

GABRIELA ULIANA AVANZO

Padronização de modelo de carcinogênese  
mamária induzido quimicamente por DMBA  
em camundongos

São Paulo

2008

GABRIELA ULIANA AVANZO

Padronização de modelo de carcinogênese mamária  
induzido quimicamente por DMBA em camundongos

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. Idécio Luiz Sinhorini

São Paulo

2008

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

#### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2076  
FMVZ

Avanzo, Gabriela Uliana  
Padronização de modelo de carcinogênese mamária induzido quimicamente por DMBA em camundongos / Gabriela Uliana Avanzo. – São Paulo : G. U. Avanzo, 2008.  
62 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2008.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Idércio Luiz Sinhorini.

1. Carcinogênese mamária. 2. DMBA. 3. Camundongos. I. Título.

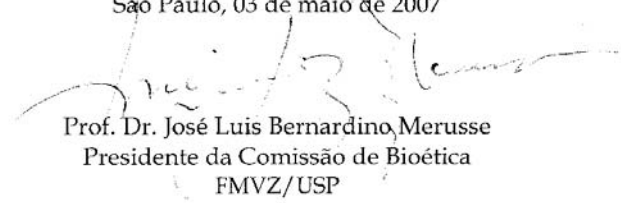


## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da expressão das conexinas 26,32 e 43 na carcinogênese mamária induzida pelo DMBA em camundongos BALB/c", protocolado sob o nº1099/2007, utilizando 100 (cem) camundongos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Idércio Luiz Sinhorini, 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 "ad referendum".

(We certify that the Research "Connexin 26,32 and 43 during mammary tumors induced by DMBA in BALB/c female mice", protocol number 1099/2007, utilizing 100 (one hundred) mice, under the responsibility Prof. Dr. Idércio Luiz Sinhorini, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 03 de maio de 2007

  
Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse  
Presidente da Comissão de Bioética  
FMVZ/USP

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: AVANZO, Gabriela Uliana

Título: Padronização de modelo de carcinogênese mamária induzido quimicamente por DMBA em camundongos

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 \_\_\_\_\_

*A Deus por sempre estar ao meu lado e ouvir minhas preces.*

*Aos meus pais, Julce e Moacir, por serem os meus primeiros e maiores mestres. E também pelo amor, carinho, compreensão e apoio incondicional.*

*Ao meu grande amor, José Luis, pela paciência, pelos conselhos, pelo auxílio e principalmente por me fazer tão feliz.*

*Aos meus irmãos, Ilara e Marcos Eduardo, e meus cunhados, Silvana e Nilson, pelo apoio em todas as fases da minha vida.*

*Aos meus pequenos, Júlia e Eduardo, por serem alegria constante na vida da tia Bibi.*

*Amo vocês....*

## **Agradecimentos**

*Ao professor Idécio Luiz Sinhorini por ter aceitado prontamente meu pedido para orientação neste estudo. E também por todo auxílio e apoio durante este trabalho e principalmente por sempre ter me estimulado.*

*A professora Maria Lúcia Zaidan Dagli (Malu) pelo auxílio e por ter aberto as portas de seu laboratório para o presente estudo.*

*Ao meu padrinho e amigo, Heidge, por todo auxílio e paciência que teve comigo durante este período.*

*A minha amiga e madrinha, Andréia, pelo apoio e pela amizade.*

*Ao Prof. Rao pelo auxílio na montagem do delineamento experimental com o DMBA.*

*Ao Prof. Paulo Brandão (VPS), sua esposa Laura e ao meu amigo Alexandre (fininho) pelo grande apoio durante a iniciação científica.*

*Ao Prof. Antônio Piantino por ter aberto as portas para minha iniciação científica e a todos da Ornitopatologia, em especial à Carininha.*

*Aos funcionários do Laboratório de Histologia: Cláudio e Luciano pela confecção das lâminas estudadas.*

*A todos os funcionários do VPT pela ajuda e carinho, em especial à Marguite, Rosires e Idalina.*

*E a todos colegas do VPT, em especial, ao Daniel, pelo auxílio na classificação das lâminas, e à Tereza, Mirela, Márcia, Heloísa e Lucas pela amizade.*

## RESUMO

AVANZO, G.U. **Padronização de modelo de carcinogênese mamária induzido quimicamente por DMBA em camundongos.** [Standardization of a mammary carcinogenesis chemically model induced by DMBA in mice]. 2009. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

O câncer de mama permanece como o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e o primeiro entre as mulheres (INCA, 2007). Porém, os mecanismos envolvidos no processo de gênese dos tumores mamários mesmo sendo intensamente estudados nos últimos 30 anos, ainda não são bem definidos. Vários estudos apontam que a susceptibilidade em função da genética é uma causa relevante ao surgimento do tumor, porém não a principal. Outros fatores tais quais o ambiente e dieta tendem a ser mais significantes nesse processo. Para a indução dos tumores em animais, a maioria dos modelos utiliza carcinógenos pertencentes à família dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, dentre eles o DMBA (7,12-dimetil bezantraceno). O DMBA foi utilizado neste estudo com o objetivo de induzir tumor mamário, estabelecendo-se assim um modelo para estudos futuros, quantificando e classificando as lesões nas diferentes concentrações do carcinógeno, avaliando também a proliferação celular através do método de imunohistoquímica PCNA nos diferentes tumores encontrados. Neste estudo, em todos os grupos houve o desenvolvimento de tumores mamários, sendo estes mais freqüentes nos grupos de 3, 6 e 9 mg. O tipo de tumor mais freqüente foi o Adenocarcinoma A, seguido de Adenoacantoma e Adenocarcinoma Misto em menor freqüência. Sendo assim, concluiu-se através deste trabalho que o DMBA produz um modelo de carcinogênese mamária em camundongos.

Palavras-chave: Carcinogênese mamária. DMBA. Camundongo.



## ABSTRACT

AVANZO, G.U. **Standardization of a mammary carcinogenesis chemically model induced by DMBA in mice.** [Padronização de modelo de carcinogênese mamária induzido quimicamente por DMBA em camundongos]. 2009. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

The breast cancer remains the second most common cancer type in the world and first among women (INCA, 2008). However, the mechanisms involved in the origin even being intensively studied in the past 30 years, are still not well defined. Several studies suggest that genetic susceptibility is a relevant issue to the tumor development, however others factors can favor tumor growing. Among such factors the environment and diet are considered more significant. For mice tumor induction, most significant carcinogens used belonging to the polycyclic aromatic hydrocarbons family, where DMBA (7,12-dimethyl bezantraceno) take place. The DMBA was used in this study in order to induce mammary tumors, establishing the real conditions for future studies in our mice colony, classifying and quantifying the lesions. Cell proliferation was also evaluated through the immunohistochemistry against PCNA in different tumors classified. In this study, all concentration resulted in breast tumor development, which was more frequently observed in groups of 3, 6 and 9 mg. The most common type tumor regarded was Adenocarcinoma A, followed by Adenoacantoma and Mixed A/B in lower frequency. In conclusion, DMBA was able to produces a model of mammary carcinogenesis in mice.

Key words: Mammary Carcinogenesis. DMBA. Mice.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AhR	Aryl hydrocarbon receptor/transcription factor
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DMBA	7, 12- dimetilbezantraceno
2-AAF	2-acetilaminofluoreno
12-HMBA	12-hidroximetil-7-metilbezantraceno
MCA	3-metilcolantreno
MNU	metilnitrosurea
PAS	Per-ARNT-Sim
PCNA	Antígeno Nuclear de Células em Proliferação
Rb	Retinoblastoma
7-HMBA	7-hidroximetil-12-metilbezantraceno

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1 Neoplasia.....	15
2.2 Neoplasia mamária.....	17
2.3 DMBA.....	22
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	26
3.1 Objetivo geral.....	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
4.1 Animais.....	29
4.2 Carcinógeno.....	29
4.3 Delineamento Experimental.....	30
<b>4.3.1 Experimento</b> .....	30
4.4 Eutanásia dos animais, contagem das lesões macroscópicas e coleta de material.....	31
4.5 Classificação histológica e quantificação microscópica das lesões.....	31
4.6 Imunohistoquímica.....	31
4.7 Avaliação estatística.....	32
<b>5 RESULTADOS</b> .....	33
5.1 Variação de peso.....	34
5.2 Sobrevida.....	35
5.3 Análise macroscópica.....	37
5.4 Análise microscópica.....	42
<b>5.4.1 Incidência e classificação histológica</b> .....	42
<b>5.4.2 Imunohistoquímica para citoqueratina e vimentina</b> .....	45
5.5 Resultados de imunohistoquímica para PCNA.....	48
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	51
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	55
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	57

# INTRODUÇÃO

---

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, muitos estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de se descobrir possíveis formas de cura e prevenção do câncer (FUKUMASU et al., 2006). Dentre esses são destacados os estudos envolvendo câncer de mama, devido à importância e alta incidência desta doença entre as mulheres (INCA, 2007).

A utilização de animais como modelo de estudo, principalmente murinos, tem grande importância na pesquisa do câncer de mama. Atualmente, os carcinógenos mais utilizados são o DMBA que necessita de biotransformação e o MNU (metilnitrosurea) que não necessita de biotransformação (MEDINA, 2004).

O DMBA é um hidrocarboneto policíclico aromático que após administrado é biotransformado em fígado e tecido mamário e rapidamente absorvido no trato intestinal, acumulando no tecido adiposo (TAMULSKI, 1973; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1981). Considerando que a glândula mamária tem por característica acumular tecido adiposo, torna-se um local de tropismo para o DMBA (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1981).

Baseado em estudos prévios (MEDINA, 1974; LANE et al., 1985), este experimento teve como objetivo estabelecer o modelo de carcinogênese mamária induzida experimentalmente pelo DMBA, para ser utilizado em estudos futuros destinados ao entendimento e a prevenção do câncer de mama.

## **REVISÃO DE LITERATURA**

---

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Neoplasia

Neoplasia significa literalmente o processo de um “crescimento novo” e um novo crescimento é chamado de neoplasma. O termo tumor foi originalmente aplicado ao edema causado por uma inflamação. Os neoplasmas também causam edemas, mas já há muito tempo o emprego não-neoplásico de tumor saiu de uso, portanto, atualmente o termo equivale a neoplasma (ROBINS; COTRAN, 2005). O principal ponto de diferença entre neoplasia, células em crescimento normal e hiperplasia recai sobre o fato de que diferentemente das demais o crescimento da neoplasia nunca atinge um equilíbrio. Independentemente do fato de seu crescimento ser rápido ou lento, uma característica inerente à neoplasia é de seu crescimento ser progressivo (BEREMBLUM et al., 1970).

Muitos oncologistas objetivaram conceituar o termo neoplasia. Na década de 50, o oncologista britânico Willis foi quem mais se aproximou: “Um neoplasma é uma massa anormal de tecido, cujo crescimento ultrapassa e não é coordenado com os tecidos normais e persiste de maneira excessiva depois da interrupção dos estímulos que deram origem à mudança” (WILLIS, 1952). Esta definição foi incrementada mais tarde por Beremblum através da seguinte definição: “Tumor é um tecido em crescimento ativo, composto por células derivadas de uma que tenha sofrido um tipo anormal de diferenciação; este crescimento é progressivo em função do atraso na maturação das células estaminais” (BEREMBLUM et al., 1970). Dentre as considerações feitas ao fenômeno, a elaborada por Evans surgiu como um divisor, entre o conhecimento adquirido até o momento e os que surgiram com os avanços da biologia molecular e genética. O conceito elaborado por Evans (EVANS et al., 1993) refletiu a compreensão gerada com o advento da biologia molecular e genética, em que “os cânceres são conseqüências de alterações genéticas e epigenéticas, envolvendo uma variedade de genes que são fundamentais para os processos de crescimento, diferenciação celular e remoção celular programada”.

Existem algumas características que diferem tumores malignos e benignos.

Ressaltam-se para os tumores malignos características funcionais como a capacidade de invasão (habilidade de infiltrar e destruir tecidos vizinhos) e formação de metástases (desenvolvimento de centros secundários de crescimento do tumor distantes do foco primário), além da característica morfológica de anaplasia (falta de diferenciação) (BEREMBLUM et al., 1970).

Câncer (tumor maligno) tem sido caracterizado por um acúmulo de alterações genéticas que conferem à célula a propriedade de evasão dos mecanismos de controle homeostático, garantindo a sua própria sobrevivência e proliferação (HANAHAAN; WEINBERG, 2000; LEROI; KOUFOPANOU; BURT, 2003). Hanahan e Weinberg sugerem que o genótipo de células cancerosas resulta da manifestação de seis alterações essenciais na fisiologia da célula que ditam o crescimento maligno: auto-suficiência em sinais de crescimento; insensibilidade aos sinais de inibição do crescimento; evasão da morte celular programada (apoptose); potencial de replicação ilimitado; invasão de tecidos propiciada pela angiogênese mantida e metástases (HANAHAAN; WEINBERG, 2000).

Para o surgimento do câncer, com exceção dos tumores transplantáveis (MAEDA et al., 2008), é necessário que ocorra um processo, envolvendo múltiplas etapas, denominado carcinogênese. Carcinogênese pode ser induzida experimentalmente através da exposição a agentes exógenos, tais quais: agentes químicos, físicos, microbiológicos ou genéticos.

