LUIZ ROBERTO BIONDI

**Influência do hipotireoidismo na progressão do melanoma
experimental**

**São Paulo
2006**

LUIZ ROBERTO BIONDI

Influência do hipotireoidismo na progressão do melanoma experimental

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:
Patologia

Área de Concentração:
Patologia Experimental e Comparada

Orientador:
Prof. Dr. Mario Mariano

**São Paulo
2006**

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1696
FMVZ

Biondi, Luiz Roberto

Influência do hipotireoidismo na progressão do melanoma experimental / Luiz Roberto Biondi.- São Paulo: L. R. Biondi, 2006.
115 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2006.

Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Mario Mariano.

1. Melanoma. 2. Hipotireoidismo. 3. Propiltiouracil.
4. B16F10. 5. Camundongos I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Influência do hipotireoidismo experimental sobre a progressão do melanoma", protocolo nº380/2003, utilizando 52 (cinquenta e dois) camundongos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Mario Mariano, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado pela referida Comissão em reunião de 15/02/06.

(We certify that the Research "Influence of experimental hypothyroidism in melanoma porgression" protocol number 380/2003, utilizing 52 (fifty two) mice, under the responsibility of Prof. Dr. Mario Mariano, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of 02/15/06.

São Paulo, 16 de fevereiro de 2006

Prof.ª Dr.ª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BIONDI, Luiz Roberto

Título: Influência do hipotireoidismo na progressão do melanoma experimental

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

*À **Patrícia**, meu grande amor, por seu
companheirismo, amizade, apoio e
incentivo. Aos meus tesouros, **Felipe**
e **Bruna**, por encherem minha alma
de luz com seus olhinhos carinhosos.
A vida, dividida com vocês três, fica
muito fácil!*

*Aos meus queridos pais, **Franco e Neide**, por me darem tudo o que precisava: amor, amizade, educação, honestidade e, principalmente, três irmãos maravilhosos: **Bete, Giancarlo e Gianfranco!***

*Ao meu mestre e orientador, **Prof. Dr. Mario Mariano**, por sua visão da ciência, da pesquisa e da vida e por descortinar, a mim, os caminhos do trabalho científico: um ídolo!*

AGRADECIMENTOS

Ao meu mestre, **Prof. Dr. Vicente Borelli**, Diretor da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Metropolitana de Santos, um exemplo de determinação e amor à nossa profissão, agradeço pelos ensinamentos profissionais e de vida e pela confiança depositada em mim, tornando este sonho possível.

Ao **Prof. Dr. Mario Mariano**, por tornar possível este projeto e pela orientação amigável e quase paternal com que me conduziu durante a execução deste trabalho.

A **Dra. Renata Garcia de Siqueira Viegas da Cruz**, Magnífica Reitora da Universidade Metropolitana de Santos, pela confiança e pelo respeito que sempre dedicou ao trabalho que desenvolvo nesta Instituição.

Ao **Prof. Dr. Pedro Fernandes Lara** do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pelo carinho com que fui recebido, pelas suas inestimáveis orientações e por ter cedido o Iodo Radioativo, permitindo a execução de importante fase deste experimento.

Ao **Prof. Dr. Idécio Luiz Sinhorini**, pela acolhida, pelos bons conselhos e pelo auxílio na execução das fotomicrografias.

Ao **Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira** e **Dra. Priscila Viau Furtado**, do Laboratório de Dosagens Hormonais da FMVZ-USP, pela orientação e atenção dispensada no processamento das amostras.

A **Profa. Dra. Fernanda I. Staquicini** (Fê), ex-pós-graduanda do Departamento de Imunologia do Edifício de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de São Paulo que, com paciência e competência, pegou-me pelas mãos e guiou-me pelos caminhos da pesquisa, ensinando-me as técnicas laboratoriais necessárias para execução desse trabalho e pelas dicas que, sem elas, não teria obtido sucesso.

A **Fabiana Aliperti** (Fabi), pós-graduanda do Departamento de Imunologia do Edifício de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de São Paulo que, sem sua colaboração e carinho, cuidando de minhas culturas de células de melanoma, este trabalho teria sido muito mais difícil.

A **Geova Pereira dos Santos** (Geo), técnico bioterista do Biotério do Departamento de Imunologia do Edifício de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de São Paulo, pela colaboração e pelos cuidados com os animais deste experimento.

Ao **Prof. Dr. Kleber da Cunha Peixoto Júnior**, pelo auxílio na confecção e interpretação das análises estatísticas.

À **Prof. Dra. Georgea Bignardi Jarreta**, pela gentil correção do texto em inglês.

A **Alan de Jesus** e **Roberto Moraes Lima**, funcionários do Hospital Veterinário da Universidade Metropolitana de Santos, pela dedicação e cuidados com os animais utilizados neste experimento.

Aos demais **funcionários do Hospital Veterinário da Universidade Metropolitana de Santos** que, pela dedicação e carinho, indiretamente colaboraram pelo êxito deste trabalho.

Aos **médicos veterinários do Curso de Aprimoramento Profissional do Hospital Veterinário da Universidade Metropolitana de Santos**, turmas de 2004, 2005 e 2006, pela dedicação ao manterem a rotina de atendimento do Hospital Veterinário, a despeito de minhas ausências ao frequentar as disciplinas de pós-graduação e durante a execução da parte experimental deste trabalho.

À querida **Silvia A. Sochiarelli**, secretária do Curso de Pós-graduação do Departamento de Patologia, pela sua sempre sorridente e cordial orientação.

A todos **docentes e funcionários do Departamento de Patologia** me auxiliaram com seus conselhos e orientações.

À equipe de bibliotecárias da Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, particularmente a **Sra. Elza Faquim**, pela atenciosa revisão, produção da ficha catalográfica e pelo apoio e aconselhamento.

Aos meus queridos **Nina** e **Léo**, companheiros e amigos incondicionais, pela pureza de suas almas, que só é possível aos animais.

Aos **Laboratórios Pfizer Ltda**, por ter cedido o medicamento Propil®

À **Medicina Veterinária**, profissão que desempenho com paixão e dedicação, grande motivadora deste trabalho.

RESUMO

BIONDI, L. B. **Influência do hipotireoidismo na progressão do melanoma experimental.** [Influence of hypothyroidism on experimental melanoma progression]. 2006. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos do hipotireoidismo experimental induzido mediante utilização da droga propiltiouracil ou por tireoidectomia actínica, utilizando-se Iodo¹³¹, sobre o crescimento tumoral local e potencial metastático do melanoma murino, cepa B16F10 em camundongos C57BL6. O trabalho constituiu-se de dois experimentos distintos: 1. Influência do hipotireoidismo sobre o crescimento local e sobrevida, mediante indução do hipotireoidismo com propiltiouracil (PTU) a 0,05% na água de bebida e inoculação de células B16F10 por via subcutânea. 2. Influência do hipotireoidismo sobre o potencial metastático, onde os animais foram submetidos aos seguintes tratamentos: água (CTRL_M); indução do hipotireoidismo com propiltiouracil a 0,05% na água de bebida (PTU_M); indução do hipotireoidismo com Iodo¹³¹ (I¹³¹_M) e do hipertireoidismo com L-tiroxina a 0,00005% na água de bebida (T4_M) e posterior inoculação de células B16F10, por via intravenosa. No experimento 1, os parâmetros avaliados consistiram na medida do volume tumoral e taxa de sobrevida. Os volumes tumorais variaram de 1,8 mm³ a 10.673,1 mm³. Na média diária dos volumes tumorais, o menor valor foi de 1,6 mm³ enquanto o maior volume obtido foi de 8140,9 mm³. A análise estatística das médias dos volumes, mediante teste de T não pareado, não indicou diferença significativa entre os grupos CTRL_L (controle) e PTU_L (tratado), com p = 0,795 para o teste de T e p = 0,5759 para o teste de F, para um intervalo de confiança de 95%. A média da sobrevida foi de 22 dias para o grupo CTRL_L e 21 dias para o grupo PTU_L. A análise estatística dos dados de sobrevida seguiu o Teste de Mantel-Haensze, não havendo diferença significativa na evolução da sobrevida entre os grupos, com p = 0,752 para um intervalo de confiança de 95%. No experimento 2, o parâmetro avaliado consistiu no número de nódulos metastáticos mediante contagem dos nódulos na superfície dos pulmões dos animais, após eutanásia. A distribuição de nódulos tumorais pulmonares apresentou média de 32 nódulos para o grupo CTRL_M; 91 nódulos

para o grupo PTU_M; 23 nódulos para o grupo T4_M e 77 nódulos para o grupo I¹³¹_M. Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) entre os grupos CTRL_M *versus* PTU_M e I¹³¹_M e entre os grupos T4_M *versus* PTU_M e I¹³¹_M. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos CTRL_M *versus* T4_M e entre os grupos PTU_M *versus* I¹³¹_M. Os estudos estatísticos foram realizados mediante Teste de Análise de Variância simples (ANOVA) e aplicação de pós-teste de Dunnett, de múltipla comparação. Concluiu-se que o hipotireoidismo não interferiu no crescimento local da cepa B16F10 do melanoma murino em camundongos C57BL6 e significativamente alterou o comportamento metastático da referida cepa nesta linhagem isogênica, favorecendo a formação de nódulos metastáticos nos animais em que este estado patológico foi induzido, quer pela utilização de droga antitireoidiana PTU, quer pela tireoidectomia actínica com I¹³¹, no entanto, a administração de L-tiroxina não acarretou o efeito contrário.

Palavras-chave: Melanoma. Hipotireoidismo. Propiltiouracil. B16F10. Camundongos

ABSTRACT

BIONDI, L. B. **Influence of hypothyroidism on experimental melanoma progression.** [Influência do hipotireoidismo na progressão do melanoma experimental]. 2006. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

The aim of this study was to evaluate the effects of hypothyroidism induced by propylthiouracil or by actinic thyroidectomy, using I^{131} , on focal and methastatic tumor growth of murine melanoma, B16F10, in mice C57BL6. The study was consisted of two different assays: 1. the influence of hypothyroidism on the focal growth and survival rate, by hypothyroidism induction with propylthiouracil (PTU) 0.05% in drinking water and subcutaneous inoculation of B16F10 and 2. the influence of hypothyroidism on the methastatic potential, were the animals underwent the followed treatments: drinking water (CTRL_L), hypothyroidism induction by propylthiouracil on 0.05% in drinking water (PTU_M group), hypothyroidism induction by I^{131} (I131_M group) and hypothyroidism induction by L-tiroxine on 0.00005% in drinking water (T4_M group). B16F10 cells were intravenously inoculated in all groups. On the first assay, the tumor volume was measured and the survival rate was evaluated. The tumor volumes ranged from 1.8 mm³ to 10673.1 mm³. Regarding the daily mean of tumor volumes, the lowest volume was 1.6 mm³ while the highest one was 8140.9 mm³. A statistical analysis of the tumor volumes was performed using unpaired T test and it showed no significant difference between group CTRL_L (control) and group PTU_L (treated one) (with $p=0.795$ on T test and $p= 0.5759$ on F test, using a confidence interval of 95%). The survival rate mean was 22 days on group CTRL_L and 21 days on group PTU_L. The Mantel-Haenszel (logrank) test was used for statistical analysis of these data, and there was no significant difference on the survival rate between groups CTRL_L and PTU_L (with $p=0.752$ and confidence interval of 95%). On the second assay, the number of methastatic nodules on the lung surface after euthanasia was evaluated. Regarding the lung nodules distribution, 32 nodules were found on group CTRL_M, 91 nodules were found on group CTRL_M, 23 on group T4_M and 77 on group I^{131} _M. There was a statistically significant difference ($p<0.01$) between groups CTRL_M and PTU_M / I131_M and between groups T4_M and PTU_M / I131_M. No significant difference

was observed ($p>0.05$) between groups CTRL_M and T4_M and between groups PTU_M and I^{131} _M. ANOVA test was used for statistical analysis, followed by multiple comparison Dunnett's post test. It was concluded that hypothyroidism did not have any influence on the focal growth of the murine melanoma B16F10 in mice C57BL6 and significantly did alter the methastatic behavior of that clone in this isogenic lineage, enhancing the methastatic nodules formation in the animals who were induced to this pathological condition, either by PTU or by actinic thyroidectomy, using I^{131} ; however, the administration of L-tiroxine did not show the opposite effect.

Key words: Melanoma. Hypothyroidism. Propylthiouracil. B16F10. Mouse

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Avaliação do crescimento tumoral local – Representação gráfica da evolução do volume tumoral em relação ao tempo pós-inoculação, grupos CTRL_L e PTU_L.....	61
Figura 2 -	Avaliação do crescimento tumoral local - Representação gráfica das médias dos volumes tumorais, grupos CTRL_M e PTU_M.....	61
Figura 3 -	Avaliação do crescimento tumoral local – Representação gráfica da sobrevida dos grupos CTRL_L e PTU_L, curva de Kaplan-Meier.....	63
Figura 4 -	Avaliação do potencial metastático (nidação) – Representação gráfica da distribuição do número de nódulos superficiais pulmonares e respectiva média (linha cheia).....	66
Figura 5 -	Avaliação do potencial metastático (nidação) – Representação gráfica das médias do número de nódulos superficiais pulmonares e desvio padrão.....	67
Figura 6 -	Avaliação do potencial metastático (nidação) Macrofotografia de pulmões, hemiface dorsal do órgão.....	69
Figura 7 -	Avaliação do potencial metastático (nidação). Fotomicrografias de cortes histológicos de pulmão, corados pelo método de HE. Aumento 76x.....	70
Figura 8 -	Avaliação do potencial metastático (nidação). Fotomicrografias de cortes histológicos de pulmão, corados pelo método de HE. Aumento 76x.....	71
Figura 9 -	Avaliação do potencial metastático (nidação). Fotomicrografias de cortes histológicos de pulmão, corados pelo método de HE. Aumento 76x.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Volume tumoral por indivíduo e dia após inoculação subcutânea Avaliação do crescimento tumoral local Grupo CTRL_L (controle).....	58
Tabela 2 -	Volume tumoral por indivíduo e dia após inoculação subcutânea Avaliação do crescimento tumoral local Grupo PTU_L (tratado).....	59
Tabela 3 -	Volume tumoral médio em relação ao dia após inoculação subcutânea . Avaliação do crescimento tumoral local CTRL_L x PTU_L.....	60
Tabela 4 -	Comparação entre as médias dos volumes tumorais Avaliação do crescimento tumoral local CTRL_L x PTU_L.....	60
Tabela 5 -	Evolução dos óbitos em relação ao dia após a inoculação subcutânea. Avaliação do crescimento tumoral local (CTRL_L e PTU_L).....	62
Tabela 6 -	Porcentagem de animais vivos em relação ao dia após inoculação subcutânea. Avaliação do crescimento tumoral local CTRL_L x PTU_L.....	63
Tabela 7 -	Peso médio dos grupos, consumo médio de ração e solução de bebida Avaliação do crescimento tumoral local CTRL_L x PTU_L.....	64
Tabela 8 -	Peso médio dos animais durante o experimento em relação ao dia após inoculação Avaliação do crescimento local. CTRL_L x PTU_L.....	65

Tabela 9 -	Distribuição dos nódulos pulmonares metastáticos, contados na superfície dos pulmões. Avaliação do potencial metastático Grupos CTRL_M; T4_M; PTU_M e I ¹³¹ _M.....	66
Tabela 10 -	Média dos nódulos metastáticos pulmonares. Avaliação do potencial metastático Grupos CTRL_M; T4_M; PTU_M e I ¹³¹ _M.....	67
Tabela 11 -	Peso médio dos animais, consumo médio de ração e solução de bebida Avaliação do potencial metastático.....	73
Tabela 12 -	Tiroxina sérica (T4 Total) Grupos CTRL_M; T4_M; PTU_M e I ¹³¹ _M e eutireoidiano – média obtida conforme descrito em <i>material e métodos</i> Avaliação do potencial metastático.....	74

LISTA DED ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
[¹²⁵ I]T ₃	Triiodotironina marcada com iodo radioativo isótopo 125
[³ H]timidina	Timidina tritiada
μCi	Microcurrie
μg	Micrograma
μL	Microlitro
201T	Cepa de adenocarcinoma pulmonar humano
2-ME	2-mercaptoetanol
3LL	Cepa de carcinoma pulmonar de Lewis
A/J	Linhagem de camundongos isogênicos
A/Jax	Linhagem de camundongos isogênicos
AAF	2-acetilaminofluoreno
ANOVA	Análise de Variância
B16F10	Cepa do melanoma murino
BALB/c	Linhagem de camundongos isogênicos
C3H/he	Linhagem de camundongos isogênicos
C3H/HeN	Linhagem de camundongos isogênicos
C57BL/6	Linhagem de camundongos isogênicos
C57BL6J	Linhagem de camundongos isogênicos
CBA/J	Linhagem de camundongos isogênicos
CTRL	Controle
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DU145	Cepa de adenocarcinoma prostático humano

ED ₅₀	Dose de uma droga que é farmacologicamente ativa a 50% de uma população ou sistema biológico exposto a esta droga
EUA	Estados Unidos da América
FT4	T4 livre
GH	Hormônio de crescimento
GSTP	lesões hepáticas hiperplásicas -glutamil transpeptidase placentária positivas
HEPES	ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfônico
HPB	Hiperplasia prostática benigna
I ¹³¹	Iodo radioativo isótopo 131
IFN	Interferon
IFN- ₂	Interferon alfa 2
IL-2	Interleucina 2
IMC	Índice de Massa Corporal
INCA	Instituto Nacional do Câncer
iodo ¹³¹	Iodo radioativo isótopo 131
kg	Quilograma
LAK	Células Matadoras Ativadas por Linfocina
LDH	Laboratório de Dosagens Hormonais – FMVZ – USP
L-tiroxina	Levotiroxina sódica
mCi	Milicurrie
MES	Melanoma expansivo superficial
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MLA	Melanoma lentiginoso acral

MLM	Melanoma lentigo maligno
MME	Metaloelastase
MMP	Metalo proteinase
MN	Melanoma nodular
°C	Graus Celsius
PA	Puro para análise
PBI	Ligação protéica do iodeto
PBS-EDTA	Tampão salino acrescido de enzima proteolítica
PC3	Cepa de adenocarcinoma prostático humano
PTEN/MMAC1	Gene supressor de tumor
PTU	Propiltiouracil
RIA	Radioimunoensaio
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Meio para cultivo celular
T241	Cepa de fibrossarcoma
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
T4 T	Tiroxina sérica total
TPO	Peroxidase tireoidiana
TR	Receptor de hormônio tireoidiano
TRH	Hormônio Liberador de Tirotropina
TSH	Hormônio Estimulador da Tireóide ou tirotropina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
3	OBJETIVOS.....	44
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1	Animais.....	45
4.2	Indução do Hipotireoidismo.....	47
4.2.1	<i>Indução pelo PTU.....</i>	47
4.2.1.1	Escolha da droga.....	48
4.2.1.2	Solução estoque.....	48
4.2.1.3	Solução de bebida.....	49
4.2.2	<i>Indução pela tireoidectomia actínica.....</i>	49
4.3	Indução do Hipertireoidismo.....	50
4.3.1	<i>Solução estoque.....</i>	50
4.3.2	<i>Solução de bebida.....</i>	51
4.4	Melanoma.....	52
4.4.1	<i>Linhagem Celular e Cultura de Células.....</i>	52
4.4.2	<i>Viabilidade Celular.....</i>	53
4.4.3	<i>Preparo das Células para Utilização In Vitro.....</i>	54
4.5	Desenvolvimento Tumoral.....	54
4.5.1	<i>Experimento para Avaliação do Efeito do Hipotireoidismo sobre o Crescimento Tumoral Local.....</i>	54
4.5.2	<i>Experimento para Avaliação do Efeito do Hipotireoidismo e do Hipertireodismo sobre o Potencial Metastático (nidação)...</i>	55

4.6	Dosagem Hormonal.....	56
4.7	Estudo Histopatológico.....	56
4.8	Análise Estatística.....	57
5	RESULTADOS.....	58
5.1	Efeito do Hipotireoidismo sobre o crescimento tumoral local.....	58
5.1.1	<i>Avaliação do Crescimento Tumoral Local.....</i>	58
5.1.2	<i>Avaliação da Sobrevida.....</i>	62
5.1.3	<i>Estudo Anatomopatológico.....</i>	64
5.1.4	<i>Controle de Peso e Consumo de Água e Alimento.....</i>	64
5.2	Efeito do Hipotireoidismo e do Hipertireodismo sobre o Potencial Metastático.....	65
5.2.1	<i>Avaliação da Capacidade do Potencial Metastático (Nidação)..</i>	65
5.2.2	<i>Estudo Anatomopatológico.....</i>	68
5.2.3	<i>Estudo Histopatológico.....</i>	68
5.2.4	<i>Controle de Peso e Consumo de Água e Alimento.....</i>	73
5.2.5	<i>Dosagem de T4 Total.....</i>	73
6	DISCUSSÃO.....	75
7	CONCLUSÃO.....	99
	REFERÊNCIAS.....	100
	APÊNDICE.....	115

1 INTRODUÇÃO

A observação clínica de dois animais da espécie canina, ambos portadores de doença maligna, respectivamente linfoma centrobástico e adenocarcinoma ovariano com efusão sanguinolenta abdominal e que, contrariamente à literatura, apresentaram sobrevida superior à descrita para estes casos, suscitou a suspeita que poderia haver um elo entre estes animais que justificasse seu melhor desempenho frente à doença maligna. A revisão dos registros destes animais revelou como característica comum o fato de apresentarem, concomitantemente, doença tireoidiana, especificamente o hipotireoidismo.

Os indícios que o hipotireoidismo poderia, de alguma maneira, contribuir para um curso favorável da doença primária, motivou este trabalho, associada à constatação que a relação entre hipotireoidismo e câncer vem sendo há tempos, motivo de estudos e controvérsias.

Optou-se como modelo de estudo o melanoma murino, pela facilidade de execução, por ter sido objeto de vários estudos e, a princípio, por não sofrer influências hormonais diretas, diferentemente dos modelos relatados anteriormente na literatura, onde o componente hormonal fez-se presente, como nos modelos com células do hepatoma, de tumores prostáticos e mamários.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os tumores de pele constituem-se nas neoplasias mais comuns na espécie humana, compreendendo 40% de todos os tumores diagnosticados nos Estados Unidos da América (EUA) nos últimos anos. A ocorrência do melanoma, a mais freqüente neoplasia fatal da pele, aumentou em 15 vezes nos últimos 60 anos, sendo que sua incidência tem aumentado mais rapidamente que as demais neoplasias de pele, tornando-se um problema de saúde pública, particularmente entre as pessoas de pele clara, que respondem por 83% dos casos da doença (GILCHREST et al., 1999; MARTINEZ; OTLEY, 2001).

