

# *Efeito do Hipotireoidismo no Tumor de Ehrlich Sólido em Camundongos Fêmeas Castradas e Não Castradas*

**artigo original**

## **RESUMO**

Foi estudado o efeito do hipotireoidismo, induzido pelo propiltiouracil (PTU), no tumor de Ehrlich sólido, implantado em camundongos fêmeas adultas castradas ou não. Foram utilizados 40 animais distribuídos em quatro grupos: hipotireóideo castrado, hipotireóideo não castrado, eutireóideo castrado e eutireóideo não castrado. Os animais receberam uma injeção de células neoplásicas no coxim plantar esquerdo. A curva de crescimento tumoral foi determinada por mensurações da pata inoculada durante 12 dias quando os animais foram necropsiados. A hipofunção tireoidiana reduziu o tamanho do tumor de Ehrlich nos animais castrados. Embora o crescimento neoplásico tenha sido menor, o diâmetro nuclear médio e o número de regiões organizadoras de nucléolos (NORs) e de mitoses/campo foram maiores. Conclui-se que o hipotireoidismo retarda o crescimento do tumor de Ehrlich sólido, sem alterar as características celulares de malignidade, que o efeito isolado da castração causa alterações discretas e que a associação hipotireoidismo-castração potencializa o retardo do crescimento do tumor de Ehrlich sólido. **(Arq Bras Endocrinol Metab 2004;48/6:867-874)**

**Descritores:** Camundongo; Tumor de Ehrlich; Hipotireoidismo; Castração

## **ABSTRACT**

### **Effect of Hypothyroidism on the Solid Form of the Ehrlich Tumor in Intact or Castrated Adult Female Mice.**

The effect of hypothyroidism on the solid form of the Ehrlich tumor in intact or castrated adult female mice was studied. Hypothyroidism was induced by treatment with propylthiouracil (PTU). Forty mice were divided into four groups: castrated hypothyroid, intact hypothyroid, castrated euthyroid, and intact euthyroid. The mice were inoculated with suspension cells into the left footpad. The tumor growth curve was determined by measuring the inoculated footpad during 12 days. At the end of the experimental period the mice were sacrificed. Hypothyroidism was associated with a reduction in size of the tumor only in the castrated animals. Although the neoplastic growth was lower, mean nuclear diameter, number of nucleolar organizer regions (NORs), and area of mitosis were higher. In conclusion, hypothyroidism resulted in a delayed growth of the tumor, but it did not affect the malignant features of the neoplastic cells. In addition, the isolated effect of castration caused only mild alterations, whereas hypothyroidism associated with castration resulted in a more prominent delay in the growth rate of the Ehrlich tumor. **(Arq Bras Endocrinol Metab 2004;48/6:867-874)**

*Alessandra Estrêla da Silva  
Rogéria Serakides  
Enio Ferreira  
Jáder R. Cappi Moraes  
Natália de Melo Ocarino  
Geovanni Dantas Cassali*

*Departamento de Clínica e  
Cirurgia Veterinárias, Setor de  
Patologia da Escola de  
Veterinária; e Laboratório de  
Patologia Comparada,  
Departamento de Patologia do  
Instituto de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Minas  
Gerais, Belo Horizonte, MG.*

*Recebido em 21/01/04  
Revisado em 10/03/04 e 09/06/04  
Aceito em 21/06/04*

**Keywords:** Mice; Ehrlich tumor; Hypothyroidism; Castration

DENTRE AS NEOPLASIAS, o câncer de mama é a mais freqüente em mulheres (1-4). Apesar de ser exaustivamente estudado, ainda é a principal causa de mortalidade por câncer em todo o mundo (5).

A etiologia do câncer de mama é multifatorial, com a participação de fatores genéticos (predisposição hereditária), ambientais (carcinógenos químicos), infecciosos (vírus), nutricionais (obesidade) e principalmente de fatores hormonais (2,3,6,7).

Atualmente, sabe-se que o estrógeno (8,9), a prolactina (10,11), a progesterona (7,12), os andrógenos (13,14) e até mesmo os hormônios tireoidianos (9,15,16) estão envolvidos na carcinogênese mamária por mecanismos ainda não totalmente elucidados (3).

A hipótese de que as disfunções tireoidianas participam da gênese do câncer de mama não é recente (17), mas ainda é controversa. Algumas evidências sugerem que o hipotireoidismo aumenta o risco de desenvolvimento do câncer de mama (1). Entretanto, há também relatos de que a indução de hipotireoidismo pelo propiltiouracil retarda o crescimento neoplásico e melhora o prognóstico do tratamento quimioterápico em modelos de câncer de próstata em camundongos (18).

A fim de elucidar os fatores envolvidos na gênese do câncer, vários pesquisadores estão utilizando os tumores experimentais transplantáveis no estudo da carcinogênese física, química, viral e hormonal. A vantagem do uso dessas neoplasias, em comparação às demais, recai sobre o conhecimento prévio da quantidade e das características iniciais das células tumorais a serem inoculadas e o desenvolvimento rápido da neoplasia que restringe o tempo de estudo (19-24).

