



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS E SAÚDE**



MARIA DA CONCEIÇÃO BARROS OLIVEIRA

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

TERESINA

2016

MARIA DA CONCEIÇÃO BARROS OLIVEIRA

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

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

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

Linha de Pesquisa: Investigação para Diagnóstico em Saúde

Orientador: Prof. Dr. Benedito Borges da Silva

TERESINA

2016

MARIA DA CONCEIÇÃO BARROS OLIVEIRA

**EXPRESSÃO DO ANTÍGENO KI-67 NO EPITÉLIO MAMÁRIO 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: Investigação para Diagnóstico em Saúde

Aprovada em 03 de Agosto de 2016

BANCA EXAMINADORA:

Presidente: Prof. Dr. Benedito Borges da Silva

1º Examinador: Prof. Dr. Airton Mendes Conde Júnior

2º examinador: Prof^a. Dr^a. Janaína de Moraes Silva

Suplente: Prof. Dr. Pedro Vítor Lopes Costa

DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente a **Deus**, por estar sempre guiando meus caminhos, me fortalecendo diante de todos os obstáculos e por ter permitido mais essa conquista na minha vida.

Aos meus pais **Mauro Oliveira e Ancelisinda Oliveira**, e minha irmã **Jaqueline Oliveira**, por todo amor, carinho, apoio e incentivos durante esta jornada.

Ao meu noivo **Danylo Rafael**, por sempre estar presente na minha vida, pelo amor, carinho, paciência, apoio, companheirismo e incentivo durante todas as etapas desta conquista.

DEDICATÓRIA ESPECIAL

Ao querido **Prof. Dr. Benedito Borges da Silva**, mestre na verdadeira acepção da palavra, marco em minha formação como pesquisadora, me ensinou a importância da pesquisa e seus benefícios para a sociedade, pela sua brilhante orientação deste trabalho, por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa, pelo incentivo, amizade e confiança, a minha eterna gratidão.

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 **Victor Hugo, Danylo, Rodrigo e George e demais alunos do mestrado**, agradeço não apenas pela ajuda e apoio no desenvolvimento deste trabalho, mas também pela amizade, união, força e superação desde o início desta caminhada.

À **Danielle Benigno**, agradeço pelo carinho, apoio, companheirismo e respeito. Houve meses de angústias, cansaço físico e psicológico, mas juntas lutamos e enfrentamos todos os obstáculos das nossas pesquisas.

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

À **Diretora do Centro de Ciências e Saúde** pelo empenho no funcionamento das pós-graduações do CCS.

Aos **professores do Mestrado** pelos ricos ensinamentos e preciosas contribuições, em particular aos professores doutores Pedro Vitor, Alesse, Airton, Nadir e a todos os outros pelo apoio.

À secretária do Mestrado **Edilene** pelo cuidado, apoio, carinho e amizade.

Ao **Professor Doutor Paulo Michel**, Coordenador do Mestrado em Ciências Farmacêuticas pela autorização para utilização do Núcleo de Tecnologia Farmacêutica (NTI) e a todos os funcionários do NTI que prestam serviços no da UFPI, em especial aos senhores **Ari e Sena**, constante auxílio.

Aos **funcionários da Ginecologia e Mastologia do Hospital Getúlio Vargas** em particular a Senhoras Efigênia, Toinha, Socorro, Eugênia e todos os outros.

RESUMO

Introdução: Os inibidores da aromatase, em particular o anastrozol, inibem a aromatase reduzindo os níveis de estrogênio e a proliferação celular no epitélio mamário e, portanto, tem sido utilizado de forma eficaz no tratamento de cânceres estrogênio-dependentes na pós-menopausa e vem sendo propostos também na quimioprevenção, todavia o estudo dos efeitos diretos na mama humana encontra restrições éticas e um modelo animal que apresenta produção constante de estrogênios e ideal para o estudo do efeito de drogas que bloqueiam a síntese estrogênica é o de ratas em estro permanente. **Objetivo:** Avaliar a expressão do antígeno Ki-67 no epitélio mamário de ratas em estro permanente tratadas com anastrozol. **Materiais e Métodos:** Vinte e oito ratas *Wistar-Hannover* em estro permanente induzido por 1,25 mg/dia de propionato de testosterona e aos 90 dias de vida foram divididas ao acaso em dois grupos, controle e experimental, com 14 animais cada. Os animais do grupo controle receberam somente o veículo (propilenoglicol) e os do grupo experimental receberam 0,125 mg/dia de anastrozol por gavagem durante 28 dias. No 29º dia todos os animais foram sacrificados e extirpado o primeiro par mamário abdômino-inguinal e fixado em formol tamponado a 10% para avaliar a expressão do antígeno Ki-67 por análise imunoistoquímica. Os dados foram analisados estatisticamente usando o *test t de Student* ($p < 0,05$). **Resultados:** A porcentagem média de núcleos corados por Ki-67 por 500 células no epitélio mamário foi $76,97 \pm 0,76$ e $14,44 \pm 2,02$ nos grupos controle e experimental, respectivamente ($p < 0,0001$). **Conclusão:** O anastrozol reduziu significativamente a expressão do antígeno Ki-67 no epitélio mamário de ratas em estro permanente.

Palavras chaves: Rata, Estro permanente, Anastrozol, inibidor da aromatase, Ki-67.

ABSTRACT

Introduction: Aromatase inhibitors, in particular anastrozole, inhibit aromatase reducing estrogen levels and cell proliferation in breast epithelium and, therefore, has been used effectively in the treatment of estrogen-dependent cancers in postmenopausal women and is also being proposed for chemoprevention, however the study of direct effects on human breast has ethical restrictions and an animal model which shows continuous production of estrogens and ideal for studying the effect of drugs which block estrogen synthesis is the female rat in persistent estrus.

Objectives: To evaluate the Ki-67 antigen expression in mammary epithelium of rats in persistent estrus treated with anastrozole. **Materials and Methods:** Twenty-eight Wistar-Hanover female rats in persistent estrus induced by 1.25 mg of testosterone propionate subcutaneous in the second day of life were randomly divided into two groups, control and experimental, with 14 animals each. The animals of control group received only the vehicle (propyleneglycol) and the animals of group experimental received 0,125 mg / day of anastrozole by gavage during 28 days. At 29^o day, all animals were sacrificed and excised the first inguinal mammary pair and fixed in 10% buffered formalin to evaluate the expression of Ki-67 antigen by immunohistochemical analysis. Data were analyzed statistically using the Student's t test ($p < 0.05$). **Results:** The mean percentage of Ki-67-stained nuclei per 500 cells in the mammary epithelium was 76.97 ± 0.76 and 14.44 ± 2.02 , in the control and experimental groups, respectively ($P < 0.0001$). **Conclusions:** Anastrozole treatment significantly reduced Ki-67 antigen expression in mammary epithelium of rats in persistent estrus.

