



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA- UnICEUB
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

JENNIFER YUMIE SONOBE HABLE

HELOISA LIMA HELLER

A TALIDOMIDA COMO AGENTE ANTIANGIOGÊNICO NO CÂNCER DE MAMA

BRASÍLIA

2020



JENNIFER YUMIE SONOBE HABLE

HELOISA LIMA HELLER

A TALIDOMIDA COMO AGENTE ANTIANGIOGÊNICO NO CÂNCER DE MAMA

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e Pesquisa.

Orientação: Luciana Ramalho de Farias

BRASÍLIA

2020

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a professora Luciana Ramalho de Farias pela atenção e preocupação com suas alunas. Somos gratas também ao departamento de pesquisa do UniCEUB, pelo apoio e por possibilitar todas as atividades do programa de iniciação científica.

Muito obrigada também ao laboratório de microscopia localizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília que nos recebeu e permitiu o nosso trabalho.

RESUMO

O câncer é considerado o mal do século, segundo a OMS, sendo o de mama o mais letal entre as mulheres. Diferenças metabólicas, em comparação com as células saudáveis, favorecem o desenvolvimento e a sobrevivência das células cancerígenas. Neste contexto, para o desenvolvimento do tumor, há um aumento de fatores de crescimento e consequente angiogênese, que é a formação vascular a partir de vasos pré-existentes. Dessa maneira, uma forma de suprimir este crescimento das células malignas é diminuir a quantidade de nutrientes disponíveis, por meio do bloqueio da angiogênese. Evidências sugerem que a Talidomida possui propriedades antiproliferativas, antiangiogênicas e redutoras do TNF α . Dessa forma, compreender melhor o comportamento desse fenômeno em células cancerígenas sob tratamento pode contribuir para o desenvolvimento de novos métodos adjuvantes, o que possibilita melhorar a terapia e prognóstico de pacientes com câncer de mama. Para realização do projeto, foram cultivadas células da linhagem MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamário humano) em meio L-15 (Leibovitz Medium) suplementado com solução antibiótica e soro fetal bovino. Em seguida, seria realizado o teste de viabilidade com concentrações distintas de Talidomida e um grupo controle para determinação da citotoxicidade da droga, pelo ensaio padrão por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT). Posteriormente, cerca de 7×10^5 células por poço seriam plaqueadas e após 24h de incubação, metade das amostras receberiam tratamento com Talidomida, nas concentrações significativas determinadas após a análise de viabilidade celular, enquanto a outra metade formaria o grupo controle. Por fim, seria realizado a extração de RNA e síntese de DNA destas células, para análise da expressão gênica, através do experimento de qPCR em tempo real. Infelizmente não foi possível realizar a pesquisa devido às limitações da pandemia do COVID-19.

Palavras-Chave: Câncer de Mama. Talidomida. Angiogênese.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	8
3. MÉTODO	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	16
6. REFERÊNCIAS	17

1. INTRODUÇÃO

Na proliferação celular, mecanismos de gestão e controle possibilitam que o processo ocorra de forma sustentável. Entretanto, falhas em diversos mecanismos podem ter como consequência o câncer. Nesse sentido, o progressivo acúmulo de uma massa de células advindas de um processo replicativo e excessivo não compensado pela perda celular apropriada é caracterizado como câncer (CASCIATO D. A., 2008).

O câncer é considerado o mal do século, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) e ocasiona gastos mundialmente, cerca de 1,16 bilhões de dólares só no ano de 2010, enquanto a taxa de mortalidade atribuída à doença foi de 8,8 milhões de pessoas no mundo em 2015. No Brasil, o câncer mais letal entre as mulheres é o de mama e corresponde a cerca de 29,5% dos casos novos anualmente (INCA, 2018).

Neste contexto, as células se tornam malignas devido a ocorrência de mutações genéticas que têm como consequência o aumento da sobrevivência e reprodução celular (JACQUELINE C. et al, 2017). Existem fatores de risco associados à doença, entre eles os genes BRCA1 e BRCA2 que estão relacionados ao aparecimento do câncer de mama aumentando em até 80% o risco do seu desenvolvimento (LOPES A. et al, 2013), e as alterações em genes supressores de tumor (eg. TP53, PTEN) que provocam a perda dos seus fatores protetivos, e assim, aumentam em até 50% as chances de desenvolvimento desse tipo de câncer (CASCIATO D. A., 2008).

