



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



DANIELLE BENIGNO DE ANDRADE E SILVA

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

TERESINA

2017

DANIELLE BENIGNO DE ANDRADE E SILVA

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

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
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 Vítor Lopes Costa
Co-Orientador: Prof°. Dr. Benedito Borges da Silva**

TERESINA

2017

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

Silva, Danielle Benigno de Andrade e.
S586e Expressão do antígeno ki-67 no endométrio de ratas em estro permanente
tratadas com anastrozol / Danielle Benigno de Andrade e Silva. -- Teresina,
2017.
61 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-
Graduação em Ciências e Saúde, 2017.
“Orientador: Prof. Dr. Pedro Vítor Lopes Costa.”
Bibliografia

1. Rata. 2. Estro permanente. 3. Anastrozol. I. Título. II. Teresina – Universidade
Federal do Piauí.

CDD 618

DANIELLE BENIGNO DE ANDRADE E SILVA

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
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 Vítor Lopes Costa
Co-Orientador: Prof°. Dr. Benedito Borges da Silva

Data da defesa: 31/03/2107

Presidente

**Prof. Dr. Pedro Vítor Lopes Costa
(UFPI-Presidente / orientador)**

1º Examinador

**Prof. Dr. Benedito Borges da Silva
(UFPI – Membro Interno)**

2º Examinador

**Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa
(UFPI – Membro Externo)**

Suplente

**Prof. Dr. Airton Mendes Conde Júnior
(UFPI – suplente)**

DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente a **Deus**, por estar sempre guiando minha vida, e por ter me iluminado e fortalecido para que essa conquista fosse possível.

Aos meus pais **Augusto Cezar e Maria da Graça/Olímpia Carvalho**, por todo amor, carinho, apoio e incentivo durante todas as etapas da minha vida.

Ao meu marido **Diógenes da Silva e Silva**, por sempre estar presente na minha vida, pelo amor, companheirismo, paciência e apoio sem os quais esse objetivo não teria sido alcançado.

Aos meus filhos **Pedro Augusto e Maria Clara**, que são minha maior fonte de inspiração.

DEDICATÓRIA ESPECIAL

DEDICATÓRIA ESPECIAL

Ao **Prof. Dr. Pedro Vítor Lopes Costa**, agradeço de maneira muito especial pelo acolhimento, por confiar na minha determinação em realizar este projeto, por ter aberto as portas do grupo de pesquisa do qual faz parte, pelo apoio e incentivos constantes, pela dedicação e pela disposição em sempre atender as minhas solicitações. Enfim por ter sido um mestre amigo e por ter conduzido a orientação deste trabalho com competência e segurança.

Ao **Prof. Benedito Borges da Silva**, mestre incansável e de extrema competência na arte de ensinar e orientar, por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa, pelo apoio e incentivo constantes, pela segura orientação em todas as etapas deste trabalho, desde a concepção da ideia, execução até conclusão desta pesquisa, pela disposição em sempre ajudar e compartilhar sua vasta experiência.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

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

À **Conceição Oliveira**, agradeço por compartilhar comigo toda as etapas de realização deste trabalho, todas as angústias e incertezas dessa caminhada, tornando, com sua ajuda e companheirismo, esse caminho mais fácil de ser percorrido.

Aos colegas do grupo de pesquisa do professor Dr. Benedito Borges, **Danylo, Vítor Hugo, Cleciton e demais alunos do mestrado**, pela ajuda e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos de trabalho no Instituto Federal do Piauí, **Ariane Santos e Kayo Figueiredo**, pelo incentivo, apoio e ajuda sempre que eu precisei durante toda essa caminhada.

Ao Magnífico **Reitor e Vice-Reitora da Universidade Federal do Piauí** pelo incentivo e apoio que vêm proporcionando à pesquisa e pós-graduação na UFPI.

A **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.

A 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 e prestadores de serviço do NTI – UFPI, em especial aos senhores **Ari e Sena**, constante auxílio.

Aos **funcionários da Ginecologia e Mastologia do Hospital Getúlio Vargas** em particular as Senhoras Eugênia e Isabel.

RESUMO

ANDRADE-SILVA, D.B. **Expressão do antígeno KI – 67 no endométrio de ratas em estro permanente tratadas com anastrozol.** 2017. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Saúde) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.