Contrariamente às demais neoplasias, em que os avanços tecnológicos têm contribuído para a diminuição dos óbitos, a taxa de mortalidade do melanoma vem aumentando nos EUA, com incremento de 38,9% entre 1973 e 1996. Enquanto foram registrados 54.200 novos casos de melanoma em 2003 neste país, a estimativa de 2005 saltou para 59.580 casos novos, sendo 46.170 casos de melanoma *in situ* e 13.410 casos de melanoma invasivo, responsável por 7.770 mortes. Entre 1998 e 2002, a média etária dos casos diagnosticados foi de 57 anos enquanto a média de idade dos indivíduos que vieram a óbito foi de 67 anos. Não há predisposição sexual, com distribuição praticamente eqüitativa em ambos os sexos, correspondendo a 4% dos tumores malignos no homem e a 3% das neoplasias na mulher (JEMAL et al., 2003; JEMAL et al., 2005; NCI-SEER, 2006; PERLIS; HERLYN, 2004).

No Brasil, os coeficientes de incidência do melanoma situam-se em padrões intermediários se comparados às cifras mundiais, merecendo particular atenção cidades ao sul do país, que apresentam os maiores índices de ocorrência, embora

os registros brasileiros de bases populacionais possam não refletir precisamente a real dimensão do problema. Em comparação com dados relativos ao período 1979-1982 e do ano 1987, constatou-se aumento relativo de 38% na incidência do melanoma entre homens e de 11% entre mulheres no município de Porto Alegre, local de maior ocorrência do melanoma cutâneo no país. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) são esperados 2.710 novos casos de melanoma entre a população masculina e de 3050 novos casos entre a população feminina, para o ano de 2006 (FERNANDES et al., 2005; INCA, 2006; MENDONÇA, 1992).

O melanoma foi descrito pela primeira vez por Hipócrates no século V sendo o termo *melanoma* sugerido por Carswell em 1938, que relatou as características malignas do tumor. O termo *melanoma* implica, em si, um processo maligno, portanto, o uso do adjetivo “benigno” é contraditório e deve ser evitado, devendo ser utilizado o termo *melanocitoma* para a forma benigna dos tumores melanocíticos (DAVIS, 1985; DICK et al., 1988).

Desde que Sir James Paget observou, em 1864, que nevos pigmentados poderiam originar formações cancerosas, as causas do melanoma tem sido motivo de controvérsias. De etiologia desconhecida, acredita-se que vários fatores contribuam para o surgimento do melanoma como: predisposição genética, traumatismos repetidos em nevos preexistentes, alterações hormonais, viroses, deficiências imunológicas e, particularmente, exposição à luz solar. Aparentemente, a exposição à radiação ultravioleta de forma intensa e intermitente não daria aos melanócitos tempo suficiente para a produção de melanina, que os protegeria a si mesmos. Por sua vez, os melanócitos expostos à radiação sofreriam lesões no DNA e mutações, particularmente aquelas envolvendo o gene supressor de tumor PTEN/MMAC1, onde a perda de heterozigose foi detectada em mais de 40% das

linhagens de melanoma (ADAM; EFRON, 1983; DICK et al., 1988; GREEN, 1984; PERLIS; HERLYN, 2004; SAIDA, 2001).

O melanoma surge a partir de lesão proveniente do tecido neuroectodérmico, decorrente da proliferação sem controle dos melanoblastos, células precursoras dos melanócitos e responsáveis pela produção de pigmento da pele. Estas células, originárias da crista neural, retêm muitas características morfológicas e funcionais remanescentes dos neurônios, e ativamente migram durante o desenvolvimento embrionário para locais como a pele, olhos, superfícies mucosas e sistema nervoso. No entanto, não há correlação entre a densidade relativa de melanócitos e a frequência do melanoma em determinada região do organismo (ADAM; EFRON, 1983; ELLERHORST et al., 2004; SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002).

Consideram-se quatro tipos principais de melanoma: melanoma expansivo superficial (MES), o mais freqüente, correspondendo a 70% dos casos; melanoma nodular (MN) que responde por 15 a 30% dos casos; melanoma lentiginoso acral (MLA) que acomete principalmente pessoas de pele escura (negros) e melanoma lentigo maligno (MLM), que responde por 5% dos casos. O melanoma apresenta duas fases biológicas distintas: de crescimento horizontal ou radial, em que apenas está envolvida a epiderme, e de crescimento vertical, onde há invasão da derme possibilitando a ocorrência de disseminação hematológica e formação de metástases, não sendo raras as complicações por metástases pulmonares em nódulo único ou mesmo multi-nodulares (FERNANDES et al., 2005; SU, 1997).

De evolução imprevisível, pode regredir espontaneamente ou levar à morte rapidamente e, embora muito raramente, pode manifestar-se como tumor primário em outros órgãos como cavidade oral, pálpebras, esôfago, leptomeninges, trato urinário, fígado, ovários, glândulas adrenais, reto, ânus e pulmões (DOMINGUES;

GIL; BRUSSA, 1992; JOHNSON; HAMILTON; LOWE, 1998; MARTINEZ; OTLEY, 2001; OST et al., 1999; VAZIRI et al., 2002; WEYANDT et al., 2003).

Podendo ocorrer em todas as espécies de vertebrados, o melanoma já foi descrito inclusive em anfíbios, répteis, peixes, aves e em animais de laboratório, na sua forma espontânea (CHEVILLE, 1994; SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002).

Nos cães, acomete principalmente animais com mais de 10 anos de idade e é responsável por 4 a 7% das neoplasias e 9 a 20% dos tumores de pele que acometem esta espécie. O sítio de predileção é a mucosa oral, em uma apresentação invasiva, com larga propensão a metástases em linfonodos regionais e pulmões, embora sua apresentação em região palpebral também seja muito agressiva. Juntamente com o carcinoma de células escamosas e o fibrossarcoma, o melanoma bucal responde por mais de 50% das neoplasias de cavidade oral nos cães e, não raro, apresenta-se na forma amelanótica, tornando-se um desafio diagnóstico pela semelhança histológica com carcinomas, sarcomas, linfomas e tumores osteogênicos (BRODEY, 1960; KREHBIEL; LANGHAN, 1975; MODIANO; RITT; WOJCIESZYN, 1999; OAKES et al., 1993; RAMOS-VARA et al., 2000).

Contrariamente, os tumores melanocíticos são raros nos felinos, respondendo por menos de 1% das neoplasias de cavidade oral e aproximadamente 0,5% dos tumores de pele nesta espécie e, semelhante ao que ocorre na espécie canina, apresentam prognóstico ruim. (LINDE-SPIMAN et al., 1997; SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002).

Em eqüinos, corresponde entre 6 a 15% das neoplasias epiteliais e ocorre em 80% dos animais idosos de pelagem acinzentada (tordilho), devido a uma predisposição genética ligada a esta pelagem. Entre os animais selvagens, há relato

de melanoma em pálpebras do esquilo vermelho e na conjuntiva de veado (FUKUI et al., 2002; SAKAI et al., 2001; SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002).

Tanto no homem quanto nos animais, o melanoma responde pobremente às terapias antineoplásicas, particularmente quando em sua forma invasiva (PERLIS; HERLYN, 2004).

Os hormônios tireoidianos são reguladores-chaves do metabolismo e do desenvolvimento e são conhecidos por apresentarem efeitos pleiotrópicos em vários órgãos estando envolvidos na calorigênese, no desenvolvimento do sistema nervoso central, na síntese protéica e, inclusive, no processo de metamorfose dos anfíbios. A glândula tireóide sintetiza e libera triiodotironina (T3) e tiroxina (T4), que representam os únicos hormônios contendo iodo nos vertebrados. A tiroxina é o principal produto secretado pela glândula tireóide, e um processo de perda de iodo nos tecidos periféricos produz T3, o hormônio tireoidiano metabolicamente ativo. A triiodotironina e o T4 ligam-se à tireoglobulina, que provê a matriz para a síntese e estocagem destes hormônios pela tireóide. Mais de 99% do T3 e T4 circulantes estão ligados a proteínas, principalmente a proteína de ligação de T4 e, em menor proporção, a transtiretina e albumina, podendo fácil e rapidamente serem liberados destas proteínas para os tecidos periféricos. A produção dos hormônios tireoidianos é controlada pelo hormônio estimulador da tireóide (TSH) ou tirotropina, sintetizada pela hipófise anterior em resposta ao hormônio liberador de tirotropina (TRH) secretado pelo hipotálamo. Por sua vez, T3 e T4 não ligados ou livres exercem realimentação negativa sobre a síntese e liberação de TRH e TSH, objetivando manter os níveis circulantes de hormônios tireoidianos dentro da faixa de normalidade para a espécie. A ação dos hormônios tireoidianos é iniciada por sua interação com receptores de hormônio tireoidiano (TRs), que pertencem à

superfamília dos receptores de hormônios esteroidais e incluem os receptores de esteróides sexuais, receptores de vitamina D e receptores do ácido retinóico. Estes receptores de hormônio tireoidiano regulam a transcrição de produtos de genes que mediam os efeitos hormonais de diferenciação, desenvolvimento e metabolismo (BOELAERT; FRANKLYN, 2005; CALLERY; ELINSON; 2000; SCHWARTZ; OPPENHEIMER, 1978).

O conhecimento do comportamento funcional da glândula tireóide é fundamental no entendimento da maioria das doenças tireoidianas e representa a base para o diagnóstico e terapia das doenças tireoidianas. Eutireoidismo, hipertireoidismo (ou tireotoxicose) e hipotireoidismo são estados clínicos determinados, respectivamente, por níveis normais, excessivos ou insuficientes de hormônio tireoidiano ao nível das células somáticas. Em medicina humana, denomina-se *Doença de Graves* a condição autoimune caracterizada por hipertireoidismo, bócio, oftalmopatia e, raramente, dermatopatia (GINSBERG, 2004; MONACO, 2003; WERNER, 1969).

Os níveis circulantes de hormônios tireoidianos podem refletir um problema primário da glândula na biossíntese dos hormônios, destruição das células da tireóide com diminuição na liberação dos hormônios para a circulação, causas iatrogênicas ou anormalidades nos tecidos-alvos. No homem e em animais adultos, a hipersecreção dos hormônios tireoidianos (hipertireoidismo) leva a uma variedade de sintomas clínicos incluindo perda de peso, taquicardia, aumento do débito cardíaco e agitação mental. Na ausência dos hormônios (hipotireoidismo), verifica-se ganho de peso, fadiga e fraqueza muscular, intolerância ao frio e lentidão mental. No entanto, o efeito contundente observado em ambas as condições é no consumo de oxigênio, devido aos estados de hiper ou hipometabolismo. Nas células, tanto T3

quanto T4 pode alterar as funções respiratórias das mitocôndrias bem como os processos nucleares e citoplasmáticos envolvidos na síntese protéica (BOELAERT; FRANKLYN, 2005; SCHWARTZ; OPPENHEIMER, 1978).

Diversas drogas têm habilidade de interferir direta ou indiretamente na síntese dos hormônios tireoidianos. As drogas antitireoidianas mais importantes são os tiourilenos, sendo o propiltiouracil (6-n-propil-2-tiouracil, PTU) e o metimazol (1-metil-mercaptoimidazole, MMI) as mais utilizadas clinicamente. Estes compostos, que vêm sendo utilizados por décadas no tratamento da tireotoxicose e por centros de estudo como meio de induzir experimentalmente o hipotireoidismo, inibem a formação dos hormônios tireoidianos ao impedirem a conversão do iodo inorgânico em iodo orgânico pela glândula tireóide sem, contudo, interferirem diretamente com a concentração de iodo inorgânico na glândula. De acordo com a hipótese melhor aceita, os tiourilenos atuam inibindo de maneira potente a reação de iodinação da tirosina catalisada por uma peroxidase tireoidiana – TPO (MARCHANT; LEES; ALEXANDER, 1978; SUGAWARA; SUGAWARA; WEN, 1999; TAUROG, 1976).

Particularmente em relação ao propiltiouracil, além dos efeitos antitireoidianos promovidos por sua ação inibidora da TPO, esta droga também é um potente inibidor da iodotironina-deiodenase tipo I, enzima presente nos tecidos periféricos e que converte o hormônio T4 em seu metabólito ativo, T3, mediante deiodinação do anel externo diminuindo, assim, a conversão da tiroxina em triiodotironina, o que torna esta droga vantajosa em relação aos demais tiourilenos, como o metimazol (COOPER, 1986; GEFFNER; AZUKIZAWA; HERSHEMAN, 1975; SANDERS et al., 1997).

Também a tireoidectomia actínica, baseada nos efeitos destrutivos dos isótopos radioativos de iodo tem sido utilizada, tanto no manejo terapêutico da

tirotoxicose quanto na indução do hipotireoidismo experimental, datando do início dos anos 40 sua utilização com finalidade terapêutica com o radioisótopo 130, porém, apenas após o desenvolvimento do radioisótopo 131 (I^{131}), em 1946, com meia vida mais longa, difundiu-se sua utilização. Este isótopo tem a capacidade de acumular-se nas células da glândula tireóide causando sua morte por meio da emissão de partículas beta e gama, que lesam o DNA celular, desencadeando os mecanismos de morte celular programada ou apoptose. (CHAPMAN, 1983; SUBRAMANYAM; MURTHY; REDDI, 1975; WOLLMAN; SCOW, 1953).

Existem na medicina humana, vários relatos de pacientes com câncer e concomitante hipotireoidismo que tiveram um retardo no curso da doença quando comparados com pacientes eutireoidianos. Esta observação sugere que a presença do hipotireoidismo pode interferir com o crescimento tumoral e afetar a sobrevida destes pacientes. Por outro lado, relatos dos efeitos do hipotireoidismo sobre a indução de tumores mamários na mulher vão do favorecimento à redução da carcinogênese. Enquanto diferentes estudos epidemiológicos confirmam a associação destas doenças, outros estudos não confirmam tais resultados, tornando o tema controverso (SMYTH, 2003).

A tentativa de estabelecer uma relação entre doença neoplásica e distúrbios hormonais, bem como controlar o crescimento tumoral mediante manipulação hormonal é antiga. O reconhecimento que alterações no estado endócrino poderiam ter efeito benéfico no controle do câncer de mama é creditado a Beatson que, em meados de 1896, teria sido o primeiro autor a associar à ooforectomia a suplementação com extrato de tireóide objetivando controlar o câncer metastático avançado de mama (LYONS; EDELSTYN, 1965; RAY, 1967; SMYTH, 2003).

Spencer (1954) acreditava que a incidência de doença maligna era largamente condicionada por fatores locais e que o bócio endêmico, em variados graus de severidade, possuía distribuição mundial fundamentalmente baseada na disponibilidade de iodo, e que não era difícil demonstrar que tanto a deficiência de iodo quanto a incidência de doença maligna dividiam lugar comum. Em suas observações, o autor postulou algumas hipóteses na tentativa de explicar este fenômeno:

1. A taxa metabólica no homem decresce progressivamente com a idade enquanto a incidência de doença maligna aumenta com o passar da mesma, sugerindo que a doença maligna estaria relacionada à diminuição da taxa de metabolismo e esta, por sua vez, poderia ser considerada uma indicadora grosseira da atividade tireoidiana. Desta forma, poderia haver uma correlação entre doença maligna e disfunção da tireóide.
2. A incidência do bócio aumenta na puberdade e durante o período gestacional, períodos estes em que lesões melanocíticas pré-malignas podem crescer e se tornar malignas.
3. A administração de hormônio tireoidiano demonstrou melhorar a ação do estrógeno no tratamento do carcinoma prostático, permitindo menores doses e retardando a resistência do tumor ao mesmo.
4. A associação entre doença maligna e bócio foi bem ilustrada em estudo conduzido no Meddlesex Hospital em 1924 onde, na avaliação de 1000 exames *pos mortem*, dos quais 500 das mortes foram causadas por câncer, observou-se que 13,3% dos homens e 21,2% das mulheres apresentavam doença tireoidiana enquanto que apenas 2% dos homens e 6,5% das

mulheres que morreram de doença não-maligna apresentavam doença tireoidiana concomitante.

Em 1956, Pearson et al., estudaram os efeitos da hipofisectomia no tratamento da doença maligna avançada, concluindo que a hipofisectomia havia induzido a remissão da doença em vinte e um dos quarenta e um pacientes com câncer avançado de mama. No entanto, apenas um entre quatro pacientes com câncer de próstata se beneficiou da hipofisectomia associada à orquiectomia e administração de estrógeno, enquanto nenhum dos quatro pacientes portadores de melanoma apresentou qualquer benefício após hipofisectomia. Também Ray (1967), relatou sua experiência na inclusão da hipofisectomia como alternativa terapêutica ao câncer de mama avançado. Entre 1952 e 1966, o autor submeteu 630 pacientes com câncer de mama à hipofisectomia, tendo observado que 42% das pacientes apresentaram remissão da doença por mais de seis meses e demonstraram média de sobrevida de 24,5 meses, com algumas delas atingindo três ou mesmo cinco anos de sobrevida.

Por outro lado, Lyons; Edelstyn (1965) e O'Bryan et al. (1974) estudaram o efeito profilático da administração de extrato de tireóide ou de tiroxina após tratamento cirúrgico de tumores mamários em associação à ooforectomia, demonstrando que estas substâncias eram desprovidas de valor clínico.

Em levantamento realizado no Memorial Hospital em Nova Iorque, que incluiu os anos de 1946 a 1962, e que avaliou a incidência de doença maligna em 300 mulheres e 56 homens admitidos com tireotoxicose, verificou-se uma menor incidência de neoplasias neste grupo (25%) quando comparado com os demais pacientes admitidos pelo hospital, que apresentaram incidência de 59,8%. No entanto, os autores atribuíram a esta diferença uma interferência de amostragem,

pois, muitos dos pacientes que recorreram ao hospital, o fizeram motivados por doença maligna. Em outro estudo retrospectivo que considerou uma população de 7338 mulheres com bócio nodular não-tóxico, adenoma de tireóide, hipertireoidismo, hipotireoidismo, tireoidite de Hashimoto e doença não tireoidiana, avaliadas pelo MGH Thyroid Clinic, entre janeiro de 1925 e dezembro de 1964 e que foram assistidas por pelo menos um ano, concluiu-se que estas mulheres não apresentaram risco aumentado de morte por neoplasia mamária, exceto aquelas com bócio nodular não-tóxico e que haviam recebido suplementação com hormônio tireoidiano (WANEBO; BENUA; RAWSON, 1966).

Em estudo que buscou relacionar doença maligna e distúrbios tireoidianos, um aumento estatisticamente significativo nas mortes por câncer linfático e hematopoiético foi observado em mulheres com bócio nodular não-tóxico e adenoma de tireóide. Por outro lado, um incremento significativo nas mortes por câncer de pâncreas e respiratórios foi observado em mulheres com hipertireoidismo. Embora tenha se estabelecido uma correlação entre volume do tumor de mama e aumento da glândula tireóide, indicando um fator de crescimento comum entre estes órgãos, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos hipotireoidiano, hipertireoidiano e controle, em relação à prevalência de neoplasia mamária. No entanto, os autores alertam para a baixa prevalência de neoplasia mamária entre as mulheres japonesas, o que se poderia ser creditado às diferenças na função tireoidiana em relação às mulheres ocidentais e que mulheres japonesas que sofrem de tireoidite de Hashimoto possuem um risco cinco vezes maior de desenvolvimento de neoplasia mamária comparadas com aquelas sem evidência de doença tireoidiana (GOLDMAN; MONSON; MALLOF, 1990).

No Brasil, estudo que avaliou retrospectivamente o histórico de 309 mulheres com câncer de mama, demonstrou que a prevalência de hipotireoidismo entre estas pacientes foi de 12,3%, similar à população em geral, estimada em 3,0 a 13,6%. Porém, os autores chamam a atenção para os altos níveis séricos de TSH entre estas pacientes, particularmente aquelas com Índice de Massa Corporal (IMC) elevado (CAMARGO et al., 2002).

De fato, quando uma associação entre doença tireoidiana e câncer de mama parece existir, o hipotireoidismo é o achado mais freqüente. Desta forma, ganhou atenção a hipótese que níveis elevados de hormônio tireoidiano restringiriam o câncer de mama enquanto níveis mais baixos favoreceriam seu crescimento (SMYTH, 1993; SMYTH, 1997; SMYTH, 2003).

Em um estudo em que foi avaliada a incidência do hipotireoidismo em sobreviventes de câncer na infância (média de 1 a 16 anos após o diagnóstico), 34% dos pacientes apresentaram hipotireoidismo central (baixa produção de TRH pelo hipotálamo com os valores de T4 Livre no terço inferior da normalidade), concluindo-se que o hipotireoidismo central é comum nestes pacientes (ROSE et al., 1999).

Hercbergs; Leith, (1993), publicaram um interessante relato de caso em que um paciente de sexo masculino, portador de tumor pulmonar primário de células pequenas, foi submetido à lobectomia, vindo a apresentar um ano após a cirurgia, recidiva do tumor com múltiplas massas hilares quando foi, então, submetido a tratamento quimioterápico. Dezoito meses depois, o paciente desenvolveu coma por mixedema devido a alterações no metabolismo tireoidiano, devido à utilização de amiodarona, um antiarrítmico rico em iodeto e que havia sido prescrito por conta de doença cardíaca pré-existente. O paciente recuperou-se completamente do coma após receber suplementação com levotiroxina sódica exógena (L-tiroxina). Durante

os quatro anos seguintes ao coma o acompanhamento da doença maligna por meio de radiografias torácicas demonstrou total remissão das massas hilares quando, então, o paciente veio a óbito devido a alterações cardiovasculares. Os autores atribuíram a regressão do tumor ao mixedema desenvolvido pelo paciente.

Pesquisa clínica que avaliou os níveis séricos de triiodotironina em 161 homens encaminhados para tratamento de câncer de próstata, 20 homens com hiperplasia prostática benigna (HPB) e 27 homens normais, levou os autores a concluir que os níveis mais elevados deste hormônio encontravam-se entre os homens com HPB seguidos por aqueles com câncer de próstata em comparação com os níveis dos homens saudáveis, sugerindo que novas terapias para o tratamento dos tumores prostáticos poderiam advir da supressão dos efeitos mitogênicos da triiodotironina. (LEHRER et al., 2002).

São poucos os trabalhos que buscaram alguma relação entre os distúrbios tireoidianos e melanoma. O desenvolvimento de lesões pigmentadas foi associando ao estado tireoidiano em relato de caso onde se descreveu o aparecimento de nevo pigmentado em dois pacientes, um deles com Doença de Graves e outro recebendo suplementação com L-tiroxina, demonstrando uma possível associação entre hormônios tireoidianos e proliferação de lesões melanocíticas (REDONDO; IDOATE; DE FELIPE, 1998).