O tumor de Ehrlich é primariamente um adenocarcinoma mamário do camundongo fêmea e, mesmo que seja indiferenciado, é possível que sofra as influências dos hormônios incriminados na gênese do câncer de mama, como estrógeno, prolactina, andrógenos e até mesmo dos hormônios tireoidianos. Tem sido utilizado como modelo no estudo da ação de componentes físicos, químicos e biológicos sobre o crescimento, patogênese, cinética, imunologia, bioquímica e terapêutica dos tumores (19-24). Apesar de existirem alguns trabalhos que sinalizam a ação dos esteróides sexuais no desenvolvimento desse tumor, não há relatos da ação dos hormônios

tireoidianos ou de sua associação com os hormônios sexuais no tumor de Ehrlich.

O objetivo principal deste trabalho foi estudar o efeito do hipotireoidismo, induzido pelo propiltiouracil (PTU) no tumor de Ehrlich sólido originário do adenocarcinoma mamário, implantado em camundongos fêmeas adultas castradas ou não.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 40 camundongos fêmeas da linhagem *Swiss* com três meses de idade, alojadas em caixas plásticas (10 animais/caixa), recebendo a mesma ração comercial e água *ad libitum*. Os camundongos foram submetidos a um regime de 12 horas de luz e 12 horas sem luz. Os animais foram distribuídos em quatro grupos de 10, onde dois grupos foram submetidos a ovariectomia bilateral e dois mantidos não castrados.

Dez dias após a ovariectomia, um grupo de animais castrados e outro de animais não castrados foram induzidos ao hipotireoidismo, compondo-se quatro tratamentos de acordo com o seguinte esquema: (1) hipotireóideo castrado, (2) hipotireóideo não castrado, (3) eutireóideo castrado e (4) eutireóideo não castrado.

Os animais foram induzidos ao hipotireoidismo mediante administração diária de propiltiouracil (PTU) na água de beber, na concentração de 1mg/ml. A indução do hipotireoidismo iniciou-se 30 dias antes da inoculação das células tumorais e foi mantida até o final do experimento. Os animais dos grupos eutireóideos receberam água destilada como placebo. A quantidade de PTU ingerida diariamente por cada animal dos grupos hipotireóideos foi estimada deduzindo-se a quantidade diária de água consumida da quantidade de água administrada, dividindo-se o valor encontrado pelo número de animais da caixa.

O preparo das células tumorais incluiu a lavagem, a contagem das células e o teste de viabilidade das mesmas. Foram retirados 3,0ml de fluido ascítico de um camundongo pré-inoculado a 8 dias com o tumor de Ehrlich na cavidade peritoneal. Esse fluido foi centrifugado até a obtenção de um líquido denso e claro, correspondente a uma suspensão celular com o mínimo de fibrina e hemácias. Seguiu-se, então, a contagem e o teste de viabilidade das células tumorais, sendo a viabilidade de 95%. A fórmula

para determinação do número de células viáveis foi deduzida segundo Guerra (25).

Todos os animais receberam uma injeção subcutânea de 0,05ml da suspensão celular, contendo  $2,5 \times 10^6$  células tumorais, entre os coxins plantares do membro posterior esquerdo, para obtenção do tumor na forma sólida, permanecendo 12 dias com esse tumor.

Para a avaliação da curva de crescimento tumoral, foram feitas mensurações mediante o uso de um micrômetro (Mitutoyo, mensuração 0,01mm, n° de série 7301) imediatamente antes e a cada dois dias após a inoculação do tumor, totalizando sete mensurações. Os animais foram pesados no início e no final da fase experimental.

Ao final do experimento, os animais foram sacrificados. Foram colhidos o coxim plantar para análise histomorfométrica do tumor, os linfonodos inguinais e poplíteos, baço, fígado, rins, pulmões e coração para estudo de metástases, e a tireóide para atestar o efeito do PTU sobre a morfologia da glândula. Em balança de precisão, foi determinado o peso da pata inoculada com o tumor e da pata contra-lateral, obtendo-se a diferença de peso entre as duas patas para cálculo do peso do tumor. O sucesso da ovariectomia foi confirmado à necropsia pela hipotrofia uterina e não detecção dos ovários ou fragmento deles.

Os tecidos foram fixados em formol neutro e tamponado com fosfato a 10% e processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Cortes histológicos de 4mm foram corados pelas técnicas da hematoxilina-eosina (26) para avaliação morfológica e morfométrica.

Em um corte histológico da pata inoculada, foram determinados a porcentagem das áreas de necrose, tecido neoplásico viável, inflamação, hemorragia, vasos, tecido normal e edema com auxílio de uma ocular micrométrica, contendo uma graticula com 25 pontos. O índice mitótico foi determinado em 15 campos representativos, e o diâmetro longitudinal e transversal de 30 núcleos das células neoplásicas, escolhidos aleatoriamente, foram

mensurados. Ao final, foi aplicado às médias um fator de correção obtido pela escala de uma lâmina micrométrica.

Com o objetivo de verificar o metabolismo das células neoplásicas, foi realizada a caracterização e a contagem do número de regiões organizadoras de nucléolo coradas pela prata (AgNORs), segundo a técnica descrita por Ploton e cols. (27), com modificações propostas por Aubele e cols. (28). Foram contadas as NORs presentes em 30 núcleos de células neoplásicas escolhidos aleatoriamente.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com quatro tratamentos e 10 repetições por tratamento, sendo cada animal uma repetição. As médias foram comparadas pelo teste Student-Newman-Kewls (SNK) (29).