Introdução: Os inibidores da aromatase (IA), dentre eles o anastrozol, inibem a enzima aromatase reduzindo os níveis circulantes de estrogênio. Portanto, os IA tem sido utilizados de forma eficaz no tratamento de cânceres de mama estrogênio-dependentes na pós-menopausa e também na quimioprevenção, todavia o estudo dos efeitos diretos no endométrio humano encontra restrições éticas, razão pela qual utilizamos o modelo animal de ratas em estro-permanente, caracterizado pela produção constante de estrogênios, sendo portanto, ideal para o estudo do efeito de drogas que bloqueiam a síntese desses hormônios. **Objetivo:** Avaliar a expressão do antígeno Ki-67 no endométrio de ratas em estro permanente tratadas com anastrozol. **Métodos:** Vinte e oito ratas Wistar – Hannover adultas, virgens e estro permanente foram distribuídas aleatoriamente em 2 grupos: grupo I (n=14, controle) que receberam apenas veículo(propilenoglicol) e grupo II (n= 14, anastrozol) que receberam anastrozol 0,5mg/kg ou 0,125mg/animal/dia diluído em 0,1 ml de propilenoglicol durante 28 dias consecutivos, por gavagem. No 29º dia, os animais foram sacrificados e o terço proximal do útero foi imediatamente removido e fixados em formol tamponado a 10%. Em seguida, realizou-se estudo imunistoquímico padronizado. As células do epitélio endometrial com o núcleo corado em marrom foram consideradas positivas para a expressão do Ki-67. A porcentagem de células coradas foi obtida pela razão entre o número de células com núcleo corado e o número de total de células multiplicado por 100. Os dados foram analisados utilizando o teste t independente de Student e o teste de Mann – Whitney (p < 0,05). **Resultados:** A porcentagem média de núcleos corados por Ki-67 por 500 células no epitélio endometrial foi 53,2±26,3 e 5,9±7,1 nos grupos controle e experimental, respectivamente (p<0,0001). **Conclusão:** O anastrozol administrado na dose de 0,5 mg/Kg/dia durante 28 dias consecutivos, levou a uma redução estatisticamente da expressão do antígeno Ki-67 no endométrio de ratas em estro permanente.

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

ABSTRACT

ABSTRACT

ANDRADE-SILVA, D.B. **Expressão do antígeno Ki-67 no endométrio de ratas em estro permanente tratadas com anastrozol.** 2017. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Saúde) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.

Introduction: Aromatase inhibitors, in particular anastrozole, inhibit aromatase reducing estrogen levels and cell proliferation in endometrium 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 endometrium 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.

Aim: Evaluate the Ki-67 antigen expression in endometrium epithelium of rats in persistent estrus treated with anastrozole. **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 proximal third of the uterus 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 independent test and the Mann – Whitney test ($p < 0.05$). **Results:** The mean percentage of Ki-67-stained nuclei per 500 cells in the endometrium epithelium was $53,2 \pm 26,3$ and $5,9 \pm 7,1$, in the control and experimental groups, respectively ($P < 0.0001$). **Conclusions:** Treatment of adult rats in permanent estrus with 0.125 mg / animal / day of anastrozole for 28 days significantly decreased cell proliferation in the endometrium.

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Estrutura química do anastrozol.....	25
Figura 2-	Ratas em gaiolas com acesso livre á água e ração.	33
Figura 3-	Sonda metálica.....	35
Figura 4-	Administração do medicamento.....	35
Figura 5-	Sistema computadorizado utilizado para contagem de células 1:Microscopia óptica; 2: Vídeo câmera digital; 3: Software de análise de imagem.	37
Figura 6-	Fotomicrografia de corte histológico do endométrio de rata androgenizada que tomou propilenoglicol (veículo) por gavagem mostrando o endométrio com grande concentração de núcleos corados em marrom com anticorpo anti-Ki-67 MIB-5 (magnificação original x400).	41
Figura 7-	Fotomicrografia de corte histológico do endométrio de rata androgenizada que tomou anastrozol 0,125 mg/dia por gavagem mostrando o endométrio com uma pequena concentração de núcleos corados em marrom com anticorpo anti-Ki-67 em comparação ao grupo controle (magnificação original x400). 42	
Figura 8-	Boxplot da proporção de núcleos corados conforme grupo de ratas	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Classificação dos inibidores da aromatase.....	24
Tabela 2-	Medidas descritivas de porcentagem de núcleos corados para cada grupo.	43

