



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E SAÚDE



DIEGO CIPRIANO CHAGAS

**EXPRESSÃO DO ANTÍGENO KI-67 NO EPITÉLIO VAGINAL DE RATAS EM
ESTRO PERMANENTE TRATADAS COM ANASTRAZOL**

TERESINA

2019

DIEGO CIPRIANO CHAGAS

**EXPRESSÃO DO ANTÍGENO KI-67 NO EPITÉLIO VAGINAL DE RATAS EM
ESTRO PERMANENTE TRATADAS COM ANASTRAZOL**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Ciências e Saúde da Universidade Federal do Piauí para obtenção do título de Mestre em Ciências e Saúde.

Área de Concentração: Métodos Diagnósticos e Análise das Condições de Saúde.

Linha de Pesquisa: Métodos de Diagnóstico em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Benedito Borges da Silva.

TERESINA

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do CCS
Serviço de Processamento Técnico

C433e Chagas, Diego Cipriano.
Expressão do antígeno ki-67 no epitélio vaginal de ratas em estro permanente tratadas com anastrozol / Diego Cipriano Chagas. -- Teresina, 2019.
57 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciências e Saúde, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Benedito Borges da Silva.
Bibliografia

1. Antígeno Ki-67. 2. Anastrozol. 3. Atrofia Vaginal – Terapia Medicamentosa. 4. Câncer de Mama – Terapia Medicamentosa. 5. Proliferação Celular. I. Título.

CDD 611.67

Elaborada por Fabíola Nunes Brasilino CRB 3/ 1014

DIEGO CIPRIANO CHAGAS

**EXPRESSÃO DO ANTÍGENO KI-67 NO EPITÉLIO VAGINAL DE RATAS EM
ESTRO PERMANENTE TRATADAS COM ANASTRAZOL**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Ciências e Saúde da Universidade Federal do Piauí para obtenção do título de Mestre em Ciências e Saúde.

Linha de Pesquisa: Métodos de Diagnóstico em Saúde.

Data da defesa: 18/07/2019

Banca examinadora:

Presidente: Prof. Dr. Benedito Borges da Silva

1º Examinador: Prof. Dr. Pedro Vitor Lopes Costa

2º examinador: Prof. Dr. Alesse Ribeiro dos Santos

Suplente: Prof. Dr^a. Ione Maria Ribeiro Soares Lopes

DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente a **Deus**, pelo seu grande amor, pela glória com que sempre dispões as conquistas na minha vida, nas concepções do que designou e sabe acima de tudo o momento ideal.

Aos meus pais **Francisco Edmilson das Chagas e Lúcia Cipriano Chagas**, ao meu filho **Matheus, Antônio**, meus irmãos **Dayana, Igor e Luma** e demais familiares, além da minha amiga **Taciane**, por todo amor, paciência e apoio que me dedicaram para alcançar um objetivo tão especial.

DEDICATÓRIA ESPECIAL

Ao **Prof. Dr. Benedito Borges da Silva**, não só um mestre na verdadeira acepção da palavra, mas um mestre especial para mim, pois foi verdadeiramente essencial em minha formação como pesquisador, por ser uma pessoa que me ensinou a importância da pesquisa e seus benefícios para a sociedade, me orientando com uma dedicação indiscutivelmente brilhante. Contemplo também uma profunda gratidão pelo acolhimento em seu grupo de pesquisa, pelo incentivo, amizade e confiança.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal do Piauí** pela oportunidade de crescimento intelectual e profissional.

Aos colegas do grupo de pesquisa do professor **Dr. Benedito Borges**, dentre eles **Larisse, Renato, Jefferson, Danylo, Luana e demais alunos do mestrado e doutorado**, agradeço não apenas pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho, mas também pela amizade e companheirismo durante o trajeto desse estudo.

Agradeço profundamente a **Maria da Conceição Barros Oliveira e Victor Alves de Oliveira**, por todo apoio, paciência e instruções que me dedicaram durante todos os passos desse estudo, sendo verdadeiramente indispensáveis para meu desenvolvimento.

Agradeço ao **Dr. Erasmo** pelas instruções e grande apoio dado no desenvolvimento do processamento de dados desse estudo e a minha tia **Professora Valdênia**, pelo importante auxílio com a correção ortográfica da produção textual.

Agradeço a **Dra Adeline** (veterinária do Biotério do Núcleo de Tecnologia Farmacêutica da UFPI) e aos colaboradores do Biotério **Sr. Ary e Sr. Sena** por tanta atenção, dedicação e contribuição na minha pesquisa.

Ao Magnífico **Reitor e Vice-Reitora da Universidade Federal do Piauí** pela existência desta pós-graduação *stricto sensu* trabalhando na qualificação de recursos humanos no Piauí.

Ao **Diretor do Centro de Ciências e Saúde, Prof. Dr. Viriato Campelo**, pelo empenho no funcionamento das pós-graduações do CCS.

Ao **Coordenador e professores do Mestrado** pelos ricos ensinamentos e preciosas contribuições do curso.

A secretária do Mestrado **Edilene** pela grande atenção, carinho e amizade, uma funcionária sempre acessível a todos.

Aos **funcionários do Hospital Getúlio Vargas** em particular **Eugênia e Rose**, sempre atenciosas, dedicadas e boas amigas.

RESUMO

Introdução: Atrofia vaginal e o câncer mamário hormônio sensível são condições comuns em mulheres pós - menopáusicas e o tamoxifeno, por sua vez, é a terapia endócrina padrão para esta doença, todavia apesar de mostrar efeito trófico vaginal pode provocar reações endometriais graves, daí a busca de endocrinoterapia alternativa. **Objetivo:** Avaliar a expressão do antígeno Ki-67 no epitélio vaginal de ratas em estro permanente tratadas com anastrozol. **Materiais e métodos:** Seleccionadas 42 ratas induzidas ao estado de estro permanente e divididas em 2 grupos: grupo I (controle, n=21) o qual foi administrado 0,1 ml/animal/dia de propilenoglicol e grupo II (experimental n=21) receberam 0,5 mg/Kg de anastrozol diluído em 0,1ml de propilenoglicol. Avaliação imunoistoquímica do marcador Ki-67 foi realizada com análise microscópica as células do epitélio vaginal, à análise estatística, foi realizada utilizando o teste não paramétrico Mann Whitney. **Resultados:** A microscopia de luz mostrou uma maior concentração de células com núcleo corados em marrom com anti-Ki-67 no grupo controle do que no grupo experimental. A porcentagem média de núcleos corados com Ki-67 por 500 células no epitélio vaginal foi de $68,64 \pm 2,64$ e $30,46 \pm 2,00$ [média +/- erro padrão da média (SEM)] nos grupos controle e experimental, respectivamente ($p < 0,003$). **Conclusões:** O presente estudo mostrou que o anastrozol, na dose e duração do tratamento utilizado, induziu uma diminuição significativa na proliferação celular da mucosa vaginal de ratas no estro permanente, avaliado pela expressão da proteína Ki-67.

Palavras chaves: Anastrozol, Ki-67, Proliferação, Rata, Vagina.

ABSTRACT

Introduction: Vaginal atrophy and breast cancer sensitive hormone are common conditions in postmenopausal women and tamoxifen, in turn, is the standard endocrine therapy for this disease, although despite showing vaginal trophic effect can cause severe endometrial reactions, hence the search for alternative endocrine therapy. **Objective:** To evaluate Ki-67 antigen expression in the vaginal epithelium of rats treated with anastrozole in permanent estrus. **Materials and methods:** 42 rats were induced to the state of permanent estrus and divided into 2 groups: group I (control, n = 21), which was administered 0.1 ml/animal/day of propylene glycol and group II (experimental n = 21) will receive 0.5 mg/kg or 0.125 mg/animal/day of anastrozole diluted in 0.1 ml of propylene glycol. Immunohistochemical evaluation of Ki-67 marker was performed and checked carefully with microscopic analysis of the cells of the vaginal epithelium, Statistical analysis was performed using the nonparametric Mann Whitney test. **Results:** Light microscopy showed a higher concentration of brown-stained cells with anti-Ki-67 in the control group than in the experimental group. The mean percentage of nuclei stained with Ki-67 per 500 cells in the vaginal epithelium was 68.64 ± 2.64 and 30.46 ± 2.00 [mean +/- standard error of the mean (SEM)] in the control and ($p < 0.003$). **Conclusions:** The present study showed that anastrozole, in the dose and duration of treatment used, induced a significant decrease in the cellular proliferation of the vaginal mucosa of rats in the permanent estrus, evaluated by the expression of the protein Ki- 67.

