRO DE 2013.

RESUMOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

- SILVA, N. C. R.; CARVALHO, L. A.; **REIS, D. C.**; BOSCO, Y. O.; SOUZA, C. M.; CARDOSO, V. N.; CASSALI, G. D. ; OLIVEIRA, D. R. Influence of the composition of dietary lipids in developing murine mammary carcinoma 4T1. *III Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental*, Tiradentes, 2013.

- VELOSO, E. S.; **REIS, D. C.**; CASSALI, G. D.; FERREIRA, E. Gastrointestinal metastasis of spontaneous mammary tumor in swiss mice. *III Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental*, Tiradentes, 2013.

- PINTO, S. G. B.; **REIS, D. C.**; MOREIRA, G. V.; ARANTES, J. A.; SILVA, A.C.A ; LOPES, M. T. P ; FERREIRA, E. ; CASSALI, G.D. Reduction of CD3+ lymphocytes after with thalidomide in mice 4T1 murine mammary carcinoma. *III Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental*, Tiradentes, 2013.

- MOREIRA, G. V.; **REIS, D. C.**; PINTO, S. G. B.; CAMPOS, L. C.; SILVA, A. C. A; LOPES, M. T. P; FERREIRA, E.; CASSALI, G. D. Evaluation of survival rate and tumor progression of 4T1 mammary cancer. *III Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental*, Tiradentes, 2013.

- SILVA, I. L. D. ; **REIS, D. C.**; QUARESMA, B. M. ; ABREU, R. V. S. ; CASSALI, G.D ; FERREIRA, E. Relationship between CD3+ lymphocytes and the development of lung

metastasis of murine mammary adenocarcinoma 4T1 cells after surgical resection of the primary tumor. *III Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental*, Tiradentes, 2013.

- **DIEGO CARLOS DOS REIS**; CRISTINA MARIA DE SOUZA; LILIANE CUNHA CAMPOS; ANA CANDIDA ARAÚJO E SILVA; MIRIAM TERESA PAZ LOPES; ENIO FERREIRA; GEOVANNI DANTAS CASSALI. Talidomida promove leucocitose em camundongos inoculados com o carcinoma mamário murino 4T1. *II Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária, (XVI ENAPAVE)*, Curitiba, 2013.

Publicado como resumo expandido em *Anais do II Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária, (XVI ENAPAVE)*, Curitiba, 2013.

- MARINA RIOS DE ARAÚJO; KARINE ARAÚJO DAMASCENO; CONRADO DE OLIVEIRA GAMBA; **DIEGO CARLOS DOS REIS**; ENIO FERREIRA; GEOVANNI DANTAS CASSALI. Tumor filoides da glândula mamária canina: relato de cinco casos. *II Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária, (XVI ENAPAVE)*, Curitiba, 2013.

Publicado como resumo expandido em *Anais do II Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária, (XVI ENAPAVE)*, Curitiba, 2013.

- LIDIANNE NARDUCCI MONTEIRO; MARINA RIOS DE ARAÚJO; **DIEGO CARLOS DOS REIS**; CECÍLIA BONOLO DE CAMPOS, ENIO FERREIRA; GEOVANNI DANTAS CASSALI. Teratoma Maligno extragnodal em um cão. *II Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária, (XVI ENAPAVE)*, Curitiba, 2013.

Publicado como resumo expandido em *Anais do II Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária, (XVI ENAPAVE)*, Curitiba, 2013.

- EMERSON SOARES VELOSO; ISTEFANI LUCIENE DAYSE DA SILVA; **DIEGO CARLOS DOS REIS**; RAFAEL VÍTOR DOS SANTOS ABREU; BRUNA MARQUES QUARESMA; SOPHIA GIA BRANDÃO PINTO; MIRIAM TERESA PAZ LOPES; ANA CÂNDIDA ARAÚJO E SILVA; GEOVANNI DANTAS CASSALI; ENIO FERREIRA. Identificação de linfócitos CD3+ em metástases pulmonares do adenocarcinoma mamário murino 4T1 após ressecção cirúrgica do tumor primário. *XXII Semana de Iniciação Científica da UFMG*, Belo Horizonte, 2013.