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS, 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
NTI	Núcleo de Tecnologia farmacêutica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.	21
2	OBJETIVO.	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS.	32
3.1	Tipo de estudo e local de realização.	33
3.2	Critérios de inclusão da amostra.	33
3.3	Critérios de não-inclusão da amostra.	34
3.4	Cálculo Amostral.	34
3.5	Divisão dos Grupos.	34
3.6	Métodos.	35
3.6.1	Método Histológico.	35
3.6.2	Método Imunoistoquímico.	36
3.6.3	Método Quantitativo.	36
3.6.4	Método Estatístico.	38
3.7	Aspectos Legais e Éticos.	38
4	RESULTADOS.	39
5	DISCUSSÃO.	45
6	CONCLUSÃO.	49
	REFERÊNCIAS.	52
	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, no The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology	61

O endométrio humano, mucosa que reveste a face interna da cavidade úterina, é constituído por um epitélio cilíndrico simples e por duas camadas, a basal que se apoia no miométrio e a camada funcional que se opõe ao lúmen uterino. A camada funcional subdivide-se ainda em estrato compacto, que é superficial e delgado, onde se encontram glândulas e estroma denso e estrato esponjoso, onde estão glândulas, muito estroma e tecido intersticial frouxo. O endométrio em mulheres na fase reprodutiva passa pelas fases proliferativa, que vai aproximadamente do 6º ao 14º dia do ciclo endometrial, apresentando picos de estrogênio em torno de 24 a 36 horas antes da ovulação. Após a ovulação vem a segunda fase ou fase endometrial secretora com duração de cerca de 12 a 14 dias, onde níveis de estrogênio e progesterona inicialmente elevados são seguidos de níveis baixos destes hormônios sobrevivendo a menstruação com duração de cerca de cinco dias (HOFFMAN et al, 2014).

Algumas alterações patológicas estão relacionadas à atividade proliferativa do endométrio, sobretudo como consequência de determinadas terapias medicamentosas. A terapia hormonal estrogênica empregada para amenizar os sintomas da menopausa assim como o uso dos moduladores seletivos de estrógeno (SERMs), indicados para o tratamento do câncer de mama, dentre outras terapias, podem levar à proliferação das células do endométrio e ao desenvolvimento gradual de hiperplasias, pólipos e até mesmo carcinomas endometriais. Isso se deve ao fato de que o estrogênio exerce uma ação proliferativa sobre o endométrio, tanto no estroma quanto nos epitélios de revestimento e glandular (DA SILVA et al , 2000; MORAES et al, 2006; HU et al,2015; KI -CHAN NA, 2016).

Dentre os principais SERMs está o tamoxifeno, um Modulador Seletivo do Receptor de Estrogênio de primeira geração, que foi inicialmente desenvolvido como anticoncepcional e posteriormente utilizado para induzir a ovulação. Foi aprovado em 1978 pelo *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos para tratamento adjuvante do câncer de mama e, em 1998, para quimioprevenção primária em pacientes de alto risco para câncer de mama (FISHER et al, 1998; DOS SANTOS, et al. 2009; KI -CHAN NA, 2016).

O tamoxifeno pode agir como agonista parcial do estrogênio em alguns tecidos e como antagonista em outros, dependendo da espécie, dos órgãos alvos e da concentração desse hormônio nos tecidos. Na mama o tamoxifeno tem ação antiestrogênica por se ligar ao RE e impedir, de forma competitiva, a ação do

estrogênio no tecido mamário. No endométrio, apresenta uma ação antagonista no período da pré-menopausa uma vez que os níveis de estrogênio estão elevados, e agonista, na pós-menopausa, quando os níveis de estrogênio estão baixos. Este comportamento agonista do tamoxifeno no endométrio de mulheres menopausadas estimula atividade proliferativa deste tecido podendo causar hiperplasias, pólipos e carcinomas(PATRIARCA et al,1996; RODRIGUES-JÚNIOR et al, 2012). O risco de carcinoma endometrial com o uso prolongado de tamoxifeno é cerca de 3-7 vezes maior em mulheres na pós-menopausa(FISHER et al,1998).