Key words: Rat, persistent estrus, anastrozole, aromatase inhibitor, Ki-67.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Representação esquemática da produção de estrogênios em mulheres na pré-menopausa e pós-menopausa.....	25
Figura 2-	Estrutura química do composto de terceira geração anastrozol.....	28
Figura 3-	Mecanismo de ação dos inibidores da aromatase.....	29
Figura 4-	Ratas utilizadas em gaiolas com acesso livre á água e ração.....	35
Figura 5-	Sonda metálica.....	37
Figura 6-	Administração do medicamento.....	37
Figura 7-	Sistema computadorizado utilizado para contagem de células 1:Microscopia óptica; 2: Vídeo câmera digital; 3: Software de análise de imagem.....	39
Figura 8-	Fotomicrografia de corte histológico do epitélio mamário de rata androgenizada que tomou propilenoglicol (veículo) por gavagem mostrando o epitélio mamário com grande concentração de núcleos corados em marrom com anticorpo anti-Ki-67 MIB-5 (magnificação original x400).....	43
Figura 9-	Fotomicrografia de corte histológico do epitélio mamário de rata androgenizada que tomou anastrozol 0,125 mg/dia por gavagem mostrando o epitélio mamário com uma pequena concentração de núcleos corados em marrom com anticorpo anti-Ki-67 em comparação ao grupo controle (magnificação original x400).....	43
Figura 10-	Bloxpot da porcentagem de núcleos corados segundo o grupo.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação dos inibidores da aromatase.....	25
Tabela 2- Medidas descritivas de porcentagem de núcleos corados para cada grupo.....	44

LISTA DE ABREVEATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

CCA	Centro de Ciências Agrárias
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CRMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
ER	Receptor de Estrogênio
HGV	Hospital Getúlio Vargas
Kg	Quilograma
LAPAC	Laboratório de Anatomia e Patologia e Citologia
mg	Miligrama
mL	Mililitro
µm	Micrômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
SERM	Modulador Seletivo do Receptor de Estrogênio
TAM	Tamoxifeno
UFPI	Universidade Federal do Piauí

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	OBJETIVO.....	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1	Tipo de estudo e local de realização.....	35
3.2	Critérios de inclusão da amostra.....	35
3.3	Critérios de não-inclusão da amostra.....	36
3.4	Cálculo Amostral.....	36
3.5	Divisão dos Grupos.....	36
3.6	Métodos.....	37
3.6.1	Método Histológico.....	37
3.6.2	Método Imunoistoquímico.....	38
3.6.3	Método Quantitativo.....	38
3.6.4	Método Estatístico.....	40
3.7	Aspectos Legais e Éticos.....	40
4	RESULTADOS.....	41
5	DISCUSSÃO.....	47
6	CONCLUSÃO.....	52
	REFERÊNCIAS.....	54
	ANEXOS.....	59
	ANEXO A- Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí.....	60
	ANEXO B- Comprovante de submissão do Artigo Científico da Dissertação como requisito para defesa, na Revista Clinics.....	61

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o câncer tornou-se um evidente problema de saúde pública, sendo estimados 27 milhões de casos novos para o mundo até o ano de 2030 (INCA, 2014). O problema do câncer no Brasil ganha relevância pelo perfil epidemiológico que essa doença vem apresentando. A incidência de câncer na população tem aumentado significativamente, tendo como principais fatores causais o estilo de vida e a longevidade. O câncer de mama é a principal causa de morte por câncer nas mulheres em todo o mundo, com cerca de 520 mil mortes estimadas no ano de 2012. É a segunda causa de morte por câncer nos países desenvolvidos, atrás somente do câncer de pulmão, e a principal causa de morte por câncer nos países em desenvolvimento. No Brasil, país em desenvolvimento, o câncer de mama é a neoplasia maligna mais comum em mulheres, com uma incidência anual crescente, sendo esperados para o ano de 2016, cerca de 57.960 casos novos da doença e 14.207 mortes (INCA, 2016).

A glândula mamária possui uma unidade morfo-funcional que é o lóbulo, constituído por ducto terminal intralobular, dútulos e alvéolos, cuja proliferação e diferenciação celular são determinadas por importantes interações hormonais (THAKURIA et al., 2015). Contudo, o estudo dos efeitos dessas interações hormonais no epitélio mamário humano normal, por questões éticas, é limitado, daí a busca dos modelos experimentais. O modelo *in vitro* tem a desvantagem da não reprodutibilidade das características do meio endócrino humano, além da ausência de interações imunológicas, vasculares e estromais. Já o modelo animal representa uma boa opção e tem contribuído bastante para a compreensão da biologia e desenvolvimento de estratégias terapêuticas na neoplasia mamária, entretanto, apresenta limitações quanto à extrapolação de resultados (RODRIGUES-JÚNIOR et al., 2012; DA SILVA et al., 2001; DA SILVA et al., 2007; DA SILVA et al., 2009).

O modelo animal que apresenta morfologia e carcinogênese mamária com pontos similares aos da espécie humana, é a rata. A rata androgenizada ou em estro permanente é um modelo biológico que se encontra sobre constante estímulo estrogênico e que vem despertando interesse para o estudo de diversos aspectos hormonais e ideal para o estudo do efeito de drogas que bloqueiam a síntese estrogênica (DA SILVA et al., 2007; DA SILVA et al., 2009).

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 mamária. 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 até o quinto dia de vida, induziu estro permanente em todos os animais. Quando adultas, as ratas apresentavam anovulação e ovários policísticos, além de comportamento agressivo quando em contato com os machos. Estas ratas, além de apresentarem obliteração do terço externo vaginal em decorrência da androgenização (HARRIS; LEVINE, 1965; 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 mamário.

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 inibidoras da produção estrogênica como os inibidores da aromatase sobre a atividade proliferativa no epitélio mamário, visando a endocrinoterapia no câncer de mama ou a quimioprevenção em mulheres de alto risco para câncer de mama (DA SILVA et al., 2009).

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 mulher 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 (Figura 1) (FREEDMAN; VERMA; CLEMONS, 2006; GEISLER; LONNING, 2005; DI NARDO; GILARDI, 2013).

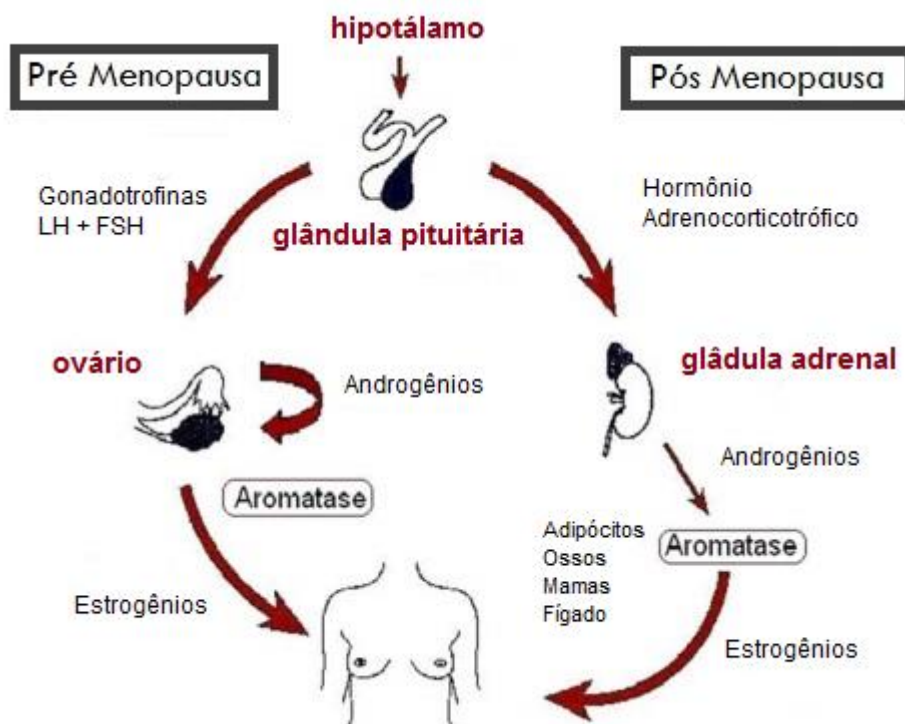


Figura 1- Representação esquemática da produção de estrogênios em mulheres na pré-menopausa e pos-menopausa.