Key words: Anastrozole, Ki-67, Proliferation, Rat, Vagina.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática da produção de estrogênios em mulheres na pré-menopausa e pós-menopausa.	24
Figura 2 - Mecanismo de ação dos inibidores da aromatase.	26
Figura 3 - Ratas em gaiolas plásticas com uma grade de metal com acesso livre á água e ração.....	33
Figura 4 - Procedimento de gavagem com sonda metálica.	34
Figura 5 - Fotomicrografia de secção histológica do epitélio vaginal de ratas androgenizadas mostrando maior concentração de núcleos corados em marrom com o anticorpo anti-Ki-67 MIB-5 no grupo controle (A) , comparando com uma menor concentração de núcleos corados em marrom com anticorpo anti-Ki-67 MIB-5 no grupo experimental (B) tratadas com anastrozol 0,5 mg/kg (ampliação original x400). Fonte: Arquivo Pessoal.....	39
Figura 6 - Boxplot da porcentagem de núcleos corados segundo o grupo.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos inibidores da aromatase.	25
Tabela 2 - Porcentagem média de núcleos corados com anti Ki-67 (MIB 5) no epitélio vaginal de ratas em estro permanente tratadas com anastrozol.	39

LISTA DE ABREVIATURAS, UNIDADES, SÍMBOLOS E SIGLAS

CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal.
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.
CRMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária.
mL	Mililitros.
mg	Miligramas.
RE	Receptor de Estrogênio.
Kg	Quilograma.
µm	Micrômetro.
pH	Potencial hidrogeniônico.
UFPI	Universidade Federal do Piauí.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. OBJETIVO.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1. Tipo de estudo e local da realização.....	32
3.2. Critérios de inclusão da amostra.....	32
3.3. Critérios de não-inclusão da amostra.....	33
3.4. Cálculo Amostral.....	34
3.5. Divisão dos Grupos.....	34
3.6.1 Método Histológico.....	35
3.6.2. Método Imunoistoquímico.....	35
3.6.3. Método Quantitativo.....	36
3.6.4. Método Estatístico.....	37
3.7. Aspectos Legais e Éticos.....	37
4. RESULTADOS.....	38
5. DISCUSSÃO.....	41
6. CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
ANEXOS.....	54
ANEXO A: parecer de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí.....	55
ANEXO B: comprovante de submissão do Artigo Científico da Dissertação como requisito para defesa, na revista Scientific Reports (Qualis A1, fator de impacto: 4.5)...	56

1. INTRODUÇÃO

Atrofia vaginal e o câncer mamário hormônio sensível são condições comuns em mulheres pós-menopáusicas e o tamoxifeno, por sua vez, é a terapia endócrina padrão para esta doença, todavia apesar de efeito trófico vaginal pode provocar efeitos adversos principalmente endometriais graves, daí a busca de endocrinoterapia alternativa. (NERY-AGUIAR et al., 2016).

Os inibidores da aromatase tornaram-se os fármacos endócrinos de primeira escolha no tratamento endócrino do câncer de mama hormônio sensível em mulheres na pós-menopausa, representados pelo anastrozol, letrozol e exemestano, classificados como de terceira geração, com destaque entre eles para o anastrozol (GOSS; STRASSER, 2001). Estes fármacos estão associados a uma maior eficácia no câncer de mama e melhor tolerabilidade geral em relação tamoxifeno (GOBBI et al., 2014). O tamoxifeno, por sua vez, tem sido associado a efeitos adversos indesejáveis, em particular, aumento da incidência de hiperplasia endometriais e até mesmo câncer endometrial, além de catarata, tromboembolismo e eventos cerebrovasculares (PAN; CHLEBOWSKI, 2014).

O estudo dos efeitos do anastrozol no epitélio vaginal de mulheres apresenta restrições éticas, daí a busca de modelos experimentais, mesmo sabendo da limitação quanto à extrapolação de resultados para humanos. O modelo animal, cujo tecido epitelial vaginal é mais similar ao de humanos em termos de sensibilidade a terapêutica, é a rata. A rata em estro permanente é um modelo que se apresenta sob estimulação estrogênica constante, mimetizando síndrome dos ovários policísticos, portanto interessante para o estudo do efeito de drogas hormonais (BARRACLOUGH, 1961; BARROS-OLIVEIRA et al., 2017, DA SILVA et al., 2007; DA SILVA et al., 2009; DOS SANTOS et al., 2012; RODRIGUES-JÚNIOR et al., 2012.).

Por volta dos 35 a 42 dias de vida da rata, ocorre o início dos ciclos estrais. Com o início dos ciclos estrais, os esteróides ovarianos, estradiol e progesterona são produzidos, atuando em conjunto, induzem a proliferação epitelial e regulam positivamente a morfogênese dos tecidos hormônio sensíveis. As ratas são animais do tipo poliestro, ou seja, apresentam ciclos estrais regulares e sucessivos, que se

manifestam por mudanças em vários setores do organismo, tendo diferentes designações, tais como: proestro, estro, metaestro e diestro (MORAN et al., 2004).

A interrupção do ciclo estral pode ser determinada de várias maneiras, como por meio dos androgênios, mais especificamente o propionato de testosterona, tem merecido especial atenção para indução do estro permanente. A droga administrada nos primeiros dias de vida, em estágio crítico da diferenciação hipotalâmica, lesa a área pré-óptica supraquiasmática, responsável pela liberação cíclica de gonadotrofinas e ovulação, enquanto o núcleo arqueado, que regula a secreção tônica, permanece ativo, resultando em um padrão acíclico de gonadotrofinas (BARRACLOUGH; GORSKI, 1961; DA SILVA et al., 2009; DA SILVA et al., 2007).

O período de maior sensibilidade hipotalâmica foi bem caracterizado pela primeira vez por Barraclough (1961) que, com uma única injeção de propionato de testosterona de 1,25 mg, aplicada em ratas por via subcutânea até o quinto dia de vida, induziu estro permanente em todos os animais. Quando adultas, as ratas apresentavam anovulação e ovários policísticos, comportamento agressivo quando em contato com os machos, além de apresentarem obliteração do terço externo vaginal em decorrência da androgenização (DA SILVA et al., 2007; DA SILVA et al., 2009). Portanto, as ratas em estro permanente representariam um modelo experimental ideal para o estudo de drogas hormonais sobre o epitélio vaginal.

Assim, considerando-se o estrogênio como o principal responsável pelo estímulo mitogênico no epitélio, inúmeros estudos vêm sendo realizados com o intuito de verificar o efeito de drogas inibidoras da ação estrogênica como os antiestrogênios ou os inibidores da aromatase sobre a atividade proliferativa nos epitélios hormônio sensíveis, visando a endocrinoterapia no câncer hormônio sensível e seus efeitos no aparelho urogenital (DA SILVA et al., 2009; DOS SANTOS et al., 2012).

A principal enzima que está envolvida na produção de estrogênios é a CYP19A1 ou aromatase, que pertence à família do citocromo P450 e está predominantemente localizada no fígado, glândulas supra-renais e tecido adiposo

(LAKE; HUDIS, 2002). No entanto, a fonte de estrogênio varia marcadamente entre as mulheres na pré e pós-menopausa. Em mulheres pré-menopáusicas, a principal fonte de estrogênio é obtida pelos ovários sob influência da secreção de hormônios a partir do hipotálamo. Já na mulheres pós-menopáusicas, caracterizada por insuficiência ovariana, o córtex supra-renal passa a ser a principal fonte de esteroides sexuais, produzidos na forma de andrógenos e estes são metabolizados em tecidos periféricos pela enzima aromatase, para a formação de estrogênios, sendo assim, a quantidade de aromatase no tecido periférico de mulheres na pós-menopausa varia amplamente e aumenta em função da massa adiposa. (Figura 1) (DI NARDO; GILARDI 2013; FREEDMAN; VERMA; CLEMONS, 2006; GEISLER, J. et al., 1996; GEISLER; LONNING 2005; YUE et al., 1998).