Além disso, para o tumor se desenvolver, é necessário nutrientes e oxigênio, dessa forma, há um aumento de fatores de crescimento e consequente angiogênese, que é o formação vascular a partir de vasos pré-existentes. Uma forma de suprimir este crescimento das células malignas é diminuir a quantidade de nutrientes disponíveis, por meio do bloqueio da angiogênese (PAPETTI M. et HERMAN I. M., 2002).

O tratamento do câncer de mama exige uma série de análises que leva em consideração o estadiamento da doença. Cirurgia e quimio/radioterapia são os métodos mais utilizados nos tratamentos dos pacientes, porém, a diversidade trazida por essas abordagens tem impulsionado as buscas por inovações terapêuticas contra o câncer de mama. Dessa forma, o interesse dos efeitos da Talidomida sobre o desenvolvimento, tratamento e progressão do câncer de mama tem aumentado de forma considerável devido

a estudos que demonstraram propriedades antiproliferativas, antiangiogênicas e redutoras do TNF α (LACOPETTA D. et al. 2017). Porém, embora os resultados com a Talidomida sejam promissores, algumas questões ainda precisam ser elucidadas para melhor esclarecer se as vias influenciadas pelo uso dessa droga são favoráveis ou não ao uso terapêutico da mesma, no tratamento do câncer de mama.

Dessa maneira, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) em células de câncer de mama submetidas ao tratamento com Talidomida, *in vitro*. Através do cultivo da linhagem de células de câncer de mama MDA-MB-231, análise da viabilidade das células após o tratamento com Talidomida; determinação dos níveis de VEGF nas células após o tratamento com Talidomida e comparação da expressão gênica relacionada à VEGF em células de câncer de mama e controle após o tratamento com Talidomida.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Câncer de Mama

O câncer de mama é o tipo de câncer mais comum em mulheres, responsável por cerca de 29% dos cânceres diagnosticados por ano (CASCIATO D. A., 2008).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, os tumores malignos de mama podem ser classificados em epiteliais não invasivos, epiteliais invasivos, mistos epiteliais mesenquimais e tumores malignos diversos. Os tumores não invasivos são classificados dessa forma por respeitarem a membrana basal epitelial.

Menarca precoce, antes dos 12 anos de idade, primeira gravidez tardia, após 28 anos de idade, nulipariedade, menopausa tardia, ganho significativo de peso na vida adulta, uso estendido de contraceptivos orais, histórico familiar, tempo prolongado de terapias com reposição hormonal são alguns fatores associados ao aumento de risco do desenvolvimento do câncer de mama (EVANS D. et LALLO F., 2002).

Há algumas comprovações que mulheres com câncer de mama herdado possuem um prognóstico pior que em uma população controle (FOULKES W. et al, 1997). Assim, o fator hereditário é um dos aspectos de risco mais importantes a ser considerado para o desenvolvimento de câncer de mama. Exceto em casos raros como a síndrome de Cowden, não há pistas fenotípicas que ajudem a identificar as pessoas que possuem mutações patológicas (EVANS D. et LALLO F., 2002).

Evidências sugerem que há várias mutações genéticas envolvidas na predisposição a câncer de mama (NAROD S. A. et al, 1995). Entretanto, as mais comuns são alterações nos genes BRCA-1 e BRCA-2 (EVANS D. et LALLO F., 2002). Indivíduos com mutações nos genes BRCA-1 e BRCA-2 possuem o câncer de mama como a neoplasia maligna mais comum e apresentam, assim, um risco de morte entre 46% a 87% (PETRUCELLI N. et al, 2016).

O gene BRCA-1, localizado no braço longo do cromossomo 17, aparentemente é responsável pela supressão da sinalização a partir do receptor de estrógeno nas células epiteliais mamárias. Mais de 500 mutações podem ocorrer nesse gene e são herdadas como um fator autossômico dominante, de penetrância variável. As mulheres que apresentam mutação em BRCA-1 têm chances de 50% a 85% de desenvolverem o câncer de mama. Os tumores de mama que possuem esta mutação tendem a se apresentar como negativo para o receptor de estrógeno (ER-) (CASCIATO D. A., 2008).