A conceituação da carcinogênese como um processo de múltiplas etapas que antecede o aparecimento de neoplasias gerou o conceito de pré-neoplasia, que seria caracterizada por estágios anteriores às neoplasias benignas e malignas (BANNASCH, 1986). Vários fatores podem influenciar na pré-neoplasia tais quais: predisposição genética, idade e fatores ambientais (ROBINS; COTRAN, 2005). O processo de carcinogênese pode ser dividido em 3 fases: iniciação, promoção e progressão (FABER, 1984).

A fase de iniciação caracteriza-se por um dano no DNA que pode ser provocado por agentes químicos, físicos (radiação ultravioleta e ionizante), biológicos (vírus) ou genéticos (hereditariedade) (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1989). Os danos ao DNA supracitados, que ocorrem nesta fase, são permanentes e irreversíveis (PITOT; DRAGAN, 1991).

Na fase de promoção observa-se a expansão pelo crescimento das células fenotipicamente alteradas (FABER; SARMA, 1987) por um estímulo à proliferação



celular que pode ser decorrente da liberação de um fator de crescimento ou de determinado xenobiótico.

A fase de progressão caracteriza-se pela irreversibilidade que as alterações genéticas conferem às células: alto potencial proliferativo, capacidade invasiva, metastática e alterações bioquímicas sendo que esta última característica já se apresenta nas fases anteriores (PITOT; DRAGAN, 1991).

A homeostase é um dos fatores mais importantes na manutenção das funções dos tecidos e possíveis alterações nesta homeostase resultam em disfunções que podem gerar o câncer (MESNIL; YAMASAKI, 1993). A inibição dos genes supressores do tumor que mantêm a homeostase celular em um estágio adiantado da carcinogênese pode conduzir diretamente ao desenvolvimento do câncer. Os genes modificados freqüentemente encontrados nos diferentes cânceres humanos estão em geral implicados no controle da proliferação celular, por exemplo, o p53, Rb (Retinoblastoma) e o *ras*. Estudos comprovam que em câncer de mama em humanos ocorre inativação da função de p53 em aproximadamente 40% dos tumores, assim também têm sido relatadas alterações em Rb e proteínas relacionadas (SHI et al., 2003).

## 2.2 Neoplasia mamária

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2007), as neoplasias mamárias são classificadas como o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo, sendo o primeiro o câncer de pele, e o primeiro entre as mulheres. A cada ano, cerca de 22% dos novos casos de câncer em mulheres são de mama. Segundo a mesma fonte, estima-se que para o ano de 2008, no Brasil, sejam registrados 49.400 novos casos com um risco de 51 casos a cada 100 mil mulheres (Figura 1).

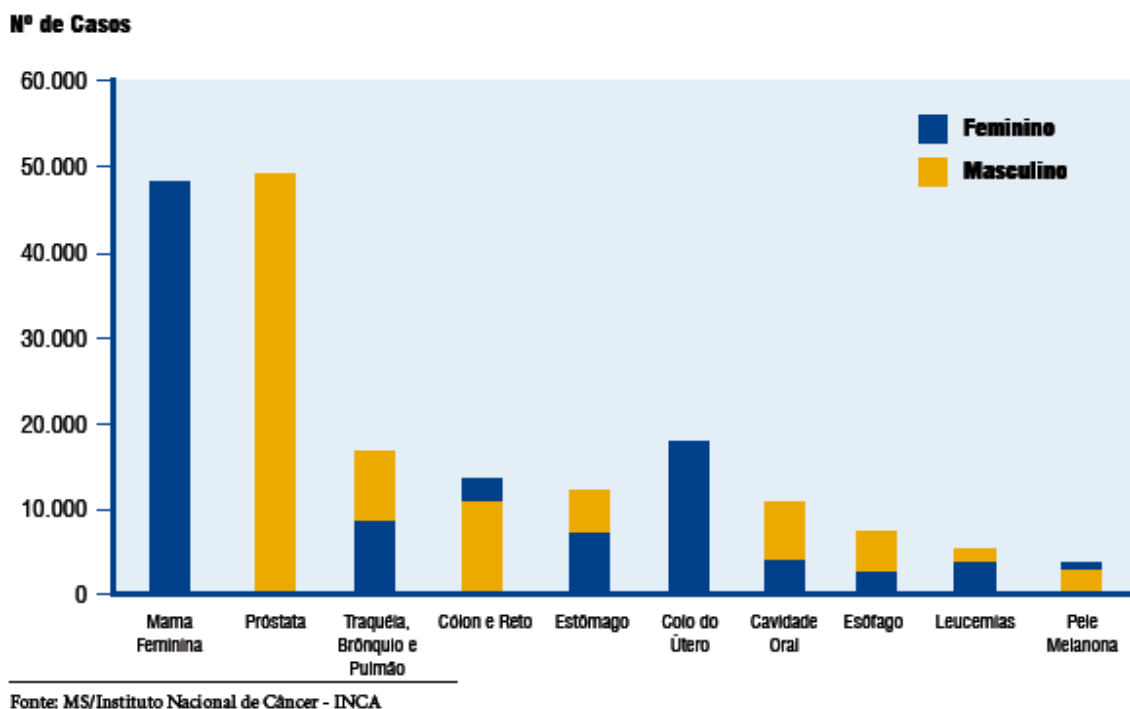


Figura 1 - Incidência de tipos de câncer estimados para o ano de 2008, não sendo incluídos câncer de pele não melanoma

Os tumores mamários também são de grande importância na área veterinária. Em fêmeas caninas, por exemplo, é considerado o tipo de tumor mais comumente diagnosticado (DE NARDI, 2002). Estudo relata que nos Estados Unidos, a incidência deste tipo de tumor corresponde a 52% das neoplasias de cadelas no referido país (RUTTEMAN et al., 2001).

Quando se reporta aos seres humanos, a alta incidência do câncer de mama é influenciada pela idade, genética, radiação, status socioeconômico, dieta, etnia e história reprodutiva (MEDINA, 2004). Os fatores de risco relacionados à vida reprodutiva da mulher (menarca precoce, nuliparidade, idade da primeira gestação a termo acima dos 30 anos, anticoncepcionais orais, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal) estão bem estabelecidos em relação ao desenvolvimento do câncer de mama (RUSSO; RUSSO, 1998). Além desses, a idade continua sendo um dos mais importantes fatores de risco. As taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos, e posteriormente o mesmo se dá de forma mais lenta (INCA, 2007).

Sabe-se também que alguns fatores podem contribuir na promoção do câncer de mama, tais quais dieta rica em gordura e estímulo hormonal (MEDINA et al., 1985; HAKKAK et al., 2005). Investigações epidemiológicas e experimentais têm

identificado que aspectos relacionados à dieta podem influenciar nas fases de iniciação e promoção do câncer. Em contrapartida, provou-se que alguns alimentos e nutrientes como o alho e o selênio têm efeito de proteção contra o câncer, agindo de forma a impedir a formação de adutos de DNA (MEDINA; LANE; SHEPHERD, 1983; EL-BAYOUMY et al., 2006).

O câncer de mama é reconhecido como hormônio dependente desde 1896, quando Beatson provou através de seus experimentos que com a remoção dos ovários ocorre a regressão da disseminação do câncer de mama (BEATSON, 1896). Entretanto, existem fatores que apresentam efeito de proteção contra o câncer de mama tal qual a gravidez, destacando-se a primeira gravidez entre mulheres com idade igual ou inferior a 20 anos. O aumento na atividade apoptótica e alterações no destino da célula (alterações persistentes nos mecanismos regulatórios intracelulares) são mecanismos que justificam a proteção conferida por hormônios produzidos durante este período sendo ambos regulados pela proteína codificada pelo gene p53 (MEDINA, 2004).

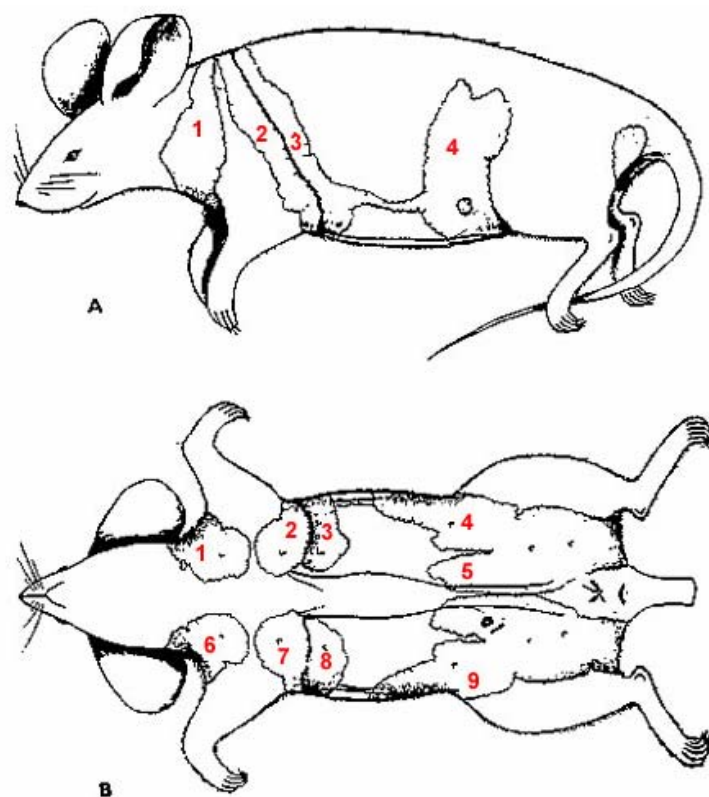
Quando é mencionada a influência hormonal no desenvolvimento do câncer de mama, deve ser destacada a importância do estrogênio. É relatado que a probabilidade do desenvolvimento do câncer de mama é muito pequena quando da ausência do ovário; ovariectomia causa regressão em tumores malignos e existem modelos experimentais onde animais são submetidos ao estrogênio para a indução de câncer de mama (RUSSO; RUSSO, 1998).

Em função da grande importância e da alta frequência com que atinge a população humana e canina, muitos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de se investigar a cura e a prevenção do câncer de mama. Historicamente, a utilização de animais em modelos de estudos, principalmente roedores, tem grande importância na biologia da glândula mamária e principalmente na pesquisa do câncer de mama. Nestes estudos, são utilizados carcinógenos em diferentes concentrações com o objetivo de se induzir o aparecimento do tumor, com destaque para o 2-AAF (2-acetilaminofluoreno), MCA (3-metilcolantreno), MNU (metilnitrosurea) e DMBA (7, 12- dimetilbezantraceno) (MEDINA, 1974; REIGH et al., 1978; SHI et al., 2003; MAFFINI et al, 2008). Atualmente, os carcinógenos mais utilizados são o DMBA que necessita de biotransformação em fígado e em glândula mamária e o MNU que não necessita de biotransformação (TAMULSKI, 1973; MEDINA, 2004). Para se obter uma maior indução de tumores de glândulas

mamárias, administra-se o carcinógeno eleito em animais jovens, quando as referidas glândulas são indiferenciadas e há alta taxa de proliferação celular (RUSSO; RUSSO, 1998).

O câncer de mama em modelos experimentais resulta de uma interação do carcinógeno com o órgão alvo. A glândula mamária apresenta-se como um alvo extremamente seletivo. O conhecimento da estrutura alvo, do carcinógeno e da interação de ambos é extremamente importante para se justificar o desenvolvimento do tumor.

Em camundongos, existem dez glândulas mamárias sendo distribuídas cinco glândulas com seus respectivos mamilos para cada lado da linha média anterior do corpo. As glândulas são alojadas na camada adiposa mamária subcutânea. Tais glândulas são divididas em cervical direita, cervical esquerda, primeira torácica, segunda torácica, abdominal e inguinal (Figura 2) (SQUARTINI; PINGITORE, 1994).



Fonte: SQUARTINI; PINGITORE, 1994

**Figura 2A.**

1. Glândula mamária cervical esquerda
2. Glândula mamária torácica esquerda
3. Glândula mamária torácica esquerda
4. Glândula mamária abdominal esquerda

**Figura 2B**

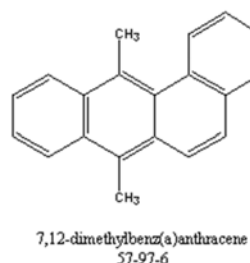
1. Glândula mamária cervical esquerda
2. Glândula mamária torácica esquerda
3. Glândula mamária torácica esquerda
4. Glândula mamária abdominal esquerda
5. Glândula mamária Inguinal esquerda
6. Glândula mamária cervical direita
7. Glândula mamária torácica direita
8. Glândula mamária torácica direita
9. Glândula mamária abdominal esquerda
10. Glândula mamária Inguinal direita

Figura 2 - Distribuição e classificação das glândulas mamárias em camundongos

### 2.3 DMBA (7,12-dimetilbezantraceno)

A maioria dos carcinógenos pertence à família dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (CURRIER et al., 2005). Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são poluentes ambientais provenientes da combustão incompleta de combustíveis, madeira e matéria orgânica. Também se ressalta o fato de estarem presentes em cigarros (GAO et al., 2005).