As estratégias endócrinas para mulheres na pré-menopausa têm-se centrado em métodos de ablação dos ovários como: cirurgia, irradiação e uso de medicações, principalmente do tamoxifeno. Todavia, no endométrio, esse fármaco apresenta uma ação antagonista no período da pré – menopausa uma vez que os níveis de estrogênio estão elevados, e agonista, na pós –menopausa, quando os níveis de estrogênio estão baixos, aumentando as chances de desenvolvimento de patologias endometriais em decorrência do estímulo à proliferação epitelial neste tecido (PATRIARCA et al ,1996; RODRIGUES-JÚNIOR et al., 2012;JEON et al, 2017). Por outro lado, estudos têm demonstrado uma superioridade da terapia com inibidores da aromatase, em comparação as terapias com o tamoxifeno, em mulheres na pós-menopausa, uma vez que estes fármacos se mostraram tão efetivos quanto o tamoxifeno sem, contudo, estimular a proliferação celular no endométrio (OLIVEIRA; ALDRIGHI; RINALD, 2006). Diante disso, vem crescendo o interesse dos pesquisadores em investigar se os resultados obtidos com o uso de inibidores da aromatase podem ser aplicados a uma população na pré-menopausa (DOWSETT; HAYNES, 2003; CLEMONS; COLEMAN; VERMA, 2004; DELLAPASQUA et al., 2005).

Na fase reprodutiva da mulher, a biossíntese de estrogênios ocorre principalmente nos ovários e exige uma ação combinada das gonadotrofinas, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH), sobre as células da teca e da granulosa do ovário. O LH agindo sobre as células da teca estimula a produção de androgênio, androstenediona e testosterona que por sua vez são secretados no líquido extracelular, se difundem pela membrana basal até as células da granulosa fornecendo os precursores para a produção de estrogênio. As células da granulosa sob estimulação do FSH e dos elevados níveis de atividade da enzima aromatase convertem os androgênios em estrogênios (NOTHNICK, 2011; HOFFMAN

et al, 2014). Na menopausa a síntese desses esteroides acontece no córtex da glândula supra - renal, onde são produzidos pela zona reticular por expressão do gene 17 α – hidroxilase, na forma de androgênios, e convertidos em estrogênios nos tecidos periféricos, pela ação da aromatase (BOON, 2010).

Os inibidores de aromatase têm como indicação a quimioprevenção da recidiva do câncer de mama após cirurgia ou a prevenção de metástases em mulheres na menopausa (MATSUZAKI, 2006; OLIVEIRA; ALDRIGHI; RINALD, 2006). Dividem-se em três gerações e são classificados quanto a sua estrutura química e tipo de inibição enzimática em: 1) inibidores propriamente ditos com ação não esteróide e; 2) inativadores com estrutura esteróide. Do ponto de vista farmacológico a diferença entre inibidores e inativadores repousa no fato de que os inativadores se ligam definitivamente à enzima aromatase, ao passo que os inibidores funcionam como antagonistas competitivos e, portanto, se ligam temporariamente a essa enzima (SAAD et al,2002; ATTAR;BULUN,2006; PAVONE;BULUN,2012; HASHIM,2014).

A primeira geração de inibidores induz uma adrenalectomia medicamentosa a qual produz efeitos colaterais como letargia, erupções cutâneas e náuseas. Os inibidores de segunda geração têm menos efeitos colaterais, mas apresentam a desvantagem de ter como única via de administração, a intramuscular. O anastrozol e o letrozol, representantes da terceira geração, são seletivos, reversíveis e potentes inibidores da enzima aromatase (Tabela1) (PAVONE;BULUN,2012; GOBBI et al, 2014; HASHIM,2014).

Tabela 1 - Classificação dos Inibidores da aromatase

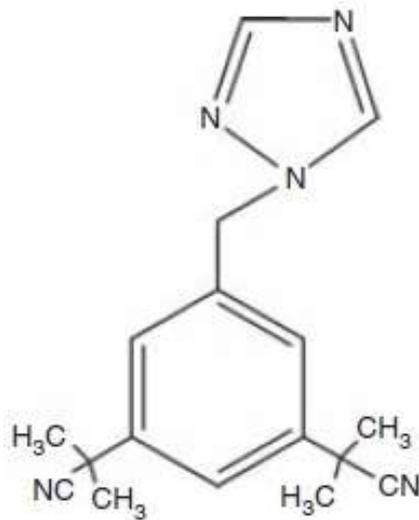
	INIBIDORES	INATIVADORES
PRIMEIRA GERAÇÃO	Aminoglutetimida	
SEGUNDA GERAÇÃO	Fadrozol	Formestano
TERCEIRA GERAÇÃO	Anastrozol, Letrozol	Exemestano

Fonte: modificado de SAAD et al, 2002.