## RESULTADOS

### Consumo de Propiltiouracil (PTU) e Morfologia da Tireóide

De acordo com o consumo de PTU estimado, os animais hipotireóides castrados e não castrados consumiram, em média, 2,05mg e 2,20mg de PTU/dia respectivamente, não havendo diferença significativa entre os grupos. A morfologia da tireóide dos animais hipotireóides, independente do estado funcional das gônadas, atestou o efeito do PTU, apresentando bócio adenomatoso.

### Peso dos Animais e Peso e Crescimento do Tumor de Ehrlich Sólido

No início do experimento não foi observada diferença entre as médias de peso corporal dos animais, mas ao final, embora os grupos hipotireóides tenham apresentado redução de peso corporal, essa diminuição somente foi significativa no grupo hipotireóide castrado, provavelmente como consequência do hipotireoidismo. Os

**Tabela 1.** Resultado do peso corporal, do peso das patas e do tumor em camundongos fêmeas hipotireóides e eutireóides castradas e não castradas com tumor de Ehrlich sólido.

Variável	Grupo			
	Hipotireóide		Eutireóide	
	Castrado (n= 10)	Não castrado (n= 10)	Castrado (n= 10)	Não castrado (n= 10)
Peso do animal (g) (antes da castração)	27,76 ± 2,59 a	27,95 ± 2,85 a	27,44 ± 2,66 a	29,84 ± 2,88 a
Peso do animal (g) (final do experimento)	26,30 ± 2,36 b	26,91 ± 3,25 a	28,20 ± 2,37 a	29,95 ± 3,21 a
Peso da pata direita (g)	0,82 ± 0,10 b	0,81 ± 0,08 b	0,88 ± 0,07 ab	0,94 ± 0,07 a
Peso da pata esquerda (g) (inoculada)	1,04 ± 0,12 b	1,14 ± 0,14 a	1,25 ± 0,19 a	1,30 ± 0,18 a
Peso do tumor (g)	0,23 ± 0,11 a	0,33 ± 0,14 a	0,37 ± 0,19 a	0,37 ± 0,16 a

\* Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem significativamente entre si ( $p > 0,05$ ).

\*\* As médias e desvios-padrão dos pesos das patas e do tumor foram tomados 12 dias após a inoculação do tumor.

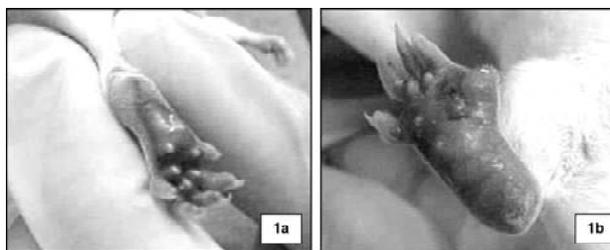
resultados do peso das patas e do peso do tumor estão sumariados na tabela 1.

Antes da inoculação das células tumorais, não havia diferença significativa no tamanho das patas entre os grupos estudados. No entanto, a partir do segundo dia após a inoculação, já era possível observar diferenças significativas entre os grupos, que foram tornando-se cada vez mais nítidas, principalmente na associação hipotireoidismo-castração. O crescimento tumoral no grupo hipotireóide castrado foi significativamente menor já no segundo dia, repetindo-se no quarto dia. No sexto dia, o grupo hipotireóide castrado ainda manteve o menor crescimento em relação aos demais, e o grupo hipotireóide não castrado apresentou diminuição significativa do crescimento tumoral, mas curiosamente essa redução não se manteve nos dias subseqüentes da análise, quando somente o grupo hipotireóide castrado continuou apresentando redução significativa do crescimento do tumor (tabela 2 e figura 1).

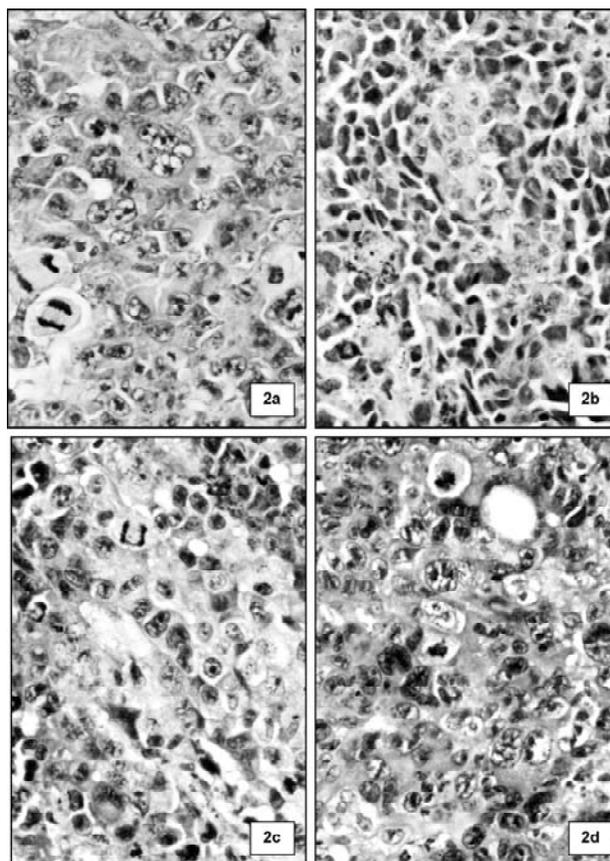
### Morfologia e Histomorfometria do Tumor de Ehrlich Sólido