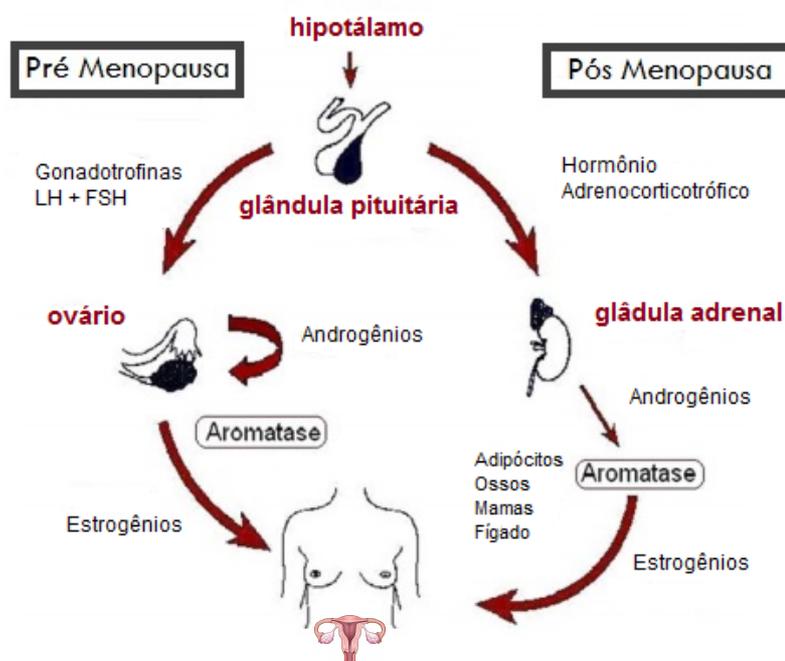


Figura 1 - Representação esquemática da produção de estrogênios em mulheres na pré-menopausa e pós-menopausa. Fonte: Adaptado de Freedman; Verma; Clemons (2006).

A enzima aromatase é responsável pela conversão de androgênios em estrogênios, em particular, testosterona em estradiol, androstenediona em estrona e 16-alfa-hidroxitesterona em estriol (DI NARDO; GILARDI, 2013). Esta enzima desempenha um papel direto na biossíntese de estrogênio e acredita-se que ela desempenha um papel importante na progressão do câncer hormônio sensível (DI NARDO; GILARDI, 2013; GEISLER; LONNING, 2005). Portanto, as glândulas supra-renais e a aromatase são peças fundamentais na manutenção de um ambiente

estrogênico na mulher pós-menopáusia. Por este motivo, a inibição da aromatase e consequentemente da síntese de estrogênios, se constitui em estratégia com base racional sólida no tratamento do câncer hormônio sensível em mulheres na pós-menopausa (CLEMONS; GOSS, 2001; FREEDMAN; VERMA; CLEMONS, 2006), todavia até onde investigado, há escassez de estudos sobre os efeitos dos inibidores da aromatase no epitélio vaginal no *status* pré-menopausal e os poucos estudos encontrados, ainda em modelos animais, mostram resultados conflitantes (KUBATKA et al., 2008a; SADLANOVA et al., 2009).

Os inibidores da aromatase podem ser classificados de diferentes formas. Quanto à sua estrutura química e tipo de inibição enzimática, as drogas são classificadas em inibidores propriamente ditos, com estrutura não-esteróide, e inativadores, com estrutura esteróide (FREEDMAN; VERMA; CLEMONS, 2006). Outra classificação possível é quanto à geração, assim, a aminoglutetimida é considerada inibidor da aromatase de primeira geração, e o fadrozol e o formestano, os inibidores de segunda geração; a terceira geração inclui o anastrozol, o letrozol e o vorozol, que são inibidores, e o exemestano, entre os inativadores (Tabela 1). A diferença principal, do ponto de vista químico e farmacológico entre os inibidores e os inativadores, é que estes últimos se ligam de forma definitiva à enzima, enquanto que os inibidores funcionam principalmente como antagonistas competitivos, ligando-se à enzima somente temporariamente (GOSS; STRASSER, 2001; GEISLE et al., 1996).

Tabela 1 - Classificação dos inibidores da aromatase.

	Inibidores (não esteróides)	Inativadores (esteróides)
Primeira geração	Aminoglutetimida	
Segunda geração	Fadrozol	Formestano
Terceira geração	Anastrozol, letrozol e o vorozol	Exemestano

Fonte: Adaptado de Freedman; Verma; Clemons (2006).

O anastrozol é um derivado do benzotriazol, tem ação inibidora sobre a aromatase, bloqueando assim a conversão de testosterona em estradiol e

androstenediona em estrona (Figura 2) caracterizando o principal mecanismo de ação de um inibidor da aromatase (BUZDAR, 2003; KELLY; BUZDAR, 2010; WILKINSON, 2004). Particularmente, a inibição da enzima aromatase ocorre através de uma ligação competitiva ao grupo heme do citocromo P450 da aromatase, diminuindo a biossíntese de estrogênios na periferia do corpo (SANFORD; PLOSKER, 2008).

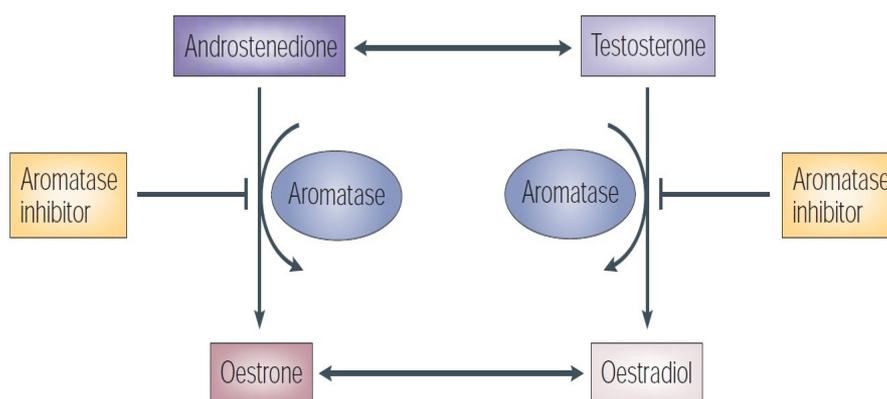


Figura 2 - Mecanismo de ação dos inibidores da aromatase. Fonte: (JOHNSTON; DOWSETT, 2003).

O anastrozol apresenta efeitos significativos para o tratamento do câncer hormônio sensível e devido a isto, atualmente é utilizado como o tratamento de primeira linha para mulheres na pós-menopausa que apresentam Receptor de Estrogênio (RE) positivo, particularmente em casos de câncer de mama hormônio sensíveis localmente avançados ou metastáticos. Além disso, é indicado também para o tratamento inicial do câncer de mama, para sua quimioprevenção e para mulheres pós-menopáusicas que fariam uso do tamoxifeno, principalmente se por tempo prolongado (FABIAN, 2007; GOLDBIRSCH et al., 2009).

O uso de anastrozol por longo período de tempo não demonstrou efeito sobre as dosagens de hormônios esteróides, como cortisol, aldosterona, androstenediona e 17-hidroxiprogesterona, confirmando sua alta seletividade na inibição da aromatase sem interferir nas demais vias da esteroidogênese adrenal (BUZDAR, 2003; HAYNES et al., 2003; KELLY; BUZDAR, 2010) e também não afeta a síntese de gonadotrofinas e esteróides dependentes do eixo hipotalâmico-hipofisário-ovário (BHATNAGAR, 2007; DI NARDO; GILARDI 2013; YUE et al., 1998). Alguns estudos avaliaram qual a dose diária necessária de anastrozol, para promover a inibição da

aromatase e diminuição da síntese de estrogênio e então observaram que a dose diária de 1 mg de anastrozol era a dose mínima capaz de suprimir consistentemente a estrona e estradiol ao limite de detecção por radioimunoensaio (MILANI; JHA; POTTER, 2009; SANFORD; PLOSKER, 2008).

Quando administrado por via oral em jejum, o anastrozol é rapidamente absorvido e quando após as refeições, a taxa de absorção é mais lenta, mas não há qualquer efeito sobre a extensão da absorção. Na dose recomendada de 1 mg, o anastrozol atinge as concentrações plasmáticas máximas dentro de 2 horas após sua administração e após sete dias são obtidos aproximadamente 90 a 95 % de suas concentrações plasmáticas. Menos de 10% de anastrozol é excretado como fármaco inalterado, enquanto que 60% é excretado como metabolitos (BUZDAR, 2003; SANFORD; PLOSKER, 2008).