O anastrozol é um inibidor de aromatase não esteroidal, de terceira geração, derivado do benzotriazol, que foi desenvolvido para o tratamento do câncer de mama. Em 2002, esta droga foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos para ser utilizada em mulheres na pós-menopausa para o tratamento

do câncer de mama/Receptor de Estrogênio (ER) positivo; para o tratamento inicial do câncer de mama; para sua quimioprevenção e para mulheres pós-menopáusicas, como uma alternativa ao uso do tamoxifeno. O anastrozol é comercializado como ARIMIDEX® pela AstraZeneca Pharmaceuticals LP (Wilmington, D.E) (Figura 1) (BUZDAR,2003; FABIAN, 2007; GOLDBIRSCH et al., 2009).

Figura 1 - Estrutura química do anastrozol.



Fonte: Adaptado de GEISLER; LONNING (2005).

Para promover a inibição da aromatase e consequente diminuição da síntese de estrogênios, o anastrozol é utilizado na dose de 1 mg/dia por via oral, sendo rapidamente absorvido se ingerido em jejum e apresentando taxa de absorção mais lenta se ingerido após as refeições, no entanto, nenhum efeito foi observado sobre a extensão da absorção (SANFORD; PLOSKER, 2008; MILANI; JHA; POTTER, 2009). Atinge a concentração plasmática máxima dentro de duas horas após a administração e menos de 10% do anastrozol é excretado como fármaco inalterado, ao passo que 60% é excretado na forma de metabólitos inativos (SANFORD; PLOSKER, 2008; DI NARDO;GILARDI, 2013) .

A metabolização do anastrozol ocorre, predominantemente, por via hepática através das reações de hidroxilação e N- glucuronidação, mediadas pelas enzimas CYP3A4 e UGT1A4, resultando nos seguintes metabólitos: hidroxianastrozol,

hidroxianastrazol conjugado e anastrazol N-glucuronide. Apresenta meia vida plasmática de 50 horas e seus metabólitos são inativos, portanto, não suprimem a atividade da aromatase, sendo eliminados principalmente através da urina. De maneira geral os inibidores de aromatase de terceira geração são drogas bem toleradas e os efeitos pró-estrogênicos, característicos do tamoxifeno, são menos frequentes. No entanto alguns efeitos adversos estão ligados ao uso dessa medicação: desordens musculoesqueléticas, artralguas e perda de densidade mineral óssea (INGLE et al., 2010; KAMDEM et al., 2010).

O anastrazol tem a capacidade de bloquear a síntese de estrógenos que ocorre sob efeito da enzima aromatase, sem interferir em outras vias esteroidogênicas, uma vez que apresenta uma elevada seletividade para essa enzima. Desta forma pode-se explicar a maior eficácia dessa medicação em mulheres sem ovários funcionais, seja por ablação ovariana, na pré-menopausa ou por insuficiência ovariana, na pós-menopausa, situações onde a síntese de estrógenos depende da aromatização de andrógenos em sítios extra - ovarianos (FABIAN et al, 2007; BHATNAGA, 2007; INGLE et al., 2015). Por ser um agonista competitivo, o anastrazol interage reversivelmente com a molécula heme da aromatase, inibindo tanto a interação do ligante quanto do oxigênio com o complexo enzimático e, conseqüentemente, impedindo a aromatização esteroideal. A inibição é reversível e a manutenção do efeito depende da presença contínua da droga (LAKE; HUDIS, 2002; BHATNAGA, 2007).

