



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

JHONATAS CLEY SANTOS PORTO

**EXPRESSÃO DO ANTÍGENO KI-67 NA ZONA RETICULAR DO CÓRTEX
ADRENAL DE RATAS EM ESTRO PERMANENTE TRATADAS COM
EXEMESTANO**

Teresina – PI
2022

JHONATAS CLEY SANTOS PORTO

**EXPRESSÃO DO ANTÍGENO KI-67 NA ZONA RETICULAR DO CÓRTEX
ADRENAL DE RATAS EM ESTRO PERMANENTE TRATADAS COM
EXEMESTANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Saúde - PPGCS da Universidade Federal do Piauí – UFPI, na área de concentração Métodos Diagnósticos e Análise das Condições de Saúde e linha de pesquisa Investigação para Diagnóstico em Saúde, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências e Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Vitor Lopes Costa.

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

P853e Porto, Jhonatas Cley Santos.
Expressão do antígeno ki-67 na zona reticular do córtex adrenal de ratas em estro permanente tratadas com exemestano / Jhonatas Cley Santos Porto. -- Teresina, 2022.
44 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciências e Saúde, 2022.
Orientação : Prof. Dr. Pedro Vitor Lopes Costa.
Bibliografia

1. Exemestano. 2. Inibidor da Aromatase. 3. Córtex suprarrenal. 4. Antígeno Ki-67. 5. Hiperandrogenismo. 6. Ratas. I. Costa, Pedro Vitor Lopes. II. Título.

CDD 615.1

JHONATAS CLEY SANTOS PORTO

**EXPRESSÃO DO ANTÍGENO KI-67 NA ZONA RETICULAR DO CÓRTEX
ADRENAL DE RATAS EM ESTRO PERMANENTE TRATADAS COM
EXEMESTANO**

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: Investigação para Diagnóstico em Saúde.
Orientador: Prof. Dr. Pedro Vitor Lopes Costa

Aprovada em 11 de outubro de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

Presidente: Prof. Dr. Pedro Vitor Lopes Costa

1º Examinador: Prof. Dr. José Arimatéa dos Santos Junior - Interno

2º Examinador: Prof. Dr. Alesse Ribeiro dos Santos - Externo

Suplente: Prof^a. Dra^a. Ione Maria Ribeiro Soares Lopes - Interno

Dedico este trabalho ao Prof. Dr. Benedito
Borges da Silva (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter dado a mim o dom da vida, saúde, proteção e benção para que eu chegasse até aqui.

A minha esposa, Sabrina Celine Portela do Nascimento, e meus filhos, Rodrigo Portela dos Santos Porto e Saulo Luiz Portela Macedo, pelo apoio, inspiração e carinho tão necessários para meu progresso pessoal e profissional.

A meus pais, Maria da Conceição Chaves dos Santos, José de Ribamar Veiga da Silva Filho, Marcio Cley Viana Porto, e avós, Maria dos Milagres Chaves dos Santos e Antônio Cardoso dos Santos, pelo apoio e investimento na minha educação.

À Gerlândia da Costa Portela, meus irmãos, madrinha, tios (as), amigos (as) que acreditaram em mim e sempre lançaram palavras esperançosas que foram fundamentais para que eu concluísse mais esta etapa na minha vida acadêmica.

À prof^a. Dra. Mitra Mobin, a minha mãe torta, que me mostrou este fascinante mundo da pesquisa científica, que ensinou a mim a beleza e importância contida nos pequenos detalhes e que a vida é um constante recomeço.

Ao Magnífico Reitor e Vice-Reitor da Universidade Federal do Piauí (UFPI), pelo incentivo e apoio à pesquisa e pós-graduação da UFPI, em meio a tantas dificuldades vividas no cenário atual.

À coordenação do Mestrado em Ciências e Saúde (PPGCS) pelo empenho na organização e funcionamento deste programa, especialmente neste período pandêmico.

Aos professores do PPGCS pelos ensinamentos e preciosas contribuições para a profissão e para a vida.

À secretária do PPGCS, Edilene, pelo cuidado, carinho e por ser sempre prestativa e disponível para ajudar a todos.

Ao Prof. Dr. João Paulo Jacob Sabino, pela disponibilidade do biotério e laboratório de pesquisa de Biofísica e Fisiologia, e por estar sempre disposto a ajudar.

Aos colegas do grupo de pesquisa do professor Dr. Benedito Borges da Silva, e demais colegas do mestrado e doutorado, pela ajuda e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Pedro Vitor Lopes Costa, pelo acolhimento, ensinamentos e orientações necessárias para elaboração desta dissertação.

Ao amigo e companheiro de profissão Marco Aurélio Sousa de Oliveira, pelo apoio e incentivo nas etapas de microscopia desta pesquisa.

‘Um homem que ousa desperdiçar uma hora de tempo não descobriu o real valor da vida.’

Charles Darwin

RESUMO

Introdução: Exemestano pertence ao grupo dos inibidores da aromatase, no qual constituem a primeira escolha para o tratamento do câncer de mama receptor de estrogênio positivo, um subtipo de câncer de mama que depende de estrogênio para se desenvolver. No entanto, além da escassez de estudos, há controvérsias sobre os efeitos do exemestano na glândula adrenal, em especial na zona reticular que é responsável pela síntese dos precursores do estrogênio. **Objetivo:** Avaliar a influência do exemestano na proliferação celular da zona reticular da glândula adrenal de ratas sob constante estímulo estrogênico. **Métodos:** Este é um estudo experimental, controlado e quantitativo realizado com dezoito ratas Wistar adultas, virgens, que foram androgenizadas pela administração de propionato de testosterona diluído em óleo de milho. Os animais foram randomizados em 2 grupos: I - controle (n=08) que receberam propilenoglicol; II - experimental (n=10) que receberam 10mg/kg/dia de Exemestano (Aromasin®) diluídos em 0,5mL de propilenoglicol durante 28 dias consecutivos. No 29º dia, as ratas foram eutanizadas e suas glândulas adrenais foram cirurgicamente removidas e armazenadas em formol tamponado 10%. Os tecidos foram processados para confecção das lâminas imuno-histoquímicas. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico no aumento de 400x por dois pesquisadores treinados e independentes. Os núcleos celulares corados em marrom foram considerados positivos para Ki-67. Os dados comparativos entre os grupos foram analisados através do teste t de Student para amostras independentes ($p < 0,05$). **Resultados:** A análise quantitativa das porcentagens dos núcleos marcados com anticorpo anti-Ki-67 mostrou uma média de 5,4 (erro padrão de 0,95) para o grupo experimental e 17,06 (erro padrão de 3,13) para o grupo controle, com $p < 0,003$. **Conclusão:** Ratas androgenizadas submetidas ao tratamento oral com exemestano na dosagem de 10mg/kg/dia durante 28 dias apresentou significativa redução na expressão do antígeno Ki-67 nas células da zona reticular da glândula adrenal.

Palavras-chave: Exemestano. Inibidor da Aromatase. Córtex suprarrenal. Antígeno Ki-67. Hiperandrogenismo. Ratas.

ABSTRACT

Introduction: Exemestane belongs to the group of aromatase inhibitors, which constitute the first choice for the treatment of estrogen receptor positive breast cancer, a subtype of breast cancer that depends on estrogen to develop. However, in addition to the scarcity of studies, there are controversies about the effects of exemestane on the adrenal gland, especially on the zona reticularis, which is responsible for the synthesis of estrogen precursors. **Objective:** To evaluate the influence of exemestane on cell proliferation in the zona reticularis of the adrenal gland in rats under constant estrogenic stimulation. **Methods:** This is an experimental, controlled, quantitative study carried out with twenty-eight adult, virgin, androgenized Wistar rats that were androgenized by the administration of testosterone propionate diluted in corn oil. The animals were randomized into 2 groups: I - control (n=08) that received propylene glycol; II - experimental (n=10) who received 10mg/kg/day of Exemestane (Aromasin®) diluted in 0.5mL of propylene glycol for 28 consecutive days. On the 29th day, the rats were euthanized and their adrenal glands were surgically removed and stored in 10% buffered formalin. Tissues were processed to make immunohistochemical slides. The slides were analyzed under an optical microscope at 400x magnification by two independent and trained researchers. Cell nuclei stained in brown were considered positive for Ki-67. Cell nuclei stained in brown were considered positive for Ki-67. Comparative data between groups were analyzed through Student's t test for independent samples ($p < 0,05$). **Results:** The quantitative analysis of the nucleus labeled with anti-Ki-67 antibody showed an average of 5.4 (standard error of 0.95) for the experimental group and 17.06 (standard error of 3.13) for the control group, with $p < 0,003$. **Conclusion:** Androgenized rats submitted to oral treatment with exemestane at a dosage of 10mg/kg/day for 28 days showed a significant reduction in the expression of Ki-67 antigen in cells of the zona reticularis of the adrenal gland.

