

LINCON JO MORI

**Efeitos morfológicos, histológicos e moleculares dos
moduladores seletivos dos receptores de estrogênios
tamoxifeno e raloxifeno na prevenção primária de
tumores mamários quimicamente induzidos em ratas**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Obstetrícia e Ginecologia
Orientador: Prof. Dr. Edmund Chada Baracat

**São Paulo
2007**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Mori, Lincon Jo

Efeitos morfológicos, histológicos e moleculares dos moduladores seletivos dos receptores de estrogênios tamoxifeno e raloxifeno na prevenção primária de tumores mamários quimicamente induzidos em ratas / Lincon Jo Mori. -- São Paulo, 2007.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Obstetrícia e Ginecologia.

Área de concentração: Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Edmund Chada Baracat.

Descritores: 1.Neoplasias mamárias/induzido quimicamente 2.Modelos animais
3.Carcinógenos 4.9,10-dimetil-1,2-benzantraceno 5.Tamoxifeno 6.Raloxifeno 7.Ratos

USP/FM/SBD-263/07

DEDICATÓRIA

A meu Pai, a quem amo muito

A minha Mãe, pois nunca a esqueço

A meus Irmãos e Família

(e tudo que esta palavra representa)

A Rita, o meu amor

AGRADECIMENTOS

À Dra. **Eliza Naomi Muranaka**, idealizadora e colaboradora fundamental desta Tese e por sua valiosa amizade.

Ao Prof. Dr. **Alfredo Carlos Simões Dornellas de Barros**, por ser o mentor do projeto e pelo incentivo à vida acadêmica e pela amizade.

Ao Prof. Dr. **Edmund Chada Baracat**, pela sua inestimável orientação, dedicação, estímulo e apoio.

Ao Prof. Dr. **Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva**, pela co-orientação, disponibilidade, por tornar viável toda pesquisa biomolecular deste projeto.

À Profa. Dra. **Angela Maggio da Fonseca**, pela revisão, colaboração e carinho com seus pós-graduandos.

Ao Prof. Dr. **José Aristodemo Pinotti**, pelo estímulo à pesquisa.

As técnicas do Laboratório LIM-58, **Marinalva Almeida** e **Daniela Silva**, pela contribuição com os experimentos e cuidado com os animais.

Aos biólogos **Beatriz Schnabel** e **Márcio Custódio**, pelo valioso auxílio e realização dos exames genéticos.

Às Doutoradas **Christina Helena Pelizon**, **Kátia Maciel Pincerato**,
Sheila Aparecida Coelho Siqueira e ao Dr. **Roberto Falzoni**, ao
Prof. Dr. **Kihoshi Iriya** pela disposição e análise dos exames
anatomopatológicos.

Ao estatístico **Fabrcio Duarte** , pelo trabalho e dedicação.

À bióloga **Cristina Tanikawa** e Profa. **Silvia Costa Ortiz** e ao
Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP, pela
disposição em ajudar e pela orientação dos aspectos práticos.

A **Maria Fernanda Maluf**, pela amizade e auxílio na digitação da
Tese.

À **biblioteca** do Hospital Sírio Libanês, pelo auxílio na obtenção
dos artigos científicos.

A **Rita Ortega**, pelo carinho, toda dedicação e profissionalismo na
revisão e formatação de toda tese e pela sua amizade.

Aos **Animais**, utilizados e estudados que proporcionam à pesquisa
e o progresso da ciência.

À FMUSP, especialmente, ao LIM-58 e à **Disciplina de
Ginecologia** do Hospital das Clínicas, que me acolheu e
possibilitou este trabalho.

A **Todos** que participaram direta ou indiretamente deste Projeto
meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE GRÁFICOS	xiv
LISTA DE TABELAS	xv
RESUMO	xvi
<i>SUMMARY</i>	xix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	10
3 OBJETIVOS	39
3.1 Geral.....	40
3.2 Específicos	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1 Manuseio com os animais.....	47
4.2 Manutenção dos animais	48
4.2.1 Alojamento	48
4.2.2 Alimentação	50
4.2.3 Identificação.....	50
4.2.4 Sacrifício dos animais	51
4.3 Coleta de tecido mamário	52
4.4 Preparo prévio das amostras de tumor	53
4.5 Extração mRNA	53
4.5.1 Fase de separação do mRNA.....	53
4.5.2 Fase de precipitação do mRNA.....	54
4.5.3 Fase de lavagem	54
4.5.4 Dissolução do mRNA.....	54
4.5.5 Purificação do RNA	54
4.6 Avaliação da concentração e grau de pureza das amostras de RNA por espectrofotometria.....	55
4.7 Reação de Transcriptase Reversa (RT) para obtenção de cDNA ..	56

4.8	PCR em tempo real.....	57
4.9	Ética	59
4.10	Método Estatístico	60
5	RESULTADOS	67
5.1.	Análise e apresentação dos resultados.....	68
5.2	Descrição morfológica	68
5.2.1	Porcentagem das ratas que desenvolveram tumores.....	68
5.2.2	Intervalo entre indução e aparecimento do tumor	71
5.2.3	Número de tumores em cada rata por grupo.....	72
5.2.4	Tamanho do tumor em cada rata por grupo	74
5.3	Exame histopatológico.....	75
5.3.1	Caracterização anatomopatológica das neoplasias formadas em cada grupo.....	75
5.3.2	Porcentagem de células neoplásicas RE positivas.....	77
5.3.3	Porcentagem de células neoplásicas para Ki-67	80
5.3.4	Porcentagem de grau histológico tumoral mamário.....	80
5.4	Avaliação genética	82
5.4.1	Estudo genético de fatores envolvidos na expressão angiogênica pelo método de RT-PCR Array das neoplasias formadas em cada grupo.....	83
6	DISCUSSÃO	88
7	CONCLUSÕES.....	119
8	ANEXOS.....	121
9	REFERÊNCIAS	138

LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC	American Joint Committee on Cancer
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CO	Monóxido de carbono
CO ₂	Dióxido de carbono
CORE	Continuing Outcomes Relevant to Evista
Ct	Ciclo limiar
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMBA	7,12-Dimetilbenzantraceno
DNA	Ácido desoxirribonucléico
MORE	Multiples Outcomes of Raloxifene Evaluation
NMU	N-nitrosometiluréia
NSABP-P1	National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project - P1 Study
O ₂	Oxigênio
qRT-PCR	Reação em Cadeia de Polimerase por Transcriptase Reversa em Tempo Real
Ral	Raloxifeno
RE	Receptor de estrogênio
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
RT ² -PCR Array	Reação em Cadeia de Polimerase por Transcriptase Reversa em Tempo Real
RUTH	Raloxifene Use for The Heart trial
SERMs	Moduladores seletivos de receptores estrogênicos
STAR	Study Tamoxifen and Raloxifen ou NSABP-P2
TAF ₁	Função de ativação de transcrição
TAF ₂	Função de ativação de transcrição
Tam	Tamoxifeno

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura dos receptores hormonais esteróides (superfamília).....	22
Figura 2 -	Estrutura dos RE α e β	24
Figura 3 -	Receptor de estrogênio inativado pelo complexo chaperona	27
Figura 4 -	Estrutura química dos SERMs	30
Figura 5 -	Mecanismo de ação do tamoxifeno no RE	32
Figura 6A e 6B -	Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Ginecologia (LIM 58) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.....	43
Figura 7 -	Administração por gavagem das substâncias	43
Figura 8 -	Grupo 1 - DMBA.....	44
Figura 9 -	Grupo 2 - Tamoxifeno	44
Figura 10 -	Grupo 3 - Raloxifeno	44
Figura 11 -	Estante climatizada para manutenção da temperatura, umidade e ventilação dos animais	49
Figura 12 -	Tumor mamário induzido quimicamente	69
Figura 13 -	Carcinoma ductal invasivo tipo papilífero em mama de rata (HE; 400x).....	76
Figura 14 -	Carcinoma ductal invasivo tipo comedarcinoma em mama de rata (HE; 400x).....	76

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Número de tumores mamários induzidos nas ratas nos três grupos estudados.....	70
Gráfico 2 - Porcentagem de ratas com tumores de mamas	70
Gráfico 3 - Formação do primeiro tumor (dias) de mama nas ratas	72
Gráfico 4 - Número médio de tumores de mamas induzidos nas ratas nos três grupos estudados.....	73
Gráfico 5 - Média normalizada de ΔC_t do Grupo Tamoxifeno vs DMBA.....	85
Gráfico 6 - Média normalizada de ΔC_t do Grupo Tamoxifeno vs DMBA $p < 0,05$	85
Gráfico 7 - Média normalizada de ΔC_t do Grupo Raloxifeno vs DMBA.....	87
Gráfico 8 - Média normalizada de ΔC_t do Grupo Raloxifeno vs DMBA $p < 0,05$	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação de lesão neoplásica e não neoplásica da glândula mamária de rata em comparação ao tecido humano	19
Tabela 2 - Marcadores imunohistoquímicos de tecido mamário humano e de rata.....	20
Tabela 3 - Análise do tempo de indução dos tumores induzidos nos três grupos	72
Tabela 4 - Características morfológicas dos três grupos quanto à formação de tumores induzidos	73
Tabela 5a - Avaliação morfológica e histológica: Grupo 1 – DMBA.....	78
Tabela 5b - Avaliação morfológica e histológica: Grupo 2 – Tamoxifeno	79
Tabela 5c - Avaliação morfológica e histológica: Grupo 3 – Raloxifeno	79
Tabela 6 - Análise da atividade proliferativa (Ki67) dos tumores induzidos, considerando o maior tumor desenvolvido nas ratas.....	80
Tabela 7 - Porcentagem do grau histológico tumoral mamário nos três grupos.....	82
Tabela 8 - Média normalizada de ΔC_t do Grupo Tamoxifeno vs DMBA.....	84
Tabela 9 - Média normalizada de ΔC_t do Grupo Raloxifeno vs DMBA.....	86

RESUMO

Mori LJ. *Efeitos morfológicos, histológicos e moleculares dos moduladores seletivos dos receptores de estrogênios tamoxifeno e raloxifeno na prevenção primária de tumores mamários quimicamente induzidos em ratas* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2007. 189p.

O câncer de mama é a neoplasia mais comum na população feminina, representando até um terço dos novos diagnósticos de neoplasia nessa população em algumas regiões do mundo. A prevenção primária ou secundária constitui a pedra fundamental no controle do câncer de mama; depende da identificação dos determinantes da doença, em termos de iniciação e promoção. Aproximadamente, 48.930 novos casos de câncer de mama são detectados anualmente no Brasil, tornando-se um sério problema de saúde pública. O objetivo primário deste estudo foi avaliar a ação e diferenças de dois SERMs, tamoxifeno (TAM) e raloxifeno (RAL), na quimioprevenção de tumores mamários quimicamente induzidos em ratas. Foram estudados três grupos homogêneos (DMBA ou 7,12-Dimetilbenzantraceno, TAM e RAL) compostos de 20 ratas adultas da raça Sprague-Dawley com tumores induzidos quimicamente pelo carcinógeno DMBA. As ratas, com 40 a 50 dias de vida, receberam a substância em dose única, por gavagem. Nos grupos TAM e RAL, os animais receberam os SERMs, diariamente, por via oral, 10 dias antes e por mais 80 dias após a indução química com o DMBA. A ação destes SERMs na quimioprevenção de tumores mamários, como também as características morfológicas e histopatológicas dos tumores induzidos, a porcentagem de receptores de estrogênio e a atividade proliferativa da célula tumoral pelo Ki67 foram analisadas. A expressão angiogênica em cada grupo e suas diferenças foram avaliadas com o método qRT-PCR. Após a análise estatística dos resultados observou-se, em relação aos três grupos, que não houve diferenças significantes quanto ao peso, tipo histológico do tumor formado, porcentagem dos receptores de estrogênio e a média do tamanho tumoral. Houve diferenças estatísticas quanto a: 1) número de ratas que desenvolveram tumores (DMBA 100%, tamoxifeno 35% e raloxifeno 15%); 2) indução do aparecimento do tumor (DMBA = 32 dias, TAM=46 dias e RAL=57 dias); 3) média, por rata, de tumores formados em cada grupo (DMBA=4,5 tumores, TAM=1,33 tumores e RAL=1,28 tumores); 4) porcentagem de células Ki-67 positivas nos tumores: DMBA 85% dos casos Ki67= 75% a 80%, 15% dos casos Ki67=50%; TAM 43% dos casos Ki67=50% e 57% dos casos Ki67=75% ,e RAL 100% dos casos Ki67=50%; 5) grau histológico tumoral: DMBA 100% grau 3; TAM 71% grau 2 e 29% grau 3 , RAL 100% grau 2; 6) a avaliação da expressão de fatores angiogênicos: nos grupos TAM vs DMBA apresentou maior expressão nos genes *Angpt1*, *Angpt2*, *Hqf*, *Hif1a*, *Itgab3*, *Lep*, *Mapk14*, *Mmp19 predicted*, *Nrp1*, *Pgf*, *Plau*, *Serpinf1*, *Tgfb1*, *Tgfb2*, *Tek*, *Timp3*, *TNF*, *Vegfa* e *Vegfc*. No grupo RAL vs DMBA, apresentaram maior expressão os genes *Hif1a*, *Itgab3* , *Pgf*, *Plau*, *Tek* e *Vegfc*. Este grupo mostrou, ainda, menor expressão dos genes *Fgf6* e *Pecam*. Neste modelo experimental, houve maior eficácia do raloxifeno em relação ao tamoxifeno na quimioprevenção mamária;

possivelmente, esta maior proteção esteja relacionada com os diferentes fatores angiogênicos expressos nos dois grupos.

Descritores: 1-neoplasias da mama/induzido quimicamente; 2-modelos animais; 3-carcinógenos; 4-DMBA; 5-tamoxifeno; 6-raloxifeno; 7-ratos.

SUMMARY

Mori LJ. *Morphological, histological and molecular effects of SERMs tamoxifen and raloxifene in primary prevention of chemically-induced mammary tumors in rats* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2007. 189p.

Breast cancer is the most common neoplastic disease in the female population, accounting for up to one third of new cancer cases in women in some regions of the world. Prevention, either primary or secondary, is essential for breast cancer control, which depends on identification of the determining factor of the disease, both for initiation and promotion. About 48,930 new cases of breast cancer are detected annually in Brazil, creating a serious Public Health problem. The primary objective of the present study was to determine the action of two SERMs (tamoxifen and raloxifene) as chemopreventive agents and to check the differences between them. The secondary objectives were to evaluate morphological and histological aspects, the percentage of estrogen receptor and proliferative mammary activity (Ki67), and expression of 84 genes involved in modulating the biological process of angiogenesis by qRT-PCR array. Young female Sprague-Dawley rats had chemically-induced tumors by DMBA (7,12Dimethylbenzanthracene) administered by gavage between the ages of 40 to 50 days old. They were divided into three groups: DMBA, TAM and RAL; the two latter groups received SERMs 10 days before DMBA and for 80 days after it. Data analyses showed: 1) the number of rats that developed tumors in each group (DMBA = 20 rats - 100%; TAM = 7 rats - 35%; RAL = 3 rats -15%); 2) induction of tumor onset (DMBA = 32 days, TAM = 46 days, RAL = 57 days); 3) number of tumors formed in each group by individual rat (DMBA = 4.5; TAM = 1.33, and RAL = 1.28); 4) the percentage of Ki67 positive cells in tumors (DMBA = 50 to 80%, TAM = 50 to 75%, and RAL = 50%); 5) histological grade of mammary tumor (DMBA = 100% grade 3, TAM = 71% grade 2 and 29% grade 3, and RAL = 100% grade 2); 6) assessment of expression of angiogenic factors. TAM group compared to DMBA group showed greater expression of the following genes: Angpt2, Hqf, Hif1a, Itgab3, Lep, Mapk14, mmp19 predicted, Nrp1, Pgf, Plau, Serpinf1, Tgfb1, Tgfb2, Tek, Timp3, TNF, Vegfa and Vegfc. RAL group compared to DMBA group showed greater expression of genes Hif1a, Itgab3, Pgf, Plau, Tek and Vegfc; in addition, in this group, genes Fgf6 and Pecam had less expression. In conclusion, in this experimental model, the raloxifene group proved to be more efficient than the tamoxifen group in mammary chemoprevention. The results can be possibly associated with different expressions of angiogenic factors in both groups.

Descriptors: 1-breast cancer/chemically induced; 2-animal models; 3-carcinogens; 4-DMBA; 5-tamoxifen; 6-raloxifene; 7-rats

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o câncer de mama representa sério problema de saúde pública, em função de sua elevada incidência e pelas repercussões biopsicossociais que ocasiona à sociedade. No Brasil, são detectados, aproximadamente, 48.930 novos casos de câncer de mama, sendo responsável por cerca de 8.000 óbitos por ano, segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (Brasil, 2006). Na região sudeste brasileira, esta neoplasia é o mais incidente entre as mulheres, com risco estimado de 71 casos novos por 100 mil. Permanece como o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e o primeiro entre as mulheres. Na população mundial, a sobrevida média em cinco anos é de 61% (ParKin, 2006; ParKin e Fernandes, 2006) com taxa de mortalidade, tendendo à estabilidade nos países ocidentais industrializados (Jatoi e Miller, 2003; Jemal *et al.*, 2007).

A incidência de câncer de mama no Brasil e em vários países ocidentais industrializados tem aumentado em cerca de 1%, em média, não apenas pelo maior número de diagnósticos realizados (Fentiman, 2000; Ries *et al.*, 2003).

Determinados fatores de risco têm influenciado esse aumento (Collaborative, 1996, 1997, 2002; Garland *et al.*, 1998; Colditz e Rosner, 2000; Lipworth *et al.*, 2000; McPherson *et al.*, 2000; Bernstein, 2002; Marchbanks *et al.*, 2002; Althuis *et al.*, 2003; Colditz *et al.*, 2004; Friman *et al.*, 2007), como as mudanças nos hábitos (maior consumo e ingestão de

gorduras não saudáveis, sedentarismo e, conseqüente, aumento no índice de massa corpórea, consumo exagerado de álcool (Fan *et al.*, 2000; Prentice *et al.*, 2006; Michels *et al.*, 2007; Tworoger *et al.*, 2007) e, sobretudo, os fatores reprodutivos que favorecem a maior exposição estrogênica (menarca precoce; uso de anticoncepcionais precocemente e por longos períodos; terapia hormonal; gestação cada vez mais tardia; menor número de gestações; menor tempo de amamentação).

Vários autores mostram que o estrogênio é, de fato, um importante fator promotor da carcinogênese mamária por aumentar a taxa de proliferação da célula, incrementando, assim, o risco de formação de células atípicas (Yager e Liehr, 1996; Zheng *et al.*, 1998; Muti *et al.*, 2000; Russo *et al.*, 2003, 2005a, 2005b, 2005c; Eliassen *et al.*, 2006).

Além disso, outros pesquisadores verificaram que determinados metabólitos estrogênicos, como o 4-hidroxiestradiol e o 16-alfahidroxiestradiol, têm a capacidade de induzir a carcinogênese, por promover lesão genotóxica no DNA da célula mamária (Fishman *et al.*, 1984; Yager e Liehr, 1996; Muti *et al.*, 2000; Russo e Russo, 2004a, 2006;).

Os moduladores seletivos de receptores estrogênicos (SERMs) são compostos sintéticos que se ligam aos receptores estrogênicos, podendo atuar como agonista ou antagonista, parcial ou total, nos diferentes tecidos-alvo. Ligam-se aos receptores com afinidade variável, levando a alterações conformacionais e interações com os co-fatores (coativadores ou correpressores), que determinam a atividade seletiva agonista ou antagonista na célula-alvo.

O conhecimento cada vez maior do mecanismo de ação dos receptores estrogênicos permitiu mudanças na estrutura química dos SERMs, propiciando ação mais seletiva em determinados tecidos-alvo. Entre os SERMs de primeira geração, assinalam-se: o tamoxifeno e o clomifeno. Quanto aos de segunda geração, destacam-se o raloxifeno, o toremifeno, o droloxifeno e o idoxifeno. Com relação aos da terceira geração, os principais são o ICI182,170 (antiestrogênio puro), arzoxifeno, alcobifeno, em-652, Ly-353381.HCl. Fazem parte dos de quarta geração o lasofoxifeno e o ormeloxifeno (Johnston, 2001; Jordan, 2002, 2003; Riggs e Hartmann, 2003; Renaud *et al.*, 2005; Fan *et al.*, 2007).

Importante pesquisa multicêntrica, duplo-cego, analisou o efeito do tamoxifeno, SERM com ação antiestrogênica na mama, na prevenção da formação do câncer de mama em pacientes de alto risco, consignando uma estratégia válida de prevenção primária (Cuzick *et al.*, 2003; Fisher *et al.*, 2005).

Este ensaio clínico, conhecido como NSABP-P1 "*National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project - P1 Study*", foi publicado por Fisher *et al.*, em 1998. Foram randomizadas 13.338 mulheres de alto risco para câncer de mama, em estudo duplo-cego (placebo versus tamoxifeno), comprovando que o uso de tamoxifeno por cinco anos diminuía o risco de câncer de mama invasivo em, pelo menos, 49% dos casos e, em 69%, quando o receptor hormonal era positivo para estrogênio. O uso do tamoxifeno, todavia, foi associado significativamente com maior risco de câncer endometrial, acidente vascular cerebral, tromboembolismo pulmonar

e trombose venosa profunda; sobretudo em mulheres acima de cinquenta anos de idade.

O raloxifeno, SERM de segunda geração, teria maior seletividade em determinados tecidos-alvo, entretanto não apresenta uma ação preventiva na mama tão bem avaliada, clínica ou experimentalmente.

Informações adicionais sobre os benefícios do raloxifeno foram oferecidas pelo ensaio clínico MORE “Multiples Outcomes of Raloxifene Evaluation”. Cummings *et al.*, em 1999, distribuíram 7.705 mulheres pós-menopáusicas, em estudo duplo cego controlado (raloxifeno versus placebo). Os autores mostraram que o raloxifeno reduziu significativamente o risco de câncer de mama invasivo (redução do risco relativo em 76%, apesar do pequeno número de casos de câncer), mas também aumentou o risco de tromboembolismo. Aumentou a densidade mineral óssea, diminuiu o risco de fratura vertebral e não modificou o risco de desenvolver hiperplasia ou câncer endometrial.

Martino *et al.*, em 2004, publicaram o ensaio clínico CORE “*Continuing Outcomes Relevant to Evista*”, que consistia em avaliar parte do estudo MORE e examinar o efeito do raloxifeno por quatro anos adicionais. Foram acompanhadas 3.510 mulheres no grupo raloxifeno e 1.703 no grupo placebo. Durante os oito anos de seguimento, a incidência de câncer de mama invasivo foi reduzida em 66% no grupo geral e em 76% quando os receptores hormonais eram positivos no grupo raloxifeno, em comparação ao grupo placebo. No estudo CORE, houve aumento de risco para tromboembolismo em 117% em relação ao grupo placebo, que já havia sido

observado no estudo MORE. Os autores concluíram que o raloxifeno usado no tratamento de mulheres com osteoporose na pós-menopausa, possibilitou a diminuição na incidência de câncer de mama invasivo, efeito que persistiu após quatro anos de uso.

Já no estudo RUTH (*Raloxifene Use for The Heart Trial*), Barret-Connor *et al.* (2006) analisaram 10.101 mulheres na pós-menopausa com doenças coronarianas ou cardíacas, ou ainda, com vários fatores de risco. Avaliaram o uso do raloxifeno e placebo (estudo duplo-cego) e seu efeito nos eventos cardiovasculares. Durante período de 5,6 anos não houve diferença na incidência de doenças cardiovasculares. Entretanto, no grupo raloxifeno houve redução significativa do câncer de mama invasivo (redução de risco de 44% no grupo geral e de 55% quando o receptor hormonal era positivo). Assim, como no estudo MORE, o raloxifeno aumentou o risco relativo de tromboembolismo (44%) e, também, apresentou outros efeitos colaterais, como ondas de calor e edema periférico.

Recentemente, Vogel *et al.*, em 2006, publicaram o estudo STAR “*Study Tamoxifen and Raloxifen ou NSABP-P2*”, duplo-cego e prospectivo, que comparou o uso de raloxifeno e tamoxifeno. Foram randomizadas 19.747 mulheres na pós-menopausa, com risco aumentado para câncer de mama (índice de Gail >1, 6). Após seguimento médio de quatro anos, o raloxifeno mostrou-se tão efetivo quanto o tamoxifeno na redução do risco de câncer invasivo da mama (incidência de 4,30 casos/1.000 no grupo tamoxifeno e de 4,41 casos/1.000 no grupo raloxifeno), com menor risco de eventos tromboembólicos (30% menos) e cataratas (21% menos), mas

maior risco de câncer *in situ* (incidência de 1,51 casos por mil no grupo tamoxifeno e 2,11 casos por mil no grupo raloxifeno, mas com p não significativa). Houve, também, tendência de menor risco para câncer endometrial com o uso do raloxifeno (incidência de 2,0 casos/1000 no grupo tamoxifeno e de 1,25 casos/1000 no grupo raloxifeno). O risco para outros tipos de cânceres, fraturas, doença isquêmica cardíaca e acidente vascular cerebral foi semelhante em ambos os grupos. Em virtude destes resultados, o raloxifeno passou a ser considerado também na quimioprevenção, assim como o tamoxifeno, em pacientes de alto risco para câncer de mama.

Atualmente, a terapia adjuvante para o câncer de mama invasivo depende de: 1) dados clínicos (faixa etária, estado menstrual, co-morbidades ou condições clínicas da paciente); 2) dados anatomopatológicos (o tamanho do tumor, tipo e grau histológico, grau nuclear, comprometimento linfonodal, presença de invasão vasculo-linfática, presença de metástases visceral e/ou óssea), segundo a Classificação TNM, que é determinada pelo AJCC (*American Joint Committee on Câncer* (American, 2002); 3) avaliação imuno-histoquímica do tumor, que procura caracterizar os vários processos do ciclo celular e molecular envolvidos na carcinogênese e suas etapas. Embora sejam descritos inúmeros marcadores na literatura médica, apenas três são importantes para se definir a conduta quanto à terapia adjuvante: o receptor hormonal de estrogênio e/ou de progesterona e a presença ou não da superexpressão e/ou amplificação do her-2-neu (Braun e Harbeck, 2001; Bundred, 2001; Goldhirsch *et al.*, 2005; Come *et al.*, 2006; Winer *et al.*, 2006).

Grande parte dos dados clínicos hoje conhecidos em relação ao câncer de mama foram observados em modelos experimentais.

O câncer de mama é uma doença sistêmica de comportamento biológico variável; por isso, apresenta conduta terapêutica complexa que, em muitos casos, os bons resultados (de melhor prognóstico) dependem da detecção precoce (prevenção secundária). Contudo, existe uma porcentagem de casos, cuja detecção é precoce, mas a evolução não é favorável (mau prognóstico). Talvez, o perfilamento genético possa orientar e discriminar grupos específicos que serão beneficiados com determinados tratamentos, como assinalaram Perou *et al.* (2000), Sorlie *et al.* (2001), Lonning *et al.* (2001), Van'T Veer *et al.* (2002), Van de Vijver *et al.* (2002), Pagliarulo *et al.* (2002), Popescu e Zimonjic (2002) e Quackenbush (2006).

Nesse sentido, além da melhora gradativa na tecnologia de exames que possam detectar lesões mais precoces (Kopans, 1995; Feig *et al.*, 1998; Olsen e Gotzsche, 2001; Tabar *et al.*, 2001; Feig, 2002; Lee, 2002; Jackson, 2002; Gøtzsche e Nielsen, 2006) e estímulos para mudanças mais saudáveis nos hábitos e estilos de vida, surge a descoberta de novos medicamentos, com o propósito de se fazer a prevenção primária, entre eles substâncias que tenham ação quimioprotetoras na formação do câncer de mama (Fentiman, 2000; Geller e Vogel, 2005; Bao *et al.*, 2006; Grilli, 2006; Jordan, 2006; Kelloff *et al.*, 2006; Jordan, 2007; Russo *et al.*, 2007).

No presente trabalho, estudamos a carcinogênese mamária e o uso de quimioprotetores (tamoxifeno e raloxifeno) por meio de modelo experimental com ratas da raça Sprague Dawley.

O modelo animal em ratas é, comprovadamente, o tipo experimental de escolha para a carcinogênese mamária, em função da semelhança estrutural e fisiológica das mamas desses roedores à da espécie humana, já tendo servido de base para inúmeras pesquisas translacionais, da pesquisa básica à pesquisa clínica na área. Por esse motivo, foi escolhido tal modelo para desenvolver nosso estudo.

Desse modo, esta linha de pesquisa permite avaliar o uso experimental de substâncias quimioprotetoras e seus resultados contra o câncer de mama, bem como entender e tentar elucidar os mecanismos envolvidos na carcinogênese mamária e o comportamento biológico tão diverso desta neoplasia.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

Vários autores (Huggins *et al.*, 1959, 1961; Dao e Sunderland, 1959; Dao, 1962, 1969; Russo *et al.*, 1982, 1990, 2005a; Briand, 1983; Gould, 1995; Cheung *et al.*, 2003a, 2003b; Hakkak *et al.*, 2007) utilizaram o modelo animal como fonte de estudo do câncer de mama no ser humano, o que contribuiu sobremaneira para o entendimento de sua biologia e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Contudo, poucas espécies de animais formam tumores de mama espontaneamente; além dos roedores (ratos e camundongos) destacam-se os cachorros. Estes últimos apresentam, como grande desvantagem, o custo elevado de seu processo experimental.

Assim, a maioria dos modelos animais experimentais descritos para câncer de mama utilizam os roedores.

Dentre os modelos experimentais para o desenvolvimento de tumores de mama em roedores, destacam-se os induzidos quimicamente, os induzidos por vírus, os tumores humanos transplantados (xenografados), os modelos transgênicos em camundongos e aqueles induzidos por radiação ionizante (Bland e Copeland, 2004; Harris *et al.*, 2004; Russo *et al.*, 2005a, 2005b).

Em nosso trabalho, utilizamos o modelo experimental de indução química de formação de tumores em ratas por ser um modelo factível, de

baixo custo e por servir para o fim maior, ou seja, o estudo de substâncias com ação quimioprotetora.

As glândulas mamárias de várias espécies de ratas são susceptíveis à transformação química carcinogênica, notadamente, as espécies Sprague-Dawley, Búfalo/N, Fischer 344, Lewis e Wistar-Furth, como referiram Jordan (1976); Jordan e Allen (1980), Jordan *et al.* (1980, 1990, 1991), Van Zwieten *et al.* (1984), Siemann (1987), Russo *et al.* (1990, 2005a, 2005b, 2005c), Barros *et al.* (2003), Imai *et al.* (2005).

Sabe-se, também, que os modelos de indução química em roedores sofrem influência quanto à idade do animal, a dose do agente carcinogênico e o tipo de ração (porcentagem de gordura), segundo Manni *et al.* (1982, 1995), Kritchevsky (1997), HilaKivi-Clarke *et al.* (1997), Russo e Russo (2004b), Assis *et al.* (2006). Consoante esses autores, as ratas devem ser virgens, com idade entre 40 e 60 dias, submetidas à dieta com rações peletizadas com porcentagem de gordura de 5% (ou 20%, se o intuito for utilizar modelo de alta ingestão de gordura).

Neste trabalho, utilizamos ratas virgens da raça Sprague-Dawley, homogêneas quanto ao peso, com idade variável de 40 a 50 dias, para indução química com DMBA (7,12-Dimetilbenzantraceno) e que foram alimentadas com ração peletizada com porcentagem de gordura em torno de 5%.

Segundo Russo *et al.* (1990, 2005a), na faixa etária de 40 a 60 dias, a indução química carcinogênica na formação de tumores de mama é máxima, estando relacionada à fase de maior taxa proliferativa do tecido mamário

desses animais que corresponde ao início da maturidade sexual. Os autores referiram taxas de 97% a 100% de formação de tumores de mama em ratas quando o agente carcinogênico era injetado nesta fase e a incidência de formação de tumores diminuía de modo marcante, quando era administrado, após 60 dias de vida ou se a rata tivesse tido gestação a termo e/ou amamentado.

Esses modelos animais de formação de tumores mamários têm sido utilizados desde descrição clássica de Huggins *et al.* (1961), que permitiu avanços importantes no conhecimento do processo de carcinogênese mamária.

Os modelos animais de indução química carcinogênica com redores são ótimos para testes de substâncias antitumorais e/ou preventivas como mostraram vários autores (Jordan e Allen, 1980; Jordan *et al.*, 1990, 1991; Russo *et al.*, 1990, 2005a, 2005b; Ip *et al.*, 2002; Barros *et al.*, 2003; El-Bayoumi e Sinha, 2004; Kim *et al.*, 2004).

As duas drogas mais utilizadas para indução química carcinogênica de tumores mamários em roedores são o N-nitrosometiluréia (NMU) e o 7,12-Dimetilbenzantraceno (DMBA).

O NMU, descrito originalmente por Gullino *et al.* (1975), induz à formação de carcinomas mamários em roedores quando administrado por via subcutânea ou intravenosa. Provoca cerca de 75%, em média de alteração da expressão/ativação do gen ras (protooncogene) (Zarbl *et al.*, 1985; Russo *et al.*, 1990, 2005a; Cha *et al.*, 1996).

O gene *ras*, quando alterado (oncogen *ras*), o que ocorre em cerca de 10% a 20% dos tumores de mama (Stewart *et al.*, 2004; De Vita *et al.*, 2004), aumenta a via de sinalização do ciclo celular, sendo dependente de proteínas GTPase, que estimulam o gene *raf*. A ativação *ras/raf* aumenta a expressão de proteínas nucleares, como *fos*, *jun* e *myc*, induzindo à expressão de outros genes e incrementando a transcrição do sinal e a proliferação celular. Portanto, quando a pesquisa visa estudar as vias de sinalizações celulares, o NMU não deve ser escolhido pois, pode interferir nos resultados. Quanto à incidência e à latência de formação de tumores de mama em roedores, o NMU é compatível ao DMBA, como mostraram Rogers e Lee (1986), Rogers *et al.* (1998) e Russo *et al.* (1990, 2005a).

Em contrapartida, o DMBA, também, é um potente indutor de formação de tumor de mama em roedores. É, geralmente, administrado por via oral, por gavagem, misturado com óleo (Russo *et al.* 1990, 2005a).

Os metabólitos do DMBA são ativados no fígado e na glândula mamária. Portanto, estudos que usem substâncias que alterem significativamente a função hepática ou dietas com alto teor de gordura não devem utilizar o DMBA em sua metodologia, pois pode haver alteração dos resultados; como ressaltaram HilaKivi-Clarke *et al.* (1997).

Em ratas, os tumores induzidos quimicamente são hormônio-dependentes, segundo vários autores (Russo *et al.*, 1990, 1991, 2005a, 2005b, 2005c; Cheung *et al.*, 2003a, 2003b).

Essa dependência é demonstrada, por exemplo, em ratas Sprague-Dawley e com tumor induzido por DMBA que foram submetidas a

ooforectomia. Os tumores regrediram em cerca de 70% a 80% (Solleveld *et al.*, 1986; Russo *et al.*, 1990; Thompson e Singh, 2000).

Após a ocorrência de gestação e lactação, a exposição à substância carcinogênica (DMBA ou MNU) também reduz a suscetibilidade da glândula mamária em formar tumor; entretanto, gestação logo após a exposição facilitaria a formação tumoral (Welsch, 1985; Russo *et al.*, 1990, 2005a).

Como nosso trabalho tem o intuito de pesquisar e comparar fármacos de ação hormonal quimioprotetora (raloxifeno e tamoxifeno), optou-se por este modelo animal, que seria ideal por apresentar dependência hormonal, como foi descrito por vários autores (Dao, 1969; Russo *et al.*, 1982, 1990, 2005a, 2005b; Van Zwieten *et al.*, 1984).

A carcinogênese nas mamas de ratas, segundo Russo e Russo (1997, 1998), ocorre sobretudo no epitélio dos ductos terminais, nos brotos alveolares ou no ducto terminal, que constituem a unidade ducto-lobular terminal em mulheres. O ducto terminal do lóbulo tipo 1 é o local mais comum de origem do carcinoma ductal. A replicação celular e a concentração de respostas estrogênicas tipo alfa são mais altas na adolescência nos lóbulos tipo 1, quando a glândula é mais suscetível à carcinogênese. Há evidências de que os carcinomas mamários surgem nas estruturas indiferenciadas, porém, as lesões benignas, como os adenomas, cistos e fibroadenomas, ocorrem em estruturas mais diferenciadas quando da exposição ao agente carcinogênico. Quanto mais diferenciada a estrutura na ocasião da exposição, mais benigna e diferenciada é a lesão. A alta

suscetibilidade dos ductos terminais para transformação neoplásica é atribuída a seu elevado índice proliferativo. Há um gradiente decrescente de atividade proliferativa dos ductos terminais para os lóbulos do tipo 3. A atividade proliferativa diminui com a idade, porém o gradiente de proliferação não se altera: os ductos terminais têm maior atividade do que os lóbulos do tipo 1. Estes têm atividade proliferativa maior do que os lóbulos do tipo 2, e estes maiores do que os lóbulos do tipo 3. A mama de nulíparas contém mais estruturas indiferenciadas (tipo 1), e a idade ou a menopausa não alteram estas características. Em mulheres que tiveram gestação e encontram-se na pré-menopausa, a estrutura predominante é a mais diferenciada, ou seja, o lóbulo tipo 3; porém, quando atingem a menopausa adquirem o mesmo padrão observado em nulíparas, segundo Russo *et al.* (1990, 2005a) e Russo e Russo (1997).

Quanto às características histológicas dos tumores de mamas induzidos em ratas, revelam similaridades com os da espécie humana (Van Zwieten *et al.*, 1984; Russo *et al.*, 1989, 1990, 1991; Greaves e Barsoum, 1990; Popesko *et al.*, 1990; Peray e Barthold, 1993; Turusov e Mohr, 1994; Cardiff e Wellings, 1999; Russo e Russo, 2000; Cardiff *et al.*, 2002). Observou-se que:

- a) os tipos histológicos são semelhantes;
- b) reagem de forma similar aos marcadores imuno-histoquímicos;
- c) o comportamento biológico é semelhante.

Esta similaridade estrutural e funcional permitiu e autorizou inúmeros trabalhos translacionais da pesquisa básica para a pesquisa em ser humano quanto ao câncer de mama.

Assim, a Conferência realizada em Hannover, na Alemanha, em 1987, resultou na classificação de lesão não neoplásica e neoplasia da glândula mamária de ratas em comparação a lesões da espécie humana, mostrando essa semelhança (Tabela 1).

Contudo, para Greaves e Barsoum (1990) e Russo *et al.* (1990); Russo e Russo (2000), alguns tipos histológicos de tumores de mama em ratas não são encontrados nem têm paralelo na mulher. Entre eles, destacam-se a lesão de Paget, subtipo esquirroso e medular e o tumor lobular invasivo ou *in situ*.

Os mesmos autores, também, referem que os tumores de mamas em ratas têm quadro histológico semelhante aos tumores ductais, mas raramente ocorre metástase. Aliás, esse modelo animal não serve para se estudar casos de metástases. A maioria dos tumores induzidos apresenta epitélio hiperplásico com papilomatose contendo células epiteliais com grau variável de atipias e, principalmente, histologia do tipo papilar e sólido. Em alguns casos, a distinção clara de invasão do tumor é difícil de ser feita, pois, estes tumores permanecem confinados adjacentes ao estroma.