Shimkin et al. (1952), relataram o caso de um paciente de 32 anos portador de importante metástase pulmonar de melanoma primário de origem desconhecida. O paciente, que se encontrava em boas condições de saúde, foi submetido à hipofisectomia com objetivo de controlar o tumor, apresentando sobrevida de nove semanas após o procedimento cirúrgico, sem que demonstrasse qualquer efeito

sobre a progressão da doença, exceto por alterações degenerativas encontradas nas metástases pulmonares à necropsia.

Algumas terapias utilizadas no controle do câncer, inclusive do melanoma, têm resultado em hipotireoidismo iatrogênico, levando alguns autores acreditarem que esta condição indesejável poderia, no entanto, ser favorável à resposta antitumoral. Em um estudo, motivado pela observação de um paciente que recebera tratamento para melanoma metastático com Interleucina-2 e células matadoras ativadas por linfocina (LAK – lymphokine-activated killer cells) e que desenvolveu hipotireoidismo iatrogênico, concluiu-se que, de 34 pacientes que receberam este tipo de tratamento utilizado em neoplasias avançadas, sete pacientes tornaram-se hipotireoidianos, cinco dos quais apresentaram remissão completa do tumor, enquanto apenas cinco de 27 pacientes eutireoidianos experimentaram remissão tumoral (ATKINS et al., 1988).

Em outro estudo, observou-se que quatro dentre vinte pacientes com câncer renal e melanoma e que foram tratados com imunoterapia utilizando-se Interleucina-2 (IL-2) e Interferon alfa-2 (IFN- α_2), apresentaram evidência laboratorial de hipotireoidismo iatrogênico em decorrência a este protocolo de tratamento e, aparentemente, três destes pacientes obtiveram benefícios com esta condição, que resultou em 50% de regressão tumoral (SCALZO et al., 1990).

Vários outros estudos apontam o hipotireoidismo como complicação freqüente nos tratamentos antineoplásicos como a radioterapia em pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço ou com o uso de Interleucina-2 e Interferon alfa-2 no tratamento de tipos câncer, entre eles o melanoma (DORVAL et al., 1992; KRUIT et al., 1991; MINI et al., 2001; MÖNIG; HAUSCHILD; LANGE; FÖLSCH, 1994; ROSE et al., 1999).

No entanto, em levantamento retrospectivo realizado nos registros médicos do Anderson Cancer Center, da Universidade do Texas - EUA, que avaliou a incidência de hipotireoidismo entre pacientes com melanoma cutâneo, apesar de ter sido observada prevalência significativamente alta do hipotireoidismo nesta população, não se constatou qualquer diferença aparente na apresentação do melanoma entre os portadores de hipotireoidismo e eutireoidianos, sugerindo que a interação entre a doença tireoidiana e melanoma, se houver, acarreta pouco efeito sobre os estágios mais avançados do tumor (ELLERHORST et al., 2003).

Estudo semelhante realizado na mesma Instituição, e que acompanhou 91 pacientes com diagnóstico de melanoma uveal durante dois anos, aponta para uma incidência de doença auto-imune sistêmica de 8,8% e de hipotireoidismo de 13,2% entre estes pacientes. Observou-se, também, que os pacientes com doença auto-imune apresentaram maior sobrevida quando comparados aos demais pacientes. Esta maior sobrevida não foi observada, no entanto, entre os pacientes com hipotireoidismo (ELLERHORST; COOKSLEY; GRIMM, 2001).

Recentemente, o propiltiouracil foi utilizado na indução do hipotireoidismo químico em 22 pacientes com glioma recorrente, em associação com tamoxifeno. Onze dos 22 pacientes tornaram-se hipotireoidianos, sem que experimentassem sinais de hipotireoidismo clínico. O grupo de pacientes com hipotireoidismo apresentou média de sobrevida significativamente superior (10,1 meses *versus* 3,1 meses) em relação aos pacientes eutireoidianos, sugerido que a associação do hipotireoidismo iatrogênico com a droga quimioterápica possa tornar-se importante ferramenta terapêutica para este tipo de tumor (HERCBERGS et al., 2003).

Diversos trabalhos experimentais buscaram estudar a relação entre doença neoplásica e distúrbio tireoidiano, com resultados ora favoráveis ora contrários à esta associação.

Em um dos primeiros trabalhos em que esta relação foi estudada e que demonstrou o efeito antitumoral do hipotireoidismo, Dubnik; Morris; Dalton, (1950), estudaram a inibição do desenvolvimento das glândulas mamárias e da formação de tumores mamários em fêmeas de camundongos C3H submetidas à administração oral de thiouracil, uma droga antitireoidiana. O desequilíbrio hormonal assim provocado resultou em atrofia do epitélio mamário e retardo no aparecimento espontâneo dos tumores de mama, sem que houvesse, contudo, qualquer decréscimo na incidência dos mesmos.

Novamente, camundongos C3H/he de ambos os sexos e que receberam implantes subcutâneos de adenocarcinoma mamário foram divididos em grupos controle e tratados com propiltiouracil na água de bebida, encontrando-se diferença estatisticamente significativa, com maior sobrevida dos animais que desenvolveram hipotireoidismo pelo tratamento com PTU que apresentaram, também, menor volume tumoral médio. Resultados semelhantes foram obtidos quando da indução do hipotireoidismo associada a drogas quimioterápicas como o 5-fluorouracil. (SHOEMAKER et al., 1976; SHOEMAKER; DAGHER, 1979).

Porém, em ensaio que avaliou o comportamento de neoplasia mamária em fêmeas primíparas, os autores atribuíram a menor incidência de tumores de mama à grande regressão do epitélio mamário causado nas fêmeas hipotireoidianas e não a um efeito antitumoral que pudesse ser creditado ao hipotireodismo (VONDERHAAR; GRECO, 1982).

Em outro relato, a sobrevida de ratos Buffalo portadores de hepatoma de Morris 7800 apresentou aumento significativo (23% a 31%) naqueles animais em que houve indução do hipotireoidismo pelo uso do PTU adicionado à ração ou pela tireoidectomia pelo Iodo radioativo isótopo 131 . A administração de L-tiroxina exógena reverteu os efeitos do PTU e encurtou a sobrevida destes animais. Descartou-se, em experimento semelhante, influência sexual ou da redução no consumo de alimentos pelos hospedeiros do tumor que estavam sob os efeitos do hipotireoidismo. Os efeitos benéficos do estado hipotireoidiano ocorreram em dependência direta da fase do desenvolvimento tumoral, diminuindo consideravelmente quando a indução do mesmo se deu nos estágios mais avançados do tumor. Os autores não foram capazes de definir quais os mecanismos anatômicos ou bioquímicos que pudessem explicar a inibição do crescimento tumoral promovida pelo hipotireoidismo (MISHIKIN et al., 1979a; MISHIKIN et al., 1979b; MISHIKIN et al., 1981).

Os efeitos da tiroxina sobre o crescimento tumoral e metastático foram também avaliados em experimento em que fêmeas de camundongos A/Jax e C57BL6L receberam, no membro posterior, implantes respectivamente das cepas S-1 de sarcoma e T241 do fibrossarcoma de Lewis. Os animais foram divididos em grupo controle, tratado com L-tiroxina e tratado com Iodo 131 (tireoidectomia actínica). Em ambos os sistemas, os animais que receberam L-tiroxina apresentaram maior volume tumoral e maior número de nódulos metastáticos. Em relação ao grupo controle, os animais que sofreram indução do hipotireoidismo apresentaram resultados opostos aos obtidos com o tratamento pela L-tiroxina (KUMAR; CHIANG; DEODHAR, 1979).

Na tentativa de explicar a dependência do fibrossarcoma T241 pelos hormônios tireoidianos, comparou-se a capacidade de ligação de células de cultura deste tumor e cultura de células esplênicas de camundongos à triiodotironina marcada $^{125}\text{T3}$. Os resultados confirmaram a presença de receptores para hormônio tireoidiano no núcleo das células tumorais, a exemplo das células esplênicas e, desta forma, sugeriram um efeito metabólico direto dos hormônios tireoidianos como um possível mecanismo de dependência deste tumor aos mesmos (GUPTA; CHIANG; DEODHAR, 1981).

Em estudo que buscou relacionar o hipotireoidismo a outros distúrbios hormonais, resultados semelhantes de inibição do crescimento local e metastático foram obtidos com o hepatoma #44 de Morris em animais com hipotireoidismo ou hipofisectomizados. Enquanto os efeitos do hipotireoidismo puderam ser revertidos com a administração de L-tiroxina exógena, os benefícios da hipofisectomia só puderam ser totalmente revertidos quando da administração exógena simultânea de L-tiroxina, prolactina e hormônio de crescimento (GH), pois a administração destes hormônios de forma separada não restaurou o crescimento tumoral nos animais hipofisectomizados. Uma vez que o hipotireoidismo resulta em elevados níveis de prolactina sérica, os autores postularam a hipótese que o hepatoma de Morris possui elevados níveis de receptores de hormônio lactogênico (ERDSTEIN; GUYDA; MISHIKIN, 1984).

Os efeitos do hipotireoidismo sobre o crescimento tumoral em sistemas xenotransplantados puderam ser observados em experimento que avaliou o crescimento de células do adenocarcinoma prostático humano PC3 e de células do adenocarcinoma pulmonar humano, pouco diferenciado, 201T, em camundongos atímicos *nude*, havendo significativa redução do crescimento tumoral naqueles

animais que se tornaram hipotireoidianos com o uso da droga propiltiouracil adicionada à água de bebida, 21 dias antes do implante. Diferentemente, os animais que receberam a droga 21 dias após o implante, também aqueles em que se interrompeu a utilização da droga a partir da inoculação do implante e naqueles que não receberam a droga (animais controle), houve significativo crescimento tumoral. A fim de descartar uma possível ação direta da droga sobre as células tumorais, as mesmas foram testadas em cultivo celular frente a diferentes concentrações de PTU e sua capacidade de incorporação de timidina tritiada (^3H timidina), sem que tenha havido qualquer inibição sobre o crescimento das mesmas. Experimento semelhante que obteve os mesmos resultados foi conduzido com a cepa DU145 do adenocarcinoma prostático humano. (THEODOSSIOU et al., 1999; THEODOSSIOU; SCHWARZENBERGER, 2000).

Também a influência dos hormônios tireoidianos sobre a carcinogênese foi objeto de estudos. Ratos Wistar submetidos à tireoparatireodectomia receberam em sua ração a adição, igualmente aos seus pares controles intactos, da droga 2-acetilaminofluoreno (AAF), um potente indutor de carcinoma hepático. Enquanto os ratos tireoidectomizados tratados com AAF não desenvolveram qualquer nódulo hepático, praticamente a totalidade dos ratos intactos que receberam a droga desenvolveu hepatomas malignos. Creditou-se este efeito anticarcinogênico da tireoidectomia a um retardo na taxa de progressão de nódulos latentes no fígado. Porém, este efeito inibidor da carcinogênese proporcionado pela tireoidectomia somente foi observado nos animais em que o procedimento antecedeu a administração do AAF, não se notando qualquer efeito benéfico da tireoidectomia quando realizada após a administração do mesmo. O autor considerou a diminuição da carcinogênese como consequência da diminuição da taxa de metabolismo

causada pelo hipotireoidismo, o que teria ocasionado uma menor conversão do AAF em seus metabólitos ativos pelo fígado (GOODALL, 1966).

Contrariamente, estudo semelhante de carcinogênese hepática promovida pela utilização de dietilnitrosamina, um potente indutor de hepatocarcinoma em roedores, demonstrou que o tratamento de curta duração com triiodotironina (T3) reduziu dramaticamente o número de nódulos hepáticos GSTP (lesões hepáticas hiperplásicas -glutamil transpeptidase ou glutathione S-transferase placentária positivas) e que a administração de ciclos repetidos (uma semana por mês) de T3 em ratos portadores de nódulos diminuiu em 50% o desenvolvimento de hepatocarcinoma e, em 100%, o aparecimento de metástases em relação aos animais do grupo controle (LEDDA-COLUMBANO et al., 2000).

Em oposição aos relatos que referem o efeito antitumoral do hipotireoidismo, Spencer (1954), já fazia referência a experimento que avaliou a resposta a enxertos de células de tumor de granulosa, de luteomas e de adenomas tubulares no baço de camundongos tratados e não tratados com tiroxina, notando-se nítida rejeição dos enxertos no grupo que recebeu suplementação com este hormônio.

Ensaio conduzido com camundongos C3H/He previamente tratados com tiroxina demonstraram que estes animais apresentaram significativo aumento no número de células T circulantes e maior rejeição ao transplante de células do carcinoma de Ehrlich, comparados ao grupo controle, semelhantemente ao observado em pacientes com Doença de Graves (AOKI; WAKISAKA; NAGATA, 1976).

De maneira análoga, os efeitos do hiper e do hipotireoidismo experimentalmente induzidos sobre o crescimento e desenvolvimento espontâneo de metástases pulmonares do carcinoma pulmonar de Lewis (3LL) foi estudado em

camundongos, onde a administração de T3 aos animais significativamente inibiu a formação espontânea de metástases e prolongou a sobrevida dos animais. Interessante ressaltar que a indução do hipotireoidismo com o uso de metimazol também inibiu o crescimento local e a formação espontânea de metástases, prolongando a sobrevida dos animais ao passo que o tratamento com T4 estimulou o crescimento tumoral e o desenvolvimento de metástases pulmonares. Os autores atribuíram estes resultados a diferentes ações dos hormônios tireoidianos sobre o sistema imune. (KINOSHITA et al., 1991).

Não há, até o presente momento, estudo comparativo sobre os efeitos do hipotireoidismo no crescimento local e metastático do melanoma murino.

3 OBJETIVOS

Pela importância clínica do melanoma, quer em seres humanos quanto nos animais, este trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos do hipotireoidismo experimentalmente induzido, mediante utilização da droga antitireoidiana propiltiouracil ou por tireoidectomia actínica, utilizando-se Iodo¹³¹, sobre o crescimento tumoral local e metastático do melanoma murino da linhagem B16F10 em camundongos C57BL6.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos envolvendo a utilização de animais realizados no presente estudo seguiram as recomendações do Conselho Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, respeitando a legislação vigente, particularmente a Lei Nº 11.977, de 25 de Agosto de 2005 e sob autorização da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e anuência da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade Metropolitana de Santos.

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos linhagem C57BL6 machos, com 60 dias de idade, fornecidos pelo biotério central da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e alojados no biotério do Departamento de Imunologia do Edifício de Ciências Biomédicas desta Universidade.

Os animais foram mantidos sob condições controladas de higiene, iluminação (ciclo 12 horas claro/12 horas escuro, iniciando-se às 6 horas da manhã o ciclo claro) e temperatura ($25 \pm 3^{\circ}\text{C}$), recebendo alimentação *ad libitum* (ração Nuvital®.) durante todo o experimento. Respeitou-se um período de adaptação de sete dias antes do início dos experimentos, ocasião em que receberam água filtrada *ad libitum*.

Após o período de 15 dias para indução dos estados hipo e hipertireoidiano e da inoculação das células do melanoma, os animais foram transferidos e alojados no

Biotério da Universidade Metropolitana de Santos (UNIMES), até o final do experimento.

Os animais foram divididos em 06 (seis) grupos, com oito indivíduos cada, compreendendo dois experimentos distintos:

Experimento 1 – crescimento local e sobrevida:

- **GRUPO CTRL_L** – avaliação do crescimento local do melanoma – grupo controle.

Experimento 2 – potencial metastático:

- **GRUPO PTU_L** – avaliação do crescimento local do melanoma sob hipotireoidismo induzido com propiltiouracil - PTU (Propil® - Laboratórios Pfizer Ltda).
- **GRUPO CTRL_M** – avaliação do crescimento metastático do melanoma – grupo controle.
- **GRUPO PTU_M** – avaliação do crescimento metastático do melanoma sob hipotireoidismo induzido com propiltiouracil (PTU).
- **GRUPO I¹³¹_M** – avaliação do crescimento metastático do melanoma sob hipotireoidismo induzido por tireoidectomia actínica (utilização de I¹³¹).
- **GRUPO T4_M** - avaliação do crescimento metastático do melanoma sob hipertireoidismo induzido com levotiroxina sódica (Synthroid® - Abbott Laboratórios do Brasil Ltda).

Para cada grupo acima citado realizou-se o registro diário do consumo de água ou água adicionada de medicamento e semanal do ganho de peso e do consumo de

ração (dados não publicados), para cálculo do consumo médio de solução de bebida, de alimento e peso médio.

Para maior facilidade na condução da leitura deste texto, consultar tabela destacável no apêndice A.

4.2 Indução do hipotireoidismo

Obteve-se o estado hipotireoidiano mediante a utilização da droga antitireoidiana propiltiouracil (PTU) na concentração de 0,05% na água de bebida ou pela utilização de iodo radioativo isótopo 131 (I^{131} - tireoidectomia actínica), respectivamente nos grupos PTU_L, PTU_M e I^{131} _M.

4.2.1 Indução pelo PTU

Relatos apontam que concentrações de 0,01 a 0,05% de PTU na água de bebida são adequadas à obtenção do hipotireoidismo em camundongos, comparável à utilização do PTU adicionado à ração ou ao hipotireoidismo induzido por meio de tireoidectomia actínica ou mesmo cirúrgica. (MISHIKIN et al., 1979; SHOEMAKER; DAGHER, 1979; OREN et al., 1996; SILVA et al., 2004)

Cooper et al. (1983) utilizando-se de radioimunoensaio específico e sensível para PTU observou em ratos que concentrações tão baixas quanto 0,0005% da droga na água de bebida por um período de sete dias foi capaz de suprimir a ligação protéica do iodeto (PBI) em 50% (ED_{50}) com concomitante diminuição de T3 e T4 séricos.

THEODOSSIOU; SCHWARZEMBERGER, (2000), relatam que esta concentração demonstrou-se indutora de hipotireoidismo nos camundongos.

4.2.1.1 Escolha da droga

Diversos trabalhos relatam a indução experimental do hipotireoidismo em ratos e camundongos utilizando-se drogas da família dos tiourilenos, como metimazol e propiltiouracil (PTU), obtendo-se resultados semelhantes com ambas as drogas, porém, segundo Geffner; Azukizawa; Hersheman (1975) o PTU tende a induzir um grau de hipotireoidismo mais severo por diminuir a conversão periférica de tiroxina em triiodotironina (COOPER, 1986; SANDERS et al., 1997; SUGAWARA; SUGAWARA; WEN, 1999).

4.2.1.2 Solução estoque

Nahata et al. (2000) determinou a estabilidade da solução oral de propiltiouracil a partir de preparações comercialmente disponíveis, utilizando-se de cromatografia líquida de alto desempenho e submetidas a temperaturas de estoque de quatro e 25°C, observando que as soluções mantiveram-se estáveis por 70 dias a 25°C e por 91 dias a 4°C, sem perder suas características físico-químicas, embora o autor tenha desaconselhado o armazenamento a 25°C devido ao risco de contaminação bacteriana.

Baseado em Nahata et al. (2000) e Souza (2000), preparou-se uma solução de estoque a 0,5% conforme, resumidamente, segue:

Em um graal de porcelana, trituraram-se 30 comprimidos de 100 mg de propiltiouracil (Propil® - cedido pelos Laboratórios Pfizer Ltda.) até obter-se um pó fino. A seguir, adicionou-se uma pequena quantidade de uma solução preparada com 50% de xarope simples NF (85% de sacarose em água purificada) e 50% de metilcelulose a 1% até obter-se uma pasta homogênea. A seguir, foram acrescentadas quantidades geométricas da solução acima até obter-se o volume final de 600ml. A solução de estoque foi, então, armazenada em frasco âmbar e mantida sob refrigeração à temperatura média de 4°C.

4.2.1.3 Solução de bebida

Os animais dos grupos PTU_L e PTU_M receberam como solução de bebida, uma preparação a partir da solução estoque na proporção de 9ml de água filtrada para cada 1ml de solução estoque a fim de obter-se a concentração desejada de 0,05%, mantida em bebedouros de cor âmbar, devido à sensibilidade da solução à luz. A fim de se evitar os riscos de contaminação bacteriana e possível instabilidade da preparação, optou-se pelo descarte e renovação diários da solução de bebida.

Seguindo relatos anteriores, considerou-se um período de 15 dias para indução do estado hipotireoidiano antes de qualquer inoculação de células tumorais. (SHOEMAKER et al., 1976; THEODOSSIOU et al., 1999).

4.2.2 Indução pela tireoidectomia actínica

Para que se descartasse a possibilidade que os resultados obtidos fossem provenientes de uma influência direta do PTU sobre as células tumorais, um grupo

de animais foi submetido à tireoidectomia actínica, mediante uso de iodo radioativo I^{131} .

O iodo radioativo, cedido pelo Prof. Dr. Pedro Fernandes Lara, do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, contendo 5,2mCi em 1ml foi previamente diluído com solução de cloreto de sódio a 0,9% a fim de obter-se a concentração de 400 μ Ci por ml. Os animais receberam 0,5ml da preparação ou 200 μ Ci de I^{131} por via intraperitonal, em dose única, 15 dias antes da inoculação com as células tumorais, conforme previamente descrito (ERDSTEIN; GUYDA; MISHKIN, 1984; KUMAR; CHIANG; DEODHAR, 1979; MISHKIN et al., 1979).

4.3 Indução do hipertireoidismo

A literatura é controversa quanto à concentração de levotiroxina sódica na água de bebida de ratos e camundongos para indução do hipertireoidismo. Optou-se pela concentração de levotiroxina sódica a 0,00005% na água de bebida correspondente à ingestão média de 5 μ g de levotiroxina sódica por animal ou o equivalente a 100 μ por kg/dia, levando-se em conta um consumo médio de 5,0ml/dia (OREN et al., 1996; STEIN-STREILEIN, 1987; THEODOSSIOU, 1999).

4.3.1 Solução de Estoque

A preparação da levotiroxina sódica em solução oral considerou os estudos de BOULTON; FAWCETT; WOODS (1996) que avaliaram, mediante uso de cromatografia computadorizada, a estabilidade da levotiroxina sódica em suspensão

oral a partir de preparações comercialmente disponíveis submetidas a temperaturas de armazenamento de dois a 42°C. Segundo os autores, a levotiroxina sódica em solução, é sensível à luz e à temperatura, com estabilidade máxima obtida por até oito dias, à temperatura de 4°C.

Baseado em BOULTON; FAWCETT; WOODS (1996) e Souza (2000), a solução estoque foi preparada, resumidamente, como segue:

Em um graal de porcelana, foram triturados cinco comprimidos de 100µg de levotiroxina sódica (Synthroid® - Abbott Laboratórios do Brasil Ltda) até obter-se um pó bem fino. Adicionou-se uma pequena quantidade de glicerol PA a fim de obter-se uma mistura homogênea que foi transferida para um cálice graduado. Lavou-se o graal com sucessivas passagens de glicerol até obter-se o volume de 40ml. Completou-se com água destilada até obter-se o volume de 100ml. A solução assim obtida, com concentração de levotiroxina sódica a 0,0005%, foi mantida sob refrigeração à temperatura de 4°C em frasco âmbar por sete dias, quando nova solução foi preparada.