- GIOVANNA VIERA MOREIRA; **DIEGO CARLOS DOS REIS**; SOPHIA GIA BRANDÃO PINTO; LILIANE CUNHA CAMPOS; MIRIAM TERESA PAZ LOPES; ENIO FERREIRA; GEOVANNE DANTAS CASSALI. Avaliação de índice de sobrevida e progressão tumoral no carcinoma mamário murino 4T1. *XXII Semana de Iniciação Científica da UFMG*, Belo Horizonte, 2013.

PRÊMIO: Trabalho premiado como relevância acadêmica na *XXII Semana de Iniciação Científica da UFMG*.

- **REIS, D. C.**; AULER, P. A.; FERRACIOLLI, C. J.; SOUZA, C. M.; FERREIRA, E.; CASSALI, G.D. Cetoprofeno inibe a proliferação celular do tumor sólido de Ehrlich em camundongos. *XIV Simpósio Mineiro de Oncologia e 14º Encontro de Ex-residentes do CEOMG*, Belo Horizonte, 2012.

- **REIS, D. C.**; SOUZA, C. M.; CASSALI, G. D. Efeito da carboplatina nos parâmetros bioquímicos de camundongos inoculados com o tumor experimental de células 4T1. *XIV Simpósio Mineiro de Oncologia e 14º Encontro de Ex-residentes do CEOMG*, Belo Horizonte, 2012.

- GIOVANNA VIEIRA MOREIRA; **DIEGO CARLOS REIS**; CRISTINA MARIA DE SOUZA; LILIANE CUNHA CAMPOS; ANA CANDIDA ARAÚJO E SILVA; MIRIAM TERESA PAZ LOPES; ENIO FERREIRA; GEOVANNI DANTAS CASSALI. Avaliação hematológica em animais portadores do tumor experimental de células 4T1 tratados com talidomida. *XXI Semana de Iniciação Científica da UFMG*, 2012.

ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

- CRISTINA MARIA DE SOUZA; ANA CANDIDA ARAÚJO E SILVA; CLARISSA DE JESUS FERRACIOLLI; GIOVANNA VIEIRA MOREIRA ; LILIANE CUNHA CAMPOS; **DIEGO CARLOS DOS REIS**; MIRIAM TERESA PAZ LOPES; MÔNICA ALVES NEVES DINIZ FERREIRA; SILVIA PASSOS ANDRADE; GEOVANNI DANTAS CASSALI. Combination therapy with carboplatin and thalidomide suppresses tumor growth and metastasis in 4T1 murine breast cancer model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*^{JCR}, v. xx, p. xx, 2013.

ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO EM PERIÓDICOS

DIEGO CARLOS DOS REIS; CRISTINA MARIA DE SOUZA; LILIANE CUNHA CAMPOS; ANA CANDIDA ARAÚJO E SILVA; MIRIAM TERESA PAZ LOPES; GEOVANNI DANTAS CASSALI; ENIO FERREIRA. Talidomida promove leucocitose em camundongos inoculados com carcinoma mamário murino 4T1. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* (Online).

- SOUZA, C. M.; AULER, P. A.; **REIS, D. C.**; LAVALLE, G. E.; FERREIRA, E.; CASSALI, G. D. Administração subcutânea de cetoprofeno inibe o crescimento do tumor de Ehrlich em camundongos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*.

11. ANEXOS

ANEXO A. Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal – CETEA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 261/2012, relativo ao projeto intitulado “Avaliação do infiltrado inflamatório do carcinoma mamário murino 4T1 após o tratamento com talidomida”, que tem como responsável Geovanni Dantas Cassali, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 13/09/2012. Este certificado espira-se em 13/09/2017.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 261 / 2012, related to the Project entitled “Inflammatory infiltrate evaluation in murine 4T1 mammary carcinoma after thalidomide treatment.”, under the supervision of Geovanni Dantas Cassali, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 13/09/2012. This certificates expires in 13/09/2017.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS

Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte,
13/09/2012.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais

Avenida Antônio Carlos, 6627; Campus Pampulha

Unidade Administrativa II; 2º Andar, Sala 2005

Cep: 31270-901; Belo Horizonte, MG; Brasil

Telefone: (31) 3499-4516; Fax: (31) 3499-4592

www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO B. Submissão do artigo no periódico *Pathology, Research and Practice*.