Os tumores induzidos de mama nas ratas com aspectos de fibroadenomas ou adenomas são bastante semelhantes aos da espécie humana, mas têm ocorrência baixa.

Existem também marcadores imuno-histoquímicos específicos da célula mamária em rata que apresentam correspondência à do ser humano, em especial, para as células mioepiteliais e do epitélio luminal e à membrana basal (Tabela 2) (Russo *et al.*, 1990; Russo e Russo, 2000).

O potencial carcinogênico do estrogênio no tecido mamário foi sugerido em vários estudos clínicos (Harris *et al.*, 1996; Early, 2001, 2005) e também experimentais (Russo e Russo, 1997, 1998, 2004a; Charpentier *et al.*, 2000; Doisneau-Sixou *et al.*, 2003; Russo *et al.*, 2005a).

Constitui importante fator promotor da carcinogênese da célula mamária ao promover a proliferação celular, induzir o aumento da produção de receptores e incrementar a síntese de DNA nessas células (Russo e Russo, 2001; Hayashi *et al.*, 2003; Platet *et al.*, 2004; Shao e Brown, 2004).

Além disso, também, participa como agente indutor da carcinogênese mamária, ao expor metabólitos estrogênicos (derivados 16 α hidroxilado e 4OH metabólitos – catecóis – estrogênicos) com capacidade genotóxica ao DNA da célula mamária (Yager e Liehr, 1996; Liehr, 2000; Muti *et al.*, 2000; Liehr e Jones, 2001).

O estrogênio e os SERMs tamoxifeno e o raloxifeno apresentam efeitos biológicos complexos em vários tecidos, inclusive no tecido mamário, conforme a faixa etária e o estado menstrual (Russo *et al.*, 1990, 2005b; Lewis e Jordan, 2005).

Tabela 1 - Classificação de lesão neoplásica e não neoplásica da glândula mamária de rata em comparação ao tecido humano

	Lesão em Rata	Lesão em Humano
I	Neoplasia epitelial benigna: adenoma (papilífero, tubular, hiperplasia, lactífero)	Papiloma intraductal: adenoma lactífero Adenoma gestacional
II	Neoplasia epitelial maligna Carcinoma ductal a) Não invasivo cribriforme comedo sólido papilífero b) Invasivo cribriforme comedo sólido papilífero outras especificações	Carcinoma Ductal Carcinoma Ductal In Situ cribriforme comedo sólido papilífero Carcinoma Ductal Invasivo cribriforme comedo papilífero Carcinoma Infiltrativo Esquirroso Medular Colóide Carcinoma lobular Doença de Paget
III	Neoplasia Estromal Benigno Fibroma Maligno Fibrossarcoma	Benigno Fibroma Maligno Fibrossarcoma
IV	Neoplasia Epitelial-Estromal Benigno Fibroadenoma Maligno Carcinossarcoma	Benigno Fibroadenoma Filódes benigno Maligno Carcinossarcoma Tumor filódes maligno
V	Lesões não neoplásicas Normal, glândula lactífera Hiperplasia lobular Alterações císticas: ductal e lobular Hiperplasia epitelial	Normal, glândula lactífera Hiperplasia lobular de grávida e não grávida Alterações císticas: ductal e lobular Hiperplasia epitelial com e sem atipia

FONTE: Adaptado de Conferência de Hannover, 1987.

Tabela 2 - Marcadores imuno-histoquímicos de tecido mamário humano e de rata

Tipo celular ou estrutura	Antígeno	
	Humano	Rata
Células mioepiteliais	Actina	Actina
	Miosina	Miosina
	CALLA	CALLA
	gP180	NK
	Queratina 5	NK
	Queratina 14	Queratina 14
Células luminais	MFGM	MFGM
	Queratina 7	NK
	Queratina 8	Queratina 11
	Queratina 18	Queratina 18
	Queratina 18	NK
	Caseína	Caseína
	α -Lactalbumina	α -Lactalbumina
	Lactoferrina	Lactoferrina
Membrana basal	Laminina	Laminina
	Tipo IV	Tipo IV
	Fibronectina	Fibronectina
	Entactina	Entactina

FONTE: Adaptado de Russo *et al.* (1990,2000)

O principal mecanismo de ação dos hormônios esteróides na célula mamária (e, entre eles, os derivados estrogênicos) depende da difusão passiva da circulação para o núcleo da célula, onde ocorre sua ligação ao receptor estrogênico e interação do complexo receptor-estrogênico com o DNA da célula (pela ligação do elemento responsivo ao estrogênio e domínio de ligação hormonal do receptor).

Esta interação leva à transcrição da síntese de RNAm que, no interior de ribossomos, presentes no citoplasma da célula, promovem a tradução e a síntese de determinada proteína que atua no ciclo celular (Parker, 1995; Foster *et al.*, 2001; Klinge, 2001; Soto e Sonnenschein, 2001).

O receptor estrogênico pertence a uma superfamília de receptores hormonais esteróides que incluem os receptores de glicocorticóide (com 777 aminoácidos), progesterona (933 aminoácidos), aldosterona (984 aminoácidos), estrogênio (595 e 485 aminoácidos), tireoidiano (490 aminoácidos), e de ácido retinóico (462 aminoácidos) (Ribeiro *et al.*, 1995; Gustafsson e Warner, 2000; Tolon *et al.*, 2000).

Esses receptores têm domínios específicos, porém, apresentam certa similaridade em sua estrutura, como descreveram Thornton (2001) e Thornton *et al.* (2003) (Figura1).

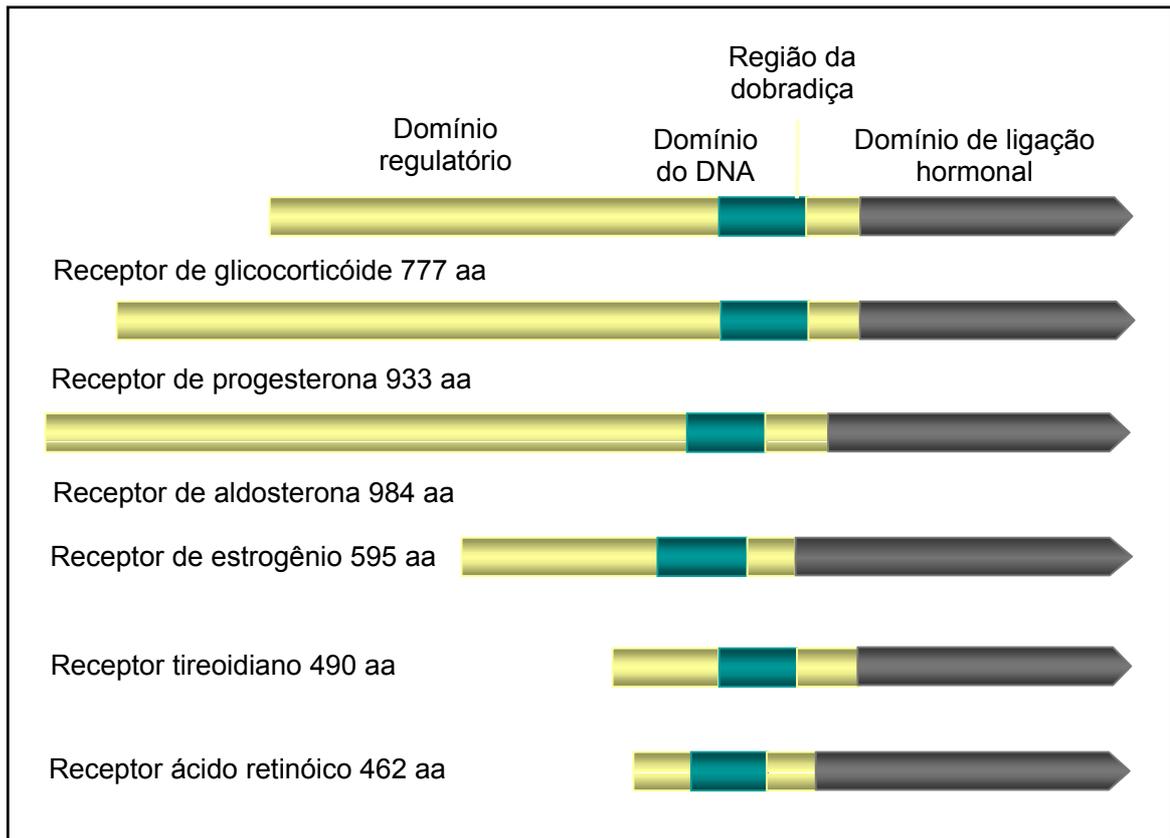


Figura 1 - Estrutura dos receptores hormonais esteróides (superfamília) (Adaptado de Speroff e Fritz, 2005)

Foram identificados dois receptores estrogênicos, designados de α (RE α) e β (RE β). O primeiro, descoberto por Jensen e Jacobson em 1962; teve sua seqüência de aminoácidos descrita por Green *et al.*, em 1986, por técnicas de DNA recombinante. Já o RE β foi isolado e caracterizado por Mosselman *et al.* (1996) e Kuiper *et al.* (1997).

Um terceiro receptor estrogênico (receptor gama) foi descoberto por Hawkins *et al.* (2000), em células de peixe teleósteo. Conforme Ariazi *et al.* (2002), existem ainda dificuldades em sua melhor caracterização quanto à sua estrutura e eventual semelhança ao RE α e RE β .

Os receptores estrogênicos apresentam seis regiões (A, B, C, D, E, F) e cinco domínios (AB, domínio regulatório; C, domínio de ligação ao DNA; D, domínio dobradiça; E, domínio de ligação hormonal; F, domínio carboxi terminal), segundo Kuiper *et al.* (1997), White e Parker (1998), Hall *et al.* (2001), Sommer e Fuqua (2001), McDonnell e Norris (2002).

Os receptores estrogênicos α e β apresentam similaridade na seqüência de aminoácidos em seus respectivos domínios (Brandenberger *et al.*, 1997; Enmark *et al.*, 1997; Hawkins *et al.*, 2000; Ariazi *et al.*, 2002; Weihua *et al.*, 2003). Assim, há semelhanças nos domínios regulatórios (18%), de ligação ao DNA (96%), da dobradiça (30%), de ligação hormonal (53%) e no da região F (18%) (Figura 2).

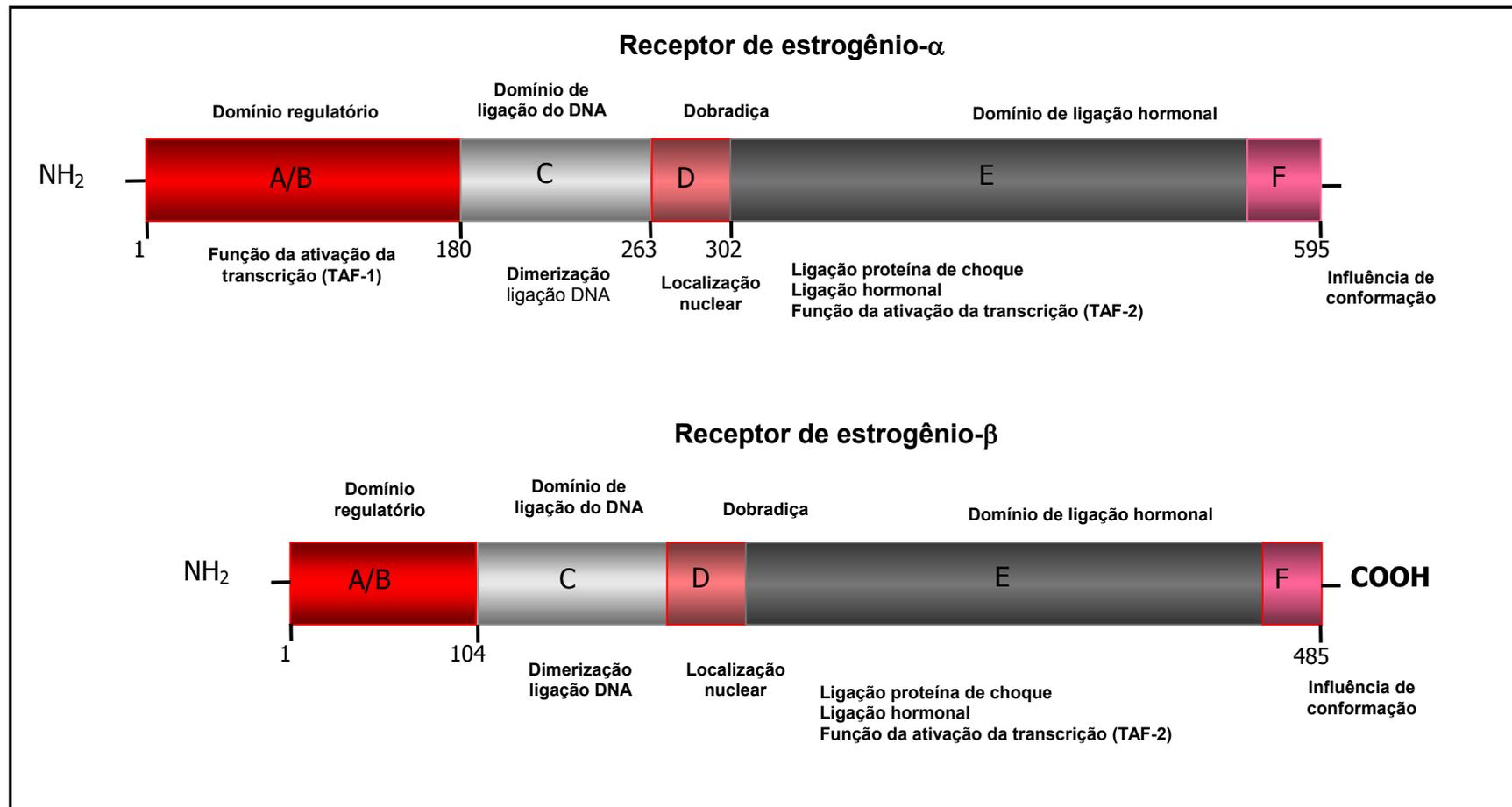


Figura 2 - Estrutura do RE α e β (Adaptado de Speroff e Fritz, 2005)

Existem, também, diferenças nas estruturas do RE α e do RE β que determinam diferentes ações e diferenças quanto à sua distribuição em tecidos e órgãos específicos (Brandenberg *et al.*, 1997; Rollerova e Urbancikova, 2000; Shaw *et al.*, 2002; Speirs *et al.*, 2002).

A região AB (ou domínio regulatório) do RE é a área aminoterminal que contém sítios de fosforilação, chamados de TAF₁ (Função de ativação de transcrição) que podem estimular a transcrição mesmo na ausência da ligação hormonal no RE α . No RE β , a área de TAF₁ é inativa ou ausente, como relataram Kuiper *et al.* (1997), Warner *et al.* (1999) e Loven *et al.* (2004).

A região C (ou domínio de ligação do DNA) apresenta área de dois dedos de zinco, que é essencial para a ativação da transcrição (Freedman, 1992; Hyder *et al.*, 1995). Esta área sofre mudança em sua conformação induzida pelo estrogênio (ou molécula efetora) e liga-se ao elemento responsivo desse esteróide, determinando respostas diferentes, conforme a expressão genética distinta de cada célula-alvo.

A região D (ou área de dobradiça) contém área de sinalização importante na movimentação do receptor do núcleo para o citoplasma e, também, por sua rotação contribui para a mudança de sua conformação.

A região E (ou domínio de ligação hormonal) é a área de ligação da molécula efetora (estrogênio e SERM) e é ainda responsável pela dimerização dos receptores (homodímeros ou heterodímeros). Contém a área de TAF₂ (Função de Ativação de Transcrição), cuja atividade total depende da ligação hormonal (ao contrário do TAF₁) (Wurtz *et al.*, 1996).

A região F (ou de domínio carboxiterminal) é a que modula a transcrição gênica dos estrogênios e dos SERMs, por alterar a conformação espacial; exerce papel fundamental na eficácia dos SERMs ao suprimir a transcrição (Montano *et al.*, 1995; Teutsch *et al.*, 1995). A região F afeta a atividade das áreas TAF1 e TAF2 por alterar sua conformação.

O RE, na ausência da molécula efetora, associa-se a um complexo multiprotéico de chaperonas e permanece inativo (pelas proteínas de choque, com destaque para a hsp 90) (Parker, 1995) (Figura 3).

A presença da molécula efetora (estrogênio ou outra molécula) leva a mudança na conformação do RE, com a sua dimerização e potencial para interagir com proteínas coativadoras e corressoras do TAF1 e TAF2 (Webb *et al.*, 1992; Murphy, 1994; Cavailles *et al.*, 1995; Horwitz *et al.*, 1996; Mckenna e O'Malley, 2002).

Tanto o estradiol como o tamoxifeno e o raloxifeno, induzem a mudanças diferentes na conformação do RE (Brzozowski *et al.*, 1997; Melamed *et al.*, 1997; Tanenbaum *et al.*, 1998; White e Parker, 1998; Osborne e Schiff, 2003). Dessa forma, podem ter respostas diferentes quanto à sua atividade agonista/antagonista.

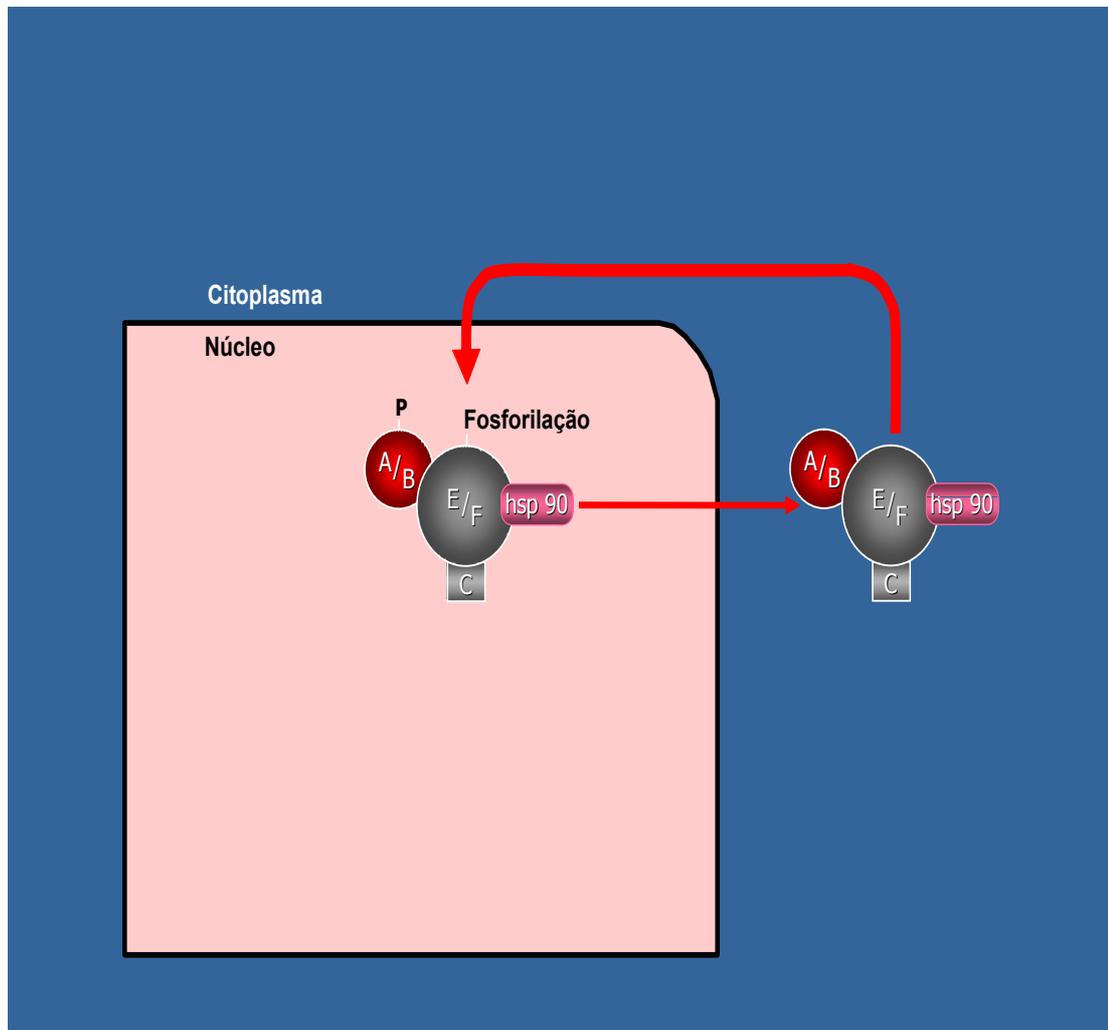


Figura 3 - Receptor de estrogênio inativado pelo complexo chaperona (Adaptado de Speroff e Fritz, 2005)

Este mecanismo de ativação do RE pode ser efetuado também na ausência da molécula efetora pela sua fosforilação desse receptor (O'Malley *et al.*, 1995; Feng *et al.*, 2001). A fosforilação pode ser decorrente de receptores de membrana celulares ativados ou por fatores de crescimento (como EGF, IGF1 e TGF α), que ativam as proteínas quinases e estas, por sua vez, ativam o RE, levando a uma atividade independente, a sinergismo com ação agonista/antagonista ou à ativação de proteínas coativadoras.

Por fim, segundo esses mesmos autores, os fatores que determinam a atividade biológica do RE dependem de:

- a) afinidade da molécula efetora pelo domínio de ligação hormonal do receptor;
- b) expressão diferencial do tecido-alvo, quanto aos subtipos de receptores (Re α e Re β);
- c) conformação espacial do complexo receptor-ligante e da modulação das proteínas;
- d) expressão diferencial do tecido-alvo à fosforilação e às proteínas adaptadoras.

O tamoxifeno é uma substância não-esteróidica semelhante ao clomifeno, com ação estrogênica ou antiestrogênica, parcial ou total, conforme a célula-alvo e a dose.

Sintetizado em 1966, originalmente, foi desenvolvido com a finalidade anticoncepcional, mas, pelo contrário, demonstrou-se que induzia a ovulação.

Constitui, pois, um modulador seletivo do receptor de estrogênio de primeira geração (SERM) (Figura 4). Desde a publicação clássica de Beatson, em 1896, mostrando exemplos de tumores de mama inoperáveis que regrediam com a ooforectomia, a hormonioterapia ganhou realce na terapêutica do câncer de mama.

O uso do tamoxifeno no câncer de mama metastático foi descrito em meados de 1970 (Morgan *et al.*, 1976; Manni *et al.*, 1979); rapidamente, veio a se constituir em medicamento de escolha para o tratamento de tumores avançados. Foi aprovado, para esse fim, em 1977, pela Food Drug Administration. Apresentava resposta favorável em 20% a 56% dos casos, mas com melhor tolerabilidade do que altas doses de estrogênios, acetato de megestrol, bem como a adrenalectomia (Morgan *et al.*, 1976; Westerberg *et al.*, 1976; Rose e Mouridsen, 1984; Ingle *et al.*, 1986).

As experiências favoráveis quanto ao uso do tamoxifeno nos casos portadores de metastáse de câncer de mama propiciaram sua utilização na terapia adjuvante em vários ensaios clínicos, com resultados também favoráveis (grupo Early, 2001 e 2005; e Fisher 1994 – NSABP B14). Em síntese, o impacto do tamoxifeno no tratamento do câncer de mama é prolongar a sobrevida livre de doença e a sobrevida global, com resultados positivos que oscilam de 30% a 45%; sendo mais evidente nas mulheres com idade acima de 50 anos. As taxas de resposta para os casos avançados alcançam valores de 30% a 40% e de 75% em tumores fortemente positivos para RE.

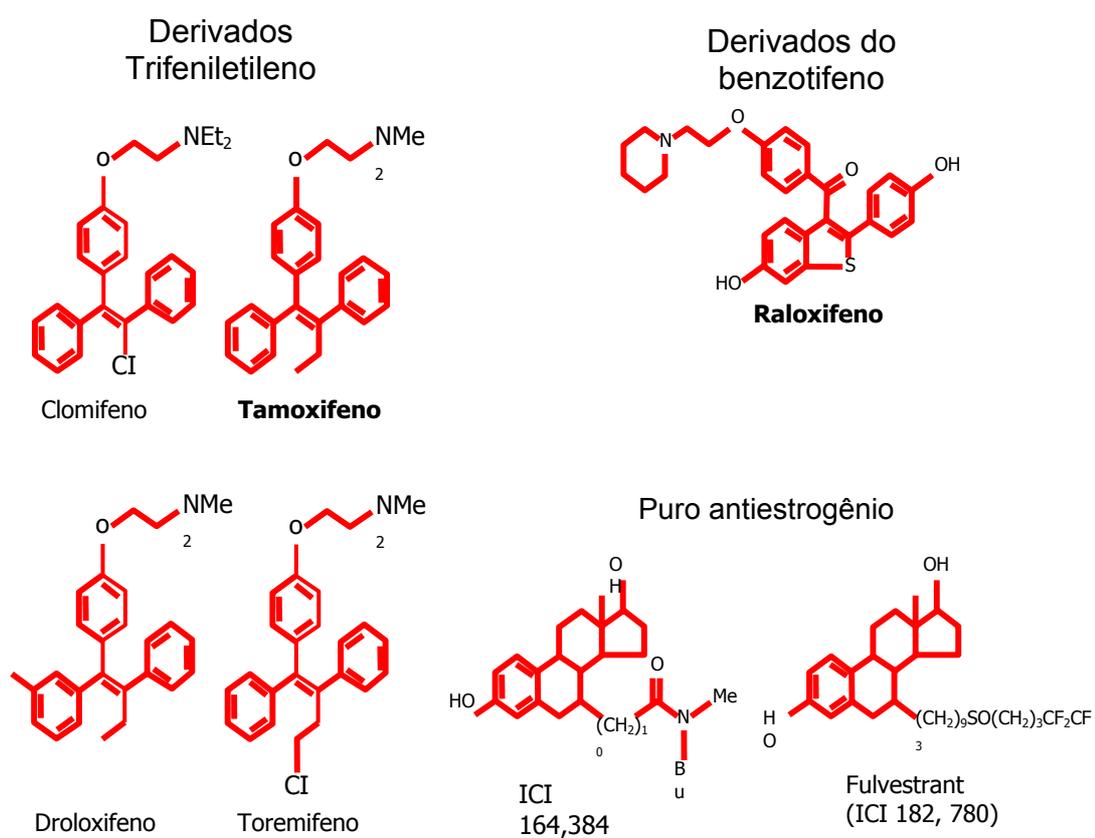


Figura 4 - Estrutura química dos SERMs (Adaptado de DeVita, Hellman, Rosenberg, 2004)

Por todas essas características, é a substância de primeira escolha para as pacientes pré-menopáusicas RE positivo na terapia adjuvante e, também, pode ser usado nas pós-menopáusicas com RE positivo na terapia adjuvante na ausência ou dificuldade de se usar inibidor da aromatase, que nesses casos apresenta eficácia superior, segundo Nabholz *et al.* (2000), Mouridsen *et al.* (2001), Schmid *et al.* (2003) e Goss *et al.* (2003).

O principal mecanismo de ação do tamoxifeno na célula mamária é bloquear o RE (Figura 5), alterando a transcrição dos genes regulados pelos estrogênios (Berry *et al.*, 1990; Katzenellenbogen *et al.*, 1995; Somer e Fuqua, 2001; Jordan, 2003; Osborne e Schiff, 2003).

Liga-se à área de domínio da ligação hormonal, inativando a área TAF₂, ao modificar sua conformação espacial (Halachmi *et al.*, 1994; Landel *et al.*, 1994, 1997; Shang *et al.*, 2000; Tamrazi *et al.*, 2003; Glaeser *et al.*, 2006). No endométrio, no fígado e no osso, porém, ativa a região TAF₁, induzindo ação promotora agonista (Tzukerman *et al.*, 1994; Katzenellenbogen *et al.*, 1995; Bentrem *et al.*, 2001).

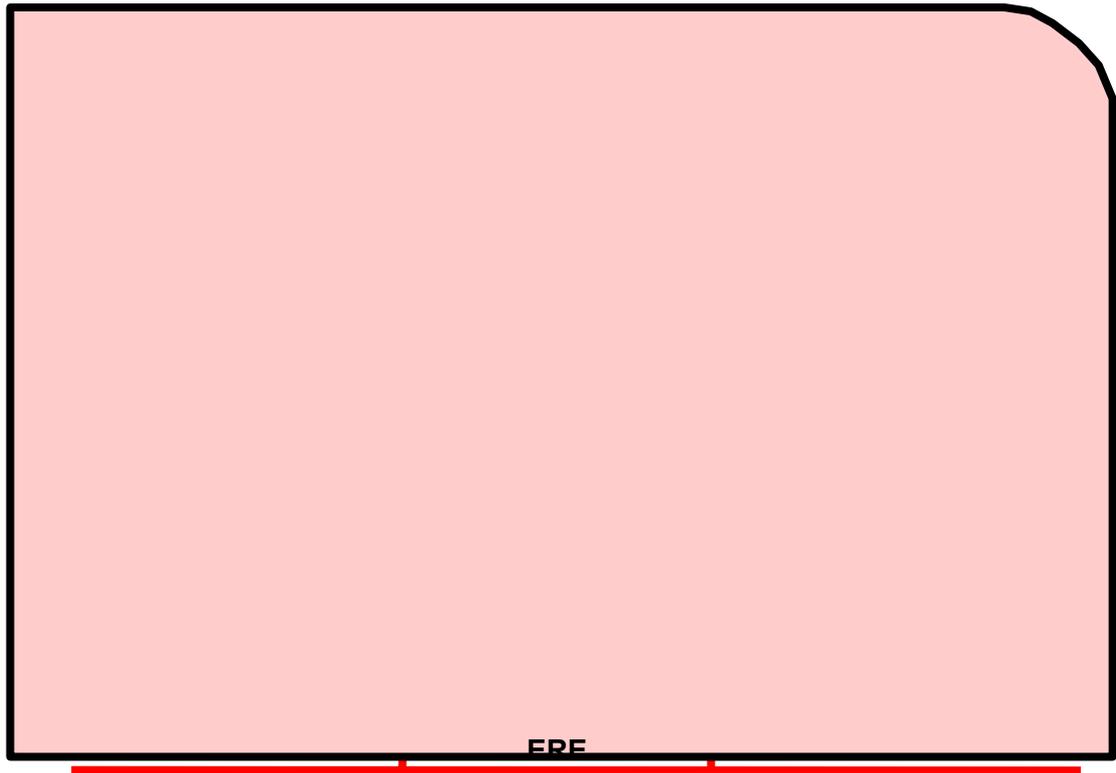


Figura 5 - Mecanismo de ação do tamoxifeno no RE (Adaptado de Speroff e Fritz, 2005)

O tamoxifeno, também, possui atividade mediada por fatores de crescimento que bloqueiam a proliferação da célula mamária, ao estimular a secreção de TGF β e diminuir a de IGF₁ e IGF₂ pela célula mamária, pelo fibroblasto e pelo estroma (Coletta *et al.*, 1994; Murphy, 1994; Benson *et al.*, 1996).

Por meio de ação não mediada via RE, pode inibir a atividade da proteína C quinase (fosforilação) e inibir a ação da calmodulina dependente de AMPc fosfodiesterase (Coletta *et al.*, 1994; Fujimoto e Katzenellenbogen, 1994; Kallen *et al.*, 2004), o que explicaria sua atuação favorável em tumores com RE negativos.

O raloxifeno é uma substância não esteróidica, derivado do benzotrofeno inicialmente desenvolvida para atuar como agente antitumoral contra o câncer de mama (Black *et al.*, 1983). Tem ação antiestrogênica, agonista e antagonista, parcial ou total, constituindo um SERM de segunda geração.

Parece ter os mesmos sítios específicos do RE, com ação agonista e/ou antagonista semelhante à do tamoxifeno, contudo não apresenta ação proliferativa endometrial (Morello *et al.*, 2002, 2003). Além disso, é um SERM que, ao interagir com o RE, promove diferente conformação espacial e ação antagonista na célula mamária mediada pelo bloqueio da região TAF-2; e na célula endometrial destaca-se a ação antagonista da região TAF1 (Berry *et al.*, 1990; Tzukerman *et al.*, 1994; Katzenellenbogen *et al.*, 1995; Brzozowski *et al.*, 1997; Paech *et al.*, 1997; Levenson e Jordan, 1998;

Bentrem *et al.*, 2001; Levenson *et al.*, 2002; Glaeser *et al.*, 2006; Fan *et al.*, 2007).

Como o raloxifeno não promoveu resultados tão favoráveis nos casos de tumores de mama resistentes ao tamoxifeno, poucas pesquisas clínicas foram direcionadas nesse sentido (Buzdar e Hortobagyi, 1998). Entretanto, foi aprovado pelo FDA, em 1998, para o tratamento de osteoporose em mulheres pós-menopáusicas (Balfour e Goa, 1998; LufKin *et al.*, 1998). Diversos estudos mostraram melhora da densidade mineral óssea (Cummings *et al.*, 1999; Martino *et al.*, 2004; Barrett-Connor *et al.*, 2006; Vogel *et al.*, 2006).

Esses mesmos ensaios clínicos revelaram haver tendência de ação quimioprotetora do raloxifeno contra o câncer de mama.

Em relação aos mecanismos propostos para explicar a mínima atividade agonista no útero, destaca-se o mecanismo de seletividade tecidual, quanto ao tipo e forma do receptor e interação com coativadores (Nilsson e Koehler, 2005; Fan *et al.*, 2007).

Diferentes moléculas efetoras podem produzir conformações distintas do RE, que determinam atividades biológicas diferentes. Quando a molécula efetora entra no núcleo da célula e liga-se ao RE, o complexo RE-ligante sofre dimerização, produzindo configuração específica. Os dímeros ligam-se a coativadores específicos e ao elemento responsivo de hormônio com ação gene-alvo específica. Os coativadores reconhecem somente configurações ligante-receptor específico.

Foram identificadas mais de dez coativadores, entre eles, o SRC-1, TIF2, CBP/p300 e P/CAF. Esses coativadores, que são expressos em um único tipo de tecido, como o útero, podem modificar a resposta biológica (Chen *et al.*, 1997, 2004; Li *et al.*, 1997; Edwards, 2000; Demayo *et al.*, 2002; Mukherjee *et al.*, 2006).

Desde a publicação célebre de Watson e Crick, em 1953, explicando a estrutura química, de dupla hélice, do DNA e sua característica específica (molécula esta que é a base da hereditariedade e que forma os genes), inúmeras descobertas permitiram o desenvolvimento da biologia molecular e genética.

Entre esses marcos fundamentais na investigação genética, destaca-se a produção laboratorial da seqüência gênica de DNA de plasmídios (levando à expressão destas seqüências gênicas), por Cohen *et al.*, em 1973, bem como o desenvolvimento da técnica de PCR (*Polymerase chain Reaction* = Reação em Cadeia de Polimerase) por Saiki *et al.*, em 1985, que permitiram a amplificação de quantidades mesmo diminutas de RNA ou DNA.

O Projeto Genoma Humano iniciado, em 1990, e ao seu término em 2000, identificou cerca de 30 mil a 40 mil genes na espécie humana, deu grande impulso ao desenvolvimento da técnica de perfilamento genético. Esta permite a avaliação simultânea de vários genes e suas expressões (com suas respectivas assinaturas genéticas ou moleculares) de determinado tecido ou órgão (ou tumor, no caso) (Ganguly *et al.*, 2001).

Em 1995, o grupo coordenado por Venter (Celera Genomics) seqüenciou o genoma de *Haemophilus influenzae* e *Mycoplasma genitalium*

(Fraser *et al.* e Fleischmann *et al.*, 1995). Surgiu, desde então, o termo genômica, ou seja, o estudo da estrutura e funcionamento do material genético total (genoma) de um determinado organismo.

A técnica de “*microarray*” ou “*chip*” de DNA baseia-se, sobretudo, no princípio da hibridização, na qual fragmentos de ácidos nucleicos são marcados com radioisótopos (sondas-primers) e hibridizados com ácidos nucleicos imobilizados em um suporte sólido (Velculescu *et al.*, 1995; Lander, 1996; Debouck e Goodlellow, 1999; Duggan *et al.*, 1999).

Constitui uma das melhores alternativas para a análise quantitativa de milhares de genes simultaneamente, permitindo a avaliação global da expressão gênica do organismo, tecidos ou células em diferentes situações (fisiológicas ou patológicas) (Schena *et al.*, 1995; Diatchenko *et al.*, 1996; Carulli *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1998; Afshari *et al.*, 1999; Lockhart e Winzeler, 2000; Willard *et al.*, 2000; Bertucci *et al.*, 2003a, 2003b; Huang *et al.*, 2004). Pode, também, ser usada na identificação de alterações variadas em genomas da mesma espécie.

Atualmente, existem muitos arquivos (bibliotecas) de DNA, no qual o DNA complementar (cDNA) é sintetizado a partir de RNA mensageiro (RNAm) obtido de células cujo gene pesquisado estava ativo, como mostraram os autores Claverie (1999), Gerry *et al.* (1999) e Lockhart e Winzeler (2000). Nesta técnica, a obtenção de cDNA serve de base para a criação de um conjunto de oligonucleotídeos específicos que expressam os genes do tecido em interesse. Esses oligonucleotídeos são marcados e fixados em uma membrana. Assim, a partir do RNAm de um tecido tumoral

ou de um tecido que se queira estudar, sintetiza-se o cDNA, marcando-o com nucleotídeos fluorescentes ou o próprio RNAm pode ser marcado e servir como sonda. Ocorre a hibridização (do molde com a sonda) e, após a lavagem, as moléculas não pareadas são eliminadas, enquanto as moléculas pareadas aderem-se à membrana e formam imagens específicas (Chen *et al.*, 1998; Goodfellow, 1999; Johnson e Lin, 2002; Kaminski e Friedman, 2002).

A grande quantidade de dados gerados (sinais fluorescentes) pelo experimento de *microarray* necessita da utilização de programas computadorizados específicos para a análise dessas imagens e tratamento matemático da intensidade dos sinais fluorescentes emitidos, além do gerenciamento e armazenamento desses dados (Liang e Pardee, 1998; Wittes e Friedman, 1999; Meade *et al.*, 2006).

Existem basicamente duas estratégias estatísticas para se avaliar as informações obtidas dos milhares de sinais emitidos, de forma computadorizada: a) análise supervisionada - onde determinado grupo de alteração (doença, no caso) apresenta certa evolução (pior ou melhor) que é correlacionada às análises das placas correspondentes, gerando padrões específicos nas assinaturas genéticas; b) análise não supervisionada, onde o próprio computador fornece padrões específicos de expressão gênica (independente da evolução da patologia) e o mesmo tenta relacionar com determinado grupo de patologia ou determinada evolução (pior ou melhor) (Schena *et al.*, 1995; Liu, 2004, 2005).

As sondas de cDNA produzidas a partir de RNAm também podem ser amplificadas pela técnica de PCR, denominadas, neste caso, de RT-PCR, pois, as moléculas de cDNA amplificadas foram obtidas a partir da com base na transcrição reversa do RNAm pela ação da enzima transcriptase reversa.

Em razão da alta complexidade e variabilidade da técnica de *microarray*, torna-se necessária sua validação por meio de outros experimentos, como o Northern Blotting ou RT-PCR quantitativo, como confirmaram Schulze e Downward (2001) e Holloway *et al.* (2002).