Keywords: Exemestane. Aromatase inhibitor. Adrenal cortex. Ki-67 antigen.
Hyperandrogenism. Rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Secção histológica da glândula adrenal. M: medula; Z: zona reticular; F: zona fasciculada; G: zona glomerular.....	15
Figura 2 - Conversão enzimática de Androstenediona em Estrona.....	17
Figura 3 - Fórmula estrutural do exemestano (Aromasin®).....	19
Figura 4 - Ratas em gaiolas com acesso livre à água e ração.....	24
Figura 5 - Administração do exemestano (A) utilizando uma sonda de gavagem metálica (B).....	25
Figura 6 - Sistema computadorizado utilizado na contagem das células. 1: Microscópio óptico; 2: Câmara de vídeo digital; 3: Software usado na contagem celular.....	27
Figura 7 - Fotomicrografia de uma secção histológica da glândula adrenal de uma rata fêmea androgenizada, mostrando uma pequena parte da medula (M) e da zona reticular (R). Note a presença de numerosos núcleos corados em marrom com o anticorpo anti-Ki-67 antes do tratamento com exemestano, grupo controle (A) e escassos núcleos corados após tratamento, grupo experimental (B) (Ampliação original de 400x).....	30
Figura 8 - Box plot evidenciando a diferença entre as porcentagens médias dos núcleos celulares corados com anticorpo anti-Ki-67 nos grupos controle e experimental.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagem das células marcadas com anticorpo Ki-67 de ratas androgenizadas (controle) e tratadas com exemestano (experimental).....	29
Tabela 2 - Porcentagem média dos núcleos celulares corados com anticorpo anti-Ki-67 por 500 células nos grupos controle e experimental.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentos Animais
CYP19	Gene regulador da enzima aromatase
DEAH	Dehidroepiandrosterona
ER+	Receptor de estrogênio positivo
IAs	Inibidores da aromatase
Ki-67	Antígeno nuclear
HE	Hematoxina e eosina
PH	Potencial hidrogeniônico
SOP	Síndrome dos ovários policísticos
UFPI	Universidade Federal do Piauí

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus centígrados
H	Horas
Kg	Kilogramas
mg	Miligramas
ml	Mililitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Glândula adrenal	15
2.2 Aromatase	16
2.3 Exemestano	18
2.4 Modelo experimental.....	20
3 OBJETIVO.....	23
4.MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1 Tipo e local do estudo	24
4.2 Calculo Amostral.....	24
4.3 Obtenção das glândulas.....	26
4.4 Análise histológica e imunohistoquímica	26
4.5 Quantificação	27
4.6 Aspectos éticos.....	28
4.7 Análise estatística	29
5 RESULTADOS	30
6 DISCUSSÃO.....	33
7 CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS	38
ANEXOS.....	42
ANEXO A: Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Piauí.....	43
ANEXO B: Certificado de prorrogação de vigência da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Piauí.	44

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama receptor de estrogênio positivo (ER+) é um subtipo de câncer mamário que depende de hormônios estrogênicos para crescer e se desenvolver. Este tipo de neoplasia é mais frequente em mulheres pós-menopausadas e seu tratamento baseia-se na interrupção do fornecimento de estrógenos ao tecido tumoral. Na mulher pré-menopausa, a fonte principal destes hormônios são os ovários, enquanto que nas mulheres pós-menopausadas são outros tecidos, principalmente adiposo e ósseo (GAL et al., 2019).

A biosíntese dos hormônios estrogênicos é dependente da enzima aromatase, que é amplamente distribuída nos tecidos de mamíferos. Esta enzima é responsável pela conversão de andrógenos em estrógenos. Curiosamente, os estrógenos secretados pelas gônadas (ovários e testículos) atuam de forma sistêmica enquanto àqueles produzidos extragonadalmente (tecido adiposo, por exemplo) desenvolvem uma ação local (SIMPSON et al, 2000). Neste sentido, estudos foram desenvolvidos objetivando entender a regulação tecido-específica da aromatase e concluíram que esta enzima está superexpressa no câncer de mama ER+, mas normal em outros tecidos (WOOD;CUPP, 2018).

Em relação a interrupção do fornecimento de estrógenos ao câncer de mama ER+, os inibidores da aromatase (IAs) têm emergido como alternativa à endocrinoterapia deste tipo de câncer em mulheres pós-menopausadas. Este grupo de medicamentos impede a conversão dos andrógenos em estrógenos através do bloqueio da atividade enzimática da aromatase. Das três gerações de IAs atualmente disponíveis, os da terceira geração são mais indicados uma vez que apresentam maior seletividade à aromatase e menos efeitos colaterais quando comparados aos IAs das gerações antecessoras (BARROS-OLIVEIRA et al., 2017).

Os IAs da terceira geração são representados por letrozol, anastrozol e exemestano. Os dois primeiros são classificados como IAs não esteroidais porque inibem reversivelmente a aromatase, enquanto o exemestano bloqueia de forma irreversível esta enzima e por isso é denominado IA esteroideal (PEREZ, 2007). Em relação ao exemestano, este fármaco é comercializado na formulação oral de 25mg sob o nome Aromasin® (CHOUEIRII et al., 2004) e há estudos que avaliaram seus efeitos não apenas no tecido mamário, mas também na atividade óssea, metabolismo lipídico (MCCLOSKEY et al., 2007), no trato reprodutivo, glândula pituitária (MIRSKY

et al.,2011) e como quimioprevenção do câncer de mama em mulheres pós-menopausadas (GOSS et al., 2011).

Embora o tecido tumoral da mama seja capaz de produzir excessivamente estrógenos *in loco* através da superexpressão da aromatase, é necessário que haja precursores androgênicos suficientes para que ocorra a biossíntese destes hormônios (WOOD;CUPP, 2018). Portanto, a glândula adrenal, especificamente a zona reticular do córtex adrenal no qual produz e secreta os andrógenos, influencia diretamente no fornecimento de estrógenos ao tecido neoplásico da mama (SIMPSON et al, 2000).

No entanto, estudos experimentais que avaliam a influência do exemestano na glândula adrenal são escassos e limitados por razões éticas. Neste sentido, modelos experimentais têm sido desenvolvidos, apesar de ser reconhecido as limitações de extrapolação dos resultados de animais para humanos. Até o momento, apenas um estudo analisou histologicamente a influência do exemestano a zona fasciculada da glândula adrenal de ratas e relatou uma redução da espessura desta zona com aumento do número e proeminência dos sinusóides (MIRSKY et al., 2011). Contudo, nenhum estudo *in vivo* sobre a ação do exemestano no perfil proliferativo das células da zona reticular da adrenal foi encontrado na literatura.

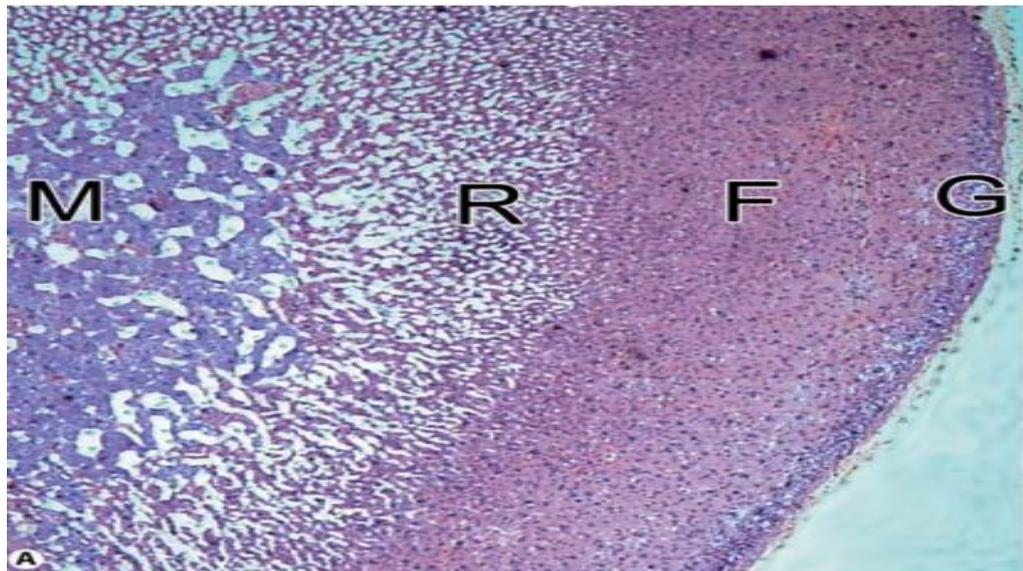
Tendo em vista o papel desempenhado pela zona reticular da adrenal como produtora dos precursores dos hormônios estrogênicos somado a ausência de dados sobre a influência dos IAs no perfil proliferativo nesta zona e utilizando um marcador sensível como anticorpo monoclonal anti-Ki-67, este estudo foi realizado.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Glândula adrenal

As glândulas adrenais, também denominadas suprarrenais, estão localizadas nos polos superiores dos rins e cada uma apresenta uma massa de aproximadamente 4 gramas. Histologicamente, estas glândulas são divididas em duas regiões: medula e córtex (Figura 1). A medula da adrenal corresponde em torno de 20% da sua massa total, secreta os hormônios epinefrina e noradrenalina sob estimulação direta do sistema nervoso simpático. Já o córtex adrenal, que representa cerca de 80% da massa total da glândula, é subdividido em três zonas distintas: glomerulosa, fasciculada e reticular (VINSON, 2009; HALL, 2011).