A metabolização do anastrozol é hepática e ocorre através das reações de N-desalquilação, hidroxilação e glucuronidação, levando a uma meia vida plasmática de 50 horas, indicando que a administração de dose única diária é adequada. Os três principais metabolitos de anastrozol que têm sido observados no plasma e na urina de pacientes humanos são: triazol, hidroxianastrazolglucuronide e anastrozol glucuronide. O triazol é o principal metabolito, porém é inativo e não suprime, assim como os outros dois metabolitos, a atividade da aromatase. A eliminação desses metabolitos ocorre principalmente através da urina (INGLE et al., 2010; KAMDEM et al., 2010).

A avaliação criteriosa da proliferação celular é feita na análise patológica do câncer hormônio sensível, sendo a quantificação da atividade mitótica o método tradicionalmente usado, entretanto, a expressão imunoistoquímica do Ki-67 tem sido largamente utilizada, por tratar-se de um método mais sensível de avaliação da atividade proliferativa (DA SILVA et al., 2009; ELSTON; ELLIS, 1991; FITZGIBBONS et al., 2000; SCOTT et al., 1991). O marcador Ki-67 é uma proteína nuclear, de função desconhecida, expressa em todas as fases do ciclo celular, exceto na fase G₀ (fase de repouso), assim reconhecendo um antígeno nuclear presente em

células em proliferação e ausente em células em repouso (FITZGIBBONS et al., 2000; GERDES, 1990; GERDES et al., 1991; SPYRATOS et al., 2002).

O anastrozol, no momento, é a droga de escolha na terapia endócrina do câncer de mama em mulheres na pós-menopausa, também é indicado para o tratamento inicial do câncer de mama, para sua quimioprevenção em mulheres pós-menopáusicas que fariam uso prolongado do tamoxifeno (FABIAN, 2007; GOLDBIRSCHE et al., 2009). Nery-Aguiar et al. (2016) mostraram que tamoxifeno induziu um aumento significativo na proliferação celular da mucosa vaginal de ratas castradas por meio da expressão da proteína Ki-67. Por outro lado, os efeitos do anastrozol na mama e aparelho genital tem sido avaliado apenas em modelos experimentais de ratas pré-menopáusicas (KUBATKA et al. 2008a; SADLONOVA et al. 2009).

A propósito, o letrozole reduziu significativamente a proliferação celular do epitélio endometrial e vaginal de ratas (KUBATKA et al., 2008b). Todavia, Sadlonova et al. (2009) administraram anastrozol a ratas por 15 semanas e não mostraram atrofia do epitélio endometrial e vaginal. Assim, diante das controvérsias e escassez de estudos dos efeitos do anastrozol no epitélio vaginal de ratas em estro permanente, é que o presente estudo foi desenhado.

2. OBJETIVO

Avaliar a expressão do antígeno Ki-67 no epitélio vaginal de ratas em estro permanente tratadas com anastrozol.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Tipo de estudo e local da realização

A realização dessa pesquisa foi através de um estudo experimental, randomizado e controlado, realizado no Biotério do Núcleo de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal do Piauí (UFPI) e no Laboratório de consultoria Locus – Anatomia, Patologia e Citologia – SP.

3.2. Critérios de inclusão da amostra

Foram utilizadas ratas *Wistar-Hannover* com peso aproximado de 250 gramas, provenientes do biotério central da Universidade Federal do Piauí (UFPI), foi solicitada a quantidade de 6 ratas gestantes, tendo uma estimativa de nascimento de 12 a 15 filhotes de cada rata gestante, estabelecendo uma proporção lógica de 50% relativa ao sexo, estimava-se que entre 36 e 45 filhotes teriam o sexo feminino, estando aptos para experimentação, foi feita esta solicitação mediante um planejamento estatístico usando a fórmula ($n = n + n \times 10\%$). Assumindo a pesquisa com um risco experimental de 10%. O nascimento dos filhotes resultou em um $n = 42$, quantidade suficiente para estabelecer uma margem de segurança para o trabalho que contabilizou 21 ratas para obtenção segura e sustentável para ambos os grupos (controle e experimental).

Após o nascimento, as ratas foram selecionadas baseando-se na distância entre os orifícios anogenitais, atividade realizada mediante treinamento de 6 meses do autor e acompanhamento direto do orientador com vasta experiência de 20 anos usando a metodologia proposta. As ratas até o desmame, com 21 dias de vida permaneceram juntamente com as mães e os ratos foram submetidos a outras pesquisas de acordo com a aprovação do comitê de ética animal. Todas as ratas foram induzidas a estro permanente através da aplicação de injeção subcutânea, na região dorso-cervical, de 1,25 mg de propionato de testosterona diluído em 0,1 ml de óleo de milho no segundo dia de vida.

Durante a realização da pesquisa todas as ratas permaneceram em gaiolas plásticas com uma grade de metal, a uma temperatura ambiental entre 20°C e 24°C e luz artificial de lâmpadas fluorescentes com ciclo claro/escuro de 12 horas. As ratas tiveram livre acesso à água filtrada e a ração para roedores.



Figura 3 - Ratas em gaiolas plásticas com uma grade de metal com acesso livre á água e ração. Fonte: Arquivo pessoal.

Aos 90 dias de vida, as ratas androgenizadas foram selecionadas para pesquisa. Foram consideradas em estro permanente as ratas apresentando oclusão do terço distal da vagina, queratinização do epitélio vaginal, principal característica do estro permanente e também a presença de ovários policísticos, constatados por ocasião da autópsia (BARRACLOUGH, 1961).

3.3. Critérios de não-inclusão da amostra

Foram utilizados como critérios para a exclusão de animais a presença de qualquer sinal de doença detectada ao exame físico dos animais durante a seleção e durante a pesquisa e a ausência de sinais do estado de estro permanente aos 90 dias de vida.

3.4. Cálculo Amostral

Inicialmente foi realizado o cálculo de amostragem, utilizando-se o software Bioestat 5.3®, para a realização de um teste *t* de *Student* para duas amostras independentes com intervalo de confiança de 95% e nível de alfa de 0,05. Para isto, foram usados dados de um trabalho da literatura que utilizou metodologia similar à empregada neste estudo (KUBATKA et al., 2008a). O resultado deste cálculo determinou uma amostra mínima de 18 (dezoito) animais em cada grupo de estudo.

3.5. Divisão dos Grupos

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: grupo I (controle, n=21) e grupo II (experimental, n=21). As ratas do grupo I (controle) receberam 0,1ml/animal/dia de propilenoglicol (veículo) e as ratas do grupo II (experimental) receberam 0,5 mg/Kg de anastrozol diluído em 0,1 ml de propilenoglicol (KUBATKA et al., 2008a). O veículo e o anastrozol foram administrados continuamente durante 28 dias, sempre no mesmo período de horário do dia (entre 15-16 horas da tarde), usando-se uma sonda de gavagem apropriada para administração via oral.

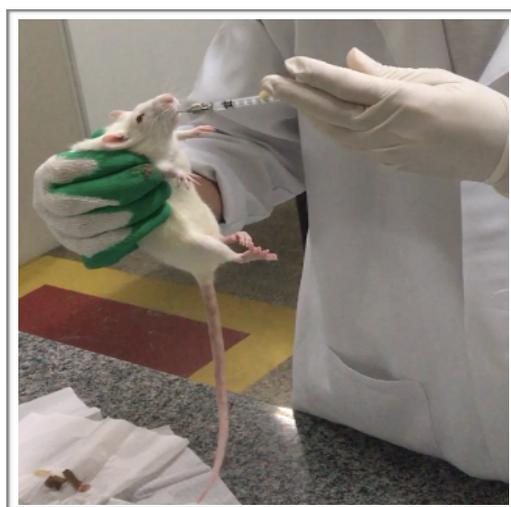


Figura 4 - Procedimento de gavagem com sonda metálica. Fonte: Arquivo pessoal.