Assim, o potencial tecnológico do método *microarray* para o estudo de processos tumorais é imenso, mas seus resultados, para serem validados necessitam de rigor na análise de seus dados e, em geral, experimentos adicionais são requeridos.

Em nosso experimento, parte dos objetivos específicos foi aquilatar a ação quimioprotetora do tamoxifeno e do raloxifeno na carcinogênese mamária de ratas em fase adulta, avaliando a via de expressão angiogênica pelo método RT²-PCR Array (Reação em Cadeia de Polimerase por Transcriptase Reversa em Tempo Real) em cada grupo e suas diferenças.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a ação de dois moduladores seletivos de receptores de estrogênios (tamoxifeno e raloxifeno) na prevenção primária do câncer de mama em ratas adultas submetidas à carcinogênese química, pelo dimetilbenzantraceno (DMBA).

3.2 Específicos

- a) Estudar as características morfológicas e anatomopatológicas dos tumores induzidos.
- b) Analisar a expressão de receptores de estrogênio e a atividade proliferativa por meio da expressão imuno-histoquímica do Ki-67 das neoplasias em cada grupo.
- c) Avaliar fatores envolvidos no processo de expressão angiogênica pelo método RT² PCR Array (Reação Cadeia Polimerase por Transcriptase Reversa em Tempo Real) em cada grupo e suas eventuais diferenças.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram estudadas as mamas de 60 ratas, virgens, da raça Sprague-Dawley, com idade adulta, homogêneas, que chegaram ao laboratório (LIM58-FMUSP) (Figuras 6A e 6B) com peso médio semelhante e com idade de 30 a 40 dias de vida. Todas as ratas, na faixa de idade de 40 a 50 dias de vida, receberam para indução de carcinogênese mamária química, dose única de dimetilbenzantraceno (DMBA) (20mg por via oral, por gavagem), estabelecido por McCormick *et al.* (1982) e Russo *et al.* (1990, 2004b) (Figura 7).

As ratas foram divididas em três grupos:

- Grupo 1 (controle): 20 ratas que receberam apenas indução química com DMBA (Figura 8), na faixa etária de 40 a 50 dias de vida;
- Grupo 2: 20 ratas que foram tratadas com tamoxifeno, desde 10 dias antes, até 80 dias depois da indução química com DMBA (Figura 9), na dose de 0,1 mg por dia, por via oral, dose considerada quimioprotetora, segundo McCormick *et al.* (1982), Jordan *et al.* (1990, 1991) e Russo *et al.* (1990, 2004b);
- Grupo 3: 20 ratas que foram tratadas com raloxifeno, desde 10 dias antes, até 80 dias depois da indução química com DMBA (Figura 10), na dose de 0,1 mg por dia, por via oral; segundo Black *et al.* (1983), Gottardis e Jordan (1987), Russo *et al.* (2004b).



Figuras 6A e 6B - Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Ginecologia (LIM 58) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo



Figura 7 - Administração por gavagem das substâncias

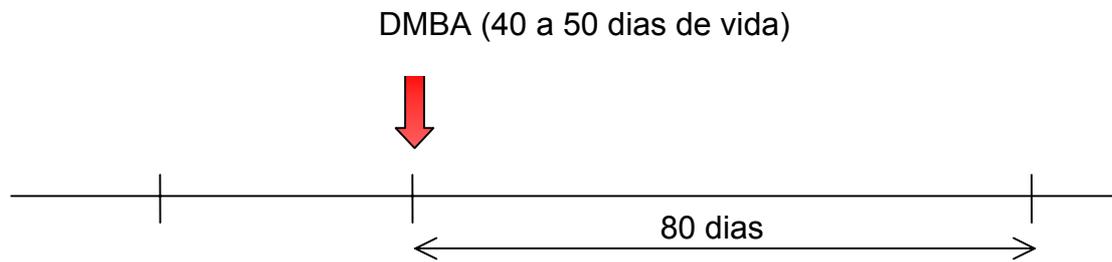


Figura 8 - Grupo 1 - DMBA

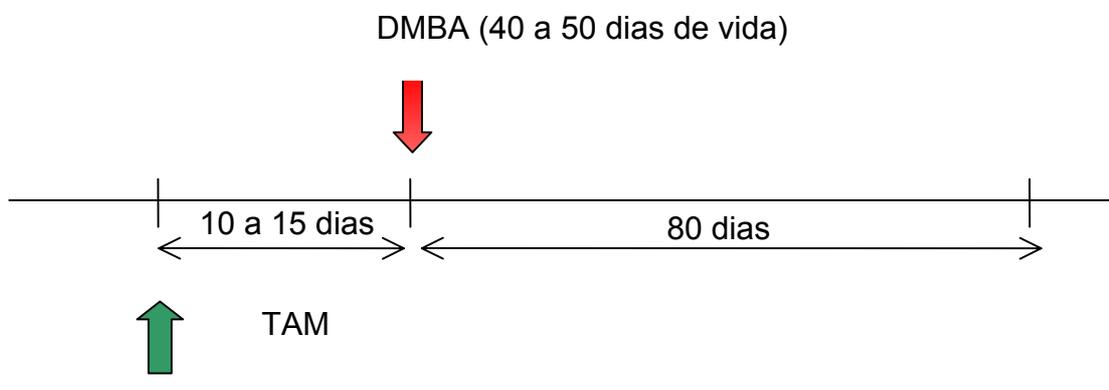


Figura 9 - Grupo 2 - Tamoxifeno

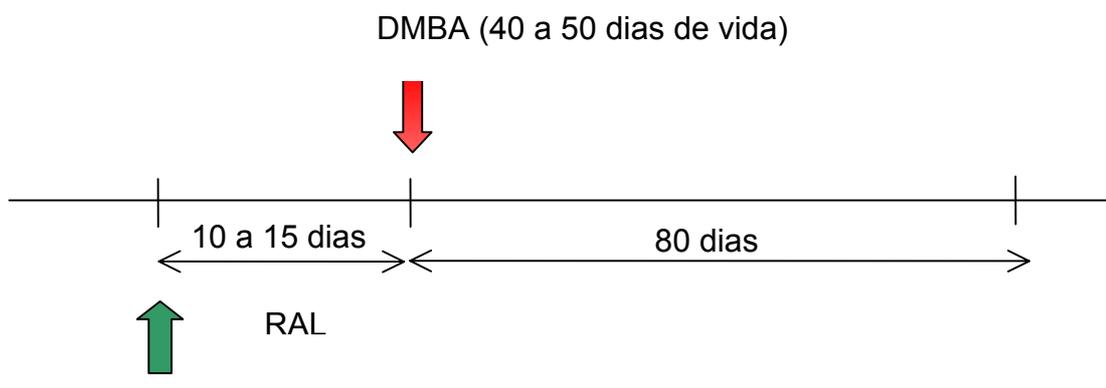


Figura 10 - Grupo 3 - Raloxifeno

Cada animal foi seguido, mediante o controle e preenchimento de uma ficha operacional onde foram anotados os dados, entre eles, os pesos no início do tratamento, durante o tratamento e no sacrifício do animal (Anexos A, B, C). Três vezes por semana, após a indução química, até 100 dias desse procedimento, as ratas tiveram suas mamas examinadas e a mama excisada para confirmação histopatológica da transformação carcinomatosa.

Em cada grupo, foram pesquisados:

1. porcentagem de ratas que desenvolveram carcinoma de mama;
2. intervalo em dias entre indução e aparecimento do carcinoma;
3. número de tumores em cada rata por grupo;
4. diâmetro tumoral da mama em cada animal;
5. caracterização histopatológica das neoplasias formadas em cada grupo;
6. porcentagem de célula neoplásica RE positivo;
7. porcentagem de células neoplásicas positivas para Ki-67;
8. porcentagem de células RE positivas no tecido mamário não neoplásico;
9. fração de células Ki-67 no tecido mamário não neoplásico;
10. avaliação dos fatores envolvidos no processo de expressão angiogênica pelo método de RT² PCR Array das neoplasias formadas em cada grupo.

Para avaliação imuno-histoquímica do receptor estrogênico das amostras de mamas das ratas foram utilizados o Kit clone id-5 (Dako®) e,

para avaliação da porcentagem de células Ki-67, empregou-se o clone MIBI-7 (Dako®).

No Kit RT² PCR Array- APR-024A (da empresa SuperArray Bioscience Corporation), (Kit para Reação Cadeia Polimerase por Transcriptase Reversa em Tempo Real), avaliamos o processo de angiogênese específica para ratas por intermédio da expressão de 84 genes angiogênicos, divididos em dois subgrupos: fatores angiogênicos e outros fatores envolvidos na angiogênese.

Os fatores angiogênicos propriamente ditos avaliados foram:

- a) fatores de crescimento e receptores: Angpt1 (Agpt), Bai1, Col18a1, Ctgf, Ereg, Fgf1, Fgf2, Fgf6, Fgf16, Fgfr3, Figf (Vegf-d), Flt1, Fzd5, Itgav, Jag1, Kdr, Nrp, Pgf, Tek, Vegf, Vegfb, Vegfc;
- b) moléculas de adesão: Col18a1, Ctgf, Eng, Itga5, Itgav, Nrp, Tek;
- c) proteases, inibidores e outras proteínas de matriz: Anpep, Col4a3, Fn1, Mmp19, Serpinb5, Serpinf1;
- d) fatores de transcrição e outros: Agpt2 (Angpt2), Epas1, Mapk14, Tbx4.

Os outros fatores envolvidos na angiogênese e avaliados foram:

- a) citocinas e quimoquinas: Ccl2, Cxcl1 (GRO), Cxcl2 (GRO2), Cxcl9, Ifna1, Ifnb1, Ifng, Il1b, Il6, Tnf;
- b) outros fatores de crescimento e receptores: Edg1, Efna5, Egf, Hgf, Igf1, Itgb3, Lep, Mdk, Npr1, Nrp2, Pdgfa, Pdgfb, Tgfa, Tgfb1, Tgfb2, Tgfb3, Tgfbr1;

- c) moléculas de adesão: Cdh5, Itgb3, Lama5, Nrp2, Pecam, Thbs4;
- d) proteases, inibidores e outras proteínas de matriz: Ecgf1, F2 (CF-2), Mmp2, Mmp3, Mmp9, Plau, Plg, Timp1, Timp2, Timp3;
- e) fatores de transcrição e outros: Akt1, Efna1 (Ephrin A1), Efna2, Hif1a, Id1, Id3, Lect1, Ptgs1, Sphk1.

4.1 Manuseio com os animais

Os animais foram mantidos em gaiolas climatizadas próprias para roedores, com as condições ideais de temperatura, umidade e claridade.

Foram alimentados com ração peletizada e balanceada (com porcentagem de gordura em torno de 5% no total de ingesta calórica) e água à vontade (Clark *et al.*, 1997; Barros *et al.*, 2001a, 2001b, 2003).

Os animais foram sacrificados em câmara fechada de CO₂ e O₂. Este método não é doloroso e os animais não têm sensação de hipóxia.

As mamas dos animais foram removidas e processadas para estudo anatomopatológico. Depois, os animais foram encaminhados para incineração.

4.2 Manutenção dos animais

4.2.1 Alojamento

As ratas foram alojadas em gaiolas seguras para evitar ferimentos, fugas e penetração de animais externos e permitir fácil higienização. A população foi numericamente adequada para atender as necessidades básicas de alimentação e hidratação. Um rato adulto de 300 g necessita de espaço de 250cm³ e, uma fêmea com filhotes, de 1000 cm³. O forro da gaiola, pode ser de maravalha de madeira, papel ou sabugo de milho picado, deve ser trocado a cada dois dias. Em nosso estudo, utilizamos maravalha de madeira.

A iluminação ideal no local deve ser de 323 lumes/m³, a um metro acima do piso, e sob um ciclo de 12 horas dia e 12 horas noite. A iluminação prolongada de intensidade excessiva pode causar lesão retiniana, principalmente em ratos albinos. Em nosso estudo utilizamos temporizador para mimetizar o espaço dia e noite de forma mais adequada.

A ventilação do ambiente é imprescindível. Há acentuada formação do gás amônia em decorrência da decomposição bacteriana de fezes e urina, que pode provocar lesões no epitélio respiratório dos animais. Em nosso estudo, as gaiolas foram condicionadas em estante climatizada que mantinha a temperatura, a umidade e a ventilação dentro das normas recomendadas (Figura 11).



Figura 11 - Estante climatizada para manutenção da temperatura, umidade e ventilação dos animais

A temperatura foi mantida entre 18° e 26°C, e a umidade do ar em torno de 40% a 70%, como medida preventiva de necrose de membros ou cauda que podem ser conseqüência de baixa umidade do ambiente e para melhor conforto do animal. Pitalismo ou sufocamento pode refletir calor excessivo. Alterações como dispnéia e pneumonia podem ser devidas a excesso de amônia no ambiente por má ventilação. Em nosso estudo, nenhum animal apresentou tal alteração (Barros *et al.*, 2003; Schanaider e Souza, 2003; Kolar, 2006).

4.2.2 Alimentação

A rata adulta necessita de 5g de ração e 10 ml de água por 100g de peso por dia. A água pode ser fornecida à vontade e a ração mais utilizada é a peletizada e balanceada, no caso o teor de gordura era de 5% do total.

Desequilíbrio nutricional pode acarretar ganho ponderal inadequado, suscetibilidade a doenças, infertilidade, mortalidade, anemia, doenças ósseas, agalactia e distúrbios neurológicos que podem influenciar no resultado final da pesquisa. Em nossa pesquisa, nenhum animal ficou doente ou sofreu desequilíbrio nutricional e todas as ratas tiveram a mesma alimentação e hidratação (Barros *et al.*, 2001a, 2001b, 2003; Schanaider e Souza, 2003; Kolar, 2006).

4.2.3 Identificação

A identificação individual dos animais é detalhe muito importante, porque nem sempre é suficiente a identificação externa das caixas, pois as

fugas dos animais não são raras. Existem muitas maneiras de se identificar individualmente os animais: identificação pelo padrão individual da pelagem, aplicação de tinta sobre a pele e pêlos, perfuração do pavilhão auricular, colocação de brincos, amputação de falanges e tatuagens. Em nosso estudo, cada gaiola apresentava, no máximo, quatro ratas, que eram identificadas por: rata1 - nenhuma perfuração auricular; rata2 - uma perfuração auricular; rata3 - duas perfurações auriculares e, quando necessário, a rata 4 era identificada com uma perfuração auricular e duas perfurações no pavilhão auricular contralateral. Além disso, cada caixa também era identificada quanto ao número de animais, tipo de droga e quando foi iniciado o experimento.

4.2.4 Sacrifício dos animais

Quando necessário sacrificar o animal, deve-se escolher um método que seja rápido e não cause dor ou medo. Existem métodos químicos e físicos.

O método mais utilizado é a inalação de CO₂ (dióxido de carbono) em câmara fechada, segundo Black *et al.* (1994). Em nosso estudo, utilizamos o método da câmara fechada de inalação de dióxido de carbono. O CO (monóxido de carbono) pode ser usado da mesma maneira e tem a vantagem de provocar perda da sensação dolorosa e morte mais rápida (Richardson e Flecknell, 2005). Métodos físicos devem ser realizados com os animais sedados ou levemente anestesiados. Existem comercialmente equipamentos para deslocamento cervical ou decapitação. A decapitação

com guilhotina poder ser usada quando se necessita de sangue ou tecido orgânicos sem contaminação química (Barros *et al.*, 2001a, 2001b, 2003; Gauthier e Griffin, 2005; Kolar, 2006).

4.3 Coleta de tecido mamário

A coleta de tecido mamário normal ou tumoral em roedores segue os mesmos preceitos da coleta em humanos. Os procedimentos são realizados sob anestesia, quando se deseja que o animal permaneça vivo após o procedimento, ou como procedimento terminal após eutanásia ou morte espontânea durante o transcorrer do experimento.

Utilizamos o método de câmara fechada de CO₂ para sacrifício dos animais, para o exame histopatológico, parte do material foi fixada em formol a 10% e, posteriormente, processado e a outra parte foi colocada imediatamente em nitrogênio líquido a -70°C para criopreservação, até posterior processamento.

Neste estudo, a análise dos fatores envolvidos no processo de angiogênese foi avaliada pelo método RT² PCR Array (Kit APR-024A da empresa SuperArray Bioscience Corporation) e foram utilizados mRNA extraídos dos tumores formados nas ratas em cada grupo.

4.4 Preparo prévio das amostras de tumor

As amostras de cada tumor foram colocadas em tubo separadamente para serem homogeneizadas no aparelho Poytron PT-3100, que é um disruptor de células a uma velocidade de 25.000 rpm, e misturadas em um tubo contendo 1,0 ml de TRIZOL® (Invitron), para posterior extração do RNA.

4.5 Extração de mRNA

As amostras de tumores das ratas em cada grupo foram submetidas ao processo de extração de mRNA que consiste em cinco fases.

4.5.1 Fase de separação do mRNA

As amostras foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente, centrifugada por 10 minutos a 12.000 X g a 4°C, adicionou-se 0,3ml de clorofórmio; depois, as amostras foram misturadas no vórtex e incubadas novamente por 10 minutos à temperatura ambiente. Por fim, centrifugou-se por 15 minutos/12.000 x g a 4°C, retirando-se o sobrenadante, evitando-se a interfase.

4.5.2 Fase de precipitação do mRNA

Foram adicionados ao sobrenadante (em outro tubo) 0,75ml de álcool isopropílico, homogeneizado e incubado a -20°C por 12 horas.

4.5.3 Fase de Lavagem

As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000g, desprezou-se o sobrenadante e preservou-se o material precipitado, que foi ressuscitado em 1ml de etanol (75%). As amostras foram misturadas no vórtex e centrifugadas novamente por 5min/ 7500 X g.

4.5.4 Dissolução do mRNA

Desprezado o sobrenadante, preservou-se o precipitado (onde estava contido o RNA), secou-se o tubo, ressuscitando o precipitado com água deionizada tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) que constitui um forte inibidor de ribonuclease. Da solução final, foram retirados 1 μ l para leitura em espectrofotômetro para avaliar a concentração e o grau de pureza das amostras de RNA.

4.5.5 Purificação do RNA

Para purificação adicional das amostras de RNA foi utilizado o Kit QIAamp RNA da empresa QIAGEN® (EUA), que é um purificador de RNA total, obedecendo as instruções de uso do fabricante.

Para cada amostra de RNA, colocou-se o volume de 100 μ l de RNA-*free water* com 350 μ l da solução Tampão-RLT + β mercapto-etanol, misturando-se. Adicionaram-se ao mesmo, 250 μ l de etanol absoluto (100%) que foram misturadas, mas sem o uso da centrífuga. Pipetaram-se 700 μ l da amostra de RNA e colocou-se na coluna purificadora RNA-QIAamp em um tubo de 2ml a solução anterior, e depois centrifugou-se por 15s a uma

velocidade de 15.000rpm. Desprezou-se o sobrenadante e adicionaram-se à coluna QIAamp-RNA mais 500 μ l do tampão RPE, depois centrifugou-se essa solução a uma velocidade de 14.000rpm por 15s. Desprezou-se o sobrenadante. Cuidadosamente foram abertas as colunas de QIAamp e foram adicionados 500 μ l do tampão-RPE e centrifugou-se a uma velocidade de 14.000 rpm por 3 min. Transferida a solução da coluna QIAamp para um novo tubo de 1,5ml e pipetaram-se 35 μ l RNA-free water e centrifugou-se por mais 1min a uma velocidade de 15.000 rpm.

4.6 Avaliação da concentração e grau de pureza das amostras de RNA por espectrofotometria

A leitura no aparelho de espectrofotometria foi feita em uma solução com 2 μ l da amostra de RNA extraída e purificada com 498 μ l de água miliQ. Para obter uma referência, foi colocado em um tubo com água DEPC (2 μ L) e água miliQ (498 μ l). As leituras foram obtidas em 260 nm e 280nm (comprimento de onda da luz que o aparelho emite). O aparelho de espectrofotometria emite ondas de luz que, após atravessarem a solução, são detectadas por um fotodetector. Quanto mais luz for absorvida pela solução, isto é, quanto menos luz for captada pelo fotodetector, maior é a concentração da amostra. A relação entre as leituras obtidas com ondas de 260nm e 280 nm (260/280) deve ser entre 1,75 e 2,1, quando obtemos RNA

com alto grau de pureza, fato este notado em todas as amostras do presente estudo.

4.7 Reação de Transcriptase Reversa (RT) para obtenção de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada a partir do RNA total e purificada e do pool de cada grupo (DMBA/ Tam /Ral), diluído em 10 μ de água DEPC e ao qual foi acrescentado 1 μ de oligonucleotídeos iniciadores (oligo-dT da marca Invitrogen®) e 1 μ de 10mM dNTP-mistura. A solução foi aquecida a 65°C (para desnaturar qualquer estrutura secundária) por 5 minutos e então esfriada no gelo por 1 minuto. Preparou-se previamente outra solução-mix contendo 2 μ de 10XRT tampão + 4 μ de 25nM MgCl₂ + 2 μ de 0,1 M DTT + 1 μ de RNAase-OUT (inibidor recombinante RNAase); que age na desnaturação da cadeia molde.

Adicionaram-se 9 μ de solução-mix + 1 μ de RNA total-pool de cada grupo, que foi misturado delicadamente e incubado a 42°C por 2 minutos. Adicionado 1 μ de SuperScript II RT para cada tubo, misturado e incubado a 42°C por 50 minutos. Ao final, elevou-se a temperatura a 70°C por 15 minutos e estocou-se a -20°C até o uso. Em todo esse processo, utilizamos a máquina de termociclador Gene Amp® PCR System 9700 (Empresa Applied Biosystem).

4.8 PCR em tempo real

A RT-PCR em tempo real avalia o acúmulo de produto na fase logarítmica da reação de amplificação, estando diretamente relacionada à quantidade de molde existente no início da reação, sendo atualmente considerado excelente método por ser preciso e reprodutível para a quantificação da expressão gênica. Utilizamos o sistema de detecção por Sybr-Green, que se baseia no uso de uma molécula fluorescente, denominada SybrGreen I, quando intercalada à dupla fita de DNA, passa a ser detectável.

Durante os ciclos iniciais da reação de RT-PCR, o sinal de fluorescência emitido pelo SybrGreen I é fraco para ser detectado, ou seja, não ultrapassa o sinal de fluorescência de fundo (que é inespecífica). Contudo, no decorrer dos ciclos da reação de RT-PCR, há aumento do produto amplificado e, conseqüente, aumento do sinal emitido de fluorescência, passando a ser detectável, e os valores sendo quantificados após o número fixo de ciclos, representando a quantidade final de cada produto acumulado, diferente da reação de RT-PCR convencional.

A metodologia que utiliza o SybrGreen I exige cuidadosa padronização, uma vez que esse fluorocromo se intercala-se a qualquer molécula de dupla fita presente na reação. A especificidade da detecção de fluorescência com SybrGreen I pode ser comprometida pela formação de dímeros de oligonucleotídeos, pela concentração inadequada de oligonucleotídeos e pela formação de produtos de amplificação inespecíficos. Todos estes

fatores levam à formação de moléculas de dupla fita não esperadas que incorporam o SybrGreen I e têm sua fluorescência registrada.

Neste método de detecção, a confirmação de especificidade da amplificação é realizada por meio da análise da curva de desnaturação ou “melting curve”. Nesta curva, analisa-se a fluorescência das amostras em relação ao aumento contínuo da temperatura, o que possibilita determinar a temperatura de desnaturação ou “melting temperature” (T_m) de cada fragmento, resultante da reação de amplificação. Cada fragmento amplificado possui um T_m específico, o que possibilita a diferenciação entre os produtos resultantes. Durante a reação, a fluorescência aumenta a cada novo ciclo de polimerização e atinge um limiar (“threshold”), no qual todas as amostras podem ser comparadas. Este limiar corresponde ao momento usado para a análise da fluorescência. Este é um ponto definido pelo pesquisador e, obrigatoriamente, deve estar na faixa em que a quantidade de fluorescência gerada pela amplificação das amostras torna-se significativamente maior que a fluorescência de base (“background”). O limiar é definido na fase exponencial da reação de PCR, quando a quantidade de produto formada traduz, de forma satisfatória, a concentração inicial de fitas molde (cDNA) amplificadas pela reação. O ciclo exato, no qual o limiar de fluorescência é definido denomina-se ciclo limiar (Ct: “threshold cycle”). Amostras mais concentradas (com maior número de fitas moldes iniciais) atingem o limiar mais precocemente e mostram valores de Ct mais baixos. Quando a eficiência da reação de PCR está próxima de 100%, o

número de cópias geradas aumenta de forma exponencial, dobrando a cada ciclo da reação.

No experimento, utilizamos o SybrGreen da marca Platinum®Sybr Green qPCR SuperMix UDG-Rox (da empresa Invitrogen™), que tem a característica de amplificar quantidades mínimas de DNA ou RNA (1 pg).

Além disso, apresenta anticorpos monoclonais específicos para a atividade polimerase DNA, reduzindo significativamente a amplificação não específica; as moléculas UDG e dUTP estão inclusas na mistura para prevenir a reamplificação de carreadores de produtos do PCR não desejados, que contenham produtos de uracil. O componente Rox serve para normalizar os sinais de fluorescência entre as reações, determinando melhor captação dos sinais emitidos.

4.9 Ética

Este projeto foi submetido e aprovado na Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob o protocolo número 456/01 (Anexo D).

Este projeto também está dentro das normas de cuidados e proteção aos experimentos animais, conforme as regras da FMUSP, assim como as leis nacionais de uso de animais em laboratório.

4.10 Método Estatístico

A análise estatística foi realizada, conforme a avaliação de dados morfológicos, histológicos e genéticos.

Ao conjunto de dados da avaliação morfológica (peso das ratas, porcentagem de ratas que desenvolveram tumores, tempo de indução dos tumores formados, número de tumores em cada rata/grupo, diâmetro dos tumores em cada rata/grupo) foram aplicados testes estatísticos de distribuição t-Student e teste de distribuição F-Fischer. Como análise complementar, utilizamos técnicas estatísticas descritivas: medidas de centralidade, tabelas multidimensionais e análise gráfica.

O nível de significância adotado para os testes foi de 5% ($p < 0,05$).

A análise do conjunto de dados da avaliação histológica (caracterização histopatológica das neoplasias em cada grupo, correlação entre diâmetro e Ki-67, porcentagem de Ki-67 das células neoplásicas, avaliação de diferenças entre grupos para o grau histológico tumoral) foram aplicadas as técnicas estatísticas de análise de relação entre variáveis (teste de correlação de Pearson), teste de distribuição de t-Student e Teste Estatístico de F-Fischer, com nível de significância de 10% ($p < 0,10$).

A análise do conjunto de dados da avaliação genética de cada grupo (avaliamos o processo de angiogênese específica para ratas por intermédio da expressão de 84 genes angiogênicos pelo método de RT² PCR Array) foi desenvolvida, empregando-se metodologia comparativa entre as análises das curvas de ciclo limiar (Ct) dos três grupos (DMBA, tamoxifeno e

raloxifeno), segundo o método $\Delta\Delta Ct$, e pelo auxílio de programa estatístico específico Excel-PCR Array, da empresa Superarray (<http://www.superarray.com/PCRArrayPlate.php/DataAnalysisTemplate>).

Em razão da relação proporcional inversa entre ciclo limiar (Ct) e o nível de expressão gênica original e o dobro da quantidade de produto de cada ciclo, o nível de expressão original (L) para cada gene de interesse é expresso como:

$$L = 2^{-Ct}$$

Para normalizar o nível de expressão de um gene de interesse (GOI) em relação ao gene de controle (*housekeeping* gene-HKG), os níveis de expressão dos dois genes são divididos:

$$\frac{2^{-Ct(GOI)}}{2^{-Ct(HK6)}} = \frac{2^{-[Ct(GOI) - Ct(HK)]}}{2^{-\Delta Ct}}$$

Para determinar a mudança na expressão gênica, a expressão normalizada do GOI na amostra experimental é dividida pela expressão normalizada do mesmo GOI nas amostras de controle:

$$\frac{2^{-\Delta Ct \text{ experimental}}}{2^{-\Delta Ct \text{ controle}}} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Onde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ experimental} - \Delta Ct \text{ controle}$

Para completar o cálculo, temos:

$$\frac{2^{-Ct+} \text{ (GOI) experimental}}{2^{-Ct} \text{ (HK6) experimental}} \div \frac{2^{-Ct+} \text{ (GOI) controle}}{2^{-Ct} \text{ (HK6) controle}} = \frac{2^{-[Ct \text{ (GOI)} - Ct \text{ (HK)}] \text{ experimental}}}{2^{-[Ct \text{ (GOI)} - Ct \text{ (HK)}] \text{ controle}}} = \frac{2^{-\Delta Ct} \text{ experimental}}{2^{-\Delta Ct} \text{ controle}} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

1. Teste de hipóteses com índice de concordância, para confirmar a equivalência no peso médio dos três grupos analisados (DMBA x tamoxifeno x raloxifeno), dado a suspeita de que diferenças nos pesos das ratas poderiam influenciar no desenvolvimento dos tumores

Tomando t_0 como referência, avaliamos como melhor medida de centralidade a ser adotada nesse teste estatístico, a média, pois é utilizada quando os dados se distribuem segundo uma distribuição normal de probabilidade e quando o desvio padrão (DP), comparativamente à média dos dados, pode ser considerado moderado, ou seja, não existe grande dispersão nos dados.

Considerando M_0 como a primeira pesagem, teremos as seguintes hipóteses de testes:

Teste 1 – Hipótese estatística: $\mu_{\text{peso } M_0 \text{ (grupo 1)}} = \mu_{\text{peso } M_0 \text{ (grupo 2)}}$

Teste 2 – Hipótese estatística: $\mu_{\text{peso } M_0 \text{ (grupo 1)}} = \mu_{\text{peso } M_0 \text{ (grupo 3)}}$

Teste 3 – Hipótese estatística: $\mu_{\text{peso } M_0 \text{ (grupo 2)}} = \mu_{\text{peso } M_0 \text{ (grupo 3)}}$

Distribuição amostral: t-Student (para $n < 30$), $p < 0,05$

2. Teste para validar estatisticamente diferenças entre grupos quanto ao número de ratas que adquiriram tumor

Teste 1 - Hipótese estatística: P ratas positivadas (grupo 1) = P ratas positivadas (grupo 2)

Teste 2 - Hipótese estatística: P ratas positivadas (grupo 1) = P ratas positivadas (grupo 3)

Teste 3 - Hipótese estatística: P ratas positivadas (grupo 2) = P ratas positivadas (grupo 3)

Distribuição amostral: F-Fischer para $n < 30$, comparação de dois grupos independentes, respostas binárias; $p < 0,05$ (5% certeza), ou seja, se repetimos o mesmo experimento 100 vezes, com o mesmo perfil de amostra, em, pelo menos, 95 destas teremos o mesmo resultado.

3. Análise da média de tumores induzidos em cada grupo

Para se avaliar o número médio de tumores induzidos por ratas, utilizaram-se de medidas estatísticas de centralidade, objetivando-se obter um panorama que permita a comparação entre os grupos. Como o número de ratas que desenvolveram tumores nos grupos tamoxifeno e raloxifeno é insuficiente para inferirmos com certeza por meio de um teste estatístico de hipótese, optou-se pela avaliação descritiva, neste caso.

4. Análise estatística para obter melhor medida e avaliar estatisticamente diferenças no tempo de indução

Adotando a média como a melhor opção estatística para compararmos o tempo de indução entre os grupos, posteriormente verificado pelos testes de hipóteses, segundo a distribuição t-Student (para $n < 30$), $p < 0,05$, ou seja, se repetíssemos o mesmo experimento 100 vezes, com o mesmo perfil de amostra em, pelo menos, 95 destas teríamos o mesmo resultado.

Teste 1 – Hipótese estatística: μ T indução (grupo 1) = μ T indução (grupo 2)

Teste 2 – Hipótese estatística: μ T indução (grupo 1) = μ T indução (grupo 3)

Teste 3 – Hipótese estatística: μ T indução (grupo 2) = μ T indução (grupo 3)

5. Análise de correlação de Pearson entre diâmetro tumoral (cm) e porcentagem do Ki67

Com o objetivo de avaliarmos uma possível relação entre o diâmetro tumoral (cm) observado no maior tumor formado e a medida de atividade proliferativa da célula (porcentagem do Ki67) em cada rata, desenvolvemos uma análise de relação entre variáveis, ou seja, métodos utilizados para verificar o nível de influência entre as respostas obtidas em determinada variável sobre outra. A associação é utilizada para medir a relação entre variáveis qualitativas. Já a correlação, é empregada para medir a relação entre variáveis quantitativas, no caso, está segunda opção foi escolhida.

Classificamos a correlação em:

- a) Fortemente negativa (entre -0,7 e -1), ou seja, à medida que uma variável cresce, a outra diminui fortemente;
- b) Moderadamente negativa (entre -0,2 e -0,7), à medida que uma variável cresce, a outra diminui moderadamente;
- c) Inexistente ou fraca (entre -0,2 e 0,2), ou seja, uma variável não influencia na ocorrência de outra;
- d) Moderadamente positiva (entre 0,2 e 0,7), à medida que uma variável cresce, a outra cresce moderadamente;
- e) Fortemente positiva (entre 0,7 e 1), ou seja, à medida que uma variável cresce, a outra cresce fortemente.

6. Teste estatístico comparativo para avaliar diferenças da porcentagem do Ki67 entre grupos

Teste 1 – Hipótese estatística: Ki67 (grupo 1) = Ki67 (grupo 2)

Teste 2 – Hipótese estatística: Ki67 (grupo 1) = Ki67 (grupo 3)

Teste 3 – Hipótese estatística: Ki67 (grupo 2) = Ki67 (grupo 3)

Distribuição amostral: testes não-paramétricos; $p < 10$ (10% certeza), ou seja, se repetíssemos o mesmo experimento 100 vezes, com o mesmo perfil de amostra em, pelo menos, 90 destas teríamos o mesmo resultado.

7. Teste de hipótese para avaliação do grau histológico tumoral entre os grupos

Teste 1 – Hipótese estatística: μ grau (grupo 1) = μ grau (grupo 2)

Teste 2 – Hipótese estatística: μ grau (grupo 1) = μ grau (grupo 3)

Teste 3 – Hipótese estatística: μ grau (grupo 2) = μ grau (grupo 3)

Distribuição: t-Student (para $n < 30$), $p < 10$ (10% certeza), ou seja, se repetíssemos o mesmo experimento 100 vezes, com o mesmo perfil de amostra em, pelo menos, 90 destas teríamos o mesmo resultado.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Análise e apresentação dos resultados

Os dados foram submetidos à análise estatística, geralmente, com nível de significância de 5%, utilizando-se diferentes distribuições e variadas técnicas para a análise exploratória de dados; conforme descrito na metodologia estatística.

5.2 Descrição morfológica

5.2.1 Porcentagem das ratas que desenvolveram tumores

A porcentagem de ratas que desenvolveram carcinoma de mama nos três grupos foram, respectivamente (Gráficos 1 e 2, Figura 12):

Grupo 1 - DMBA – 20 ratas desenvolveram tumores (100%);

Grupo 2 - Tamoxifeno – 7 ratas desenvolveram tumores (35%);

Grupo 3 - Raloxifeno – 3 ratas desenvolveram tumores (15%).



Figura 12 - Tumor mamário induzido quimicamente

Gráfico 1 - Número de tumores mamários induzidos nas ratas nos três grupos estudados

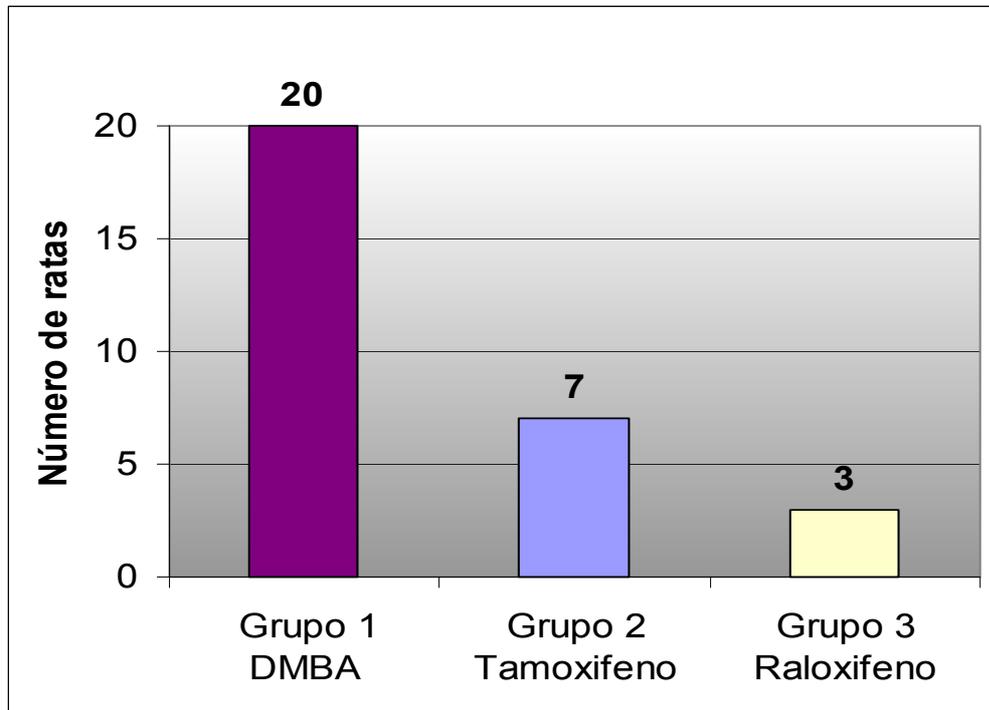
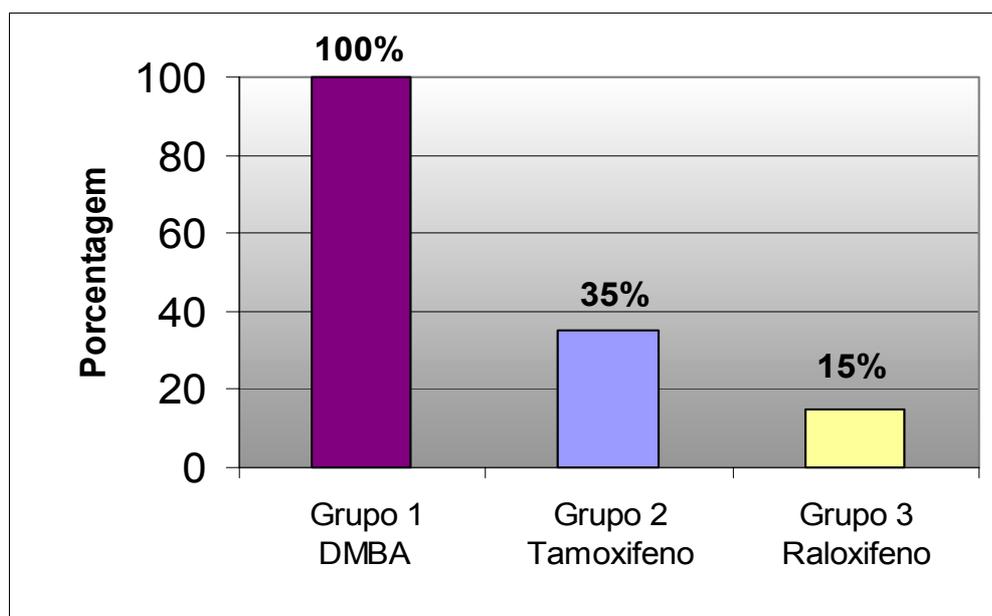


Gráfico 2 - Porcentagem de ratas com tumores de mamas induzidos nos três grupos estudados



A avaliação comparativa e estatística dos três grupos, adotando-se o valor de $p < 0,05$, mostra que o tamoxifeno e o raloxifeno têm efeito quimioprotetor na formação de tumores de mamas em ratas, e o raloxifeno mostrou efeito superior ao tamoxifeno.