Figura 1: Secção histológica da glândula adrenal. M: medula; Z: zona reticular; F: zona fasciculada; G: zona glomerular.



Fonte: Adaptado de Silva et al., 2007.

A zona glomerulosa está localizada logo abaixo da cápsula da adrenal e é composta por uma fina camada de células secretoras de hormônios mineralocorticoides, especialmente a aldosterona. Esta zona é controlada principalmente pelas concentrações do líquido extracelular de potássio e pela angiotensina II, ambos tendo efeito positivo na liberação da aldosterona (SILVA et al., 2007).

A zona fasciculada é a camada mais extensa do córtex adrenal e secreta os hormônios glicocorticoides, com destaque para o cortisol. Esta zona é influenciada

principalmente pela ação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) liberado pelo eixo hipotalâmico-hipofisiário (VINSON, 2009).

A zona mais interna do córtex adrenal é a zona reticular, constituída por células dispostas de forma desordenada e que secretam hormônios androgênicos. Esta zona é estimulada principalmente pelo hormônio ACTH e, em menor proporção, pelo hormônio estimulante do androgênio cortical produzido pela hipófise. Contudo, o processo bioquímico envolvido no controle da produção e secreção dos androgênios adrenais ainda não estão completamente compreendidos como àqueles relacionados com os mineralocorticoides e glicocorticoides (HALL, 2011).

Os andrógenos são hormônios sexuais de 19 carbonos derivados do colesterol e são responsáveis pelas características fenotípicas masculinas. Os principais andrógenos sintetizados pelo córtex adrenal são testosterona, androstenediona, 16α -hidroxitestosterona e DEAH (dehidroepiandrosterona). Estes andrógenos são secretados na corrente sanguínea e utilizados em diversos tecidos periféricos como precursores dos estrógenos, através da conversão realizada pela enzima aromatase (SILVA et al., 2009).

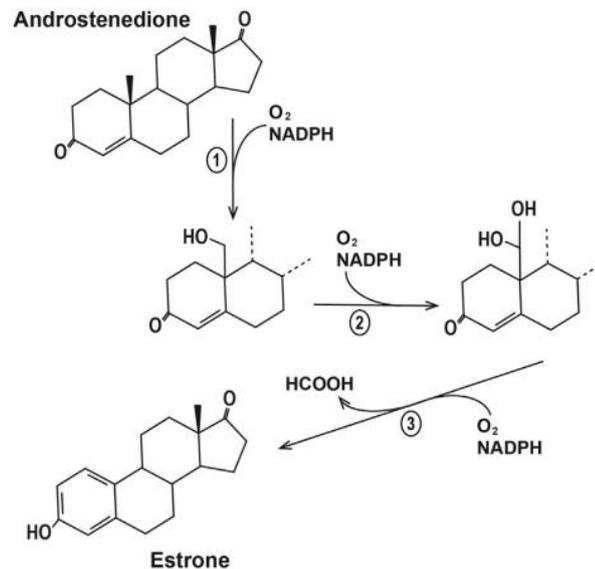
2.2 Aromatase

Aromatase é uma enzima que pertence à família do citocromo P450, sendo encontrada no retículo endoplasmático de vários tipos celulares de diferentes tecidos. Esta enzima foi purificada e sequenciada primeiramente na década de 80 através de estudos de tecidos obtidos de diferentes espécies de mamíferos, incluindo a placenta humana. A partir destes estudos, observou-se que a sequência desta proteína é altamente preservada entre espécies distintas de mamíferos, especialmente as sequências correspondentes ao local de ligação da enzima com seu substrato (WOOD;CUPP, 2018).

A aromatase está envolvida na conversão enzimática de andrógenos em estrógenos. As reações químicas envolvendo a aromatase nesta conversão podem ser divididas didaticamente em três etapas: nas duas primeiras ocorre a hidroxilação do andrógeno e na terceira etapa acontece a liberação de um átomo de carbono na forma de ácido fórmico e subsequente formação de um anel fenólico na molécula final, característica estrutural dos compostos estrogênicos (Figura 2). Além disso, cada andrógeno é precursor de um estrógeno específico, ou seja, testosterona é convertida

em estradiol, androstenediona em estrona e 16 α -hidroxitestosterona em estriol (NARDO;GILARD, 2013).

Figura 2: Conversão enzimática de androstenediona em estrona.



Fonte: Adaptado de Wood e Cupp, 2018.

Conforme Stocco (2012), a aromatase é normalmente expressa nos ovários, placenta, testículo, cérebro, osso, gordura e endotélio vascular de mamíferos. Curiosamente, os estrógenos produzidos nas gônadas (ovário e testículos) e na placenta são secretados na circulação sanguínea, resultando em uma ação sistêmica. Por outro lado, os estrógenos produzidos extragonadal não são liberados na circulação sanguínea, resultando em uma ação local.

Estudos recentes foram conduzidos com o objetivo de entender as características de liberação gonadal e extragonadal dos estrógenos, concluindo que a expressão da aromatase tem regulação tecido-específica através do gene CYP19 que, na espécie humana, está localizado no cromossomo 15 (SIMPSON et al., 2000).

Distúrbios genéticos que resultam na perda total ou parcial da atividade da aromatase são raros. Em mulheres, a perda da atividade da aromatase é imediatamente detectada, uma vez que a genitália externa é masculinizada. No entanto, em homens o fenótipo resultante da mutação no gene CYP19 é expresso apenas após a puberdade, ocorrendo infertilidade devido a espermatozoides imóveis. Interessantemente, gestantes em que o feto detém de mutação homozigótica no gene da aromatase também apresentam sinais transitórios de virilização como aumento de acne e hirsutismo. Isso acontece devido a redução da síntese de estrógeno placentar

combinada com a síntese androgênica aumentada pela adrenal fetal (WOOD;CUPP, 2018).

Enquanto as mutações no CYP19 que resultam em atividade reduzida ou ausente da aromatase são raras, alterações que resultam na expressão exagerada desta enzima e conseqüente aumento nos níveis estrogênicos são muito mais frequentes. Esta elevação dos níveis estrogênicos pode ser associada as doenças benignas como endometriose ou malignas, tal como neoplasias, i.e. câncer de mama, útero e próstata. Um exemplo é a alteração no éxon I e seus promotores do CYP19 que resultam na produção exagerada de estrógenos pelo tecido adiposo na glândula mamária, beneficiando o tumor neste tecido (WOOD;CUPP, 2018).

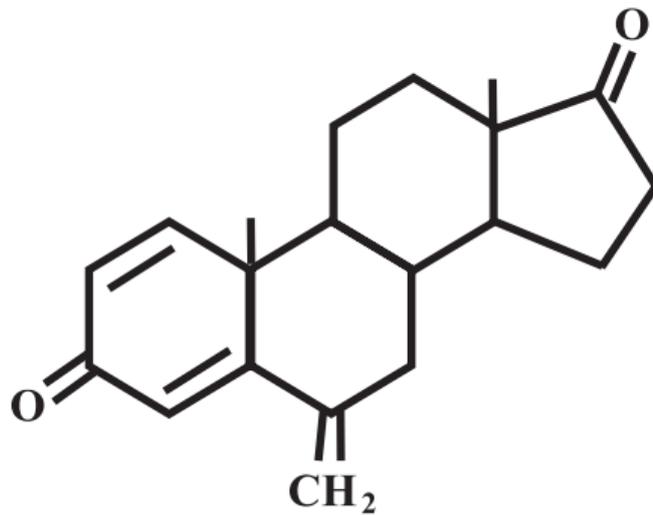
Em situações em que ocorre excesso de estrógenos, o bloqueio da atividade da aromatase é clinicamente relevante, especialmente em cânceres que se beneficiam de estrógenos como o câncer de mama ER+. Para isso, tem-se disponível a classe de medicamentos chamados de inibidores da aromatase, com destaque para àqueles da terceira geração: letrozol, anastrozol e exemestano. Os dois primeiros são classificados como inibidores não esteroidais da aromatase e apresentam uma ação inibidora reversível desta enzima. Por outro lado, o exemestano apresenta uma estrutura esteroidal e por isso é denominado inibidor esteroidal da aromatase, apresentando uma ação inibidora irreversível desta enzima (GHOSH et al., 2016).