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-hidroxitestosterona em estriol (DI NARDO; GILARDI, 2013). Esta

desempenha um papel direto na biossíntese de estrogênio na mama e acredita-se que ela desempenha um papel importante na progressão do câncer mamário (GEISLER;LONNING, 2005; DI NARDO;GILARDI, 2013). Portanto, as glândulas supra-renais e a aromatase são peças fundamentais na manutenção de um ambiente estrogênico na mulher pós-menopáusicas. Por este motivo, a inibição da aromatase e conseqüentemente da síntese de estrogênios, se constitui em estratégia com base racional sólida no tratamento do câncer de mama hormônio dependente em mulheres na pós-menopausa, fazendo com que ocorra uma redução da proliferação celular no epitélio mamário (CLEMONS; GOSS, 2001; FREEDMAN; VERMA; CLEMONS, 2006).

A investigação sobre a utilização dos inibidores da aromatase em mulheres com câncer de mama na pré-menopausa ainda está em fase de crescimento (KUBATKA et al., 2008). Alguns estudos demonstraram que a monoterapia com inibidores de aromatase na pré-menopausa levam a efeitos altamente variáveis do estradiol, assim como aumentos significativos na testosterona e androstenediona plasmática, que podem ser justificados em parte por um aumento reflexo de gonadotrofinas secundárias à supressão do estrogênio (DOWSETT; HAYNES, 2003; GOSS; STRASSER, 2001). Já outros estudos apontam que a prevenção e tratamento do câncer utilizando os inibidores da aromatase nestas mulheres dependem da fonte primária de estradiol no tecido mamário. Alguns estudos experimentais sugeriram a importância da produção de estrogênio *in situ* na glândula mamária, estabelecendo como conceito o papel fundamental da síntese de estradiol *in situ* ao invés da absorção de estradiol no plasma por um tecido mamário já existente, sugerindo que os inibidores da aromatase podem diminuir os níveis de estradiol no tecido mamário, sem provocar uma redução nos níveis de estradiol no plasma e isso poderia reduzir a incidência de câncer de mama em pacientes pré-menopausadas (KUBATKA et al., 2008).

As estratégias endócrinas para mulheres na pré-menopausa têm-se centrado em métodos de ablação dos ovários (cirúrgico, medicamentoso e através de irradiação) e no uso do Tamoxifeno (TAM), um Modulador Seletivo do Receptor de Estrogênio (SERM) de primeira geração, como agente de primeira linha. Estudos têm demonstrado uma superioridade da terapia com inibidores da aromatase, em comparação com o TAM em mulheres na pós-menopausa, com isto pesquisadores

estão começando a investigar se estes resultados obtidos pelo uso de inibidores da aromatase podem ser aplicados a uma população na pré-menopausa (AEBI; CASTIGLIONE-GERTSCH, 2003; CLEMONS; COLEMAN; VERMA, 2004; DELLAPASQUA et al., 2005).

A propósito 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 esteroide (FREEDMAN; VERMA; CLEMONS, 2006). Outra classificação possível é quanto à geração. Assim, a aminoglutetimida é considerada o inibidor da aromatase de primeira geração, e o fadrozol e o formestano, os inibidores de segunda geração. A terceira geração, e incluem o anastrozol, o letrozol e o vorozol, entre os 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 aqueles funcionam principalmente como antagonistas competitivos, ligando-se à enzima apenas 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).

Aliás, o anastrozol (Figura 2) e todos os compostos de terceira geração tornaram-se os fármacos endócrinos de primeira escolha para pacientes com câncer de mama na pós-menopausa, uma vez que estão associados com uma maior atividade e melhor tolerabilidade geral quando comparado com o TAM (GOBBI et al., 2014) que tem sido associado a efeitos adversos potencialmente fatais como o aumento da incidência de câncer de endométrio, tromboembolismo e eventos cerebrovasculares (PAN; CHLEBOWSKI, 2014).

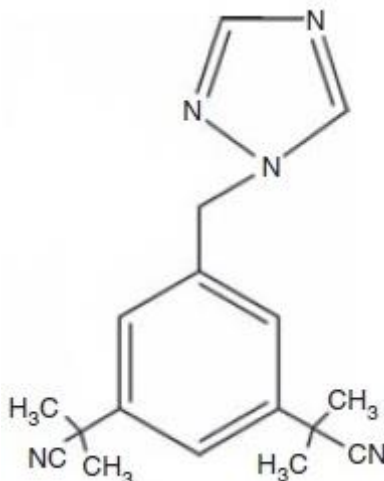


Figura 2- Estrutura química do composto de terceira geração anastrozol.

Fonte: Adaptado de GEISLER; LONNING (2005).

O anastrozol é um derivado do benzotriazol e é comercializado como ARIMIDEX® pela AstraZeneca Pharmaceuticals LP (Wilmington, D.E). Tem ação inibidora sobre a aromatase, bloqueado assim a conversão de testosterona em estradiol e androstenediona em estrona (Figura 2) caracterizando o principal mecanismo de ação de um inibidor da aromatase (WILKINSON, 2004; HAYNES et al., 2003; KELLY; BUZDAR, 2010; BUZDAR, 2003). Particularmente a inibição da enzima aromatase ocorre através uma ligação competitiva ao grupo heme do citocromo P450 da aromatase, diminuindo a biossíntese de estrogênios na periferia do corpo e na mama (SANFORD; PLOSKER, 2008).