4.3.2 Solução de Bebida

Os animais do grupo T4_M receberam como solução de bebida uma preparação a partir da solução estoque na proporção de 9 ml de água filtrada para cada 1ml de solução estoque a fim de obter-se a concentração desejada de 0,00005%, mantida em bebedouros de cor âmbar, devido à sensibilidade da solução à luz. A fim de se evitar os riscos de contaminação bacteriana e devido à alta instabilidade da preparação, optou-se pelo descarte e renovação diários da solução de bebida.

Seguindo relatos anteriores, considerou-se um período de 15 dias para indução do estado hipertireoidiano antes de qualquer manipulação com células tumorais (OREN et al., 1996).

4.4 Melanoma

4.4.1 Linhagem Celular e Cultura de Células

As células transplantáveis do melanoma murino permitem modelos de estudos experimentais tanto do comportamento tumoral quanto de novas terapias para o câncer. A linhagem B16F10 foi estabelecida por Fidler (1973), oriunda do melanoma de ocorrência natural do camundongo C57BL6 que, por meio de seleção progressiva, obteve o isolamento de variantes com diferentes graus de potencial metastático. Este autor também relatou que o número de metástases experimentalmente obtidas é proporcional ao número de células viáveis inoculadas e que muitos êmbolos tumorais morrem e falham em formar metástases.

Estas células, quando inoculadas por via subcutânea, apresentam a capacidade de multiplicação neoplásica sem propiciar o desenvolvimento de metástases enquanto que, quando inoculadas por via endovenosa, desenvolvem nidação em parênquima pulmonar formando nódulos macroscópicos na superfície dos pulmões, passíveis de serem contados.

As células de melanoma da linhagem B16F10 foram fornecidas pelo Departamento de Imunologia da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP.

Após o descongelamento rápido em banho-maria a 37,5°C as células foram transferidas do frasco de congelamento para um tubo cônico de centrífuga onde imediatamente adicionou-se 9ml de meio RPMI 1640 sendo, então, submetidas à centrifugação em centrífuga refrigerada a 1200rpm e 4°C. Colheu-se uma alíquota de 10µL para avaliação da viabilidade celular e contagem de células. Para replicação celular, as células de melanoma foram semeadas em garrafas de cultivo, em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 5×10^{-5} M de 2-mercaptoetanol (2-ME), 25mM de HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfônico), 216 mg/ml de L-glutamina, 36mg/L de L-asparagina, 116mg/L de L-arginina-HCl, 110 mg/L de estreptomicina, a 37°C e 5% de CO₂. O descolamento das células para posterior replicação deu-se por curta exposição a PBS-EDTA 1.2Mm. Não foram utilizadas as colônias que sofreram mais de quatro passagens em cultura. (OLIVEIRA FILHO; BEVILACQUA; CHAMMAS, 1997; STAQUICINI et al., 2003).

4.4.2 Viabilidade Celular

As células do melanoma murino B16F10 apresentam característica refringência da luz à microscopia ótica quando viáveis e perdem esta característica quando mortas, tornando-se opacas. A viabilidade dos cultivos celulares foi determinada, então, pela contagem das células refringentes em hemocítmetro (câmara de Neubauer melhorada) e examinadas por microscopia ótica. As células viáveis e as não viáveis (células não refringentes) foram contadas em porcentagem de células totais. Considerou-se adequada, a cultura com um total de pelo menos 90% de células viáveis.

4.4.3 Preparo das Células para Utilização In Vitro

As células em cultura, manipuladas em fluxo laminar, após terem seu meio de cultura desprezado, foram descoladas da garrafa de cultivo utilizando-se 5ml de PBS-EDTA 1.2mM, transferidas para um tubo de centrifuga, tendo-se colhido uma alíquota de 10µL para contagem celular em hemocítômetro e centrifugadas por 5 minutos a 4°C a 1200rpm em centrífuga refrigerada. Após a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante, descolou-se gentilmente o botão celular formado e adicionou-se meio RPMI 1640 em quantidade suficiente para obtenção da concentração desejada para os respectivos grupos:

- CTRL_L e PTU_L: 3330 células de melanoma B16F10 por µl de suspensão.
- CTRL_M, PTU_M, T4_M e I¹³¹_M: 1000 células de melanoma B16F10 por µl de suspensão.

Os tubos contendo as células foram mantidos em um recipiente com gelo, para imediata utilização.

4.5 Desenvolvimento Tumoral

4.5.1 Experimento para Avaliação do Efeito do Hipotireoidismo sobre o Crescimento Tumoral Local

Os dois grupos, CTRL_L (controle) e PTU_L (tratado), compostos por oito animais cada, receberam via subcutânea, na região torácica dorsal, 1×10^6 células de melanoma B16F10, viáveis, em volume final de 300µl. O crescimento da massa

tumoral foi acompanhado por medidas diárias com paquímetro onde se registrou o diâmetro longitudinal e o diâmetro transversal para fins de cálculo de volume da massa tumoral.

Para o cálculo do volume tumoral, utilizou-se a fórmula do volume da elipse, segundo Shoemaker et al., 1976 e Shoemaker; Dagher, 1979:

$$V = \frac{L^2 C}{6} \text{ onde:}$$

V = volume em mm³

= constante numérica “pi” equivalente a 3,1416.

L = largura do tumor tomada em seu maior eixo, em mm.

C = comprimento do tumor tomado em seu maior eixo, em mm.

Para o estudo da sobrevida, aguardou-se a morte espontânea dos animais e registrou-se o período de vida pós-implante de cada animal destes dois grupos.

Uma vez que se permitiu aos animais seguirem a evolução da doença até o óbito e, devido à metodologia utilizada na mensuração de T4 total (T4T), que exigia grandes volumes de soro, não foi possível mensurar-se os valores de T4T dos grupos CTRL_L e PTU_L.

4.5.2 Experimento para Avaliação do Efeito do Hipotireoidismo e do Hipertireodismo sobre o Potencial Metastático (nidação)

Para o estudo de metástase experimental, os grupos compostos de oito animais cada, respectivamente, CTRL_M, PTU_M, T4_M e I¹³¹_M, receberam, por via intravenosa mediante acesso pela veia da base da cauda, 2x10⁵ células de melanoma murino viáveis em volume final de 200µl.

Após 15 dias da inoculação, os camundongos tratados e não tratados foram sacrificados em câmara de CO₂. Os animais sacrificados foram, então, submetidos à necropsia onde tiveram seus pulmões removidos para contagem do número de nódulos pulmonares por meio de lupa estereoscópica e posterior conservação em formalina tamponada a 10%.

4.6 Dosagem Hormonal

Imediatamente após o sacrifício dos animais dos grupos de avaliação do potencial metastático, procedeu-se colheita do sangue dos mesmos em tubos de centrífuga. Formou-se, assim, uma reserva de sangue de cada grupo que permitiu, após centrifugação, a obtenção de soro para subsequente mensuração de T4 total (T4T). As amostras, após congelamento a -18°C, foram encaminhadas para o Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo e submetidas a estudo por Radioimunoensaio (RIA).

4.7 Estudo Histopatológico

Os espécimes de pulmões, conservados em formalina tamponada a 10%, foram submetidos à inclusão em parafina, cortados em micrótomo e montados em lâmina de vidro e coradas pelo método de hematoxilina-eosina para posterior estudo histopatológico.

4.8 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas mediante utilização do programa GraphPad *Prism* versão 4.0, desenvolvido por GraphPad Software. Inc. – USA, disponível em www.Graphpad.com.

5 RESULTADOS:

5.1 Efeito do Hipotireoidismo sobre o crescimento tumoral local e sobrevida

5.1.1 Avaliação do Crescimento Tumoral Local

Observou-se o aparecimento de nódulo clinicamente detectável por palpação em quatro animais do grupo controle e em cinco animais do grupo tratado, sete dias após a inoculação das células B16F10.

Doze dias após o implante, todos os animais de ambos os grupos apresentavam nódulos clinicamente detectáveis e mensuráveis.

O menor volume tumoral mensurável foi de 1,8 mm³, enquanto o maior volume mensurado foi de 10.673,1 mm³, conforme tabelas 1 e 2 para o grupo controle e para o grupo tratado, respectivamente.

Tabela 1 - Volume tumoral por indivíduo e dia após inoculação subcutânea
Avaliação do crescimento local
Grupo CTRL_L (controle) – São Paulo – 2006

ANIMAL	VOLUME TUMORAL – mm ³									
	Dias após inoculação									
	Dia 0	Dia 7	Dia 9	Dia 12	Dia 15	Dia 17	Dia 19	Dia 21	Dia 23	Dia 24
1	0,0	0,0	1,8	335,1	1531,5	2144,7	2220,6	5575,3	8140,9	Ø
2	0,0	0,0	1,8	466,5	1649,3	3351,0	3177,7	6003,6	Ø	Ø
3	0,0	0,0	1,8	837,8	2544,7	3979,4	4289,3	8081,8	Ø	Ø
4	0,0	0,0	4,2	1026,3	2546,8	4071,5	4387,2	10673,1	Ø	Ø
5	0,0	2,1	103,7	1231,5	2835,3	5068,4	7433,0	Ø	Ø	Ø
6	0,0	4,2	207,3	1238,8	3024,3	5080,0	9047,8	Ø	Ø	Ø
7	0,0	9,8	418,9	1583,4	3026,4	5575,3	Ø	Ø	Ø	Ø
8	0,0	9,8	454,0	1847,3	3780,4	6082,1	Ø	Ø	Ø	Ø

Ø - óbito

Tabela 2 -	Volume tumoral por indivíduo e dia após inoculação subcutânea Avaliação do crescimento local Grupo PTU_L (tratado) – São Paulo – 2006
------------	---

ANIMAL	VOLUME TUMORAL – mm ³									
	Dias após inoculação									
	Dia 0	Dia 7	Dia 9	Dia 12	Dia 15	Dia 17	Dia 19	Dia 21	Dia 23	Dia 24
1	0,0	0,0	207,3	823,6	1504,3	2723,8	3329,0	4158,4	5541,8	Ø
2	0,0	0,0	207,3	950,3	1744,6	3026,4	3732,2	7478,6	Ø	Ø
3	0,0	0,0	230,9	1061,9	1885,0	3969,4	5026,6	8835,8	Ø	Ø
4	0,0	0,0	294,5	1327,3	2002,8	3969,4	5080,0	Ø	Ø	Ø
5	0,0	1,8	318,3	1539,4	2412,7	4347,5	5310,9	Ø	Ø	Ø
6	0,0	2,1	424,1	1642,0	3213,3	5321,9	8848,8	Ø	Ø	Ø
7	0,0	2,4	466,5	1642,0	3223,3	5445,4	Ø	Ø	Ø	Ø
8	0,0	6,3	466,5	1767,2	3223,3	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

Ø - óbito

Alguns animais apresentaram ulceração da formação tumoral sem que houvesse, contudo, qualquer relação com o tamanho do nódulo tumoral ou com o grupo ao qual o animal pertencia. Não foram notados nestes animais, quaisquer sinais de desconforto, inflamação ou contaminação bacteriana.

Todos os animais foram a óbito de forma natural, sem que nenhum deles apresentasse sinais de agonia, anorexia ou adipsia que justificassem o sacrifício do mesmo.

Na distribuição da média diária dos volumes tumorais, o menor valor mensurado foi de 1,6 mm³ enquanto o maior volume obtido foi de 8140,9 mm³, conforme tabela 3, onde cada valor corresponde à média dos volumes tumorais dos animais vivos.

Tabela 3 - Volume tumoral médio em relação ao dia após inoculação subcutânea
Avaliação do crescimento local
Grupos CTRL_L x PTU_L – São Paulo – 2006

DIAS APÓS INOCULAÇÃO	GRUPO			
	n	CRTL_L	n	PTU_L
0	8	0,0	8	0,0
7	8	3,2	8	1,6
9	8	149,2	8	326,9
12	8	1070,8	8	1344,2
15	8	2617,3	8	2401,2
17	8	4419,1	7	4114,8
19	6	5092,6	6	5221,3
21	4	7583,5	3	6824,3
23	1	8140,9	1	5541,8

A tabela 4 mostra a média geral dos volumes tumorais nos grupos CTRL_L e PTU_L, respectivamente.

Tabela 4 - Comparação entre as médias dos volumes tumorais
Avaliação do crescimento local
Grupos CTRL_L x PTU_L – São Paulo – 2006

GRUPO	n (dias)	MÉDIA ⁽¹⁾	ERRO MÉDIO ±
CTRL_L	9	3231 ^a	1076,0
PTU_L	9	2864 ^a	876,6

(1) Médias de mesma letra não possuem diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$)

A figura 1 sumariza os resultados apresentados nas referidas tabelas.

Figura 1 - Avaliação do crescimento tumoral local – Representação gráfica da evolução do volume tumoral em relação dia pós-inoculação, grupos CTRL_L e PTU_L. Gráfico obtido a partir da tabela 3, onde cada valor corresponde à média do volume tumoral dos animais vivos dos respectivos grupos. Notar que a diminuição do volume tumoral ocorrido no grupo PTU_L no dia 23 deve-se a um artifício, devido ao óbito de animais com volume tumoral maior, nos dias anteriores

A análise estatística das médias dos volumes, mediante teste de T não pareado, não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos CTRL_L e PTU_L, com $p = 0,795$ para o teste de T e $p = 0,5759$ para o teste de F, para um intervalo de confiança de 95%, conforme figura 2.

Figura 2 - Avaliação do crescimento tumoral local - Representação gráfica das médias dos volumes tumorais, grupos CTRL_M e PTU_M. Não há diferença estatisticamente significativa entre as referidas médias ($p > 0,05$)

5.1.2 Avaliação da Sobrevida

O primeiro óbito ocorrido no grupo controle se deu 19 dias após a inoculação das células tumorais. Enquanto no grupo tratado, o primeiro óbito se deu 17 dias após o implante. A média da sobrevida foi de 22 dias para o grupo CTRL_L e 21 dias para o grupo PTU_L.

O número de óbitos por dia e a taxa de sobrevida estão demonstrados nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5 - Evolução dos óbitos em relação ao dia após a inoculação subcutânea
Avaliação do crescimento tumoral local
Grupos CTRL_L x PTU_L – São Paulo – 2006

DIAS APÓS INOCULAÇÃO	NÚMERO DE ÓBITOS	
	CTRL_L	PTU_L
0	0	0
7	0	0
9	0	0
12	0	0
15	0	0
17	0	1
19	2	2
21	4	5
23	7	7
24	8	8

Tabela 6 - Porcentagem de animais vivos em relação ao dia após inoculação subcutânea
Avaliação do crescimento tumoral local
Grupos CTRL_L x PTU_L – São Paulo – 2006

DIAS APÓS INOCULAÇÃO	SOBREVIDA %	
	CTRL_L	PTU_L
0	100,0	100,0
7	100,0	100,0
9	100,0	100,0
12	100,0	100,0
15	100,0	100,0
17	100,0	87,5
19	75,0	75,0
21	50,0	37,5
23	12,5	12,5
24	0,0	0,0

As frações de sobrevida foram calculadas segundo o método de Kaplan-Meier e demonstradas na figura 3.

Figura 3 - Avaliação do crescimento tumoral local – Representação gráfica da sobrevida dos grupos CTRL_L e PTU_L, curva de Kaplan-Meier, mostrando que a evolução dos óbitos deu-se de forma semelhante em ambos os grupos. Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$)

A análise estatística dos dados de sobrevida seguiu o Teste de Mantel-Haenszel (logrank), não indicando diferença estatisticamente significativa na evolução da sobrevida entre os grupos controle e tratado com $p = 0,752$ para um intervalo de confiança de 95%.

5.1.3 Estudo Anatomopatológico

Todos os animais de ambos os grupos foram submetidos à necropsia, não sendo observados quaisquer sinais de crescimento metastáticos em órgãos internos, inclusive sistema nervoso central, razão pela qual não foram realizados estudos histopatológicos de espécimes colhidos dos animais deste experimento.

5.1.4 Controle de Peso e Consumo de Água e Alimento

A tabela 7 apresenta o peso médio dos animais, o consumo hídrico médio e o consumo médio de alimento de ambos os grupos no decorrer do experimento, obtidos conforme descrito em *material e métodos* e demonstra que o peso e os consumos de alimento e solução de bebida mantiveram-se dentro do esperado para a espécie.

Tabela 7 - Peso médio dos animais, consumo médio de ração e solução de bebida
Avaliação do crescimento tumoral local.
Grupos CTRL_L x PTU_L – São Paulo – 2006

GRUPO	PESO MÉDIO EM GRAMAS	CONSUMO HÍDRICO ml/dia ^{(1) (2)}	CONSUMO DE ALIMENTO gramas/dia ⁽²⁾
CTRL_L	24.6 ± 2.3	3,8 ^a	3,9 ^b
PTU_L	25.4 ± 3.6	5,3 ^a	3,7 ^b

(1) Este consumo médio de solução de bebida garantiu uma ingestão diária equivalente a 115 mg/kg de propiltiouracil.

(2) Médias de mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significativa

A tabela 8 apresenta a média dos pesos dos animais em relação ao dia após a inoculação mostrando que os animais, embora portadores de doença maligna, não apresentaram variação de peso durante o experimento.

Tabela 8 - Peso médio dos animais durante o experimento em relação ao dia após inoculação
Avaliação do crescimento local.
CTRL_L x PTU_L – São Paulo – 2006

DIAS APÓS INOCULAÇÃO SUBCUTÂNEA	GRUPOS			
	CTRL_L		PTU_L	
	Peso em gramas	N	Peso em gramas	N
0	22.9	8	20.9	8
7	21.6	8	21.5	8
9	23.2	8	21.7	8
12	24.2	8	22.9	8
15	25.8	8	25.9	8
17	29.1	8	28.8	7
19	26.7	6	28.3	5
21	24.4	4	29.1	3
23	23.7	1	29.3	1

5.2 Efeito do Hipotireoidismo e do Hipertireodismo sobre o Potencial

Tumoral Metastático

5.2.1 Avaliação do Potencial Metastático (Capacidade de Nidação)

A tabela 9 e a figura 4 mostram a distribuição de nódulos tumorais pulmonares nos grupos controle ou sob tratamento, obtidos a partir da contagem dos nódulos na superfície pulmonar, mediante magnificação por lupa estereoscópica.

Tabela 9 - Distribuição dos nódulos pulmonares metastáticos, contados na superfície dos pulmões.

Grupos CTRL_M; T4_M; PTU_M e I¹³¹_M

Avaliação do potencial metastático – São Paulo – 2006

ANIMAL	GRUPO			
	CTRL_M	PTU_M	T4_M	I ¹³¹ _M
1	59	138	46	93
2	44	120	38	91
3	37	111	28	90
4	30	103	16	85
5	26	76	14	84
6	21	74	14	78
7	20	55	14	68
8	19	50	12	30

Figura 4 - Avaliação do potencial metastático (nidação) – Representação gráfica da distribuição do número de nódulos superficiais pulmonares e respectivas médias (linha cheia). Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos CTRL_M e T4_M ($p>0,05$) e entre os grupos PTU_M e I131_M ($p>0,05$). No entanto, há diferença estatisticamente significativa entre CTRL_M e PTU_M ($p<0,01$) e CTRL_M e I131_M ($p<0,01$)

A média de nódulos tumorais, conforme tabela 10 e figura 5, foi de 32 nódulos para o grupo CTRL_M; 91 nódulos para o grupo PTU_M; 23 nódulos para o grupo T4_M e 77 nódulos para o grupo I¹³¹_M. Houve diferença estatisticamente

significativa ($p < 0,01$) entre os grupos CTRL *versus* PTU e I^{131} . O mesmo se deu entre os grupos T4 *versus* PTU e I^{131} . Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os grupos CTRL *versus* T4 e entre os grupos PTU *versus* I^{131} . Os estudos estatísticos foram realizados mediante Teste de Análise de Variância para uma amostra não pareada (ANOVA) e aplicação de pós-teste de Dunnett, de múltipla comparação.

Tabela 10 - Média dos nódulos metastáticos pulmonares por grupo.
Grupos CTRL_M; T4_M; PTU_M e I^{131} _M
Avaliação do potencial metastático – São Paulo – 2006

GRUPO	NÓDULOS PULMONARES METASTÁTICOS			
	N	MÉDIA ⁽¹⁾	DP	CV
CTRL_M	8	32 ^a	14	43,7
PTU_M	8	90 ^b	32	35,0
T4_M	8	22 ^a	13	57,3
I^{131} _M	8	77 ^b	20	26,8

(1) Médias de mesma letra não possuem diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) Médias de letra diferente, possuem diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

Figura 5 - Avaliação da capacidade de nidacão (metástase) – Representação gráfica das médias do número de nódulos superficiais pulmonares e desvio padrão. Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos CTRL_M e T4_M ($p > 0,05$) e entre os grupos PTU_M e I^{131} _M ($p > 0,05$). No entanto, há diferença estatisticamente significativa entre CTRL_M e PTU_M ($p < 0,01$) e CTRL_M e I^{131} _M ($p < 0,01$)

5.2.2 Estudo Anatomopatológico

Foi possível evidenciar-se a presença de nódulos de coloração acastanhada escura, de tamanhos variados, na superfície pulmonar (pleura visceral), conforme figura 6A, 6B, 6C E 6D.

Alguns animais dos grupos PTU_M e I¹³¹_M apresentaram nódulos em pleura parietal.

Não foram observados quaisquer sinais de crescimento metastáticos em outros órgãos internos, inclusive sistema nervoso central, além dos pulmões dos animais dos grupos de estudo de crescimento metastático, quando submetidos à necropsia.

5.2.3 Estudo Histopatológico

Os cortes histológicos os pulmões dos animais dos do experimento de avaliação do potencial metastático revelaram proliferação de células de morfologia poliédrica (epitelióide), com grandes quantidades de melanina no citoplasma. Observou-se ainda, pleomorfismo acentuado e mitoses aberrantes em disposição de forma nodular em meio aos alvéolos ou próximo aos bronquíolos, característico de melanoma de padrão epitelióide. As figuras 7A, 7B, 8A, 8B, 9A e 9B mostram fotomicrografias obtidas dos cortes histológicos de pulmão normal de camundongo e dos pulmões dos grupos CTRL_M; T4_M; PTU_M e I¹³¹_M.

Não foram verificadas lesões macroscópicas em outros órgãos que justificassem a execução de estudo histopatológico.