2.3 Exemestano

Exemestano pertence ao grupo dos inibidores da aromatase da terceira geração, sendo aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) para tratamento hormonal do câncer de mama em 21 de outubro de 1999. Estruturalmente semelhante aos hormônios androgênicos, precursor dos estrogênios, é o único fármaco deste grupo a inibir irreversivelmente a aromatase, sendo denominado inibidor esteroidal da aromatase (PEREZ, 2007). Sua estrutura química está representada na figura 3.

Atualmente o exemestano é produzido pela Pfizer (New York, USA) e disponibilizado em formulação oral de 25mg, com o nome Aromasin®. Na dosagem de 25mg/dia, este fármaco apresenta uma ampla distribuição tecidual, uma rápida taxa de absorção com $T_{máx}$ em torno de 2 horas, e uma meia vida de 27 horas (CHOUEIRII et al., 2004).

Figura 3: Fórmula estrutural do exemestano (Aromasin®)



Fonte: Adaptado de Goss et al., 2004.

Este fármaco é indicado para o tratamento adjuvante do câncer de mama ER+ inicial em mulheres na pós-menopausa. Dados de estudos pré-clínicos e clínicos demonstram uma maior tolerabilidade e eficácia do exemestano quando comparado com tamoxifeno, fármaco considerado padrão ouro na terapia hormonal deste tipo de câncer (MCCLOSKEY et al., 2007).

Gao e colaboradores (2019), avaliaram *in vivo* e *in vitro* a ação do exemestano no tumor mamário e observaram que este fármaco não apenas inibe a proliferação das células cancerígenas da mama como também impede o aparecimento de novos tumores. Resultados similares foram obtidos para metabólitos do exemestano tais como 17-hidroximestano. O mesmo estudo também afirma que a ausência de resistência cruzada ao exemestano dá-se aos efeitos inibitórios dos metabólitos esteroideal androgênico resultante deste fármaco na produção da ciclina D1.

Um estudo clínico controlado, randomizado e duplo cego avaliou a ação quimiopreventiva do exemestano em 4560 mulheres pós-menopausadas. A triagem concluiu que este IA reduziu significativamente a incidência do câncer de mama invasivo nas mulheres com risco moderadamente elevado para câncer de mama. Além disso, nenhum efeito tóxico grave foi associado ao exemestano durante 3 anos de uso (GOSS et al., 2011).

Adicionalmente a ação anticancerígena do exemestano, estudos também relatam a interação deste medicamento com outros sistemas como esquelético,

endócrino, reprodutivo e cardiovascular. No tecido esquelético, este IA apresenta aparentemente uma ação estimuladora da formação óssea, contudo observa-se uma perda na densidade do osso resultando em risco elevado para fraturas (MCCLOSKEY et al., 2007; PEREZ, 2007). Em relação ao sistema reprodutivo, um estudo analisou histologicamente as alterações nos ovários e útero de ratas tratadas com exemestano durante 28 dias e não encontrou alteração estatisticamente significativa (MIRSKY et al., 2011).

Estudos clínicos e pré-clínicos concordam na influência do exemestano no metabolismo lipídico, alterando positivamente a razão das lipoproteínas LDL/HDL (MCCLOSKEY et al., 2007; PEREZ, 2007). Alterações histológicas na glândula pituitária de ratas sob uso deste IA também estão disponíveis na literatura (MIRSKY et al., 2011).

No entanto, estudos que pesquisam a ação farmacológica do exemestano na glândula adrenal são escassos e limitados. Mirsky e colegas (2011) relataram uma redução no peso desta glândula de ratas tratadas com exemestano, bem como uma redução da zona fasciculada do córtex adrenal. Curiosamente, estes autores também relataram um aumento do número e proeminência de sinusoides nesta zona. Resultados similares são descritos por Perez (2007). No entanto, até o momento, nenhum relato da atividade proliferativa da zona reticular da adrenal é descrito na literatura.

Avaliar a influência dos hormônios estrogênicos na fisiologia e patofisiologia em humanos é um grande desafio devido às limitações éticas. Neste sentido, modelos laboratoriais com uso de animais têm sido desenvolvidos e aprimorados objetivando aumentar o conhecimento acerca da ação estrogênica no tecido neoplásico e normal.

2.4 Modelo experimental

Devido a questões éticas, vários estudos foram e continuam sendo desenvolvidos para validar modelos laboratoriais que mimetizem as alterações hormonais, morfológicas e reprodutivas da Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) de humanos. Dentre os modelos envolvendo animais como ratos, hamsters, porquinhos da Índia, camundongos e primatas subumanos discutidos na literatura, àqueles que utilizam ratos são considerados os mais viáveis uma vez que estes

animais são relativamente pequenos, apresentam curto ciclo estral (4-5 dias), alta taxa reprodutiva e estão disponíveis em diferentes cepas genéticas (SILVA et al., 2009).

A literatura relata a indução de estro permanente relacionado a SOP em ratas utilizando estrogênios, androgênios, antiprogestinas e inibidores da aromatase ou expondo estes animais à luz contínua (SINGH, 2005).

A indução da SOP por luz contínua dependerá da intensidade, duração e características espectrais da luz usada. Dados de pesquisa apontam uma duração superior a 25 dias para a indução de anovulação crônica em ratas e que esta anovulação é reversível em 80% das ratas submetidas a ciclo dia/noite. Isto acontece devido a ovulação espontânea em ratos envolver o sistema neuroendócrino que é controlado pelo relógio biológico destes animais. Embora ainda não esteja claro os fatores fisiológicos subjacentes ao desenvolvimento da SOP por esta técnica, acredita-se que as ratas submetidas à luz constante desenvolvem estresse contínuo que ativa o sistema nervoso simpático resultando na hiperplasia da glândula adrenal (SINGH, 2005).

Outro modelo laboratorial da SOP em ratas baseia-se na administração de andrógenos nestes animais nos primeiros dias de vida (SILVA et al., 2002). A indução da SOP por este método gera alterações irreversíveis nos centros cíclico hipotalâmico responsáveis pelo *feedback* dos esteroides, resultando em ovários anovulatórios polifocilucar durante a puberdade e fase adulta. A utilização de androstenediona (GNODDE et al., 1979) desidroepiandrosterona -DHEA (MAHESH et al., 1982) e testosterona (OTA et al., 1983) já é descrito na literatura, existindo uma maior padronização para o último andrógeno na forma de propionato de testosterona.

O uso de estrógenos, especialmente estradiol, para indução de ovários policísticos em ratas também é citada na literatura. Diferentemente das ratas androgenizadas nos primeiros dias de vida, as ratas que recebem estradiol desenvolvem a SOP apenas na vida adulta, e com resultados discordantes entre os estudos disponíveis. Acredita-se que este método resulte em SOP devido ao aumento da atividade do sistema nervoso simpático que influencia no desenvolvimento de manutenção de cistos ovarianos (SINGH, 2005)

A administração de inibidores da aromatase, como o letrozol (KAFALI et al., 2004), e antiprogestinas, como mifepristona (SANCHEZ-CRIADO, et al., 1993), também induzem a SOP reversível em ratas recém nascidas. Apesar destes dois modelos serem escolhas menos frequentes pelos pesquisadores, estudos tem

demonstrado uma aparente efetividade na mimetização da SOP humana quando se utiliza ratas tratadas com mifepristona e letrozol.

3 OBJETIVO

Avaliar a influência do exemestano na proliferação celular da zona reticular da glândula adrenal de ratas sob constante estímulo estrogênico.

4.MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo e local do estudo

Este é um estudo experimental, controlado, randomizado, de cunho quantitativo realizado entre janeiro a dezembro de 2021 no biotério do Núcleo de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal do Piauí (UFPI), no Laboratório de Imunopatologia do Hospital São Marcos e na coordenação de ginecologia do Hospital Getúlio Vargas, todos localizados em Teresina, Piauí.

4.2 Calculo Amostral

O tamanho amostral foi obtido através do teste t de Student para duas amostras independentes com intervalo de confiança de 95% e alfa de 5%, realizado no software BioEstat 5.3. Para a realização do teste usou-se dados do estudo de Kubatka e colaboradores (2008), cujo desenho metodológico é similar ao desta pesquisa. O cálculo amostral evidenciou um número de 10 animais por grupo.