Por implicações éticas, a investigação dos efeitos do anastrazol no endométrio de mulheres fica impossibilitada. Razão pela qual a utilização do modelo animal representa uma alternativa que tem contribuído bastante para a compreensão da biologia e desenvolvimento de estratégias terapêuticas no endométrio, embora apresente limitações quanto à extrapolação de resultados para seres humanos (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 fisiologia ovariana e endometrial semelhantes as da espécie humana, é a rata. Assim como nas mulheres, o endométrio de ratas é também a túnica mucosa da cavidade uterina, apresentando-se revestido por um epitélio simples prismático com numerosas invaginações tubiliformes, as glândulas uterinas. Ratas apresentam ciclos estrais, regulares e sucessivos, do tipo poliestro, com duração de quatro a seis dias, divididos em quatro fases: proestro, estro, metestro e diestro. Durante esses ciclos o útero sofre um

variado número de transformações morfológicas, sob influência do estrogênio e da progesterona, assim como ocorre em mulheres na idade fértil. A rata androgenizada ou em estro permanente é um modelo biológico que se encontra sob constante estímulo estrogênico, portanto, uma boa opção para o estudo de drogas que bloqueiam a síntese estrogênica (DA SILVA et al, 2007; DA SILVA et al., 2009).

O androgênio, mais especificamente a testosterona, aplicada na dosagem de 1,25 mg de propionato de testosterona em solução oleosa até o quinto dia de vida, lesa os neurônios da área supraquiasmática do hipotálamo anterior que perdem sua característica cíclica sofrendo masculinização, ao passo que a eminência mediana do hipotálamo (região tônica) não sofre influência dessa aplicação de androgênio mantendo constante a liberação de FSH que amadurece os folículos tornando-os sensíveis às pequenas quantidades de LH, resultando em produção permanente de estrogênios. Dessa forma os ovários das ratas em estro permanente estão sob constante estímulo estrogênico não havendo, via de regra, nem ovulação ou produção de progesterona (BARRACLOUGH, 1961; DA SILVA et al., 2009; DA SILVA et al., 2007).

Em estado anovulatório induzido pela testosterona, as ratas apresentam: maior peso corpóreo; maior peso do fígado, coração, rins, hipófise, tireoide e adrenais; menor volume dos ovários com ausência de corpo amarelo, numerosos folículos vesiculares e hiperplasia do tecido intersticial; útero sem distensão por acúmulo de líquido como ocorre na fase estral e no tratamento estrogênico e miométrio sem alterações. O endométrio das ratas em estro permanente apresenta estroma compacto, edematoso e com poucas glândulas; epitélio hipertrófico composto por células colunares altas e metaplasia escamosa (BARRACLOUGH, 1961). Apresentam ainda anovulação, ovários policísticos e obliteração do terço externo da vagina (HARRIS; LEVINE, 1965; DA SILVA et al, 2007; DA SILVA et al., 2009).

A proteína Ki-67 (MIB – 5) é um antígeno de proliferação celular cujo anticorpo correspondente está expresso nas células em proliferação durante as fases do ciclo celular, com exceção da fase de repouso (G₀), tendo relação direta com a fração de crescimento da população celular. Nos procedimentos de imunistoquímica, uma reação positiva mostra deposição do cromógeno em células ou estruturas que contêm o antígeno de interesse (GERDES et al ,1991;BARRA, 2006).

Alguns trabalhos na literatura comprovam que o uso prolongado do tamoxifeno aumenta as chances de câncer de endométrio. Com o objetivo de avaliar os efeitos do tamoxifeno no endométrio, Zhang *et al*, 2016 realizaram um estudo retrospectivo e um *in vitro*. No estudo retrospectivo os autores encontraram que cânceres de endométrio em estágio avançado e com metástase de linfonodo eram mais frequentes em usuárias de tamoxifeno. No ensaio *in vitro* o tamoxifeno induziu proliferação celular em células do endométrio. Os autores concluíram que o câncer de endométrio em pacientes que fazem uso do tamoxifeno exhibe subtipos histológicos mais agressivos e de pior prognóstico.

Em outro estudo que avaliou o uso do anastrozol (Arimidex), tamoxifeno ou a combinação de ambos, os autores demonstraram que o uso do anastrozol (inibidor da aromatase) no tratamento adjuvante do câncer inicial de mama proporcionou diminuição tanto na recidiva loco-regional quanto na incidência dessa neoplasia na mama contralateral. Ao comparar o anastrozol com o tamoxifeno no tratamento adjuvante do câncer de mama, constatou-se uma redução de 59% na incidência de câncer de mama contralateral após 5 anos no grupo tratado com anastrozol ao passo que no grupo tratado com tamoxifeno foi observada maior incidência de trombose venosa profunda, isquemia cerebral e câncer de endométrio já no grupo tratado com anastrozol os efeitos adversos mais frequentes foram fraturas e complicações musculoesqueléticas (HOWELL *et al*, 2005).