O gene BRCA-2, localizado no cromossomo 13, assim como o gene BRCA-1, é um gene supressor de tumor, porém possui uma complexidade maior que o gene BRCA-1. As alterações nesse gene aumentam o risco de desenvolvimento de melanoma, câncer de mama, de ovários e de pâncreas e, majoritariamente, ocorre em idades mais avançadas do que os que têm mutações no gene BRCA-1. O tumor com esta mutação em mulheres com câncer de mama tende a se apresentar como positivos para o receptor de estrógeno (ER+) (CASCIATO D. A., 2008).

De acordo com as diretrizes da *National Comprehensive Cancer Network*, é aconselhável as mulheres com alterações nos genes BRCA-1 e BRCA-2 considerarem a mastectomia bilateral como um tratamento cirúrgico primário para o câncer de mama, devido à sua elevada taxa de câncer de mama ipsilateral e contralateral.

Em relação a outras formas de tratamento, a imunoterapia baseada em inibidores de ponto de verificação combinada com a quimioterapia é considerada como um campo promissor para o câncer de mama. O receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) e CDK4/6 são dois alvos biológicos mais importantes para o câncer de mama. Dessa forma, os tratamentos anti-HER2 e inibidores de CDK4/6 aumentam a resposta objetiva e a sobrevivência livre de progressão (HU X. et al, 2017).

2.2 Angiogênese

A angiogênese, formação de vasos sanguíneos nascentes de vasculatura preexistente, é um evento fundamental no processo de crescimento celular. No entanto, este processo fisiológico pode ser dominado por células tumorais, mediando metástases à distância ou disseminação (BERGERS G. et BENJAMIN L. E., 2003).

Desde o estágio inicial da tumorigênese, as células tumorais produzem um grande número de fatores pró-angiogênicos, como o VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular), para formar uma rede nascente de vasos que subsequentemente penetra profundamente no tumor (CARMELIET P., 2011).

O VEGF é uma glicoproteína homodimérica, e existem ao menos 4 isoformas principais da glicoproteína. A expressão do seu gene é regulada de diversas formas, como fatores de crescimento (exemplos: fator de crescimento de fibroblastos, fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1) e hipóxia. Ele atua a partir de efeitos diretos em células

endoteliais, produz sinais anti-apoptóticos, aumenta a permeabilidade vascular, induz a quimiotaxia, colagenases e ativadores de plasminogênio (CARMELIET P., 2005).

Sem um suprimento vascular adequado, os tumores sólidos se encontram estagnados e podem crescer apenas 1 ou 2 mm (CARMELIET P., 2005). A neovascularização induzida pelas células tumorais é importante para o crescimento do tumor, pois possibilita o transporte de oxigênio e nutrientes para o local, apoiando o crescimento e a progressão tumoral (EBOS J. M. L. et KERBEL R. S., 2011) (FOLKMAN J., 1971). No entanto, esses vasos são imaturos, tortuosos, irregulares e promovem uma vascularização heterogênea, criando um ambiente hostil, com hipóxia, poucos nutrientes, pH baixo, promovendo uma malignidade ainda maior das células e uma maior capacidade de adaptação em diversos ambientes (CARMELIET P., 2011).

Além disso, a capacidade destas células neoplásicas de liberar fatores angiogênicos contribui para a formação de metástases através da ativação de plasminogênio e colagenases que colaboram para a degradação da membrana basal endotelial (PINHO M. S. L., 2005).

2.3 Uso de Talidomida no tratamento de câncer

Talidomida é um fármaco que começou a ser sintetizado em 1950 na Alemanha, a partir do ácido glutâmico, descoberta como um antiemético efetivo, inicialmente foi utilizada para controle de sintomas como náuseas e vômitos em gestantes. Entretanto, em 1961, o medicamento foi validado como a causa de malformações em recém-nascidos. Consequentemente, nessa década, a Talidomida foi retirada do mercado em vários países (VARGESSON N., 2015).

Após outras avaliações, a Talidomida foi reconhecida como opção de tratamento para outras enfermidades, como a hanseníase, devido aos seus efeitos imunomodulatórios (WANG X. et al., 2016). Atualmente, este fármaco é conhecido pelas funções anti-inflamatórias, imunossupressoras e antiangiogênicas; a última relacionada a suporte de oxigênio e nutrientes (BORGES L. G. et FRÖEHLICH P. E., 2003). Há relatos da inibição da transição epitelial-mesenquimal, relacionada à carcinogênese, invasão e recorrência do câncer (LACOPETTA D. et al, 2017).