4.3 Modelo experimental da Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) e Administração do Exemestano (Aromasin®)

Foram usadas vinte ratas Wisters oriundas do biotério central da UFPI. A indução da SOP foi realizada no segundo dia após o nascimento, com administração de 1,25mg de propionato de testosterona diluído em 0,5ml de óleo de milho via subcutânea na região dorsocervical de todas as ratas (SILVA et al., 2007).

As vinte ratas foram mantidas em gaiolas de plásticos com tela metálica no topo, sendo alocados 4 animais por gaiola (Figura 4). As gaiolas foram armazenadas em uma sala com temperatura controlada ($22\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$) e com ciclo circadiano de 12h de luz e 12h de escuro, com ciclo de luz iniciando às 7h e finalizando às 19h com auxílio de lâmpadas fluorescentes.

Figura 4: Ratas em gaiolas com acesso livre à água e ração.



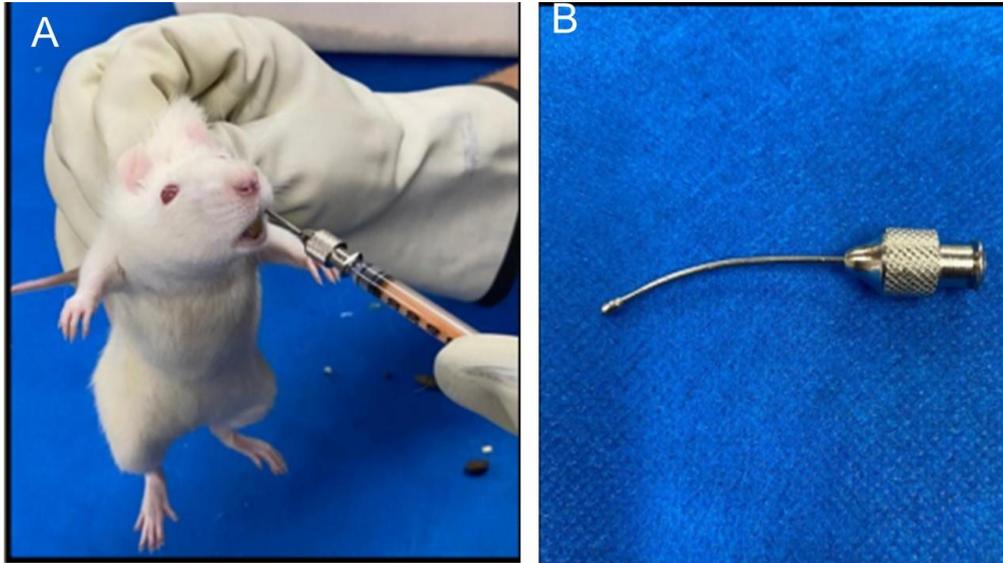
Fonte: Arquivo pessoal.

Após 90 dias, todos os animais foram avaliados para a presença do estro permanente considerando a obliteração do terço distal da vagina e a queratinização do epitélio vaginal, principal característica do androgenismo nestes animais. No total, 18 ratas foram consideradas em estro permanente e foram divididas randomicamente em dois grupos, de modo que o Grupo I (controle) contivesse 8 ratas e Grupo II (experimental) contivesse 10 ratas. Optou-se por um n maior no grupo experimental devido a se obter uma inferência estatística mais representativa.

Cada animal do grupo controle recebeu 0,5ml/dia de propilenoglicol por via oral com auxílio de uma sonda metálica de gavagem (Figura 5B). As ratas do grupo experimental receberam 10mg/kg/dia de exemestano diluído em 0,5ml de propilenoglicol também por via oral através de uma sonda metálica de gavagem (Figura 5A). O placebo e o exemestano foram administrados de forma contínua por 28 dias, sempre no horário entre 2h e 4h do turno vespertino.

Durante todo o estudo, as ratas tiveram livre acesso à água filtrada e à ração para roedores SUPRA LAB®.

Figura 5: Administração do exemestano (A) utilizando uma sonda de gavagem metálica (B).



Fonte: Arquivo pessoal.

4.3 Obtenção das glândulas

No 29º dia após o início da administração do exemestano, as ratas foram submetidas à eutanásia com dose excessiva dos anestésicos Midazolam (15mg/kg) e Ketamina (300mg/kg) pela via intraperitoneal. Em seguida, cada rata foi colocada em uma prancha de cortiça para a remoção das glândulas adrenais.

Os tecidos foram imediatamente fixados em formaldeído tamponado 10% por 24h e posteriormente foram submetidos à análise histológica e imunohistoquímica. Apenas uma glândula de cada animal foi analisada neste estudo, adotando como critério de escolha apenas a facilidade da remoção cirúrgica.

4.4 Análise histológica e imunohistoquímica

O tecido da adrenal foi cortado em seções de 5 mm de espessura. Estas seções foram processadas e coradas com hematoxilina e eosina (HE), para avaliação morfológica.

Em seguida, os cortes foram desidratados em concentrações crescentes de álcool absoluto e lavados com solução tamponada de pH 7,4. A avaliação imuno-

histoquímica com o marcador Ki-67 foi realizada usando um sistema de detecção combinado com um método de recuperação de antígeno. Para tanto, os cortes foram tratados com peróxido de hidrogênio a 3% diluído em solução tamponada durante cinco minutos para bloquear o peróxido endógeno. Após a recuperação do antígeno, as amostras de tecido foram incubadas com anticorpo monoclonal primário de camundongo anti Ki-67 (clone MIB-5/1:100) por 16h, durante a noite, em geladeira a aproximadamente 4°C. Em seguida, as amostras foram lavadas com solução salina tamponada e incubadas por 45 minutos com o sistema de detecção New Link Polymer. Para a leitura dessas reações, todas as lâminas foram tratadas com solução de tetracloridrato de 3-3-diamina benzidina na concentração de 1 mg/ml de solução salina tamponada com Tris e solução de peróxido de hidrogênio por cinco minutos, depois contrastada com hematoxilina de Harris por cinco minutos, seguido por desidratação em banhos de álcool etílico e xilol. As células foram consideradas positivas para expressão imunohistoquímica do antígeno Ki-67 quando o núcleo apresentou coloração amarronzada (BARROS-OLIVEIRA, 2017).

4.5 Quantificação

Todas as células com o núcleo corado em marrom, mesmo que fracamente, foi considerada positivo para expressão do Ki-67.

A contagem das células foi realizada na clínica ginecológica do Hospital Getúlio Vargas, utilizando o sistema computadorizado constituído por um microscópio de luz da 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 (Figura 6).

Figura 6: Sistema computadorizado utilizado na contagem das células. 1: Microscópio óptico; 2: Câmara de vídeo digital; 3: Software usado na contagem celular.



Fonte: Arquivo pessoal.

A leitura das lâminas histológicas foi realizada no aumento de 400x. Em cada lâmina, contou-se 500 células em campos aleatórios iniciando na área de maior concentração de núcleos corados em marrom. Nesta etapa, usou-se o Software de Processamento e Análise de imagem Imagelab® (SOFTIUM Informática LTDA, São Paulo, Brasil), para evitar a contagem repetida de uma mesma célula. A porcentagem de células marcadas com anticorpo anti-Ki-67 foi obtida pela seguinte fórmula $nC/nT \times 100$, onde nT refere-se ao número total de células contadas e nC ao número de células com núcleo marrom.

Todas as lâminas foram lidas por dois pesquisadores de forma independente. O número de células marcadas com anti-Ki-67 adotado neste estudo foi a média da quantificação dos dois pesquisadores.

4.6 Aspectos éticos

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), sob parecer de nº 641/20. Este estudo foi realizado seguindo as diretrizes na Diretriz Brasileira de Cuidados e Uso de Animais para Pesquisa Científica e Fins Didáticos conforme determina a Resolução Normativa

nº 12 de setembro de 2013 do Conselho Nacional de Controle de Experimentos Animais (CONCEA).