Figura 6 – Avaliação do potencial metastático. Macrofotografia de pulmões, hemiface dorsal do órgão.

6A: Grupo CTRL_M – animais não tratados - controle

6B: Grupo T4_M – animais tratados com L-tiroxina

6C: Grupo PTU_M – animais tratados com PTU

6D: Grupo I¹³¹_M – animais submetidos à tireoidectomia actínica

Figura 7A – Fotomicrografia de corte histológico de pulmão normal de camundongo, corado pelo método hematoxilina-eosina (HE). Aumento 76x.

A – alvéolos B – brônquio V – vaso sanguíneo

Figura 7B – Fotomicrografia de corte histológico de pulmão de camundongo, corado pelo método hematoxilina-eosina (HE). Aumento 76x. **Grupo – CTRL_M**

A – alvéolos B – brônquio NM – melanoma - nódulo metastático V – vaso sanguíneo

Figura 7

Figura 8A – Fotomicrografia de corte histológico de pulmão de camundongo, corado pelo método hematoxilina-eosina (HE). Aumento 76x. Grupo **CTRL_M**.

A – alvéolos B – brônquio NM – melanoma - nódulo metastático V – vaso sangüíneo

Figura 8B – Fotomicrografia de corte histológico de pulmão de camundongo, corado pelo método hematoxilina-eosina (HE). Aumento 76x. Grupo – **T4_M**.

A – alvéolos B – brônquio NM – melanoma - nódulo metastático NMPB – nódulo peri-brônquico/vascular V – vaso sangüíneo

Figura 9A – Fotomicrografia de corte histológico de pulmão de camundongo, corado pelo método hematoxilina-eosina (HE). Aumento 76x. **Grupo – PTU_M**

A – alvéolos B – brônquio NM – melanoma - nódulo metastático NMPB – nódulo peri-brônquico NMPB/V – nódulo peri-brônquico/vascular V – vaso sanguíneo

Figura 9B – Fotomicrografia de corte histológico de camundongo, corado pelo método hematoxilina-eosina (HE). Aumento 76x. **Grupo – I¹³¹_M**

A – alvéolos B – brônquio NM – melanoma - nódulo metastático NMPB – nódulo peri-brônquico NMPB/V – nódulo peri-brônquico/vascular V – vaso sanguíneo

5.2.4 Controle de Peso e Consumo de Água e Alimento

Os animais submetidos ao estudo do potencial metastático apresentaram as seguintes médias de peso e consumo de alimento e solução de bebida, no decorrer do experimento, conforme tabela 11.

Tabela 11 - Peso médio dos animais, consumo médio de ração e solução de bebida
Avaliação do potencial metastático – São Paulo – 2006

GRUPO	PESO MÉDIO EM GRAMAS	CONSUMO HÍDRICO ml/dia	CONSUMO DE ALIMENTO gramas/dia
CTRL_M	25,3	4,9	4,9
PTU_M	23,1	6,5 ⁽¹⁾	3,5
T4_M	24,6	8,4 ⁽²⁾	5,6
I ¹³¹ _M	23,8	4,1	4,0

(1) Este consumo médio de solução de bebida garantiu uma ingestão diária equivalente a 140 mg/kg de propiltiouracil.

(2) Este consumo médio de solução de bebida garantiu uma ingestão diária equivalente a 300 µg/kg de levotiroxina sódica.

5.2.5 Dosagem de T4 Total

A tabela 12 compara a média dos valores séricos de T4 total entre os grupos do experimento e estas com o valor obtido com o grupo eutireoidiano. Não foi realizada análise estatística entre as mesmas, pois os dados foram obtidos da mensuração única da mistura da amostra do soro de cada animal, em seu respectivo grupo, conforme explicado em *material e métodos*.

Tabela 12 - Tiroxina sérica (T4 Total)
 Grupos CTRL_M; T4_M; PTU_M e I¹³¹_M e eutireoidiano – média
 obtida conforme descrito em *material e métodos*
 Avaliação do potencial metastático – São Paulo – 2006

GRUPO	n	TIROXINA (T4 TOTAL) µg/dL
CTRL_M	8	3,61
PTU_M	8	2,13
T4_M	8	5,70
I ¹³¹ _M	8	1,16
EUTIREOIDIANO	4	2,83

6 DISCUSSÃO

Considerando-se que tanto no ensaio para avaliação do crescimento local quanto para avaliação da capacidade metastática houve homogeneidade no peso médio dos animais bem como no consumo médio diário de ração, pode-se inferir que não houve qualquer efeito indireto do hipotireoidismo sobre a economia animal que pudesse ter afetado ou promovido os resultados obtidos.

Desta forma, a indução do estado hipotireoidiano não interferiu no comportamento da cepa B16F10 quando avaliados seu potencial de crescimento local e a sobrevida dos animais ($p > 0,05$).

A presença dos nódulos tumorais clinicamente detectáveis por inspeção e palpação em alguns dos animais, sete dias após a inoculação subcutânea e a evolução dos nódulos que atingiram grandes volumes no curto espaço de tempo de 23 dias, culminando com o óbito de todos os animais de ambos os grupos, demonstram um elevado grau de agressividade da cepa B16F10, o que pode ter influenciado o resultado obtido no experimento de avaliação do crescimento local, uma vez que a velocidade de crescimento desta cepa pode ter obscurecido qualquer influência que poderia haver, fosse ela positiva ou negativa, ocasionada pelo hipotireoidismo sobre o crescimento do melanoma murino.

É importante ressaltar que, embora haja uma aparente tendência das médias dos volumes do grupo PTU_L se apresentarem menores que aquelas do grupo CTRL_L, particularmente nos últimos dias pós-inoculação, estas médias são, na verdade, resultado de um artifício, pois, os animais com volumes tumorais maiores vindo a óbito precocemente, levaram a uma diminuição da média do volume por conta dos sobreviventes apresentarem volumes tumorais menores. Isto explica a

diminuição do volume tumoral, passível de se observar na figura 2, ocorrida no 23º dia após a inoculação.

Os resultados obtidos com o comportamento da cepa B16F10 na avaliação do crescimento local e sobrevida dos animais corroboram relatos anteriores em que diversos autores procuram relacionar o comportamento do melanoma às alterações no metabolismo dos hormônios tireoidianos, particularmente o hipotireoidismo. Já em 1952, Shimkin et al. relataram a tentativa de tratamento do melanoma em um homem, por meio da hipofisectomia total, concluindo que tal procedimento não influenciou o progressivo crescimento do tumor do paciente em estudo.

Também Ellerhorts et al. (2003) relataram, em um estudo retrospectivo, uma maior incidência de pacientes hipotireoidianos entre os portadores de melanoma cutâneo, sem que se notasse, contudo, qualquer diferença aparente na apresentação do melanoma em pacientes hipotireoidianos e eutireoidianos, sugerindo que a interação entre o melanoma e o hipotireoidismo, se houvesse, se daria nos primeiros estágios da doença maligna que, por sua vez, deixaria de sofrer influencia dos hormônios da tireóide nos estágios mais avançados. Estes mesmos autores já haviam relatado uma maior incidência do hipotireoidismo entre pacientes com melanoma de úvea, sem que se pudesse detectar, contudo, qualquer tendência em aumento de sobrevida neste grupo de pacientes. Na tentativa de explicar esta relação, Ellerhorts et al. (2004) estudaram a expressão do hormônio liberador de tirotropina (TRH) em cultura de células humanas de melanócitos oriundos de diversas cepas de melanoma e de lesões pigmentadas (nevo) bem como a resposta proliferativa destas cepas ao TRH exógeno, encontrando a presença de receptores de TRH em 63% das culturas de melanoma humano e uma alta incidência no nevo displásico, mas não em cultura de melanócitos. Da mesma forma, as cepas do

melanoma e do nevo displásico responderam com aumento na proliferação diante de baixas concentrações de TRH exógeno. Desta forma, os autores sugeriram uma ação autócrina do TRH como fator de crescimento, de maneira que as células do melanoma seriam capazes de detectar o estado hipotireoidiano (baixos níveis hormonais circulantes) e, à semelhança das células neuroendócrinas do hipotálamo, responderiam produzindo TRH. No entanto não há, até o momento, estudos demonstrando a expressão de TRH ou mesmo de receptores de membrana para os hormônios tireoidianos que tenham sido conduzidos com a cepa B16F10.

Por outro lado, os resultados obtidos confrontam com estudos experimentais que avaliaram o crescimento tumoral e sobrevida em animais com hipotireoidismo experimentalmente induzido. Trabalhos envolvendo tumor mamário, hepatoma de Morris, sarcoma 1, fibrossarcoma de Lewis, carcinoma pulmonar de Lewis, carcinoma prostático PC-3 e DU 145 realizados em camundongos ou ratos hipotireoidianos demonstraram uma maior sobrevida destes animais quando comparados ao grupo eutireoidiano (DUBINIK; MORRIS; DALTON, 1950; ERDSTEIN; GUYDA; MISHIKIN, 1984; GUPTA; CHIANG; DEODHAR, 1981; KINOSHITA et al., 1991; KUMAR; CHIANG; DEODHAR, 1979; MISHIKIN et al., 1979; MISHIKIN et al., 1981; SHOEMAKER et al., 1976; THEODOSSIOU et al., 1999; THEODOSSIOU; SCHWARZENBERGER, 2000).

Alguns destes estudos demonstraram, também, a inibição do crescimento tumoral local, melhor resposta ao 5-fluorouracil frente ao adenocarcinoma mamário e inibição da hepatocarcinogênese promovida pela administração de 2-aminofluoreno, tendo os autores, em sua maioria, associado ao hipotireoidismo a menor velocidade de crescimento e volume tumorais e, conseqüentemente, maior sobrevida dos animais (GOODALL, 1966; SHOEMAKER; DAGHER, 1979).

Embora estudo sobre o comportamento do tumor mamário em fêmeas primíparas de camundongos C3H/HeN (positivas para vírus do tumor mamário murino) frente a diversos estados tireoidianos tenha demonstrado que, após um ano do desmame, 90 a 96% dos animais eutireoidianos e hipertireoidianos desenvolveram tumor mamário, enquanto que este índice restringiu-se a 70% dos animais com hipotireoidismo, creditou-se esta diferença a uma grande regressão do epitélio mamário causado pelo hipotireoidismo e não a uma ação direta sobre o crescimento tumoral (VONDERHARR; GRECO, 1982).

Evidencia-se desta forma que, contrariamente às células do hepatoma, próstata e glândula mamária estudadas em camundongos ou ratos, as células do melanoma murino não parecem sofrer influência dos hormônios tireoidianos quando implantadas no subcutâneo dos animais.

No estudo da capacidade de nidação, ou seja, no comportamento da cepa B16F10 na indução de metástases pulmonares, evidenciou-se diferença estatisticamente significativa na comparação dos grupos CTRL_M e T4_M quando comparados aos grupos PTU_M e I¹³¹_M. ($p < 0,05$).

Embora a média dos nódulos do grupo T4_M tenha sido inferior à média do grupo controle, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos citados. É possível que a tiroxina tenha, no entanto, contribuído para a tendência de média menor apresentada por este grupo.

Também não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos PTU_M e I¹³¹_M, apesar da maior média apresentada pelo grupo tratado com o PTU, o que poderia ser explicado pelo efeito imunossupressor atribuído a esta droga, que teria acentuado os efeitos do hipotireoidismo. Goldrath et al. (1982), estudaram os efeitos das drogas metimazol e propiltiouracil sobre a estimulação de

fitohemaglutinina (PHA) na blastogênese de células mononucleares do sangue periférico de voluntários saudáveis e sem histórico de doença tireoidiana, evidenciando-se um significativo efeito supressor do PTU em concentrações terapêuticas na resposta blastogênica destas células.

Levando-se em conta que a administração de levotiroxina sódica não produziu diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e tratado com T4, pode-se considerar que a comparação se deu entre animais eutireoidianos e hipotireoidianos, embora Dakine; Oliver; Grino (2000) indiquem a mensuração de TSH como mais adequada para o diagnóstico do hipotireoidismo em roedores.

Assim, o hipotireoidismo significativamente influenciou na capacidade de nidação das células do melanoma murino, favorecendo um maior número de nódulos tumorais ou metástase.

Diversos fatores, alguns deles relacionados entre si, podem estar envolvidos no mecanismo que explicaria os resultados obtidos. O próprio processo de formação de metástase em si encerra particularidades que poderiam determinar este comportamento.

Metástase é uma lesão neoplásica que nasce de outra formação cancerosa sem que haja uma relação de contigüidade entre elas. A habilidade de produzir metástase é uma propriedade das células tumorais malignas (POSTE; FIDLER, 1980).

O processo de dispersão metastática parece depender de uma complexa interação entre fatores do hospedeiro e da habilidade das células tumorais em extravasar e crescer. A dispersão metastática das células tumorais de um tumor primário a sítios distantes no organismo é responsável pela maior morbidade e mortalidade nos pacientes com doença neoplásica, sendo considerada a principal

causa de morte por câncer. Felizmente, a metástase é um processo extremamente ineficiente, com poucas de muitas células desprendidas do tumor primário formando tumores secundários com sucesso (CAMERON et al., 2000; LUZZI et al., 1998; WEISS, 1990).

A disseminação de um tumor maligno é o resultado de uma cascata de eventos que consiste no descolamento de células de um tumor primário, invasão da matriz extracelular circundante, invasão dos vasos sangüíneos, disseminação via sistema circulatório, adesão à íntima dos vasos, extravasamento e crescimento nos sítios secundários. A mera presença de células tumorais no sangue por si só não constitui metástase, uma vez que muitas das células circulantes morrem (FIDLER, 1973; STAQUICINI et al., 2003; WANG et al., 2004).

Estudos experimentais com a cepa B16F10 do melanoma murino demonstram que apenas 0,01% das células injetadas na circulação forma focos metastáticos. Tem sido apontada a capacidade das células de extravasar aos tecidos vizinhos mediante a degradação da membrana basal e da matriz extracelular como importante fator limitante. Acredita-se, também, que muitas das células tumorais sejam rapidamente destruídas na circulação, tanto pelo sistema imune quanto pelas forças hemodinâmicas. No entanto, contrariando este conceito, estudos conduzidos com células da cepa B16F10 marcadas com nanoesferas demonstraram que praticamente todas as células injetadas do melanoma sobreviveram na microcirculação e extravasaram com sucesso em 24 horas após a inoculação na membrana corioalantoidea de embriões de galinha. O mesmo estudo demonstrou que o processo de extravasamento é independente da habilidade metastática da cepa, uma vez que fibroblastos normais e mutantes (*ras*-transformados) extravasam igualmente (KOOP, 1995; KOOP et al., 1996).

Em camundongos, ficou evidenciado que a maioria das células injetadas (>80%) sobreviveram à fase inicial na circulação e extravasaram com sucesso até o 3º dia, porém, poucas das células extravasadas dividiram-se e formaram colônias (na proporção de uma em cada 40 células formando micrometástases). Destas, apenas uma de cada 100 micrometástase progrediu para formar nódulos macroscópicos no 13º dia, enquanto a maioria das micrometástases desapareceu, sendo que mais de um terço das células extravasadas ainda estavam presentes no tecido no 13º dia na forma de células cancerosas solitárias, a maioria delas em estado de dormência. Os autores determinaram que a perda celular na microvasculatura restringiu-se a 10% apenas, demonstrando que a principal causa da ineficiência metastática seria uma inabilidade das células extravasadas em iniciarem o crescimento e das micrometástases em tornarem-se tumores macroscópicos, talvez por influência da angiogênese e da imunoregulação (LUZZI et al., 1998).

Um dos primeiros trabalhos que tenta relacionar o processo metastático e os hormônios tireoidianos foi conduzido por Zimel et al. em (1975) que, inoculando suspensão do carcinoma 256 de Walker no testículo de ratos Wistar, obtiveram, após o crescimento do tumor primário neste órgão, a rápida formação de metástases nos linfonodos abdominais. Os animais foram, então, divididos em grupo controle e grupos tratados com tiroxina ou drogas antitireoidianas. Os autores relatam que a diminuição da atividade da tireóide, promovida pela administração diária de propiltiouracil marcadamente favoreceu o crescimento metastático enquanto que a tireotoxemia, desenvolvida pela administração de tiroxina, significativamente reduziu a instalação de metástases enquanto o desenvolvimento dos tumores primários não

sofreu qualquer influência do nível sérico dos hormônios tireoidianos, semelhantemente aos resultados obtidos neste ensaio.

Igualmente, Kinoshita et al. (1991) relataram que os hormônios tireoidianos poderiam ser importantes para o crescimento tumoral *in vivo*, embora tenham considerado controverso se os hormônios tireoidianos estimulariam ou inibiriam o crescimento dos tumores. Atribuíram aos resultados conflitantes obtidos pelos diversos autores às diferenças de sensibilidade aos hormônios tireoidianos pelos tumores estudados e às condições experimentais usadas na indução do hiper ou do hipotireoidismo. Também consideraram que seria possível que os hormônios tireoidianos controlassem o crescimento tumoral metastático afetando os mecanismos de defesa naturais do hospedeiro, uma vez que, segundo Herberman e Ortaldo (1981), o desenvolvimento espontâneo de metástases parece ser controlado pela mediação de células matadoras naturais (NK) e macrófagos alveolares. Desta forma, realizaram estudo em que o crescimento do carcinoma pulmonar 3LL em camundongos foi associado a uma significativa diminuição dos níveis séricos de T3 e T4, com evidente inibição do desenvolvimento de metástase pulmonar espontânea por T3. Os autores consideraram que este efeito antimetastático de T3 não se deu por uma ação antitumoral direta, uma vez que não se notou um efeito citotóxico do hormônio sobre as células do carcinoma pulmonar em cultura. Na tentativa de explicar seus resultados, os autores notaram que o tratamento com T3 ou T4 aumentou a morte celular de 3LL pelos macrófagos alveolares e que a droga antitireoidiana metimazol causou marcada supressão da atividade das células NK, embora não tenha exercido qualquer influência sobre a atividade dos macrófagos alveolares.

Assim, uma das possibilidades na tentativa de explicar o maior número de nódulos metastáticos apresentado pelos animais dos grupos hipotireoidianos aqui relatado poderia ser atribuída à influência dos hormônios da tireóide sobre o sistema imune.

A ativação sistêmica de macrófagos usando variadas técnicas tem demonstrado eficácia na destruição ou inibição de uma larga gama de tumores singênicos, alogênicos e xenogênicos. Existem evidências que o sistema imune pode modular a progressão e formação de metástases do melanoma (FIDLER, 1978; FIDLER, 1994; JOHNSON et al., 1998; LIPTON et al., 1983; MACEWEN et al., 1999; VERONESI et al., 1982).

Dados obtidos de experimentos *in vitro* indicam que monócitos humanos, quando em contato com células cancerosas, produzem mediadores citotóxicos, incluindo TNF- α , intermediários de oxigênio reativo e óxido nítrico. Em estudo clínico, demonstrou-se que os macrófagos alveolares e monócitos do sangue periférico de pacientes com carcinoma renal e metástase pulmonar, bem como de voluntários normais responderam *in vitro*, ao LPS (lipopolissacarídeo de *Salmonella typhimurium*) e ao Interferon gama recombinante de maneira similar, apresentando habilidade de matar seletivamente células tumorais do melanoma SK-MEL-28 (MACURA-BIEGUN et al., 2003; THOMASSEN et al., 1990).

Diversos trabalhos procuraram demonstrar a capacidade antitumoral dos macrófagos. Matsuzaki (1987) estudou a atividade antitumoral de macrófagos alveolares e células matadoras naturais (NK) estimuladas pela utilização de *Lactobacillus casei* LC 9018 frente a variante altamente metastática do melanoma murino, cepa B16-BL6, obtendo como resultado uma menor atividade metastática nos animais tratados, com marcada estimulação da atividade das células NK e maior

citotoxicidade mediada pelos macrófagos alveolares, demonstrando a importância da participação destas células na inibição da formação de metástases. Também Duffie e Young (1991), buscaram estudar a habilidade tumoricida de macrófagos alveolares e peritoniais *in vitro*, provenientes de camundongos C57BL6 em que foram inoculadas as cepas metastática LLC-C3 ou não metastática LLC-C8 do carcinoma pulmonar de Lewis. Durante o desenvolvimento das metástases, os macrófagos alveolares provenientes dos animais LLC-C3 apresentaram *in vitro*, capacidade aumentada de matar células tumorais sem qualquer estímulo adicional, enquanto os macrófagos provenientes dos animais LLC-C8 não apresentaram esta característica. Notadamente, os macrófagos peritoniais demonstraram a mesma atividade, atribuindo-se este comportamento dos macrófagos à própria presença das metástases.

Ainda sob este aspecto, que atribui a atividade antitumoral como uma das principais funções dos macrófagos, fatores citotóxicos tais como radicais de oxigênio e fator de necrose tumoral - TNF são liberados pelos macrófagos para inibir o crescimento das células tumorais (LIU; NG, 1991; LIU; TSUI; WONG, 1993).

Atribui-se ao TNF potente atividade antitumoral contra várias neoplasias humanas. Tem-se demonstrado, também, que o TNF- pode afetar a sinalização das integrinas, maior grupo de receptores de matriz extracelular na superfície das células tumorais resultando em menor ativação de α_3 . Sabe-se que a interação célula-matriz é primariamente mediada por moléculas de adesão, como as integrinas, que podem participar na migração e penetração das células tumorais pela membrana basal e outras barreiras moleculares (CLEZARDIN, 1998; SCHMITMEIER, MARKLAND; CHEN; WANG; YANG, 2002; ZUBER et al., 1988).

Uma maior expressão da integrina $\alpha 3$, responsável pela ativação da metaloproteinase-2 (MMP-2), tem sido relatada nas formas mais invasivas do melanoma humano (ALBELDA et al., 1990; HEINO, 1996; SAIDA, 2001; STAQUICINI et al., 2004).

Por outro lado, a influência do hipotireoidismo sobre a atividade dos macrófagos está bem documentada. Macrófagos alveolares provenientes de ratos normais e de ratos em que se induziu o estado hipotireoidiano com a droga antitireoidiana metimazol, tiveram sua atividade fagocitária contra leveduras avaliada. Enquanto macrófagos de animais normais fagocitaram e mataram rapidamente as leveduras, macrófagos de animais com hipotireoidismo demonstraram nítida diminuição de sua atividade. Em outro estudo, que comparou a função de macrófagos peritoniais de camundongos C57BL6 com aqueles derivados de animais em que se induziu hipotireoidismo mediante utilização de metimazol, observou-se supressão da expressão do gene do fator de necrose tumoral (TNF). De maneira similar, a produção de reativos nitrogenados e os intermediários de oxigênio foi significativamente diminuída nestas células. Embora se credite ao metimazol um efeito imunossupressor tanto para macrófagos quanto para linfócitos, os autores não obtiveram qualquer efeito inibidor desta droga *in vitro*, com doses de 1 a 10000 μ M sobre a produção de nitrogênio reativo e superóxidos em macrófagos peritoniais de camundongos. Esta associação também ficou evidenciada em estudo prévio conduzido pelos mesmos autores e que demonstrou que células tumorais MBL-2 crescem mais rapidamente em animais com hipotireoidismo e que macrófagos provenientes de camundongos hipotireoidianos apresentam menor capacidade fagocitária, menor habilidade em matar células, menores níveis de enzimas lisossomais e menor produção de TNF (LIU; NG, 1991; LIU; TSUI; WONG, 1993).