#### Fórmula estrutural



Fórmula Molecular

$C_{20}H_{16}$

Peso Molecular

256.3 g/mol

Figura 3 - Identificação do DMBA, enfoque na estrutura molecular plana

Estudos em animais indicaram que o DMBA é rapidamente absorvido no trato intestinal e tende a se acumular em tecido adiposo (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1981). A glândula mamária tem por característica acumular tecido adiposo, sendo assim, é um local tropismo para o DMBA.

Muitos tumores de mama surgem espontaneamente em poucas espécies animais, por exemplo, canino e murino. Por razões práticas, a maioria dos estudos experimentais de câncer de mama utiliza roedores (RUSSO; RUSSO, 1996).

Vários trabalhos utilizando o DMBA como carcinógeno são apresentados na literatura científica. O quadro abaixo (Quadro 1) resume alguns destes estudos com seus respectivos resultados:

(Continua)

Linhagem do animal	Doses administradas	Tempo de administração	Resultados encontrados	Referência Bibliográfica
BALB/cCrgl (camundongo)	6,0; 3,0 e 1,6 mg	Semanalmente, durante 3 a 6 semanas	68% em 6 mg (ao final de 6,5 meses); 18% em 3 mg e 8% em 1,5 mg (adenocantoma, em maior frequência e adenocarcinoma tipo B).	MEDINA, 1974
Lewis (rato)	0,015 g/ 100 g de peso corpóreo	Dose única	Incidência de 70%, após 12 meses (nódulo alveolar hiperplásico em maior frequência). Primeiros tumores ao 30° dia.	HASLAM; BERN, 1977
Sprague Dawley (rato)	5 mg	Dose única	95% de adenocarcinomas	KRITCHEVSKY et al, 1984
BALB/c (camundongo)	1; 3; 6 mg	Semanalmente, sendo administrado 1 mg/semana durante 1, 3, e 6 semanas respectivamente	Os primeiros tumores se desenvolveram a partir da 10ª semana após administração do DMBA. Na dose de 1 mg houve baixa incidência de tumores de mama(16%), sendo todos eles classificados como adenoacantomas. Nas doses de 3 e 6 mg houve uma maior incidência (26 e 44% respectivamente), sendo que a grande maioria destes tumores foi classificada como adenocarcinomas (78%) e os demais tumores como adenoacantomas.	LANE et al, 1985
BALB/c (camundongo)	1 mg	Dose única	Aparecimento de tumores a partir da 17ª Semana. Todos os tumores de mama foram classificados como adenocarcinomas. Houve também o aparecimento de tumores em estômago, ovário e linfossarcoma (causa da morte dos animais entre as semanas 46 e 52).	MEDINA ; KITTRELL, 2004
Sprague-Dawley (rato)	20 mg	Dose única	13 semanas após administração do DMBA 100% dos animais desenvolveram tumores em mama. Predominaram adenocarcinomas. Apesar da malignidade não ocorreram metástases.	BARROS et al, 2004
FVB/N (camundongo)	1 mg/semana (total 6 mg)	Semanalmente, durante 6 semanas	Aparecimento de tumor 4 semanas depois da dose final. Após 29 semanas do início o tratamento, todos os animais desenvolveram tumores. 75% dos animais desenvolveram tumores de mama, 15% tumores em pulmão, 10% desenvolveram linfoma e 5% desenvolveram câncer de pele.	CURRIER et al, 2005

(Conclusão)

Linhagem do animal	Doses administradas	Tempo de administração	Resultados encontrados	Referência Bibliográfica
P53 <sup>R270H/+</sup> WAPCre (camundongo)	1 mg/semana (total 6 mg)	Semanalmente, durante 6 semanas	Incidência de 40% de tumores de mama (carcinoma, sarcoma, neoplasia intraepitelial); Outros tumores encontrados: pulmão (carcinoma broncoalveolar), cavidade abdominal (sarcoma), estômago (papiloma de células escamosas e carcinoma) e pele (adenoma de células sebáceas, papiloma de células escamosas e carcinoma).	WIJNHOVEN et al, 2005
"Wild Type" e Atm (camundongo)	1 mg/semana (total 6 mg)	Semanalmente, durante 6 semanas	Incidência: 64,7% (Atm), com aparecimento aos 189 dias e 37,5% com aparecimento aos 229 dias (Wild Type) Tipos de tumor: Adenocarcinoma mamário, tumor adenoescamoso mamário (maior frequência), tumor em pulmão, ovário, útero, adenocarcinoma gástrico e linfoma (menor frequência).	LU et al, 2006

Quadro 1 - Resumo de trabalhos utilizando o DMBA como carcinógeno apresentados na literatura científica



Dentre os mecanismos que explicam o desenvolvimento do tumor mamário pelo DMBA a principal teoria é a ativação receptor/fator de transcrição AhR (aryl hydrocarbon receptor/transcription factor), membro da família Per-ARNT-Sim (PAS) de fatores de transcrição que influenciam o desenvolvimento, ciclo circadiano e respostas da hipóxia (TROMBINO et al., 2005).

De modo geral, a administração de DMBA leva ao aumento na atividade do AhR, por intermédio da indução da CYP1A1, CYP1A2 e outras enzimas que participam no metabolismo de xenobióticos (HOFFMAN; GAY, 1981). São estas enzimas que convertem o DMBA em intermediários epóxido mutagênicos, o 7-hidroximetil-12-metilbezantraceno (7-HMBA), 12-hidroximetil-7-metilbezantraceno (12-HMBA) e 7,12-dimetilbezantraceno, que formam adutos de DNA. No tecido hepático são encontrados os três metabólitos acima, enquanto na glândula mamária são formados apenas os monohidróxidos (7-HMBA e 12-HMBA) (TAMULSKI et al., 1973).

Estes metabólitos ativam principalmente o AhR que se complexa com a proteína Heat-Shock 90 (hsp90) e provavelmente com outras proteínas apenas sugeridas mas não descritas (TROMBINO et al., 2000). Quando por algum motivo estas duas proteínas se dissociam, a AhR está livre para se translocar para o núcleo e se dimerizar com o cofator ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator), associando-se a seqüências regulatórias de transcrição específicas no DNA. Uma vez no núcleo induzem a expressão de genes que codificam para fatores de crescimento e proto-oncogenes, dentre eles *c-erb-2*, *c-myc*, *c-fos*, *c-jun* e *Ha-ras* (TROMBINO et al., 2000).

Estas vias envolvidas na indução de tumores mamários em camundongos, induzidos pelo DMBA (6 doses de 1 mg/20 semanas) foram comprovadas por Currier et al. (2005). Tais autores verificaram a elevada expressão do AhR, *c-myc*, ciclina D1 e a proteína Rb nos tumores mamários de camundongos. Estas proteínas ativam vias de sinalização Wnt, a via NF- $\kappa$ B e a via da prolil-isomerase Pin-1, sugerindo que o desenvolvimento do tumor está relacionado às vias de controle do crescimento celular e as vias anti-apoptóticas.

## **OBJETIVOS**

---

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Estabelecer um modelo para o estudo de tumores de mama em camundongos BALB/c fêmeas.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Determinar a mínima concentração de DMBA (1, 3, 6 e 9 mg/kg de peso vivo) capaz de induzir tumores mamários no período de 1 ano para estabelecimento de modelo de estudo.
- Mensurar as lesões macroscopicamente em cada etapa do experimento.
- Quantificar e classificar os tumores mamários microscopicamente induzidos pelo DMBA em cada etapa do experimento.
- Ratificar a classificação através de métodos imunohistoquímicos (citoqueratina e vimentina).
- Avaliar a proliferação das células dos tumores mamários por imunohistoquímica para o Antígeno Nuclear de Células em Proliferação (PCNA)

## **MATERIAL E MÉTODOS**

---

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados 100 camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, oriundos do biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Em função da toxicidade do carcinógeno e erros de gavagem no início do tratamento 10 animais foram perdidos, sendo assim, o experimento foi conduzido com 90 animais.

Os animais permaneceram no referido biotério em sala com ventilação (16-18 trocas de ar/hora), umidade relativa (45-65%), temperatura controlada (20-24° C) e ciclo claro/escuro 12:12.

### 4.2 Carcinógeno

Utilizou-se o carcinógeno Dimetibezantraceno (DMBA, Sigma) (MEDINA,1974) para a indução dos tumores. Este foi previamente dissolvido em óleo de milho comercial, livre de aditivos, e posteriormente administrado via oro-gástrica. O DMBA foi ministrado nas concentrações de 1, 3 (dividido em 3 doses de 1 mg), 6 (dividido em 6 doses de 1 mg) e 9 (dividido em 9 doses de 1 mg) mg/kg peso vivo. Os controles receberam apenas óleo de milho. Para cada grupo experimental efetuou-se apenas uma gavagem semanal de 1 mg de DMBA. Após a utilização do carcinógeno, houve a inativação do mesmo com solução sulfocrômica, antes do descarte.

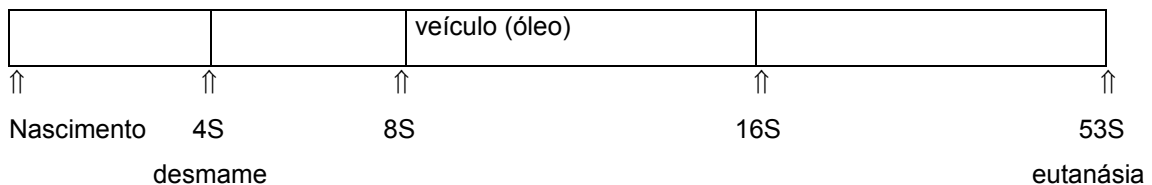
### 4.3 Delineamento experimental

#### 4.3.1 Experimento

A administração do DMBA teve início na oitava semana de vida dos animais. Após a administração da primeira dose de DMBA os animais foram palpados para avaliação do aparecimento das lesões nas glândulas mamárias. As lesões foram mensuradas com o auxílio de um paquímetro. Todos os animais foram pesados antes da administração do carcinógeno.

Foram utilizados 90 animais (20 animais no grupo controle; 18 animais no grupo de 1 mg; 15 animais no grupo de 3 mg; 18 animais no grupo de 6 mg e 19 animais no grupo de 9mg), como demonstrado na figura abaixo (Figura 4):

#### Controle veículo (óleo)



#### Concentrações 1, 3, 6 e 9 mg DMBA

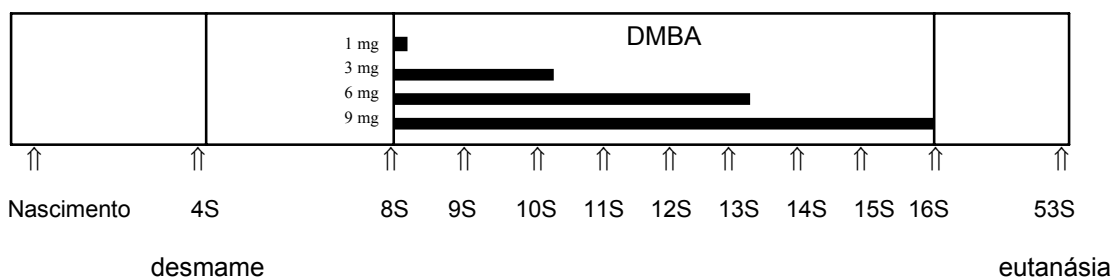


Figura 4 - Esquema de tratamento dos camundongos do grupo controle e DMBA

#### 4.4 Eutanásia dos animais, contagem das lesões macroscópicas e coleta de material

Os camundongos foram anestesiados com Pentobarbital Sódico (250 mg/kg) e eutanasiados por secção da artéria aorta caudal. As lesões foram avaliadas imediatamente após a eutanásia e os órgãos fixados em methacarn (fixador alcoólico constituído por 60% de metanol, 30% de clorofórmio e 10% de ácido acético) para classificação e mensuração das lesões. Características macroscópicas adicionais, como o tamanho, a localização e a cor foram descritos. A data de eutanásia dos animais teve como parâmetro a condição física do animal, ou seja, os animais foram eutanasiados no momento em que se apresentavam abaixo do peso e debilitados. O experimento foi finalizado após 1 ano (53 semanas) da administração da primeira dose, sendo todos os animais eutanasiados.

#### 4.5 Classificação histológica e quantificação microscópica das lesões

Na necropsia, os tumores e órgãos foram rapidamente removidos e fixados em methacarn. Os tecidos foram processados, embebidos em parafina e seccionados em 5µm. Os slides foram corados com hematoxilina eosina utilizando os procedimentos rotineiros de laboratório. As lesões foram comparadas com imagens demonstradas em publicação e classificadas (SQUARTINI; PINGITORE, 1994).