Independente do grupo, a neoplasia localizava-se na derme e invadia a musculatura, o tecido ósseo e a medula óssea. Extensas áreas de necrose e hemorragia foram observadas no grupo eutireóide não castrado e em menor extensão nos demais grupos, como confirmado pela morfometria (tabela 3). As células neoplásicas, com exceção do grupo hipotireóide não castrado, apresentavam-se arranjadas predominantemente em padrão sólido, às vezes formando cordões, intensamente pleomórficas, grandes, com citoplasma abundante, fracamente basofílico, em sua maioria vacuolizado e sem bordas definidas. Os núcleos apresentavam-se hipocromáticos, grandes, variando de ovais a alongados, alguns apresentando reentrância do envelope nuclear, com nucléolos evidentes e múltiplos, variando de um a quatro nucléolos, sendo vários deles macronúcleolos (figuras 2a, 2c e 2d). O índice mitótico foi maior no grupo hipotireóide castrado, com muitas figuras de mitose, várias atípicas. O grupo hipotireóide não castrado apresentou dois padrões celulares distintos, o primeiro semelhante aos demais grupos, e o segundo caracterizado por células menores, fusiformes, pleomórficas, com citoplasma fortemente basofílico, variando de moderado a escasso sem bordas definidas, núcleos hipercromáticos e sem evidência de nucléolos (figura 2b).

O processo inflamatório era constituído predominantemente por linfócitos e macrófagos e em menor número por eosinófilos e basófilos situados adjacentes à epiderme. A intensidade da inflamação variou de discreta



**Figura 1.** Camundongo fêmea, tumor de Ehrlich sólido. a) Tumor de Ehrlich no animal hipotireóide castrado 12 dias após a inoculação das células neoplásicas no coxim plantar. b) Tumor de Ehrlich no animal eutireóide não castrado (controle) 12 dias após a inoculação das células neoplásicas no coxim plantar.



**Figura 2.** Camundongo fêmea, tumor de Ehrlich sólido. HE, 643x. a, c e d) Grupos eutireóide intacto, eutireóide castrado e hipotireóide castrado respectivamente. Células neoplásicas arranjadas predominantemente em padrão sólido, intensamente pleomórficas, grandes, com citoplasma abundante, fracamente basofílico, em sua maioria vacuolizado e sem bordas definidas, núcleos hipocromáticos, grandes, variando de ovais a alongados, com nucléolos evidentes e múltiplos. b) grupo hipotireóide não castrado apresentando dois padrões celulares distintos, o primeiro semelhante aos demais grupos e o segundo caracterizado por células menores, fusiformes, pleomórficas, com citoplasma fortemente basofílico, variando de moderado a escasso sem bordas definidas, núcleos hipercromáticos e sem evidência de nucléolos.

**Tabela 2.** Medidas do crescimento (mm) do tumor de Ehrlich sólido do dia 0 ao dia 12 em camundongos fêmeas hipotireóideas e eutireóideas castradas e não castradas.

Período	Grupo			
	Hipotireóideo		Eutireóideo	
	Castrado (n= 10)	Não castrado (n= 10)	Castrado (n= 10)	Não castrado (n= 10)
Dia 0 pré-inoculação	2,15 ± 0,09 a	2,22 ± 0,09 a	2,17 ± 0,08 a	2,18 ± 0,08 a
Dia 2 pós-inoculação	2,81 ± 0,24 b	3,04 ± 0,30 a	3,11 ± 0,19 a	3,13 ± 0,34 a
Dia 4 pós-inoculação	3,61 ± 0,21 b	3,99 ± 0,31 a	4,06 ± 0,23 a	4,15 ± 0,19 a
Dia 6 pós-inoculação	4,08 ± 0,24 c	4,50 ± 0,29 b	4,73 ± 0,32 ab	4,80 ± 0,19 a
Dia 8 pós-inoculação	4,45 ± 0,25 b	4,93 ± 0,27 a	4,87 ± 0,33 a	5,10 ± 0,27 a
Dia 10 pós-inoculação	4,72 ± 0,34 b	5,25 ± 0,23 a	5,17 ± 0,35 a	5,43 ± 0,40 a
Dia 12 pós-inoculação	4,94 ± 0,44 b	5,65 ± 0,28 a	5,49 ± 0,40 a	5,85 ± 0,35 a

\* Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem significativamente entre si ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 3.** Valores das variáveis morfométricas do tumor de Ehrlich sólido em camundongos fêmeas hipotireóideas e eutireóideas castradas e não castradas.