Em estudo clínico com a tentativa de explicar a menor resposta à infecção observada em pacientes hipotireoidianos, foi avaliada a atividade das enzimas catepsina D, -glucoronidase e arilsulfatase, ficando demonstrado que ratos Sprague-Dawley tireoidectomizados apresentaram, após 4 semanas, redução em 50% da atividade enzimática lisossomal de macrófagos alveolares. A reposição de T3 em doses fisiológicas restaurou a atividade dessas células (STARLING; WEESE, 1985).

Estudos conduzidos com camundongos C3H/He previamente tratados com tiroxina demonstraram que estes animais apresentaram significativo aumento de células T circulantes e, em consequência a esta observação, maior rejeição contra transplante de células do carcinoma de Ehrlich quando comparado ao grupo controle, semelhantemente ao observado em pacientes com Doença de Graves (AOKI; WAKISAKA; NAGATA, 1976).

Vários estudos demonstram que as células NK (natural killer – matadoras naturais) mediam atividades antitumorais e antimetastáticas, inclusive em tumores experimentalmente induzidos.

As células matadoras naturais (NK) representam uma população heterogênea de linfócitos envolvidos na resistência contra tumores e infecção microbiana, bem como na regulação e diferenciação de alguns tipos de células normais, e são parte importante do sistema imune inato (HEBERMAN; ORTALDO, 1981; PROVINCIALI; DI STEFANO; FABRIS, 1994).

Estes estudos são corroborados por achados que esplenócitos isolados de camundongos deficientes em células NK possuem citotoxicidade *in vitro* reduzida contra as células tumorais YAC-1, RMA-S e B16. Além disso, estes animais

possuem menor habilidade em rejeitar tumores e maior incidência de metástases (JOHNSON et al., 2003).

Outros relatos apontam que animais com atividade NK aumentada após imunoestimulação com adjuvantes ou Interferon (IFN) demonstraram maior resistência ao desenvolvimento de metástases. Em contraste, um maior número de metástases foi observado em animais que apresentavam baixo número de células NK, como animais jovens ou tratados com ciclofosfamida (HANNA; BURTON, 1981; HANNA; FIDLER, 1980).

Ratos que sofreram inibição seletiva das células NK mediante uso de soro anti-asialo GM1 (anti-asGM1) exibiram capacidade diminuída em destruir células circulante do adenocarcinoma mamário MADB106 e, por conseguinte, maior número de metástases pulmonares (BARLOZZARI et al., 1985).

Surpreendentemente, a maior incidência de metástases em camundongos exibindo baixa atividade das células NK não ocorreu por um maior seqüestro das células tumorais no pulmão, mas sim por uma maior sobrevida destas células (HANNA; FIDLER, 1980).

Entre as citocinas produzidas pelas células NK, encontra-se o IFN- γ . Dados sugerem que o IFN- γ favorece mecanismos suicidas intrínsecos das células neoplásicas em adição à facilitação da interação de efetores líticos com as células tumorais alvo. Experimentos demonstram que o IFN- γ regula positivamente a expressão de Fas e FasL em células B16 do melanoma, levando estas células à apoptose. Camundongos IFN- γ nocauteados demonstraram ser tão susceptíveis a metástases pulmonares quanto os animais debilitados em células NK. Desta forma, o papel antitumoral das células NK parece envolver tanto a atividade citolítica quanto a produção e secreção de IFN- γ (BÖHM et al., 1998; JOHNSON et al., 2003).

A correlação da atividade citolítica das células NK com os hormônios tireoidianos é motivo de controvérsia entre vários autores, que relatam esta atividade como aumentada, normal ou deprimida (AOKI; WAKISAKA; NAGATA, 1976; PAPIC et al., 1987; STEIN-STREILEIN, 1987; WANG et al., 1988).

Por exemplo, a administração de T4 exógeno a animais de experimentação resultou em aumento de tecido linfóide, tanto de órgãos centrais como periféricos, com um predomínio da população de pequenos linfócitos durante o tratamento, tendo o Interferon exercido a sinalização reguladora mais importante na modulação da atividade das células NK. Parece, portanto, que T4 poderia mimetizar a ação do Interferon sobre as células NK. Neste estudo, conduzido em diversas linhagens de camundongos, tais como a A/J, CBA/J, C57BL6J, BALB/c e C3H/HeN, avaliou-se a atividade citotóxica das células matadoras naturais (NK) de origem esplênica e peritoniais frente às células do linfoma YAC-1, em animais em que se induziu hipotireoidismo experimentalmente com I^{131} ou hipertireoidismo mediante administração de hormônio tireoidiano T4. Os resultados obtidos com o experimento demonstram que os hormônios tireoidianos podem aumentar a atividade das células NK nos camundongos, e que este aumento foi reversível e não foi acompanhado por um aumento nos níveis séricos de Interferon. Por outro lado, o tratamento dos animais com dois análogos inativos de T4: 3-iodo-L-tirosina e 3,5 diiodo-L-tironina não aumentaram a atividade das células NK enquanto a administração de 3,5,3'-triiodo-L-tironina aumentou significativamente a atividade NK, demonstrando não se tratar de efeito inespecífico (SHARMA; TSAI; PROFFITT, 1982).

Outro experimento em que se avaliou a distribuição de linfócitos T citotóxicos CD16/56 e das células NK em pacientes com Doença de Graves, Tireoidite de Hashimoto e voluntários saudáveis de ambos os sexos, foi demonstrado que esta

distribuição encontra-se diminuída na Doença de Graves sem que houvesse, porém, correlação com os níveis de tiroxina. Também ficou evidenciado que, apesar da diminuição da atividade citolítica das células NK nos pacientes hipertireoidianos, a mesma não foi restabelecida com a administração de metimazol, evidenciando-se, desta forma, um componente auto-imune nesta patologia (ROJANO et al., 1998).

Resultados semelhantes aos observados experimentalmente foram obtidos em ensaio que avaliou 62 voluntários, 37 mulheres e 25 homens, com faixa etária entre 90 e 106 anos, aparentemente saudáveis, livres do uso de drogas ou suplementos, onde os indivíduos que apresentaram maior número de células NK (células mononucleares separadas por centrifugação e marcadas com anticorpos monoclonais e avaliadas por citometria de fluxo) e melhor função citolítica eram aqueles que também apresentavam metabolismo dos hormônios tireoidianos e integridade da massa muscular preservados. Notadamente, houve correlação positiva entre níveis séricos de T3 e T4 livres e o número de células NK (MARIANI, 1999).

A neovascularização pode, também, ser um componente crítico para a formação de metástase, uma vez que ela favorece a entrada de células na circulação, promovendo maior densidade de vasos imaturos que possuem membrana basal delgada e poucos complexos juncionais, quando comparados aos vasos sangüíneos maduros. Acredita-se que uma formação tumoral não possa atingir tamanhos maiores que alguns milímetros (aproximadamente 10^6 células) sem que seja desencadeado o processo de angiogênese (WEIDNER et al., 1991; ZATTERSTROM; FELBOR; FUKAI; OLSON, 2000; ZETTER, 1998).

De forma semelhante, o crescimento de tecidos tumorais *in vitro* está limitado pela neovascularização, tendo sido isolado de tumores de animais e humanos um

fator mitogênico para as células endoteliais capilares, denominado TAF - fator de angiogênese tumoral (FOLKMAN et al., 1971).

Assim sendo, a inibição da angiogênese representa importante fator de controle tumoral. O primeiro composto isolado com atividade antiangiogênica foi a angiostatina, molécula obtida a partir da urina de camundongos portadores de carcinoma pulmonar de Lewis. A angiostatina é um fragmento do plasminogênio, de 38 kDa, que seletivamente inibe, de maneira potente, a proliferação das células endoteliais. Também nesta etapa, os macrófagos assumem relevante participação. Durante o processo de infiltração do tecido tumoral, os macrófagos degradam as proteínas da matriz extracelular mediante secreção de metaloproteinases (MMPs), que incluem collagenases intersticiais, estromelisinases, collagenases tipo IV e elastases, particularmente as metaloelastases (MME). As metaloelastases são essenciais para a penetração na membrana basal e invasão tecidual pelos macrófagos, e possuem importante papel na degradação do plasminogênio e geração da angiostatina. Esta observação ficou evidenciada em experimento onde macrófagos cultivados simultaneamente com células 3LL do carcinoma pulmonar de Lewis, em meio contendo Fator Estimulador de Colônia de Granulócito-Macrófago, resultou em secreção de MME e produção de angiostatina pelos macrófagos a exemplo da observação anterior, em que a angiostatina podia ser obtida *in vitro* da degradação do plasminogênio pela ação de elastases pancreáticas (DONG et al., 1997; O'REILLY et al., 1994; WEINSTAT-SASLOW; STREEG, 1994).

Desta forma, pode-se inferir que a diminuição da atividade dos macrófagos causada pelo hipotireoidismo poderia, também, acarretar menor produção de angiostatina e, conseqüentemente, menor inibição da vascularização tumoral.

Também assume importante papel na tentativa de elucidação da interação entre metástase e hormônios tireoidianos obtidas neste trabalho, a ação destes hormônios sobre o ciclo celular e as vias de transcrição.

Uma diferença fundamental entre células normais e células malignas é que estas últimas perderam algum elemento de controle no ponto de restrição R, o qual previne a progressão das células normais através do ciclo celular em condições adversas. Diferentemente das células normais, sabe-se que a cepa B16F10 frente à privação de soro no meio de cultura apresenta um típico ciclo celular livre, com células distribuídas pelas diversas fases do mesmo e sem que exibem qualquer tipo de sincronização quando realimentadas (PARDEE, 1974; RODRIGUEZ-AYERBE; SMITH-ZUBIAGA, 2000).

Em estudo de carcinogênese hepática promovida pela utilização de dietilnitrosamina, um potente indutor de hepatocarcinoma em roedores, os autores demonstraram que um tratamento de curta duração com triiodotironina (T3) reduziu dramaticamente o número de nódulos hepáticos GSTP (lesões hepáticas hiperplásicas -glutamil transpeptidase ou glutathione S-transferase placentária positivas), e que a administração de ciclos repetidos (uma semana por mês) de T3 em ratos portadores de nódulos diminuiu em 50% o desenvolvimento de hepatocarcinoma e em 100% o aparecimento de metástases. Os autores atribuíram estes resultados a uma possível ação de T3 sobre o programa de diferenciação induzindo retrodiferenciação dos hepatócitos nodulares para células aparentemente normais, via perda de seu fenótipo resistente e uma reintegração ao padrão hepático normal. É sabido que T3 interage com receptores nucleares da mesma superfamília do ácido retinóico e que estes receptores exercem um profundo efeito na diferenciação celular (ENOMOTO; FARBER, 1982; LEDDA-COLUMBANO, 2000).

Receptores esteroidais, de ácido retinóico e de hormônio tireoidiano são membros de uma superfamília de receptores que dividem diversas características, por exercer suas atividades na transcrição gênica. Ligados aos seus respectivos hormônios, estes receptores intracelulares agem como fatores de transcrição que ativam ou reprimem a expressão de genes nucleares alvos, ao ligarem-se a seqüências específicas do DNA, chamadas de elementos de resposta hormonal. (MIHARA et al., 1999; UMESONO; MURAKAMI; THOMPSON; EVANS, 1991).

Os hormônios tireoidianos são importantes reguladores do crescimento, desenvolvimento e metabolismo nos animais superiores e humanos. As ações do hormônio tireoidiano triiodotironina (T3) são iniciadas pela ligação a receptores nucleares específicos a este hormônio (TRs). Os TRs são largamente distribuídos nos tecidos dos mamíferos, e há fortes evidências de que alterações nos TRs sejam eventos comuns no câncer. Estas alterações, que incluem perda de heterozigose, rearranjos gênicos, metilação e mutações pontuais, sugerem que os genes que codificam os TR podem funcionar como supressores de tumor, embora seu papel na patogenia e progressão do processo neoplásico não esteja ainda muito claro. Acredita-se em uma potencial relação entre TRs e a via de sinalização *Ras*, pois, em células do neuroblastoma N2a- , evidências demonstram que os TRs são fortes supressores da ação do oncogene desta via. Assim, os hormônios tireoidianos antagonizam a resposta de transcrição mediada por *ras* nas células que expressam os TRs, ficando também demonstrado que as proteínas ativadas de *Ras* induzem a expressão da ciclina D1 e que os hormônios tireoidianos bloqueiam esta indução. A repressão dos níveis de ciclina D1 por T3 parece ser um importante componente do mecanismo pelo qual o hormônio bloqueia a proliferação dependente da via de sinalização *Ras*. Assim, a expressão do oncogene *ras* aumenta o número de células

que deixam a fase G1 e progridem pelo ciclo celular, e T3 bloqueia esta resposta. Estas observações assumem especial importância, uma vez que mutações ativas em *ras* estão presentes em, pelo menos, 30% das neoplasias humanas e o oncogene *ras* eficientemente transforma cepas imortalizadas de roedores e a ciclina D1, que desempenha importante papel na progressão do ciclo celular, é um dos principais alvos dos efeitos transformantes e proliferativos do oncogene *ras* (GARCÍA-SILVA; ARANDA, 2004; GARCIA-SILVA; PEREZ-JUSTE; ARANDA, 2002).

Outros trabalhos demonstram a interação dos receptores de hormônios tireoidianos e proto-oncogenes. Por exemplo, em cultura de osteoblastos murino MC3T3, T3 diminuiu a proliferação e reduziu a expressão de mRNA de *c-fos* e *c-jun* que tenha sido favorecida pelo EGF – Fator de Crescimento Epidermal (FRATZL-ZELMAN et al., 1997).

Cultura de células de próstata das cepas PC3, DU145 e LNCaP e células de neoplasia mamária da cepa MCF-7, quando submetidas a adição de transferrina, um potente mitógeno abundante na medula óssea, e à adição dos hormônios tireoidianos T3 e T4 aos meios de cultura, sofreram significativa inibição do efeito proliferativo promovido pela transferrina, particularmente quando da adição de T4, que exerceu seu efeito antiproliferativo de maneira similar em todas as cepas estudadas (MARTINEZ; RUAN; FITZPATRICK, 2000a; MARTINEZ; RUAN; FITZPATRICK, 2000b).

Também os mecanismos de morte celular programada poderiam explicar os resultados ora obtidos no experimento de avaliação do potencial metastático. A apoptose possui papel crítico no desenvolvimento e homeostasia dos organismos

multicelulares. A inibição do processo de apoptose tem sido implicada nas doenças auto-imunes e na carcinogênese (HAMMOND et al., 1997; THOMPSON, 1995).

Sob este aspecto, a apoptose, que ocorre comumente nas células tumorais durante ou logo após o extravasamento dos vasos sangüíneos ao novo ambiente tissular, é um passo importante no controle da metástase. Entre os sinalizadores de apoptose, o sistema Fas/Fas-ligante (Fas/Fas-L) desempenha importante papel na homeostase dos órgãos e na sobrevivência contra os tumores (CARSON; RIBEIRO, 1993; TEIGER et al., 1996).

CHEN; WANG; YANG, (2002), promoveram a supressão de Fas-L nas células do melanoma B16F10 mediante o uso de uma ribozina específica (Fas-L^{ribozina}), averiguando que houve neste grupo, significativo aumento na incidência de metástase pulmonar produzida pelas células do melanoma murino.

Neste sentido, Feldkamp et al. (2001), mediram a concentração de Fas solúvel no soro de 112 pacientes com Doença de Graves, 21 pacientes com bócio tóxico e 24 pacientes com hipertireoidismo subclínico devido à suplementação com L-tiroxina, encontrando importante correlação entre os níveis mensurados de Fas solúvel, T3 e T4 livres, demonstrando que Fas solúvel está aumentado no hipertireoidismo.

Por sua vez, Mihara et al. (1999) desenvolveram um trabalho em que foram avaliados os efeitos dos hormônios tireoidianos sobre a capacidade de apoptose de linfócitos humanos, demonstrando que estes hormônios têm a capacidade de reduzir a expressão do Bcl-2, um gene antiapoptótico, e induzir a oxidação intracelular, resultando em apoptose dos linfócitos.

Semelhantemente, o ácido retinóico, que também faz parte da superfamília de receptores nucleares dos hormônios tireoidianos, induz apoptose em células HL-60

de leucemia, células T periféricas do linfoma e células-tronco embrionárias P19EC, reduzindo a expressão de Bcl-2 e induzindo apoptose (PARK et al., 1994).

É possível que alterações na matriz extracelular promovidas pelo hipotireoidismo possam também ter contribuído para um maior número de nódulos metastáticos nos grupos hipotireoidianos.

Os componentes da matriz extracelular são produzidos principalmente por fibroblastos e também por tumores, células endoteliais e macrófagos. Estes componentes podem interagir *in situ* com macrófagos infiltrantes no tumor, que tanto podem inibir quanto favorecer o crescimento tumoral. O papel da dos componentes da matriz extracelular no crescimento tumoral e formação de metástase não foi ainda totalmente elucidado. Estudos recentes sugerem que estes componentes promovem um microambiente favorável no qual as células tumorais e os macrófagos infiltrantes possam interagir (MACURA-BIEGUN et al., 2003; MANTOVANI et al., 1992)

Estudos com o melanoma humano trazem evidências que o sistema ativador do plasminogênio e o sistema de enzimas da matriz, as metaloproteinases e seus inibidores, desempenham importante papel nesta questão, e que um importante componente na progressão tumoral é a geração de um estroma tumoral pela indução da resposta de reparo de feridas pelo hospedeiro (HOFMANN et al., 2000; KATERINAKI et al., 2003).

A formação do estroma tumoral requer extensiva remodelação tecidual e é, comumente, caracterizada por infiltrado celular inflamatório constituído de macrófagos, células dendríticas e linfócitos (BALKWILL; MANTOVANI, 2001).

A degradação proteolítica da membrana basal e da matriz extracelular e a movimentação através delas são apontadas como passos fundamentais na cascata de eventos que permitiriam a invasão tumoral e metástase (HOFMANN et al., 2000).

A invasão tumoral e metástase são processos que envolvem a ação coordenada de um número de proteases e fatores de crescimento, bem como o reconhecimento de estruturas apropriadas para a fixação das células tumorais. A taxa de proliferação celular parece ser um parâmetro relativamente independente neste processo, sendo os pulmões sítio freqüente de metástases de muitos diferentes tipos de tumores (KESKI-OJA, 1999).

As interações entre as células tumorais e os vasos que permitem a retenção inicial das células tumorais no pulmão são pouco entendidas, embora algumas moléculas tenham sido identificadas participando deste processo. Há tempos se acredita que as integrinas desempenham importante papel nas metástases. Cada integrina é composta por um heterodímero formado por subunidade alfa e beta. As integrinas ligam-se a componentes da matriz extracelular tais como colágeno, fibronectinas e lamininas e podem mediar a adesão, a dispersão ou a migração nestes substratos (WANG et al., 2004).

Células metastáticas fluorescentes HT1080, tratadas com diferentes anticorpos anti heterodímero e foram inoculadas na veia renal de ratos, e subseqüentemente estudadas na perfusão pulmonar. Os estudos sugeriram que a permanência das células na vasculatura pulmonar se daria pela interação entre a integrina $\alpha_3\beta_1$ com a membrana basal exposta. Desta forma, concluiu-se que a integrina $\alpha_3\beta_1$ contribui para a metástase mediando a adesão precoce da célula à vasculatura (WANG et al., 2005).

Farwell; Dubord-Tomasetti (1999) e Farwell; Tranter; Leonard (1995), estudaram extensamente a interação integrina-laminina em astrócitos do cerebelo de ratos e sua regulação pelos hormônios tireoidianos, concluindo que T4

dinamicamente regula esta interação via modulação dos microtúbulos, e que o hipotireoidismo causaria, assim, um desarranjo na matriz extracelular.

Estudos realizados com culturas de células de Sertoli demonstraram que a adição de T3 ao meio de cultura significativamente aumenta o número de células marcadas para laminina e/ou entactina, indicando que este hormônio tireoidiano tem importante papel na expressão de componentes da membrana basal (ULISSE et al., 1998).

Evidencia-se neste trabalho, a diferença de comportamento da cepa B16F10 entre os experimentos que avaliaram o crescimento local e a capacidade de nidação frente ao hipotireoidismo, que pode ser atribuída ao processo de seleção clonal.

Contrariamente ao que se acreditava no passado, a existência de subpopulações de células tumorais com diferentes habilidades metastáticas dentro de um mesmo tumor, sugere que as metástases resultam de um processo de seleção não aleatório, com o crescimento seletivo de subpopulações que possuem propriedades necessárias para completar todos os passos no processo metastático. Estudos determinaram, analisando diversas cepas do melanoma murino B16, que os tumores produzidos pela inoculação via subcutânea são altamente heterogêneos e contêm múltiplas subpopulações que exibem um largo espectro de comportamento metastático. Em contraste, metástases pulmonares oriundas tanto da inoculação subcutânea (metástase espontânea) ou geradas da inoculação direta na circulação (metástase experimental) exibem uma diversidade clonal reduzida, em geral, contendo uma ou duas sub populações. A homogeneidade fenotípica dos clones isolados das metástases pulmonares sugere que as lesões originaram-se da proliferação de uma simples célula tumoral, isto é, de origem monoclonal (POSTE; BROWN; ZEIDMAN, 1982; POSTE; FIDLER, 1980).

A heterogeneidade da cepa inoculada via subcutânea poderia, então, explicar a ausência de resposta à deficiência dos hormônios tireoidianos.

Finalmente, levando-se em conta que alguns tratamentos para o melanoma incluem a utilização de Interferon alfa, de retinóides e Interleucina 2, e que estes tratamentos apresentam como efeito colateral a possibilidade de levar o paciente ao estado hipotireoidiano, pode-se inferir que estes pacientes apresentam um maior risco de metástase pulmonar, e que o diagnóstico e controle do hipotireoidismo poderiam ser úteis a eles, embora modelos utilizando-se roedores possam não apresentar correspondência com outras espécies. Estudos futuros fazem-se necessários a fim de elucidar o mecanismo que favoreceu a instalação de nódulos metastáticos nos animais hipotireoidianos e sua possível aplicabilidade clínica.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- O hipotireoidismo não interferiu no crescimento local da cepa B16F10 do melanoma murino em camundongos C57BL6 nem afetou a sobrevida destes animais.
- O hipotireoidismo significativamente alterou o comportamento metastático da referida cepa nesta linhagem isogênica, favorecendo a formação de nódulos metastáticos nos animais em que este estado patológico foi induzido, quer pela utilização de droga antitireoidiana PTU, quer pela tireoidectomia actínica com I^{131} , no entanto, a administração de levotiroxina sódica não acarretou o efeito contrário.