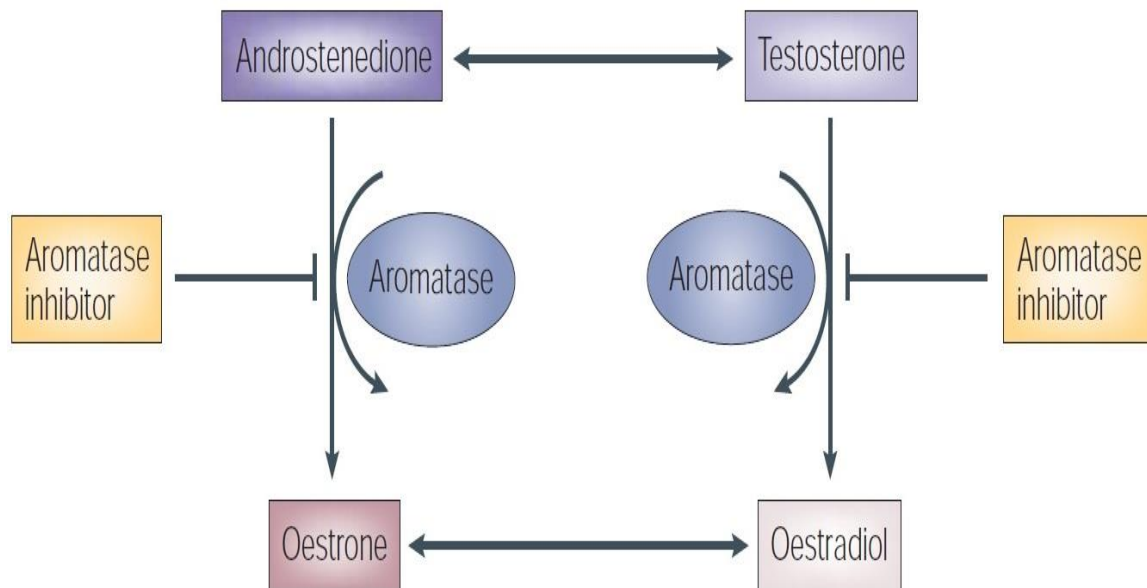


Figura 3- Mecanismo de ação dos inibidores da aromatase.

Fonte: JOHNSTON; DOWSETT (2003).

O anastrozol apresenta efeitos significativos para o tratamento do câncer de mama e devido a isto, atualmente é utilizado como o tratamento de primeira linha para mulheres na pós-menopausa que apresentam Receptor de Estrogênio (ER) positivo, particularmente em câncer de mama localmente avançado ou metastático. Além disso, é indicado também para o tratamento inicial do câncer, para sua quimioprevenção e para mulheres pós-menopáusicas que façam uso do TAM, principalmente se por tempo prolongado (FABIAN, 2007; GOLDHIRSCH et al., 2009). O uso prolongado do anastrozol não apresenta efeitos sobre as dosagens dos hormônios esteroides cortisol, aldosterona, androstenediona e 16-hidroxiprogesterona o que confirma sua alta seletividade em inibir a aromatase sem interferir nas outras vias da esteroidogênese adrenal. A ausência de alterações no hormônio luteinizante e hormônio folículo estimulante demonstra que o anastrozol não possui atividade estrogênica, progestacional ou androgênica e que não afeta a síntese das gonadotrofinas (DI NARDO; GILARDI, 2013; BHATNAGAR, 2007).

Alguns estudos foram realizados na tentativa de identificar qual seria 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 (SANFORD; PLOSKER, 2008; MILANI; JHA; POTTER, 2009). 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 metabólitos de anastrozol que têm sido observados no plasma e na urina de pacientes humanos são: triazol, hidroxí-anastrozol glucuronide e anastrozol glucuronide. O triazol é o principal metabólito, porém é inativo e não suprime, assim como os outros dois metabólitos, a atividade da aromatase. A eliminação desses metabólitos ocorre principalmente através da urina (INGLE et al., 2010; KAMDEM et al., 2010).

A avaliação rotineira da proliferação celular é feita na análise patológica do câncer de mama, sendo a quantificação da atividade mitótica o método tradicionalmente usado, entretanto, a expressão imunohistoquímica do Ki-67 tem sido largamente utilizada, por tratar-se de um método mais sensível de avaliação da atividade proliferativa (ELSTON; ELLIS, 1991; SCOTT et al., 1991; FITZGIBBONS et al., 2000; DA SILVA et al., 2009). 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) (GERDES, 1990; GERDES et al., 1991; FITZGIBBONS et al., 2000; SPYRATOS et al., 2002).

Nos últimos anos, este marcador tem sido considerado de grande interesse como um fator prognóstico e terapia preditora de resposta na fase inicial do câncer

de mama. Alguns estudos têm mostrado que, em hormônio receptor positivo, de câncer de mama precoce, o Ki-67 serve como fator prognóstico tanto em mulheres na pré como na pós-menopausa. Além disso, a elevada expressão de Ki-67 prevê uma melhor resposta à quimioterapia e alterações dinâmicas na configuração da expressão de Ki-67 estão correlacionadas com a resposta à terapia endócrina com inibidores de aromatase (DOWSETT et al., 2007; ARCHER et al., 2003; POHL et al., 2003).

A propósito, um modelo animal que mimetiza síndrome dos ovários policísticos, em que há produção estrogênica constante sem oposição da progesterona, é a rata em estro permanente e que vem despertando o interesse para o estudo dos efeitos de drogas usadas na quimioprevenção e terapia do câncer de mama como os inibidores da aromatase, pois estes animais apresentam maior concentração de ductos e alvéolos em decorrência da ação estrogênica, mimetizam uma situação de alto risco para câncer de mama em mulheres na pré-menopausa e são ideais para o estudo do efeito de drogas que bloqueiam a síntese estrogênica como o anastrozol (DA SILVA et al., 2007; DA SILVA et al., 2001; DE SOUSA et al., 2014).

Assim, em virtude das incertezas a respeito dos efeitos quimiopreventivos do anastrozol no tecido mamário e pela escassez de publicações na literatura sobre os efeitos do anastrozol no epitélio mamário de modelos animais com produção constante de estrogênios através da expressão imunohistoquímica do Ki-67, é que nos propusemos a realizar o presente estudo.

2. OBJETIVO

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

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Tipo de estudo e local da realização

Trata-se de um estudo experimental, randomizado e placebo-controlado realizado no Biotério do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI) e no Laboratório de Pesquisa da Clínica de Ginecologia do Hospital Getúlio Vargas (HGV).

3.2. Critérios de inclusão da amostra

Foram utilizadas ratas *Wistar-Hannover* provenientes do biotério do CCA da UFPI. Após o nascimento, as ratas foram separadas dos ratos baseando-se na distância entre os orifícios anogenitais. As ratas até o desmame, com 21 dias de vida permaneceram juntamente com as mães e os ratos foram separados para outras pesquisas. 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 25°C e luz artificial de lâmpadas fluorescentes com ciclo claro/escuro de 12 horas cada, sendo o ciclo claro de 7-19 horas. As ratas tiveram livre acesso à água filtrada e a ração pra roedores SUPRA LAB® (Figura 4).



Figura 4- Ratas em gaiolas 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 (WRENN et al. 1969), queratinização do epitélio vaginal (BARRACLOUGH, 1961), principal característica do estro permanente e também a presença de ovários policísticos, por ocasião da autópsia.

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.
- 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 5.0®, 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., 2008). O resultado deste cálculo determinou uma amostra mínima de 10 (dez) animais em cada grupo de estudo.

3.5. Divisão dos Grupos

Aos 90 dias de vida e após a comprovação do estro permanente, vinte e oito ratas foram distribuídas aleatoriamente, em dois grupos:

- Grupo I (controle, n=14)
- Grupo II (experimental, n=14).

As ratas do grupo I (controle) receberam 0,1ml/animal/dia de propilenoglicol e as ratas do grupo II (experimental) receberam 0,5 mg/Kg ou 0,125 mg/animal/dia de anastrozol (Aramidex®) diluído em 0,1ml de propilenoglicol. O placebo e o anastrozol foram administrados continuamente durante 28 dias, sempre no mesmo horário do dia (entre 8-10 horas da manhã), usando-se uma sonda metálica de gavagem apropriada para administração via oral (Figura 5 e 6).