#### 4.6 Imunohistoquímica

Os cortes histológicos foram desparafinados em xilol e hidratados em seqüência de álcoois (absoluto, 95% e 70%) e água destilada. A peroxidase endógena foi bloqueada por incubação, por 30 minutos, em solução contendo 80% de álcool

metílico e 20% de peróxido de hidrogênio 30 volumes. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS por 3 vezes. Os cortes foram incubados com os anticorpos primários por uma noite, em câmara úmida. Foram utilizados os seguintes anticorpos primários: anti-PCNA (DakoCytomation, 1:600), anti-VIMENTINA (DakoCytomation, 1:100), anti-PAN-CITOQUERATINA (DakoCytomation, 1:100). O Anticorpo secundário utilizado foi o kit LSAB (DakoCytomation). Assim, os cortes foram incubados com solução contendo anti-imunoglobulina de camundongo biotinizada por 30 minutos, sendo então lavados 3 vezes com PBS. Em seguida, incubados com solução contendo complexo estreptavidina-peroxidase (kit LSAB), por 30 minutos, sendo então lavados 3 vezes com PBS. A revelação foi realizada aplicando-se sobre os cortes, 200 mL de solução de DAB (diaminobenzidina, SIGMA) a 0,05% em PBS. Imediatamente antes da utilização, foram acrescentados 0,75 mL de peróxido de hidrogênio 30 volumes por mL da solução cromógena. Em seguida as lâminas foram lavadas 2 vezes com PBS e 1 vez com água destilada, contra-coradas com a hematoxilina de Mayer por 1 minuto, desidratadas, diafanizadas e montadas com resina sintética e lamínula.

Para a quantificação das lâminas de PCNA foi utilizado o programa Image J (NIH) e foram contadas aproximadamente 1000 células por lâmina.

#### 4.7 Avaliação estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism (versão 3.0, GraphPad Software Inc, EUA). ANOVA de duas vias foi utilizada para avaliar as alterações no peso corpóreo em relação às doses durante todo o experimento. Para a avaliação da sobrevivência, foi utilizado o teste Logrank. O nível de significância foi estabelecido em  $P < 0,05$  comparado em relação ao controle. A incidência dos tumores foi estabelecida através de porcentagem. Para a análise do PCNA (dados não paramétricos) foi utilizado o teste Kruskal-Wallis.



## **RESULTADOS**

---

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Variação de peso

Durante todo o experimento foi observada variação em relação ao ganho de peso apenas no grupo de 9 mg (Figura 5). Esta variação ocorreu, pois neste grupo, entre a 30ª e a 40ª semanas, permaneceu vivo apenas 1 (um) animal que apresentava ganho de peso acima da média quando comparado aos animais dos demais grupos no mesmo período.

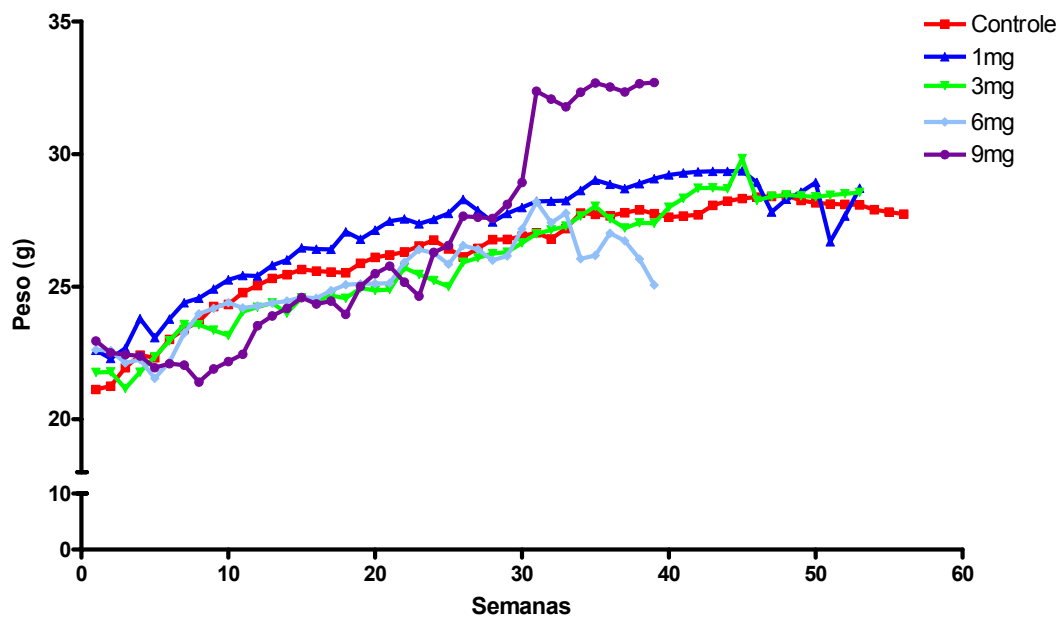


Figura 5 - Variação de peso vivo dos camundongos no decorrer do experimento com o carcinógeno DMBA

A análise estatística, para avaliação da variação do peso, foi feita nas 9 primeiras semanas do experimento, nas quais houve a administração do carcinógeno (Figura 6).

Como já se esperava, ocorreu variação significativa de peso no decorrer das semanas do experimento ( $p \leq 0,0001$ ). Esta variação significativa também ocorreu quando foram comparadas as doses e quando analisada a interação das doses com as semanas ( $p \leq 0,0001$ ).

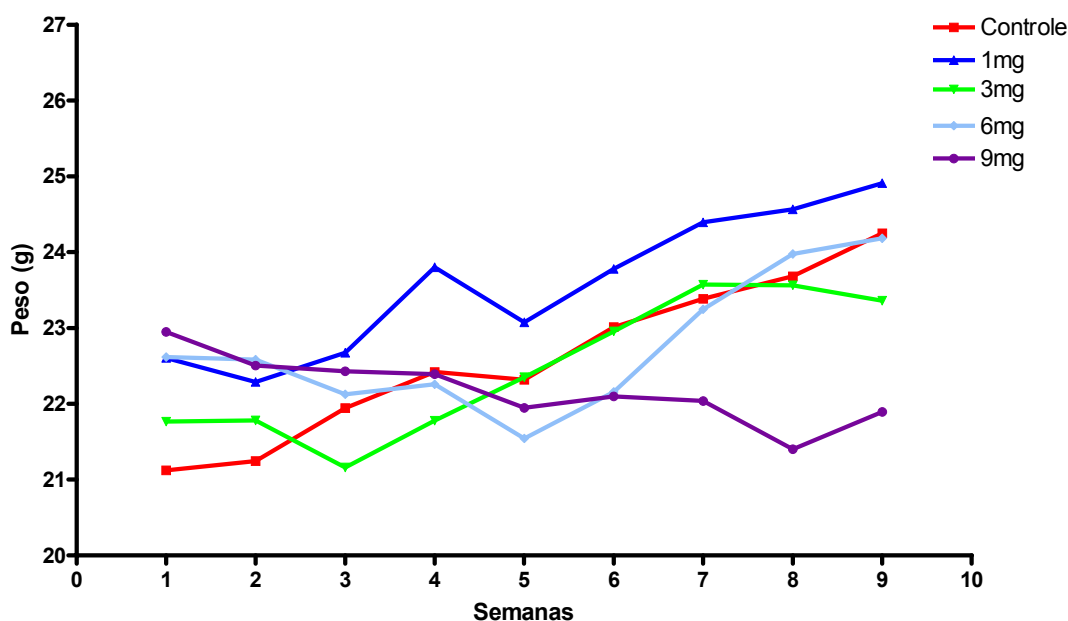


Figura 6 - Análise da Variação de peso vivo dos camundongos nas 9 primeiras semanas do experimento ( $p \leq 0,0001$ )

## 5.2 Sobrevida

Com relação aos animais submetidos à gavagem com óleo de milho contendo 1 e 3 mg de DMBA observou-se maior sobrevida que aquela dos animais que receberam 6 e 9 mg (Figura 7). Os animais do grupo controle permaneceram viáveis durante todo o experimento.

O grupo que recebeu maior dose de DMBA (9 mg), apresentou taxa de mortalidade maior que os demais grupos, observada na 18ª semana (5 animais),

devido aos tumores que surgiram já a partir da 16<sup>o</sup> semana.

O grupo de 6 mg apresentou mortalidade acentuada na 22<sup>o</sup> e 31<sup>o</sup> semanas (3 animais em cada semana), que ocorreu devido aos tumores surgidos a partir da 10<sup>o</sup> semana. As observações para este grupo, assim como para o grupo de 9 mg, foram finalizadas na 40<sup>o</sup> semana.

Com relação aos grupos de 1 e 3 mg as taxas de mortalidade foram semelhantes, no entanto, a maior sobrevida ocorreu no grupo de 1 mg (40%).

Sob análise estatística verificou-se que a diferença de sobrevida é significativa quando todos grupos são comparados ao controle ( $p < 0,001$ ) e quando se compara os grupos de 1mg e 6 mg ( $p < 0,001$ ), 3mg e 6mg ( $p = 0,0017$ ), 6mg e 9 mg ( $p = 0,0034$ ). A diferença de sobrevida não foi significativa apenas na comparação entre os grupos de 1mg e 3mg ( $p = 0,4414$ ).

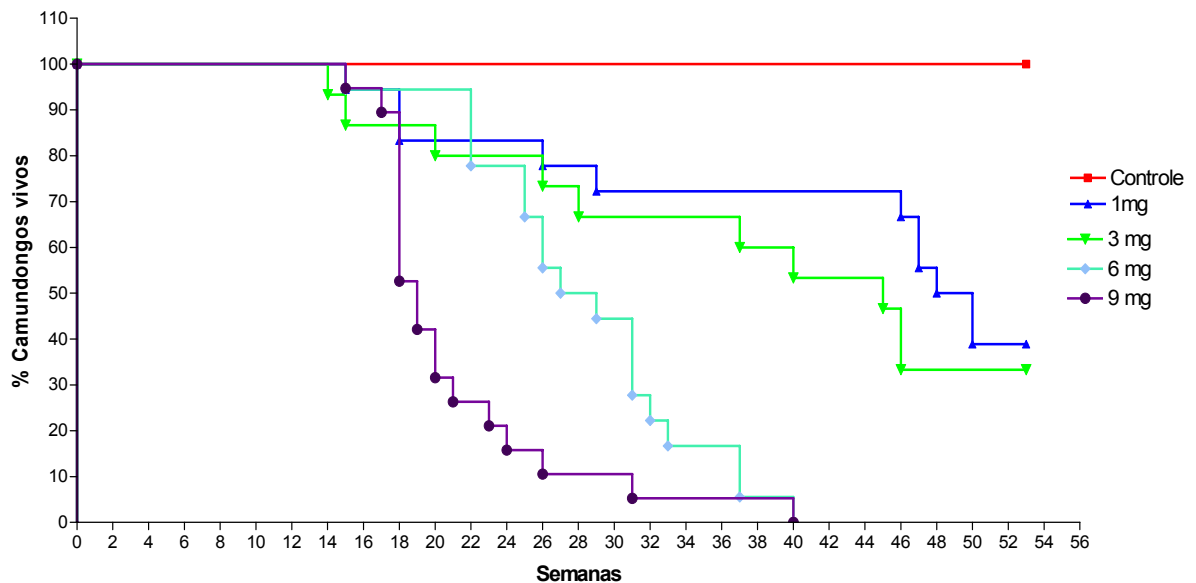


Figura 7 - Sobrevida (em porcentagem) de camundongos BALB/c submetidos à indução de tumor, após tratamento de 1, 3, 6 e 9 mg de DMBA.  $P < 0,001$  comparado em relação ao controle (Logrank Test)

### 5.3 Análise macroscópica

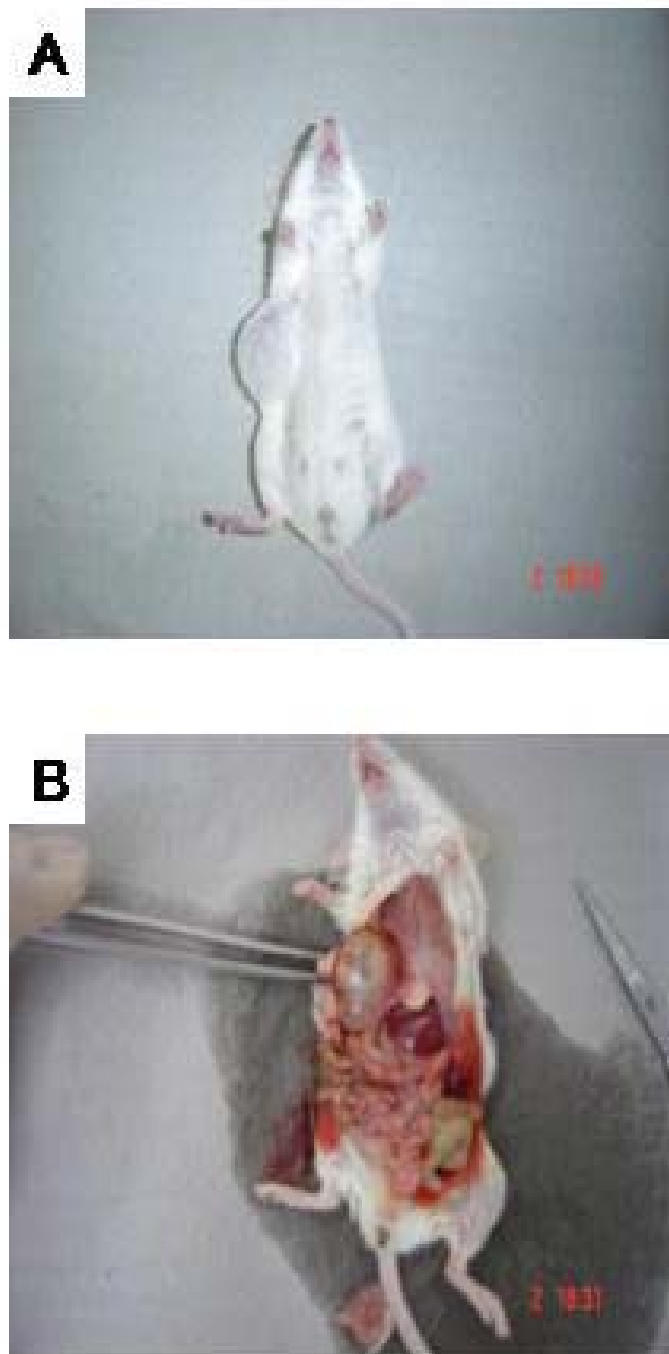
Conforme relatado anteriormente, 10 semanas após o início do tratamento, surgiram os primeiros tumores nos grupos de 1, 3 e 6 mg.