Atualmente, no caso do mieloma múltiplo recidivo, alguns tratamentos são realizados com a Talidomida, no qual foi demonstrado uma melhora da doença, mas ainda

sim com o curso fatal (BORGES L. G. et FRÖEHLICH P. E., 2003). O câncer de mama também foi analisado e a biossíntese e expressão do VEGF demonstram-se diminuídos na presença do derivado do ácido glutâmico (LACOPETTA D. et al, 2017).

2.4. Relação entre Talidomida e angiogênese

A Talidomida apresenta-se como um fármaco com capacidades imunomoduladora, anti-inflamatória e anti-angiogênica. Em relação ao seu efeito anti-angiogênico, atua diminuindo a produção do TNF- α , IL-6 e IL-12, substâncias ligadas ao crescimento celular e à angiogênese (SLEIJFER S. et al, 2004).

Além disso, a evidência das propriedades anti-angiogênicas da Talidomida coincidiu com a importância emergente da antiangiogênese no papel do crescimento e progressão do tumor. Demonstrou-se que a Talidomida inibe a angiogênese induzida por β FGF em um ensaio de microbolsa de córnea de coelho e o VEGF em um modelo em ratos de vascularização da córnea. (D'AMATO R. J. et al, 1994).

Em camundongos *nude* com hepatocarcinoma fazendo uso de Talidomida houve uma diminuição do VEGF e da densidade microvascular, no entanto, nenhuma mudança foi observada no tamanho do tumor e em suas metástases (ZHONG-LIN Z. et al, 2005).

A diminuição da formação de vasos está relacionado à inibição da secreção do VEGF, que pode atuar de diversas formas de acordo com os diferentes tipos de células e receptores (LACOPETTA D. et al., 2017).

3. MÉTODO

Este trabalho seria realizado em parceria com o laboratório de microscopia localizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob supervisão da professora Dra. Sônia Nair Bão.

3.1 Cultivo e Manutenção das Células

As células da linhagem MDA-MB 231 (adenocarcinoma mamário humano) foram cedidas pelo Laboratório de Morfologia da Universidade de Brasília. Foram cultivadas em meio L-15 (Leibovitz Medium) suplementado com 1% de solução antibiótica (25 µg/ml de gentamicina) e 10% de SFB (Soro Fetal Bovino). As células foram mantidas em incubadora úmida a 37°C com 5% de CO₂.

3.2 Análise da Viabilidade Celular

Cerca 7×10^3 células MDA-MB 231 seriam semeadas, em triplicata, para o tratamento com Talidomida; enquanto outra triplicata com o mesmo número de células seriam cultivadas para o controle do experimento. A placa contendo as células seria incubada a 37°C, *overnight*. Após a adesão celular, adicionaria ao meio Talidomida nas concentrações de 50mM enquanto as células controle em meio sem Talidomida. A citotoxicidade da Talidomida nas células MDA-MB-231 seria determinada pelo ensaio padrão por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), cuja a concentração segue as recomendações do fabricante.

Após o período de tratamento (24h e 72h), seriam adicionados 150 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL em meio de cultura) em cada poço da placa que contém as células (tratamento e controle), seguido de incubação por 4 h, no escuro e a 37°C. Posteriormente, a solução de MTT seria retirada, sendo adicionado 200 µL de DMSO a cada um dos poços para a diluição dos cristais (formados pela metabolização do MTT nas mitocôndrias das células viáveis).

Em seguida, as placas seriam lidas a 595 nm no espectrofotômetro Spectramax M5 (Molecular Devices – USA). A porcentagem de inibição do crescimento celular seria determinada através da comparação da densidade celular das células tratadas com as

células controle, sendo essa comparação determinada pela fórmula: porcentagem de inibição = $(1 - \text{densidade da célula do grupo tratado}) / \text{densidade da célula do grupo controle}$.

3.3 Extração de RNA e Síntese de cDNA

Cerca de 7×10^5 células por poço seriam plaqueadas para análise da expressão gênica. Após 24h de incubação, metade das amostras receberiam tratamento com Talidomida, nas concentrações significativas determinadas após a análise de viabilidade celular, enquanto a outra metade formaria o grupo controle.