A comprovação de ação antiestrogênica do anastrozol no endométrio sob constante estímulo estrogênico (estro permanente), condição esta que se assemelha a função ovariana com níveis fisiológicos de estrógenos, poderia beneficiar pacientes em tratamento quimiopreventivo ou adjuvante do câncer de mama, na pré menopausa, bem como pacientes na pós menopausa que fazem uso do tamoxifeno. Contudo, diante da impossibilidade de realizar a investigação dos efeitos do anastrozol no endométrio de mulheres optou-se pela utilização de ratas em estro permanente como modelos experimentais, onde o endométrio encontra-se sob constante estímulo estrogênico permitindo a fácil avaliação do efeito de drogas antiestrogênicas sobre este tecido. Assim, diante da escassez de estudos sobre o efeito do anastrozol no endométrio de ratas em estro permanente e da importância de

se esclarecer os efeitos endometriais do anastrozol, é que nos propusemos à realização do presente estudo.

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

3.1. Tipo de estudo e local de realização

Este foi 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, foi realizada a sexagem baseando-se na distância entre os orifícios anogenitais. As ratas até o desmame, com 21 dias de vida, permaneceram junto 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 (BARRACLOUGH, 1961; DA SILVA et al, 2007; DA SILVA et al., 2009).

Durante a realização da pesquisa todas os animais permaneceram em gaiolas plásticas com uma grade de metal, sendo quatro animais/gaiola, em salas com temperatura ($24 \pm 1^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (ciclo circadiano – ciclos claro / escuro de 12h) controladas, sob ventilação e exaustão de ar. As ratas tiveram livre acesso à água filtrada e a ração pra roedores SUPRA LAB® (Figura 2).

Figura 2- Ratas em gaiolas com acesso livre a água e ração.



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 e 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

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.

Com base nesses critérios, nenhuma rata precisou ser excluída do estudo.

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, um veículo neutro, inodoro e incolor, possibilitando a diluição e administração de doses pré- definidas (KUBATKA et al., 2008). 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 3 e 4).

Figura 3- Sonda metálica.



Fonte: Arquivo Pessoal.

Figura 4- Administração do medicamento.



Fonte: Arquivo Pessoal.

No 29º dia, as ratas de ambos os 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 sobredose 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 terço proximal do útero.

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 terço proximal do útero, 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.

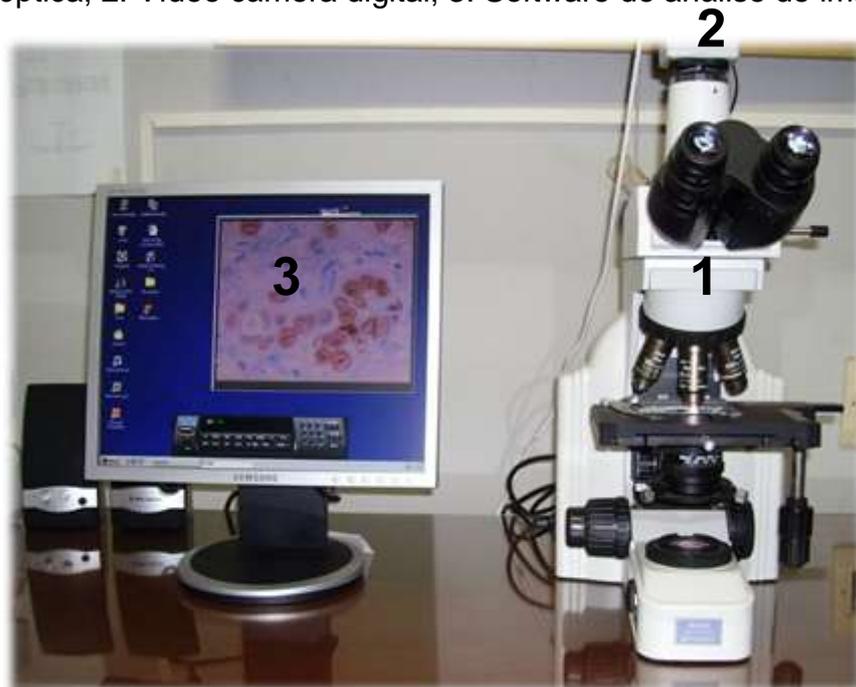
3.6.3. Método Quantitativo

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 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 5). Para a contagem de células positivas e negativas para a expressão do Ki-67 foi utilizado um aumento de 400x. Foram contadas no mínimo 500 células do epitélio endometrial, 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). Em cada caso a porcentagem de células coradas foi obtida pela razão entre o número de células com núcleo corado e o número total de células multiplicado por 100.