No grupo de 1 mg, 3 animais apresentaram tumor à partir da 10<sup>o</sup> semana, e foram eutanasiados entre a 15<sup>o</sup> e 18<sup>o</sup> semanas.

Nos grupos de 3 mg e 6 mg, apenas 1 animal de cada grupo desenvolveu tumor à partir da 10<sup>o</sup> semana. Estes foram eutanasiados na 13<sup>o</sup> e 25<sup>o</sup> semanas respectivamente.

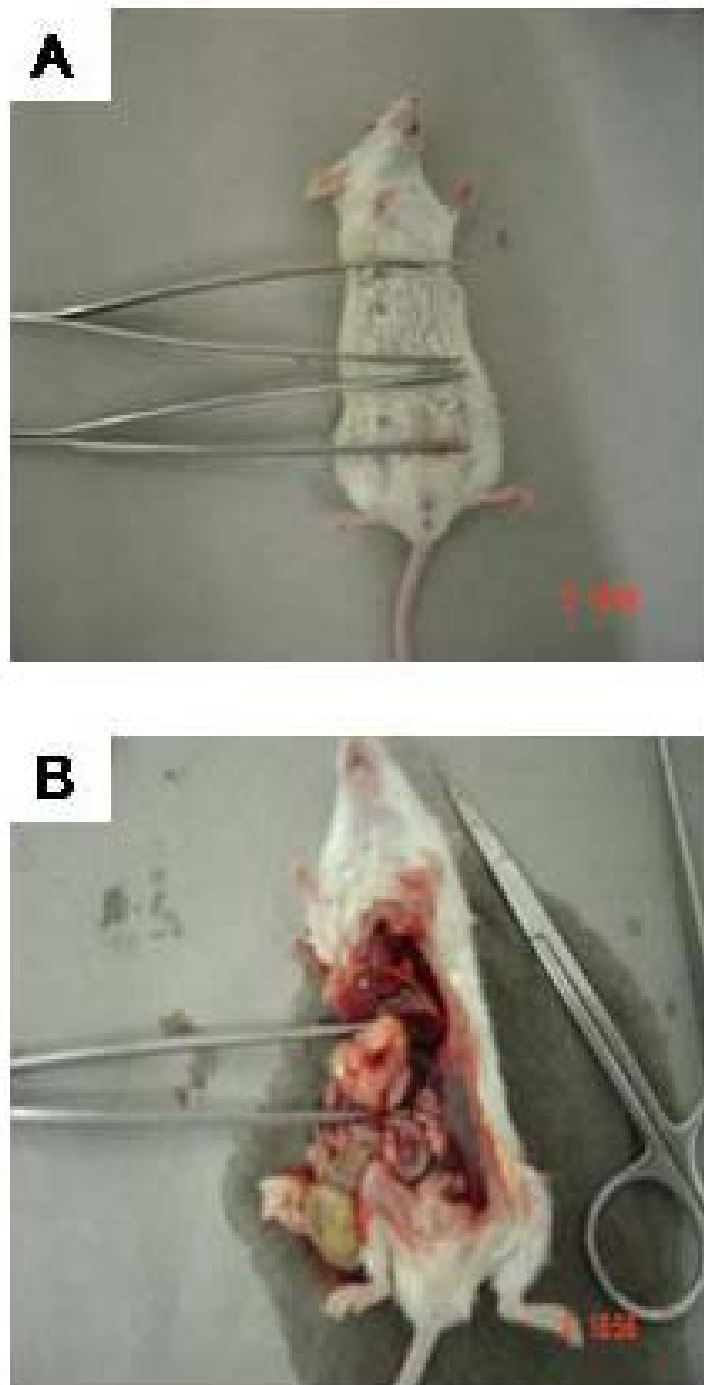
O desenvolvimento dos tumores nos grupos de menor dose (1 e 3 mg) ocorreu de forma mais lenta quando comparados aos grupos de maior dose (6 e 9 mg). Com isto, muitos animais permaneceram vivos até o final do experimento, conforme supracitado.

As figuras abaixo (Figuras 8 e 9) mostram animais dos grupos de 1 mg e 3 mg, eutanasiados na última semana do experimento (53<sup>o</sup> semana).



Fonte: Avanzo, G.U. (2007)

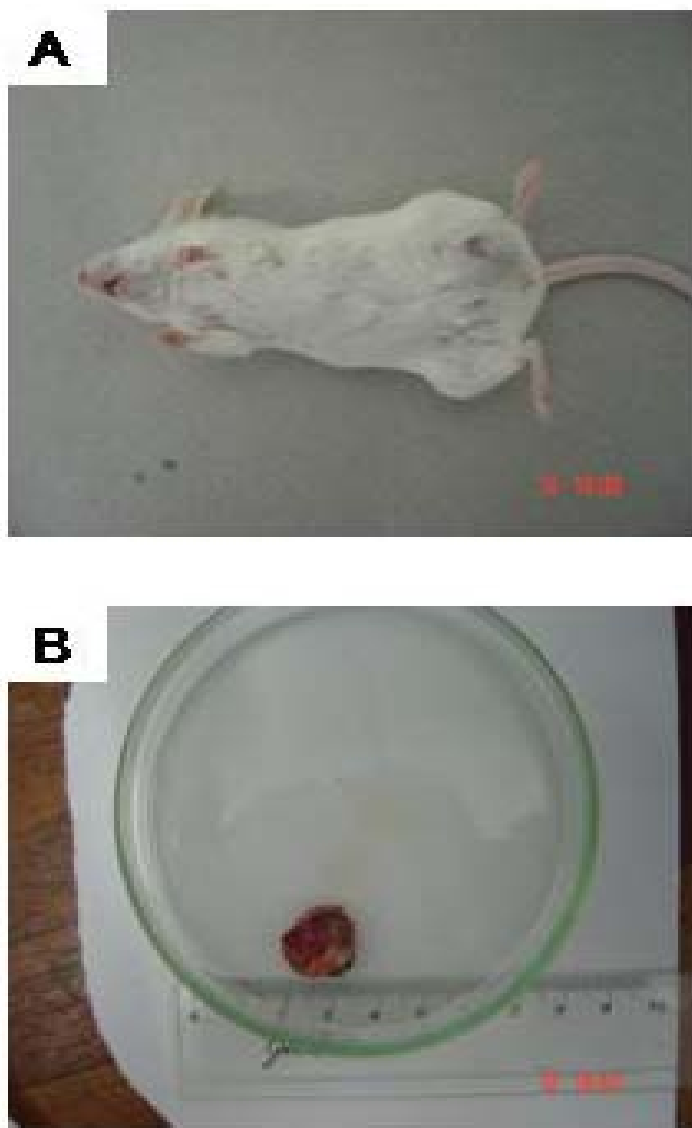
Figura 8 - A. Animal do grupo de 1 mg eutanasiado na última semana do experimento. Observa-se presença de tumor em mamas torácicas. B. Necropsia do mesmo animal, evidenciando o tumor de mama delimitado e sem infiltrações em cavidades



Fonte: Avanzo, G.U. (2007)

Figura 9 - A. Animal do grupo de 3 mg eutanasiado na última semana do experimento. Observa-se presença de tumor em mamas torácicas e abdominais. B. Necropsia do mesmo animal, evidenciando o tumor de mama com infiltrações em cavidades

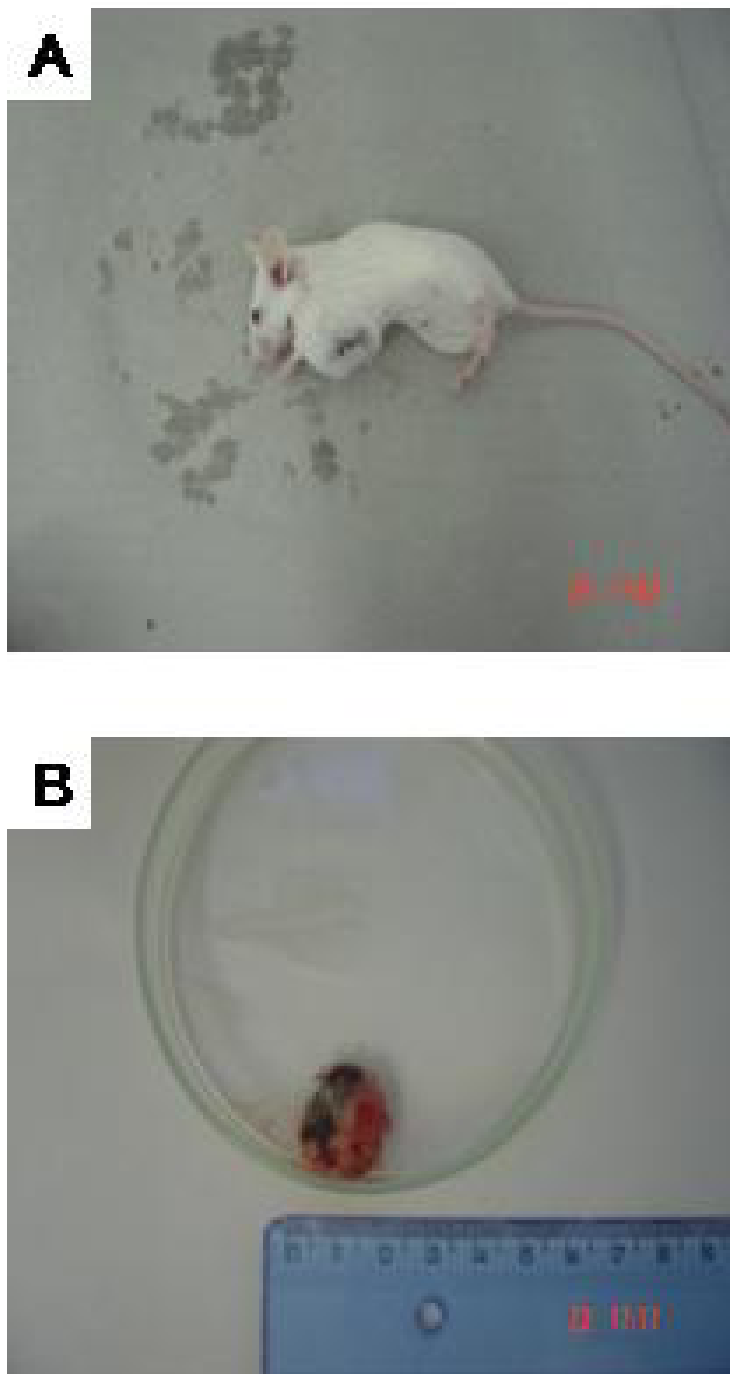
Já nos grupos de maior dose (6 e 9 mg) os tumores se desenvolveram de forma mais rápida (Figuras 10 e 11), e o referido desenvolvimento ocorreu entre a 16<sup>o</sup> e 40<sup>o</sup> semanas. Os animais destes grupos foram eutanasiados no decorrer destas semanas e o final do experimento para ambos ocorreu na 40<sup>o</sup> semana.



Fonte: Avanzo, G.U. (2007)

Figura 10 - A. Animal do grupo de 6 mg eutanasiado na 37<sup>o</sup> semana do experimento. Observa-se presença de tumor em mama inguinal. B. Tumor isolado após de necropsia, com diâmetro aproximado de 1,5 cm





Fonte: Avanzo, G.U (2007)

Figura 11 - A. Animal do grupo de 9 mg eutanasiado na 21ª semana do experimento. Observa-se presença de tumor em mamas cervical e torácica. B. Tumor isolado através de necropsia, com diâmetro aproximado de 2 cm

Os tamanhos dos tumores (maior diâmetro) foram mensurados com o auxílio de um paquímetro. O menor tumor mensurado apresentava 7,65 mm e o maior 22,15 mm. Os pesos dos tumores também foram mensurados sendo menor 0,15 mg e o maior 22,15 mg.

Sob análise macroscópica, além dos tumores de mama, foram detectados tumores em pulmão em todos os grupos, exceto no grupo de 6 mg. Também foram identificados casos de hiperplasia em timo (1 caso em 9 mg e 1 caso em 6 mg); tumor próximo à região submandibular e tumor na região dorsal próximo à coluna (ambos em animais do grupo de 6 mg), classificados como linfomas sob análise microscópica; tumor em estômago (1 caso em 3 mg).