No 29º dia, as ratas dos dois grupos foram submetidas a eutanásia por dose excessiva de anestésicos com Cetamina na dose de 300 mg/Kg associada a Midazolam 15 mg/Kg, por via intraperitoneal. Em seguida, as ratas foram imobilizadas em prancha de cortiça para remoção da vagina, o tecido foi fixado em formol tamponado (pH 7,5 aproximadamente). Depois de 24h de fixação, o material foi submetido a análise imunoistoquímica.

3.6.1. Método Histológico

Após retirada a vagina foi fixada em formol tamponado (pH 7,5 aproximadamente). Depois de 24h de fixação, o material foi desidratado em álcool etílico com concentrações crescentes; posteriormente diafinizadas em Xilol e impregnadas pela parafina líquida em estufa regulada à temperatura de 59°C, segundo o método de Masson (1956), seguido pela confecção final dos blocos, o processamento do material foi realizado automaticamente utilizando-se o *Histotécnico Oma*® (Modelo DM-20, São Paulo, Brasil).

3.6.2. Método Imunoistoquímico

Realizada análise imunoistoquímica no Laboratório Locus (Centro de Diagnóstico – Anatomia Patológica e Citologia) em São Paulo, Brasil. As secções histológicas para produção das lâminas foram realizadas com o uso do micrótomo tipo *Minot* ajustado para 5 µm de espessura. O preparo das lâminas e as respectivas reações imunoistoquímicas foram realizadas em um mesmo momento, nas mesmas condições. Os cortes obtidos foram colocados em lâminas de vidro previamente untadas com albumina de MAYER e levados para estufa regulada à 37°C, para secagem. Após 2 horas os cortes foram corados pela técnica estreptavidina-peroxidase com anticorpo (MIB-5) para posterior análise em Microscópio de Luz.

Inicialmente ocorreu a desparafinização em xilol por 5 minutos, seguida de desidratação por álcool etílico absoluto e lavagem em solução salina tamponada (pH 7.4) também por 5 minutos. Posteriormente foi realizada a imunoistoquímica, com a recuperação antigênica, onde as lâminas foram tratadas com peróxido de hidrogênio a 3% diluído em solução tamponada, por 5 minutos para bloquear os peróxidos endógenos. Após a recuperação antigênica, as amostras foram incubadas com o anticorpo monoclonal anti-Ki-67 (MIB-5/DAKO/REF.: M7240) na diluição de 1:100 por 16 horas, durante toda a noite, em um refrigerador a aproximadamente 4°C.

A seguir, as amostras foram lavadas com solução salina tamponada e incubada por 45 minutos com o sistema de detecção *Novo Link Polymer*. Para ler as reações, todas as lâminas foram tratadas com soluções de 3-3-diaminobenzidina tetrahidroclorato a uma concentração de 1mg/ml de solução tamponada de Tris e solução de peróxido de hidrogênio por 5 minutos, em seguida foram contra-coradas com hematoxilina de Harris por 5 minutos, seguido de desidratação em banhos de álcool etílico e xilol. Após o procedimento, as lâminas foram examinadas para quantificação dos resultados.

3.6.3. Método Quantitativo

Foram consideradas positivas células com o núcleo corado em marrom, mesmo que essa coloração estivesse tênue, a contagem foi realizada manualmente por dois observadores cegos em relação aos grupos estudados e as células positivas e negativas foram marcadas separadamente evitando-se a contagem das mesmas células mais de uma vez.

O procedimento de identificação e contagem das células foi realizado no laboratório de pesquisa localizado na Coordenação da Clínica Ginecológica do Hospital Getúlio Vargas /UFPI, onde foi utilizado um sistema computadorizado constituído por um Microscópio de Luz marca Eclipse E-400 (Tóquio, Japão), acoplado a uma videocâmera colorida (Samsung Digital Câmera SCC-131, Seul,

Coréia do Sul) com captura de imagem em microcomputador Pentium IV, com disco rígido de 80 Gigabytes, processador de 3.0GHz, 1024 de memória RAM e placa gráfica digitalizadora, em ambiente Windows XP. Para a contagem de células positivas e negativas para a expressão do Ki-67 foi realizado aumento de 400x. Foram contadas no mínimo 500 células do epitélio vaginal, em cada lâmina, em campos aleatórios, iniciando na área de maior concentração de núcleos com expressão do Ki-67, usando-se o Software de Processamento e Análise de imagem-Imagelab® (SOFTIUM Informática LTDA, São Paulo, Brasil).

3.6.4. Método Estatístico

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, utilizando o teste não paramétrico Mann Whitney. Os dados foram tabulados pelo programa IBM SPSS Statistics V21, sendo o nível de significância estabelecido em $p < 0,05$.

3.7. Aspectos Legais e Éticos

O protocolo deste estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPI (registro 397/17), conforme anexo A. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios básicos e éticos para pesquisa envolvendo o uso de animais, segundo o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1999).

Sob microscopia de luz, a concentração de células expressando o antígeno Ki-67 foi maior no grupo controle em comparação com o grupo experimental (Figura 5). A média dos núcleos corados pelo Ki-67 no epitélio vaginal de ratas em estro permanente foi $68,64 \pm 2,64$ (média \pm erro padrão [EP] da média) e $30,46 \pm 2,00$, nos grupos I (controle) e II (experimental), respectivamente, ($p < 0,003$) conforme (Tabela 2).

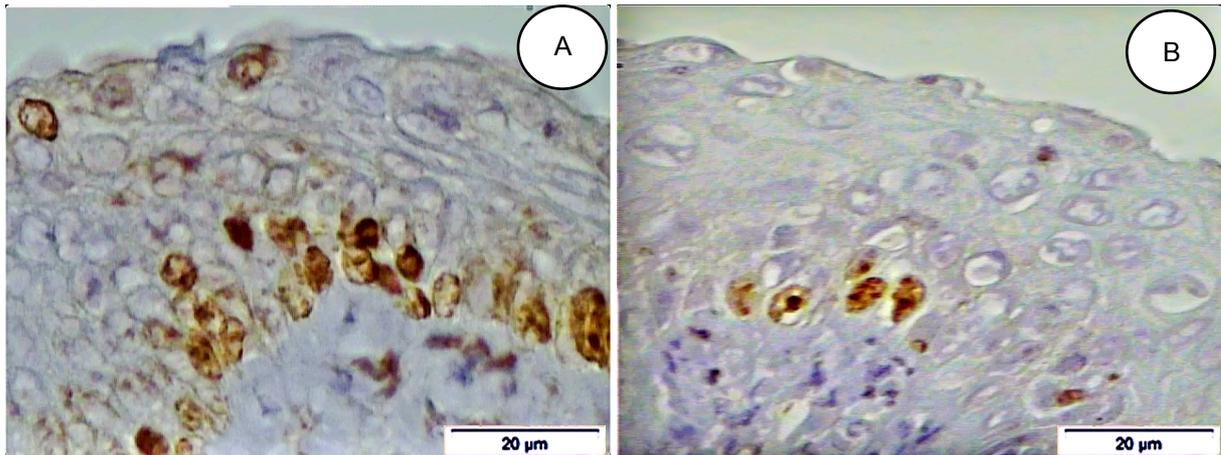


Figura 5 - Fotomicrografia de seção histológica do epitélio vaginal de ratas androgenizadas mostrando maior concentração de núcleos corados em marrom com o anticorpo anti-Ki-67 MIB-5 no grupo controle (**A**), comparando com uma menor concentração de núcleos corados em marrom com anticorpo anti-Ki-67 MIB-5 no grupo experimental (**B**) tratadas com anastrozol 0,5 mg/kg (ampliação original x400). Fonte: Arquivo Pessoal.

Tabela 2 - Porcentagem média de núcleos corados com anti-Ki-67 (MIB 5) no epitélio vaginal de ratas em estro permanente tratadas com anastrozol.

	% de núcleos positivos				
	média	EP	mediana	mínimo	máximo
Grupo controle	68,64	2,64	71,76	38,98	81,21
Grupo experimental	30,46*	2,00	28,71	17,47	55,85

*P < 0,003

Os resultados encontram-se melhor ilustrados no boxplot (Figura 6), mostra claramente a diferença entre a porcentagem média de Ki-67 do grupo controle e experimental (anastrozol), obtendo no grupo I valores máximos de 81,21 e um valor mínimo de 49,11 em comparação com grupo II com uma observação máxima de 40,00 e um mínimo de 17,47.