5.2.2 Intervalo entre indução e aparecimento do tumor

Quanto ao intervalo (em dias) entre a indução e o aparecimento médio do primeiro tumor nos três grupos, observamos (Tabela 3):

Grupo 1 – DMBA: tempo médio de formação do 1º tumor induzido foi de 32 dias;

Grupo 2 – Tamoxifeno: tempo médio de formação do 1º tumor induzido foi de 46 dias;

Grupo 3 – Raloxifeno: tempo médio de formação do 1º tumor induzido foi de 53 dias.

As análises comparativa e estatística, adotando $p < 0,05$, demonstraram que o tamoxifeno e o raloxifeno aumentaram o tempo (em dias) na indução dos tumores formados nas ratas, tendo o raloxifeno efeito superior ao tamoxifeno (Tabela 3 e Gráfico 3).

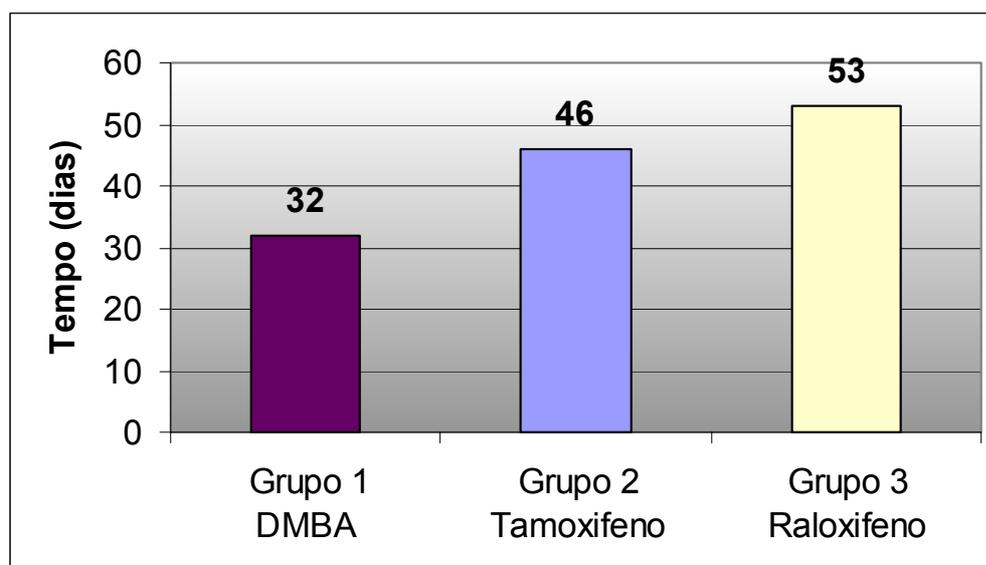
Considerando os intervalos de confiança encontrados, não observamos sobreposições relevantes entre os grupos, revelando aparentemente haver diferença estatística nos tempos médios de indução do primeiro tumor observados em cada grupo, que foram confirmados nos Testes de Hipóteses, segundo a Distribuição t-Student, para $n < 30$, ou seja, observou-se diferença significativa no tempo de indução do primeiro tumor formado ao se comparar os três grupos avaliados.

Tabela 3 - Análise do tempo de indução dos tumores induzidos nos três grupos

	Média	DP	IC
Grupo 1 - DMBA	32 dias	4 dias	28 a 36 dias
Grupo 2 - Tamoxifeno	46 dias	4 dias	42 a 50 dias
Grupo 3 - Raloxifeno	53 dias	3 dias	50 a 56 dias

NOTA: DP- desvio padrão; IC- intervalo de confiança; $p < 0,05$

Gráfico 3 - Formação do primeiro tumor (dias) de mama nas ratas



5.2.3 Número de tumores em cada rata por grupo

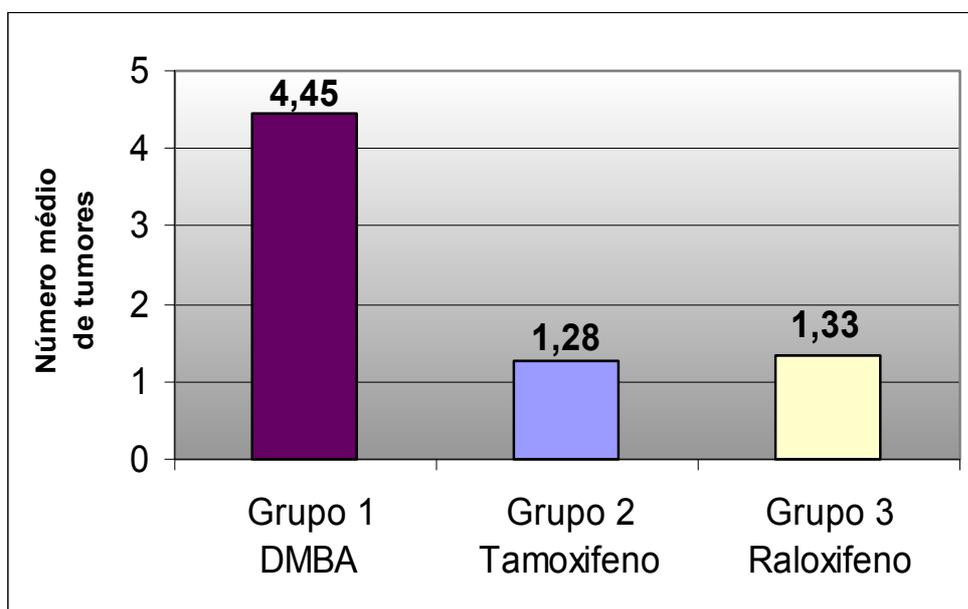
O número médio de tumores induzidos em cada grupo foi, respectivamente (Gráfico 4 e Tabela 4):

Grupo 1 – DMBA: 4,45 tumores

Grupo 2 – Tamoxifeno: 1,28 tumores

Grupo 3 – Raloxifeno: 1,33 tumores

Gráfico 4 - Número médio de tumores de mamas induzidos nas ratas nos três grupos estudados



Adotando-se $p < 0,05$, observou-se que o tamoxifeno e o raloxifeno tiveram efeito quimioprotetor ao diminuir o número de tumores de mamas induzidas nas ratas, não havendo diferença estatística nesse parâmetro entre ambas as substâncias.

Tabela 4 - Características morfológicas dos três grupos quanto à formação de tumores induzidos

	Nº de ratas com tumores	Nº médio tumores induzidos	Intervalo indução 1º tumor (dias)
Grupo 1 - DMBA	20	4,45	32
Grupo 2 - Tamoxifeno	7	1,28	46
Grupo 3 - Raloxifeno	3	1,33	57

5.2.4 Tamanho do tumor em cada rata por grupo

Considerando-se o maior tumor induzido em cada rata no grupo específico, o tamanho médio dos tumores induzidos em cada grupo foi, respectivamente:

Grupo 1 – DMBA: 3 cm

Grupo 2 – Tamoxifeno: 2,7 cm

Grupo 3 – Raloxifeno: 2,0 cm

O universo amostral reduzido dos tumores formados nos grupos tamoxifeno e raloxifeno (dado esperado pela ação quimioprotetora das substâncias estudadas) impediu aferir com precisão e certeza minimamente aceitáveis a respeito deste quesito (tamanho médio do tumor induzido nos dois grupos), se os SERMs teriam ação protetora e formariam tumores com menor diâmetro.

Em relação ao grupo DMBA, podemos referir que o tamanho médio dos tumores induzidos foi de cerca de três centímetros (em 9 das 20 ratas pesquisadas, o diâmetro do maior tumor observado foi 3cm).

5.3 Exame histopatológico

5.3.1 Caracterização anatomopatológica das neoplasias formadas em cada grupo (Tabelas 5a, 5b e 5c, Figuras 13 e 14):

Quanto às características histopatológicas dos tumores mamários induzidos em cada grupo, todos foram carcinoma ductal invasivo, respectivamente:

Grupo 1 – DMBA: formaram-se 89 tumores (50 foram do tipo comedo-carcinoma e 39 do tipo papilífero);

Grupo 2 – Tamoxifeno: formaram-se nove tumores (quatro foram do tipo comedocarcinoma e três do tipo papilífero);

Grupo 3 – Raloxifeno: formaram-se quatro tumores (dois foram do tipo comedo-carcinoma e dois do tipo papilífero).

Não houve diferença estatística entre os três grupos.

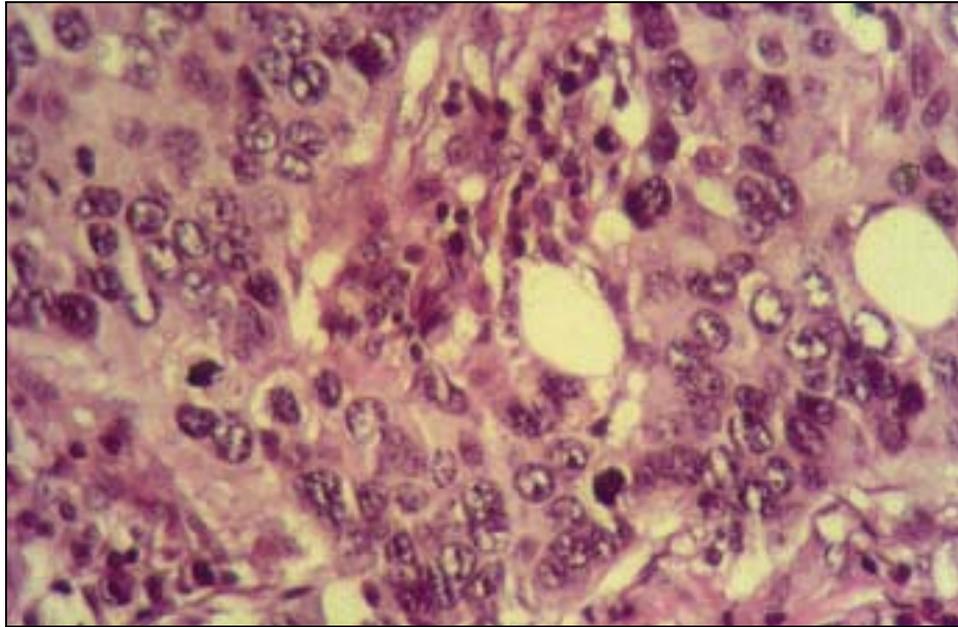


Figura 13 - Carcinoma ductal invasivo tipo papilífero em mama de rata (HE; 400x)

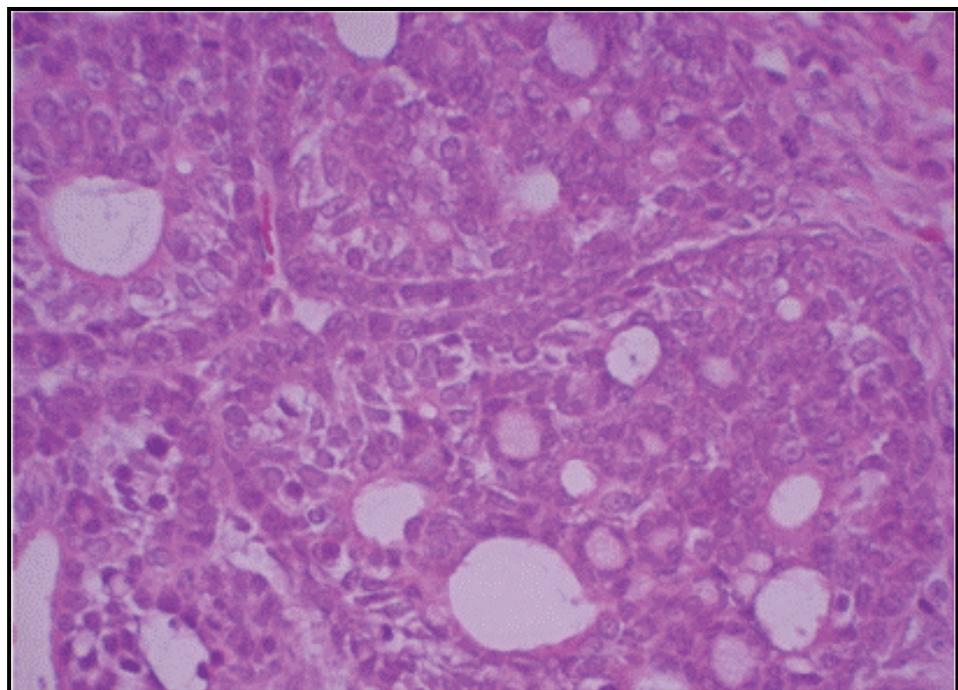


Figura 14 - Carcinoma ductal invasivo tipo comedarcinoma em mama de rata (HE; 400x)

5.3.2 Porcentagem de células neoplásicas RE positivas

As porcentagens de células neoplásicas RE positivas em cada grupo foram (Tabelas 5a, 5b, 5c):

Grupo 1 – DMBA: todas as 20 ratas tinham RE positivo com valores variando de 30% a 75% de positividade

Grupo 2 – Tamoxifeno: todas as 20 ratas tinham RE positivo com valores variando de 10% a 70% de positividade

Grupo 3 – Raloxifeno: todas as 20 ratas tinham RE positivo com valores variando de 30% a 70% de positividade

Não houve diferença estatística entre os três grupos avaliados.

Tabela 5a - Avaliação morfológica e histológica: Grupo 1 – DMBA

Rata	Latência (dias)	Nº tumores	Diâmetro (cm)	Tipo histológico	Grau nuclear	% RE(+)	% Ki67
1	30	7	3x3	ductal invasivo	3	30%	75%
2	32	6	3x2	ductal invasivo	3	30%	75%
3	35	3	2x2	ductal invasivo	3	30%	75%
4	35	1	3x3	ductal invasivo	3	70%	80%
5	40	1	2, 5 x 2, 5	ductal invasivo	3	70%	80%
6	35	3	3x3	ductal invasivo	3	40%	75%
7	35	3	3x3	ductal invasivo	3	75%	75%
8	34	1	3x3	ductal invasivo	3	60%	80%
9	35	3	3x1	ductal invasivo	3	30%	75%
10	32	6	4x2	ductal invasivo	3	60%	80%
11	34	5	3, 5 x 1,5	ductal invasivo	3	60%	75%
12	32	5	3, 5 x 1,5	ductal invasivo	3	60%	75%
13	30	7	3x3	ductal invasivo	3	70%	75%
14	30	8	3x3	ductal invasivo	3	70%	75%
15	30	4	3, 5 x 3, 5	ductal invasivo	3	60%	75%
16	28	8	4x4	ductal invasivo	3	60%	75%
17	30	4	3x3	ductal invasivo	3	30%	50%
18	29	5	2x2	ductal invasivo	3	30%	50%
19	29	6	2x2	ductal invasivo	3	30%	50%
20	30	4	3x3	ductal invasivo	3	60%	75%

Tabela 5b - Avaliação morfológica e histológica: Grupo 2 – Tamoxifeno

Rata	Latência (dias)	Nº tumores	Diâmetro (cm)	Tipo histológico	Grau nuclear	% RE(+)	% Ki67
1	30	1	5,4 x 5	carcinoma ductal	3	70%	75%
2	70	1	3 x 3	carcinoma ductal	2	40%	75%
3	50	3	4 x 4	carcinoma ductal	3	40%	75%
4	50	1	2 x 1	carcinoma ductal	2	40%	75%
5	40	1	2 x 1,5	carcinoma ductal	2	10%	50%
6	42	1	1,5 x 1,5	carcinoma ductal	2	10%	50%
7	40	1	1,5 x 1	carcinoma ductal	2	10%	50%

Tabela 5c - Avaliação morfológica e histológica: Grupo 3 – Raloxifeno

Rata	Latência (dias)	Nº tumores	Diâmetro (cm)	Tipo histológico	Grau nuclear	% RE(+)	% Ki67
4	60	1	1,5 x 1	carcinoma ductal	2	30%	50%
17	46	1	2,5 x 2,5	carcinoma ductal	2	30%	50%
18	60	2	2 x 1,5	carcinoma ductal	2	30%	50%

5.3.3 Porcentagem de células neoplásicas para Ki-67

As porcentagens de células neoplásicas Ki-67 nos três grupos estão descritas nos dados da Tabela 6.

Tabela 6 - Análise da atividade proliferativa (Ki67) dos tumores induzidos, considerando o maior tumor desenvolvido nas ratas

Grupo	Número de ratas com tumor induzido	% Ki 67 dos tumores		
1- DMBA	20	50%	3 ratas	(15%)
		75%	13 ratas	(65%)
		80%	4 ratas	(20%)
2 -Tamoxifeno	7	50%	3 ratas	(43%)
		75%	4 ratas	(57%)
3 - Raloxifeno	3	50%	3 ratas	(100%)

$p < 0,10$

Considerando-se as respectivas proporções de Ki67 para cada grupo, ficam evidenciadas as diferenças estatísticas dos mesmos. Enquanto no Grupo 1-DMBA, nota-se na maioria das ratas $Ki67 \geq 75\%$, no Grupo 2-tamoxifeno observa-se que em metade das ratas $Ki67 = 50\%$ e no Grupo 3 - raloxifeno, a totalidade das ratas apresenta $Ki67 = 50\%$.

5.3.4 Porcentagem de grau histológico tumoral mamário

Foi utilizada a classificação de Scarff-Bloom-Richardson (SBRE) modificada por Elston e Ellis (1991) que contabiliza, por meio de uma pontuação que vai de grau 1 a 3, cujos parâmetros avaliados são: a

capacidade de formação de túbulos, o pleomorfismo nuclear e a contagem mitótica (Costa *et al.*, 2002, 2004).

As porcentagens de grau histológico tumoral dos tumores de mamas nas ratas, (que aferem maior indiferenciação do tumor e maior agressividade, conforme o aumento do grau histológico tumoral), para os três grupos, foram:

- Grupo 1 - DMBA: todas as ratas (n=20) desenvolveram tumores de mamas indiferenciados com grau 3 (100% casos)
- Grupo 2 - Tamoxifeno: cinco ratas desenvolveram tumores de mamas com grau 2 (71,4% casos) e duas ratas com grau 3 (29,6%)
- Grupo 3 - Raloxifeno: todas as ratas (n=3) desenvolveram tumores de mamas com grau 2 (100% casos)

Assim, tanto o tamoxifeno como o raloxifeno apresentaram efeito quimioprotetor, ao diminuírem a agressividade e a indiferenciação do tumor de mama formado. Além disso, haveria possível superioridade do raloxifeno em relação ao tamoxifeno nesse quesito, em que todas as ratas de grupo raloxifeno desenvolveram tumores menos agressivos que o grupo tamoxifeno (Tabela 7).

Avaliação do grau histológico tumoral entre os três grupos mostrou que as hipóteses estatísticas não confirmadas segundo a distribuição t-Student (para $n < 30$), ou seja, observou-se diferença relevante quanto ao grau tumoral, ao compararmos os três grupos avaliados: grau médio tumoral em G1 > grau médio tumoral em G2 > grau médio tumoral em G3.

Tabela 7 - Porcentagem do grau histológico tumoral mamário nos três grupos estudados

Grupo	Número de ratas com tumor induzido	Grau histológico	
DMBA	20	2	(100%)
Tamoxifeno	5	2	(71,4%)
	2	3	(29,6%)
Raloxifeno	3	2	(100%)

p<0,10

5.4 Avaliação genética

A avaliação genética foi desenvolvida, empregando-se a metodologia comparativa entre os três grupos (DMBA, Tamoxifeno e Raloxifeno), baseado no ciclo limiar e no cálculo da razão do $\Delta\Delta Ct$ entre os dois grupos específicos (“tamoxifeno versus DMBA” e “raloxifeno versus DMBA”), conforme o programa estatístico desenvolvido pela empresa SuperArray®. Foram escolhidos os valores da razão do $\Delta\Delta Ct$ (“tamoxifeno versus DMBA” e “raloxifeno versus DMBA”), com $p < 0,05$ e o desvio padrão de normalidade de quatro vezes.

5.4.1 Estudo genético de fatores envolvidos na expressão angiogênica pelo método de qRT-PCR Array das neoplasias formadas em cada grupo

Os fatores envolvidos na expressão angiogênica, pelo método RT-PCR Array, das neoplasias do grupo tamoxifeno em relação ao grupo DMBA que apresentaram maior alteração na expressão de determinados genes foram: ANGPT1 (Angiopietina 1), ANGPT2 (angiopietina 2), HGF (Fator de crescimento de hepatócito), Hif1a (Fator indutor de hipóxia 1, subunidade alfa), ITGFB3 (Integrina beta 3), LEP (Leptina), MAPK14 (Mitógeno ativado proteína quinase 14), Mmp19p (Metaloproteinase 19 de matriz (previsto), Nrp1 (Receptor de peptídeo natriurético 1), PGF (Fator de crescimento placentário), PLAU (Ativador de Plasminogênio Urinário), Serpinf1 (Inibidor de peptidase serina ou cisteína, clade F, membro 1), TEK (Receptor tirosina quinase endotélio específico), TGFB1 (Fatores Transformadores de Crescimento, beta 1), TGFB2 (Fatores Transformadores de Crescimento, beta 2), Timp3 (Inibidor de metaloproteinase tecidual 3 (Distrofia pseudoinflamatória de Sorsby), TNF (Fator de necrose tumoral (TNF superfamília, membro 2), VEGFA (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular A), VEGFC (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular C) (Tabela 8, Gráficos 5 e 6, Anexo F).

Tabela 8 - Média normalizada de ΔC_t do grupo Tamoxifeno vs DMBA

Gene	Referência Sequencial	Tamoxifeno vs DMBA	p
Angpt2	XM_344544	10,31	0,0006
Angpt1	NM_053546	13,3	0,030
Hgf	NM_017017	5,86	0,0027
Hif1a	NM_024359	10,31	0,0006
Itgb3	NM_153720	10,31	0,0006
Lep	NM_01376	8,82	0,0005
Mapk14	NM_31020	8,15	0,039
Mmp19_predicted	XM_222317	3,56	0,0587
Nrp1	NM_145098	10,31	0,0006
Pgf	NM_053595	7,50	0,0006
Plau	NM_013085	10,31	0,0006
Serpinf1	NM_177927	3,86	0,0296
Tek	XM_342863	10,31	0,0006
Tgfb1	NM_021578	4,37	0,0066
Tgfb2	NM_31131	5,27	0,0447
Timp3	NM_012886	10,31	0,0006
Tnf	NM_012675	24,25	0,300
Vegfa	NM_31836	10,31	0,0006
Vegfc	NM_053653	10,31	0,0006

Gráfico 5 - Média normalizada de ΔC_t Tamoxifeno vs DMBA

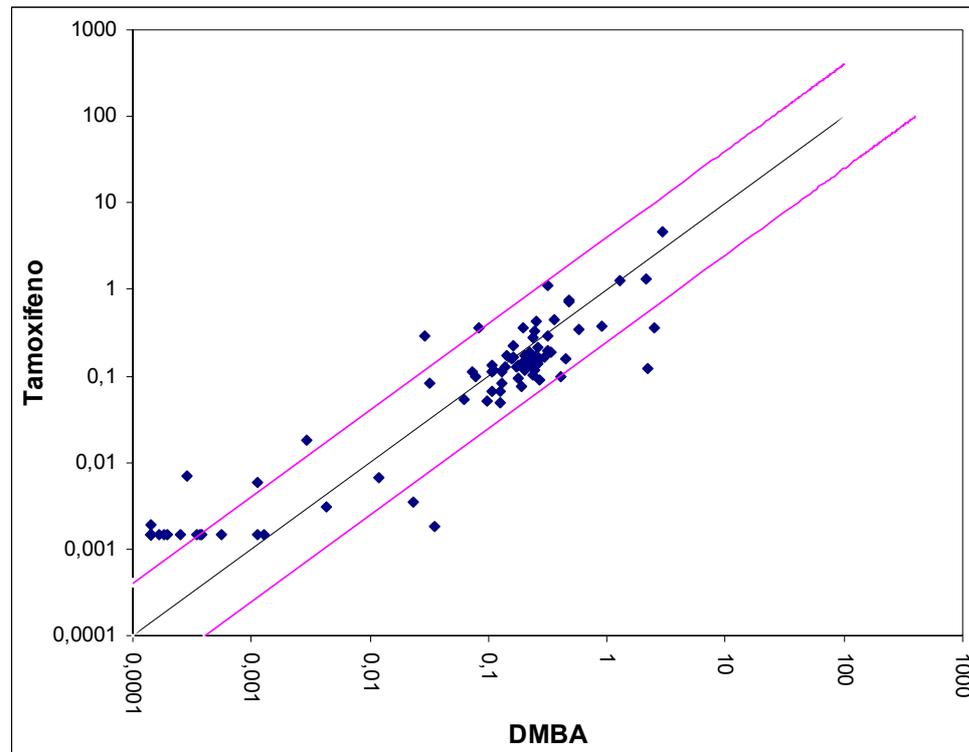
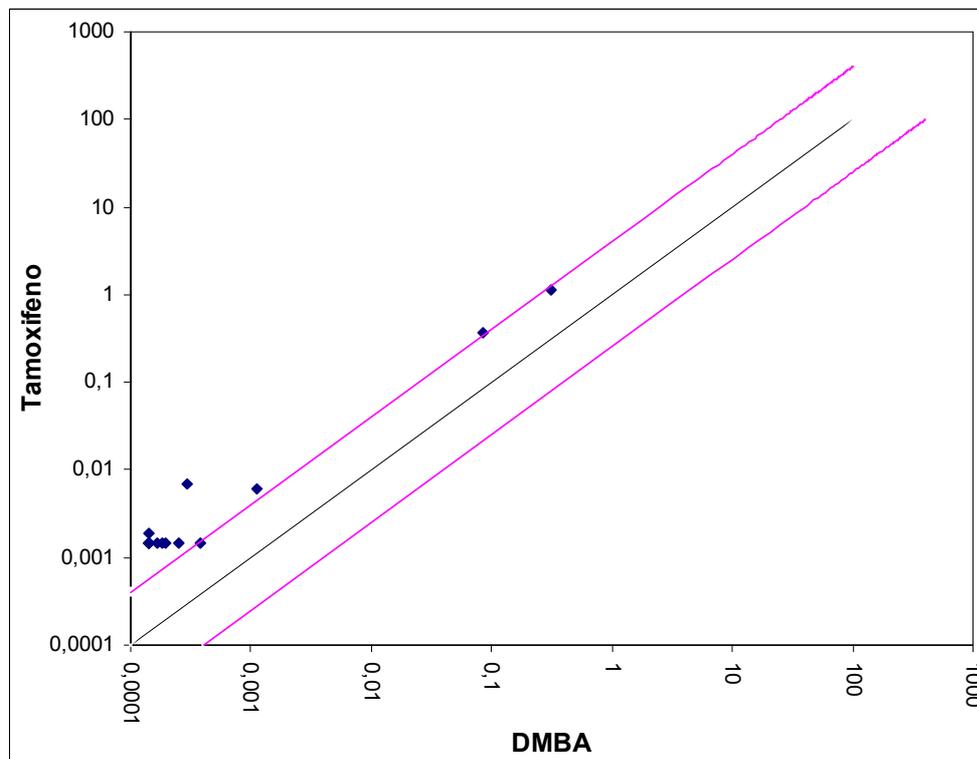


Gráfico 6 - Média normalizada de ΔC_t Tamoxifeno vs DMBA, $p < 0,05$



Para o grupo raloxifeno em relação ao grupo DMBA, os fatores envolvidos na expressão angiogênica que apresentaram maior alteração na expressão de determinados genes foram: FGF6 (Fator de crescimento fibroblástico 6), Pecam (Molécula de adesão da célula endotelial plaquetária), Hif1a (Fator indutor de hipóxia 1, subunidade alfa), ITGB3 (Integrina beta 3), PGF (Fator de crescimento placentário), PLAU (Ativador de Plasminogênio Urinário), TEK (Receptor tirosina quinase endotélio específico), VEGFC (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular C) (Tabela 9, Gráficos 7 e 8, Anexo G).

Tabela 9 - Média normalizada de ΔC_t do grupo Raloxifeno vs DMBA

Gene	Referência Sequencial	Raloxifeno vs DMBA	p
Fgf6	NM_131908	-5,3	0,0471
Hif1a	NM_024359	55526251,41	0,0643
Itgb3	NM_153720	34259481,94	0,0822
Pecam	NM_31591	-3,48	0,0633
Pgf	NM_053595	3,54	0,302
Plau	NM_013085	9,67	0,0019
Tek	XM_342863	7,09	0,0068
Vegfc	NM_053653	7,94	0,0448

Gráfico 7 - Média normalizada de ΔC_t Raloxifeno vs DMBA

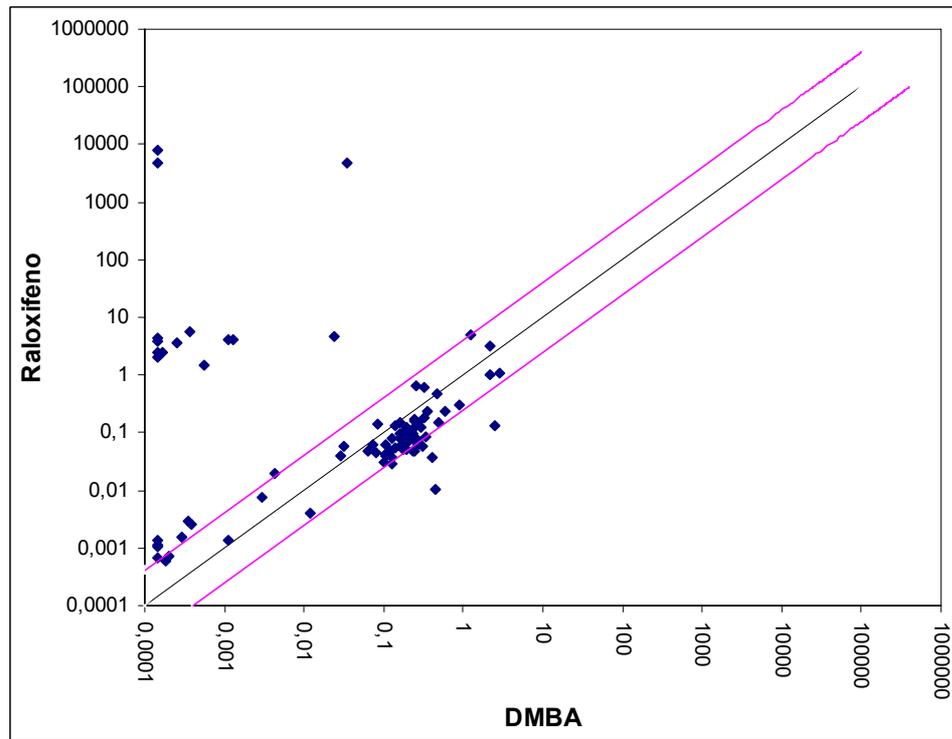
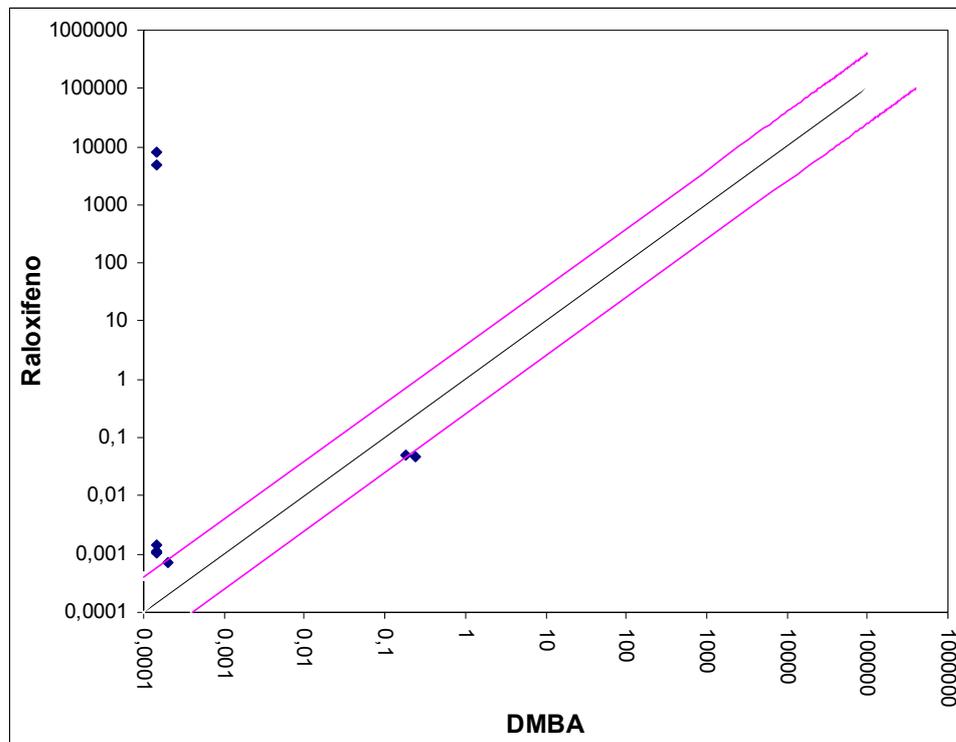


Gráfico 8 - Média normalizada de ΔC_t Raloxifeno vs DMBA, $p < 0,05$



6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Muitos animais são utilizados em investigações experimentais para o estudo da carcinogênese mamária, mas, ainda hoje, os roedores são os animais preferidos pelo fácil manuseio, boa relação custo-benefício e pelas semelhanças estruturais e histológicas bem estabelecidas com a espécie humana (Russo *et al.* 1982, 1990, 2005a, 2007; Steele *et al.*, 1994; Cardiff *et al.*, 2002; Mehta, 2000; Cheung *et al.*, 2003a, 2003b; Blakely *et al.*, 2006).

Os tumores de mamas induzidos em ratas pelo agente carcinogênico químico, DMBA, é um conhecido modelo experimental na formação de tumores malignos, resultam em importante instrumento de pesquisa no campo de modulação hormonal. Dessa forma, o estudo de substâncias quimioprotetoras, como os SERMs tamoxifeno, raloxifeno e outros são cada vez mais usados (Russo *et al.* 1990, 2005a; Luo *et al.*, 1998; Barros *et al.*, 2003; El-Bayoumi e Sinha, 2004; Kim *et al.*, 2004; Manjanatha *et al.*, 2006; Stuhr *et al.*, 2006; Malejka-Giganti *et al.*, 2007).

O câncer de mama apresenta elevada incidência, quer em países ocidentais desenvolvidos quer naqueles em desenvolvimento (Jatoi e Miller, 2003; ParKin, 2006; ParKin e Fernandes, 2006). Apesar do avanço na terapêutica e na diminuição ou estabilização na taxa de mortalidade, passou a representar um estigma para muitas mulheres por estar associado à mutilação, morte, mudança na estética, na sexualidade e na feminilidade (Maluf *et al.*, 2005; Burwell *et al.*, 2006; Mutrie *et al.*, 2007).

Por toda essa complexidade e por ser esse câncer um problema para os sistemas público e privado de saúde, a prevenção primária com o uso de SERMs é uma das estratégias para o combate à doença (Fisher *et al.*, 1998, 2005; Vogel, 2006; Vogel *et al.*, 2006; Cuzick *et al.*, 2007; Morrow e Jordan, 2007).

A glândula mamária é um dos órgãos que, nas várias espécies, não está totalmente desenvolvida ao nascimento, incluindo os humanos e os roedores. Este processo evolutivo intensifica-se com modificações funcionais e estruturais que ocorrem durante a puberdade, a gravidez e a lactação; tem como papel fundamental no seu desenvolvimento e transformação a ação de vários hormônios como a insulina, o cortisol, a tiroxina, a prolactina, o hormônio de crescimento entre outros (Shyamala *et al.*, 2002; Harris *et al.*, 2004; Russo e Russo, 2004b).

A mama é um órgão hormônio responsivo por excelência. O processo de influência hormonal, de diferenciação lobular e de proliferação da célula epitelial mamária é mais acentuado no epitélio de ductos e lóbulos e, menos freqüente, na célula mioepitelial, no estroma interlobular e no intralobular (Russo e Russo, 2004b; Russo *et al.*, 2005a, 2007).

O estrogênio é considerado um dos principais hormônios responsáveis por promover a proliferação do epitélio mamário normal e, também, do epitélio neoplásico (Fernandez *et al.*, 2006; Russo e Russo, 2006). Este hormônio age localmente na célula mamária, estimulando a síntese de DNA, mecanismo este que pode ser incrementado por substância com ação autócrina e parácrina (família EGF, família FGF, TGF-B, família IGF, família

VEGF, CSF-1 e outras citoquinas), consoante Flint *et al.* (2003), Harris *et al.* (2004), Roy e Thompson (2006).

A progesterona, por sua vez, tem papel fundamental ao estimular o crescimento de componentes alveolares dos lóbulos mamários, cuja síntese de receptores para este hormônio requer a presença prévia do estrogênio (Shyamala *et al.*, 2000, 2002; Druckmann, 2003; Aupperlee *et al.*, 2005; Aupperlee e Haslam, 2007).

Além disso, sabe-se que o epitélio mamário de roedores e humanos exibe sua máxima atividade proliferativa durante a fase lútea, quando os níveis de progesterona são mais altos, mostrando que teria importante ação sinérgica com o estrogênio na célula epitelial mamária (Mustafá e Bland, 1998; Navarrete *et al.*, 2005; Pompei *et al.*, 2005; Eigeliene *et al.*, 2006).

Durante nosso experimento, os pesos iniciais e finais das ratas nos três grupos estudados (grupo DMBA, tamoxifeno e raloxifeno) não apresentaram diferenças estatísticas e como as condições experimentais foram as mesmas para todos os animais, os resultados na formação dos tumores induzidos devem-se, provavelmente, apenas ao DMBA e aos SERMs (tamoxifeno e raloxifeno) utilizados (Anexo J).

Nota-se que, neste modelo experimental, o uso de SERMs (tamoxifeno e raloxifeno) em roedores na fase adulta, de fato, apresentou efeito quimioprotetor, diminuindo a formação de tumores induzidos, quando as ratas foram tratadas previamente com esses medicamentos, confirmando os dados existentes na literatura médica (Russo *et al.*, 1990; Kubatka *et al.*,

2002; Barros *et al.*, 2003; El-Bayoumi e Sinha, 2004; Russo e Russo, 2004b).

No presente estudo, observou-se que o DMBA na indução da formação de tumores de mama em ratas virgens Sprague-Dawley, foi excelente indutor, obtendo-se tumores de mama em todos os animais (20 ratas, 100% de formação de tumores). Estes dados são similares na literatura que mostra haver indução em 97% a 100% dos casos, levando-se em consideração a espécie do roedor, a dose do agente carcinogênico, a idade da rata quando recebeu a substância, a ocorrência de prenhez ou não e a ração utilizada (Russo *et al.*, 1990, 2005a; Barros *et al.*, 2001a, 2001b, 2003).