4.7 Análise estatística

Toda a análise estatística foi realizada no software BioEstat versão 5.3. A normalidade das distribuições dos dados foi confirmada por meio do teste de Shapiro-Wilk. O teste t de Student para duas amostras independentes foi utilizado na comparação entre as proporções médias de células coradas nos grupos controle e experimental. Adotou-se um nível significância de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

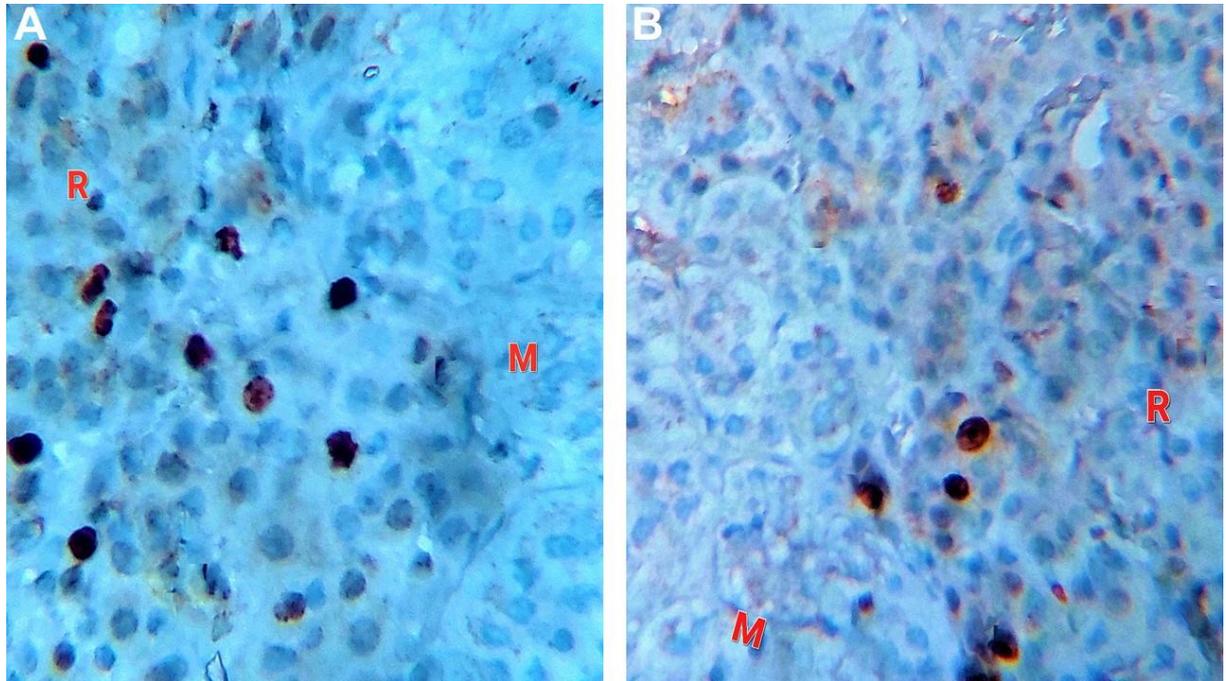
As ratas pertencentes ao grupo experimental apresentaram uma menor concentração de células com núcleos corados com anticorpo monoclonal anti-Ki-67 quando comparadas com as ratas do grupo controle, como mostra a tabela 1 e figura 7.

Tabela 1. Porcentagem das células marcadas com anticorpo Ki-67 de ratas androgenizadas (controle) e tratadas com exemestano (experimental).

Grupo	Lâminas	Pesquisador 1	Pesquisador 2	Média
Controle	1	30,0	31,1	30,5
	2	4.5	5,1	4,8
	3	15.3	16,0	15,6
	4	10.5	9,5	10,0
	5	25.7	30,1	27,9
	6	10.9	10,0	10.4
	7	22.8	18,9	20,8
	8	15.7	17,7	16,7
Experimental	9	8.8	6,1	7,4
	10	4.4	4,6	4,5
	11	0.2	0,4	0,3
	12	7.2	7,4	7,3
	13	3.2	3,1	3,1
	14	10.4	8,9	9,7
	15	2.9	2,5	2,7
	16	5.2	6,9	6,0
	17	3.6	3,1	3,3
	18	4.5	4,9	4,7

Fonte: Arquivo pessoal

Figura 7: Fotomicrografia de uma secção histológica da glândula adrenal de uma rata fêmea androgenizada, mostrando uma pequena parte da medula (M) e da zona reticular (R). Note a presença de numerosos núcleos corados em marrom com o anticorpo anti-Ki-67 antes do tratamento com exemestano, grupo controle (A) e escassos núcleos corados após tratamento, grupo experimental (B) (Ampliação original de 400x).



Fonte: Arquivo pessoal.

A análise quantitativa das porcentagens dos núcleos corados com Ki-67 mostrou uma média de 5,4 (erro padrão de 0,95) para o grupo experimental e 17,06 (erro padrão de 3,13) para o grupo controle, com $p < 0,003$ (Tabela 1).

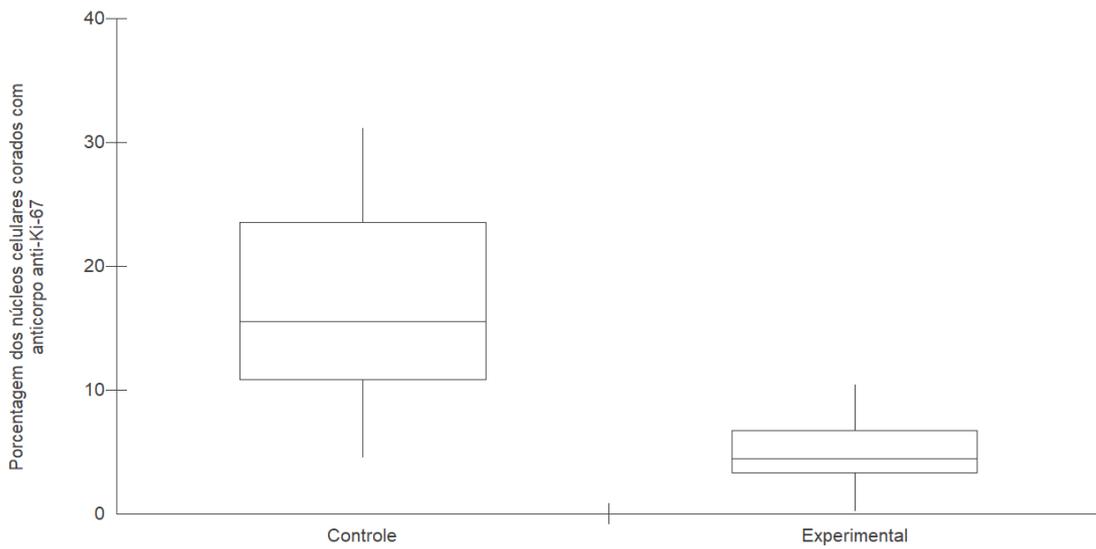
Tabela 2. Porcentagem média dos núcleos celulares corados com anticorpo anti-Ki-67 por 500 células nos grupos controle e experimental.

Grupo	Quantidade	Média	Erro Padrão	Máximo	Mínimo
Controle	8	17,06	3,13	31,1	4,5
Experimental	10	5,04*	0,95	10,04	0,2

Fonte: Arquivo pessoal. * Houve uma redução estatisticamente significativa na quantidade de núcleos celulares corados com anti-Ki-67 após tratamento com exemestano.

A diferença entre a porcentagem média dos núcleos celulares corados com o anticorpo anti-Ki-67 nas ratas pertencentes ao grupo controle e experimental pode ser claramente observada na figura 8.

Figura 8. Box plot evidenciando a diferença entre as porcentagens médias dos núcleos celulares corados com anticorpo anti-Ki-67 nos grupos controle e experimental.



Fonte: Arquivo pessoal.

6 DISCUSSÃO

Avaliar o perfil farmacodinâmico e farmacocinético de medicamentos com ação antitumoral em tecido humano com câncer de mama hormônio sensível é um grande desafio devido às limitações éticas. Portanto, o uso de modelos laboratoriais baseados em animais tornou-se uma alternativa sensata frente a este problema. O modelo baseado em ratas em estro permanente mimetiza a síndrome dos ovários policísticos, no qual os animais apresentam uma intensa proliferação do epitélio vaginal com subsequente obliteração do terço distal da vagina, sendo esta a característica que define este modelo (BARROS-OLIVEIRA et al., 2017).

No modelo laboratorial de ratas fêmeas em estro permanente, as ratas estão sob constante estimulação estrogênica e por isso este modelo torna-se uma escolha interessante para estudos que avaliam compostos que inibem a síntese de estrogênios, como os inibidores da aromatase (CHAGAS et al., 2020). Por esta razão, esta pesquisa optou por este modelo para avaliar a ação do exemestano, um inibidor da conversão enzimática de andrógenos em estrógenos, na zona reticular da glândula adrenal, local de síntese dos andrógenos.

Os escassos estudos que avaliam os efeitos do exemestano em tecidos de ratas são controversos quanto a dosagem, tempo e via utilizada para administração deste fármaco. Os estudos que utilizaram a via intramuscular para a administração do exemestano usaram dosagens de 50 e 100µg/dia durante 12 semanas (JELOVAC et al., 2004), de 100mg/kg/semana por 16 semanas (GOSS et al., 2004) e 10, 30 e 100mg/kg/semana durante 3 semanas (GOOL et al., 2010). Por outro lado, as pesquisas que adotaram a via oral para administração deste fármaco usaram dosagem de 1mg/kg/dia e 10mg/kg/dia por 13 semanas (KUBATKA et al., 2008) e dosagem única de 1000mg/kg (MIRSKY et al., 2011).