Figura 5- Sonda metálica.

Fonte: Arquivo Pessoal.



Figura 6- Administração do medicamento.

Fonte: Arquivo Pessoal.

No 29º dia, as ratas dos dois grupos foram anestesiadas com Cetamina na dose de 120 mg/Kg associado a Midazolam 8 mg/Kg, por via intraperitoneal e, posteriormente, sofreram eutanásia por dose excessiva de anestésicos de acordo com a Resolução nº 1000, de 11 de maio de 2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CRMV) que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia aceitáveis em animais. Em seguida, as ratas foram imobilizadas em prancha de cortiça para remoção do primeiro par de glândula mamária abdômino-inguinal.

3.6. Métodos

3.6.1. Método Histológico

O estudo foi realizado no Laboratório de Anatomia e Patologia e Citologia (LAPAC) de Teresina. Após a retirada do primeiro par de glândula mamária abdomino-inguinal, o material foi fixado em formol tamponado (pH entre 7,3 e 7,4), por 12-24 horas, desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico, até o absoluto, e diafanização pelo xilol. O processamento do material foi realizado automaticamente utilizando-se o Histotécnico Oma® (Modelo DM-20, São Paulo, Brasil). Por fim, foram impregnadas e incluídas em parafina líquida numa estufa à temperatura de 59°C, para confecção final dos blocos (MASSON,1956).

3.6.2. Método Imunoistoquímico

A análise imunoistoquímica foi realizada no Laboratório Locus (Centro de Diagnóstico – Anatomia Patológica e Citologia) em São Paulo, Brasil. Os cortes histológicos para confecção das lâminas foram realizados com o uso do micrótomo tipo *Minot* ajustado para 5 µm de espessura. Todas as lâminas foram preparadas e as respectivas reações imunoistoquímicas 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 realizou-se 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 tetrahidrocloreto a uma concentração de 1mg/ml de solução tamponada de Tris e solução de peróxido de hidrogênio por 5 minutos, em seguida foram contracoradas 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. Foi positiva toda e qualquer célula com gradação de coloração marrom, mesmo que tênue.

A contagem de células foi realizada no laboratório de pesquisa localizado na

Coordenação de Ginecologia 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 videocâmara 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 (Figura 7). Para a contagem de células positivas e negativas para a expressão do Ki-67 foi realizado em aumento de 400x. Foram contadas no mínimo 500 células do epitélio mamário, 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).

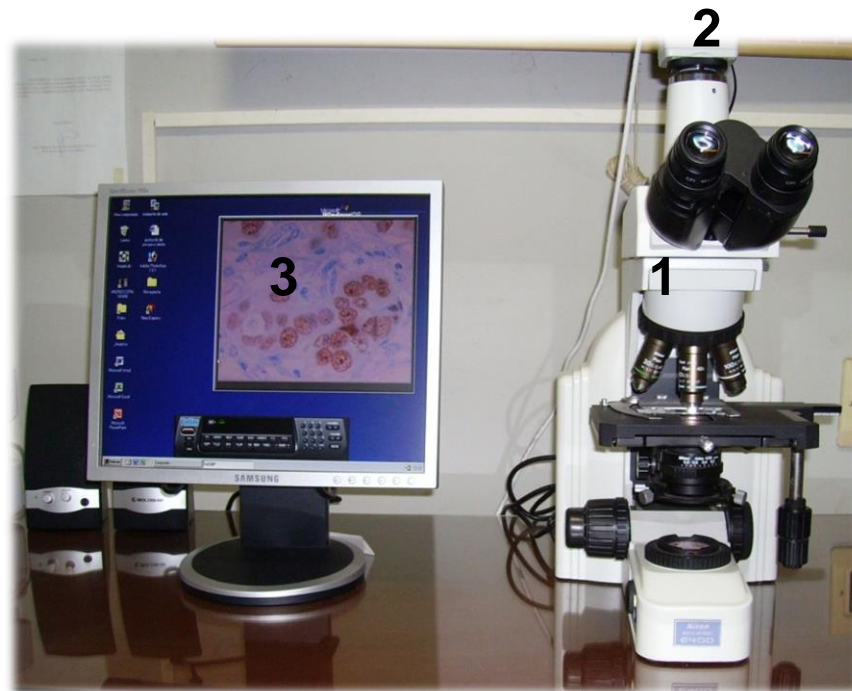


Figura 7- Sistema computadorizado utilizado para contagem de células. 1:Microscopia óptica; 2: Vídeo câmera digital; 3: Software de análise de imagem.

Fonte: Arquivo pessoal

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.

3.6.4. Método Estatístico

A comparação entre as proporções médias de células coradas nos dois grupos foi realizada utilizando-se o teste t de *Student* para duas amostras independentes (*Bussab e Morettin*) e o teste não paramétrico de *Mann-Whitney* (*Conover*). Foi adotado o nível de significância de 5% para ambos os testes.

3.7. Aspectos Legais e Éticos

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPI por meio do parecer nº 116/15 (ANEXO 1). 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, 2009).

4. RESULTADOS

À Microscopia de Luz, as células do epitélio mamário dos animais do grupo I (controle) apresentaram uma maior concentração de células com núcleo expressando o antígeno Ki-67 (Figura 8) em comparação ao grupo II (Anastrozol) (Figura 9). A análise quantitativa mostrou porcentagens médias de núcleos corados com Ki-67 por 500 células no epitélio mamário de ratas em estro permanente de $76,97 \pm 0,76$ e $14,44 \pm 2,02$, nos grupos I (controle) e II (anastrozol), respectivamente, $p < 0,0001$ (Tabela 2). Os resultados encontram-se melhor ilustrados no boxplot da porcentagem média de núcleos com expressão positiva para o antígeno Ki-67 nas células do epitélio mamário dos animais dos grupos I e II (Figura 10).

.