Além disso, o DMBA, quando utilizado na indução de tumores mamários, tende a formar mais de um tumor por rata, o que também observamos em nosso estudo, na qual a média de tumores induzidos foi de 4,45 tumores por rata (com mínimo de um tumor induzido e máximo de oito tumores) (Russo *et al.*, 1990, 2005a; Barros *et al.*, 2003; Stuhr *et al.*, 2006; Hakkak *et al.*, 2007).

Para os animais que receberam previamente raloxifeno e tamoxifeno, o número médio de tumores induzidos por rata (1,33 e 1,28, respectivamente) foi menor do que nos que receberam apenas o DMBA (4,45). Não houve diferença estatística entre esses dois grupos de SERMs, mostrando que ambas substâncias foram igualmente eficazes nesse quesito. Russo *et al.* (2005a) demonstraram, estatisticamente, diferença no número médio de tumores induzidos por rata, quando utilizaram SERMs na quimioproteção do câncer de mama.

Outro parâmetro avaliado foi o intervalo de indução (em dias) na formação de tumores mamários nos murinos; no grupo DMBA a média de indução foi de 32 dias (mínimo de 28 e máximo de 35 dias), mas com formação tumoral em 100% dos casos ao término de 120 dias do início da indução, à semelhança dos dados registrados na literatura (Russo *et al.*, 1990, 2005a; Barros *et al.*, 2003).

Em nosso experimento, houve diferença estatística na quimioproteção dos SERMs (tamoxifeno e raloxifeno). Notamos que tanto o tamoxifeno como o raloxifeno têm efeito quimioprotetor na prevenção de tumores de mama em ratas, e o raloxifeno apresentou maior efeito protetor do que o tamoxifeno em relação ao número de ratas acometidas pelo tumor (no grupo raloxifeno três ratas apresentaram tumor - 15% das ratas; no grupo tamoxifeno nove ratas tiveram tumor – 45% dos casos). Neste quesito (número de tumores formados), a literatura não mostra valores comparativos do uso de tamoxifeno e raloxifeno nesse mesmo modelo experimental animal.

Por sua vez, o ensaio “Star (*Study Tamoxifen and Raloxifen*) ou NSABP-P2”, publicado por Vogel *et al.* (2006), não mostrou diferença na formação de tumores de mama em humanos, quando comparado o uso de tamoxifeno e raloxifeno em mulheres pós-menopáusicas e com alto risco para câncer de mama. Neste estudo, foram constatados, no decorrer de 47 meses (em média), 167 casos de câncer de mama no grupo raloxifeno e 163 casos no grupo tamoxifeno, não havendo diferença estatística entre os mesmos.

Quanto à avaliação do tamanho médio dos tumores induzidos nas ratas, por grupo específico (DMBA = 3cm; tamoxifeno = 2,7cm e raloxifeno = 2,0cm), a amostragem foi insuficiente para demonstrar diferença estatística relacionada à formação de tumores com menor tamanho.

O exame histopatológico dos tumores induzidos de mama nos três grupos (20 ratas no grupo DMBA, sete ratas no grupo raloxifeno e três ratas no grupo tamoxifeno), mostrou formação para carcinoma ductal invasivo tipo papilífero e comedocarcinoma, também, encontrado no estudo de Callejo *et al.* (2005). Para Russo *et al.* (2005a), havia formação de outros tipos histológicos de tumores mamários, porém bem menos freqüentes.

Nossos resultados revelaram receptor hormonal positivo para os três grupos estudados (DMBA, raloxifeno e tamoxifeno), evidenciando que as diferenças encontradas, para esse modelo animal, devem-se à ação dos SERMs (Russo *et al.*, 2005a; Manjanatha *et al.*, 2006; Stuhr *et al.*, 2006; Malejka-Giganti *et al.*, 2007); não havendo diferença estatística quanto a esse parâmetro.

Nos tumores induzidos, a análise da porcentagem de Ki67 mostrou alto índice para o grupo DMBA (17 ratas entre 75 e 80%), quando comparado aos outros dois grupos (grupo raloxifeno com três ratas igual a 50%, e grupo tamoxifeno com quatro ratas igual a 75%), $p < 0,10$. Neste sentido, considerando-se o valor de $p < 0,10$, o raloxifeno foi mais efetivo na quimioproteção da mama, quando comparado ao tamoxifeno. As porcentagens de Ki67 nos grupos raloxifeno e tamoxifeno em relação ao

DMBA foram menores, estando em concordância com a literatura (Russo *et al.*, 2005a; Cirpan *et al.*, 2006).

A avaliação dos resultados do grau histológico dos tumores de mama formados nos três grupos (DMBA - 100% grau 3; tamoxifeno - 71% grau e 29% grau 3; raloxifeno - 100% grau 2) mostrou haver menor grau histológico quando se utilizou o SERM, ou seja, menor indiferenciação e menor agressividade do tumor (Russo *et al.*, 2005a; Shan *et al.*, 2005). Comparando-se os grupos raloxifeno e tamoxifeno, o primeiro demonstrou melhor desempenho, levando-se em conta a formação de tumores mamários mais diferenciados.

Os primeiros fatores de angiogênese que se mostraram alterados no grupo tamoxifeno em relação ao DMBA foram o ANGPT2 e a ANGPT1. A angiopoietina-2 (ANGPT2) é um fator de crescimento endotelial de ação antagonista à angiopoietina-1 (ANGPT1) pelo receptor Tie2, obstruindo a autofosforilação do receptor durante a vasculogênese (Kim *et al.*, 2000).

O receptor Tie2 é um receptor de tirosina quinase presente, exclusivamente em células endoteliais e hematopoiéticas. Este receptor é necessário para o desenvolvimento normal das estruturas vasculares durante a embriogênese, ligando-se à angiopoietina 1, 2 e 4; este último tem ação agonista à ANGPT1 (Carter e Ward, 2000).

Por sua vez, a ANGPT1 tem importante papel na manutenção e estabilização dos vasos ao promover a interação das células endoteliais com as de suporte, acha-se expressa em vários tecidos e tem fraca atividade proliferativa no endotélio, ao contrário do VEGF (Tsutsui *et al.*, 2006).

Na literatura, existe relação entre maior expressão de angiopoietina-2 e superexpressão de Her-2 no câncer de mama via mecanismos AKT e quinase ativada por mitógeno; o que confere a esses casos maior agressividade e pior prognóstico (Niu e Carter, 2007). Em relação ao uso de tamoxifeno e maior expressão de ANGPT2 e ANGPT1, não encontramos nenhum trabalho específico, fazendo supor que esses tumores formados na vigência do uso de tamoxifeno são mais agressivos por natureza (Carter e Ward, 2000; Niu e Carter, 2007).

O HGF (fator de crescimento do hepatócito) é uma citocina produzida primariamente pelos fibroblastos estromais, tendo várias funções em processos fisiológicos, incluindo motilidade celular, migração, proliferação e capacidade invasiva tecidual. O HGF e seu receptor (cMet) estão implicados, como reguladores na progressão tumoral e da metástase mamária, apresentando-se superexpressos nesses casos (Martin *et al.*, 2004).

Obtivemos, como resultado, maior expressão de HGF no grupo tamoxifeno em relação ao DMBA (Tabela 8). Os relatos da literatura demonstram casos de superexpressão do HGF em tumores mamários mais agressivos e resistentes ao tamoxifeno, corroborando com os nossos achados (Hiscox *et al.*, 2006; Kuske *et al.*, 2006).

O Hif1a (fator indutor de hipóxia, subunidade1) é um fator de transcrição encontrado em células de mamíferos, nas quais o gene supressor tumoral VHL (Von Hippel-Lindau) provoca a ubiquitinação do Hif em resposta à mudança na oxigenação tecidual. A hipóxia é um processo

comum em muitos tumores sólidos, inclusive no câncer de mama (Coradini *et al.*, 2004).

Este processo desencadeia a expressão de Hif1a, que tem sido associada com tumores mamários de pior prognóstico e desregulação no receptor estrogênico, afetando a eficácia de agentes antiestrogênicos (Coradini *et al.*, 2004; Gruber *et al.*, 2004). Em nosso experimento, houve maior expressão de Hif1a no grupo tamoxifeno em relação ao DMBA (Tabela 8). Na literatura, encontramos relatos de maior expressão de Hif1a e resistência ao tratamento com tamoxifeno, o que explicaria os nossos resultados (Brennan *et al.*, 2006; Kronblad *et al.*, 2006).

O ITGB3 (integrina beta3) pertence à família de integrinas, que são glicoproteínas transmembranas, heterodímeras com função primordial no processo de adesão e relacionadas com os receptores de sinalização celular, influenciando a proliferação, a migração e a sobrevivência celular (Langsenlehner *et al.*, 2006; Baum *et al.*, 2007).

As subunidades 18α e 8β combinam-se para formar, no mínimo, 25 diferentes integrinas. Aumentos da expressão de $\beta 3$ são observados em tumores mamários associados com maior risco de invasão tumoral e de metástase (Hood e Cheresch, 2002; Bojesen *et al.*, 2003). As integrinas $\beta 3$ estão envolvidas na progressão tumoral e metástase, pois seu aumento altera a migração e adesão da matriz extracelular (Trikha *et al.*, 2002).

A elevação do nível de integrinas, também, estimula a angiogênese das células endoteliais não tumorais, providenciando suplemento vascular ao tumor. Em nosso experimento, houve maior expressão de ITGB3 no

grupo tamoxifeno em relação ao DMBA. Não foram encontrados, na literatura, trabalhos que associem a superexpressão de ITGB3 à ação do tamoxifeno no tecido mamário, podendo esse resultado estar relacionado à própria agressividade tumoral.

A LEP (leptina) é um hormônio polipeptídeo produzido predominantemente pelo tecido adiposo, com importante papel na homeostase do peso corpóreo (Zhang *et al.*, 1994). Participa, também, do processo de hematopoiese, reprodução, angiogênese e resposta imunológica. Seu gene acha-se localizado no cromossomo 7q31.3, produzindo RNAm sobretudo no tecido adiposo e agindo por meio de seu receptor (LEPR), da família citocina classe 1. Este receptor é expresso no cérebro, na placenta, no pulmão, no fígado, em células hematopoiéticas e outros tecidos. A LEP está relacionada ao processo de angiogênese e crescimento de vários tumores; tem interação na ação estrogênica na ativação da mesma em diferentes tipos celulares (O'Neil *et al.*, 2001).

Nos tumores mamários são demonstrados que a LEP e seu receptor (LEPR) são ambos expressos e agem favorecendo a proliferação e a metástase tumoral (Mauro *et al.*, 2007).

Em nosso trabalho, as ratas tratadas com tamoxifeno apresentaram maior expressão do LEP em relação ao grupo DMBA (Tabela 8).

A literatura demonstra que maior expressão de LEP está associada a tumores mamários mais agressivos, não havendo referência direta com o uso de tamoxifeno; mas, há a possibilidade de maior expressão da LEP em

tumores mamários resistentes ao tamoxifeno (Miyoshi *et al.*, 2006; Snoussi *et al.*, 2006).

O MAPK14 (proteína quinase mitógeno ativada 14) pertence à família do MAPK, proteínas cujas ações integram múltiplos sinais bioquímicos; são ativadas por uma variedade de sinais extracelulares e são rapidamente fosforiladas em resíduos de treonina e tirosina. Este peptídeo é conhecido, também, como uma proteína quinase supressiva a drogas antiinflamatórias (CSBP), inibindo a produção de interleucina-1 e TNF pelos monócitos, tendo determinada atividade em processos inflamatórios agudos e crônicos. Esta proteína quinase é ativada em resposta a vários mecanismos de estresse e também regula a diferenciação e a sobrevivência de muitas células (Ge *et al.*, 2002).

Em nosso estudo, obteve-se maior expressão de MAPK14 no grupo tamoxifeno em relação ao DMBA (Tabela 8). A literatura mostra maior resistência às drogas anti-hormonais, quando determinados mecanismos estão superexpressos, entre eles, a hiperativação de MAPK, o que explicaria os nossos resultados (Oh *et al.*, 2001; Creighton *et al.*, 2006).

O MMP19 *predicted* (metaloproteinase de matriz 19) pertence a uma família de proteases (MMP) ligadas ao zinco, com capacidade de degradar os componentes da matriz extracelular. Participa de várias funções em processos normal e patológico, que inclui remodelação tecidual, diferenciação, angiogênese e invasão tumoral. Os MMP têm diferentes substratos codificados por distintos genes. O MMP19 exibe uma distribuição de éxons e íntrons que difere de outros MMPs; está presente em vários tipos

celulares, incluindo as células mamárias. Essas proteases, por degradarem a matriz extracelular, estão relacionadas com o processo de invasão e metástase tumoral mamária. A superexpressão de MMP associa-se a tumores mamários de pior prognóstico (Sprague *et al.*, 2006).

Em nosso experimento, houve maior expressão do Mmp19 no grupo tamoxifeno em relação ao grupo DMBA (Tabela 8). Não foram encontrados dados na literatura que relacionem a célula mamária submetida ao tratamento com tamoxifeno e seu efeito no Mmp19.

A neuropilina 1 (NRP1) é um receptor proteico específico isofórmico para VEGF. Foi identificada, originalmente, como receptor para a família das semaforinas, como mediador neuronal. A NRP1 é expressa nas células endoteliais e na superfície de várias células tumorais, inclusive, a mamária (Barr *et al.*, 2005).

Estes peptídeos podem agir em conjunto com outros receptores de superfície, mediando a transdução do sinal e não dependendo da presença da semaforina para sua ação. Eles, também, podem se ligar formando o complexo neuropilina-plexina, neste caso, a plexina é o elemento da transdução do sinal para o complexo (Weigand *et al.*, 2005).

A NRP1 exerce importante atividade antiapoptótica autócrina e é sinalizada pelo VEGF proveniente das células tumorais. Níveis mais altos de NRP1 nas células tumorais mamárias estão associados com maior risco de invasão (Fitzpatrick *et al.*, 2003).

Os resultados do nosso estudo mostraram maior expressão de NRP1 no grupo tamoxifeno em relação ao grupo DMBA (Tabela 8). Pesquisa já

realizada mostrou que a proteína plexina B1, que se liga à neuropilina 1, pode apresentar resistência à terapia hormonal (Rody *et al.*, 2007) e, também, por ser receptor de VEGF pode estar ligada a casos de tumores mais agressivos e ser resistente ao tamoxifeno (Ryden *et al.*, 2005a, 2005b).

O PGF (fator de crescimento placentário) pertence à família do VEGF, foi isolado em células placentárias por Maglione (1991). Teria a habilidade de promover a proliferação da célula endotelial. Esse peptídeo apresenta três isoformas (PGF1, PGF2, PGF3) que realizam o processo de transcrição do sinal sobretudo pelo receptor VEGFR1; contudo, a ativação desse último pode levar à transfosforilação do VEGFR2 (Autiero *et al.*, 2003).

O PGF não é produzido na maioria dos tecidos humanos em condições normais, inclusive no mamário. Todavia, pode estar expresso no endotélio vascular, nas células endoteliais da veia umbilical, no trofoblasto, no olho, nas células naturais *Killers* uterinas e na matriz dos dentes (Autiero *et al.*, 2003).

Em muitos tumores, como o adenocarcinoma gástrico, carcinoma renal, melanoma, carcinoma escamoso do colo uterino, meningiomas e, também, o carcinoma mamário, o PGF está superexpresso. Os tumores mamários que apresentam altos níveis de PGF estão associados com maior risco para metástase linfonodal e tumores indiferenciados, conferindo, assim, pior prognóstico (Parr *et al.*, 2005; Taylor e Goldenberg, 2007).

Em nosso experimento, observamos maior expressão de PGF no grupo tamoxifeno em relação ao DMBA (Tabela 8). Na literatura não existe registro de tumores mamários submetidos ao tratamento com tamoxifeno e

expressão de PGF, o que pode indicar que o tamoxifeno não consegue bloquear este tipo de VEGF, ou ainda, tratar-se de tumores resistentes aos medicamentos anti-hormonais à semelhança da resistência dos demais tipos de VEGF (Ryden *et al.*, 2005a, 2005b).

O PLAU (ativador de plasminogênio urinário ou UPA) é uma enzima proteolítica que converte o plasminogênio em plasmina. Neste sistema, existem quatro grandes componentes: protease serina uPA, receptor de superfície celular uPAR e os inibidores dos ativadores de plasminogênio PAI-1 e PAI-2, que têm sido utilizados, como fatores prognósticos em câncer de mama (Meijer-van Gelder *et al.*, 2004).

A alta expressão do sistema uPA está relacionada com o aumento da degradação e remodelação da matriz extracelular; portanto, eleva o risco no processo de invasão e metástase nos tecidos tumorais mamários (Leissner *et al.*, 2006; Urban *et al.*, 2006).

No presente estudo, obtivemos maior expressão do PLAU (uPA) nas ratas tratadas com tamoxifeno em relação ao grupo DMBA (Tabela 8). A literatura específica registra casos de tumores mamários mais agressivos, que são resistentes ao tratamento com tamoxifeno, podendo justificar nossos resultados (Meijer-van Gelder *et al.*, 2004; Leissner *et al.*, 2006; Urban *et al.*, 2006).

O Serpinf1 (fator pigmentar epitélio derivado) pertence a um grupo de inibidores de proteases serinas; o fator está relacionado à atividade neurotrópica. Este gene foi isolado em células epiteliais pigmentares

retinianas de cultura de célula fetal por Steele *et al.* (1993). Sua proteína está associada com atividade antiangiogênica importante.

Níveis altos de Serpinf1 correlacionam-se com tumores de menor agressividade, inclusive, o câncer de mama (Beckers *et al.*, 2005). Nas ratas tratadas com tamoxifeno houve maior expressão de Serpinf1 em relação ao grupo do DMBA (Tabela 8). Estes dados poderiam explicar a formação de menor número de tumores formados no grupo tamoxifeno (Tabela 3), pois, tal gene, por sua ação antiangiogênica, poderia auxiliar na proteção mamária.

O TEK (tirosina quinase endotelial ou TIE2) é um receptor tirosina quinase presente quase, exclusivamente, em células endoteliais de camundongos, ratas e no ser humano Pertence ao conjunto de quatro receptores quinases específicos para células endoteliais vasculares (as outras são o Tie1, o FLT1 e o Flk1).

Este receptor apresenta um único domínio extracelular, contendo duas imunoglobulinas separadas pelo EGF3 símile que está conectado à fibronectina tipo3. O receptor liga-se à angiopoietina 1,2 e 4. O ligante Ang2 tem afinidade similar à angiopoietina1 com o Tie2, contudo, o primeiro não induz à fosforilação do receptor. Dessa forma, a angiopoietina2 compete inibindo a ativação da Ang1. A angiopoietina 4 humana (homóloga, a murina Ang3) parece agir como agonista parcial da angiopoietina 1 (Meunier-Carpentier *et al.*, 2005).

O Tek (Tie2) é importante receptor que participa de vários processos fisiológicos e patológicos, tais como, o sistema de coagulação, o processo de inflamação e a resposta angiogênica (Meunier-Carpentier *et al.*, 2005).

Os tumores mamários que apresentam alta expressão de Tek (Tie2) e, portanto, maior associação com o processo de angiogênese tumoral, têm maior risco de invasão e metástase, o que confere pior prognóstico (Dales *et al.*, 2003; Meunier-Carpentier *et al.*, 2005).

Em nossa pesquisa, houve maior expressão de Tek (Tie2) no grupo tamoxifeno em relação ao DMBA (Tabela 8). Na literatura, não há registro de tumores mamários que receberam tratamento com medicamento anti-hormonal e sua relação com a expressão do Tek (Tie2).

O Tgfb1 (fator transformador de crescimento beta 1) e o Tgfb2 (fator transformador de crescimento beta 2) são peptídeos multifuncionais que participam na proliferação, diferenciação, produção e degradação da matriz extracelular e na morfogênese e apoptose em várias células. Age sinergicamente ao Tgfa induzindo a transformação celular, atuando como um fator de crescimento autócrino negativo. A desregulação do Tgfb pode resultar no processo de apoptose celular, muitas células sintetizam Tgfb e suas funções são transcritas pelos receptores específicos para este peptídeo (Buck *et al.*, 2002).

A sinalização intracelular do Tgfb é complexa; outros mecanismos podem ser ativados, como os Smads, os Mapk, o fosfoinositol quinase e o PP2A. O Tgfb1 e o Tgfb2 são igualmente efetivos em inibir o crescimento da

célula mamária tumoral. O tamoxifeno aumenta os níveis de TGFB nas células mamárias (Buck *et al.*, 2002).

Este peptídeo é um potente inibidor do crescimento de células epiteliais normais; contudo, as várias células tumorais, inclusive a mamária, não respondem adequadamente ao efeito inibitório do Tgfb; pela redução do receptor Tgfr2 e outros mecanismos (Barlow *et al.*, 2003; Ryu e Kern, 2003).

Células cancerosas, também, secretam em grande quantidade, Tgfb, associado a tumores mais avançados e em progressão, como o câncer de mama (Chen *et al.*, 2006; Kaklamani *et al.*, 2005; Pasche *et al.*, 2005).

Observamos maior expressão de TGFB1 e TGFB2 no grupo tamoxifeno em relação ao grupo do DMBA (Tabela 8). Na literatura, há relatos de níveis altos de expressão de Tgfb e resistência ao tamoxifeno, justificando nossos dados (Arteaga *et al.*, 1999; Buck *et al.*, 2004a, 2004b).

Os Timp3 (inibidores teciduais de metaloproteinase 3) são peptídeos que inibem a atividade das metaloproteinases de matriz (MMP), mas, paradoxalmente, também, podem ativar algumas delas por atividade mitogênica, agindo como fator de crescimento (Kawai *et al.*, 2006; Vizoso *et al.*, 2007).

Níveis altos de MMP e Timp3 estão relacionados com casos de pior prognóstico e maior risco de metástase em câncer de mama (Jinga *et al.*, 2006; Lipton *et al.*, 2007; Vizoso *et al.*, 2007). Obtivemos maior expressão de Timp3 no grupo tamoxifeno em relação ao DMBA (Tabela 8). Essa alta expressão de Timp poderia estar relacionada com diminuição da resposta ao

tratamento anti-hormonal, comprovando nossos resultados (Lipton *et al.*, 2007).

O Tnf (fator de necrose tumoral) é uma citocina pró-inflamatória, multifuncional, secretada predominantemente por monócitos e macrófagos. Tem efeito no metabolismo lipídico, na coagulação, na resistência à insulina, e na função endotelial e está envolvida no processo de apoptose celular. Esta citocina pleotrópica é reconhecida por sua ação citotóxica contra uma variedade de células tumorais, inclusive a mama, sendo capaz de induzir a regressão tumoral com eficácia comparada a certos quimioterápicos (Rayala *et al.*, 2006; Seeger *et al.*, 2006).

Os altos níveis de TNF em pacientes com câncer, incluindo o de mama, estão associados com pior prognóstico, com aumento de risco de recidiva e de metástase. Vários estudos mostraram que a excessiva produção de TNF está relacionada com perda de peso, caquexia, desregulação na resposta imunológica e anemia. Os dados sugerem que o TNF pode agir como promotor endógeno; o polimorfismo do TNF e suas proteínas de choque hsp70 aumentam a susceptibilidade da proliferação tumoral (Mestiri *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2006).

Em nosso estudo, houve maior expressão de TNF no grupo tamoxifeno em relação ao DMBA (Tabela 8). Na literatura, encontramos relatos de aumento de expressão de TNF e resistência ao tamoxifeno, justificando nossos resultados (Osipo *et al.*, 2003; Rayala *et al.*, 2006).

O VEGFA e o VGFC (fatores de crescimento endotelial vascular A e C) integram os cinco membros da família VEGF (a, b, c, d, e), exercem

importante papel na formação da rede vascular e atuam por meio de três receptores (VEGFR 1,2, 3) (Mylona *et al.*, 2007).

Estes fatores de crescimento são polipeptídeos com ação mitogênica endotelial potente e com crescimento angiogênico da célula endotelial para a matriz extracelular, ligando-se aos receptores específicos. O VEGFA liga-se a dois receptores, o VEGFR1 (Flt1) e o VEGFR2 (Flk1), com atividade tirosina quinase, e o segundo apresenta maior atividade proliferativa endotelial (Hatake *et al.*, 2007).

O VEGFR1 (Flt1) é um dos receptores tirosina quinase presente em células endoteliais com ação na diferenciação e proliferação celular. Vários tipos celulares expressam os receptores de VEGF, inclusive, a célula tumoral mamária, apresentando ação autócrina e parácrina, além do estímulo angiogênico (Fitzpatrick *et al.*, 2003).

O VEGFR2 (Flk1), também, está associado à atividade proliferativa via estímulo mitógeno ativado por proteína quinase, algo que o VEGFR1 (Flt1) não faz. O VEGFC exerce sua atividade biológica, principalmente, pelo receptor VEGFR-3 (Flt-4), com importante atividade regulatória na proliferação endotelial linfática e na linfangiogênese. Este fator de crescimento (VEGFC) é um primordial ativador da linfangiogênese e está fortemente implicado no processo de metástase (Tsai *et al.*, 2003).

Altos níveis de expressão do VEGF no câncer mamário estão associados a piores prognósticos, com maior risco de recidiva e de metástase (Mylona *et al.*, 2007; Schneider e Sledge, 2007).

O VEGFC está relacionado com maior risco de linfangiogênese e metástase linfonodal, piorando o fator prognóstico do tumor de mama. Esse peptídeo estimula a proliferação de tumores receptores de estrogênio independente em modelos experimentais para câncer de mama (Nakamura *et al.*, 2006; Schoppmann *et al.*, 2006).

A superexpressão de Her2, similarmente, à superexpressão do VEGFR2 em tumores RE positivos reduz o efeito de medicamentos anti-hormonais (Hoar *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2006).

Nas ratas submetidas ao tamoxifeno, observamos maior expressão de VEGFC, quando comparadas àquelas que receberam apenas DMBA (Tabela 8). Na literatura, existem casos de maior expressão de VEGF em tumores mamários resistentes aos medicamentos anti-hormonais, o que explicariam os nossos resultados (Ryden *et al.*, 2005a, 2005b).

Com relação aos animais que receberam raloxifeno, percebemos menor expressão de fatores gênicos comparativamente aos tratados com tamoxifeno (Tabela 8 e Tabela 9).

O primeiro gene alterado no grupo raloxifeno foi o *Fgf6* (fator de crescimento de fibroblasto 6) que pertence a uma família de fatores de crescimento e oncogenes com papel no desenvolvimento embrionário, crescimento celular, morfogênese, reparo tecidual, processo inflamatório, angiogênese, proliferação e invasão tumoral. O FGF tem, no mínimo, 23 proteínas regulatórias de crescimento, ligando-se a quatro diferentes receptores transmembranas tirosinas quinases (FGFR 1, FGFR 2, FGFR 3 e FGFR 4) (Gan *et al.*, 2006).

Esta proteína está relacionada com o estímulo da proliferação celular mamária via mecanismo autócrino e parácrino; seus níveis são elevados em tumores mamários, pois, atuam estimulando seu crescimento, capacidade invasiva e de angiogênese, associando-se a pior prognóstico e metástase. Em nosso estudo, houve menor expressão do gene *Fgf6* no grupo raloxifeno em relação ao grupo DMBA (Tabela 9). Este resultado pode corroborar o efeito protetor do raloxifeno e justificar o menor número de tumores formados neste grupo (Tabela 9) (Mironchik *et al.*, 2005; Gan *et al.*, 2006).

O PECAM1 (células de adesão endotelial plaquetária, molécula 1) é um membro da superfamília de imunoglobulinas que são expressas na superfície plaquetária, em monócitos, em neutrófilos e em subtipos de células T. Está presente, também, como constituinte na junção intercelular da célula endotelial e tem identidade imunológica semelhante à de uma glicoproteína da membrana plaquetária (antígeno CD31) (Dales *et al.*, 2004).

Apresentam várias funções, incluindo a migração transendotelial de leucócitos, a ativação de integrinas e a angiogênese. As células tumorais mamárias que expressam alto nível de PECAM-1 (CD-31) estão relacionadas com maior processo de angiogênese tumoral e, portanto, pior prognóstico (Charpin *et al.*, 2004; Dales *et al.*, 2004).

Nossos resultados mostraram subexpressão do PECAM-1 no grupo raloxifeno em relação ao DMBA (Tabela 9). Não foram encontrados trabalhos demonstrando a ação dos SERMs (tamoxifeno ou raloxifeno) na interação direta com esta imunoglobulina nas células tumorais mamárias,

mas esta menor expressão poderia justificar a contribuição no resultado favorável do experimento (Tabela 3).

O Hif1a (fator indutor de hipóxia, subunidade1), como já analisamos, é um fator de transcrição com papel chave na resposta celular à hipóxia, incluindo, a regulação de genes envolvidos no metabolismo energético, na angiogênese e na apoptose. O processo de hipóxia está presente na proliferação e na diferenciação de vários tumores, inclusive, o mamário; está relacionado com a desregulação do receptor estrogênico, afetando a eficácia de drogas antiestrogênicas (Kronblad *et al.*, 2006).

Obtivemos maior expressão de Hif1a nas ratas tratadas com raloxifeno em relação ao grupo DMBA (Tabela 9), podendo se tratar de casos resistentes ao raloxifeno como mostra a literatura (Coradini *et al.*, 2004; Gruber *et al.*, 2004; Brennan *et al.*, 2006; Kronblad *et al.*, 2006).

O ITGB3 (integrina beta3), como vimos, é um dos membros da família das integrinas, sendo formado por glicoproteínas da superfície celular e apresentando subunidades alfa e beta. O comportamento das células neoplásicas é influenciado pela ação das integrinas nos receptores de adesão celular,mediando a interação entre estas células e a matriz extracelular (Baum *et al.*, 2007).

Elas,também, estimulam a sinalização dos receptores celulares, a ação dos fatores de crescimento,proliferação,migração e sobrevida celular, e exercem papel importante no comportamento tumoral e na metástase. As integrinas B3 ($\alpha5\beta3$, $\alpha2b\beta3$) estão envolvidas no processo de desenvolvimento e progressão tumoral, e o $\alpha2b\beta3$ é o responsável pela

agregação plaquetária induzida pelo tumor, na aderência destas células ao endotélio, extravazamento e angiogênese, etapas essenciais na cascata do processo de metástase. A expressão da integrina $\alpha 5\beta 3$ está relacionada com a motilidade, invasão e diferenciação neoplásica, além do processo de angiogênese tumoral, inclusive, o mamário (Hood e Cheresh, 2002; Hood *et al.*, 2003).

Os tumores mamários com altos níveis de integrinas B3 são mais agressivos e propensos a metástases (Langsenlehner *et al.*, 2006; Baum *et al.*, 2007).

No nosso trabalho obtivemos maior expressão de ITGB3 (integrina beta3) no grupo raloxifeno em relação ao DMBA (Tabela 9). Não encontramos, na literatura, a associação da expressão desta integrina em tumores mamários na vigência do SERM raloxifeno.

O PGF (fator de crescimento placentário), como descrito anteriormente, é um tipo de VEGF símile, que pertence a uma família de peptídeos regulatórios capazes de controlar a formação de vasos sanguíneos e sua permeabilidade, por interagir com dois receptores tirosinas quinases (Flt1 e o Flk1) (Autiero *et al.*, 2003).

Os tumores mamários que expressam PGF estão relacionados com maior risco de invasão e pior prognóstico (Parr *et al.*, 2005; Taylor e Goldenberg, 2007).

Nosso trabalho revelou maior expressão do PGF no grupo raloxifeno em relação ao DMBA (Tabela 9). Na literatura, não há relato da associação da expressão do PGF em tumores mamários que receberam raloxifeno,

podendo esse resultado indicar que o raloxifeno não interage com tal peptídeo, ou ainda, tratar-se de tumor com alta expressão de VEGF e resistente a medicamento anti-hormonal (Liang *et al.*, 2006).

O PLAU (ativador de plasminogênio urinário ou UPA), como já se referiu, é uma proteína catalítica que converte o plasminogênio em plasmina. Este sistema está implicado no processo de invasão tumoral e na metástase de vários cânceres, inclusive o mamário, principalmente com altos níveis de expressão de uPA e PAI1 (Harbeck *et al.*, 2007).

Os componentes do sistema de ativação do plasminogênio são determinantes na capacidade invasiva tumoral por participarem dos processos proteolíticos e não proteolíticos na progressão tumoral. Estes processos incluem a degradação da matriz extracelular, proliferação, migração e adesão celular, mecanismos envolvidos na capacidade de metástase (Stillfried *et al.*, 2007).

Em nosso experimento, houve maior expressão de PLAU no grupo raloxifeno em relação ao DMBA (Tabela 9). Na literatura, não há registro da relação de expressão do sistema PLAU em tumores mamários submetidos ao tratamento com raloxifeno. Este resultado poderia refletir a natureza específica dos tumores mais agressivos que foram formados ou à semelhança da terapêutica com tamoxifeno, tratar-se de casos resistentes a medicamentos anti-hormonais (Meijer-van Gelder *et al.*, 2004; Leissner *et al.*, 2006; Urban *et al.*, 2006).

O TEK (tirosina quinase ou TIE2), como já descrevemos, é um dos subtipos de receptores tirosinas quinases, estando presentes exclusivamente em ratas, camundongos e células humanas (Dales *et al.*, 2004).

Este receptor está envolvido em mecanismos fisiológicos e patológicos; participa no processo do sistema de coagulação, de inflamação e de angiogênese, inclusive, no tumoral mamário. Os cânceres mamários que expressam o TEK (TIE2) têm maior risco de invasão e metástases, conferindo pior prognóstico (Dales *et al.*, 2003, 2004; Meunier-Carpentier *et al.*, 2005).

Observamos maior expressão de TEK (TIE2) no grupo raloxifeno em relação ao DMBA (Tabela 9). Na literatura, não foram encontrados tumores mamários que expressam TEK e sua relação com medicamentos anti-hormonais.

O VEGFC (fator de crescimento endotelial vascular C), como relatado anteriormente, é um polipeptídeo com ação mitogênica endotelial potente e com crescimento angiogênico da célula endotelial para a matriz extracelular, ligando-se aos receptores VEGFR2 e VEGFR3 (estes últimos com atividade linfangiogênica). Vários tipos celulares expressam os receptores de VEGF, inclusive, a célula tumoral mamária, tendo ação proliferativa e angiogênica e associando-se a tumores mais agressivos (Fitzpatrick *et al.*, 2003; Schneider e Sledge, 2007).

O VEGFC está relacionado com maior risco de linfangiogênese e metástase linfonodal para os tumores mamários (Nakamura *et al.*, 2006; Schoppmann *et al.*, 2006).

Este peptídeo estimula a proliferação de tumores receptores de estrogênio independente em modelos experimentais para câncer de mama. A superexpressão de Her2, similarmente à superexpressão do VEGFR2, em tumores RE positivos reduz o efeito de medicamentos anti-hormonais (Hoar *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2006).

Nosso experimento apresentou maior expressão de VEGFC no grupo raloxifeno em relação ao DMBA (Tabela 9). A literatura relata casos de maior expressão de VEGF em tumores mamários resistentes aos medicamentos anti-hormonais, podendo explicar nossos resultados (Liang *et al.*, 2006).

Como assinalamos anteriormente, o PGF (fator de crescimento placentário) pertence à família do VEGF, foi isolado de células placentárias por Maglione *et al.* (1991) e tem habilidade de promover a proliferação da célula endotelial.

Os tumores mamários que apresentam altos níveis de PGF, estão associados com maior risco para metástase linfonodal e tumores indiferenciados, conferindo um pior prognóstico (Parr *et al.*, 2005; Taylor e Goldenberg, 2007).

Quanto ao PGF, em nosso estudo houve maior expressão no grupo raloxifeno em relação ao DMBA (Tabela 9). Na literatura, não há registro de tumores mamários submetidos ao tratamento com raloxifeno e expressão de PGF, o que pode indicar que o raloxifeno não consegue bloquear esse VEGF, ou ainda, que os tumores induzidos podem ser resistentes aos medicamentos anti-hormonais (Ryden *et al.*, 2005a, 2005b).

O fenômeno de angiogênese tumoral consiste na formação de novos vasos sanguíneos (arterial e venoso) necessários para suprir seu aporte metabólico e garantir seu potencial no crescimento tumoral e no processo de metástase mamária (Harris *et al.*, 2004).

Este mecanismo é extremamente diverso, envolvendo a interação de vários fatores celulares e estromais; balanço entre substâncias pró-angiogênicas, angiogênicas e antiangiogênicas; e a interação de integrinas, inibidores de proteases (Timps) e proteases que degradam ou não a matriz extracelular e possibilitam as células tumorais invadirem o estroma (Harris *et al.*, 2004; Bando, 2007).

Outros fatores que podem estar envolvidos na atividade angiogênica tumoral, são o grau de hipóxia celular e mudanças genéticas dessas células (Miller *et al.*, 2007; Seifeddine *et al.*, 2007).

Portanto, o processo de angiogênese tumoral é complexo e essencial nas etapas de progressão, invasão e na metástase tumoral mamária (Harris *et al.*, 2004; Traina *et al.*, 2007).

O câncer de mama é doença heterogênea e seu comportamento clínico é diferente para o mesmo estadiamento clínico-patológico, por apresentar diversos fatores prognósticos e preditivos, entre eles o fator angiogênico, inclusive para os roedores (American, 2002; Cardiff *et al.*, 2002; Boudreau e Myers, 2003; Russo *et al.*, 2005a; Bando, 2007).

Vários estudos, desde Weidner e colaboradores (1992), que foram os pioneiros, mostraram que a pesquisa da angiogênese pode ter valor prognóstico no tumor mamário, apesar de outros trabalhos demonstrarem

resultados contraditórios, inclusive, porque os tumores contêm células diferentes quanto à sua atividade angiogênica (Ahlgren *et al.*, 2002; Weidner, 2004; Naumov *et al.*, 2006; Mylona *et al.*, 2007).

Apesar desta complexidade e, por entender que o processo de angiogênese tumoral é essencial na progressão, invasão e metástase, este processo tem sido alvo para terapias biológicas com agentes antiangiogênicos no câncer de mama.

No entanto, devemos considerar que o uso adequado dessas novas drogas depende da melhor compreensão dos vários mecanismos envolvidos no processo da angiogênese tumoral e do desempenho adequado das substâncias nos ensaios clínicos e experimentais (Bando, 2007; Mayer *et al.*, 2007).

Outro grande problema é o custo extremamente oneroso desses medicamentos antiangiogênicos (Bando, 2007).

Utilizamos um *Kit* de qRT-PCR em ratas para a pesquisa de fatores envolvidos, direta ou indiretamente, no processo de angiogênese. Realizou-se um estudo de oitenta e quatro genes, na tentativa de abranger esse mecanismo tão complexo e amplo. Foram utilizados, também, dois SERMs conhecidos, o tamoxifeno e o raloxifeno, que são substâncias implicadas em várias pesquisas na terapêutica do câncer de mama, inclusive, na quimioprevenção. Estes SERMs ainda apresentam questionamentos e dúvidas sobre seu real mecanismo de ação, pois possuem ações que vão além do bloqueio parcial ou total do receptor estrogênico (Cuzick *et al.*, 2007; Howell *et al.*, 2007; Jordan, 2007).

Além disso, para ocorrer a transformação do tecido hiperplásico mamário em tecido tumoral é fundamental que ocorra o processo de angiogênese em modelos experimentais (Schneider e Miller, 2005).