Variável	Grupo			
	Hipotireóideo		Eutireóideo	
	Castrado (n= 10)	Não castrado (n= 10)	Castrado (n= 10)	Não castrado (n= 10)
Necrose (%)	35,39 ± 8,44 b	32,68 ± 8,55 b	43,12 ± 9,18 b	53,07 ± 13,32 a
Neoplasia (%)	46,39 ± 6,67 a	48,48 ± 9,56 a	35,08 ± 9,19 b	28,63 ± 17,40 b
Inflamação (%)	7,04 ± 2,54 ab	5,32 ± 1,56 bc	9,11 ± 2,81 a	3,98 ± 2,83 c
Hemorragia (%)	2,73 ± 1,55 b	4,52 ± 1,39 a	4,81 ± 3,77 a	7,51 ± 4,07 a
Vaso (%)	3,11 ± 1,24 a	2,11 ± 0,87 a	2,46 ± 1,18 a	1,28 ± 0,96 b
Tecido normal (%)	3,68 ± 2,36 a	4,13 ± 2,36 a	3,88 ± 1,21 a	3,46 ± 2,38 a
Edema (%)	1,65 ± 1,83 a	2,77 ± 2,02 a	1,53 ± 1,07 a	1,06 ± 0,62 a

\* Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem significativamente entre si ( $p > 0,05$ ).

\*\* As médias e desvios-padrão foram tomados 12 dias após a inoculação do tumor.

**Tabela 4.** Valores do diâmetro nuclear médio ( $\mu\text{m}$ ), do número de regiões organizadoras de nucléolos (NORs) e do número de mitoses/campo no tumor de Ehrlich sólido em camundongos fêmeas hipotireóideas e eutireóideas castradas e não castradas.

Variável	Grupo			
	Hipotireóideo		Eutireóideo	
	Castrado (n= 10)	Não castrado (n= 10)	Castrado (n= 10)	Não castrado (n= 10)
Diâmetro nuclear médio ( $\mu\text{m}$ )	13,35 ± 2,51 a	11,08 ± 0,84 b	11,11 ± 1,08 b	11,10 ± 1,57 b
Nº de NORs	23,76 ± 1,75 a	20,58 ± 2,72 b	21,66 ± 1,81 b	19,80 ± 2,67 b
Nº de mitose/campo	2,53 ± 0,65 a	1,46 ± 0,73 b	1,91 ± 0,78 a b	1,49 ± 0,72 b

\* Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem significativamente entre si ( $p > 0,05$ ).

\*\* As médias e desvios-padrão foram tomados 12 dias após a inoculação do tumor.

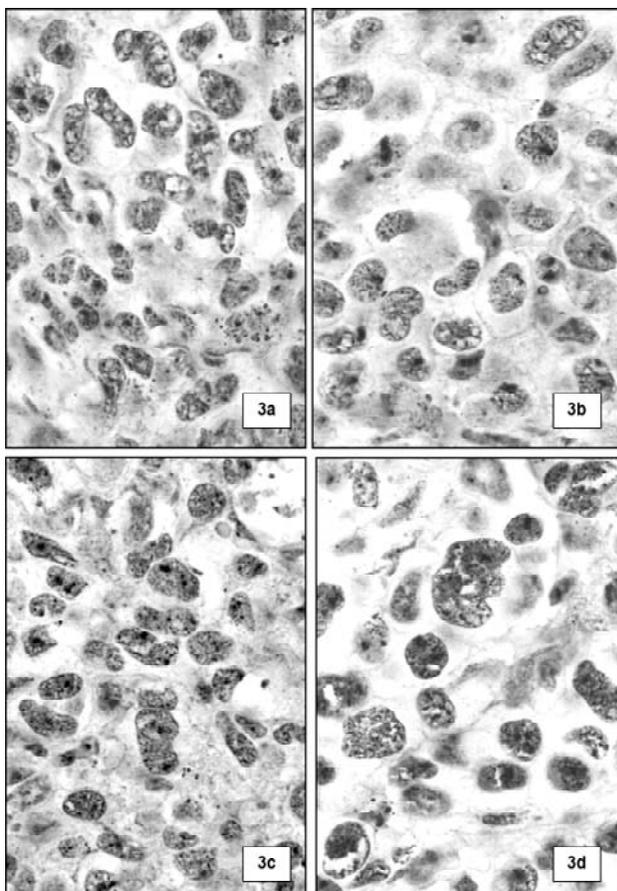
a moderada, com maior intensidade nos grupos castrados, independente do estado funcional da tireóide (tabela 3).

Os resultados obtidos pela análise morfométrica reafirmaram os achados da morfologia. As áreas de necrose e hemorragia estavam presentes numa extensão significativamente maior nos grupos eutireóideos (tabela 3), independente do estado funcional das gônadas. Apesar do menor crescimento neoplásico na associação hipotireoidismo-castração, as características celulares, como diâmetro nuclear médio, número de NORs e de mitoses/campo, foram significativamente maiores em relação aos demais grupos (tabela 4) (figuras 3a, 3b, 3c e 3d). Em relação à morfologia das regiões organizadoras de nucléolo, não havia diferenças aparentes entre grupos. As NORs variavam de pequenas a médias e não estavam arranjadas em um padrão único, apresentando

distribuição difusa, algumas poucas isoladas, outras com distribuição em cordão, formando arranjo ao redor do núcleo e nucléolo ou com pequenas e médias NORs no centro do nucléolo.