Após o tempo de exposição determinado pelo ensaio de viabilidade, as células seriam submetidas a extração de RNA utilizando o kit *Power SYBR® Green Cells-to-C_T*[™] (Thermo Fisher Scientific), seguindo as recomendações do fabricante.

O RNA total extraído seria quantificado por fluorimetria (Qubit, Invitrogen®) e as concentrações seriam igualadas entre tratamento e controle. A fim de retirar traços remanescentes de DNA genômico ainda presentes após a extração de RNA total, realizaria o tratamento de 1 mg de RNA com DNase I (Roche®) a 37°C por 30 min. Ao final, a DNase seria desnaturada a 65°C por 10 min.

Os cDNAs seriam sintetizados utilizando o kit *SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix* (Invitrogen®), de acordo com o manual do fabricante. Na reação de síntese dos cDNAs seria utilizada uma alíquota que corresponda a 1 mg de RNA à qual seria adicionado 2 µL de iniciadores [hexamEROs e oligo (dT)₂₀] e 1 µL de tampão de anelamento, sendo a reação incubada a 65°C por 5 min seguida de resfriamento em gelo por 1 min. Posteriormente, seria adicionados à reação 10 µL de tampão de reação (2X) e 2 µL da *SuperScript III* e a síntese do cDNA ocorrerá a 50°C por 50 min, sendo terminada a 85°C por 5 min. Após sua síntese, o cDNA seria armazenado a -20°C.

3.4 Desenho de Iniciadores

A fim de analisar a influência sobre angiogênese, seria desenhados iniciadores para o gene Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), assim como para gene do controle endógeno, para utilização na técnica de qPCR em tempo real. A sequência de nucleotídeos para desenho desses iniciadores, bem como dos genes que seriam utilizados como padrão, estão disponíveis no banco de dados GenBank. O iniciadores seriam desenhado através da ferramenta disponível na plataforma Primer3 Plus.

3.5 Análise da Expressão Gênica

A qPCR em Tempo Real seria realizada em triplicata para cada um dos tratamentos. Como controle endógeno utilizaria a Tubulina e Miosina, o que possibilitaria normalizar a expressão dos genes-alvo e corrigir possíveis variações entre as réplicas. A comparação do perfil de expressão do gene relacionado a VEGF seria realizada através da quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK, K. J. et SCHMITTEGEN, T. D., 2001)

A qPCR em Tempo Real seria realizada em reações de 12 μ L contendo 6 μ L do Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas®), 1 μ L de cada par de iniciadores (direto e reverso) à concentração de 0,1 μ M, 2 μ L de cDNA e 2 μ L de água no equipamento Applied Biosystems® 7500 *Fast Real-Time PCR System* utilizando o SYBR® Green como indicador de fluorescência.

As reações seriam montadas em placas de 96 poços de 0,1 mL (Applied Biosystem®) e centrifugadas por 1 min a 4000 rpm a fim de evitar possíveis diferenças no volume final das reações. Os parâmetros do ciclo de amplificação seriam: desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguida por 50 ciclos de desnaturação a 95°C por 50s e anelamento/extensão a 60°C por 48s.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A primeira fase de cultivo e manutenção das células foi realizado no segundo semestre de 2019, no entanto, por se tratar de uma droga importada, houve um atraso no trâmite para a obtenção da Talidomida; infelizmente, o início da pandemia impossibilitou a continuidade do projeto, uma vez que o mesmo é de caráter prático presencial, e tais atividades foram suspensas devido ao isolamento social exigido no combate à COVID-19.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há indícios de que o uso da Talidomida pode colaborar para um melhor prognóstico de pacientes com câncer de mama devido ao seu efeito antiangiogênico. Infelizmente não foi possível chegar a um resultado satisfatório em relação a pesquisa devido a pandemia do COVID-19 que gerou uma limitação de tempo e recursos disponíveis, a perspectiva é tentar retomar o projeto para busca de resultados.