Em nosso experimento, de fato, houve maior expressão de certos fatores angiogênicos quando utilizados o tamoxifeno (Tabela 8) e o raloxifeno (Tabela 9) em relação ao DMBA. Estes resultados demonstraram que os SERMs, tamoxifeno e raloxifeno, também participam do processo de angiogênese tumoral, podendo mostrar outro mecanismo de ação destes SERMs, além do bloqueio do receptor estrogênico.

Na literatura específica, são registrados casos de resistência tumoral mamária à terapêutica com medicamentos anti-hormonais, cujo mecanismo de ação envolve determinados fatores angiogênicos que estimulam a proliferação mamária, possibilitando maior agressividade e invasão tumoral (Buck *et al.*, 2004a, 2004b; Ryden *et al.*, 2005a, 2005b; Creighton *et al.*, 2006; Kuske *et al.*, 2006; Nakamura *et al.*, 2006; Lehnes *et al.*, 2007; Lipton *et al.*, 2007).

Em futuro próximo, poderemos com o auxílio do perfilamento genético, aprimorar e selecionar os casos de tumores mamários que terão melhor resposta aos medicamentos anti-hormonais e com menor risco de resistência, inclusive, os medicamentos para quimioprevenção mamária, como os SERMs.

Em nosso trabalho, o melhor resultado do raloxifeno em relação ao tamoxifeno na quimioprevenção mamária pode ser atribuído, em parte, pela

diferença de expressão de fatores angiogênicos menos agressivos nos tumores mamários induzidos.

Em resumo, esta linha de pesquisa, poderá propiciar o desenvolvimento de novos estudos, assim como auxiliar na compreensão dos diferentes mecanismos envolvidos no processo de carcinogênese mamária. Além disso, poderá ainda contribuir para a melhoria da quimioprevenção mamária e ser útil na busca de terapêuticas mais efetivas contra o câncer de mama.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo e neste modelo experimental, concluímos que:

1. Os SERMs tamoxifeno e raloxifeno apresentaram atividade quimioprotetora na carcinogênese mamária.
2. O raloxifeno em relação ao tamoxifeno na quimioprevenção mamária apresentou:
 - menor número de ratas acometidas;
 - maior tempo de indução tumoral;
 - tumores menos agressivos, com menor grau histológico;
 - semelhante número médio de tumores.
3. Não houve diferença com relação à expressão de receptores estrogênicos. Mas, a expressão de Ki67 foi menor nos animais que receberam raloxifeno.
4. Houve menor expressão de fatores angiogênicos relacionados à agressividade tumoral com o uso do raloxifeno em comparação ao tamoxifeno. Esta diferença de expressão angiogênica explicaria os resultados mais favoráveis obtidos com o raloxifeno.

Anexo A: Medidas Descritivas

Avaliação de peso (g) das ratas pertencentes ao **GRUPO 1 - DMBA**

Rata	1ª pes	2ª pes	3ª pes	4ª pes	5ª pes	6ª pes	7ª pes	8ª pes	9ª pes	10ª pes	11ª pes	12ª pes
1	141	149	160	169	176	200	206	209	221	230	241	250
2	160	169	179	181	201	211	221	223	230	247	251	252
3	147	151	156	171	186	201	214	224	231	244	250	256
4	133	142	153	165	175	196	205	215	225	235	242	248
5	129	136	147	159	166	178	196	208	218	235	244	257
6	140	146	158	161	174	181	195	211	231	235	249	259
7	151	159	178	197	210	214	234	247	249	257	261	266
8	144	149	158	166	177	183	196	206	211	230	239	246
9	157	166	169	178	186	199	205	218	229	241	252	263
10	136	142	149	157	169	181	201	221	232	240	251	254
11	141	150	164	171	186	195	202	220	234	251	260	268
12	139	145	156	172	190	201	210	231	244	252	263	269
13	148	151	159	169	186	202	215	229	238	245	246	254
14	138	140	146	157	164	173	186	199	208	217	236	240
15	131	142	149	152	164	177	179	191	194	200	219	239
16	132	155	156	180	198	212	219	223	235	235	242	243
17	135	152	155	176	197	209	218	228	237	239	241	248
18	137	153	158	190	193	202	215	221	220	231	234	241
19	130	152	156	176	192	206	210	221	222	237	247	246
20	148	155	161	177	186	200	210	223	224	235	246	252

Pes = pesagem, 1ª pes: peso antes do início do estudo.

Anexo B: Avaliação de peso das ratas pertencentes ao GRUPO 2 - TAMOXIFENO

Rata	1ª pes	2ª pes	3ª pes	4ª pes	5ª pes	6ª pes	7ª pes	8ª pes	9ª pes	10ª pes	11ª pes	12ª pes
1	157	166	171	186	196	23	214	224	234	243	257	260
2	150	163	166	175	186	191	196	217	225	235	243	253
3	145	152	164	187	197	206	229	237	243	252	257	262
4	148	161	170	180	194	199	27	234	244	251	258	262
5	156	166	176	198	220	237	247	254	260	266	270	283
6	153	159	171	188	199	206	214	224	234	248	252	261
7	143	158	170	196	205	218	223	230	240	248	253	257
8	141	151	159	168	179	185	195	204	211	219	219	220
9	145	155	168	174	178	184	196	205	215	219	225	231
10	147	153	166	178	183	190	200	212	220	230	239	238
11	144	151	167	177	184	192	204	210	219	221	230	240
12	142	149	157	183	187	191	208	212	225	229	241	242
13	161	170	181	200	218	228	234	244	249	252	252	260
14	156	166	179	187	202	215	223	230	238	241	271	262
15	158	168	188	195	213	218	230	241	247	260	265	275
16	144	152	163	175	190	23	218	223	241	251	251	260
17	143	150	160	172	183	198	23	208	225	263	270	270
18	142	151	158	170	179	185	198	221	230	239	240	249
19	149	158	168	172	182	194	200	208	218	227	230	240
20	152	162	173	192	219	230	258	263	265	273	273	279

Pes = pesagem, 1ª pes: peso antes do início do estudo.

Anexo C: Avaliação de peso das ratas pertencentes ao GRUPO 3 - RALOXIFENO

Rata	1ª pes	2ª pes	3ª pes	4ª pes	5ª pes	6ª pes	7ª pes	8ª pes	9ª pes		11ª pes	12ª pes
1	157	175	177	200	208	218	218	225	232	232	240	241
2	167	184	193	210	214	239	239	244	239	248	255	255
3	147	166	175	190	222	224	230	240	241	245	253	253
4	148	158	199	218	224	242	242	247	260	281	280	281
5	150	172	27	225	244	253	278	270	287	282	285	300
6	145	173	189	208	218	223	242	242	243	250	259	258
7	155	173	200	221	240	243	249	264	268	270	282	276
8	176	208	231	258	271	283	300	294	309	33	320	322
9	159	183	210	246	264	267	300	304	299	320	320	318
10	140	152	156	176	192	206	210	221	222	237	237	242
11	136	148	152	178	190	200	209	215	216	223	238	238
12	140	148	156	183	191	201	210	219	219	227	234	239
13	142	160	169	181	198	27	214	219	220	230	235	236
14	147	159	162	170	179	188	193	202	215	218	224	240
15	149	151	160	171	187	193	199	23	208	212	216	226
16	140	145	155	158	196	216	231	245	248	259	263	263
17	138	142	154	159	188	212	222	231	238	241	251	260
18	140	154	159	196	204	223	232	240	249	252	258	266
19	136	144	184	185	194	208	216	226	226	236	238	243
20	149	170	176	198	214	225	233	236	241	244	252	260

Pes = pesagem, 1ª pes: peso antes do início do estudo.

Anexo D: Carta de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética da FMUSP**HOSPITAL DAS CLÍNICAS**

D A

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAIXA POSTAL, 3671

SÃO PAULO - BRASIL

DIRETORIA CLÍNICA**Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa****APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 13.03.02, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 456/01, intitulado: "Prevenção primária do câncer da mama quimicamente induzido em ratas com modulador seletivo dos receptores estrogênicos, apresentado pelo Departamento de Obstetrícia e Ginecologia.

Pesquisador(a) Responsável: Prof. Dr. Alfredo Carlos Simões
Dornellas de Barros

CAPPesq, 19 de março de 2002.


PROF. DR. JORGE KALIL FILHO

Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c")

Anexo E: Listagem dos genes

Símbolo	Descrição	Nome do Gene	Referência Sequencial
Angpt2	Angiopietina 2	Agpt2/Ang-2	XM_344544
Akt1	Proto-oncogene 1 timoma viral	Akt	NM_33230
Angpt1	Angiopietina 1	Agpt/Agpt1	NM_053546
Anpep	Alanil (membrana) aminopeptidase	APN/Apm	NM_31012
Bai1_predicted	Inibidor da angiogênese específica cerebral 1 (previsto)	LOC362931	XM_343260
Ccl2	Quimoquina C-C modificada ligante 2	MCP-1/Scya2	NM_31530
Cdh5_predicted	Caderina 5 (previsto)	Cdh5	XM_226213
Col18a1	Procolágeno, tipo XVIII, alfa 1	Col18a1	XM_241632
Col4a3	Procolágeno, tipo IV, alfa 3	Col4a3	XM_34367
Ctgf	Fator de crescimento do tecido conjuntivo	CTGRP	NM_022266
Cxcl1	Quimoquina C-X-C modificada ligante 1	CINC-1/Gro1	NM_30845
Cxcl2	Quimoquina C-X-C modificada ligante 2	Mip-2/Scyb2	NM_053647
Cxcl9	Quimoquina C-X-C modificada ligante 9	Mig/Scyb9	NM_145672
Ecgf1	Fator 1 de crescimento da célula endotelial (plaqueta-derivado)	MGC108801	NM_001012122
Edg1	Esfingolipide G de diferenciação endotelial proteína receptor duplo 1	Edg1	NM_017301

Símbolo	Descrição	Nome do Gene	Referência Sequencial
Efna1	Efrina A1	B61	NM_053599
Efna2	Efrina A2	Efna2	XM_23493
Efna5	Efrina A5	Lerk7	NM_05393
Egf	Fator de crescimento Epidérmico	Egf	NM_012842
Eng	Endoglina	MGC124909	NM_001010968
Epas1	Proteína 1 endotelial PAS	HLF/Hif2a	NM_023090
Ereg	Épiregulina	Ereg	NM_021689
F2	Fator de coagulação II	F2	NM_022924
Fgf1	Fator de crescimento fibroblástico 1	HBGF-1/HBGF1	NM_012846
Fgf16	Fator de crescimento fibroblástico 16	Fgf16	NM_021867
Fgf2	Fator de crescimento fibroblástico 2	Fgf-2/bFGF	NM_019305
Fgf6	Fator de crescimento fibroblástico 6	Fgf6	NM_131908
Fgfr3	Fator de crescimento fibroblástico receptor 3	Fgfr3	NM_053429
Figf	Fator de crescimento induzido C-fos	Vegf-d	NM_31761
Flt1	Tirosina símile FMS quinase 1	Flt1	NM_019306
Fn1	Fibronectina 1	FIBNEC/fn-1	NM_019143
Fzd5	Homólogo Frizzled 5 (Drosófila)	Fzd5	NM_173838
Hgf	Fator de crescimento de hepatócito	HPTA	NM_017017
Hif1a	Fator indutor de hipóxia 1, subunidade alfa	MOP1	NM_024359
Id1	Inibidor de DNA ligante 1	ID125A/ldb1	NM_012797

Símbolo	Descrição	Nome do Gene	Referência Sequencial
Id3	Inibidor de DNA ligante 3	Id3	NM_013058
Ifna1	Interferon-alfa 1	IFN-alfa1	NM_001014786
Ifnb1	Interferon beta 1, fibroblasto	Ifnb	NM_019127
Ifng	Interferon gama	IFNG2	NM_138880
Igf1	Fator de Crescimento Insulin-Like I	Igf1	NM_178866
Il1b	Interleucina 1 beta	Il1b	NM_31512
Il6	Interleucina 6	IL6/Ifnb2	NM_012589
Itga5	Integrina alfa 5 (mapeada)	Itga5	XM_23577
Itgav_predicted	Integrina alfa V (prevista)	Cd51/Itgav	XM_230950
Itgb3	Integrina beta 3	Itgb3	NM_153720
Jag1	Jagged 1	Jag1	NM_019147
Kdr	Quinase inserida no receptor de proteína	Vegfr-2	NM_013062
Lama5	Laminina, alfa 5	Lama5	XM_215963
Lect1	Quimiotaxina 1 derivada de células leucocitárias	Chm-1	NM_30854
Lep	Leptina	OB/obese	NM_01376
Mapk14	Mitógeno ativado proteína quinase 14	CSBP/CSPB1	NM_31020
Mdk	MidKina	Mdk	NM_30859
Mmp19_predicted	Metaloproteinase 19 de matriz (previsto)	Mmp19	XM_222317
Mmp2	Metalopeptidase matriz 2	Mmp2	NM_31054
Mmp3	Metalopeptidase matriz 3	Mmp3	NM_133523
Mmp9	Metalopeptidase matriz 9	Mmp9	NM_31055
Npr1	Receptor de peptídeo natriurético 1	Anpra/Gca	NM_012613
Nrp1	Neuropilina 1	Nrp	NM_145098
Nrp2	Neuropilina 2	Nrp2	NM_30869

Símbolo	Descrição	Nome do Gene	Referência Sequencial
Pdgfa	Fator de crescimento derivado plaquetário, alfa	PDGFACP	NM_012801
Pdgfb	Fator de crescimento derivado plaquetário, polipeptídeo B	SIS/c-sis	XM_343293
Pecam	Molécula de adesão da célula endotelial plaquetária	CD31	NM_31591
Pgf	Fator de crescimento placentário	Plgf	NM_053595
Plau	Ativador de Plasminogênio Urinário	UPAM	NM_013085
Plg	Plasminogênio	Ab1-346	XM_574314
Ptgs1	Endoperóxido de prostaglandina sintetase 1	Cox-3/Cox1	NM_017043
Serpinb5	Inibidor de peptidase serina ou cisteína, clade B, membro 5	Maspin/Pi5	NM_057108
Serpinf1	Inibidor de peptidase serina ou cisteína, clade F, membro 1	Dmrs91/Pedf	NM_177927
Sphk1	Esfingosina quinase 1	Sphk1	NM_133386
Tbx4_predicted	T-box 4 (previsto)	Tbx4	XM_220811
Tek	Receptor tirosina quinase endotélio específico	Tie-2/Tie2	XM_342863
Tgfa	Fatores Transformadores de Crescimento, alfa	RATTGFAA/TGFA A	NM_012671
Tgfb1	Fatores Transformadores de Crescimento, beta 1	Tgfb1	NM_021578
Tgfb2	Fatores Transformadores de Crescimento, beta 2	Tgfb2	NM_31131

Símbolo	Descrição	Nome do Gene	Referência Sequencial
Tgfb3	Fatores Transformadores de Crescimento, beta 3	MGC105479	NM_013174
Tgfr1	Fatores Transformadores de Crescimento, receptor beta 1	MGC93659	NM_012775
Thbs4	Trombospondina 4	Thbs4	XM_342172
Timp1	Inibidor de metalopeptidase tecidual 1	TIMP-1/Timp	NM_053819
Timp2	Inibidor de metaloproteinase tecidual 2	MGC105282	NM_021989
Timp3	Inibidor de metaloproteinase tecidual 3 (Distrofia pseudoinflamatória de Sorsby)	Timp3	NM_012886
Tnf	Fator de necrose tumoral (TNF superfamília, membro 2)	RATTNF/TNF-alfa	NM_012675
Vegfa	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular A	Vegf	NM_31836
Vegfb	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular B	Vegfb	NM_053549
Vegfc	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular C	Vegfc	NM_053653
Rplp1	Proteína ribossômica, larga P1	MGC72935	NM_00107604
Hprt	Hipoxantina Fosforribosiltransferase	Hgpptase/Hprt1	NM_012583
Rpl13a	Proteína ribossômica L13A	Rpl13a	NM_173340
Ldha	Dehidrogenase lactato A	Ldh1	NM_017025
Actb	Actina beta	Actx	NM_31144
RGDC	Contaminação genômica de DNA de rato	RGDC	U26919
RTC	Controle de transcrição reversa	RTC	SA_00104
PPC	Controle Positivo de PCR	PPC	SA_0013

**Anexo F: Análise dos fatores angiogênicos expressos nas ratas do Grupo
Raloxifeno versus DMBA.**

Coluna	Símbolo	Raloxifeno			DMBA			T-TEST	Diferença positiva ou negativa
		Reação 1	Reação 2	Reação 3	Reação 1	Reação 2	Reação 3	p	Raloxifeno /DMBA
A01	Angpt2	32,11	33,32	0	0	0	0	0,2465	30292,37
A02	Akt1	23,17	23,16	25,18	22,24	19,97	19,88	0,3420	-2,72
A3	Angpt1	37,14	32,33	33,09	0	35,01	36,13	0,2901	4,58
A04	Anpep	25,45	26,32	28,36	25,25	24,76	24,71	0,9263	-1,08
A05	Bai1_predicted	27,8	27,76	29,3	26,37	26,12	26,2	0,7627	-1,28
A06	Ccl2	26,46	26,02	28,06	24,48	23,91	24,23	0,4937	-1,92
A7	Cdh5_predicted	28,18	28,44	29,4	20,39	24,91	25,26	0,1542	-10,98
A08	Col18a1	27,5	27,4	29,15	24,13	24,19	24,63	0,0654	-4,84
A09	Col4a3	26,79	26,53	28,00	24	23,56	23,92	0,093	-3,93
A10	Ctgf	26,7	26,45	28,59	24,54	24,16	24,47	0,4020	-2,23
A11	Cxcl1	27,19	24,41	24,51	23,59	22,63	23,62	0,4120	-3,16
A12	Cxcl2	28,23	31,23	29,08	20,85	24,41	24,86	0,0604	-45,18
B01	Cxcl9	26,81	27,02	28,15	25,11	24,33	25,14	0,4879	-1,71
B02	Ecgf1	28,49	28,05	29,43	25,83	24,57	25,15	0,2085	-3,43
B3	Edg1	27,41	27,24	28,38	24,45	23,83	24,08	0,1628	-3,63
B04	Efna1	30,61	33,65	0	32,71	0	33,22	0,2668	15500,21
B05	Efna2	26,4	26,7	27,06	24,44	23,93	24,37	0,6381	-1,48
B06	Efna5	27,6	27,08	28,17	24,79	24,28	24,55	0,333	-2,60
B7	Egf	28,7	27,28	29,32	24,37	24,44	25,05	0,2309	-3,75
B08	Eng	28,59	28,87	29,72	25,32	24,8	25,6	0,0936	-4,36
B09	Epas1	28,04	28,3	29,1	26,82	24,39	25,01	0,3388	-2,44
B10	Ereg	27,32	27,35	28,16	24,59	24,69	25,38	0,3867	-2,04
B11	F2	27,16	27,25	28,26	24,27	24,31	25,11	0,2896	-2,46
B12	Fgf1	32,21	33,49	0	31,3	31,94	32,36	0,3498	3243,49
C01	Fgf16	27,3	27,7	28,42	25,45	24,92	25,21	0,5634	-1,63
C02	Fgf2	27,44	28,7	28,57	27,17	26,95	27,54	0,3605	1,85
C3	Fgf6	27,73	28,42	28,81	24,65	23,83	24,4	0,0471	-5,3
C04	Fgfr3	37	37,7	0	35,7	32,98	31,12	0,3891	2696,12
C05	Figf	32,6	33,3	0	33,64	30,95	31,47	0,3440	3666,02
C06	Flt1	29,6	30,24	33,06	32,88	30,65	28,38	0,4878	2,58
C7	Fn1	32,05	33,13	0	30,96	26,01	25,99	0,5278	197,18
C08	Fzd5	25,39	26,04	26,77	21,37	24,61	25,17	0,7002	-1,57
C09	Hgf	33,41	32,9	0	39,31	33,51	34,04	0,2847	1434,27
C10	Hif1a	0	32,91	0	38,39	37	36,87	0,0643	55526251,41
C11	Id1	26,27	26,15	27,4	23,92	24,24	24,66	0,6047	-1,55
C12	Id3	23,85	23,94	25,87	25,17	23,4	24,3	0,3238	2,54
D01	Ifna1	25,73	25,34	26,89	23,49	22,46	23,08	0,3404	-2,43
D02	Ifnb1	27,01	26,92	27,74	25,15	24,18	24,8	0,4789	-1,76
D3	Ifng	25,35	29,87	30,67	30,93	26,3	25,1	0,8416	1,34
D04	Igf1	26,96	26,8	28,7	24,72	23,96	24,3	0,3180	-2,38
D05	Il1b	27,43	27,14	27,94	24,57	23,95	24,46	0,2473	-2,79
D06	Il6	27,94	27,31	28,49	25,77	24,95	25,72	0,5742	-1,67

continua

Anexo F: Análise dos fatores angiogênicos expressos nas ratas do Grupo Raloxifeno versus DMBA.

Coluna	Símbolo	Raloxifeno			DMBA			T-TEST	conclusão
		Reação 1	Reação 2	Reação 3	Reação 1	Reação 2	Reação 3	p	Diferença positiva ou negativa Raloxifeno /DMBA
D7	Itga5	28,3	27,56	28,68	25,05	24,75	25,42	0,3184	-2,66
D08	Itgav_predicted	27,19	25,62	27,74	13,82	24,31	24,63	0,3487	-18,81
D09	Itgb3	0	36,77	0	0	37,98	36,37	0,0822	34259481,94
D10	Jag1	27,7	27,46	28,49	24,39	23,79	24,34	0,1401	-4,04
D11	Kdr	38,05	0	0	29,01	25,68	26,51	0,2460	140155,29
D12	Lama5	26,14	26,55	28,05	24,46	23,96	24,84	0,1710	-2,09
E01	Lect1	27,45	27,53	28,67	25,7	24,24	24,44	0,1974	-3,04
E02	Lep	32,94	35,84	0	36,98	34,61	34,71	0,2913	14495,66
E3	Mapk14	33,41	34,15	0	0	39,3	33,98	0,0853	3,34
E04	Mdk	26,51	25,87	27,72	24,35	23,88	24,25	0,5425	-1,79
E05	Mmp19_predicted	24,6	23,83	25,52	24,33	23,34	24,04	0,4997	1,93
E06	Mmp2	31,49	31,97	33,61	0	38,96	31,24	0,1367	8,50
E7	Mmp3	25,65	24,74	26,5	20,85	23,1	23,17	0,3857	-2,95
E08	Mmp9	27,96	27,31	28,89	22,76	24,35	24,63	0,1642	-5,44
E09	Npr1	27,26	27,54	28,43	24,43	24,35	24,83	0,1989	-2,85
E10	Nrp1	33,06	34,8	0	0	37,68	0	0,2835	17278,22
E11	Nrp2	27,86	27,59	28,53	24,24	24,06	24,14	0,1236	-4,44
E12	Pdgfa	27,43	27,45	30,04	25,39	25,02	25,33	0,1527	-2,52
F01	Pdgfb	28,17	28,15	29,25	25,68	25,38	25,38	0,2720	-2,54
F02	Pecam	27,27	27,48	28,61	25,08	24,38	24,69	0,0633	-3,48
F3	Pgf	33,24	39,39	36,61	35,25	34,19	34,43	0,302	3,54
F04	Plau	31	38,22	34,27	36,35	0	undeter	0,0019	9,67
F05	Plg	27,67	26,75	28,34	24,51	24,13	24,36	0,2991	-2,94
F06	Ptgs1	27,7	27,49	28,59	24,86	24,48	24,99	0,2565	-2,74
F7	Serpib5	26,08	26,09	27,14	23,26	24,01	24,38	0,4925	-1,81
F08	Serpinf1	29,47	33,25	35,14	33,57	34,23	32,95	0,1013	6,53
F09	Sphk1	27,19	26,28	27,39	23,92	23,89	24,14	0,3773	-2,42
F10	Tbx4_predicted	28,29	27,76	29,24	27,98	24,73	25,3	0,6122	-1,77
F11	Tek	31,61	36,84	35,51	35,02	0	0	0,0068	7,09
F12	Tgfa	28,5	28,33	30,12	25,81	25,28	25,65	0,2175	-3,26
G01	Tgfb1	26,7	26,4	27,77	26,06	25,53	25,88	0,4877	1,71
G02	Tgfb2	32,39	32,92	36,37	32,47	31,27	32,34	0,8128	1,22
G3	Tgfb3	28,28	28,01	29,47	27,79	24,1	24,46	0,4008	-2,71
G04	Tgibr1	26,37	26,51	27,72	25,6	24,49	25,05	0,9110	-1,09
G05	Thbs4	27,15	26,82	28,3	24,53	24,18	24,45	0,3325	-2,38
G06	Timp1	28,38	29,06	31,47	31	29,34	29,91	0,1538	4,42
G7	Timp2	31,54	31,14	33	30,94	27,41	27,5	0,3763	-2,99
G08	Timp3	33,76	37,4	0	0	36,1	38,48	0,2981	1434,27
G09	Tnf	32,74	32,44	34,62	38,17	33,21	33,75	0,1369	5,34
G10	Vegfa	31,01	38,25	0	0	38,9	37	0,2545	26493,18
G11	Vegfb	27,16	27,12	28,42	25,45	25,88	26,71	0,7894	-1,20
G12	Vegfc	33,09	32,65	0	37,29	0	39,17	0,0448	7,94
H01	Rplp1	20,47	21,01	23,49	22,18	21,61	21,91	0,1834	3,84
H02	Hprt	26,2	26,43	28,15	25,16	24,18	24,43	0,5906	-1,56
H3	Rpl13a	21,25	21,64	24,08	21,47	20,74	21,25	0,3813	1,48
H04	Ldha	22,93	23,88	25,04	21,35	20,73	21,26	0,2631	-2,20
H05	Actb	23,7	25,61	26,43	23,6	23,01	23,36	0,9821	-1,01

ANEXO G: Análise dos fatores angiogênicos expressos nas ratas do Grupo Tamoxifeno versus DMBA.

Coluna	Símbolo	Tamoxifeno			DMBA			T-TEST	Diferença positiva ou negativa
		Reação 1	Reação 2	Reação 3	Reação 1	Reação 2	Reação 3	p	Tamoxifeno /DMBA
A01	Angpt2	0	0	0	0	0	0	0,0006	10,31
A02	Akt1	27,72	21,17	21,22	22,24	19,97	19,88	0,7612	1,62
A3	Angpt1	33,99	37,00	39,08	0	35,01	36,13	0,030	13,3
A04	Anpep	27,64	29,14	27,93	25,25	24,76	24,71	0,9634	1,3
A05	Bai1_predicted	29,42	31,06	28,95	26,37	26,12	26,2	0,8283	-1,16
A06	Ccl2	27,94	29,46	27,05	24,48	23,91	24,23	0,5826	-1,49
A7	Cdh5_predicted	29,17	29,04	28,68	20,39	24,91	25,26	0,3004	-4,22
A08	Col18a1	28,53	30,19	27,88	24,13	24,19	24,63	0,2967	-2,27
A09	Col4a3	28,14	28,83	27,14	24	23,56	23,92	0,3134	-1,79
A10	Ctgf	28,27	29,84	27,4	24,54	24,16	24,47	0,4886	-1,68
A11	Cxcl1	28,21	22,49	27,46	23,59	22,63	23,62	0,7168	1,51
A12	Cxcl2	28,05	29,04	27,66	20,85	24,41	24,86	0,3896	-2,85
B01	Cxcl9	27,38	28,84	27,12	25,11	24,33	25,14	0,6148	1,36
B02	Ecgf1	29,72	29,83	28,11	25,83	24,57	25,15	0,4268	-1,59
B3	Edg1	27,96	29,32	27,5	24,45	23,83	24,08	0,3990	-1,71
B04	Efna1	0	0	0	32,71	0	33,22	0,0966	4,3
B05	Efna2	27,7	28,31	26,19	24,44	23,93	24,37	0,6535	1,34
B06	Efna5	27,69	29,33	27,49	24,79	24,28	24,55	0,7754	-1,20
B7	Egf	29,2	30,36	28,41	24,37	24,44	25,05	0,1998	-2,53
B08	Eng	29,71	31,05	29,17	25,32	24,8	25,6	0,1791	-2,58
B09	Epas1	28,19	29,94	28,06	26,82	24,39	25,01	0,9690	1,3
B10	Ereg	27,87	29,34	27,41	24,59	24,69	25,38	0,9615	1,3
B11	F2	28,39	29,37	28,12	24,27	24,31	25,11	0,3915	-1,62
B12	Fgf1	0	0	38,28	31,3	31,94	32,36	0,6739	1,18
C01	Fgf16	28,65	29,57	28,09	25,45	24,92	25,21	0,7781	-1,16
C02	Fgf2	28,75	29,89	29,01	27,17	26,95	27,54	0,1023	2,58
C3	Fgf6	27,92	29,04	27,45	24,65	23,83	24,4	0,5560	-1,39
C04	Fgfr3	0	0	39,14	35,7	32,98	31,12	0,2726	2,64
C05	Figf	0	36,84	37,74	33,64	30,95	31,47	0,6193	1,31
C06	Flt1	32,45	31,42	30,38	32,88	30,65	28,38	0,1392	6,01
C7	Fn1	0	31,51	34,78	30,96	26,01	25,99	0,1884	-6,70
C08	Fzd5	27,01	27,38	25,98	21,37	24,61	25,17	0,8514	1,23
C09	Hgf	0	0	36,53	39,31	33,51	34,04	0,0027	5,86
C10	Hif1a	0	0	38,7	38,39	37	36,87	0,0006	10,31
C11	Id1	28,56	30,01	27,54	23,92	24,24	24,66	0,3587	-2,09
C12	Id3	26,97	27,41	26,3	25,17	23,4	24,3	0,3501	1,70
D01	Ifna1	27,01	28,13	26,37	23,49	22,46	23,08	0,3697	-1,73
D02	Ifnb1	28,09	29,39	28,3	25,15	24,18	24,8	0,5898	-1,34
D3	Ifng	28,78	26,27	27,06	30,93	26,3	25,1	0,1320	10,20
D04	Igf1	28,02	29,92	27,75	24,72	23,96	24,3	0,4169	-1,83
D05	Il1b	28,14	29,42	27,48	24,57	23,95	24,46	0,4780	-1,57
D06	Il6	28,51	29,16	27,83	25,77	24,95	25,72	0,6185	1,27
D7	Itga5	28,38	29,51	27,78	25,05	24,75	25,42	0,8900	-1,08
D08	Itgav_predicted	27,71	27,85	25,64	13,82	24,31	24,63	0,5053	-6,87
D09	Itgb3	0	0	39,73	0	37,98	36,37	0,0006	10,31

continua

ANEXO G: Análise dos fatores angiogênicos expressos nas ratas do Grupo Tamoxifeno versus DMBA.

Coluna	Símbolo	Tamoxifeno			DMBA			T-TEST	conclusão Diferença positiva ou negativa
		Reação 1	Reação 2	Reação 3	Reação 1	Reação 2	Reação 3	p	Tamoxifeno /DMBA
D10	Jag1	28,3	29,64	27,46	24,39	23,79	24,34	0,3599	-1,90
D11	Kdr	0	34,59	34,48	29,01	25,68	26,51	0,0082	-19,12
D12	Lama5	27,52	29,09	27,41	24,46	23,96	24,84	0,8067	-1,16
E01	Lect1	28,41	29,01	27,83	25,7	24,24	24,44	0,4849	-1,38
E02	Lep	0	0	37	36,98	34,61	34,71	0,0005	8,82
E3	Mapk14	38,2	0	0	0	39,3	33,98	0,039	8,15
E04	Mdk	27,39	28,85	27,16	24,35	23,88	24,25	0,7523	-1,21
E05	Mmp19_predicted	25,3	26,26	25,02	24,33	23,34	24,04	0,0587	3,56
E06	Mmp2	0	0	35,28	0	38,96	31,24	0,1874	4,33
E7	Mmp3	26,73	27,86	26,37	20,85	23,1	23,17	0,3453	-2,37
E08	Mmp9	27,66	28,76	27,52	22,76	24,35	24,63	0,5179	-1,62
E09	Npr1	27,97	30,13	28,05	24,43	24,35	24,83	0,4650	-1,76
E10	Nrp1	0	0	0	0	37,68	0	0,0006	10,31
E11	Nrp2	28,83	29,83	28,66	24,24	24,06	24,14	0,727	-3,02
E12	Pdgfa	29,2	30,93	28,38	25,39	25,02	25,33	0,4325	-1,85
F01	Pdgfb	28,91	29,6	27,76	25,68	25,38	25,38	0,9137	1,06
F02	Pecam	28,72	29,84	28,51	25,08	24,38	24,69	0,2455	-1,92
F3	Pgf	0	38,72	37,48	35,25	34,19	34,43	0,0006	7,50
F04	Plau	0	0	0	36,35	0	0	0,0006	10,31
F05	Plg	27,19	28,35	26,89	24,51	24,13	24,36	0,7734	1,17
F06	Ptgs1	28,45	29,63	27,72	24,86	24,48	24,99	0,6096	-1,37
F7	Serpib5	27,29	28,13	26,82	23,26	24,01	24,38	0,8474	-1,12
F08	Serpinf1	0	36,58	0	33,57	34,23	32,95	0,0296	3,86
F09	Sphk1	28,2	28,88	27,51	23,92	23,89	24,14	0,2776	-1,80
F10	Tbx4_predicted	29,11	30,3	27,71	27,98	24,73	25,3	0,874	1,26
F11	Tek	0	0	38,52	35,02	0	0	0,0006	10,31
F12	Tgfa	29,94	30,81	28,96	25,81	25,28	25,65	0,2877	-1,94
G01	Tgfb1	27,94	25,71	27,54	26,06	25,53	25,88	0,0066	4,37
G02	Tgfb2	34,59	32,64	31,76	32,47	31,27	32,34	0,0447	5,27
G3	Tgfb3	29,89	29,78	28,86	27,79	24,1	24,46	0,5752	-1,62
G04	Tgfr1	28,1	28,99	27,4	25,6	24,49	25,05	0,7492	1,19
G05	Thbs4	27,58	29,38	27,72	24,53	24,18	24,45	0,6126	-1,39
G06	Timp1	32	34,79	37,85	31	29,34	29,91	0,7040	-1,39
G7	Timp2	33,11	33,34	31,96	30,94	27,41	27,5	0,5314	-1,77
G08	Timp3	0	0	0	0	36,1	38,48	0,0006	10,31
G09	Tnf	0	32,85	30,41	38,17	33,21	33,75	0,300	24,25
G10	Vegfa	0	0	0	0	38,9	37	0,0006	10,31
G11	Vegfb	28,41	29,71	28,12	25,45	25,88	26,71	0,5137	1,55
G12	Vegfc	0	0	0	37,29	0	39,17	0,0006	10,31
H01	Rplp1	24,22	26,23	25,33	22,18	21,61	21,91	0,9940	1,00
H02	Hprt	27,13	27,72	26,31	25,16	24,18	24,43	0,2474	1,87
H3	Rpl13a	24,8	25,98	24,77	21,47	20,74	21,25	0,3838	-1,58
H04	Ldha	36,25	26,28	24,62	21,35	20,73	21,26	0,2528	-17,79
H05	Actb	27,3	24,11	26,94	23,6	23,01	23,36	0,3838	1,58

Anexo H: Avaliação morfológica e histopatológica do Grupo 2 – Tamoxifeno

Rata	Latência (dias)	Nº tumores	Diâmetro (cm)	Tipo histológico	Grau nuclear	% RE(+)	% Ki67
1	30	1	5,4 x 5	carcinoma ductal	3	70%	75%
2	70	1	3 x 3	carcinoma ductal	2	40%	75%
3	50	3	4 x 4 2,2 x 1,0 0,5 x 0,5	carcinoma ductal	3	40%	75%
4	50	1	2 x 1	carcinoma ductal	2	40%	75%
5	40	1	2 x 1,5	carcinoma ductal	2	10%	50%
6	42	1	1,5 x 1,5	carcinoma ductal	2	10%	50%
7	40	1	1,5 x 1	carcinoma ductal	2	10%	50%
8	-	-	-	-	-	10%	50%
9	-	-	-	-	-	10%	50%
10	-	-	-	-	-	10%	50%
11	-	-	-	-	-	10%	30%
12	-	-	-	-	-	30%	30%
13	-	-	-	-	-	10%	30%
14	-	-	-	-	-	10%	30%
15	-	-	-	-	-	10%	30%
16	-	-	-	-	-	30%	30%
17	-	-	-	-	-	30%	30%
18	-	-	-	-	-	30%	30%
19	-	-	-	-	-	10%	30%
20	-	-	-	-	-	30%	30%

Anexo I: Avaliação morfológica e histopatológica do Grupo 3 – Raloxifeno

Rata	Latência (dias)	Nº tumores	Diâmetro (cm)	Tipo histológico	Grau nuclear	% RH(+)	% Ki67
1						10%	30%
2						10%	30%
3						10%	50%
4	60	1	1,5 x 1	carcinoma ductal	2	30%	50%
5	-	-	-	-	-	30%	30%
6	-	-	-	-	-	30%	30%
7	-	-	-	-	-	30%	30%
8	-	-	-	-	-	30%	30%
9	-	-	-	-	-	10%	50%
10	-	-	-	-	-	10%	30%
11	-	-	-	-	-	10%	30%
12	-	-	-	-	-	30%	30%
13	-	-	-	-	-	30%	50%
14	-	-	-	-	-	30%	30%
15	-	-	-	-	-	30%	30%
16	-	-	-	-	-	30%	30%
17	46	1	2,5 x 2,5	carcinoma ductal	2	30%	50%
18	60	2	2 x 1,5 1,5 x 1,3	carcinoma ductal	2 2	30% 10%	50%
19	-	-	-	-	-	10%	30%
20	-	-	-	-	-	30%	30%

Anexo J: Média dos pesos das ratas nos Grupos DMBA, Tamoxifeno e Raloxifeno.

	Média	DP	IC
Grupo 1 – DMBA	141g	12g	129g à 153g
Grupo 2 - Tamoxifeno	148g	13g	135g à 161g
Grupo 3 - Raloxifeno	148g	12g	136g à 160g

p<0,05

9 REFERÊNCIAS

9 Referências

Afshari CA, Nuwaysir EF, Barrett JC. Application of complementary DNA microarray technology to carcinogen identification, toxicology and drug safety evaluation. *Cancer Res.* 1999; 59(19):4779-60.

Ahlgren J, Risberg B, Villman K, Bergh J. Angiogenesis in invasive breast carcinoma--a prospective study of tumour heterogeneity. *Eur J Cancer.* 2002; 38(1):64-9.

Althuis MD, Brogan DR, Coates RJ, Daling JR, Gammon MD, Malone KE, Schoenberg JB, Brinton LA. Hormonal content and potency of oral contraceptives and breast cancer risk among young women. *Br J Cancer.* 2003; 88(1):50-7.

American Joint Committee on Cancer. *The AJCC Cancer Staging Manual.* 6^a ed. Chicago, Ill; 2002.

Ariazi EA, Clark GM, Mertz JE. Estrogen-related receptor alpha and estrogen-related receptor gamma associate with unfavorable and favorable biomarkers, respectively, in human breast cancer. *Cancer Res.* 2002; 62(22):6510-8.

Arteaga CL, Koli KM, Dugger TC, Clarke R. Reversal of tamoxifen resistance of human breast carcinomas in vivo by neutralizing antibodies to transforming growth factor-beta. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91(1):46-53.