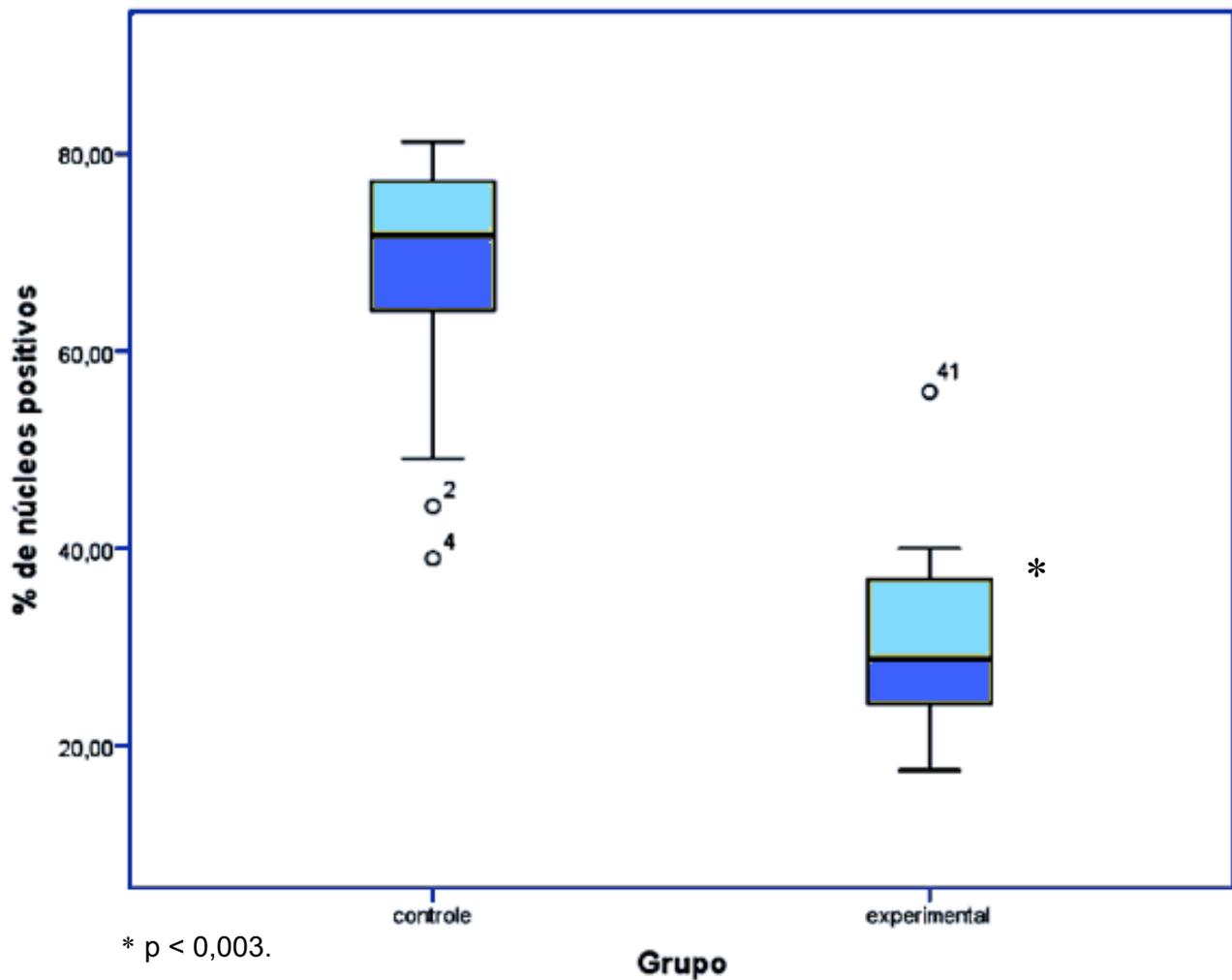


Figura 6 - Boxplot da porcentagem de núcleos corados segundo o grupo.

O estudo dos efeitos de drogas utilizadas no tratamento do câncer de mama hormônio sensível no tecido humano é limitado por razões de natureza ética, daí a busca de modelos experimentais, e isto nos levou a realizar o estudo dos efeitos do anastrozol, inibidor da síntese de estrogênios, no epitélio vaginal de ratas sob estimulação estrogênica constante ou em estro permanente. No presente estudo, as ratas em estro permanente (controle) mostraram uma maior concentração de núcleos corados com Ki-67 no epitélio vaginal em comparação com o grupo tratado com anastrozol. A média de núcleos corados com Ki-67 foi significativamente maior no grupo controle do que no grupo experimental.

A rata em estro permanente é um modelo animal mimetizando síndrome dos ovários policísticos que se caracteriza pela produção estrogênica constante, apresentando um epitélio vaginal intensamente proliferado com a presença de cornificação vaginal, característica que define este modelo experimental (BARRACLOUGH et al., 1961). O epitélio vaginal destes animais sob constante ação estrogênica mimetizando síndrome dos ovários policísticos, fornece a condição necessária para o estudo de drogas moduladoras seletivas dos receptores de estrogênio (SERMs), como o tamoxifeno (NERY-AGUIAR et al., 2016) ou principalmente inibidoras da síntese dos estrogênios, como os inibidores da aromatase (DE SOUSA et al., 2015; GONTIJO et al., 2010; RODRIGUES-JÚNIOR et al., 2012), uma vez que Kubatka et al. (2008b) mostraram um alto efeito supressor do tumor com letrozol no modelo pré-menopausa de carcinogênese mamária em ratas.

No presente estudo, o anastrozol foi administrado por via oral por meio de gavagem que apesar de ser mais laboriosa é similar a via comumente usada pelas mulheres. Na pós-menopausa, o anastrozol é geralmente usado por mulheres a uma dose de 1 mg/dia, para tratamento de câncer de mama, contudo, diferenças especialmente na absorção e metabolismo entre humanos e animais, pois as ratas tem um metabolismo mais acelerado, torna difícil estabelecer uma equivalência entre as doses usadas por mulheres e ratas (BARROS-OLIVEIRA et al., 2017), levando em consideração estas características, a administração por gavagem permitiu administrar aos animais uma dose da medicação similar a utilizada por

humanos, com base em diversas concentrações utilizadas nos diferentes estudos (DOS SANTOS AR et al., 2009).

Neste estudo, usamos uma dose de 0,5 mg/kg por dia e esta dose de anastrozol foi baseada em estudos de Kubatka et al. (2008a) e Sadlonova et al. (2009), esses autores observaram que uma dose administrada por via oral de 0,5 mg/kg desse fármaco em rata é equivalente a uma dose clínica diária de 1 mg usado por mulheres pós-menopáusicas com câncer de mama. Alguns estudos avaliaram a proliferação celular do epitélio mamário, uterino e vaginal de ratas pela expressão do antígeno Ki-67. Gerdes et al. (1983) encontraram um anticorpo Ki-67 que reconhecia um antígeno nuclear presente nas células em proliferação e ausente nas células em repouso, sendo assim ideal para avaliação da atividade proliferativa celular.

O anastrozol é utilizado em mulheres pós-menopáusicas com câncer de mama hormônio sensível, no entanto, alguns autores mostraram que os inibidores da aromatase, como o exemestano, induziram carcinogênese mamária na pré-menopausa em ratas fêmeas (KUBATKA et al., 2008a). Por outro lado, Nery-Aguiar et al. (2016), utilizando tamoxifeno em ratas castradas, mimetizando mulheres na pós-menopausa, promoveu a proliferação do epitélio vaginal. Por sua vez, Sousa-Lages et al. (2018) não apresentaram alteração no epitélio vaginal de ratas castradas com o uso de piolparina. Contudo, não é conhecido os efeitos do anastrozol administrado via oral por gavagem, diferente dos outros estudos, que usaram os inibidores da aromatase por via oral na dieta.