REFERÊNCIAS*

ADAM, Y. G.; EFRON, G. Cutaneous malignant melanoma: Current views on pathogenesis, diagnosis, and surgical management. **Surgery**, v. 93, n. 4, p. 481-490, 1983.

ALBELDA, S. M.; METTE, S. A.; ELDER, D. E.; STEWART, R.; DAMJANOVICH, L.; HERELYN, M.; BUCK, C. A. Integrin distribution in malignant melanoma: Association of the α_3 subunit with tumor progression. **Cancer Research**, v. 50, p. 6757-6764, 1990.

AOKI, N.; WAKISAKA, G.; NAGATA, I. Effects of thyroxine on T-cell counts and tumour cell rejection in mice. **Acta Endocrinologica**, v. 81, p. 104-109, 1976.

ATKINS, M. B.; MIER, J. W.; PARKINSON, R.; GOULD, J. A.; BERKMAN, E. M.; KAPLAN, M. M. Hypothyroidism after treatment with interleucine-2 and lymphokine-activated killer cells. **The New England Journal of Medicine**, v. 318, n. 24, p. 1557-1563, 1988.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **The Lancet**, v. 357, p. 539-545, 2001.

BARLOZZARI, T.; LEONHARDT, J.; WILTROUT, R. H.; HERBERMAN, R. B.; REYNOLDS, C. W. Direct evidence for the role of LGL in the inhibition of experimental tumor metastases. **The Journal of Immunology**, v. 134, n. 4, p. 2784-2789, 1985.

BOELAERT, K.; FRANKLIN, J. A. Thyroid hormone in health and disease. **The Journal of Endocrinology**, v. 187, p. 1-15, 2005. Disponível em: <<http://joe.endocrinology-journals.org/cgi/reprint/187/1/1>> Acesso em: 15 fev. 2006.

BÖHM, W.; THOMA, S.; LEITHÄUSER, F.; MÖLLER, P.; SHIRMBECK, R.; REIMANN, J. T cell-mediated, IFN- γ -facilitated rejection of murine B16 melanomas. **The Journal of Immunology**, v. 161, p. 897-908, 1998.

BOULTON, D. W.; FAWCETT, J. P.; WOODS, D. J. Stability of an extemporaneously compounded levothyroxine sodium oral liquid. **American Journal of Health-system pharmacy**, v. 53, p. 1157-1161, 1996.

BRODEY, R. A clinical and pathologic study of 130 neoplasms of the mouth and pharynx in the dog. **American Journal of Veterinary Research**, v. 21, n. 84-85, p. 787-812, 1960.

*Conforme as diretrizes para apresentação de dissertações e teses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 4 ed. São Paulo: FMVZ_USP, 2003. 84p.

CALLERY, E.; ELINSON, R. P. Thyroid hormone-dependent metamorphosis in a direct developing frog. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of North America**, v. 97, n. 6, p. 2615-2620, 2000.

CAMARGO, V. P. de; DOMENE, P.; SILVA, V.; GRACITELLI, M. E. C.; SOARES, H. P.; DEL GILGIO, A. Prevalência de hipotireoidismo em pacientes com câncer de mama. **Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia**, v. 5, n. 17, 2002.

CAMERON, M. D.; SCHMIDT, E. E.; KERKVLIT, N.; NADKARNI, K. V.; MORRIS, V.; GROOM, A. C.; CHAMBERS, A. F.; MACDONALD, I. C. Temporal progression of metastasis in lung: Cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. **Cancer Research**, v. 60, p. 2541-2546, 2000.

CARSON, D. A.; RIBEIRO, J. M. Apoptosis and disease. **The Lancet**, v. 341, p. 1251-1254, 1993.

CHAPMAN, E. M. History of the discovery and early use of radioactive iodine. **Journal of the American Medical Association**, v. 250, n. 15, p. 2042-2044, 1983.

CHEN, T. L.; WANG, J. Y.; YANG, B. C. Granulocytes mediates the Fas-L-associated apoptosis during lung metastasis of melanoma that determinates metastatic behavior. **British Journal of Cancer**, v. 87, p. 359-365, 2002.

CHEVILLE, N. F. **Introdução à patologia veterinária**. São Paulo: Manole, 1994. 556p.

CLEZARDIN, P. Recent insights into role of integrins in cancer metastasis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 54, p. 541-548, 1998.

COOPER, D. S. Which anti-thyroid drug? **The American Journal of Medicine**, v. 80, p. 1165-1168, 1986.

COOPER, D. S.; KIEFFER, D.; HALPERN, R.; SAXE, V.; MOVER, H.; MALLOF, F.; RIDGWAY, E. C. Propylthiouracil (PTU) pharmacology in the rat. II. Effects of PTU on thyroid function. **Endocrinology**, v. 113, p. 921-928, 1983.

DAKINE, N.; OLIVER, C.; GRINO, M. Effects of experimental hypothyroidism on the development on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the rat. **Life Sciences**, v. 67, p. 2827-2844, 2000.

DAVIS, N. C. Melanoma: issues of importance to the clinician. **British Journal of Hospital Medicine**, v. 33, p. 166-170, 1985.

DICK, O. W.; SANTOS, M. L. R dos; SANTOS, F. A. R. dos; FRISCHENBRUDER, J. A. Epidemiologia do melanoma maligno: revisão de 163 casos. **Acta Ontológica Brasileira**, v. 8, n. 2, p. 83-86, 1988.

DOMINGUES, A. M.; GIL, J. N.; BRUSA, M. G. S. Melanoma de gengiva com invasão da mandíbula: relato de caso. **Acta Oncologica Brasileira**, v. 12, n. 2, p. 73-76, 1992.

DONG, Z.; KUMAR, R.; YANG, X.; FIDLER, I. Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. **Cell**, v. 88, p. 801-810, 1997.

DORVAL, T.; FRIDMAN, W. H.; MATHIOT, C.; SASTRE, X.; POUILLART, P. Traitement du mélanome malin métastatique par l'interleukine-2. **Bulletin du Cancer**, v. 79, p. 781-787, 1992.

DUBINIK, C. S.; MORRIS, H. P.; DALTON, A. J. Inhibition of mammary-gland development and mammary-tumor formation in female C3H mice following ingestion of Thiouracil. **Journal of National Cancer Institute**, v. 10, n. 4, p. 815-841, 1950.

DUFFIE, G. P.; YOUNG, M. R. Tumoricidal activity of alveolar and peritoneal macrophages of C57BL6 mice bearing metastatic or nonmetastatic variants of Lewis lung carcinoma. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 49, p. 8-14, 1991.

ELLERHORST, J. A.; COOKSLEY, C. D.; BROEMELING, L.; JOHNSON, M. M.; GRIMM, E. A. High prevalence of hypothyroidism among patients with cutaneous melanoma. **Oncology Reports**, v. 10, p. 1317-1320, 2003. Disponível em: <<http://147.52.72.117/OR/2003/volume10/number5/1317.pdf>> Acesso em 15 fev. 2006.

ELLERHORST, J. A.; COOKSLEY, C. D.; GRIMM, E. A. Autoimmunity and hypothyroidism in patients with uveal melanoma. **Melanoma Research - abstract**, v. 11, n. 6, p. 633-637, 2001.

ELLERHORST, J. A.; NADERI, A. A.; JOHNSON, M. K.; PELLETIER, P.; PRIETO, V. G.; DIWAN, A. H.; JOHNSON, M. M.; GUNN, D. C.; YEKELL, S.; GRIMM, E. A. Expression of thyrotropin-releasing hormone by human melanoma and nevi. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 5531-5536, 2004.

ENOMOTO, K.; FARBER, E. Kynects of phenotypic maturation of remodeling of hyperplastic nodules during liver carcinogenesis. **Cancer Research**, v. 42, p. 2330-2335, 1982.

ERDSTEIN, J.; GUYDA, H. J.; MISHKIN, S. Effects of hypophysectomy and hormone replacement on the local and metastatic growth of Morris hepatoma 44. **Cancer Research**, v. 44, p. 2936-2941, 1984.

FARWELL, A. P.; DUBORD-TOMASETTI, S. Thyroid hormone regulates the expression of laminin in the developing rat cerebellum. **Endocrinology**, v. 140, n. 9, p. 4221-4227, 1999.

FARWELL, A. P.; TRANTER, M. P.; LEONARD, J. L. Tyroxine-dependent regulation of integrin-laminin interactions in astrocytes. **Endocrinology**, v. 136, n. 9, p. 3909-3915, 1995.

FELDKAMP, J.; PASCHER, E.; SCHOTT, M.; GORETZKI, P.; SEISSLER, J.; SCHERBAUM, W. A. Soluble Fas is increased in hyperthyroidism independent of the underlying thyroid disease. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 9, p. 4250-4253, 2001.

FERNANDES, N. C.; CALMON, R.; MACEIRA, J. P.; CUZZI, T.; SILVA, C. S. C. Melanoma cutâneo: estudo prospectivo de 65 casos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 1, p. 25-34, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962005000100004&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0365-0596. Acesso em: 15 abr. 2006.

FIDLER, I. J. Therapy of cancer metastasis by systemic activation of macrophages. **Advances in Pharmacology**, v. 30, p. 271-326, 1994.

FIDLER, I. J. Recognition and destruction of target cells by tumoricidal macrophages. **Israel Journal of Medical Sciences**, v. 14, p. 177-191, 1978.

FIDLER, I. J. Selection of successive tumour lines for metastasis. **Nature New Biology**, v. 242, n. 4, p. 148-149, 1973.

FOLKMAN, J.; MERLER, E.; ABERNATHY, C.; GRETCHEN, W. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 133, n. 2, p. 275-288, 1971.

FRATZ-ZELMAN, N.; HÖRANDNER, H.; LUEGMAYR, E.; VARGA, F.; ELLINGER, A.; ERLEE, M. P. M.; KLAUSHOFER, K. Effects of triiodothyronine on the morphology of cells and matrix, localization of alkaline phosphatase, and the frequency of apoptosis in long-term cultures of MC3T3-E1 cells. **Bone**, v. 20, n. 3, p. 225-236, 1997.

FUKUI, D.; BANDO, G.; KOSUGE, M.; YAMAGUCHI, M.; SHIBAHARA, T.; KADOTA, K. Malignant melanoma of the eyelid in red squirrel (*Sciurus vulgaris orientis*). **Journal of Veterinary Medicine Sciences**, v. 64, n. 3, p. 261-264, 2002.

FURASTÉ, A. P. Normas técnicas para o trabalho científico – Explicitação das normas da ABNT. 13ª ed. Porto Alegre RS: editora, 2005. 185p,

GARCÍA-SILVA, S.; ARANDA, A. The thyroid hormone receptor is a suppressor of *ras*-mediated transcription, proliferation, and transformation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 17, p. 7514-7523, 2004.

GARCIA-SILVA, S; PEREZ-JUSTE, G.; ARANDA, A. Cell cycle control by thyroid hormone in neuroblastoma cells. **Toxicology**, v. 181/182, p. 179-182.

GEFFNER, D. L.; AZUKIZAWA, M.; HERSHMAN, J. M. Propylthiouracil blocks extrathyroidal conversion of thyroxine to triiodothyronine and augments thyrotropin secretion in man. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 55, p. 224-229, 1975.

GILCHREST, B. A.; ELLER, M. S.; GELLER, A. C.; YAAR, M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 17, p. 1341-1348, Abr., 1999.

GINSBERG, J. Diagnosis and management of Graves' disease. **Canadian Medical Journal Association**, v. 168, n. 5. p. 575-585.

GOLDMAN, M. B.; MONSON, R. R.; MALOOF, F. Cancer mortality in women with thyroid disease. **Cancer Research**, v. 50, p. 2283-289, 1990

GOLDRATH, N.; EISENSTEIN, Z.; BANK, H.; SHOHAM, J. Anti-thyroid drugs and lymphocyte function. I. The *in vitro* effect on blastogenesis and suppressor cell activity. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 50, p. 55-61, 1982.

GOODALL, C. M. Hepatic carcinogenesis in thyroidectomized rats: apparent blockade at the stage of initiation. **Cancer Research**, v. 26, p. 1880-1883, 1966. part. 1.

GREEN, A. Sun exposure and risk of melanoma. **Australian Journal of Dermatology**, v. 25, p. 99-102, 1984.

GUPTA, K. M.; CHIANG, T.; DEODHAR, S. Specific triiodothyronine binding by tumor cells and spleen cells in a thyroid hormone dependent mouse tumor system. **European Journal of Clinical Oncology**, v. 17, n. 7, p. 819-823, 1981.

HAMMOND, L. J.; LOWDELL, M. W.; CERRANO, P. G.; GOODE, A. W.; BOTTAZZO, G. F.; MIRIKIAN, R. Analysis of apoptosis in relation to tissue destruction associated with Hashimoto's autoimmune thyroiditis. **Journal of Pathology**, v. 182, p. 138-144, 1997.

HANNA, N.; BURTON, R. Definitive evidence that natural killer (NK) cells inhibit experimental tumor metastasis *in vivo*. **The Journal of Immunology**, v. 127, n. 5, p. 1754-1758, 1981.

HANNA, N.; FIDLER, I. J. Role of natural killer cells in the destruction of circulating tumor emboli. **Journal of the National Cancer Institute**, v 65, n. 4, 1980.

HEBERMAN, R. B.; ORTLADO, J. R. Natural killer cells: Their role in defenses against disease. **Science**, v. 241, p. 24-30, 1981.

HEINO, J. Biology of tumor cell invasion: Interplay of cell adhesion and matrix degradation. **International Journal of Cancer**, v. 65, p. 717-722, 1996.

HERBERMAN, R. B.; ORTALDO, J. Natural killer cells: their role in defenses against disease. **SCIENCE**, V. 214, P. 24-30, 1981.

HERCEBERGS, A.; LEITH, J. Spontaneous remission of metastatic lung cancer following myxedema coma – an apoptosis-related phenomenon? **Journal of the National Cancer Institute**, v. 85, n. 16, Aug., 1983.

HERCBERGS, A. A.; GOYAL, L. K.; SUH, J. H.; LEE, S.; REDY, C. A.; COHEN, B. C.; STEVENS, G. H.; REDDY, S. K.; PEEREBOOM, D. M.; ELSON, P. J.; GUPTA, M. K.; BARNETT, G. H. Propylthiouracil-induced chemical hypothyroidism with high-dose tamoxifen prolongs survival in recurrent high grade glioma: a phase I/II study. **Anticancer Research**, v. 23, p. 617-626, 2003.

HOFMANN, U. B.; WESTPHAL, J. R.; VAN MUIJEN, G. N. P.; RUITER, D. J. Matrix metalloproteinases in human melanoma. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 115, p. 337-344, 2000.

INCA. Câncer de pele: melanoma. **Instituto Nacional do Câncer**, 2006. Disponível em: < http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=335 > Acesso em: 18 fev. 2006.

JEMAL, A.; MURRAY, T.; SAMUELS, A.; GHAFOR, A.; WARD, E.; THUN, M. J. Cancer Statistics, 2003. **CA A cancer Journal for Clinicians**, v. 53, p. 5-26, 2003. Disponível em: <<http://caonline.amcancersoc.org/cgi/content/full/53/1/5>. Acesso em: 15 abr. 2006.

JEMAL, A.; MURRAY, T.; WARD, E.; SAMUELS, A.; TIWARI, R. C.; GHAFOR, A.; FEUER, E. J.; THUN, M. J. Cancer Statistics, 2005. **CA A cancer Journal for Clinicians**, v. 55, p. 10-30, 2005. Disponível em: <<http://caonline.amcancersoc.org/cgi/content/full/55/1/10>. Acesso em: 15 abr. 2006.

JOHNSON, L. A.; VAIDYA, S. V.; GOLDFARB, R. H.; MATHEW, P. A. 2B4 (CD244)-mediated activation of NK cells reduces metastases of B16F10 melanoma in mice. **Anticancer Research**, v. 23, p. 3651-3656, 2003.

JOHNSON, T. M.; HAMILTON, T. LOWE, L. Multiple primary melanomas. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 39, n. 3, p. 422-427, 1998.

JOHNSON, T. M.; YAMADA, A. M.; CHANG, A. E.; FADER, D. J.; SONDAK, V. K. Advances in melanoma therapy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 38, p. 731-741, 1998.

KATERINAKI, E.; EVANS, G. S.; LORIGAN, P. C.; MACNEIL, S. TNF- increases human melanoma cell invasion and migration *in vitro*: the role of proteolytic enzymes. **British Journal of Cancer**, v. 89, p. 1123-1129, 2003.

KESKI-OJA, J. Vitamin D3 derivatives (deltanoides) in the treatment of tumor cell invasion. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 133, p. 95-97, 1999.

KINOSHITA, S.; SONE, S.; YAMASHITA, T.; TSUBURA, E.; OGURA, T. Effects of experimental hyper- and hypothyroidism on natural defense activities against Lewis lung carcinoma and its spontaneous pulmonary metastases in C57BL6 mice. **Tokushima Journal of Experimental Medicine**, v. 38, p. 25-35, 1991.

KOOP, S.; MACDONALD, I. C.; LUZZI, K.; SCHMIDT, E. E.; MORRIS, V. L.; GRATTAN, M.; KHOKHA, R. Fate of melanoma cells entering the microcirculation: Over 80% survive and extravasate. **Cancer Research**, v. 55, p. 2520-2523, 1995.

KOOP, S.; SCHMIDT, E. E.; MACDONALD, I. C.; MORRIS, V. L.; KHOKHA, R.; GRATTAN, M.; LEONE, J.; CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C. Independence of metastatic ability and extravasation: metastatic *ras*-transformed and control fibroblasts extravasate equally well. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of North America**, v. 93, p. 11080-11084, 1996.

KREHBIEL, J. D.; LANGHAM, R. F. Eyelid neoplasm of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, p. 115-119, 1975.

KRUIT, W. H. J.; GOEY, S. H.; MONSON, J. R. T.; STAHEL, R. A.; CALABRESI, F.; MERTELSMANN, R.; HOLDNER, E. E.; EGGERMONT, A. M. M.; BOLHUIS, R. L. H.; MULDER, P. H. M.; STOTER, G. Clinical experience with combined use of recombinant interleukin-2 (IL2) and interferon alfa-2a (INF α) in metastatic melanoma. **British Journal of Haematology**, v. 79, p. 84-86, 1991. Supplement 1.

KUMAR, M. S.; CHIANG, T.; DEOHAR, S. D. Enhancing effect of thyroxine on tumor growth and metastases in syngeneic mouse tumor systems. **Cancer Research**, v. 39, p. 3515-3518, 1979.

LEDDA-COLUMBANO, G. M.; PERRA, A.; LOI, R.; SHINOZUKA, H.; COLUMBANO, A. Cell proliferation induced by triiodothyronine in rat liver is associated with nodule regression and reduction of hepatocellular carcinomas. **Cancer Research**, v. 60, p. 603-609, 2000.

LEHRER, S.; DIAMOND, E. J.; STONE, N. N. Serum triiodothyronine is increased in men with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. **The Journal of Urology**, v. 168, p. 2431-24

LINDE-SIPMAN, J. S.; WIT, M. L.; GARDEREN, E.; MOLENBEEK, R. F.; VELDE-ZIMMERMANN, D.; WEGER, R. A. Cutaneous malignant melanomas in 57 cats: identification of (amelanotic) signet-ring and balloon cell types and verification of their origin by immunohistochemistry, electron microscopy, and in situ hybridization. **Veterinary Pathology**, v. 34, p. 31-38, 1997.

LIPTON, A.; HARVEY, H. A.; LAWRENCE, B.; GOTTLIEB, R.; KUKRIKA, M.; DIXON, R.; GRAHAM, W.; MILLER, S.; HECKARD, R.; SCHELZEL, D.; WHITE, D. S. *Corynebacterium parvum* versus BCG adjuvant immunotherapy in human malignant melanoma. **Cancer**, v. 51, p. 57-60, 1983.

LIU, W. K.; NG, T. B. Effect of methimazole-induced hypothyroidism on alveolar macrophages. **Virchows Archiv B Cell Pathology Including Molecular Pathology**, v. 60, p. 21-25, 1991.

LIU, W. K.; TSUI, K. W.; WONG, C. C. Repressed activity of peritoneal macrophages in methimazole-induced hypothyroid mice. **Virchows Archiv B Cell Pathology Including Molecular Pathology**, v. 63, p. 131-136, 1993.

LUZZI, K. J.; MACDONALD, I. C.; SCHMIDT, E. E.; KERKVLIT, N.; MORRIS, V. L.; CHAMBERS, A. N.; GROOM, A. C. Multistep nature of metastatic inefficiency. **American Journal of Pathology**, v. 153, n. 3, p. 865-873, 1998.

LYONS, A. R.; EDELSTYN, G. A. Thyroid hormone as a prophylactic agent following radical treatment of breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 19, 116-121, 1965.

MACEWEN, E. G.; KURZMAN, I. D.; VAIL, D. M.; DUBIELZIG, R. R.; EVERLITH, K.; MADEWELL, B. R.; RODRIGUEZ JR., C. O.; PHILLIPS, B.; ZWAHLEN, C. H.; OBRADOVICH, J.; ROSENTHAL, R. C.; HENRY, C.; FIDEL, J. Adjuvant therapy for melanoma in dogs: Results of randomized clinical trials using surgery, liposome-encapsulated muramyl tripeptide, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. **Clinical Cancer Research**, v. 5, p. 4249-4258, 1999.

MACURA-BIEGUN, A.; RUGGIERO, I.; HAJTO, B.; ZEMBALA, M. Extracellular matrix proteins modulate cytokine production by monocytes during their interactions with cancer cells. **Anticancer Research**, v. 23, p. 4033-4038, 2003.

MANTOVANI, A.; BOTTAZZI, B.; COLOTTA, F.; SOZZANI, S.; RUCO, L. The origin and function of tumor-associated macrophages. **Immunology Today**, v. 13, n. 7, p. 265-270, 1992.

MARCHANT, B.; LEES, J. F. H.; ALEXANDER, W. D. Antithyroid drugs. **Pharmacology & Therapeutic. Part B**, v. 3, p. 305-348, 1978.