O animal que apresentava tumor na região dorsal próxima à coluna foi eutanasiado por apresentar paralisia em membros posteriores. Sob necropsia, também foi observado que a bexiga urinária estava repleta de urina.

Também foram observados casos de hemorragia em cavidades torácica e abdominal.

## 5.4 Análise microscópica

### 5.4.1 Incidência e classificação histológica

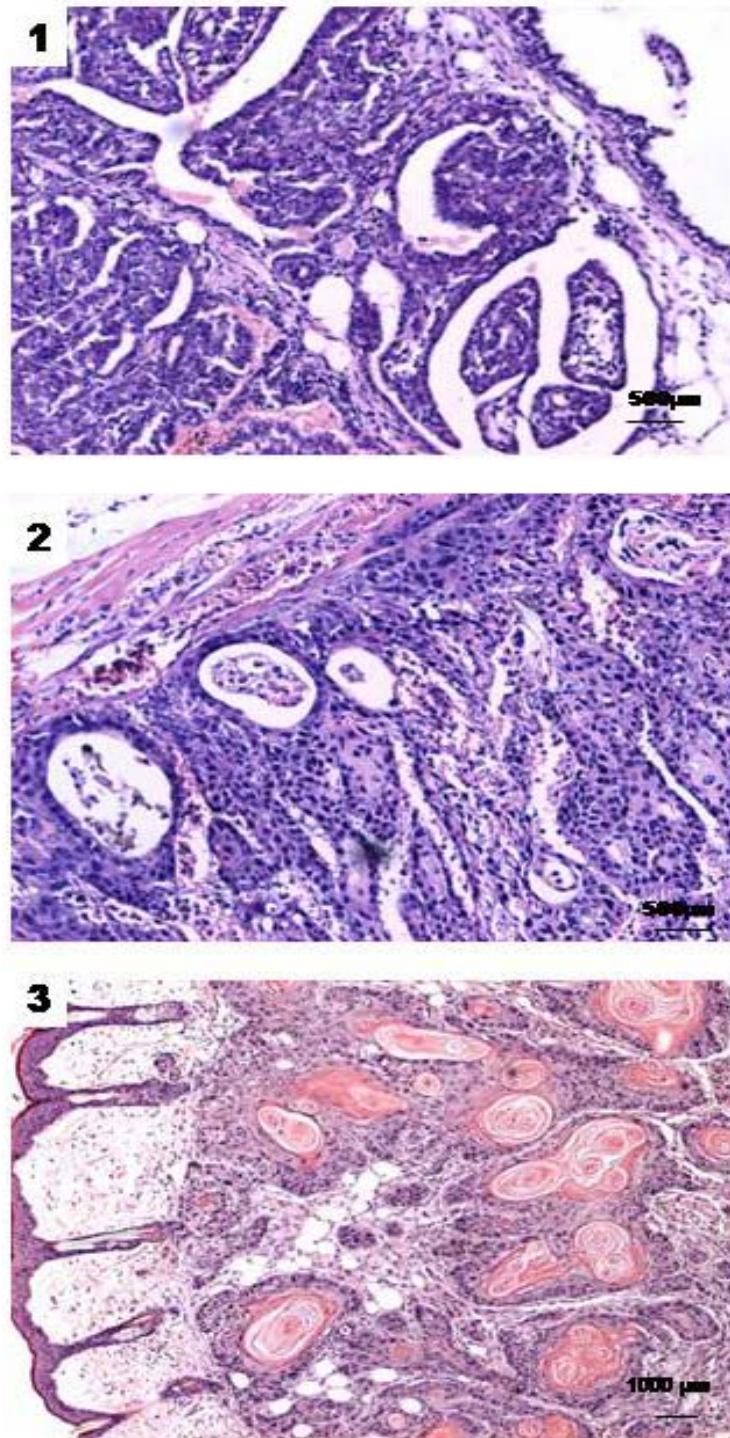
Durante todo o experimento, 48,57% dos animais desenvolveram algum tipo de tumor. Destes, 25,71% (18 casos em 70 animais) desenvolveram tumor de mama, 8,47% (6 casos em 70 animais) desenvolveram tumor em pulmão (carcinoma broncogênico), 5,71% (4 casos em 70 animais) tumor em pele (carcinoma planocelular), 5,71% (4 casos em 70 animais) linfoma, 1,42% (1 caso em 70 animais) tumor em estômago e 1,42% (1 caso em 70 animais) fibrossarcoma. Os tumores não mamários ocorreram principalmente na fase final do experimento. A incidência de

tumores de mama também variou entre as doses, sendo maior nas doses de 6 e 9 mg (Tabela 2).

Tabela 2 - Comparação das incidências de tumores entre os grupos. Os números entre parênteses apresentam o número de animais com tumores em relação ao total de animais

	1 mg	3 mg	6mg	9 mg
Tumor de mama (total)	11,11% (2/18)	20 % (3/15)	27,77 % (5/18)	42,10 % (8/19)
Adenocarcinoma A (tumor de mama)	11,11% (2/18)	6,66% (1/15)	11,11% (2/18)	26,31% (5/19)
Adenoacantoma (tumor de mama)	0% (0/18)	6,66% (1/15)	11,11% (2/18)	10,52% (2/19)
Adenocarcinoma misto A e B (tumor de mama)	0 % (0/18)	6,66% (1/15)	5,55% (1/18)	5,26% (1/19)
Tumor em pulmão (carcinoma broncogênico)	16,66% (3/18)	13,33% (2/15)	0% (0/18)	5,26% (1/19)
Tumor em pele (carcinoma planocelular)	5,55% (1/18)	0 % (0/15)	5,55% (1/18)	10,52% (2/19)
Linfoma	0 % (0/18)	6,66% (1/15)	16,66% (3/18)	0 % (0/19)
Tumor em estômago	0 % (0/18)	6,66% (1/15)	0% (0/18)	0 % (0/19)
Fibrossarcoma	0 % (0/18)	0 % (0/15)	0 % (0/18)	5,26% (1/19)

Dentre os tumores de mama, 55,55% foram classificados como Adenocarcinoma A, 16,66 % Adenocarcinoma Misto (A e B) e 27,77% de Adenoacantomas (Figura 12).



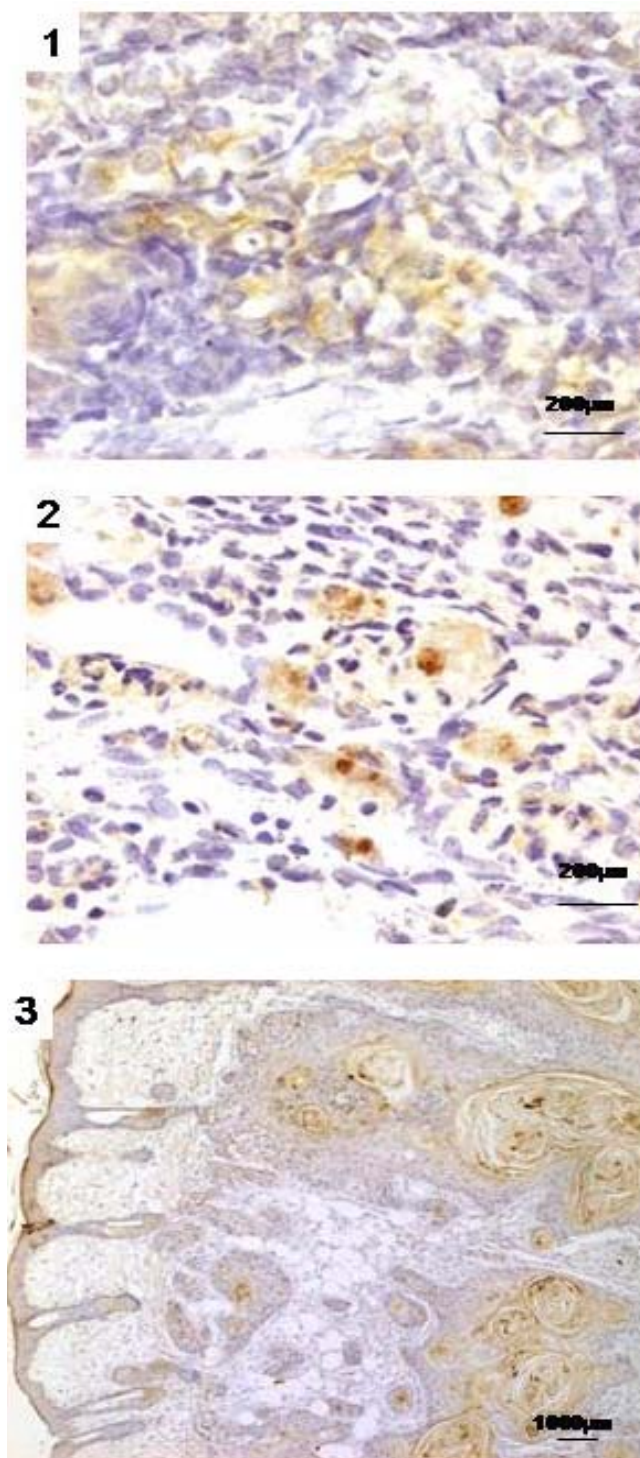
Fonte: Avanzo, G.U (2007)

Figura 12 - Fotomicrografias obtidas de tecidos oriundos de tumor de mama induzido experimentalmente em camundongo fêmea com 1 ano de evolução corados pelo método HE. 1. Adenocarcinoma A. 2. Adenocarcinoma Misto (A e B). 3. Adenoacantoma

#### 5.4.2 Imunohistoquímica para citoqueratina e vimentina

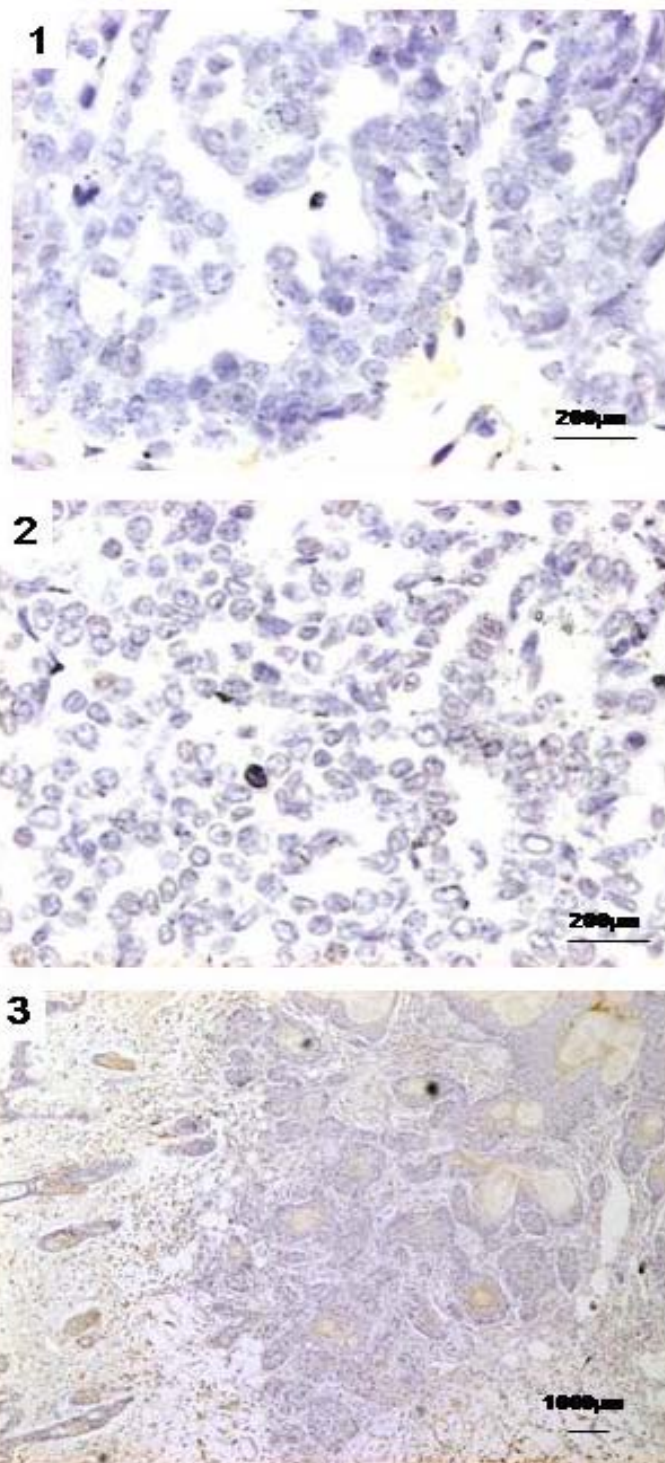
As referidas classificações histológicas foram confirmadas através da imunohistoquímica para citoqueratina e vimentina (Figuras 13 e 14).

Todas as lâminas de tumores de mama apresentaram marcações positivas na análise imunohistoquímica para citoqueratina, indicando que a origem dos tumores é epitelial.