Todavia, existem poucos estudos e com resultados controversos sobre os inibidores da aromatase, os medicamentos mais utilizados na terapia endócrina do câncer de mama em mulheres na pós-menopausa. Kubatka et al. (2008b) analisaram os efeitos preventivos do letrozol no modelo de carcinogênese mamária na pré-menopausa, o letrozol é um inibidor da aromatase de 3ª geração assim como o anastrozol testado no presente estudo. O letrozol foi administrado em duas concentrações - 1 mg/1 kg e 10 mg/1 kg no alimento (ração) oferecido, o fármaco estudado suprimiu a incidência de câncer de glândula mamária em 93% ($P < 0,00002$) no grupo 1 mg/1 kg em comparação com animais controle. No entanto, a

supressão total da carcinogênese mamária somente foi observada no grupo 10 mg/1 kg. Os animais que receberam letrozol em comparação ao grupo controle, foi encontrada atrofia uterina e vaginal, também concentrações aumentadas de triacilgliceróis plasmáticos ($P < 0,0001$) e um aumento no ganho de peso corporal e ingestão de alimentos em comparação com o grupo controle ($P < 0,0001$).

Em contraste com esses resultados, em outros estudos, Kubatka et al. (2008a), analisaram os efeitos quimiopreventivos do anastrozol no modelo de carcinogênese mamária pré-menopausa induzida por N-metil-N-nitrosourea em ratas. O anastrozol foi administrado na ração dos animais em duas concentrações: 0,05 mg/kg e 0,5 mg/kg. Conforme o estudo, no grupo 0,5 mg/kg, o anastrozol suprimiu a incidência tumoral em 40% ($p < 0,05$) e a frequência tumoral em 57% ($p < 0,01$), bem como prolongou o período de latência em 10 dias ($p = 0,084$) em comparação com o grupo de animais controle. Todavia, os efeitos do anastrozol sobre o sistema genital (útero e vagina) em ratas não foram alterados neste estudo.

Por sua vez, foi também avaliado o exemestano, um inativador da aromatase de terceira geração, com o objetivo de analisar os efeitos preventivos no modelo de carcinogênese mamária pré-menopausa induzida por N-metil-N-nitrosourea em ratas. O exemestano foi administrado em duas concentrações na ração - 1 mg/1 kg e 10 mg/1 kg. No grupo que recebeu maior concentração do fármaco, os triacilgliceróis foram reduzidos em 9% ($P = 0,032$), o colesterol total em 19,5% ($P = 0,0002$) e o colesterol LDL e HDL em 41% ($P < 0,0001$), ou 21,5% ($P = 0,0002$), respectivamente. Porém, no exame histopatológico do útero e da vagina, o estudo não revelou alterações em animais tratados com exemestano, o que aponta para os efeitos não antiestrogênicos do fármaco no sistema genital de ratas, contudo, relatam os autores que é possível que o efeito quimiopreventivo do exemestano na carcinogênese mamária de ratas dependa da dose e / ou modo de administração (KUBATKA et al. 2008c).

Sadlonova et al. (2009) também analisaram o efeito do anastrozol na prevenção da carcinogênese mamária pré-menopausa induzida por N-metil-N-nitrosourea em ratas *Sprague-Dawley*, com o intuito de avaliar os os efeitos

colaterais. O Grupo 1 - o grupo controle havia tomado alimentos sem anastrozol, os grupos 2 e 3 com anastrozol administrado na ração em várias concentrações - 0,05 mg/1 kg de alimento e 0,5 mg/1 kg de alimento. Os animais que receberam anastrozol em comparação com os animais não tratados, não foram encontradas alterações macroscópicas do útero e da vagina, inclusive os valores de peso dos genitais internos permaneceram sem alterações significantes relativas ao grupo controle e o exame histológico não mostrou alterações atróficas no endométrio do útero e no epitélio da vagina.

De acordo com os estudos citados, os medicamentos foram administrados na ração animal e o letrozol promoveu atrofia uterina e vaginal, porém estes autores não encontraram nenhuma alteração vaginal na administração do exemestano e do anastrozol na ração animal. Por outro lado, a técnica de administração da medicação a ratas por gavagem, recentemente utilizada por Barros - Oliveira et al. (2017), mostrou uma expressão significativamente reduzida da proliferação celular avaliada pela expressão da proteína Ki-67 no epitélio mamário de ratas em estro permanente, portanto resultados similares ao do presente estudo em relação ao epitélio vaginal.

A propósito, os resultados do presente estudo mostraram que o tratamento com anastrozol na dose de 0,5 mg/Kg durante 28 dias, quando administrado por gavagem com sonda metálica, assegura uma dose adequada da medicação ao reduzir significativamente a expressão média do Ki-67 no epitélio vaginal de ratas em estro permanente. Estes achados podem ser justificados pelos efeitos inibitórios do anastrozol sobre a produção estrogênica no epitélio vaginal de ratas (BUZDAR, 2003; HAYNES et al., 2003; KELLY;BUZDAR 2010).

A extrapolação destes resultados para seres humanos apresenta limitações, no entanto o estudo contribuiu para compreensão da biologia e um possível desenvolvimento de estratégias terapêuticas viáveis para distúrbios urogenitais e cânceres hormônios sensíveis em ratas sob estimulação estrogênica, mimetizando mulheres pré-menopáusicas. Outrossim, novos estudos sobre os efeitos do anastrozol na proliferação celular do epitélio vaginal serão importantes para

consolidação científica dos resultados obtidos nesse estudo, avançando com pesquisas sobre os efeitos dos inibidores da aromatase em mama e aparelho urogenital de modelos experimentais na pré-menopausa e futuramente em humanos.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou uma redução significativa da expressão do antígeno Ki-67 no epitélio vaginal de ratas em estro permanente tratadas com anastrozol na dose 0,5 mg/Kg durante 28 dias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRACLOUGH, C.A. Production of anovulatory, steriler rats by single injections of testosterone propionate. **Endocrinology**. v.68, p.62-67, 1961.

BARROS-OLIVEIRA, M. d. C. , et al. Ki-67 antigen expression in the mammary epithelium of female rats in persistent estrus treated with anastrozole. **Gynecol Endocrinoly**, Early Online: p. 1-4. 2017.

BHATNAGAR, A.S. The discovery and mechanism of action of letrozole. **Breast Cancer Res Treat**. v.105, p.7–17, 2007.

BUZDAR, A.U. Pharmacology and pharmacokinetics of the newer generation aromatase inhibitors. **Clin Cancer Res**. v.9, n.1-2, p.468-472, 2003.

CLEMONS, M.; GOSS, P. Estrogen and the risk of breast cancer. **N Engl J Med** v. 344, p. 276-285, 2001.

DA SILVA, B.B. et al. Morphologic and morphometric study of the breast parenchyma of rats in persistent estrus treated with tamoxifen and conjugated estrogens. **Clin Exp Obstet Gynecol**. v.28, n.1, p.60-62, 2001.

DA SILVA, B.B. et al. Morphological and morphometric analysis of the adrenal cortex of androgenized female rats. **Gynecol Obstet Invest**. v.64, n.1, p.44-48, 2007.

DA SILVA, B.B. et al. Evolution of Ki-67 antigen expression. In the zona reticularis os the adrenal cortex off emale rats in persistente estrus. **Human Reproduction**. v. 24, n.3, p. 705-709, 2009.

DE SOUSA, G.V. et al. Ki-67 antigen expression in the mammary epithelium of female rats in persistent estrus treated with raloxifene. **European Journal of Gynaecological Oncology**, v. 36, p. 694-697, 2015.

DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL, Colégio Brasileiro. COBEA. **Legislação e ética**, 1999.

DI NARDO, G.; GILARDI, G. Human aromatase: perspectives in biochemistry and biotechnology. **Biotechnol Appl Biochem**. v.60, n.1, p.92-101, 2013.

DOS SANTOS AR, LOPES-COSTA PV, DA SILVA BB. Vascular endothelial growth factor expression in the urethral epithelium of castrated adult female rats treated with tamoxifen. **Gynecol Endocrinol**: p. 282–6. 2009.

DOS SANTOS A.R. et al. Effect of tamoxifen on extracellular signal-regulated kinases in the urethra of castrated female rats. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology** v.164,n.1,p.102–4, 2012.

DOWSETT, M.; HAYNES, B.P. Hormonal effects of aromatase inhibitors: focus on premenopausal effects and interaction with tamoxifen. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v.86, n.3-5, p.255–263, 2003.

ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. 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**. v.19, n.5, p.403-10, 1991.

FABIAN, C.J. The what, why and how of aromatase inhibitors: hormonal agents for treatment and prevention of breast cancer. **Int J Clin Pract**. v.61, n.12 p.2051–2063, 2007.

FITZGIBBONS, P.L. et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. **Arch Pathol Lab Med**. v.124, n.7, p. 966-978, 2000.