MARIANI, E.; RAVAGLIA, G.; FORTI, P.; MENEGHETTI, A.; TAROZZI, A.; AIOLI, F.; BOSCHI, F.; PRATELLI, L.; PIZZOFEERRATO, A.; PIRAS, F.; FACCHINI, A. Vitamin D, thyroid hormones and muscle mass influence natural killer (NK) innate immunity in health nonagenarians and centenarians. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 116, p. 19-27, 1999.

MARTINEZ, J. C.; OTLEY, C. C. The management of melanoma and nonmelanoma skin cancer: A review for the primary care physician. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 76, p. 1253-1265, 2001.

MARTINEZ, M. B.; RUAN, M.; FRITZPATRICK, L. A. Altered response to thyroid hormones breast and ovarian cancer cells. **Anticancer Research**, v.20, p. 4141-4146, 2000.

MARTINEZ, M. B.; RUAN, M.; FRITZPATRICK, L. A. Altered response to thyroid hormones by prostate and breast cancer cells. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v.45, p. 93-102, 2000.

MATSUZAKI, T.; YOKOMURA, T.; AZUMA, I. Antimetastatic effect of *Lactobacillus casei* YIT9018 (LC 9018) on a high metastatic variant of B16 melanoma in C57BL6J mice. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 24, p. 99-105, 1987.

MENDONÇA, G. A. S. Risco crescente de melanoma de pele no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 26, n. 4, p. 290-294, 1992. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89101992000400012&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0034-8910. Acesso em: 15 abr. 2006.

MIHARA, S. SUZUKI, N.; WAKISAKA, S.; SUZUKI, S.; SEKITA, N.; YAMAMOTO, S.; SAITO, N.; HOSHINO, T.; SAKANE, T. Effects of thyroid hormones on apoptotic cell death of human lymphocytes. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 84, n. 4, p. 1378-1378-1385, 1999.

MINI, S.; DORI, S.; HOROWITZ, Z.; BEDRIN, L.; PELEG, M.; WOLF, M.; SHOSHANI, Y.; TAICHER, S.; KRONENBERG, J.; TALMI, Y. P. Pretreatment prevalence of hypothyroidism in patients with head and neck carcinoma. **Cancer**, v.92, n. 6, p. 1512-1515, 2001.

MISHKIN, S.; MORRIS, H. P.; YALOVSKY, M. A. MURTHY, P. V. N. Increased survival of rats bearing Morris hepatoma 7800 after induction of Hypothyroidism. **Cancer Research**, v. 39, p. 2371-2375, 1979.

MISHKIN, S.; MORRIS, H. P.; YALOVSKY, M. A.; MURTHY, P. V. N. Inhibition of the growth of Morris Hepatoma #44 in rats after induction of hypothyroidism: evidence that Morris hepatomas are thyroid dependent. **Gastroenterology**, v. 77, n. 3, p. 547-555, 1979.

MISHKIN, S. Y.; POLLACK, R.; YALOVSKY, M. A., MORRIS, H. P.; MISHKIN, S. Inhibition of local and metastatic hepatoma growth and prolongation of survival after induction of hypothyroidism **Cancer Research**, v. 41, p. 3040-3045, Ago., 1981.

MODIANO, J. F.; RITT, M. G.; WOJCIESZYN, J. The molecular basis of canine melanoma: Pathogenesis and trends in diagnosis and therapy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, p. 163-174, 1999.

MONACO, F. Classification of thyroid diseases: Suggestions for a revision. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 4, p. 1428-1432, 2003.

MÖNIG, H.; HAUSCHILD, A.; LANGE, S.; FÖLSCH, U. R. Suppressed thyroid-stimulating hormone secretion in patients treated with interleukin-2 and interferon- γ for metastatic melanoma. **Clinical Investigator**, v. 72, p. 975-978, 1994.

MOTULSKY, H. J. Prism4 Statistics Guide – statistical analyses for laboratory and clinical research. **GraphPad Software, Inc.**, San Diego CA, 2003. 148p. Disponível em: < www.graphpad.com > Acesso em: 16 Ago. 2005.

NAHATA, M. C.; MOROSCO, R. S.; TROWBRIDGE, J. Stability of propylthiouracil in extemporaneously prepared oral suspensions at 4 and 25°C. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 57, p. 1141-1143, 2000.

NCI-SEER. Surveillance Epidemiology and End Results-SEER: Melanoma of the Skin. **National Institute of Cancer**, 2006. Disponível em: < http://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html?statfacts_page=melan.html&x=14&y=18 > Acesso em: 18 fev. 2006.

OAKES, M. G.; HEDLUND, C. S.; LEWIS, D. D.; HOSGOOD, G. Canine Oral Neoplasia. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Vet**, v. 15, n. 1, p.15-30, 1993.

O'BRYAN, R. M.; GORDAN, G. S.; KELLEY, R. M.; RAVIDIN, R. G.; SEGALOFF, A.; TAYLOR III, S. G. Does thyroid substance improve response of breast cancer to surgical castration. **Cancer**, v. 33, p. 1082-1085, 1974.

OLIVEIRA FILHO, R. S.; BEVILACQUA, R. G.; CHAMMAS, R. Hyperthermia increases the metastatic potential of murine melanoma. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 8, p. 941-945, 1997. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X1997000800005&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 18 fev. 2006.

O'RELLY, M. S.; HOLMGREN, L.; YUEN SHING; CHEN, C.; ROSENTHAL, R. A.; MOSES, M.; LANE, W. S.; YIHAI CAO; SAGE, E. H.; FOLKMAN, J. Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. **Cell**, v. 79, p. 315-328, 1994.

OREN, R.; DOTAN, I.; PAPA, M.; MARRAVI, Y.; AEED, H.; BARG, J.; ZEIDEL, L.; BRUCK, R.; HALPERN, Z. Inhibition of experimentally induced cirrhosis in rats by hypothyroidism. **Hepatology**, v. 24, n. 2, p. 419-423, 1996.

OST, D.; JOSEPH, C.; SOGOLOFF, H.; MENEZES, G. Primary pulmonary melanoma: case report and literature review. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 74, p. 62-66, Jan., 1999.

PAPIC, M.; STEIN-STREILEIN, J.; ZAKARIJA, M.; MACKENZIE, J. M.; GUFFEE, J.; FLETCHER, M. A. Suppression of peripheral blood natural killer cell activity by excess thyroid hormone. **Journal of Clinical Investigation**, v. 79, p. 404-408, 1978.

PARDEE, A. B. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of North America**, v. 71, n. 4, p. 1286-1290, 1974.

PARK, J. R.; ROBERTSON, K.; HICKSTEIN, D. D.; TSAI, S.; HOCKENBERY, D. M.; COLLINS, S. J. Dysregulated bcl-2 expression inhibits apoptosis but not differentiation of retinoic acid-induced HL-60 granulocytes. **Blood**, v. 84, n. 2, p. 440-445, 1994.

PEARSON, O. H.; RAY, B. S.; HARROLD, C. C.; WEST, C. D.; LI, C. M.; MACLEAN, J. P. Hypophysectomy in treatment of advanced cancer. **Journal of the American Medical Association**, v. 161, n. 1, 17-21, 1956.

PERLIS, C.; HERLYN, M. Recent advances in melanoma biology. **The Oncologist**, v. 9, p. 182-187, 2004. Disponível em: <http://theoncologist.alphamedpress.org/cgi/reprint/9/2/182?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=1&andorexacttitle=and&andorexacttitleabs=and&andorexactfulltext=and&searchid=1140359184378_375&FIRSTINDEX=0&sortspec=relevance&volume=9&firstpage=182&journalcode=theoncologist>. Acesso em: 18 fev. 2006

POSTE, G.; DOLL, J.; TZENG, J.; ZEIDMAN, I. Comparison of the metastatic properties of B16 melanoma clones isolated from cultured cell lines, subcutaneous tumors, and individual lung metastasis. **Cancer Research**, v. 42, p. 2770-2778, 1982.

POSTE, G.; FIDLER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis. **Nature**, v. 283, p. 139-146, 1980.

PROVINCIALI, M.; DI STEFANO, G.; FABRIS, N. Regulation of NK cell lymphokine responsible by pituitary-thyroid hormones during ontogeny in mice. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 741, p. 73-80, 1994.

RAMOS-VARA, J. A.; BEISSENHERZ, .E. MILLER, M. A.; JOHSON, G. C.; PACE, L. W.; FARD, A.; KOTTLER, S. J. Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 6, p. 597-608, 2000.

RAY, B. S. Hypophysectomy as palliative treatment. **Journal of the American Medical Association**, v. 200, n. 11, p. 974-978, 1967.

REDONDO, P.; IDOATE, M.; DE FELIPE, I. Nevi related to thyroid diseases. **Archives of Internal Medicine**, v. 158, p. 1577, 1998.

RODRIGUEZ-AYERBE, C.; SMITH-ZUBIAGA, I. Effect of serum withdrawal on the proliferation of B16F10 melanoma cells. **Cell Biology International**, v. 24, n. 5, p. 279-283, 2000.

ROJANO, J.; SASIÁN, S.; GAVILÁN, I.; ESCOBAR, L.; GIRÓN, J. A. Serial analyses of the effects of methimazole or radical therapy on circulating cd16/56 subpopulations in Graves' disease. **European Journal of Endocrinology**, v. 139, p. 314-316, 1998.

ROSE, S. R.; LUSTIG, R. H.; PITUKCHEEWANONT, P.; BROOME, D. C.; BURGHEN, G. A.; LI, H.; HUDSON, M.; KUN, L. E.; HEIDEMAN, R. L. Diagnosis of hidden central hypothyroidism in survivors of childhood cancer. **The Journal of Endocrinology & Metabolism**, v. 84, n. 12, p. 4472-4479, 1999.

SAIDA, T. recent advances in melanoma research. **Journal of Dermatological Science**, v. 26, p. 1-13, 2001.

SAKAI, H.; YANAI, T.; KAWAKAMI, S.; MASEGI, T. Malignant melanoma of the palpebral conjunctiva in a captive fallow deer. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 37, n. 4, p. 816-819, 2001. Disponível em: < <http://www.jwildlifedis.org/cqi/reprint/37/4/816>> Acesso em: 18 fev. 2006.

SANDERS, J. P.; VAN DER GEYTEN, S.; KAPTEIN, E.; DARRAS, V. M.; KÜHN, E. R.; LEONARD, J. L.; VISSER, T. J. Characterization of a propylthiouracil-insensitive type I iodothyronine deiodinase. **Endocrinology**, v. 138, n. 12, p. 5153-5160, 1997.

SCALZO, S.; GENGARO, A.; BOCCOLI, G.; MASCIULLI, R.; GIANELLA, G.; SALVO, G.; MAROLLA, P.; CARLINI, P.; MASSIMINI, G.; HOLDENER, E. E.; TESTA, U.; CALABRESI, F.; PESCHLE, C. Primary hypothyroidism associated with Interleukin-2 and Interferon Alpha-2 therapy of melanoma and renal carcinoma. **European Journal of Cancer**, v. 26, n 11/12, p. 1152-1156, 1990.

SCHMITMEIER, S.; MARKLAND, F. S.; CHEN, T. Anti-invasive effect of contortrostatin, a snake venom disintegrin, and TNF- on malignant glioma cell. **Anticancer Research**, v. 20, p. 4227-4234, 2000.

SCHWARTZ, H.; OPPENHEIMER, J. H. Physiologic and biochemical actions of thyroid hormone. **Pharmacology & Therapeutics. Part B**, v. 3, p. 349-376, 1978.

SHARMA, S. D.; TSAI, V.; PROFFITT, M. Enhancement of mouse natural killer cell activity by thyroxine. **Cellular Immunology**, v. 73, p. 83-97, 1982.

SHIMKIN, M. B.; BOLDREY, E.; KELLY, K. H.; BIERMAN, H. R.; ORTEGA, P.; NAFFZINGER, H. C.; Effects of surgical hypophysectomy in a man with malignant melanoma. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 12, p. 439-453, 1952.

SHOEMAKER, J. P.; BRADLEY, R. L.; HOFFMAN JR., R. V. Increased Survival and inhibition of mammary tumors in hypothyroid mice. **Journal of surgical Research**, v. 21, n. 3, 1976.

SHOEMAKER, J. P.; DAGHER, R. Remissions of mammary adenocarcinoma in hypothyroid mice given 5-fluorouracil and chloroquine phosphate. **Journal of National Cancer Institute**, v. 62, n. 6, p. 1575-1577, 1979.

SILVA, A. E.; SERAKIDES, R.; FERREIRA, E.; CAPPI, MORAES, J. R. C.; OCARINO, N. M.; CASSALI, G. D. Efeito do hipotireoidismo no tumor de Ehrlich sólido em camundongos fêmeas castradas e não castradas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, n. 6, p. 867-874, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302004000600014&lng=en&nrm=iso>

SMITH, S. H.; GOLDSCHMIDT, M. H.; MACMANUS, P. M. A comparative review of melanocytic neoplasm. **Veterinary Pathology**, v. 39, p. 651-678, 2002.

SMYTH, P. P. A. The thyroid and breast cancer: a significant association? **Annals of Medicine**, v. 29, p.189-191, 1997.

SMYTH, P. P. A. Thyroid disease and breast cancer. **Journal of Endocrinology Investigation**, v. 16, p.396-401, 1993.

SMYTH, P. P. A. The thyroid, iodine and breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. p. 235-238, 2003. Disponível em: <http://breast-cancer-research.com:content/5/5/235> Acesso em: 18 fev. 2006.

SOUZA, G. B. **Manipulação Farmacêutica**. Rio de Janeiro: JME & Filhos Rio Gráfica Editora, 2000. 216p.

SPENCER, J. G. C. The influence of thyroid in malignant disease. **British Journal of Cancer**, v. VIII, n. 3, p. 393-411, 1954.

STAQUICINI, F. I.; MOREIRA, C. R.; NASCIMENTO, F. D.; TERSARIOL, I. L. S.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P.; LOPES, J. D. Enzyme and integrin expression by high and low metastatic melanoma cell lines. **Melanoma Research**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2003.

STARLING, J. R.; WEESE, J. L. Lysosomal enzyme activity in pulmonary alveolar macrophages, peritoneal macrophages, and blood mononuclear leukocytes in the hypothyroid rat. **Journal of Surgical Research**, v. 39, p. 413-419, 1985.

STEIN-STREILEIN, J.; ZAKARIJA, M.; PAPIC, M.; MCKENZIE, J. M. Hyperthyroxinemic mice have reduced natural killer cell activity. **The Journal of Immunology**, v. 139, n. 7, p. 2502-2507, 1987.

SU, W. P. Malignant melanoma: Basic approach to clinicopathologic correlation. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 72, p. 267-272, 1997.

SUBRAMANYAM, S.; MURTHY, D. K.; REDDI. Cytological investigations of the effects of I^{131} in male mice. **Indian Journal of Medical Research**, v. 63, n. 12, p. 1680-1687, 1975.

SUGAWARA, M.; SUGAWARA, Y.; WEN, K. Methimazole and propylthiouracil increase cellular thyroid peroxidase activity and thyroid peroxidase mRNA in cultured porcine thyroid follicles. **Thyroid**, v. 9, n. 5, p. 513-518, 1999.

TAUROG, A. The mechanism of action of the thioureyline antithyroid drugs. **Endocrinology**, v. 98, p. 1031-1046, 1976.

TEIGER, E.; DAM, T. V.; RICHARD, L.; WISNEWSKY, C.; BUN-SENG TEA; GABOURY, L.; TREMBLAY, J.; SCHAWARTZ, K.; HAMET, P. Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. **Journal of Clinical Investigation**, v. 97, n. 12, p. 2891-2897, 1996.

THEODOSSIOU, C.; SCHWARZENBERGER, P. Propylthiouracil reduces xenograft tumor growth in an athymic nude mouse prostate cancer model. **American Journal of Medical Sciences**, v. 319, n. 2, p. 96-99, 2000.

THEODOSSIOU, C.; SKREPNIK, N.; ROBERT, E. G.; PRASAD, C.; AXELRAD, T. W.; CHAPIRA, D. V.; HUNT, J. D. Propylthiouracil-induced hypothyroidism reduces xenograft tumor growth in athymic nude mice. **Cancer**, v. 86, n. 8, p. 1596-1601, 1999.

THOMASSEN, M. J.; BARNA, P. B.; WIEDEMANN, H. P.; BUKOWSKI, R. M.; FARMER, M.; AHMAD, M. Immunologic studies of alveolar macrophages from patients with metastatic renal cell carcinoma. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 141, p. 1256-1258, 1990.

THOMPSON, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science**, v. 267, p.1456-1462, 1995.

TOHEI, A.; IMAI, A.; WATANABE, G.; TAYA, K. Influence of thyouracil-induced hypothyroidism on adrenal and gonadal functions in adult female rats. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 60, n. 4, p. 439-446, 1998.

ULISSE, S.; RUCCI, N.; PIERSANTI, D.; CAROSA, E.; GRAZIANO, F. M.; PAVAN, A.; CEDDIA, P.; ARIZZI, M.; MUZI, P.; CIRONI, L.; GNESSI, L.; D'ARMIENTO, M.; JANNINI, E. A. Regulation by thyroid hormone of the expression of basement membrane components in rat prepubertal Sertoli Cells. **Endocrinology**, v. 139, p. 741-747, 1998.

UMESONO, K.; MURAKAMI, K. K.; THOMPSON, C. C.; EVANS, R. M. Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D₃ receptors. **Cell**, v. 65, p.1255-1266, 1991.

VAZIRI, M.; BUFFAM, F. V.; MARTINKA, M.; ORYSCHAK, A.; HALIWAL, H.; WHITE, V. A. Clinicopathologic features and behavior of cutaneous eyelid melanoma. **Ophthalmology**, v. 109, n. 5, p. 901-908, May, 2002.

VERONESI, U.; ADAMUS, J.; AUBERT, C.; BAJETTA, E.; BERETTA, G.; BONADONNA, G.; BUFALINO, R.; CASCINELLI, N.; COCCONI, G.; DURAND, J.; MARSILLAC, J.; IKONOPISOV, R. L.; KISS, B.; LEJEUNE, F.; MACKIE, R.; MADEJ, G.; MULDER, H.; MECHL, Z.; MILTON, G. W.; MORABITO, A. ; PETER, H.; PRIARIO, J.; PAUL, E. ; RUMKE, P.; SERTOLI, R.; TOMIN, R. A randomized trial of adjuvant chemotherapy and immunotherapy in cutaneous melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 307, p. 913-916, 1982.

VONDERHAAR, B. K.; GRECO, A. E. Effect of thyroid status on development of spontaneous mammary tumors in primiparous C3H mice. **Cancer Research**, v. 42, 4553-4561, 1982.

WAGNER, R. L.; APRILETTI, J. W.; MCGRATH, M. E.; WEST, B. L.; BAXTER, J. D.; FLETTERICK, R. J. A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. **Nature**, v. 378, p. 690-697, 1995.

WANEBO, H. J.; BENUA, R. S.; RAWSON, R. W. Neoplastic disease and thyrotoxicosis. **Cancer**, v. 19, n. 11, p. 1523-1526, 1966.

WANG, H.; FU, W.; IM, J. H.; ZHOU, Z.; SANTORO, S. A.; IYER, V.; DIPERSIO, C. M.; YU, Q. C.; QUARANTA, V.; AL-MEHD, A.; MUSCHEL, R. J. Tumor cell $\alpha_3\beta_1$ integrin and vascular laminin-5 mediate pulmonary arrest and metastasis. **The Journal of Cell Biology**, v. 164, p. 935-941, 2004. Disponível em: < <http://www.jcb.org/cgi/content/full/164/6/935>> Acesso em: 18 fev. 2006.

WANG, P. W.; LUO, S. F.; HUANG, B. Y.; LIN, J. D.; HUANG, M. J. Depressed natural killer activity in Graves' disease and during antithyroid medication. **Clinical Endocrinology**, p. 205-214, 1988.

WEIDNER, N.; SEMPLE, J. P.; WELCH, W. R.; FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis and metastasis - correlation in invasive breast carcinoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 324, n. 1, p. 1-8, 1991.

WEINSTAT-SASLOW, D.; STEEG, P. S. Angiogenesis and colonization in the tumor metastatic process: basic and applied advances. **FASEB Journal**, v. 8, p. 401-407, 1994.

WEISS, L. Metastatic Inefficiency. **Advances in Cancer Research**, v. 54, p. 159-211, 1990.

WERNER, S. C. Classification of thyroid disease. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 29, p. 860-862, 1969.

WEYANDT, G. H.; EGGERT, A. O.; HOUF, M.; BRÖCKER, E. B.; BECKER, J. C. Anorectal melanoma: surgical management guidelines according to tumour thickness. **British Journal of Cancer**, v. 89, p. 2019-2022, 2003.

WOLLMAN, S. H.; SCOW, R. O. Effect of hypophysectomy on I131 metabolism in normal and thiouracil treated C3H mice. **Endocrinology**, v. 52, n. 3, p. 338-345, 1953.

ZANI, R. M. F.; PESTANA, M. C. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 4. ed. rev. atual. ampl. São Paulo: SBD, 2003. Disponível em: <www.fmvz.usp.br> Acesso em: 20 fev. 2006.

ZATTERSTROM, U. K.; FELBOR, U.; FUKAI, N.; OLSEN, B. R. Collagen XVIII/endostatin structure and functional role in angiogenesis. **Cell Structure and Function**, v. 25, p. 97-101, 2000. Disponível em: <http://www.jstage.jst.go.jp/article/csf/25/2/97/_pdf> Acesso em: 18 fev. 2006.

ZIMEL, H.; ZIMEL, A.; PETRESCU, R.; GHINEA, E.; TASCA, A. Influence of stress and endocrine imbalance on the experimental metastasis. **Neoplasma**, v. 24, n. 2, p. 151-159, 1977.

ZUBER, P.; ACCOLLA, R. S.; CARREL, S.; DISERENS, A.C.; TRIBOLET, N. Effects of recombinant human tumor necrosis factor- on the surface phenotype and the growth of human malignant glioma cell lines. **International Journal of Cancer**, v. 42, p. 780-786, 1988.

APÊNDICE A

Siglas dos grupos do experimento e respectiva descrição

GRUPO	DESCRIÇÃO
CTRL_L	Grupo controle do experimento de avaliação de crescimento tumoral local. Recebeu água.
PTU_L	Grupo tratado do experimento de avaliação de crescimento tumoral local. Recebeu água com propiltiouracil.
CTRL_M	Grupo controle do experimento de avaliação do potencial metastático. Recebeu água.
PTU_M	Grupo tratado do experimento de avaliação do potencial metastático. Recebeu água com propiltiouracil.
T4_M	Grupo tratado do experimento de avaliação do potencial metastático. Recebeu água com levotiroxina sódica.
I131_M	Grupo tratado do experimento de avaliação do potencial metastático. Recebeu inoculação de iodo radioativo isótopo 131 por via intraperitoneal.