Fonte: Avanzo, G.U (2007)

Figura 13 - Fotomicrografias obtidas de tecidos oriundos de tumor de mama induzido experimentalmente em camundongo fêmea com 1 ano de evolução corados pelo método imunohistoquímico citoqueratina. 1. Adenocarcinoma A. 2. Adenocarcinoma Misto (A e B). 3. Adenoacantoma

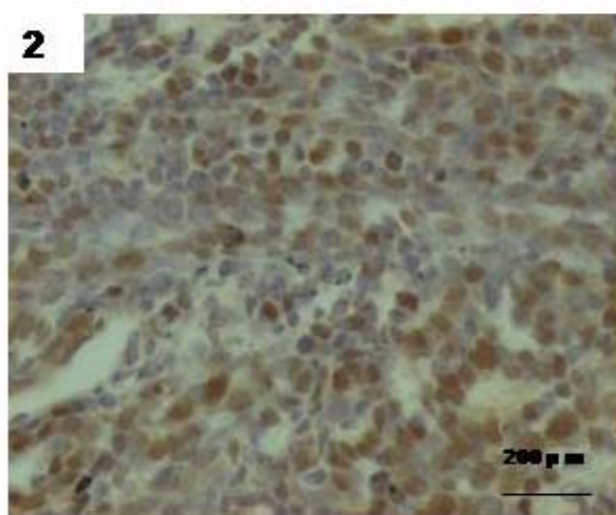
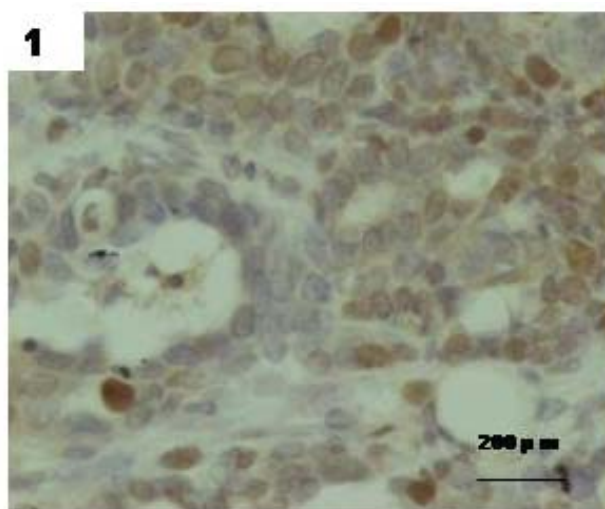


Fonte: Avanzo, G.U (2007)

Figura 14 - Fotomicrografias obtidas de tecidos oriundos de tumor de mama induzido experimentalmente em camundongo fêmea com 1 ano de evolução corados pelo método imunohistoquímico vimentina. 1. Adenocarcinoma A. 2. Adenocarcinoma Misto (A e B). 3. Adenoacantoma

### 5.5 Resultados de imunohistoquímica para PCNA

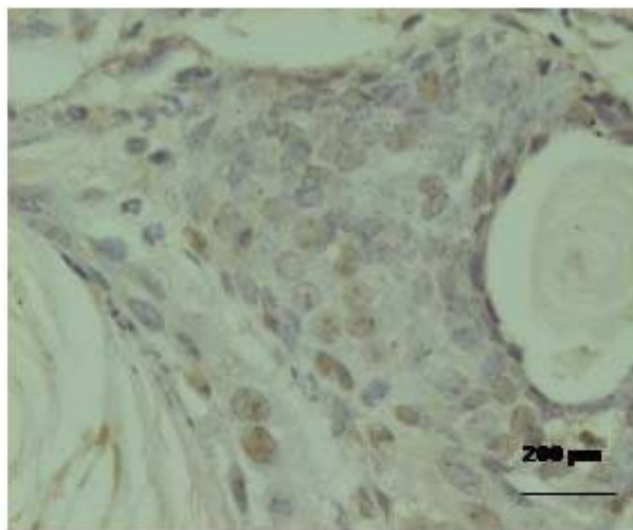
Para a análise da proliferação celular nos tumores encontrados no experimento, realizou-se a imunohistoquímica para PCNA. As figuras abaixo mostram a alta proliferação celular nos tumores de mama induzidos quimicamente através do DMBA.



Fonte: Avanzo, G.U (2007)

Figura 15 - 1. Imunohistoquímica para PCNA em Adenocarcinoma A. 2. Imunohistoquímica para PCNA em Adenocarcinoma Misto A e B (tumor de mama)





Fonte: Avanzo, G.U (2007)

Figura 16 - Imunohistoquímica para PCNA em Adenoacantoma (tumor de mama)

Quando comparados os tipos histológicos sob análise estatística, verificou-se que a maior proliferação celular (células positiva/células totais) ocorreu em adenocantomas (Figura 17). E quando foram comparadas as doses, a maior proliferação ocorreu nas doses de 6 e 9 mg (Figura 18). Em ambas análises a diferença de proliferação entre os grupos não foi significativa considerando  $p= 0,5163$  para a comparação entre grupos histológicos e  $p= 0,83$  para a comparação entre as doses.

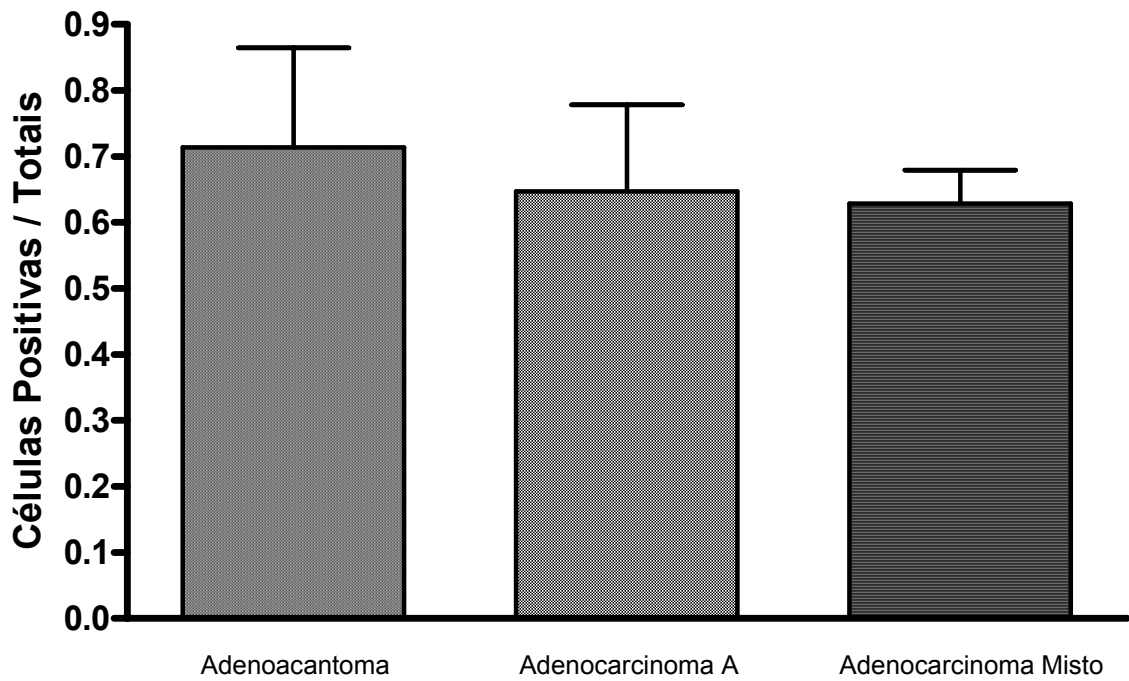


Figura 17 - Análise estatística (Kruskal-Wallis, teste não paramétrico) da proliferação celular, comparando-se tipos histológicos ( $p=0,5163$ )

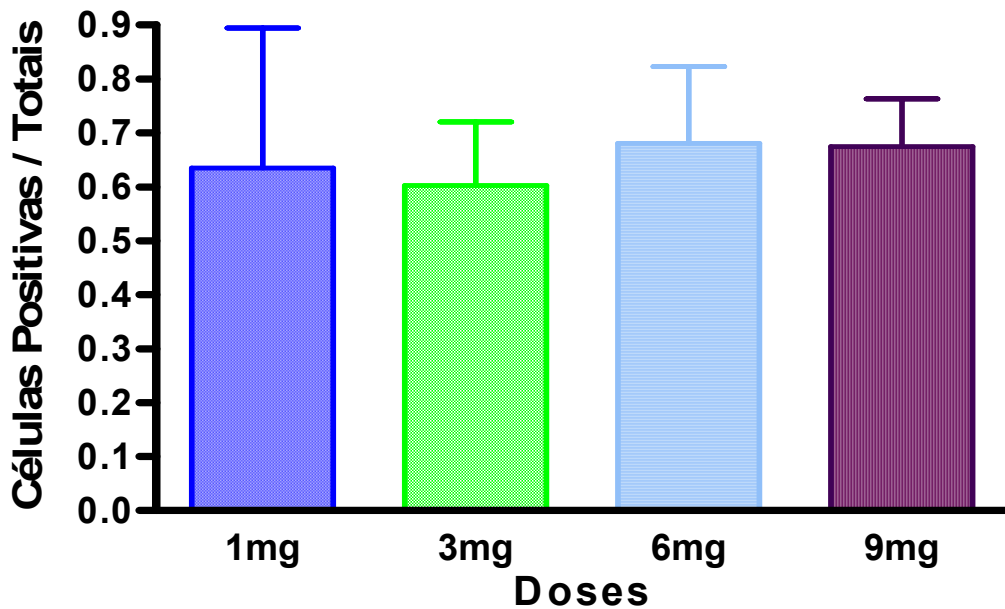


Figura 18 - Análise estatística (Kruskal-Wallis, teste não paramétrico) da proliferação celular, comparando-se as doses ( $p=0,83$ )

## **DISCUSSÃO**

---

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como principal objetivo estabelecer um modelo para o estudo de tumores de mama em camundongos BALB/c fêmeas, baseado em dados da literatura. O carcinógeno de eleição para este estudo foi o DMBA (7,12-dimetilbezantraceno), considerando que muitos estudos de carcinogênese mamária tenham sido conduzidos com o referido carcinógeno (MEDINA, 1974; HASLAM; BERN, 1977; LANE et al., 1985; MEDINA; KITTRELL, 2004; BARROS et al., 2004; CURRIER et al., 2005; WIJNHOFEN et al., 2005; LU et al., 2006).

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que em todas as concentrações de DMBA utilizadas houve o desenvolvimento de tumor de mama. Os primeiros tumores surgiram à partir da 10ª semana após o início do experimento, no entanto, a maioria dos tumores surgiram à partir da 16ª semana. Os estudos conduzidos por Lane et al. (1985) e Medina e Kittrell (2004), com a mesma linhagem de camundongos, também relatam o surgimento dos tumores entre a 10ª e a 17ª semanas, respectivamente.

A maior sobrevivência ocorreu nos grupos de 1 e 3 mg, dos quais grande parte dos animais (8 e 5 animais, respectivamente) chegou até o final do experimento. Já os grupos de 6 e 9 mg permaneceram até a 40ª semana do experimento, não obstante, apresentaram maior incidência de tumor de mama.

Os trabalhos anteriormente publicados, utilizando a dose de 6 mg em camundongos, demonstram que as incidências dos tumores de mama variam entre 40% (WIJNHOFEN et al., 2005) e 75% (CURRIER et al., 2005). E como demonstrado no quadro 1, os resultados foram ainda mais expressivos em trabalhos com ratos, chegando à incidência de 100% após a 13ª semana de administração (BARROS et al., 2004). Neste trabalho, do total de tumores 25,71% foram identificados como tumores de mama, o que demonstra que o resultado encontra-se abaixo dos limites descritos anteriormente e que o DMBA pode ser espécie-específico como destacado por Barros et al (2004).

Em relação aos demais animais que desenvolveram tumores, 8,47%

desenvolveram tumor em pulmão (carcinoma broncogênico), 5,71% tumor em pele (carcinoma planocelular), 5,71% linfoma, 1,42% tumor em estômago e 1,42% fibrossarcoma. Estes resultados também não coincidem com os trabalhos publicados. No trabalho publicado por Currier et al. (2005) observaram-se as incidências de 15% tumor em pulmão, 10% linfoma e 5% tumor em pele.

A baixa incidência de tumores observados pode ser justificada por duas hipóteses: alimentação dos animais e diferenças entre a própria linhagem. O fato da alimentação oferecida aos animais no Brasil ter mais fibras quando comparada à alimentação oferecida aos animais de outros países pode ser um fator que justifique a baixa incidência no desenvolvimento de tumores (KRITCHEVSKY; WEBER; KLURFELD, 1984; LANE et al., 1985). Esta hipótese está sustentada em bibliografias que demonstram a influência da alimentação no desenvolvimento de tumores (MEDINA; LANE; SHEPHED, 1983; EL-BAYOUMY et al., 2006). A hipótese de diferenças em uma mesma linhagem está sustentada no fato de que após vários cruzamentos entre uma mesma linhagem, acarreta alterações genéticas que conferem novas características a uma mesma linhagem. O endocruzamento efetuado durante 20 gerações, entre irmãos e irmãs da mesma linhagem, a fim de gerar camundongos que não rejeitassem tumores transplantados, originou a linhagem DBA que manifestava além das características desejadas, outras recessivas, como pêlo marrom e não aguti (MAHER, 2002). Outras provas de que o endocruzamento origina novas linhagens puras é baseada na uniformidade do DNA mitocondrial, que sugere que a maior parte das linhagens comuns derivam de uma única fêmea reprodutora acerca de 150 a 200 anos atrás (FERRIS et al., 1982) e tais linhagens apresentam características.