### Metástases do Tumor de Ehrlich Sólido

Não foram observadas metástases em nenhum dos órgãos torácicos e abdominais analisados. Entretanto, os linfonodos poplíteo e inguinal, em todos os grupos, apresentavam células neoplásicas organizadas em cordões ou em pequenos ninhos e situadas, principalmente, no seio subcapsular. O linfonodo poplíteo esquerdo apresentou maior frequência de metástases em comparação aos linfonodos inguinais, mas não houve diferença na frequência de metástase entre os grupos estudados. Além disso, aparentemente as metástases no linfonodo poplíteo esquerdo, do lado



**Figura 3.** Camundongo fêmea, tumor de Ehrlich sólido. Coloração de AgNOR, 1607x. a, b e c) Grupos eutireóideo não castrado, hipotireóideo não castrado e eutireóideo castrado respectivamente. Regiões organizadoras de nucléolo (NORs) coradas em preto pequenas, difusas, algumas poucas isoladas, outras com distribuição em cordão, formando arranjo ao redor do núcleo e nucléolo ou no centro do nucléolo. d) Grupo hipotireóideo castrado. Diâmetro nuclear grande com número de NORs maior em comparação aos demais grupos.

da pata inoculada, foram mais extensas em comparação ao linfonodo poplíteo direito.

### DISCUSSÃO

O estado hipotireóideo dos animais tratados com PTU foi confirmado pelo estudo da morfologia da tireóide, uma vez que essa tem sido descrita por vários autores como bom indicador do uso de drogas antitireoidianas (30). O aspecto de bócio adenomatoso da glândula confirmou a ação da droga na indução do hipotireoidismo. A dosagem de tiroxina não foi possível, já que o volume sanguíneo e plasmático obtido foi pequeno e insuficiente em função da anemia presente nos animais decorrente do hipotireoidismo (dados não demonstrados).

A redução do peso corporal dos animais hipotireóideos era esperada, tendo em vista que os hormônios tireoidianos são necessários para a manutenção do metabolismo geral do organismo, havendo, na hipofunção tireoidiana, aumento do catabolismo protéico com conseqüente redução da massa muscular, da síntese de proteínas, vitaminas e dos fatores de crescimento e diminuição da absorção intestinal dos carboidratos. A obesidade, um dos sinais clínicos de hipotireoidismo no homem e nos animais, deve-se ao acúmulo de mucopolissacarídeos hidrofílicos no subcutâneo, associado à diminuição do metabolismo lipídico e principalmente ao estado letárgico que induz ao sedentarismo (31,32), sendo observada mais freqüentemente no hipotireoidismo crônico (33).

Pela análise do peso da pata direita (não inoculada com o tumor), foi observada redução significativa nos grupos hipotireóideos, reafirmando o efeito do hipotireoidismo na redução das massas musculares. Essa mesma redução seria esperada na pata esquerda, o que implica numa segunda variável que coloca em dúvida os resultados do peso do tumor e compromete a avaliação do crescimento tumoral com base nesse parâmetro. Isso é confirmado pelos resultados, que não demonstraram redução significativa do peso do tumor entre os grupos estudados, apesar da nítida redução do crescimento tumoral no grupo hipotireóideo castrado já visualizada à inspeção e confirmada pela mensuração. Vários trabalhos utilizaram o peso como parâmetro para avaliação do crescimento tumoral (13,34), a partir da mesma técnica utilizada aqui. Entretanto, neste experimento em especial, devido aos efeitos sistêmicos do hipotireoidismo, a mensuração demonstrou ser o parâmetro mais adequado e confiável, tendo em vista que o peso do tumor não apresentou diferença entre os grupos, apesar da nítida redução do crescimento tumoral no grupo hipotireóideo castrado visualizada à inspeção e confirmada pela mensuração.

Ao contrário da análise do crescimento tumoral, a análise histológica e morfométrica permitiram evidenciar alterações não somente na associação hipotireoidismo-castração, mas também nos demais grupos, embora fossem menos significativas. Os grupos hipotireóideos apresentaram maior porcentagem de tecido neoplásico viável. Isso quer dizer que, apesar do grupo hipotireóideo intacto apresentar menor crescimento, a extensão do tecido neoplásico viável era maior em comparação às áreas de necrose, ao contrário dos grupos eutireóideos que apresentavam maior crescimento e supremacia das áreas de necrose frente ao tecido neoplásico viável.

A quantificação das regiões organizadoras de nucléolos (NORs) tem sido amplamente utilizada

como indicadora da proliferação celular, apresentando valor diagnóstico e prognóstico em patologia tumoral (35), uma vez que sua frequência no núcleo tem sido significativamente maior em células neoplásicas malignas do que em células normais, reativas, ou neoplásicas benignas (36). Intrigante é que, exatamente no grupo hipotireóide castrado, que apresentou menor crescimento tumoral, as características celulares eram de elevado potencial maligno, reafirmadas pela correlação negativa e significativa do tamanho do tumor com o número de NORs, de mitose e com o diâmetro nuclear.