FREEDMAN, O.C.; VERMA, S.; CLEMONS, M.J. Pre-menopausal breast cancer and aromatase inhibitors: Treating a new generation of women. **Breast Cancer Res Treat**. v.99, n.3, p.241-247, 2006.

GEISLER, J. et al. Influence of anastrozole (Arimidex), a selective, non-steroidal aromatase inhibitor, on in vivo aromatisation and plasma oestrogen levels in postmenopausal women with breast cancer. **Br J Cancer**.v.74, n.8, p.1286-1291, 1996.

GEISLER, J.; LONNING, P.E. Aromatase inhibition: translation into a successful therapeutic approach. **Clin Cancer Res**. v.11, n.8, p. 2809–2821, 2005.

GERDES, J. et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. **Am J Pathol**. v.138, n.4, p.867-873, 1991.

GERDES, J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. **Semin Cancer Biol**. v.1, n.3, p.199-206, 1990.

GOBBI, S. et al. Nonsteroidal aromatase inhibitors for the treatment of breast cancer: an update. **Anticancer Agents Med Chem**. v.14, n.1, p.54-65, 2014.

GOLDHIRSCH, A. et al. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. **Ann Oncol**. v.20, n.8, p.1319–1329, 2009.

GONTIJO, R.J.A. et al. Evaluation of Arterial Blood Pressure and Renal Sodium Handling in a Model of Female Rats in Persistent Estrus. **Clinical and Experimental Hypertension**. v. 32, p. 385-389, 2010.

GOSS, P.E.; STRASSER, K. Aromatase inhibitors in the treatment and prevention of breast cancer. **J Clin Oncol**, v, 19, n.3, p.881-894, 2001.

HAYNES BP et al. The pharmacology of letrozole. **J Steroid Biochem Mol Biol**. 87: 35-45, 2003.

INGLE, J.N. et al. Variation in anastrozole metabolism and pharmacodynamics in women with early breast cancer. **Cancer Res**. v.70, n.8, p.3278-3286, 2010.

JOHNSTON, S.R.D.; DOWSETT, M. Aromatase inhibitors for breast cancer: lessons from the laboratory. **Nature reviews cancer**. v.3, p.821-831, 2003.

KAMDEM, L.K. et al. In vitro and in vivo oxidative metabolism and glucuronidation of anastrozole. *Br J Clin Pharmacol*. v.70, n.6, p.854-869,2010.

KELLY, C.M.; BUZDAR, A.U. Anastrozole. **Expert Opin Drug Saf**. v.9, n.6, p. 995-1003, 2010.

KUBATKA, P. et al. Chemopreventive Effects of Anastrozole in a Premenopausal Breast Cancer Model. **Anticancer Res**. v.28, n.5, p. 2819-23, 2008a.

KUBATKA, P. et al. Preventive effects of letrozole in the model of premenopausal mammary carcinogenesis. **Neoplasma**, v. 55, n. 1, p. 42, 2008b.

KUBATKA, P. et al. Neoplastic effects of exemestane in premenopausal breast cancer model. **Neoplasma**, v. 55, n. 6, p. 538, 2008c.

LAKE, D.E.; HUDIS, C. Aromatase Inhibitors in Breast Cancer: An Update. **Cancer Control**. v.9, n.6, 2002.

MILANI, M.; JHA, G.; POTTER, D.A. Anastrozole use in early stage breast cancer of postmenopausal women. **Clin Med Ther**. v.31, n.1, p.141-156, 2009.

MORAN, C. et al. Adreno cortical hyperrespon in veness to corticotropin in polycystic ovarys syndrome patients with adrenal androgen excesso. **Fertil Steril**. v. 81, n.1, p.126-131, 2004.

NERY-AGUIAR A.R. et al. Analysis of the Ki-67 index in the vaginal epithelium of castrated rats treated with tamoxifen. **Clinics**; v.71, n.2, p.:90-93, 2016.

PAN, K.; CHLEBOWSKI, R.T. Adjuvant endocrine therapy of perimenopausal and recently postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer. **Clin Breast Cancer**. v.14, n.3, p.147–153, 2014.

RODRIGUES-JUNIOR, D.M. et al. Effects of tamoxifen and raloxifene on body and uterine weights of rats in persistent estrus. **Clin Exp Obstet Gynecol**. v.39, n.3, p. 362-364, 2012.

SADLONOVA, V. et al. Side effects of anastrozole in the experimental premenopausal mammary carcinogenesis. **Neoplasma**, v. 56, n. 2, p. 124, 2009.

SANFORD, M.; PLOSKER, G.L. Anastrozole: a review of its use in postmenopausal women with early-stage breast cancer. **Drugs**. v. 68, n.9, p.1319-1940, 2008.

SCOTT, R.J. et al. A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. **J Pathol.** v.165, n.2, p.173-178, 1991.

SOUSA-LAGES, C. A. et al. Effect of a gel containing pilocarpine on vaginal atrophy in castrated rats. **CLINICS**, v. 71, p. 291-294, 2016.

SPYRATOS, F. et al. Prognostic value of uPA, PAI-1 and PAI-2 mRNA expression in primary breast cancer. **Anticancer Res.** v.22, n.5, p. 2997-3003, 2002.

WILKINSON, K. Anastrozole (Arimidex). **Clin J Oncol Nurs.** v.8, n.1, p.87-88, 2004.

YUE, Wei et al. In situ aromatization enhances breast tumor estradiol levels and cellular proliferation. **Cancer research**, v. 58, n. 5, p. 927-932, 1998.

ANEXO A: parecer de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**



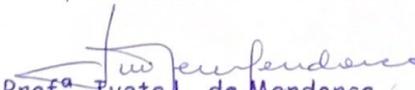
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "*Expressão do antígeno Ki-67 no epitélio vaginal de ratas em estro permanente tratadas com anastrozol*", registrada nº 397/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. BENEDITO BORGES DA SILVA do Departamento de Ginecologia/CCS/UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **12/12/2017**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Janeiro/ 2018 à Outubro/ 2018
Espécie/Linhagem/raça	Ratos heterogênicos/wistar
Nº de Animais	05
Peso/ Idade	≥200g/ ≥3 meses
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFPI.

Teresina, 12 de Dezembro de 2017.


Prof^a. Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora

ANEXO B: comprovante de submissão do Artigo Científico da Dissertação como requisito para defesa, na revista Scientific Reports (Qualis A1, fator de impacto: 4.5).



Diego Cipriano Chagas <diegociprianoc@gmail.com>

Fwd: Receipt of Manuscript SREP-19-29532

Benedito Borges da Silva <beneditoborges@globo.com>
Para: diegociprianoc@gmail.com

17 de julho de 2019 14:00

----- Mensagem original -----

Assunto: Receipt of Manuscript SREP-19-29532

Data: 17/07/2019 13:58

De: scirep.admin@nature.com

Para: beneditoborges@globo.com

Dear Prof da Silva,

Thank you for uploading your manuscript files to Scientific Reports. We have successfully received your files and your manuscript has been assigned the tracking number: SREP-19-29532. Please quote this tracking number in the subject line of any correspondence.

Your manuscript is now at our initial Quality Check stage where we check for adherence to the journal's submission guidelines, including any relevant editorial and publishing policies, prior to approval of your submission. This is to ensure that all information required by the Editorial Board Member and for the peer review process is present. If there are any points that need to be addressed prior to submission you will receive a detailed email shortly. Once your manuscript has been approved for submission, you will receive email confirmation.

Many thanks,
Manuscript Administration
Scientific Reports, a Nature Research journal
4 Crinan Street
London N1 9XW
E-mail: SciRep.admin@nature.com

Springer Nature offers an open access support service to make it easier for our authors to discover and apply for APC funding. For further information please visit <http://www.springernature.com/gp/open-research/funding>

This email has been sent through the Springer Nature Tracking System NY-610A-NPG&MTS

Confidentiality Statement:

This e-mail is confidential and subject to copyright. Any unauthorised use or disclosure of its contents is prohibited. If you have received this email in error please notify our Manuscript Tracking System Helpdesk team at <http://platformsupport.nature.com>.

Details of the confidentiality and pre-publicity policy may be found here <http://www.nature.com/authors/policies/confidentiality.html>

[Privacy Policy](#) | [Update Profile](#)

Prof. Dr. Benedito Borges da Silva