Segundo Medina e Kittrell (2005) o desenvolvimento de tumores não mamários em tratamentos com DMBA é comum, principalmente na fase final do experimento. Este fato também foi observado durante o presente estudo, no qual em sua fase final houve o desenvolvimento de tumores em pulmão, pele, estômago, linfoma e fibrossarcoma.

Quando comparadas as incidências entre os grupos podemos observar que a maior ocorreu no grupo de 9 mg com 42,10%, seguida do grupo de 6 mg (27,77%), 3 mg (20%) e 1 mg (11,11%). Tal fato correlaciona-se com a dose utilizada, onde há

aumento do número de tumores com aumento da dose.

Adenocarcinoma A foi o tumor mais freqüente em todos os grupos, seguido de adenoacantoma e adenocarcinoma misto em menor freqüência. Estes resultados são semelhantes aos resultados apresentados por Lane et al. (1985). Entretanto, não se pode fazer uma análise comparativa com a dose de 9 mg pois nas bibliografias utilizadas como base para o presente estudo a dose mais alta utilizada foi a de 6 mg.

Na análise imunohistoquímica foram utilizadas as técnicas de PCNA, citoqueratina e vimentina pelo fato de serem amplamente difundidas na literatura para caracterizar os tumores (KOKKINOS et al., 2007). As análises com citoqueratina e vimentina tinham o objetivo de ratificar a classificação histológica e assim o fizeram neste estudo, sendo positivas as lâminas processadas com citoqueratina e negativas as lâminas processadas com vimentina. Já a técnica de PCNA, tinha como objetivo avaliar a proliferação celular, não obstante, neste estudo os resultados não foram significativos, na comparação entre os grupos avaliados.

Para estudos futuros utilizando este modelo, são recomendadas as doses de 3, 6 e 9 mg. Não é recomendada a dose de 1mg em função da baixa incidência de tumores mamários. A escolha da dose dependerá do objetivo do estudo, como por exemplo, para estudo com o objetivo de se avaliar o efeito quimiopreventivo de uma determinada planta recomenda-se a dose mais baixa.

## **CONCLUSÃO**

---

## **7 CONCLUSÃO**

Apesar da incidência dos tumores mamários neste estudo ser inferior aos resultados publicados na literatura, o DMBA resultou em modelo efetivo de carcinogênese mamária, nas doses de 3, 6 e 9 mg, com incidência variando proporcionalmente ao aumento da dose.



## **REFERÊNCIAS**

---

## REFERÊNCIAS

BANNASCH, P. Preneoplastic lesions as end points in carcinogenicity testing, I. Hepatic preneoplasia. **Carcinogenesis**, London, v. 7, n. 5, p. 689-695, 1986.

BARROS, A. C. S. D.; MURANAKA, E. N. K.; MORI, L. J.; PELIZON, C. H.T.; IRIYA, K.; GIOCONDO, G.; PINOTTI, J. A. Induction of experimental mammary carcinogenesis in rats with 7,12-dimethylbez(a)anthracene. **Revista Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 59, p. 257-261, 2004.

BEATSON, G.T. On the treatment of inoperable cases of carcinoma the mamma: suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. **Lancet**, v. 2, p.104-107, 1896.

BEREMBLUM, I. The nature of tumor growth. In: FLOREY, L. **General pathology**. 4. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1970, p. 645-667.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. Neoplasia. In: **Robbins pathologic basis of disease**.4.ed.Philadelphia: W.B.Saunders, 1989, p. 239-305.

CURRIER, N.; SOLOMON, S. E.; DEMICCO, E. G.; CHANG, D. L. F.; FARAGO, M.; YING, H.; DOMINGUEZ, I.; SONENSHEIN, G. E.; CARDIFF, R. D.; XIAO, Z. X. J.; SHERR, D. H.; SELDIN, D. C. Oncogenic signaling pathways activated in DMBA-induced mouse mammary tumors. **Toxicologic Pathology**, v. 33, p. 726-737, 2005.

DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; SOUSA, R. S.; COSTA, T. A.; MACEDO, T. R.; RODIGHERI, S. M.; RIOS, A.; PIEKARZ, C. H. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, v. 7, n. 2, p. 15-16, 2002.

EL-BAYOUMY, K.; RAGHU, S.; PINTO, J. T.; RIVLIN, S. Significance of garlic and its constituents in cancer and cardiovascular disease. **The Journal of Nutrition**, p.864S-869S, 2006.

EVANS, H. J. Molecular genetic aspects of human cancers: the 1993 Franck Rose lecture. **British Journal of Cancer**, v. 68, p. 1051-1060, 1993.

FABER, E. The multistep nature of cancer development. **Cancer Research**, v. 44, p. 4217-4223, 1984.

FARBER, E.; SARMA, D. S. R. Biology of disease. Hepatocarcinogenesis: a dynamic cellular perspective. **Laboratory Investigation**, New York, v. 56, n. 1, p. 4-22, 1987.

FERRIS, S. D.; SAGE, R. D.; WILSON, A. C. Evidence from mt D.N.A. sequences that common strains of inbred mice are descended from a single female. **Nature**, v. 295, p. 163-165, 1982.

FUKUMASY, H.; DA SILVA, T. C.; AVANZO, J. L.; DE LIMA, C. E.; MACKOWIAK, I. I.; ATROCH, A.; SPINOSA, H. D.; MORENO, F. S.; DAGLI, M. L. Z. Chemopreventive effects of Paullinia cupana Mart var. sorbilis, the guarana, on mouse hepatocarcinogenesis. **Cancer Letters**, v. 233, n. 1, p.158-164, 2006.

GAO, J.; LAUER, F. T.; DUNAWAY, S.; BRUCHIEL, S. W. C. Cytochrome P450 1B1 is required for 7,12-Dimethylbenz(a)-anthracene (DMBA) Induced bSpleen Cell Immunotoxicity. **Toxicological Science**, v. 86, p. 68-74, 2005.

HAKKAK, R.; HOLLEY, A. W.; MACLEOD, S. L.; SIMPSON, P. M.; FUCHS, G. J.; JO, C. H.; EMMONS, T. K.; KOROURIAN, S. Obesity promotes 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumor development in female Zucker rats. **Breast Cancer Res**, v.7, n.5, p.R627-R633, 2005.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

HASLAM, S. Z.; BERN, H. A. Histopathogenesis of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced rat mammary tumors. **Proceedings of National Academy Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 9, p. 4020-4024, 1977.

HOFFMAN, D. J.; GAY, M. L. Embryotoxic effects of benzo[a]pyrene, chrysene, and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in petroleum hydrocarbon mixtures in mallard ducks. **Journal Toxicology and Environmental Health**, V. 7, N. 5, p. 775-787, 1981.

INCA. Estimativa 2008: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2007, 96p.

KOKKINOS, M. I.; WAFAI, R.; WONG, M. K.; NEWGREEN, D. F.; THOMPSON, E. W.; WALTHAM, M. Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer – Observations in vitro and in vivo. **Cell Tissues Organs**, v. 185, n. 1-3, p. 191-203, 2007.

KRITCHEVSKY, D.; WEBER, M. M.; KLURFELD, D. M. Dietary fat versus caloric content in initiation and promotion of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene- induced mammary tumorigenesis in rats. **Cancer Research**, v. 44, p. 3174-3177, 1984.

LANE, H. W.; BUTEL, J. S.; HOWARD, C.; SHEPHERD, F.; HALLIGAN, R.; MEDINA, D. The role of high levels of dietary fat in 7,12-dimethyl-bezanthracene-induced mouse mammary tumorigenesis: lack of an effect on lipid peroxidation. **Carcinogenesis**, v. 6, p. 403-407, 1985.

LANE, H. W.; MEDINA, D. Mode of action of selenium inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mouse mammary tumorigenesis. **Journal of National Cancer Institute**, v. 75, n. 4, p. 675-679, 1985.

LEROI, A. M.; KOUFOPANOU, V.; BURT, A. Câncer selection. **Nature Reviews**, v. 3, p. 226-231, 2003.

LU, S.; SHEN, K.; YAOLIN, W.; SANTNER, S.T.; CHEN, J.; BROOKS, S.C.; WANG, Y.A. Atm-haploinsufficiency enhances susceptibility to carcinogen-induced mammary tumors. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 4, p. 848-855, 2006.

MAEDA, T.; HASHITANI, S.; ZUSHI, Y.; SEGAWA, E.; TANAKA, N.; SAKURAI, K.; URADE, M. Establishment of a nude mouse transplantable model of a human malignant fibrous histiocytoma of the mandible with high metastatic potential to the lung. **Journal of Cancer Research of Clinical Oncology**, v. 134, n. 9, p.1005-1011, 2008.

MAFFINI, M. V.; SOTO, A. T.; SONNENSCHNEIN, C.; PAPADOPOULOS, N.; THEOHARIDES, T. C. Lack of c-kit receptor promotes mammary tumors in N-nitrosomethylurea-treated Ws/Ws rats. **Cancer Cell International**, v. 8, p. 1-7, 2008.

MAHER, B. A. Test tubes with tails. **The Scientist**, v. 16, p. 16-22, 2002.

MEDINA, D. Breast cancer: the protective effect of pregnancy. **Clinical Cancer Research**, v.10, p. 380s-384s, 2004.

MEDINA, D. Mammary tumorigenesis in chemical carcinogen-treated mice. I. Incidence in BALB-c and C57BL mice. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 53, p. 213–221, 1974.

MEDINA, D.; KITTRELL, F. Stroma is not a major target in DMBA-mediated tumorigenesis of mouse mammary preneoplasia. **Journal of Cell Sciences**, v. 118, p. 123-127, 2004.

MEDINA, D.; LANE, H.W.; SHEPHERD, F. Effect of dietary selenium levels on 7,12-dimethylbenzanthracene-induced mouse mammary tumorigenesis. **Carcinogenesis**, v. 4, p. 1159-63,1983.

MEDINA, D.; LANE, H. W.; JANET, S. B.; HOWARD, C.;FRANCES, S.; HALLIGAN, R.; MEDINA, D. The role of high levels of dietary fat in 7,12-dimethylbenzanthracene-induced mouse mammary tumorigenesis: lack of an effect on lipid peroxidation. **Carcinogenesis**, v. 6, n. 3, p. 403-407,1985.

MESNIL, M.; YAMASAKI, H. Cell-cell communication and growth control of normal and cancer cells: evidence and hypothesis. **Molecular Carcinogenesis** , p. 14-17,1993.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Drinking water & health**. Washington, DC: National Academy Press, 1981, v.4, p. 257.

PITOT, H. C.; DRAGAN, Y. P. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis.**FASEB Journal**, Bethesda, v. 5, p. 2280-2286, 1991.

REIGH, D. L.; STUART, M.; FLOYD, R. A. Activation of the carcinogen n-hydroxy-2-acetylaminofluorene by rat mammary peroxidase. **Experientia**, v. 34, p.107-108, 1978.

ROBINS, S. L.; COTRAN, R. S. Patologia- bases patológicas das doenças. 7. ed., Rio de Janeiro, Elsevier Editora Ltda., 2005, p.281-356.

RUSSO, J.; RUSSO, I. H. Experimentally induced mammary tumors in rats. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 39, p. 7-20, 1996.

RUSSO, I. H.; RUSSO, J. Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 3, n. 1, p. 49-61, 1998.

RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. Tumors of mammary gland. **Small animal clinical oncology**, 3th ed , Saunders Company, 2001, p.455-477.

SHI, H. Y.; ZHANG, W.; LIANG, R.; KITTRELL, F.; TEMPLETON, N. S.; MEDINA, D.; ZHANG, M. Modeling human breast cancer metastasis in mice: maspin as a paradigm. **Histol Histopathol**, v. 18, p. 201-206, 2003.

SQUARTINI, F.; PINGITORE, R. Pathology of tumours in laboratory animals. Tumours of the mammary gland. **World Health Organization**, v. 2, p. 47-99, 1994.

TAMULSKI, T. S.; MORREAL, C. E.; DAO, T. L. Comparative Metabolism of 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene in Liver and Mammary Tissue. **Cancer Research**, v.33, p. 3117-3122, 1973.

TROMBINO, A. F.; NEAR, R. I.; MATULKA, R. A.; YANG, S.; HAFER, L. J.; TOSELLI, P.A.; KIM, D. W.; ROGERS, A. E.; SONENSHEIN, G. E.; SHERR, D. H. Expression of the aryl hydrocarbon receptor/transcription factor (AhR) and AhR-regulated CYP1 gene transcripts in a rat model of mammary tumorigenesis. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 63, p. 117–131, 2000.

WIJNHOFEN, S. W. P.; ZWART, E.; SPEKSNIJDER, E. N.; BEEMS, R. B.; OLIVE, K. P.; TUVESON, D. A.; JONKERS, J.; SCHAAP, M. M.; BERG, J.; JACKS, T.; STEEG, H.; VRIES, A. Mice Expressing a mammary gland-specific R270H Mutation in p53 tumor suppressor gene mimic human breast cancer development. **Cancer Research**, v.65, p.8166-8173, 2005.

WILLIS, R. A. **The Spread of tumors in the human body**. London: Butterworth & Co, 1952.