O processo inflamatório foi mais intenso nas neoplasias dos grupos castrados, particularmente do grupo eutireóide castrado, o que não surpreende, tendo em vista que a linfopoese normal é regulada pelos hormônios sexuais (37,38). O estrógeno age como supressor da diferenciação e proliferação das células linfoblásticas, impedindo a passagem dessas células da fase G0 para a fase G1 e também da fase G1 para a fase S, além de inibir a atividade da timidina, necessária na replicação do DNA (37). Na castração, ocorre aumento da linfopoese provavelmente pela liberação da interleucina-7, que induz a proliferação e diferenciação dos precursores das células hematopóéticas, inclusive de linfócitos (37,38).

Os três mecanismos geralmente envolvidos na supressão da carcinogênese são a parada do ciclo celular com conseqüente diminuição da taxa de proliferação e a indução de necrose e de apoptose. No grupo eutireóide castrado, seria esperado que a redução da porcentagem das áreas de necrose aumentasse a porcentagem de tecido neoplásico viável, o que não ocorreu. Haveria, então, aumento da taxa de apoptose das células neoplásicas induzido pela resposta inflamatória estimulada pela castração? Essa é uma questão levantada com os resultados apresentados. Sabe-se que os linfócitos T citotóxicos induzem apoptose por dois mecanismos: indiretamente pela interação receptor-ligante (Fas-Fas ligante) na membrana plasmática que desencadeia sinais intracelulares para ativação da morte celular programada, e diretamente pela produção da serina-protease *granzima B*, enzima capaz de ativar uma variedade de caspases. Os linfócitos T citotóxicos reconhecem antígenos estranhos apresentados na superfície das células neoplásicas. Ao reconhecimento, expressam ligante de Fas nas suas superfícies e destroem as células alvo por ligação aos receptores Fas presentes na membrana plasmática dessas células (33).

A associação hipotireoidismo-castração potencializou o retardo do crescimento neoplásico, mas manteve

as características celulares que indicam elevado potencial proliferativo e de malignidade, o que permitiu concluir que o hipotireoidismo retarda o crescimento tumoral sem reduzir a malignidade das células. É provável que o aumento da resposta inflamatória, induzido pela castração também no estado hipotireóide, tenha contribuído para potencializar a redução da velocidade do crescimento tumoral.

A semelhança do que foi observado neste estudo, metástases do tumor de Ehrlich são raras (39), com exceção dos linfonodos regionais, pois, nesses órgãos, ocorre disseminação linfática espontânea das células do tumor de Ehrlich sólido ou ascítico, por mecanismos ainda pouco elucidados (40).

Em síntese, o hipotireoidismo, independente do estado funcional das gônadas, retarda o crescimento do tumor de Ehrlich sólido sem alterar as características celulares de malignidade. A castração aumenta a resposta inflamatória e reduz a porcentagem das áreas de necrose do tumor de Ehrlich sólido no estado eutireóide. A associação hipotireoidismo-castração potencializa o retardo do crescimento do tumor de Ehrlich sólido. O tumor de Ehrlich demonstrou ser um bom modelo para o estudo do efeito do hipotireoidismo e da castração no câncer, podendo também ser cogitada a sua utilização futura como modelo para o estudo do câncer de mama humano, partindo da premissa de que se trata de um adenocarcinoma de mama. Para tanto, são necessários mais estudos testando a ação de outros hormônios envolvidos na carcinogênese mamária e comparando os resultados com os do câncer de mama da mulher, particularmente daqueles indiferenciados e semelhantes ao tumor de Ehrlich.

## REFERÊNCIAS

1. Weiss HA, Brinton LA, Potischman NA, Brogan D, Coates RJ, Gammon MD, et al. Breast cancer risk in young women and history of selected medical conditions. **Int J Epidemiol** 1999;28:816-23.
2. Persson I. Estrogens in the causation of breast, endometrial and ovarian cancers - evidence and hypotheses from epidemiological findings. **J Steroid Biochem Mol Biol** 2000;74:357-64.
3. Henderson BE, Feigelson HS. Hormonal carcinogenesis. **Carcinogenesis** 2000;21:427-33.
4. Ingvarsson S. Breast cancer: introduction. **Cancer Biol** 2001;11:323-6.
5. Henderson BE, Ross RK. Prevention of hormone-related cancers: a delicate balance. **Helix Amgen's Magaz of Biotech** 1996;1:5-11.
6. Huggins C. Endocrine-induced regression of cancers. **Science** 1967;156:1050-4.