Neste estudo foi usado a via oral, através da técnica de gavagem, para administração do exemestano nos animais avaliados. Embora mais laboriosa, essa via de administração é similar a rota comumente usada pelas fêmeas da espécie humana, no qual se adota uma dosagem de 25mg/dia para mulheres posmenopausadas com câncer de mama hormônio sensível (CHOUEIRII et al., 2004). Contudo, é importante destacar que há diferenças nas taxas de absorção e metabolização de drogas entre humanos e ratos, no qual estes últimos apresentam metabolismo mais elevado. Neste sentido, nesta pesquisa adotou-se pela dosagem de 10mg/kg/dia, que equivale a

2,5mg/animal/dia, no qual apresenta similaridade a dosagem clínica de 25mg/dia usada no tratamento do câncer de mama em mulheres posmenopausadas (KUBATKA et al., 2008).

Em relação a mensuração da proliferação celular, muitos estudos têm adotado o uso do anticorpo monoclonal anti-Ki-67 (MIB-5) visto a alta sensibilidade desta técnica. Ki-67 é uma proteína antigênica nuclear presente em todas as células nas fases ativas da divisão celular (G1, S, G2 e mitose) mas ausente na fase de senescência da célula, isto é, na fase G0. Esta característica particular desta proteína antigênica de ser expressa somente nas células em proliferação é uma vantagem significativa do anticorpo anti-Ki-67 quando comparado a outros marcadores de proliferação celular, como o Antígeno Nuclear da Proliferação Celular (PNCA, sigla em inglês), uma vez que este último está presente em todas as fases do ciclo celular (SILVA, 2009).

Silva e colaboradores (2007) avaliaram as alterações morfológicas e morfométricas do córtex adrenal de ratas em estro permanente e observaram um aumento do peso da adrenal quando comparado com a adrenal do grupo controle (sem estro permanente). No microscópio óptico, os autores verificaram que a espessura da zona glomerular e reticular das ratas androgenizadas eram significativamente mais espessas e vascularizadas que às ratas do grupo controle. Contudo, nenhuma diferença estatisticamente relevante foi observada na zona fasciculada dos grupos controle e experimental.

Objetivando determinar evidências histológicas no trato reprodutivo e endócrino de ratas tratadas com exemestano por 28 dias, um estudo observou uma redução no peso da glândula adrenal. No entanto, a análise histológica evidenciou aumento na espessura apenas da zona fasciculada do córtex adrenal, sem alterações significativas nas zonas reticular e glomerulosa (MIRSKY et al., 2011). Gool e colaboradores (2010) também encontraram uma redução significativa no peso da glândula adrenal ($p < 0,05$) de ratas fêmeas tratadas com exemestano quando comparado com a adrenal de ratas ovarioctemizadas.

A proliferação celular da zona reticular da glândula adrenal de ratas androgenizadas é bem documentada por Silva e colaboradores (2009), que compararam a expressão do antígeno Ki-67 na zona reticular de ratas sem estro permanente (controle) com ratas androgenizadas, no qual estas últimas apresentaram maior média percentual de núcleos corados com anticorpo anti-Ki-67.

Neste estudo, as ratas androgenizadas (grupo controle) mostraram maior concentração de núcleos corados com anticorpo anti-Ki-67 no tecido analisado quando comparado com o grupo tratado com exemestano. Embora os fatores subjacentes a esta redução não estejam completamente elucidados, um estudo analisou a influência da deficiência estrogênica na glândula adrenal de ratos nocautes de aromatase e relatou redução da expressão do gene da transcriptase reversa da telomerase (TRT) com consequente encurtamento dos telômeros associado a redução da proliferação celular do córtex adrenal e atrofia adrenal, sugerindo que a expressão do gene da TRT e o encurtamento dos telômeros podem controlar a proliferação celular em torno da adrenal (BAYNE et al., 2008).

Infelizmente, a comparação dos resultados deste estudo com dados da literatura é dificultada pela escassez de pesquisas similares disponíveis e por estas serem limitadas apenas à análise histológica, não realizando uma abordagem mais aprofundada da proliferação celular.

As alterações do exemestano no perfil metabólico dos lipídeos em humanos e animais são descritas na literatura. Utilizando um modelo premenopausa de câncer de mama, Kubatka e col. (2008) relataram uma redução do colesterol total, triglicerídeos, lipoproteína de baixa densidade (LDL) e alta densidade (HDL) nas ratas tratadas com exemestano comparado com o grupo controle. Resultados similares foi relatado por Goss e col. (2004) em ratas ovarioectomizadas tratadas com exemestano.

Entretanto, os estudos que abordam as alterações do exemestano no lipidograma em humanos são controversos. Um estudo multicêntrico e randomizado envolvendo mulheres pós-menopausadas saudáveis, observou um aumento significativo na razão das lipoproteínas de baixa densidade com a alta densidade (LDL/HDL), fortemente impulsionada pela redução dos níveis plasmáticos de HDL (MCCLOSKEY et al., 2007). Por outro lado, uma pesquisa duplo-cega, controlada e randomizada não encontrou correlação significativa no uso do exemestano e alterações dos níveis plasmáticos de colesterol total e triglicerídeos (GOSS et al., 2011), mas não citou as frações lipoproteicas do colesterol, i.e. LDL e HDL.

Apesar do parâmetro bioquímico dos lipídeos não ter sido objeto de estudo desta pesquisa, estes dados são importantes uma vez que o metabolismo lipídico é fortemente influenciado pelos hormônios corticais da glândula adrenal, especialmente a zona fasciculada e reticular (HALL, 2011).

Um estudo clínico avaliou o potencial quimiopreventivo do exemestano para o câncer de mama em 4560 mulheres pósmenopausadas com idade média de 62,5 anos, e concluiu que este IA esteroidal reduziu significativamente o câncer de mama invasivo nas mulheres com risco moderadamente aumentado para este tipo de câncer. Além disso, este estudo não relacionou o uso prolongado de exemestano, i.e. acima de 3 anos, com nenhum efeito colateral grave, mas houve mudanças mínimas na qualidade de vida geral das participantes do estudo (GOSS et al., 2011).

Um estudo multicêntrico, randomizado, aberto analisou indiretamente a função da zona glomerulosa e fasciculada da glândula adrenal de 32 mulheres pós-menopausa saudáveis que utilizaram exemestano (25mg) uma vez ao dia durante 24 semanas. A função da adrenal das 32 participantes foi determinada pelos níveis sorológicos dos hormônios cortisol e aldosterona no início do tratamento e 24 semanas após receberem o exemestano. Os pesquisadores concluíram que o perfil funcional da adrenal das 32 mulheres não foi afetado pelo uso deste IA (MCCLOSKEY et al., 2007). Infelizmente, os pesquisadores não avaliaram a função da zona reticular destas participantes, o que limita a extrapolação de seus resultados à avaliação geral da função da adrenal. Além disso, a comparação dos resultados desta triagem clínica com os achados deste estudo apresenta limitações profusas, uma vez que neste estudo avaliou-se a ação do exemestano em um modelo em constante estimulação estrogênica, ou seja, com uma adrenal hiperplásica.

7 CONCLUSÃO

Ratas androgenizadas submetidas ao tratamento oral com exemestano na dosagem de 10mg/kg/dia durante 28 dias apresenta significativa redução na expressão do antígeno Ki-67 nas células da zona reticular da glândula adrenal.

Devido às limitações amostrais ocorridos no grupo controle deste estudo somado as discordâncias quanto a influência deste inibidor da aromatase esteroidal na síntese dos hormônios corticais da adrenal, novas pesquisas são encorajadas para aumentar o conhecimento sobre o perfil farmacodinâmico do exemestano em modelos laboratoriais pré e pós-menopausa.

REFERÊNCIAS

BARROS-OLIVEIRA, M. C.; COSTA-SILVA, D. R.; Andrade, D. B.; BORGES, U. S.; SILVA, V. C.; BORGES, R. S. et al. Ki-67 antigen expression in the mammary epithelium of female rats in persistent estrus treated with anastrozole. **Gynecological Endocrinology**. v.33, n. 5, p. 359-363, may. 2017.

BAYNE, S.; JONES, M. E. E.; LI, H.; PINTO, A. R.; SIMPSON, E. R.; LIU, J. P. Estrogen deficiency leads to telomerase inhibition, telomere shortening and reduced cell proliferation in the adrenal gland of mice. **Cell Research**. v. 18, n. 11, p. 1141–1150, oct. 2008.