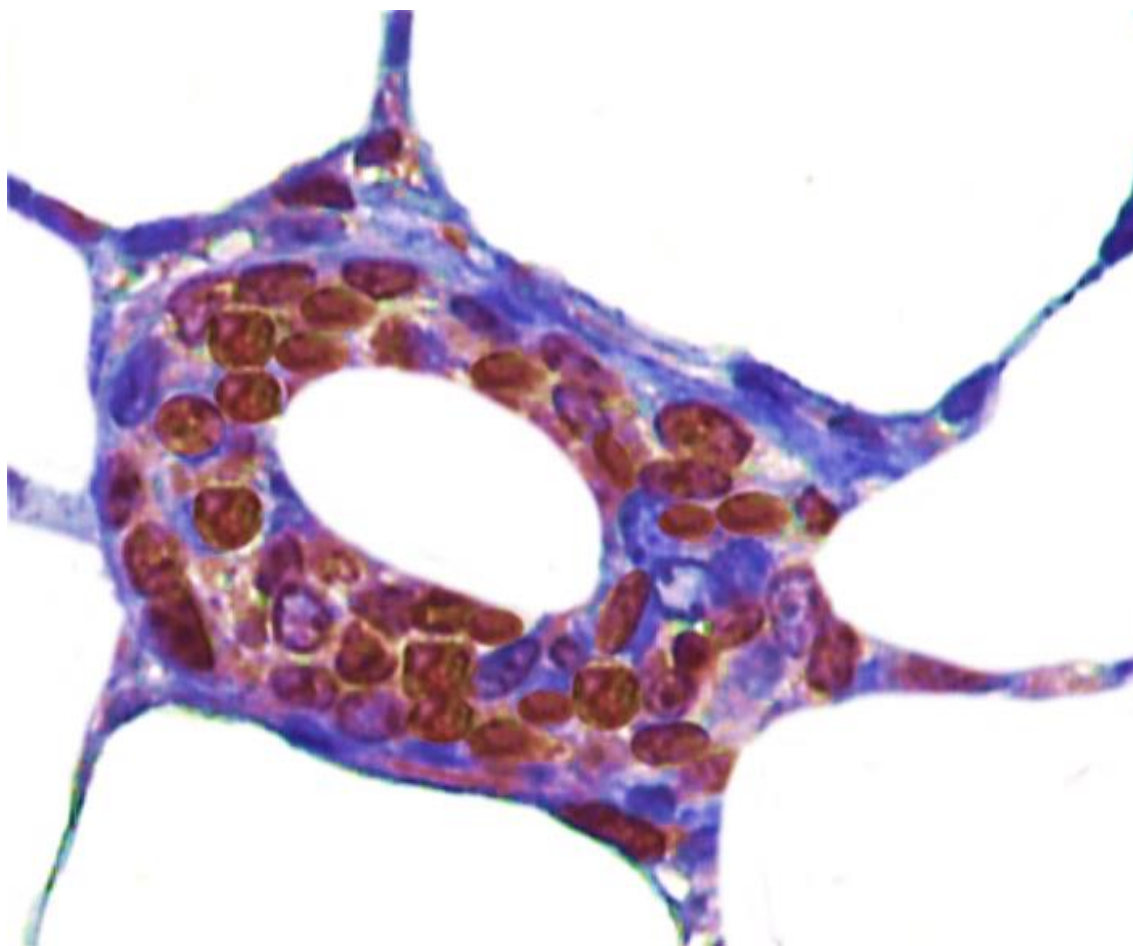


Figura 8- Fotomicrografia de corte histológico do epitélio mamário de rata androgenizada que tomou propilenoglicol (veículo) por gavagem mostrando o epitélio mamário com grande concentração de núcleos corados em marrom com anticorpo anti-Ki-67 MIB-5 (magnificação original x400).

Fonte: Arquivo Pessoal.

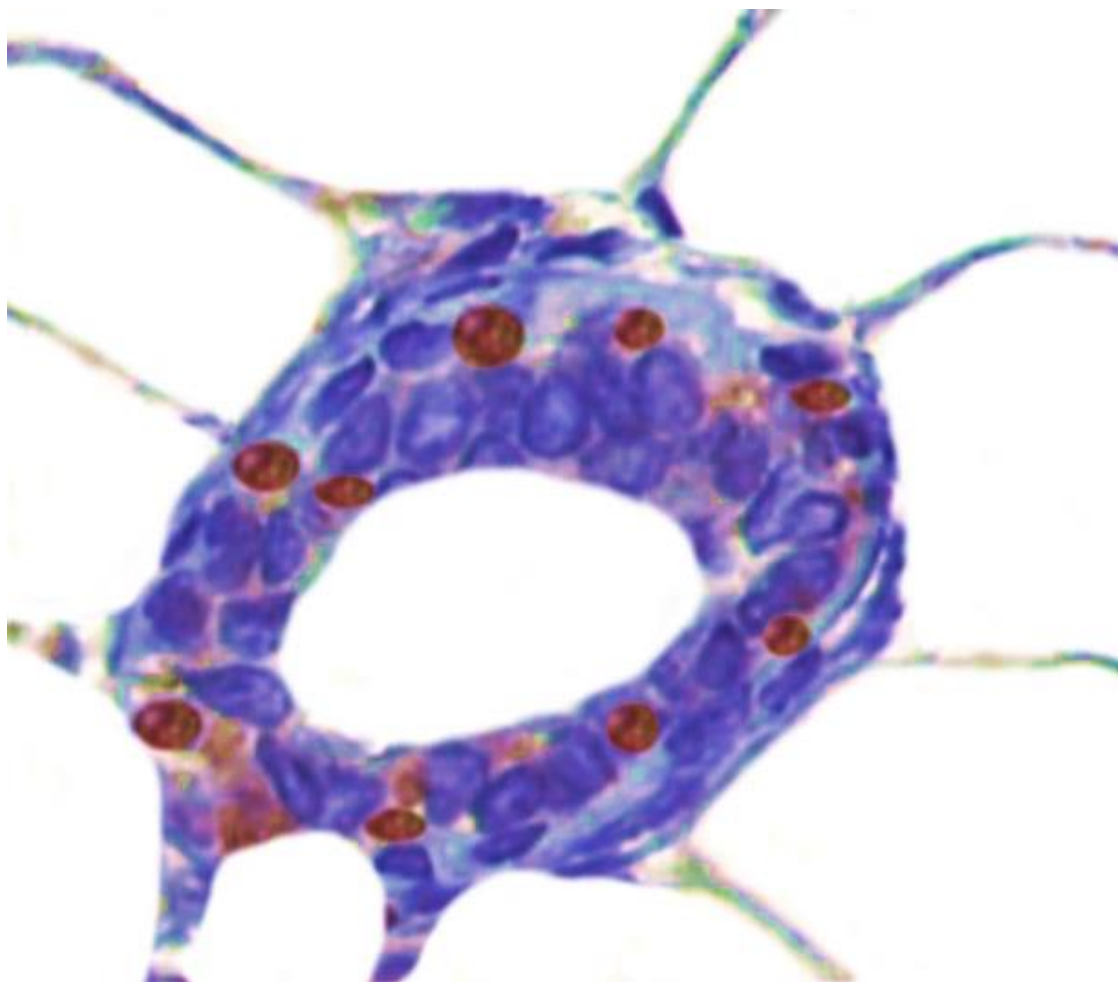


Figura 9- Fotomicrografia de corte histológico do epitélio mamário de rata androgenizada que tomou anastrozol 0,125 mg/dia por gavagem mostrando o epitélio mamário com uma pequena concentração de núcleos corados em marrom com anticorpo anti-Ki-67 em comparação ao grupo controle (magnificação original x400).

Fonte: Arquivo Pessoal.

Tabela 2- Medidas descritivas de porcentagem de núcleos corados para cada grupo.