6. REFERÊNCIAS

- BERGERS G. et BENJAMIN L. E. **Tumorigenesis and the angiogenic switch.** Nature. 2003
- BORGES L. G. et FRÖEHLICH P. E., **Talidomida – novas perspectivas para utilização como antiinflamatório, imunossupressor e antiangiogênico.** Rev. Assoc. Med. Bras. vol. 49 no.1 São Paulo Jan./Mar. 2003
- CARMELIET, P. **VEGF as a Key Mediator of Angiogenesis in Cancer.** University of Leuven, Belgium. 2005.
- CASCIATO D A.. **Risk assessment and management of high risk familial breast cancer.** Manchester, UK. 2002.
- CASCIATO D A. **Manual de Oncologia Clínica.** Tecmed. São Paulo. 2008.
- CHUNG et al. **Differential Expression of VEGF, EG-VEGF, and VEGF Receptors in Human Placentas from Normal and Pre-eclamptic Pregnancies.** J Clin Endocrinol Metab. Estados Unidos. Maio 2004.
- D'AMATO R. J., et al. **Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis.** Estados Unidos. 1994.
- EBOS J. M. L. et KERBEL R. S. **Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis.** [Nat Rev Clin Oncol. Apr; 8\(4\): 210–221.](#) 2011.
- EVANS D. et LALLOO F.. **Risk assessment and management of high risk familial breast cancer.** United Kindom. Med Genet; 39:865–871. 2002.
- FOLKMAN J. et al. **Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis.** [J Exp Med.](#) 1971
- FOULKES W., et al. **Germ-line BRCA1 mutation is an adverse prognostic factor in Ashkenazi Jewish women with breast cancer.** Clin Cancer Res **3**:2465-9. 1997.
- GÓMEZ-ESQUER F. et al. **mRNA Expression of the Angiogenesis Markers VEGF and CD105 (Endoglin) in Human Breast Cancer.** Anticancer Research. Espanha. 2004.
- GORT E. H., et al. **Hypoxic regulation of metastasis via hypoxia-inducible factors.** Curr Mol Med. 8: 60-7, 2008.
- HU X. et al. **Emerging therapies for breast cancer.** Journal of Hematology & Oncology. China. 2017.
- LIVAK, K. J. et SCHMITTEGEN, T. D. **Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method.** Elsevier Science (USA) Methods, 25(4), 402–408. 2001.
- JACQUELINE, C. et al. **Cancer: a disease at crossroads of trace-off.** Evol. App. 10:215-225, 2017
- LACOPETTA, D. et al. **Old Drug Scaffold, New Activity: Thalidomide-Related Compounds Exert Different Effects on Breast Cancer Cell Growth and Progression.** ChemMedChem, n. 12, p. 381 –389. 2017.
- LOPES, A. et al. **Oncologia para graduação.** São Paulo: LeMar, 2013.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. INCA. **Estimativa de Câncer no Brasil.** Brasil. 2018

- NAROD S. A., et al. **An evaluation of genetic heterogeneity in 145 breast-ovarian cancer families.** Am J Hum Genet 56:254-64. 1995.
- PAPETTI M. et HERMAN I. M. **Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis.** Cell Physiology. [Volume 282, Issue 5](#), May 2002. Pages C947-C970
- PETRUCELLI N., et al. **BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer.** Estados Unidos. 1998. [Atualizado]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editores.
- PINHO M. S. L. **Angiogênese o gatilho proliferativo.** Brasil. 2005.
- RICHARDSON, P. et al. **Thalidomide in multiple myeloma.** Biomedicine & Pharmacotherapy, 56(3), 115–128. 2002
- SAITO, R. F. et al. **O metabolismo da célula tumoral.** São Paulo. 2015.
- SLEIJFER, S. et al. **Thalidomide in solid tumours: the resurrection of an old drug.** European Journal of Cancer, 2004. 40: p. 2377- 2382
- SINN H. P. et HANS K. **A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition.** 2013.
- VARGESSON, N. **Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms.** Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews, v. 105, n. 2, p. 140-156, 2015.
- WANG X. et al. **Importance of the interaction between immune cells and tumor vasculature mediated by thalidomide in cancer treatment (Review).** International Journal of Molecular Medicine 38.4 (2016): 1021-1029
- WARBURG, O. **On the origin of cancer cells.** Science, vol.123,no. 3191, pp. 309–314, 1956.
- XICHUN H., et al. **Emerging therapies for breast cancer.** Journal of Hematology & Oncology. Shanghai, China. 2007.
- ZHONG-LIN Z. et al. **Effects of thalidomide on angiogenesis and tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma in nude mice.** World J Gastroenterol. China. 2005