CHOUERI, T. K.; ALEMANY, C. A.; ABOU-JAWDE, R. M.; BUDD, G. T. Role of aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. **Clinical Therapeutics**. v. 26, n. 8, p. 1999-1214, jun. 2004.

GAL, L.; BAO, Z.; DENG, H.; LI, X.; LI, J.; RONG, Z. et al. The beneficial androgenic action of steroidal aromatase inactivators in estrogen-dependent breast cancer after failure of nonsteroidal drugs. **Cell Death and Disease**, v. 10, n. 494, p.1-14, jun. 2019.

GOL, S. A.; WIT, J. M.; SCHUTTER, T.; CLERCK, N.; POSTNOV, A. A.; HOVINGA, S. K. et al. Marginal growth increase, altered bone quality and polycystic ovaries in female prepubertal rats after treatment with the aromatase inhibitor exemestane. **Hormone Research in Paediatrics**. v.73, n.1, p. 49-60, 2010.

GOSS, P. E.; QI, S.; JOSSE, R. G.; PRITZKER, K. P. H.; MENDES, M.; HU, H.; WALDMAN, S.D. et al. The steroidal aromatase inhibitor exemestane prevents bone loss in ovariectomized rats. **Bone**. v.34, n. 3, p. 384-392, mar., 2004.

GOSS, P. E.; INGLE, J. N.; ALÉS-MARTÍNEZ, J. E.; CHEUNG, A. M.; CHLEBOWSKI, R.T.; WACTAWSKI-WENDE, J. et al. Exemestane for breast-cancer prevention in postmenopausal women. **The New England Journal of Medicine**. v. 364, n. 25, p. 2381-2391, jun. 2011.

GHOSH, D.; LO, J.; EGBUTA, C. Recent progress in the discovery of next generation inhibitors of aromatase from the structure-function perspective. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.9, n. 59, p. 5131–5148, jun. 2016.

GNODDE, H. P.; DIETEN, J. A.; VAN LOOK, P. F. Effect of androstenedione on the estrous cycle of the rat. **J Reprod Fertil**. v. 56, p. 675-678, 1979.

HALL, J. E. Tratado de fisiología médica. 12ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 1173 p. 2011. Cap. 77.

KAFALI, H., IRIADAM, M.; OZARDALI, I.; DEMIR, N. Letrozole-induced polycystic ovaries in the rat: a new model for cystic ovarian disease. **Archives of Medical Research**. v. 35, n. 2, p.103-138, mar. 2004.

KUBATKA, P. et al. Neoplastic effects of exemestane in premenopausal breast cancer model. **Neoplasma**, v.55, n.6, p.532-543, 2008.

JELOVAC, D.; MACEDO, L.; HANDRATTA, V.; LONG, B.J.; GOLOUBEVA, O. G.; INGLE, J. N. et al. Effects of Exemestane and Tamoxifen in a Postmenopausal Breast Cancer Model. **Clinical Cancer Research**. v. 10, p. 7375-7381, nov. 2004.

MAHESH, V. B.; COSTOFF, A.; MILLS, T. M.; BAGNELL, C. A. The polycystic ovary syndrome and experimental models for the study of its pathogenesis. **Progress in Clinical and Biological Research**. v. 112, p. 301-313, 1982.

MCCLOSKEY, E. V.; HANNON, R. A.; LAKNER, G.; FRASER, W. D.; CLACK, G.; MIYAMOTO, A. et al. Effects of third generation aromatase inhibitors on bone health and other safety parameters: Results of an open, randomised, multi-centre study of letrozole, exemestane and anastrozole in healthy postmenopausal women. **European Journal of Cancer**. v. 43, p. 2523 – 2531, oct. 2007.

MIRSKY, M. L.; SIVARAMAN, L.; HOULE, C.; POTTER, D. M.; CHAPIN, R. E.; CAPPON, G. D. Histologic and cytologic detection of endocrine and reproductive tract

effects of exemestane in female rats treated for up to twenty-eight days. **Toxicologic Pathology**. v. 39, n. 4, p. 589-605, 2011.

NARDO, G.D; GILARDI, G. Human aromatase: perspectives in biochemistry and biotechnology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. v. 60, n. 1, p. 92-101, jan-feb. 2013.

OTA, H.; WAKIZAKA, A.; FUKUSHIMA, M.; MAKI, M. Enhanced ovarian gonadotropin receptors in the testosterone-induced polycystic ovary in rats. **Tohoku Journal of Experimental Medicine**. v. 148, n. 3, p. 313-325, mar. 1986.

PEREZ, E.A. Safety of aromatase inhibitors in the adjuvant setting. **Breast Cancer Research and Treatment**. v.105, p.75-89, jul. 2007.

SÁNCHEZ-CRIADO, J. E.; SÁNCHEZ, A.; RUIZ, A.; GAYTÁN, F. Endocrine and morphological features of cystic ovarian condition in antiprogestosterone RU486-treated rats. **Acta Endocrinologica (Copenhagen)**. v. 129, n. 3, p. 237-245, sep. 1993.

SIMPSON, E.; RUBIN, G.; CLYNE, C.; ROBERTSON, K.; O'DONNELL, L.; JONES, M. et al. The role of local estrogen biosynthesis in males and females. **Trends Endocrinol Metabolism**. v. 11, n. 5, p. 184-188, jul. 2000.

SINGH, K. B. Persistent estrus rat models of polycystic ovary disease: an update. **Fertility and Sterility**. v.84., n.2, p. 1228-1234, out. 2005.

SILVA, B. B.; GONTIJO, J. A. R.; CRÉTÉ, A. R.; SIMÕES M. J. Evaluation of body weight in androgenized female rats. **Clinical and Experimental Obstetrics and Gynecology**. v. 29, n. 2, p. 97-99, 2002.

SILVA, B. B.; LOPES-COSTA, P. V.; ROSAL, M. A.; PIRES, C. G.; SANTOS, L. G; GONTIJO, J. A. et al. Morphological and morphometric analysis of the adrenal cortex of androgenized female rats. **Gynecologic and Obstetric Investigation**. v. 64, n. 1, p. 44–48, jan. 2007.

SILVA, B. B.; LOPES-COSTA, P. V.; SANTOS, A. R.; PIRES, C. G.; BORGES, C. S.; GONTIJO, J. A. Evaluation of Ki-67 antigen expression in the zona reticularis of the adrenal cortex of female rats in persistent estrus. **Human Reproduction**. v. 24, n.3, p. 705–709, dec. 2009.

STOCCO, C. Tissue physiology and pathology of aromatase. **Steroids**. v.77, n. 1-2, p. 27-35, jan. 2012.

VINSON, G. P. The adrenal cortex and life. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 5, n. 300, p. 2-6, mar. 2009.

WOOD, J. R; CUPP, A. S. Aromatization. **Encyclopedia of Reproduction**. v. 2, n. 2, p. 195-201, 2018.

ANEXOS

ANEXO A: Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Piauí.



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



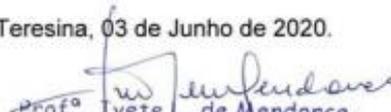
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil, CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada ***“Expressão do antígeno Ki-67 em ratas tratadas com exemestano”***, registrada nº **641/20**, 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 **Ad. Referendum**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/07/2020 a 31/10/2020
Espécie/Linhagem/raça	Rato heterogênico/ wistar
Nº de Animais	05
Peso/ Idade	250g a 450g/ adultas >90 dias prenhes, com a mesma idade gestacional.
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFPI.
Local de alojamento dos animais durante o experimento	Biotério do Núcleo de Tecnologia Farmacêutica da UFPI.
Grau de Invasividade	1

Teresina, 03 de Junho de 2020.


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

ANEXO B: Certificado de prorrogação de vigência da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Piauí.



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

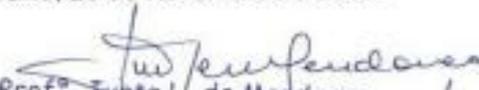


Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil. CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceuapi@ufpi.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "*Expressão do antígeno ki-67 em ratas tratadas com exemestano*", sob a responsabilidade do **Prof. Dr. BENEDITO BORGES DA SILVA** do **Departamento de Ginecologia/CCS/ UFPI**, com Carta de Aprovação nesta Comissão sob o nº **641/2020**, teve após análise da documentação recebida por esta Comissão, a sua solicitação de Prorrogação de Vigência para o período de **01 de Dezembro de 2020 a 31 de Agosto de 2021** e a Solicitação de alteração do local onde serão mantidos os animais durante o experimento para o **Biotério Setorial II (localizado no departamento de Biofísica e Fisiologia/CCS/UFPI)**, **Aprovadas** em Reunião datada de 20 de Novembro de 2020.

Teresina, 25 de Novembro de 2020.


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