Grupo	N	Média	Erro Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Controle (I)	14	76,97	0,76	76,75	71,48	80,88
Experimental (II)	14	14,44 *	2,02	12,65	5,79	28,92

Legenda: N = tamanho da amostra. *Valores com diferença significativa, Teste T de *Student* $p < 0,0001$.*

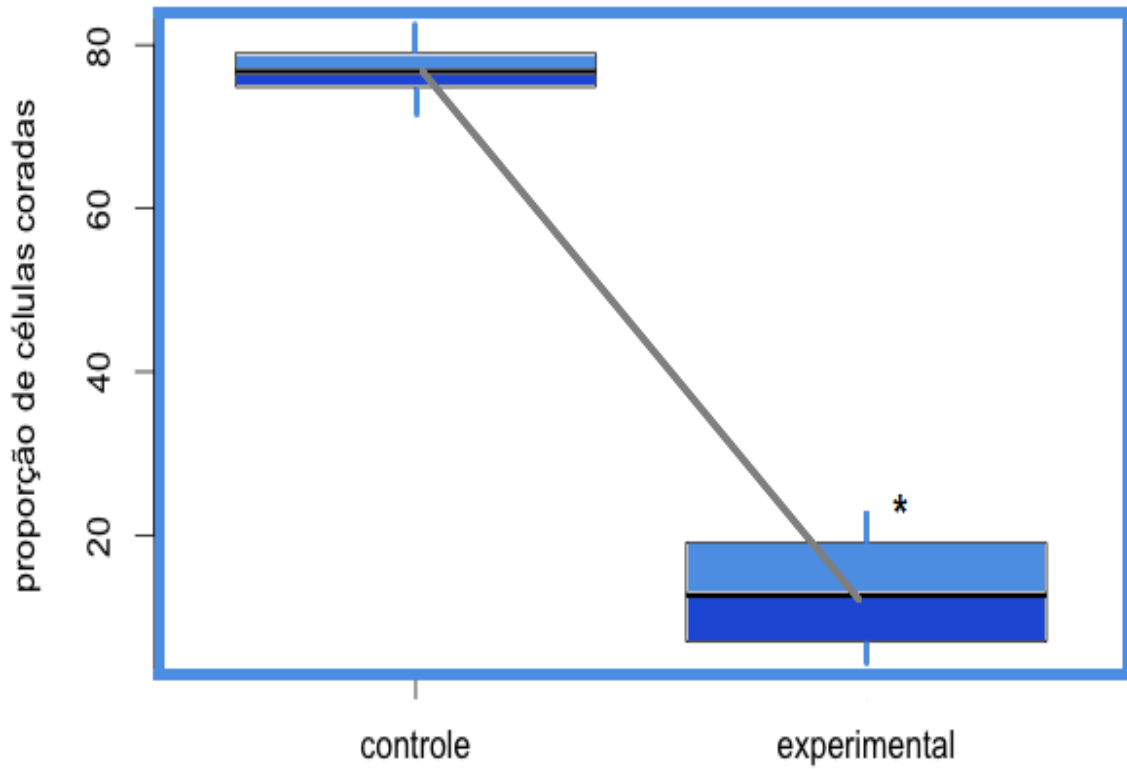


Figura 10- Bloxpot da porcentagem de núcleos corados segundo o grupo.

Legenda: * $p < 0,0001$.

5. DISCUSSÃO

Nosso estudo foi motivado, por um lado, pela tendência atual em se fazer a quimioprevenção e tratamento do câncer de mama com inibidores da aromatase em mulheres na pós-menopausa, e por outro lado, pela escassez de estudos sobre os efeitos destas drogas em um epitélio mamário sob produção constante de estrogênio, onde poderia se observar melhor o bloqueio da produção de estrogênios através da análise da expressão imunoistoquímica do KI-67.

O estudo dos efeitos das drogas citadas sobre o tecido mamário humano normal é dificultado por razões éticas, e isto nos incitou a utilizar um modelo experimental, mesmo sabendo das limitações para extrapolar os resultados. Optamos, então, pelo modelo de ratas em estro permanente, que encontra-se sob contínua produção estrogênica mimetizando a síndrome dos ovários policísticos (BARRACLOUGH 1961; DA SILVA et al., 2001). A glândula mamária desses animais encontram-se sob constante estímulo estrogênico e similar às mamas com aumento da densidade, podendo assim mimetizar uma situação de risco aumentado para o câncer de mama e constituir-se em um tecido ideal para o estudo do efeito de drogas com efeito antiestrogênico ou que bloqueiam a síntese estrogênica como o anastrozol, um inibidor da aromatase (DA SILVA et al., 2007; DA SILVA et al., 2001).

A indução do estro permanente foi conseguida pela androgenização das ratas, no período neonatal, como difundida por vários autores (BARRACLOUGH, 1961; NOGUEIRA; DA SILVA, 2009; SOUSA-LAGES et al., 2016). Foi comprovado o estro permanente nas ratas que apresentaram oclusão do terço distal da vagina, queratinização do epitélio vaginal e a presença de ovários policísticos, por ocasião da necropsia, como preconizado por (RODRIGUES-JÚNIOR et al., 2012; GONTIJO et al., 2010; DE SOUSA et al., 2014).

Completados os 90 dias de vida, e após confirmação do estro, as ratas foram divididas em dois grupos, que receberam propilenoglicol ou anastrozol (Aramidex®) diluído em propilenoglicol. Preferiu-se o propilenoglicol por ser um veículo neutro, incolor e inodoro, permitindo administrar a droga nas diluições e doses pré-definidas, e pela via oral (gavagem), que apesar de mais laboriosa, contudo, é similar à via comumente utilizada pelas mulheres (DOS SANTOS et al., 2009; KIM et al., 2007). Não utilizamos grupos de ratas castradas (mimetizado a pós-menopausa) porque estas não estão submetidas a constante estímulo estrogênico, apresentando

hipoestrogenismo e atrofia mamária, e como nosso objetivo foi avaliar os efeitos de uma droga inibidora da síntese estrogênica, a rata em estro permanente, mimetizando a pré-menopausa com ovários policísticos e produção constante de estrogênios, foi considerada o modelo ideal.

As diferenças, principalmente na absorção e no metabolismo, dificultam estabelecer uma correspondência da dose entre a mulher e a rata. Isso faz com que as mais variadas concentrações sejam observadas nos diferentes estudos. Utilizamos, neste estudo, uma dose de 0,5 mg/Kg ou 0,125 mg/animal/dia e para obtenção desta dose de anastrozol, baseamo-nos, sobretudo, nos trabalhos de Kubatka et al. (2008) e Sadlonova et al. (2009).

Kubatka et al. (2008) observaram que a administração por via oral da dose de 0,5 mg/Kg de anastrozol em um modelo convencional de ratas na pré-menopausa é equivalente à dose clínica diária de Aramidex® (1 mg) administrado em mulheres com câncer de mama pós-menopausadas. Além disso, Sadlonova et al. (2009) verificaram, em um modelo convencional de ratas na pré-menopausa, que a administração oral de 0,5 mg/Kg de anastrozol, é similar a observada em mulheres recebendo 1 mg diário. Esses estudos mostram que esta dosagem (0,5 mg/Kg) é suficiente para produzir efeito desejado neste modelo experimental. Assim, a dose de anastrozol utilizada neste estudo está de acordo com a literatura disponível e poderia mimetizar o efeito do uso desta droga por mulheres para quimioprevenção ou tratamento do câncer de mama.

O período de administração da droga foi de 28 dias, ou seja, aproximadamente seis ciclos da rata, o que corresponderia em humanos a cerca de seis ciclos ou seis meses. Completado os 28 dias os animais foram sacrificados para o estudo proposto.