7. Vorherr H. Endocrinology of breast cancer. **Maturitas** 1987;9:113-22.
8. Henderson BE, Ross RK, Bernstein L. Estrogens as a cause of human cancer. **Cancer Res** 1988;48:246-53.
9. Carreño MSR, Peixoto S, Giglio A. Reposição hormonal e câncer de mama. **Rev Soc Bras Canc** 1999;7:41-50.
10. Clevenger CV, Plank TL. Prolactin as an autocrine/paracrine factor in breast cancer. **J Mammary Gland Biol Neopl** 1997;2:59-68.
11. Llovera M, Touraine P, Kelly PA, Goffin V. Involvement of prolactin in breast cancer: redefining the molecular targets. **Experimental Gerontol** 2000;35:41-51.
12. King RJA. A discussion of the roles of estrogen and progesterin in human mammary carcinogenesis. **J Steroid Biochem Molec Biol** 1991;39:811-9.
13. Kodama M, Kodama T. Effects of steroid hormones on the *in vivo* incorporation of glycine-<sup>214</sup>C into solid Ehrlich tumor, kidney, and liver. **Cancer Res** 1970;30:228-35.
14. Langer M, Kubista E, Schemper M, Spona J. Androgen receptors, serum androgen levels and survival of breast cancer patients. **Arch Gynecol Obstet** 1990;247:203-9.
15. Nogueira CR, Brentani MM. Triiodothyronine mimics the effects of estrogen in breast cancer cell lines. **J Steroid Biochem Mol Biol** 1996;59:271-9.
16. Kostoglou-Athanassiou I, Ntalles K, Markopoulos C, Athanassiou P, Gogas J, Proukakis C. Thyroid function in postmenopausal women with breast cancer on tamoxifen. **Eur J Gynec Oncol** 1998;19:150-4.
17. Vorherr H. Thyroid disease in relation to breast cancer. **Klin Wochenschr** 1978;56:1139-45.
18. Theodossiou C, Schwarzenberger P. Propylthiouracil reduces xenograft tumor growth in an athymic nude mouse prostate cancer model. **Am J Med Sci** 2000;319:96-9.
19. Palermo-Neto J, Massoco CO, Souza WR. Effects of physical and psychological stressors on behaviour, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Brain Behavior and Immunity** 2003;17:43-54.
20. Segura JA, Barbero LG, Márquez J. Ehrlich ascites tumour unbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B stimulation. **Immunol Lett** 2000;74:111-5.
21. Mady EA. Antitumor and biochemical effects of *Echis coloratus* Crude venom on Ehrlich Ascite Carcinoma cells *in vivo*. **J Venon Anim Toxins** 2002;8:283-96.
22. Oloris SCS, Dagli MLZ, Guerra JL. Effect of b-carotene on the development of the solid Ehrlich tumor in mice. **Life Sci** 2002;71:717-24.
23. Yoneda K, Yamamoto T, Ueta E, Osaki T. The inhibitory action of BOF-A2, a 5-fluorouracil derivative, on squamous cell carcinoma. **Cancer Lett** 1999;137:17-25.
24. Valadares MC, Queiroz MLS. The effect of a titanocene dichloride derivative, Ti IV (C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>NCS<sub>2</sub> on the hematopoietic response of Ehrlich tumour-bearing mice. **Eur J Pharmacol** 2002;439:35-42.
25. Guerra JL. Aspectos do processo inflamatório em camundongos portadores do tumor de Ehrlich. **Fitoterapia** 2002;73:730-3.
26. Luna LG. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. New York: McGraw Hill; 1968.
27. Ploton D, Menager M, Jeannesson P. Improvement in the staining and the visualization of the argyrophilic proteins of nucleolar organizer regions at the optical level. **Histochem J** 1986;18:5-14.
28. Aubele M, Biesterfeld S, Derenzini M. Guidelines of AgNOR quantitation. **Zentralblatt für Pathol** 1994;140:107-8.
29. Sampaio IBM. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2002.
30. Serakides R, Nunes VA, Santos RL, Cassali GD, Costa Neto PP. Histomorphometry and quantification of nucleolar organizer region (NORs) in bovine thyroid containing methylthiouracil residues. **Vet Pathol** 1999;36:574-82.
31. Feldman EC, Nelson RW. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1987.
32. Larsen PR, Ingbar SH. The thyroid gland. In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM. **William's Textbook of Endocrinology**. 9<sup>th</sup> ed. Philadelphia: W.B Saunders, 1998. p. 357-487.
33. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
34. Kodama M. Enhancing effect of hydrocortisone on hematogenous metastasis of Ehrlich ascite tumor in mice. **Cancer Res** 1975;35:1015-21.
35. Crocker J, Boldy DAR, Egan MJ. How should we count AgNORs? Proposal for a standardized approach. **J Pathol** 1989;158:185-8.
36. Trere D. AgNOR staining and quantification. **Micron** 2000;31:127-31.
37. McKenzie CE, Betezi I. Estrogen dependent suppression of mitogen response in rat lymphocytes. **Acta Endocrinol** 1987;116:200-4.
38. Smithson G, Beamer WG, Shultz KL, Christianson SW, Shultz LD, Kincade PW. Increased B lymphopoiesis in genetically sex steroid-deficient hypogonadal (hpg) mice. **J Exp Med** 1994;180:717-20.
39. Kiseleva MS, Magamadov YC. Hematogenous dissemination of tumor cells and metastases formation in Ehrlich ascites tumor. **Neoplasia** 1972;19:257.
40. Dagli MLZ, Guerra JL, Saldiva PHN. An experimental study on the lymphatic dissemination of the solid Ehrlich tumor in mice. **Braz J Vet Res Anim Sci** 1992;29:97-103.

**Endereço para correspondência:**

Rogéria Serakides  
Señor de Patologia  
Depto. de Clínica e Cirurgia Veterinárias da UFMG  
Av. Antônio Carlos 6627  
Caixa Postal 567  
31270-901 Belo Horizonte, MG  
Fax: (31) 3499-2230  
E-mail: serakide@dedalus.lcc.ufmg.br