Assis S, Wang M, Goel S, Foxworth A, Helferich W, HilaKivi-Clarke L. Excessive weight gain during pregnancy increases carcinogen-induced mammary tumorigenesis in Sprague-Dawley and lean and obese Zucker rats. *J Nutr.* 2006; 136(4):998-1004.

Aupperlee M, Kariagina A, Osuch J, Haslam SZ. Progestins and breast cancer. *Breast Dis.* 2005-2006;24:37-57.

Aupperlee MD, Haslam SZ. Differential hormonal regulation and function of PR isoforms in normal adult mouse mammary gland. *Endocrinology.* 2007; 148: doi:10.1210/en.2006-1721.

Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, Kroll J, Plaisance S, De Mol M, Bono F, Kliche S, Fellbrich G, Ballmer-Hofer K, Maglione D, Mayr-Beyrle U, Dewerchin M, Dombrowski S, Stanimirovic D, Van Hummelen P, Dehio C, Hicklin DJ, Persico G, Herbert JM, Communi D, Shibuya M, Collen D, Conway EM, Carmeliet P. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med.* 2003; 9(7):936-43.

Balfour JA, Goa KL. Raloxifene. *Drugs Aging.* 1998;12(4):335-41.

Bando H. Vascular endothelial growth factor and bevacitumab in breast cancer. *Breast Cancer.* 2007;14(2):163-73.

Bao T, Prowell T, Stearns V. Chemoprevention of breast cancer: tamoxifen, raloxifene, and beyond. *Am J Ther.* 2006;13(4):337-48.

Barlow J, Yandell D, Weaver D, Casey T, Plaut K. Higher stromal expression of transforming growth factor-beta type II receptors is associated with poorer prognosis breast tumors. *Breast Cancer Res Treat.* 2003; 79(2):149-59.

Barr MP, Byrne AM, Duffy AM, Condrón CM, Devocelle M, Harriott P, Bouchier-Hayes DJ, Harmeý JH. A peptide corresponding to the neuropilin-1-binding site on VEGF(165) induces apoptosis of neuropilin-1-expressing breast tumour cells. *Br J Cancer.* 2005;92(2):328-33.

Barrett-Connor E, Mosca L, Collins P, Geiger MJ, Grady D, Kornitzer M, McNabb MA, Wenger NK; Raloxifene use for the heart (RUTH) Trial Investigators. Effects of raloxifene on cardiovascular events and breast cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med*. 2006; 355(2):190-2.

Barros ACSD, Muranaka ENK, Mori LJ, Pelizon CH, Iriya K, Pinotti JA. Fundamentos Teóricos do Modelo Experimental de Carcinogênese Mamária em Ratas. *Rev Ginecol Obstet*. 12:19-22, 2001a.

Barros ACSD, Muranaka ENK, Mori LJ, Pelizon CH, Iriya K, Pinotti JA. Aspectos técnicos da indução da carcinogênese mamária experimental em ratas. *Rev Ginecol Obstetr*. 2001b; 12:13-8.

Barros ACSD, Muranaka ENK, Mori LJ, Pelizon CH, Iriya K, Giocondo G, Pinotti JA. Induction of experimental mammary carcinogenesis in rats with 7-12-dimethylbenz(a)anthracene. *Rev Hosp Clin*. 2003; 59(5):257-61.

Baum O, Hlushchuk R, Forster A, Greiner R, Clezardin P, Zhao Y, Djonov V, Gruber G. Increased invasive potential and up-regulation of MMP-2 in MDA-MB-231 breast cancer cells expressing the beta3 integrin subunit. *Int J Oncol*. 2007;30(2):325-32.

Beatson GT. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma:suggestions for a new method of treatment with illustrative cases. *Lancet*. 1896; 2:104-7.

Beckers J, Herrmann F, Rieger S, Drobyshev AL, Horsch M, Hrabe de Angelis M, Seliger B. Identification and validation of novel ERBB2 (HER2, NEU) targets including genes involved in angiogenesis. *Int J Cancer*. 2005; 114(4):590-7.

Benson JR, Wakefield LM, Baum M, Colletta AA. Synthesis and secretion of transforming growth factor beta isoforms by primary cultures of human breast tumour fibroblasts in vitro and their modulation by tamoxifen. *Br J Cancer*. 1996;74(3):352-8.

Bentrem D, Dardes R, Liu H, Macgregor-Schafer J, Zapf J, Jordan V. Molecular mechanism of action at estrogen receptor alpha of a new clinically relevant antiestrogen (GW7604) related to tamoxifen. *Endocrinology*. 2001; 142(2):838-46.

Bernstein L. Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2002; 7(1):3-15

Berry M, Metzger D, Chambon P. Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependant agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J*. 1990; 9(9):2811-8.

Bertucci F, Loriol B, Nasser V, Granjeaud S, Tagett R, Braud AC, Patrice V, Houlgatte R, Daniel B, Nguyen C. Gene expression profiling of breast carcinomas using nylon DNA arrays. *C R Seances Soc Biol Fil*. 2003a; 326(10-11):131-9.

Bertucci F, Viens P, Tagett R, Nguyen C, Houlgatte R, Birnbaum D. DNA arrays in clinical oncology: promises and challenges. *Lab Invest*. 2003b; 83(3):305-16.

Black LJ, Jones CD, Falcone JF. Antagonism of estrogen action with a new benzothiophene derived antiestrogen. *Life Sci*. 1983;32(9):131-6.

Black LJ, Sato M, Rowley ER, Magee DE, Bekele A, Williams DC, Cullinan GJ, Bendele R, Kauffman RF, Bensch WR, Frolik CA, Termine JD, Bryant HU. Raloxifene (LY139481 HCl) prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats. *J Clin Invest*. 1994;93(1):63-9.

Blakely CM, Stoddard AJ, Belka GK, Dugan KD, Notarfrancesco KL, Moody SE, D'Cruz CM, Chodosh LA. Hormone-induced protection against mammary tumorigenesis is conserved in multiple rat strains and identifies a core gene expression signature induced by pregnancy. *Cancer Res.* 2006; 66(12):6421-31.

Bland KI, Copeland EM. *The breast: comprehensive management of benign and malignant diseases*. 3^a ed. St Louis: Saunders; 2004.

Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Integrin beta3 Leu33Pro homozygosity and risk of cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2003; 95(15):1150-7.

Boudreau N, Myers C. Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. *Breast Cancer Res.* 2003;5(3):140-6.

Brandenberger AW, Tee MK, Lee JY, Chao V, JRB. Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER- α) and beta (ER- β) mRNA in the midgestational human fetus. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82(10):3509-12.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativa de incidência de mortalidade por câncer de mama no Brasil (2006). Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2006>>.

Braun S, Harbeck N. Molecular markers of metastasis in breast cancer: current understanding and prospects for novel diagnosis and prevention. *Expert Rev Mol Med.* 2001; 2001:1-14.

Brennan DJ, Jirstrom K, Kronblad A, Millikan RC, Landberg G, Duffy MJ, Ryden L, Gallagher WM, O'Brien SL. CA IX is an independent prognostic marker in premenopausal breast cancer patients with one to three positive lymph nodes and a putative marker of radiation resistance. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(21):6421-31.

Briand P. Hormone-dependent mammary tumors in mice and rats as a model for human breast cancer (review). *Anticancer Res.* 1983; 3(4):273-81.

Burwell SR, Case LD, Kaelin C, Avis NE. Sexual problems in younger women after breast cancer surgery. *J Clin Oncol.* 2006;24(18):2815-21.

Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engstrom O, Ohman L, Greene GL, Gustafsson JA, Carlquist M. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature.* 1997; 389(6652):753-8.

Buck MB, Pfizenmaier K, Knabbe C. Antiestrogens induce growth inhibition by sequential activation of p38 mitogen-activated protein Kinase and transforming growth factor-beta pathways in human breast cancer cells. *Mol Endocrinol.* 2004a;18(7):1643-57.

Buck MB, Fritz P, Dippon J, Zugmaier G, Knabbe C. Prognostic significance of transforming growth factor beta receptor II in estrogen receptor-negative breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2004b; 10(2):491-8.

Buck M, von der Fecht J, Knabbe C. Antiestrogenic regulation of transforming growth factor α receptors I and II in human breast cancer cells. *Ann NY Acad Sci.* 2002; 963:140-143.

Bundred NJ. Prognostic and predictive factors in breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2001; 27(3):137-42.

Buzdar AU, Hortobagyi G. Update on endocrine therapy for breast cancer. *Clin Cancer Res.* 1998; 4(3):527-34.

Cai J, Parr C, Watkins G, Jiang WG, Boulton M. Decreased pigment epithelium-derived factor expression in human breast cancer progression. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(11 Pt 1):3510-7.

Callejo J, Cano A, Medina M, Villaronga M, Gonzalez-Bosquet E, Sabria J, Laila JM. Hormonal environment in the induction of breast cancer in castrated rats using dimethylbenzanthracene: influence of the presence or absence of ovarian activity and of treatment with estradiol, tibolone, and raloxifene. *Menopause*. 2005;12(5):601-8.

Cardiff RD, Wellings SR. The comparative pathology of human and mouse mammary glands. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 1999;4(1):105-22.

Cardiff RD, Bern HA, Faulkin LJ, Daniel CW, Smith GH, Young LJ, Medina D, Gardner MB, Wellings SR, Shyamala G, Guzman RC, Rajkumar L, Yang J, Thordarson G, Nandi S, MacLeod CL, Oshima RG, Man AK, Sawai ET, Gregg JP, Cheung AT, Lau DH. Contributions of mouse biology to breast cancer research. *Comp Med*. 2002;52(1):12-31.

Carter WB, Ward MD. HER2 regulatory control of angiopoietin-2 in breast cancer. *Surgery*. 2000; 128(2):153-8.

Carulli JP, Artinger M, Swain PM, Root CD, Chee L, Tulig C, Guerin J, Osborne M, Stein G, Lian J, Lomedico PT. High throughput analysis of differential gene expression. *J Cell Biochem Suppl*. 1998;30-31:286-96.

Cavaillès V, Dauvois S, L'horset F, Lopez G, Hoare S, Kushner PJ, Parker MG. Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. *EMBO J*. 1995; 14(15):3741-51.

Cha RS, Guerra L, Thilly WG, Zarbl H. Ha-ras-1 oncogene mutations in mammary epithelial cells do not contribute to initiation of spontaneous mammary tumorigenesis in rats. *Carcinogenesis*. 1996; 17(11):2519-24.

Charpentier AH, Bednarek AK, Daniel RL, Hawkins KA, Laflin KJ, Gaddis S, Macleod MC, Aldaz CM. Effects of estrogen on global gene expression: identification of novel targets of estrogen action. *Cancer Res.* 2000; 60(21):5977-83.

Charpin C, Dales JP, Garcia S, Carpentier S, Djemli A, Andrac L, Lavaut MN, Allasia C, Bonnier P. Tumor neoangiogenesis by CD31 and CD105 expression evaluation in breast carcinoma tissue microarrays. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(17):5815-9.

Chen H, Lin RJ, Schiltz RL, Chakravarti D, Nash A, Nagy L, Privalsky ML, Nakatani Y, Evans RM. Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimetric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell.* 1997; 90:569-80.

Chen H, Hewison M, Hu B, Sharma M, Sun Z, Adams JS. An Hsp27-related, dominant-negative-acting intracellular estradiol-binding protein. *J Biol Chem.* 2004; 279(29):29944-51.

Chen JJ, Wu R, Yang P, Huang J, Sher Y, Han M, Kao W, Lee P. Profiling expression patterns and isolating differentially expressed genes by cDNA microarray system with colorimetry detection. *Genomics.* 1998; 51(3):313-24.

Chen T, Jackson CR, Link A, Markey MP, Colligan BM, Douglass LE, Pemberton JO, Deddens JA, Graff JR, Carter JH. Int7G24A variant of transforming growth factor-beta receptor type I is associated with invasive breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(2):392-7.

Cheung SY, Yuen MT, Choi HL, Cheng HK, Huang Y, Chen S, Chan FL. An expression study of hormone receptors in spontaneously developed, carcinogen-induced and hormone-induced mammary tumors in female Noble rats. *Int J Oncol.* 2003a; 22(6):1383-95.

Cheung SY, Choi HL, James AE, Chen ZY, Huang Y, Chan FL. Spontaneous mammary tumors in aging Noble rats. *Int J Oncol*. 2003b; 22(2):449-57.

Cirpan T, Iscan O, Terek MC, Ozsener S, Kanit L, Pogun S, ZeKioglu O, Yucebilgin S. Proliferative effects of different hormone regimens on mammary glands in ovariectomized rats. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2006;27(3):256-61.

Clark JD, Gebhart GF, Gonder JC, Keeling ME, Kohn DF. Special Report: The 1996 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *ILAR J*. 1997; 38(1):41-48.

Claverie JM. Computacional methods for the identification of differential and coordinated gene expression. *Hum Mol Genet*. 1999; 8(10): 1821-32.

Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Helling RB. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973; 70(11):3240-4.

Colditz GA, Rosner B. Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status: data from the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol*. 2000; 152(10):950-64.

Colditz GA, Rosner BA, Chen WY, Holmes MD, HanKinson SE. Risk factors for breast cancer according to estrogen and progesterone receptor status. *J Natl Cancer Inst*. 2004; 96(3):218-28.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet*. 1996; 47(9017):1713-27.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. *Lancet*. 1997; 350(9084):1047-59.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 5302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet*. 2002; 360 (9328):187-95.

Colletta AA, Benson JR, Baum M. Alternative mechanisms of action of anti-oestrogens. *Breast Cancer Res Treat*. 1994; 31(1):5-9.

Come SE, Buzdar AU, Ingle JN, Arteaga CL, Brown M, Dowsett M, Hilsenbeck SG, Kumar R, Johnston SR, Lee AV, Paik S, Pritchard KI, Winer EP, Hart C. Proceedings of the Fifth International Conference on Recent Advances and Future Directions in Endocrine Therapy for Breast Cancer: conference summary statement. *Clin Cancer Res*. 2006; 12(3 Pt 2):997s-1000s.

Coradini D, Pellizzaro C, Speranza A, Daidone MG. Hypoxia and estrogen receptor profile influence the responsiveness of human breast cancer cells to estradiol and antiestrogens. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(1):76-82.

Costa I, Moral R, Solanas M, Escrich E. High-fat corn oil diet promotes the development of high histologic grade rat DMBA-induced mammary adenocarcinomas, while high olive oil diet does not. *Breast Cancer Res Treat*. 2004;86(3):225-35.

Costa I, Solanas M, Escrich E. Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesions induced with 7,12 dimethylbenz(alpha)anthracene in the rat: a comparative analysis with human breast tumors. *Arch Pathol Lab Med*. 2002;126(8):915-27.

Creighton CJ, Hilger AM, Murthy S, Rae JM, Chinnaiyan AM, El-Ashry D. Activation of mitogen-activated protein Kinase in estrogen receptor alpha-positive breast cancer cells in vitro induces an in vivo molecular phenotype of estrogen receptor alpha-negative human breast tumors. *Cancer Res.* 2006; 66(7):393-11.

Cummings SR, Eckert S, Krueger KA, Grady D, Powles TJ, Cauley JA, Norton L, Nickelsen T, Bjarnason NH, Morrow M, Lippman ME, Black D, Glusman JE, Costa A, Jordan VC. The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation. *JAMA.* 1999; 281(23):2189-97.

Cuzick J, Forbes JF, Sestak I, Cawthorn S, Hamed H, Holli K, Howell A; International Breast Cancer Intervention Study I Investigators. Long-term results of tamoxifen prophylaxis for breast cancer--96-month follow-up of the randomized IBIS-I trial. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(4):272-82.

Cuzick J, Powles T, Veronesi U, Forbes J, Edwards R, Ashley S, Boyle P. Overview of the main outcomes in breast-cancer prevention trials. *Lancet.* 2003;361(9354):296-300.

Dales JP, Garcia S, Andrac L, Carpentier S, Ramuz O, Lavaut MN, Allasia C, Bonnier P, Charpin C. Prognostic significance of angiogenesis evaluated by CD105 expression compared to CD31 in 905 breast carcinomas: correlation with long-term patient outcome. *Int J Oncol.* 2004;24(5):1197-204.

Dales JP, Garcia S, Bonnier P, Duffaud F, Meunier-Carpentier S, Andrac-Meyer L, Lavaut MN, Allasia C, Charpin C. Tie2/Tek expression in breast carcinoma: correlations of immunohistochemical assays and long-term follow-up in a series of 909 patients. *Int J Oncol.* 2003; 22(2):391-7.

Dao TL. The role of ovarian hormones in initiating the induction of mammary cancer in rats by polynuclear hydrocarbons. *Cancer Res.* 1962; 22:973-81.

Dao TL. Mammary cancer induction by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene: relation to age. *Science*. 1969;165(89):810-1.

Dao TL, Sunderland H. Mammary carcinogenesis by 3-methylcholanthrene. I. Hormonal aspects in tumor induction and growth. *J Natl Cancer Inst*. 1959; 23:567-85.

Debouck CE e Goodlellow P. DNA microarray in drug discovery and development. *Nature Genet*. 1999; 21: 48-50.

Demayo FJ, Zhao B, Takamoto N, Tsai SY. Mechanism of action of estrogen and progesterone. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 955: 48-59.

DeVita V, Hellman S, Rosenberg S. *Cancer Principles and Practice of Oncology*. 7^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.

Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93(12):6025-30.

Doisneau-Sixou SF, Sergio CM, Carroll JS, Hui R, Musgrove EA, Sutherland RL. Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer*. 2003; 10(2):179-86.

Duggan DJ, Bitter M, Chen Y, Meltzer P, Trent J. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nature Genet*. 1999; 21:10-4.

Druckmann R. Progestins and their effects on the breast. *Maturitas*. 2003;46 Suppl 1:S59-69.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2001; (1): CD000486.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet.* 2005; 365(9472):1687-717.

Edwards DP. The role of coactivators and corepressors in the biology and mechanism of action of steroid hormone receptors. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2000; 5(3):37-24.

Eigeliene N, Harkonen P, Erkkola R. Effects of estradiol and medroxyprogesterone acetate on morphology, proliferation and apoptosis of human breast tissue in organ cultures. *BMC Cancer.* 2006; 6:246.

El-Bayoumy K, Sinha R. Mechanisms of mammary cancer chemoprevention by organoselenium compounds. *Mutat Res.* 2004; 551(1-2):181-97.

Eliassen AH, Missmer SA, Tworoger SS, Spiegelman D, Barbieri RL, Dowsett M, Hankinson SE. Endogenous steroid hormone concentrations and risk of breast cancer among premenopausal women. *J Natl Cancer Inst.* 2006; 98(19):1406-15.

Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991;19(5):403-10.

Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson JA. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82(12):4258-65.

Fan S, Meng Q, Gao B, Grossman J, Yadegari M, Goldberg Id, Rosen EM. Alcohol stimulates estrogen receptor signaling in human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 2000; 60(20):5635-9.

Fan M, Rickert EL, Chen L, Aftab SA, Nephew KP, Weatherman RV. Characterization of molecular and structural determinants of selective estrogen receptor downregulators. *Breast Cancer Res Treat.* 2007; 13(1):37-44..

Feig AS. Effect of service screening mammography on population mortality from breast carcinoma. *Cancer* 2002; 95: 451-57.

Feig SA, D'Orsi CJ, Hendrick RE, Jackson VP, Kopans DB, Monsees B, Sickles EA, Stelling CB, Zininger M, Wilcox-Buchalla P. American College of Radiology Guidelines for Breast Cancer Screening. *AJR.* 1998;171: 29-33.

Feng W, Webb P, Nguyen P, Liu X, Li J, Karin M, Kushner PJ. Potentiation of estrogen receptor activation function 1 (AF-1) by Src/JNK through a serine 118-independent pathway. *Mol Endocrinol.* 2001; 15(1):32-45.

Fentiman IS. Future prospects for the prevention and cure of breast cancer. *Eur J Cancer.* 2000; 36(9):1085-8.

Fernandez LP, Milne RL, Barroso E, Cuadros M, Arias JI, Ruibal A, Benitez J, Ribas G. Estrogen and progesterone receptor gene polymorphisms and sporadic breast cancer risk: a Spanish case-control study. *Int J Cancer.* 2006; 119(2):467-71.

Fisher B, Costantino JP, Redmond CK, Fisher ER, Wickerham DL, Cronin WM. Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14. *Natl Cancer Inst.* 1994; 86 (7):527-37.

Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Cecchini RS, Cronin WM, Robidoux A, Bevers TB, Kavanah MT, Atkins JN, Margolese RG, Runowicz CD, James JM, Ford LG, Wolmark N. Tamoxifen for the prevention of breast cancer: current status of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97(22):1652-62.

Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM, Vogel V, Robidoux A, Dimitrov N, Atkins J, Daly M, Wieand S, Tan-Chiu E, Ford L, Wolmark N. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst.* 1998; 90(18):1371-88.

Fishman J, Schneider J, Hershcove RJ, Bradlow HL. Increased estrogen-16 alpha-hydroxylase activity in women with breast and endometrial cancer. *J Steroid Biochem.* 1984; 20(4B):177-81.

Fitzpatrick TE, Lash GE, Yanaihara A, Charnock-Jones DS, Macdonald-Goodfellow SK, Graham CH. Inhibition of breast carcinoma and trophoblast cell invasiveness by vascular endothelial growth factor. *Exp Cell Res.* 2003; 283(2):247-55.

Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, Bult CJ, Tomb J-F, Dougherty BA, Merrick JM, Mckenney K, Sutton G, Fitzhugh W, Fields C, Gocayne JD, Scott J, Shirley R, Liu L.-I, Glodek A, Kelley JM, Weidman JF, Phillips CA, Spriggs T, Hedblom E, Cotton MD, Utterback TR, Hanna MC, Nguyen DT, Saudek DM, Brandon RC, Fine LD, Fritchman JL, Fuhrmann JL, Geoghagen NSM, Gnehm CL, McDonald LA, Small KV, Fraser CM, Smith HO, Venter JC. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae*. *Science.* 1995; 269: 496-512.

Flint DJ, Beattie J, Allan GJ. Modulation of the actions of IGFs by IGFBP-5 in the mammary gland. *Horm Metab Res.* 2003; 35(11-12):809-15.

Foster JS, Henley DC, Ahamed S, Wimalasena J. Estrogens and cell-cycle regulation in breast cancer. *Trends Endocrinol Metab.* 2001; 12(7):320-7.

Fraser CM, Gocayne JD, White O, Adams MD, Clayton RA, Fleischmann RD, Bult CJ, Kerlavage AR, Sutton G, Kelley JM, Fritchman JL, Weidman JF, Small KV, Sandusky M, Fuhrmann J, Nguyen D, Utterback TR, Saudek DM, Phillips CA, Merrick JM, Tomb JF, Dougherty BA, Bott KF, Hu P-C, Lucier TS, Peterson SN, Smith HO, Hutchison III, CA, Venter JC. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science.* 1995; 270: 397-408.

Freedman LP. Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocr Rev.* 1992; 13(2):129-45

Friman EI, Mahlman M, Nilsson B, Skoog L, Lofgren L, Wilking N, Von Schoultz E. Hormone therapy and estrogen receptor expression in breast cancer. *Acta Oncol.* 2007;46(2):194-8.

Fujimoto N, Katzenellenbogen B S. Alteration in the agonist/antagonist balance of antiestrogens by activation of protein Kinase A signaling pathways in breast cancer cells: antiestrogen selectivity and promoter dependence. *Mol Endocrinol.* 1994;8(3):296-304.

Gan Y, Wientjes MG, Au JL. Expression of basic fibroblast growth factor correlates with resistance to paclitaxel in human patient tumors. *Pharm Res.* 2006;23(6):1324-31.

Ganguly NK, Bano R, Seth SD. Human genome Project: pharmacogenomics and drug development. *Indican J Exp Biol.* 2001; 39(10): 955-61.

Garland M, Hunter DJ, Colditz GA, Manson JE, Stampfer MJ, Spiegelman D, Speizer F, Willett WC. Menstrual cycle characteristics and history of ovulatory infertility in relation to breast cancer risk in a large cohort of US women. *Am J Epidemiol.* 1998; 147(7):636-43.

Gauthier C, Griffin G. Using animals in research, testing and teaching. *Rev Sci Tech.* 2005; 24(2):735-45.

Ge B; Gram H; Di Padova F, Huang B, New L, Ulevitch RJ, Luo Y, Han J. MAPKK-independent activation of p38-alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38-alpha. *Science.* 2002;295:1291-1294.

Geller BA, Vogel VG. Chemoprevention of breast cancer in postmenopausal women. *Breast Dis.* 2005-2006;24:79-92.

Gerry NP, Witowski NE, Day J, Hammer RP, Barany G, Barany F. Universal DNA microarray method for multiplex detection of low abundance point mutations. *J Mol Biol.* 1999; 292(2): 251-62.

Glaeser M, Niederacher D, Djahansouzi S, Hanstein B, Dittrich R, Beckmann MW, Fasching PA, Ackermann S. Effects of the antiestrogens tamoxifen and raloxifene on the estrogen receptor transactivation machinery. *Anticancer Res.* 2006; 26(1B):735-44.

Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ; Panel members. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol.* 2005; 16(10):1569-83.

Goodfellow PN. Impact of genomics on healthcare. Overview. *Br Med Bull.* 1999; 55(2):305-8.

Goss PE, Ingle JN, Martino S, Robert NJ, Muss HB, Piccart MJ, Castiglione M, Tu D, Shepherd LE, Pritchard KI, Livingston RB, Davidson NE, Norton L, Perez EA, Abrams JS, Therasse P, Palmer MJ, Pater JL. A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer. *N Engl J Med.* 2003; 349(19):1793-802.

- Gottardis MM, Jordan VC. Antitumor actions of keoxifene and tamoxifen in the N-nitrosomethylurea-induced rat mammary carcinoma model. *Cancer Res.* 1987;47(15):4020-4.
- Gotzsche PC, Nielsen M. Screening for breast cancer with mammography. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006;(4):CD001877.
- Gould MN. Rodent models for the study of etiology, prevention and treatment of breast cancer. *Semin Cancer Biol.* 1995;6(3):147-52.
- Greaves P, Barsoum N. Pathology of tumours in laboratory animals. Tumours of the rat. Tumours of soft tissues. *IARC Sci Publ.* 1990; (99):597-623.
- Green S, Kumar V, Krust A, Walter P, Chambon P. Structural and functional domains of the estrogen receptor. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51(pt 2):751-8.
- Grilli S. Tamoxifen (TAM): the dispute goes on. *Ann Ist Super Sanita.* 2006;42(2):170-173.
- Gruber G, Greiner RH, Hlushchuk R, Aebbersold DM, Altermatt HJ, Berclaz G, Djonov V. Hypoxia-inducible factor 1 alpha in high-risk breast cancer: an independent prognostic parameter? *Breast Cancer Res.* 2004;6(3):R191-8.
- Gullino PM, Pettigrew HM, Grantham FH. N-nitrosomethylurea as mammary gland carcinogen in rats. *J Natl Cancer Inst.* 1975;54(2):401-14.
- Gustafsson JA, Warner M. Estrogen receptor beta in the breast: role in estrogen responsiveness and development of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000; 74(5):245-8.

Hakkak R, MacLeod S, Shaaf S, Holley AW, Simpson P, Fuchs G, Jo CH, Kieber-Emmons T, Korourian S. Obesity increases the incidence of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in an ovariectomized Zucker rat model. *Int J Oncol*. 2007; 30(3):557-63

Halachmi S, Marden E, Martin G, Mackay H, Abbondanza C, Brown M. Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription. *Science*. 1994; 264(5164):1455-8.

Hall JM, Couse JF, Korach KS. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem*. 2001; 276(40):36869-72.

Harbeck N, Schmitt M, Paepke S, Allgayer H, Kates RE. Tumor-associated proteolytic factors uPA and PAI-1: critical appraisal of their clinical relevance in breast cancer and their integration into decision-support algorithms. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2007; 44(2):179-201.

Harris JH, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. *Breast diseases*. 3^a ed Philadelphia: Lippincott; 2004.

Harris RE, Namboodiri KK, Farrar WB, Solano SM, Wynder EL. Hormone replacement therapy and breast cancer risk. *JAMA*. 1996; 275(15):1158

Hatake K, Tokudome N, Ito Y. Next Generation Molecular Targeted Agents for Breast Cancer: Focus on EGFR and VEGFR Pathways. *Breast Cancer*. 2007;14(2):132-49.

Hayashi SJ, Eguchi H, Tanimoto K, Yoshida T, Omoto Y, Inoue A, Yoshida N, Yamaguchi Y. The expression and function of estrogen receptor alpha and beta in human breast cancer and its clinical application. *Endocr Relat Cancer*. 2003; 10(2):193-202.

Hawkins MB, Thornton JW, Crews D, Skipper JK, Dotte A, Thomas P. Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97(20):1751-6.

Hilakivi-Clarke L, Clarke R, Onojafe I, Raygada M, Cho E, Lippman M. A maternal diet high in n - 6 polyunsaturated fats alters mammary gland development, puberty onset, and breast cancer risk among female rat offspring. *Proc Natl Acad Sci*. 1997; 94(17):9372-7.

Hiscox S, Jordan NJ, Jiang W, Harper M, McClelland R, Smith C, Nicholson RI. Chronic exposure to fulvestrant promotes overexpression of the c-Met receptor in breast cancer cells: implications for tumour-stroma interactions. *Endocr Relat Cancer*. 2006; 13(4):1085-99.

Hoar FJ, Chaudhri S, Wadley MS, Stonelake PS. Co-expression of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and c-erbB2 in human breast carcinoma. *Eur J Cancer*. 2003; 39(12):1698-73.

Holloway AJ, Van Laar RK, Tothill RW, Bowtell DD. Options available--from start to finish--for obtaining data from DNA microarrays II. *Nat Genet*. 2002;32 Suppl:481-9.

Hood JD, Cheresh DA. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2002;2:91-100.

Hood JD, Frausto R, Kiosses WB, Schwartz MA, Cheresh DA. Differential α integrin-mediated Ras-ERK signaling during two pathways of angiogenesis. *J Cell Biol*. 2003;162(5):933-43.

Horwitz KB, Jackson TA, Bain DL, Richer JK, Takimoto GS, Tung L. Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol Endocrinol*. 1996; 10(10):1167-77.

Howell A, Clarke RB, Evans G, Bundred N, Cuzick J, Santen R, Allred C. Estrogen deprivation for breast cancer prevention. *Recent Results Cancer Res.* 2007;174:151-67.

Huang J, Wei W, Zhang J, Liu G, Bignell GR, Stratton MR, Futreal PA, Wooster R, Jones KW, Shapero MH. Whole genome DNA copy number changes identified by high density oligonucleotide arrays. *Hum Genomics.* 2004; 1(4):287-99.

Huggins C, Grand LC, Brillantes FP. Critical significance of breast structure in the induction of mammary cancer in the rat. *Proc Natl Acad Sci* 1959; 45(8):1294-300.

Huggins C, Grand LC, Brillantes FP. Cancer induced by a single feeding of polymucular hydrocarbons, and its suppression. *Nature.* 1961;189:204-7.

Hyder SM, Shipley GL, Stancel GM. Estrogen action in target cells: selective requirements for activation of different hormone response elements. *Mol Cell Endocrinol.* 1995; 112(1):35-43.

Imai T, Cho YM, Hasumura M, Hirose M. Enhancement by acrylamide of N-methyl-N-nitrosourea-induced rat mammary tumor development-possible application for a model to detect co-modifiers of carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2005; 230(1):25-32.

Ingle JN, Green SJ, Ahmann DL, Long HJ, Edmonson JH, Rubin J, Chang MN, Creagan ET. Randomized trial of tamoxifen alone or combined with aminoglutethimide and hydrocortisone in women with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 1986;4(6):958-64.

Ip C, Dong Y, Ganther HE. New concepts in selenium chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev.* 2002; 21(3-4):281-9.

Jackson VP. Screening mammography: controversies and headlines. *Radiology*. 2002; 225(2):323-6.

Jatoi I, Miller AB. Why is breast-cancer mortality declining? *Lancet Oncol*. 2003; 4(4):251-4.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin*. 2007;57(1):43-66.

Jensen EV, Jacobson HI. Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Prog Horm Res*. 1962; 18:387-89.

Jinga DC, Blidaru A, Condrea I, Ardeleanu C, Dragomir C, Szegli G, Stefanescu M, Matache C. MMP-9 and MMP-2 gelatinases and TIMP-1 and TIMP-2 inhibitors in breast cancer: correlations with prognostic factors. *J Cell Mol Med*. 2006; 10(2):499-510.

Johnson KF, Lin SM. Microarray analysis; a comparative approach. *Mol Cancer Ther*. 2002; 1(3): 237-8.

Johnston SR. Endocrine manipulation in advanced breast cancer: recent advances with SERM therapies. *Clin Cancer Res*. 2001; 7(12 Suppl):4376s-4387s.

Jordan VC. Effect of tamoxifen (ICI 46,474) on initiation and growth of DMBA-induced rat mammary carcinomata. *Eur J Cancer*. 1976; 12(6):419-24.

Jordan VC. The secrets of selective estrogen receptor modulation: cell-specific coregulation. *Cancer Cell*. 2002; 1(3):215-7.

Jordan VC. Antiestrogens and selective estrogen receptor modulators as multifunctional medicines. 2. Clinical considerations and new agents. *J Med Chem*. 2003; 46(7):1081-111.

Jordan VC. Optimising endocrine approaches for the chemoprevention of breast cancer beyond the study of tamoxifen and raloxifene (STAR) trial. *Eur J Cancer*. 2006; 42(17):2909-13.

Jordan VC. Chemoprevention of breast cancer with selective oestrogen-receptor modulators. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7(1):46-53.

Jordan VC, Allen KE. Evaluation of the antitumour activity of the non-steroidal antioestrogen monohydroxytamoxifen in the DMBA-induced rat mammary carcinoma model. *Eur J Cancer*. 1980; 16(2):239-51.

Jordan VC, Allen KE, Dix CJ. Pharmacology of tamoxifen in laboratory animals. *Cancer Treat Rep*. 1980; 64(6-7):745-59.

Jordan VC, Lababidi MK, Langan-Fahey S. Suppression of mouse mammary tumorigenesis by long-term tamoxifen therapy. *J Natl Cancer Inst*. 1991; 83(7):492-6.

Jordan VC, Lababidi MK, Mirecki DM. Anti-oestrogenic and anti-tumour properties of prolonged tamoxifen therapy in C3H/OUJ mice. *Eur J Cancer*. 1990; 26(6):718-21.

Kaklamani VG, Baddi L, Liu J, Rosman D, Phukan S, Bradley C, Hegarty C, McDaniel B, Rademaker A, Oddoux C, Ostrer H, Michel LS, Huang H, Chen Y, Ahsan H, Offit K, Pasche B. Combined genetic assessment of transforming growth factor-beta signaling pathway variants may predict breast cancer risk. *Cancer Res*. 2005; 65(8):3454-61.

Kallen J, Schlaeppi JM, Bitsch F, Filipuzzi I, Schilb A, Riou V, Graham A, Strauss A, Geiser M, Fournier B. Evidence for ligand-independent transcriptional activation of the human estrogen-related receptor alpha (ERRalpha): crystal structure of ERRalpha ligand binding domain in complex with peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1alpha. *J Biol Chem.* 2004;279(47):49330-7.

Kaminski N e Friedman N. Practical approaches to analyzing results of microarray experiments. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002; 27(2): 125-32.

Katzenellenbogen BS, Montano MM, Le Goff P, Schodin DJ, Kraus WL, Bhardwaj B, Fujimoto N. Antiestrogens: mechanisms and actions in target cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1995; 53(1-6): 387-93.

Kawai K, Uetsuka K, Doi K, Nakayama H. The activity of matrix metalloproteinases (MMPS) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in mammary tumors of dogs and rats. *J Vet Med Sci.* 2006; 68(2):105-11.

Kelloff GJ, Lippman SM, Dannenberg AJ, Sigman CC, Pearce HL, Reid BJ, Szabo E, Jordan VC, Spitz MR, Mills GB, Papadimitrakopoulou VA, Lotan R, Aggarwal BB, Bresalier RS, Kim J, Arun B, LuKH, Thomas ME, Rhodes HE, Brewer MA, Follen M, Shin DM, Parnes HL, Siegfried JM, Evans AA, Blot WJ, Chow WH, Blount PL, Maley CC, *et al.* Task Force on Cancer Prevention. Progress in chemoprevention drug development: the promise of molecular biomarkers for prevention of intraepithelial neoplasia and cancer--a plan to move forward. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(12):3661-97.

Kim H, Hall P, Smith M, Kirk M, Prasain JK, Barnes S, Grubbs C. Chemoprevention by grape seed extract and genistein in carcinogen-induced mammary cancer in rats is diet dependent. *J Nutr.* 2004;134(12 Suppl): 3445S-52S.

Kim I, Kim J-H, Ryu YS, Jung SH, Nah JJ, Koh GY. Characterization and expression of a novel alternatively spliced human angiopoietin-2. *J Biol Chem*. 2000; 275:18550-6.

Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(14):2905-19.

Kopans DB. Screening mammography and the controversy concerning women aged 40-49 years. *RSNA Categorical Course in Breast Imaging*. 1995; 39-49.

Kolar R. Animal experimentation. *Sci Eng Ethics*. 2006; 12(1):111-22.

Korkola JE, DeVries S, Fridlyand J, Hwang ES, Estep AL, Chen YY, Chew KL, Dairkee SH, Jensen RM, Waldman FM. Differentiation of lobular versus ductal breast carcinomas by expression microarray analysis. *Cancer Res*. 2003; 63(21):7167-75.

Kritchovsky D. Caloric restriction and experimental mammary carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat*. 1997; 46(2-3):161-7.

Kronblad A, Jirstrom K, Ryden L, Nordenskjold B, Landberg G. Hypoxia inducible factor-1alpha is a prognostic marker in premenopausal patients with intermediate to highly differentiated breast cancer but not a predictive marker for tamoxifen response. *Int J Cancer*. 2006; 118(10):2609-16.

Kubatka P, Ahlersova E, Ahlers I, Bojkova B, Kalicka K, Adamekova E, Markova M, Chamilova M, Ermakova M. Variability of mammary carcinogenesis induction in female Sprague-Dawley and Wistar: Han rats: the effect of season and age. *Physiol Res*. 2002; 51(6):633-40.

Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. 1997; 138(3):863-70.

Kuske B, Naughton C, Moore K, Macleod KG, Miller WR, Clarke R, Langdon SP, Cameron DA. Endocrine therapy resistance can be associated with high estrogen receptor alpha (ERalpha) expression and reduced ERalpha phosphorylation in breast cancer models. *Endocr Relat Cancer*. 2006; 13(4):1121-33.

Landel CC, Kushner PJ, Greene GL. The interaction of human estrogen receptor with DNA is modulated by receptor-associated proteins. *Mol Endocrinol*. 1994; 8(10):147-19.

Landel CC, Potthoff SJ, Nardulli AM, Kushner PJ, Greene GL. Estrogen receptor accessory proteins augment receptor-DNA interaction and DNA bending. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1997;63(1-3):59-73.

Lander ES. Array of hope. *Science*. 1996; 274: 536-9.

Langsenlehner U, Renner W, Yazdani-BiuKi B, Eder T, Wascher TC, Paulweber B, Clar H, Hofmann G, Samonigg H, Krippel P. Integrin alpha-2 and beta-3 gene polymorphisms and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat*. 2006; 97(1):67-72.

Lee CH. Screening mammography: proven benefit, continued controversy. *Rad Clin N Am*. 2002; 40(30): 33-46.