Após comparação entre os dois grupos estudados, observamos que no grupo controle, representado pelas ratas em estro permanente que receberam o propilenoglicol, as glândulas mamárias apresentaram alta concentração de células em atividade proliferativa. Esses achados estão de acordo com os poucos estudos publicados na literatura como o de Sousa et al. (2014) que observaram grande atividade proliferativa, representada pelo estudo imunoistoquímico com o KI-67, na mama de ratas em estro permanente que utilizaram o propilenoglicol. Estes achados

podem ser justificados devido ao emprego neonatal de androgênios (proprionato de testosterona) que condiciona o desaparecimento do mecanismo cíclico liberador de gonadotrofinas, que estaria sediado no hipotálamo anterior (BARRACLOUGH;GORSKI, 1961). A adenohipófise, deixando de receber o estímulo dos polipeptídeos originados nos núcleos hipotalâmicos anteriores, secretaria menor quantidade de hormônio folículo estimulante e hormônio luteinizante. Diante disso, na rata submetida a tratamento androgênico neonatal, ocorre uma contínua produção de estrogênios e uma maior liberação de prolactina (BARRACLOUGH;GORSKI, 1961; JACOBSON;NORGREN,1965).

No presente estudo, mostramos que a administração de anastrozol na dose de 0,5 mg/Kg ou 0,125 mg/animal/dia durante 28 dias, diminuiu significativamente a proporção média de expressão do KI-67 no epitélio mamário de ratas em estro permanente comparada ao grupo controle. Previamente, nenhum trabalho na literatura avaliou a expressão do KI-67 no epitélio mamário de ratas em estro permanente tratadas com anastrozol. Entretanto, um estudo investigou por análise histopatológica, os efeitos quimiopreventivos da utilização do anastrozol na dose de 0,5 mg/Kg após indução da carcinogênese mamária em ratas na pré-menopausa. Kubatka et al. (2008) observaram melhoras significativas sobre a supressão tumoral, suprimindo a incidência e frequência do tumor em 40% e 57% respectivamente, o que nos levar a supor que o anastrozol atua de forma a reduzir a proliferação celular mamária, como mostrado no presente estudo, pois acrescenta-se também que o mesmo teve efeitos significativos sobre a supressão tumoral. Estes achados podem ser justificados pelos efeitos inibitórios do anastrozol sobre a produção estrogênica, onde o mesmo atua na inibição da enzima aromatase, bloqueado assim a conversão dos androgênios em estrogênios, mais precisamente a testosterona em estradiol e androstenediona em estrona (HAYNES et al. 2003, KELLY;BUZDAR 2010, BUZDAR, 2003). Assim, o anastrozol reduziu a proliferação celular ao inibir a produção estrogênica nas ratas em estro permanente.

Portanto, mesmo sabendo das limitações e das dificuldades de extrapolação de resultados obtidos em animais para seres humanos, a redução da expressão do KI-67 na mama de ratas em estro permanente, após tratamento com anastrozol mostrado neste estudo reflete uma ação inibidora da produção estrogênica, provocando uma redução da atividade proliferativa, e é possível que na presença de

mamas com alto risco para câncer representado por um aumento da densidade mamária e uso de terapia hormonal na pós-menopausa, o anastrozol possa provocar redução da proliferação celular e do risco para desenvolvimento de câncer de mama.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos deste estudo, podemos concluir que o anastrozol administrado na dose de 0,5 mg/Kg durante 28 dias consecutivos, reduziu significativamente a expressão do Ki-67 no epitélio mamário de ratas em estro permanente.

O presente estudo mostrou que o anastrozol reduziu a proliferação celular, entretanto, são necessários novos estudos para um melhor embasamento de nossos resultados.

REFERÊNCIAS

AEBI, S.; CASTIGLIONE-GERTSCH, M. Adjuvant endocrine therapy for the very young patients. **Breast**, v.12, n.6, p.509–515, 2003.

ARCHER, C.D. et al. Early changes in apoptosis and proliferation following primary chemotherapy for breast cancer. **Br J Cancer**. v.89 n.10, p.35-41, 2003.

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

BHATNAGA, 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.; COLEMAN, R.E.; VERMA, S. Aromatase inhibitors in the adjuvant setting: bringing the gold to a standard? **Cancer Treat Rev**. v.30, n.4, p.325–332, 2004.

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

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

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.

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.

DELLAPASQUA, S. et al. Adjuvant endocrine therapy for premenopausal women with early breast cancer. **J Clin Oncol**. v.23, n.8, p.1736–1750. 2005.

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, A. et al. Vascular endothelial growth factor expression in the urethral epithelium of castrated adult female rats treated with tamoxifen. **Gynecological Endocrinology**. v. 25, p. 282-286, 2009.

DOWSETT, M. et al. Prognostic value of Ki67 expression after short-term presurgical endocrine therapy for primary breast cancer. **J Natl Cancer Inst**. v.99, n.1, p.167–70, 2007.

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.

FREEDMA, 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.

HARRIS, G.W.; LEVINE, S. Sexual differentiation of the brain and its experimental control. **J Physiol.** v.181, p.379-400, 1965.

HAYNES, B.P. et al. The pharmacology of letrozole. **J Steroid Biochem Mol Biol.** v.87, n.1, p.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.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, RJ, 2014. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014>.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativa do câncer no Brasil. Rio de Janeiro, RJ, 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016>.

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, 2008.

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. Adrenal cortical hyperresponsiveness to corticotropin in polycystic ovary syndrome patients with adrenal androgen excess. **Fertil Steril.** v.81, n.1, p.126-131, 2004.

NOGUEIRA, L.T.; DA SILVA, B.B. Effects of raloxifene on the mammary epithelium of female rats in persistent estrus. **Gynecol Endocrinol.** v.25, n.6, p.357-61, 2009.

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.

POHL G, et al. Expression of cell cycle regulatory proteins in breast carcinomas before and after preoperative chemotherapy. **Breast Cancer Res Treat.** v.7, n.8, p.97-103, 2003.

RODRIGUES-JÚNIOR, D.M. et al. Comparative Study of Tamoxifen and Raloxifene on Endometrial Cell Proliferation of Female Rats in Persistent Estrus. **International Journal of Gynecological Cancer**. v. 22, p. 30-34, 2012.

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.124-129, 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, E. 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.

THAKURIA, S. et al. Histological study of human mammary gland in women of north eastern region of India. **Journal of Evidence based Medicine and Healthcare**. v. 2, n.37, 2015.

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

ANEXOS

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
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
Campus Universitário Ministro Portela, Sítio Ininga, Teresina, Piauí, Brasil CEP: 64049-550
 Telefone: (98) 3215-3734 - e-mail: ceoa@ufpi.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos do Anastrozol no Endométrio e no Epitélio Mamário de Ratas em Estro permanente", protocolo nº 116/15, sob a responsabilidade de PEDRO VITOR LOPES COSTA- que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), 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 27/11/2015.

Teresina, 27 de Novembro de 2015.



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 Clinics, com qualis B1 na área interdisciplinar e fator de impacto de 1,328.

CLINICS - Manuscript ID CLINICS-2016-0333

03-Aug-2016

Dear Prof. da Silva:

Your manuscript entitled "Ki-67 antigen expression in the mammary epithelium of female rats in persistent estrus treated with anastrozole" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in CLINICS.

Your manuscript ID is CLINICS-2016-0333.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/clinics-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/clinics-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to CLINICS.

Sincerely,

Edmund Baracat

Editor, CLINICS

www.clinics.org.br