Lee YG, Macoska JA, Korenchuk Sand Pienta KJ. MIM, a potential metastasis suppressor gene in bladder cancer. *Neoplasia*. 2002; 4:291-4.

Lehnes K, Winder AD, Alfonso C, Kasid N, Simoneaux M, Summe H, Morgan E, Iann MC, Duncan J, Eagan M, Tavaluc R, Evans CH Jr, Russell R, Wang A, Hu F, Stoica A. The effect of estradiol on in vivo tumorigenesis is modulated by the human epidermal growth factor receptor 2/phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt1 pathway. *Endocrinology*. 2007; 148(3):1171-80.

Leissner P, Verjat T, Bachelot T, Paye M, Krause A, Puisieux A, Mougin B. Prognostic significance of urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 mRNA expression in lymph node- and hormone receptor-positive breast cancer. *BMC Cancer*. 2006;6:216.

Levenson AS, Kliakhandler IL, Svoboda KM, Pease KM, Kaiser SA, Ward JE 3RD, Jordan VC. Molecular classification of selective oestrogen receptor modulators on the basis of gene expression profiles of breast cancer cells expressing oestrogen receptor alpha. *Br J Cancer*. 2002;87(4):449-56.

Levenson AS, Jordan VC. The key to the antiestrogenic mechanism of raloxifene is amino acid 351 (aspartate) in the estrogen receptor. *Cancer Res*. 1998;58(9):1872-5.

Lewis JS, Jordan VC. Selective estrogen receptor modulators (SERMs): mechanisms of anticarcinogenesis and drug resistance. *Mutat Res*. 2005; 591(1-2):247-63.

Li H, Gomes PJ, Chen JD. RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 8479-84.

Liang Y, Brekken RA, Hyder SM. Vascular endothelial growth factor induces proliferation of breast cancer cells and inhibits the anti-proliferative activity of anti-hormones. *Endocr Relat Cancer*. 2006;13(3):905-19.

Liang P, Pardee AB. Differential display. A general protocol. *Mol Biotechnol.* 1998; 10(3):261-7.

Liehr JG. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocr Rev.* 2000; 21(1):40-54.

Liehr JG, Jones JS. Role of iron in estrogen-induced cancer. *Curr Med Chem.* 2001; 8(7) 839-49.

Lipton A, Ali SM, Leitzel K, Demers L, Evans DB, Hamer P, Brown-Shimer S, Pierce K, Carney W. Elevated plasma tissue inhibitor of metalloproteinase-1 level predicts decreased response and survival in metastatic breast cancer. *Cancer.* 2007; 109(10):1933-9.

Lipworth L, Bailey LR, Trichopoulos D. History of breast-feeding in relation to breast cancer risk: a review of the epidemiologic literature. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92(4):302-12.

Liu ET. Expression genomics and cancer biology. *Pharmacogenomics.* 2004; 5(8):1117-28.

Liu ET. Genomic technologies and the interrogation of the transcriptome. *Mech Ageing Dev.* 2005; 126(1):153-9.

Lockhart DJ, Winzeler EA. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature.* 2000; 405(6788):827-36.

Lonning PE, Sorlie T, Perou CM, Brown PO, Botstein D, Borresen-Dale AL. Microarrays in primary breast cancer-lessons from chemotherapy studies. *Endocr Relat Cancer.* 2001; 8(3):259-63.

Loven MA, Davis RE, Curtis CD, Muster N, Yates JR, Nardulli AM. A novel estrogen receptor alpha-associated protein alters receptor-deoxyribonucleic acid interactions and represses receptor-mediated transcription. *Mol Endocrinol.* 2004; 18(11):2649-59.

LufKin EG, Whitaker MD, Nickelsen T, Argueta R, Caplan RH, Knickerbocker RK, Riggs BL. Treatment of established postmenopausal osteoporosis with raloxifene: a randomized trial. *J Bone Miner Res.* 1998; 13(11):1747-54.

Luo S, Labrie C, Belanger A, Candas B, Labrie F. Prevention of development of dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)-induced mammary tumors in the rat by the new nonsteroidal antiestrogen EM-800 (SCH57050). *Breast Cancer Res Treat.* 1998; 49(1):1-11.

Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88(20):9267-71.

Malejka-Giganti D, ParKin DR, Bennett KK, Lu Y, Decker RW, Niehans GA, Bliss RL. Suppression of mammary gland carcinogenesis by post-initiation treatment of rats with tamoxifen or indole-3-carbinol or their combination. *Eur J Cancer Prev.* 2007;16(2):130-41.

Maluf MFM, Mori LJ, Barros ACSD. O impacto psicológico do câncer de mama. *Rev Bras. Cancerol.* 2005; 51(2):149-54.

Manjanatha MG, Shelton S, Bishop ME, Lyn-Cook LE, Aidoo A. Dietary effects of soy isoflavones daidzein and genistein on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary mutagenesis and carcinogenesis in ovariectomized Big Blue transgenic rats. *Carcinogenesis.* 2006; 27(12):2555-64.

Manni A, Grove R, Kunselman S, Aldaz M. Involvement of the polyamine pathway in breast cancer progression. *Cancer Lett.* 1995; 92(1):49-57.

Manni A, Rainieri J, Arafah BM, Pearson OH. Effect of high-dose oestrogen administration on the growth and prolactin receptor content of N-nitrosomethylurea-induced mammary tumours in the rat. *J Endocrinol.* 1982; 93(1):11-6.

Manni A, Trujillo JE, Marshall JS, Brodkey J, Pearson OH. Antihormone treatment of stage IV breast cancer. *Cancer.* 1979; 43(2):444-50.

Marchbanks PA, McDonald JA, Wilson HG, Folger SG, Mandel MG, Daling JR, Bernstein L, Malone KE, Ursin G, Strom BL, Norman SA, Wingo PA, Burkman RT, Berlin JA, Simon MS, Spirtas R, Weiss LK. Oral contraceptives and the risk of breast cancer. *N Engl J Med.* 2002; 346(26):2025-32.

Martin TA, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG. Hepatocyte growth factor disrupts tight junctions in human breast cancer cells. *Cell Biol Int.* 2004;28(5):361-71.

Martino S, Cauley JA, Barrett-Connor E, Powles TJ, Mershon J, Disch D, Secret RJ, Cummings SR; CORE Investigators. Continuing outcomes relevant to Evista: breast cancer incidence in postmenopausal osteoporotic women in a randomized trial of raloxifene. *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96(23):1751-61.

Mauro L, Catalano S, Bossi G, Pellegrino M, Barone I, Morales S, Giordano C, Bartella V, Casaburi I, Ando S. Evidences that leptin up-regulates E-cadherin expression in breast cancer: effects on tumor growth and progression. *Cancer Res.* 2007;67(7):3412-21.

Mayer EL, Lin NU, Burstein HJ. Novel approaches to advanced breast cancer: bevacizumab and lapatinib. *J Natl Compr Canc Netw.* 2007;5(3):314-23.

McCormick DL, Mehta RG, Thompson CA, Dinger N, Caldwell JA, Moon RC. Enhanced inhibition of mammary carcinogenesis by combined treatment with N-(4-hydroxyphenyl)retinamide and ovariectomy. *Cancer Res.* 1982; 42(2):508-12.

McDonnell DP, Norris JD. Connections and regulation of the human estrogen receptor. *Science.* 2002; 296(5573):1642-4.

McKenna NJ, O'Malley BW. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell.* 2002; 108(4):465-74.

McPherson K, Steel CM, Dixon JM. Breast cancer-epidemiology, risk factors and genetics. *Clin Rev.* 2000; 321:624-8.

Meade JD, Cho YJ, Fisher JS, Walden JC, Guo Z, Liang P. Automation of fluorescent differential display with digital readout. *Methods Mol Biol.* 2006; 317:23-57.

Meijer-van Gelder ME, Look MP, Peters HA, Schmitt M, Brunner N, Harbeck N, Klijn JG, Foekens JA. Urokinase-type plasminogen activator system in breast cancer: association with tamoxifen therapy in recurrent disease. *Cancer Res.* 2004; 64(13):4563-8.

Melamed M, Castano E, Notides AC, Sasson S. Molecular and Kinetic basis for the mixed agonist/antagonist activity of estriol. *Mol Endocrinol.* 1997; 11(12):1868-78.

Mehta RG. Experimental basis for the prevention of breast cancer. *Eur J Cancer.* 2000; 36(10):1275-82.

Mestiri S, Bouaouina N, Ahmed SB, Khedhaier A, Jrad BB, Remadi S, Chouchane L. Genetic variation in the tumor necrosis factor-alpha promoter region and in the stress protein hsp70-2: susceptibility and prognostic implications in breast carcinoma. *Cancer*. 2001; 91(4):672-8.

Meunier-Carpentier S, Dales JP, Djemli A, Garcia S, Bonnier P, Andrac-Meyer L, Lavaut MN, Allasia C, Charpin C. Comparison of the prognosis indication of VEGFR-1 and VEGFR-2 and Tie2 receptor expression in breast carcinoma. *Int J Oncol*. 2005; 26(4):977-84.

Michels KB, Mohllajee AP, Roset-Bahmanyar E, Beehler GP, Moysich KB. Diet and breast cancer: a review of the prospective observational studies. *Cancer*. 2007;109(Suppl 12):2712-49.

Miller KD, Sledge GW, Burstein HJ. Angiogenesis inhibition in the treatment of breast cancer: a review of studies presented at the 2006 san antonio breast cancer symposium. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2007;5(3):1-12.

Mironchik Y, Winnard PT Jr, Vesuna F, Kato Y, Wildes F, Pathak AP, Kominsky S, Artemov D, Bhujwalla Z, Van Diest P, Burger H, GlacKin C, Raman V. Twist overexpression induces in vivo angiogenesis and correlates with chromosomal instability in breast cancer. *Cancer Res*. 2005; 65(23):10801-9.

Miyoshi Y, Funahashi T, Tanaka S, Taguchi T, TamaKi Y, Shimomura I, Noguchi S. High expression of leptin receptor mRNA in breast cancer tissue predicts poor prognosis for patients with high, but not low, serum leptin levels. *Int J Cancer*. 2006; 118(6):1414-9.

Montano MM, Muller V, Trobaugh A, Katzenellenbogen BS. The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol Endocrinol*. 1995; 9(7):814-25.

Morello KC, Wurz GT, Degregorio MK. SERMs: current status and future trends. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2002; 43(1): 63-76.

Morello KC, Wurz GT, Degregorio MW. Pharmacokinetics of selective estrogen receptor modulators. *Clin Pharmacokinetics*. 2003; 42(4):361-72.

Morgan LR JR, Schein PS, Woolley PV, Hoth D, Macdonald J, Lippman M, Posey LE, Beazley RW. Therapeutic use of tamoxifen in advanced breast cancer: correlation with biochemical parameters. *Cancer Treat Rep*. 1976; 60(10):1437-43.

Morrow M, Jordan VC. The current status of breast cancer chemoprevention: a star is born. *J Surg Oncol*. 2007; 95(1):4-5.

Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett*. 1996; 392(1):49-53.

Mouridsen H, Gershanovich M, Sun Y, Perez-Carrion R, Boni C, Monnier A, Apffelstaedt J, Smith R, Sleeboom HP, Janicke F, Pluzanska A, Dank M, Becquart D, Bapsy PP, Salminen E, Snyder R, Lassus M, Verbeek JA, Staffler B, Chaudri-Ross HA, Dugan M. Superior efficacy of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy for postmenopausal women with advanced breast cancer: results of a phase III study of the International Letrozole Breast Cancer Group. *J Clin Oncol*. 2001; 19(10):2596-606.

Mukherjee A, Soyak SM, Fernandez-Valdivia R, Gehin M, Chambon P, Demayo FJ, Lydon JP, O'malley BW. Steroid receptor coactivator 2 is critical for progesterone-dependent uterine function and mammary morphogenesis in the mouse. *Mol Cell Biol*. 2006; 26(17):6571-83.

Murphy LC. Antiestrogen action and growth factor regulation. *Breast Cancer Res Treat*. 1994; 31(1):61-71.

Mustafa IA, Bland KI. Physiologic effects of steroid hormones and postmenopausal hormone replacement on the female breast and breast cancer risk. *Ann Surg.* 1998; 228(5):638-51.

Muti P, Bradlow HL, Micheli A, Krogh V, Freudenheim JL, Schunemann HJ, Stanulla M, Yang J, Sepkovic DW, Trevisan M, Berrino F. Estrogen metabolism and risk of breast cancer: a prospective study of the 2:16alpha-hydroxyestrone ratio in premenopausal and postmenopausal women. *Epidemiology.* 2000; 11(6):635-40

Mutrie N, Campbell AM, Whyte F, McConnachie A, Emslie C, Lee L, Kearney N, Walker A, Ritchie D. Benefits of supervised group exercise programme for women being treated for early stage breast cancer: pragmatic randomised controlled trial. *BMJ.* 2007; 334(7592):517.

Mylona E, Alexandrou P, Giannopoulou I, Liapis G, Sofia M, Keramopoulos A, Nakopoulou L. The prognostic value of vascular endothelial growth factors (VEGFs)-A and -B and their receptor, VEGFR-1, in invasive breast carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2007; 104(3):557-63.

Nabholtz JM, Buzdar A, Pollak M, Harwin W, Burton G, Mangalik A, Steinberg M, Webster A, Von Euler M. Anastrozole is superior to tamoxifen as first-line therapy for advanced breast cancer in postmenopausal women: results of a North American multicenter randomized trial. Arimidex Study Group. *J Clin Oncol.* 2000; 18(22):3758-67.

Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Yoshidome K, Nakahara M, Nakao K, Nakamura M, Kakudo K. Nitric oxide in breast cancer: induction of vascular endothelial growth factor-C and correlation with metastasis and poor prognosis. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(4):1201-7.

Navarrete MA, Maier CM, Falzoni R, Quadros LG, Lima GR, Baracat EC, Nazario AC. Assessment of the proliferative, apoptotic and cellular renovation indices of the human mammary epithelium during the follicular and luteal phases of the menstrual cycle. *Breast Cancer Res.* 2005; 7(3):R306-13.

Naumov GN, Bender E, Zurakowski D, Kang SY, Sampson D, Flynn E, Watnick RS, Straume O, Akslen LA, Folkman J, Almog N. A model of human tumor dormancy: an angiogenic switch from the nonangiogenic phenotype. *J Natl Cancer Inst.* 2006; 98(5):316-25.

Nilsson S, Koehler KF. Oestrogen receptors and selective oestrogen receptor modulators: molecular and cellular pharmacology. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005; 96(1):15-25.

Niu G, Carter WB. Human epidermal growth factor receptor 2 regulates angiopoietin-2 expression in breast cancer via AKT and mitogen-activated protein Kinase pathways. *Cancer Res.* 2007; 67(4):1487-93.

Oh AS, Lorant LA, Holloway JN, Miller DL, Kern FG, El Ashry D. Hyperactivation of MAPK induces loss of ER expression in breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 2001; 15:1344-59.

Olsen O, Gotzsche PC. Cochrane review on screening for breast cancer with mammography. *Lancet.* 2001; 358: 1340-42.

O'Malley BW, Schrader WT, Mani S, Smith C, Weigel NL, Conneely OM, Clark JH. An alternative ligand-independent pathway for activation of steroid receptors. *Recent Prog Horm Res.* 1995; 50:333-47.

O'Neil JS, Burow ME, Green AE, McLachlan JA, Henson MC. Effects of estrogen on leptin gene promoter activation in MCF-7 breast cancer and JEG-3 choriocarcinoma cells: selective regulation via estrogen receptors alpha and beta. *Mol Cell Endocrinol.* 2001; 176(1-2):67-75.

Osborne CK, Schiff R. Growth factor receptor cross-talk with estrogen receptor as a mechanism for tamoxifen resistance in breast cancer. *Breast*. 2003; 12(6):362-7.

Osipo C, Gajdos C, Liu H, Chen B, Jordan VC. Paradoxical action of fulvestrant in estradiol-induced regression of tamoxifen-stimulated breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2003; 95(21):1597-608.

Pagliarulo V, Datar RH, Cote RJ. Role of genetic and expression profiling in pharmacogenomics: the changing face of patient management. *Curr Issues Mol Biol*. 2002; 4(4):101-10.

Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scanlan TS. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science*. 1997; 277(5331):1508-10.

Parker MG Structure and function of estrogen receptors. *Vitam Horm*. 1995; 51:267-87.

ParKin DM. The evolution of the population-based cancer registry. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6(8):63-12.

ParKin DM, Fernandez LM. Use of statistics to assess the global burden of breast cancer. *Breast J*. 2006;12(Suppl 1):S70-80.

Parr C, WatKins G, Boulton M, Cai J, Jiang WG. Placenta growth factor is over-expressed and has prognostic value in human breast cancer. *Eur J Cancer*. 2005; 41(18):2819-27.

Pasche B, Knobloch TJ, Bian Y, Liu J, Phukan S, Rosman D, Kaklamani V, Baddi L, Siddiqui FS, Frankel W, Prior TW, Schuller DE, Agrawal A, Lang J, Dolan ME, Vokes EE, Lane WS, Huang CC, Caldes T, Di Cristofano A, Hampel H, Nilsson I, von Heijne G, Fodde R, Murty VV, de la Chapelle A, Weghorst CM.

Somatic acquisition and signaling of TGFBR1*6A in cancer. *JAMA*. 2005; 294(13):1634-46.

Peray DH, Barthold SW. *Pathology of laboratory rodents and rabbits*. Iowa, US: Iowa State University Press; 1993.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Van de Rijn M, Jeffrey Ss, Rees Ca, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AI, Brown Po, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000; 406(6797):747-52.

Platet N, Cathiard AM, Gleizes M, Garcia M. Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004; 51(1):55-67.

Pompei LM, Carvalho FM, Ortiz SC, Motta MC, Cruz RJ, Melo NR Morphometric evaluation of effects of two sex steroids on mammary gland of female rats. *Maturitas*. 2005; 51(4):370-9.

Popescu NC, Zimonjic DB. Chromosome and gene alterations in breast cancer as markers for diagnosis and prognosis as well as pathogenetic targets for therapy. *Am J Med Genet*. 2002; 115(3):142-9.

Popesko P, Rastova V, Horak J. A colour atlas of anatomy of laboratory animals. London: Wolf Publications; 1990. v.2.

Prentice RL, Caan B, Chlebowski RT, Patterson R, Kuller LH, Ockene JK, Margolis KL, Limacher MC, Manson JE, Parker LM, Paskett E, Phillips L, Robbins J, Rossouw JE, Sarto GE, Shikany JM, Stefanick ML, Thomson CA, Van Horn L, Vitolins MZ, Wactawski-Wende J, Wallace RB, Wassertheil-Smoller S, Whitlock E, Yano K, Adams-Campbell L, Anderson GL, Assaf AR, Beresford SA, Black HR, Brunner RL, Brzyski RG, Ford L, Gass M, Hays J, Heber D, Heiss G, Hendrix SL, Hsia J, Hubbell FA, Jackson RD, Johnson KC, Kotchen JM, LaCroix AZ, Lane DS, Langer RD, Lasser NL, Henderson MM. Low-fat dietary pattern and risk of invasive breast cancer: the Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial. *JAMA*. 2006; 295(6):629-42.

Quackenbush J. Microarray analysis and tumor classification. *N Engl J Med*. 2006; 354(23):2463-72.

Rayala SK, Mascarenhas J, Vadlamudi RK, Kumar R. Altered localization of a coactivator sensitizes breast cancer cells to tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther*. 2006; 5(2):230-7.

Renaud J, Bischoff SF, Buhl T, Floersheim P, Fournier B, Geiser M, Halleux C, Kallen J, Keller H, Ramage P. Selective estrogen receptor modulators with conformationally restricted side chains. Synthesis and structure-activity relationship of ERalpha-selective tetrahydroisoquinoline ligands. *J Med Chem*. 2005;48(2):364-79.

Ribeiro RC, Kushner PJ, Baxter JD. The nuclear hormone receptor gene superfamily. *Annu Rev Med*. 1995; 46:443-53.

Richardson CA, Flecknell PA. Anaesthesia and post-operative analgesia following experimental surgery in laboratory rodents: are we making progress? *Altern Lab Anim*. 2005;33(2):119-27.

Ries L, Eisner M, Kosary F. *SEER cancer statistics review 1975-2000*. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2003.

Riggs BL, Hartmann LC. Selective estrogen-receptor modulators -- mechanisms of action and application to clinical practice. *N Engl J Med*. 2003; 348(7):618-29.

Rody A, Holtrich U, Gaetje R, Gehrman M, Engels K, von Minckwitz G, Loibl S, Diallo-Danebrock R, Ruckhaberle E, Metzler D, Ahr A, Solbach C, Karn T, Kaufmann M. Poor outcome in estrogen receptor-positive breast cancers predicted by loss of plexin B1. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(4):1115-22.

Rogers AE, Hafer LJ, Iskander YS, Yang S. Black tea and mammary gland carcinogenesis by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in rats fed control or high fat diets. *Carcinogenesis*. 1998;19(7):1269-73.

Rogers AE, Lee SY. Chemically-induced mammary gland tumors in rats: modulation by dietary fat. *Prog Clin Biol Res*. 1986; 222:255-82.

Rollerova E, Urbancikova M. Intracellular estrogen receptors, their characterization and function. *Endoc Regul*. 2000; 34: 23-18.

Rose C, Mouridsen HT. Treatment of advanced breast cancer with tamoxifen. *Recent Results Cancer Res*. 1984; 91:230.

Ross RK, Paganini-Hill A, Wan PC, Pike MC. Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogen versus estrogen plus progestin. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92(4):328-32.

Roy PG, Thompson AM. Cyclin D1 and breast cancer. *Breast*. 2006;15(6):718-27.

Russo J, Balogh G, Mailo D, Russo PA, Heulings R, Russo IH. The genomic signature of breast cancer prevention. *Recent Results Cancer Res.* 2007; 174:131-50.

Russo J, Gusterson BA, Rogers AE, Russo IH, Wellings SR, Van Zwieten MJ. Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Biology of disease: Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. Lab Invest.* 1990; 62(3):244-78.

Russo J, Gusterson BA, Rogers AE, Russo IH, Wellings SR, Van Zwieten MJ. Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab. Invest.* 1991; 62:1-32.

Russo J, Hasan Lareef M, Balogh G, Guo S, Russo IH. Estrogen and its metabolites are carcinogenic agents in human breast epithelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003; 87(1):1-25.

Russo J, Russo IH, Van Zwieten MJ, Rogers AE, Gusterson B. *Classification of neoplastic and non-neoplastic lesions of the rat mammary gland of laboratory animals.* Berlin: Springer-Verlag; 1989. p.275-304

Russo J, Russo IH. Toward a unified concept of mammary carcinogenesis. *Prog Clin Biol Res.* 1997; 396:1-16.

Russo IH, Russo J. Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 1998; 3(1):49-61.

Russo J, Russo IH. Atlas and histologic classification of tumors of the rat mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2000; 5(2):187-200.

Russo J, Russo IH. The pathway of neoplastic transformation of human breast epithelial cells. *Radiat Res.* 2001; 155(1 Pt 2):151-154.

Russo J, Russo I. H. Genotoxicity of steroidal estrogens. *Trends Endocrinol. Metab.* 2004a; 15(5):211-214,

Russo J, Russo I. *Molecular basis of breast cancer- prevention and treatment.* New York: Springer-Verlag Berlim; 2004b.

Russo J, Santen R, Russo IH. Hormonal control of the breast development. In: DeGroot LJ, Jameson WB, editors. *Endocrinology.* 5^a ed. Philadelphia: Saunders; 2005a. v.3, p.3045-55.

Russo J, Mailo D, Hu Y-F, Balogh GA, Sheriff F, Russo IH. Breast differentiation and its implication in cancer prevention. *Clin. Cancer Res.* 2005b; 11:931s-936s.

Russo J, Moral R, Balogh G A, Mailo D A, Russo I H. The Protective role of pregnancy in breast cancer. *Breast Cancer Res J.* 2005c; 7:131-42.

Russo J, Russo IH. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006; 102 (1-5):89-96.

Russo J, Tay LK, Russo IH. Differentiation of the mammary gland and susceptibility to carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat.* 1982; 2 (1):5-73.

Ryden L, Jirstrom K, Bendahl PO, Ferno M, Nordenskjold B, Stal O, Thorstenson S, Jonsson PE, Landberg G. Tumor-specific expression of vascular endothelial growth factor receptor 2 but not vascular endothelial growth factor or human epidermal growth factor receptor 2 is associated with impaired response to adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005a; 23(21):4695-704.

Ryden L, Stendahl M, Jonsson H, Emdin S, Bengtsson NO, Landberg G. Tumor-specific VEGF-A and VEGFR2 in postmenopausal breast cancer patients with long-term follow-up. Implication of a link between VEGF pathway and tamoxifen response. *Breast Cancer Res Treat.* 2005b; 89(2):135-43.

Ryu B, Kern SE. The essential similarity of TGFbeta and activin receptor transcriptional responses in cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 2003; 2(2):164-70.

SaiKi RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985; 230(4732):1350-4.

Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* 1995; 270(5235):467-70.

Schanaider TB, Souza C. Ethics and animal experiments. *Rev Bras Anesthesiol.* 2003; 53(2): 278-85.

Schmid M, Jakesz R, Samonigg H, Kubista E, Gnant M, Menzel C, Seifert M, Haider K, Taucher S, Mlineritsch B, Steindorfer P, Kwasny W, Stierer M, Tausch C, Fridrik M, Wette V, Steger G, Hausmaninger H. Randomized trial of tamoxifen versus tamoxifen plus aminoglutethimide as adjuvant treatment in postmenopausal breast cancer patients with hormone receptor-positive disease: Austrian breast and colorectal cancer study group trial 6. *J Clin Oncol.* 2003; 21(6):984-90.

Schneider BP, Miller KD. Angiogenesis of breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23(8):1782-90.

Schneider BP, Sledge GW Jr. Drug insight: VEGF as a therapeutic target for breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 2007; 4(3):181-9.

Schoppmann SF, Fenzl A, Nagy K, Unger S, Bayer G, Geleff S, Gnant M, Horvat R, Jakesz R, Birner P. VEGF-C expressing tumor-associated macrophages in lymph node positive breast cancer: impact on lymphangiogenesis and survival. *Surgery*. 2006; 139(6):839-46.

Schulze A, Downward J. Navigating gene expression using microarrays--a technology. *Nat Cell Biol*. 2001; 3(8):E190-5.

Seeger H, Wallwiener D, Mueck AO. Different effects of estradiol and various antiestrogens on TNF-alpha-induced changes of biochemical markers for growth and invasion of human breast cancer cells. *Life Sci*. 2006; 78(13):1464-8.

Seifeddine R, Dreiem A, TomKiewicz C, Fulchignoni-Lataud MC, Brito I, Danan JL, Favaudon V, Barouki R, Massaad-Massade L. Hypoxia and estrogen cooperate to regulate gene expression in T-47D human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007; 104:DOI doi:10.1016/j.jsbmb.2007.03.025

Shan L, Yu M, Snyderwine EG. Gene expression profiling of chemically induced rat mammary gland cancer. *Carcinogenesis*. 2005; 26(2):53-9.

Shang Y, Hu X, Drenth J, Lazar MA, Brown M. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell*. 2000; 103(6):843-52.

Shao W, Brown M. Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy. *Breast Cancer Res*. 2004; 6(1):39-52.

Shaw JA, Udokang K, Mosquera JM, Chauhan H, Jones JL, Walker RA. Oestrogen receptors alpha and beta differ in normal human breast and breast carcinomas. *J Pathol*. 2002; 198(4):450-7.

Shyamala G, Chou YC, Louie SG, Guzman RC, Smith GH, Nandi S. Cellular expression of estrogen and progesterone receptors in mammary glands: regulation by hormones, development and aging. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002; 80(2):137-48.

Shyamala G, Yang X, Cardiff RD, Dale E. Impact of progesterone receptor on cell-fate decisions during mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97(7):3044-9.

Siemann DW. Rodent tumor models in experimental cancer therapy. New York: Pergamon; 1987. p. 12.

Snoussi K, Strosberg AD, Bouaouina N, Ben Ahmed S, Helal AN, Chouchane L. Leptin and leptin receptor polymorphisms are associated with increased risk and poor prognosis of breast carcinoma. *BMC Cancer.* 2006; 6:38-48.

Solleveld HA, Van Zwieten MJ, Broerse JJ, Hollander CF. Effects of X-irradiation, ovariectomy and estradiol-17 beta on incidence, benign/malignant ratio and multiplicity of rat mammary neoplasms--a preliminary report. *Leuk Res.* 1986; 10(7):755-9.

Sommer S, Fuqua SA. Estrogen receptor and breast cancer. *Semin Cancer Biol.* 2001; 11(5):339-52.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, Van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lonning P, Borresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98(19):10869-74.

Soto AM, Sonnenschein C. The two faces of janus: sex steroids as mediators of both cell proliferation and cell death. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93(22):1673-5.

Speroff L, Fritz MA. Clinical gynecologic endocrinology and infertility. 7^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, c2005.

Speirs V, Skliris GP, Burdall SE, Carder PJ. Distinct expression patterns of ER alpha and ER beta in normal human mammary gland. *J Clin Pathol.* 2002; 55(5):371-4.

Sprague JE, Li WP, Liang K, Achilefu S, Anderson CJ. In vitro and in vivo investigation of matrix metalloproteinase expression in metastatic tumor models. *Nucl Med Biol.* 2006; 33(2):227-37.

Steele FR, Chader GJ, Johnson LV, Tombran-Tink J. Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proc. Nat. Acad. Sci USA.* 1993;90: 1526-30.

Steele VE, Moon RC, Lubet RA, Grubbs CJ, Reddy BS, Wargovich M, McCormick DL, Pereira MA, Crowell JA, Bagheri D, et al. Preclinical efficacy evaluation of potential chemopreventive agents in animal carcinogenesis models: methods and results from the NCI Chemoprevention Drug Development Program. *J Cell Biochem Suppl.* 1994; 20: 32-54.

Stewart SL, Querec TD, Ochman AR, Gruver BN, Bao R, Babb JS, Wong TS, Koutroukides T, Pinnola AD, Klein-Szanto A, Hamilton TC, Patriotis C. Characterization of a carcinogenesis rat model of ovarian preneoplasia and neoplasia. *Cancer Res.* 2004; 64(22):8177-83.

Stillfried GE, Saunders DN, Ranson M. Plasminogen binding and activation at the breast cancer cell surface: the integral role of urokinase activity. *Breast Cancer Res.* 2007;9(1):R14.

Stuhr LE, Salnikov AV, Iversen VV, Salvesen G, Rubin K, Reed RK. High-dose, short-term, anti-inflammatory treatment with dexamethasone reduces growth and augments the effects of 5-fluorouracil on dimethyl-alpha-benzanthracene-induced mammary tumors in rats. *Scand J Clin Lab Invest*. 2006; 66(6):477-86.

Tabar L, Vitak B, Chen HH, Yen MF, Duffy SW, Smith RA. Beyond randomized controlled trials: organized mammography screening substantially reduces breast cancer mortality. *Cancer*. 2001; 91:1724-31.

Tamrazi A, Carlson KE, Katzenellenbogen JA. Molecular sensors of estrogen receptor conformations and dynamics. *Mol Endocrinol*. 2003; 17(12):2593-602.

Tanenbaum DM, Wang Y, Williams SP, Sigler PB. Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95(11):5998-603.

Taylor AP, Goldenberg DM. Role of placenta growth factor in malignancy and evidence that an antagonistic PlGF/Flt-1 peptide inhibits the growth and metastasis of human breast cancer xenografts. *Mol Cancer Ther*. 2007; 6(2):524-31.

Teutsch G, Nique F, Lemoine G, Bouchoux F, Cerede E, Gofflo D, Philibert D. General structure-activity correlations of antihormones. *Ann N Y Acad Sci*. 1995; 761:5-28.

Thompson HJ, Singh M. Rat models of premalignant breast disease. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2000; 5(4):409-20.

Thornton JW. Evolution of vertebrate steroid receptors from an ancestral estrogen receptor by ligand exploitation and serial genome expansions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98:5671.

- Thornton JW, Need E, Crews D. Resurrecting the ancestral steroid receptor: ancient origin of estrogen signaling. *Science*. 2003; 301:1714.
- Tolon RM, Castillo AI, Jimenez-Lara AM, Aranda A Association with Ets-1 causes ligand- and AF2-independent activation of nuclear receptors. *Mol Cell Biol*. 2000. 20(23):8793-802.
- Traina TA, Rugo HS, Dickler M. Bevacizumab for advanced breast cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2007;21(2):303-19.
- Trikha M, Zhou Z, Timar J, Raso E, Kennel M, Emmell E, Nakada MT. Multiple roles for platelet GPIIb/IIIa and alphavbeta3 integrins in tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Cancer Res*. 2002; 62:2824–33.
- Tsai PW, Shiah SG, Lin MT, Wu CW, Kuo ML. Up-regulation of vascular endothelial growth factor C in breast cancer cells by heregulin-beta 1. A critical role of p38/nuclear factor-kappa B signaling pathway. *J Biol Chem*. 2003; 278(8):5750-9.
- Tsutsui S, Inoue H, Yasuda K, Suzuki K, Takeuchi H, Nishizaki T, Higashi H, Era S, Mori M. Angiopoietin 2 expression in invasive ductal carcinoma of the breast: its relationship to the VEGF expression and microvessel density. *Breast Cancer Res Treat*. 2006; 98(3):261-6.
- Turusov VS, Mohr U, (eds.). *Pathology of tumors in laboratory animals: tumors of the mouse*. Lyon, FR: IARC Scientific Publ.; 1994. v. 2.
- TwoRoger SS, Missmer SA, Eliassen AH, Barbieri RL, Dowsett M, Hankinson SE. Physical activity and inactivity in relation to sex hormone, prolactin, and insulin-like growth factor concentrations in premenopausal women: Exercise and premenopausal hormones. *Cancer Causes Control*. 2007; 18:DOI 10.1007/s10552-007-9017-5.

Tzukerman MT, Esty A, Santiso-Mere D, Danielian P, Parker MG, Stein RB, Pike JW, McDonnell DP. Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol Endocrinol*. 1994; 8(1):21-30.

Urban P, Vuaroqueaux V, Labuhn M, Delorenzi M, Wirapati P, Wight E, Senn HJ, Benz C, Eppenberger U, Eppenberger-Castori S. Increased expression of urokinase-type plasminogen activator mRNA determines adverse prognosis in ErbB2-positive primary breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006; 24(26):4245-53.

Van de Vijver MJ, He YD, Van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, Van Der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers Et, Friend SH, Bernards R. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*. 2002; 347(25):1999-2009.

Van 't Veer LJ, Dai H, Van De Vijver MJ, He Yd, Hart AA, Mao M, Peterse Hl, Van Der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002; 415(6871):530-6.

Van Zwieten MJ, Shellabarger CJ, Hollander CF, Cramer DV, Stone JP, Holtzman S, Broerse JJ. Differences in DMBA-induced mammary neoplastic responses in two lines of Sprague-Dawley rats. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1984; 20(9):1199-204.

Velculescu Ve, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science*. 1995; 270(5235):484-7.

Vizoso FJ, Gonzalez LO, Corte MD, Rodriguez JC, Vazquez J, Lamelas ML, Junquera S, Merino AM, Garcia-Muniz JL. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. *Br J Cancer*. 2007; 96(6):93-11.

Vogel VG. Recent results from clinical trials using SERMs to reduce the risk of breast cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1089:127-42.

Vogel VG, Costantino JP, Wickerham DI, Cronin Wm, Cecchini RS, Atkins JN, Bevers TB, Fehrenbacher L, Pajon Er JR, Wade JL 3rd, Robidoux A, Margolese RG, James J, Lippman SM, Runowicz CD, Ganz PA, Reis SE, Mccaskill-Stevens W, Ford LG, Jordan VC, Wolmark N; National Surgical Adjuvant Breast And Bowel Project (NSABP). Effects of tamoxifen vs raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes: the NSABP Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 trial. *JAMA.* 2006; 295(23):2727-41.

Xu J, Zhou JY, Wu GS. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand is required for tumor necrosis factor alpha-mediated sensitization of human breast cancer cells to chemotherapy. *Cancer Res.* 2006; 66(20):10092-9.

Warner M, Nilsson S, Gustafsson JA. The estrogen receptor family. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 1999; 11(3):249-54.

Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. 1953. *Nature.* 1953; 171(4356):737-8.

Webb P, Nguyen P, Valentine C, Lopez GN, Kwok GR, Mcinerney E, Katzenellenbogen BS, Enmark E, Gustafsson JA, Nilsson S, Kushner PJ. The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions. *Mol Endocrinol.* 1992; 6(2):157-67.

Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1992; 84(24):1875-87.

Weidner N. The importance of tumor angiogenesis: the evidence continues to grow. *Am J Clin Pathol.* 2004; 122(5):675-7.

Weigand M, Hantel P, Kreienberg R, Waltenberger J. Autocrine vascular endothelial growth factor signalling in breast cancer. Evidence from cell lines and primary breast cancer cultures in vitro. *Angiogenesis.* 2005;8(3):197-204.

Weihua Z, Andersson S, Cheng G, Simpson ER, Warner M, Gustafsson JA. Update on estrogen signaling. *FEBS Lett.* 2003; 546(1):17-24.

Welsch CW. Host factors affecting the growth of carcinogen-induced rat mammary carcinomas: a review and tribute to Charles Brenton Huggins. *Cancer Res.* 1985; 45(8):3415-43.

Westerberg H, Nordenskjold B, DE Schryver A, Notter G. Anti-oestrogen therapy of advanced mammary carcinoma. *Acta Radiol Ther Phys Biol.* 1976; 15(6):513-18.

White R, Parker MG. Molecular mechanisms of steroid hormone action. *Endocr Relat Cancer.* 1998; 5:1-14.

Willard M, Freeman D, Robertson J, Kent EV. Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. *Bio Techniques.* 2000; 29:1042-55.

Winer E P, Piccart-Gebbart MJ, Rigo HS HS, Sledge GW. Management of Her 2 positive breast cancer. In: American Society of Clinical Oncology. 2006 *Educational Book.* Alexandria, VA; 2006. [acesso 27 mar 2007]. Disponível em: <http://www.asco.org/portal/site/ASCO/menuitem.c608d82cf53347fd506fe310ee37a01d/?vgnnextoid=c759201eb61a7010VgnVCM100000ed730ad1RCRD&vmview=edbk_category_edbooks_view&index=y&confID=40&category=Breast%20Cancer>.

Wittes J, Friedman HP. Searching for evidence of altered gene expression: a comment on statistical analysis of microarray data. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91(5):400-1.

Wurtz JM, Bourguet W, Renaud JP, Vivat V, Chambon P, Moras D, Gronemeyer H. A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat Struct Biol.* 1996; 3(1):87-94.

Yager J D, Liehr JG. Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 1996; 36:23-32

Zarbl H, Sukumar S, Arthur AV, Martin-Zanca D, Barbacid M. Direct mutagenesis of Ha-ras-1 oncogenes by N-nitroso-N-methylurea during initiation of mammary carcinogenesis in rats. *Nature.* 1985; 315(6018):382-5.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994; 372:425-432.

Zheng W, Dunning L, Jin F, Holtzman J. Urinary estrogen metabolites and breast cancer: a case-control study. *Cancer Epidemiol. Biomark Prev.* 1998; 7(1):85-6.