Figura 5- Sistema computadorizado utilizado para contagem de células. 1:Microscopia óptica; 2: Vídeo câmera digital; 3: Software de análise de imagem.



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

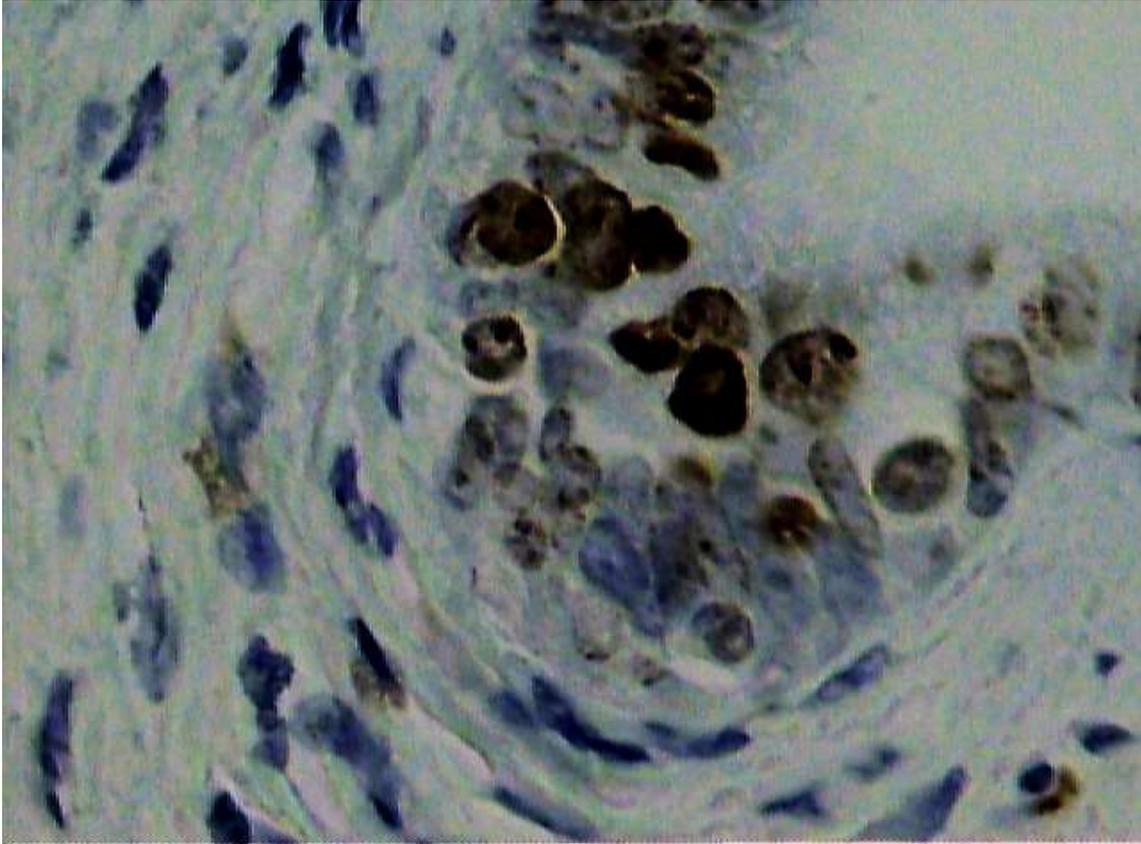
Os dados foram processados no *software* IBM® SPSS®, versão 21.0, e foram calculadas médias, desvio padrão, medianas, mínimos e máximos para as variáveis referentes à contagem de núcleos de células após efeitos do anastrozol no endométrio de ratas em estro permanente. A normalidade das distribuições foi verificada por meio do Teste de Shapiro-Wilk. Foram realizados o teste t independente de Student e o teste de Mann-Whitney, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

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 do experimento, em seus aspectos éticos e metodológicos, foram realizados de acordo com os princípios básicos e éticos para pesquisa envolvendo o uso de animais conforme recomendado pela Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos – DBCA, como determinado pela Resolução Normativa nº 12 de setembro de 2013 do CONCEA.

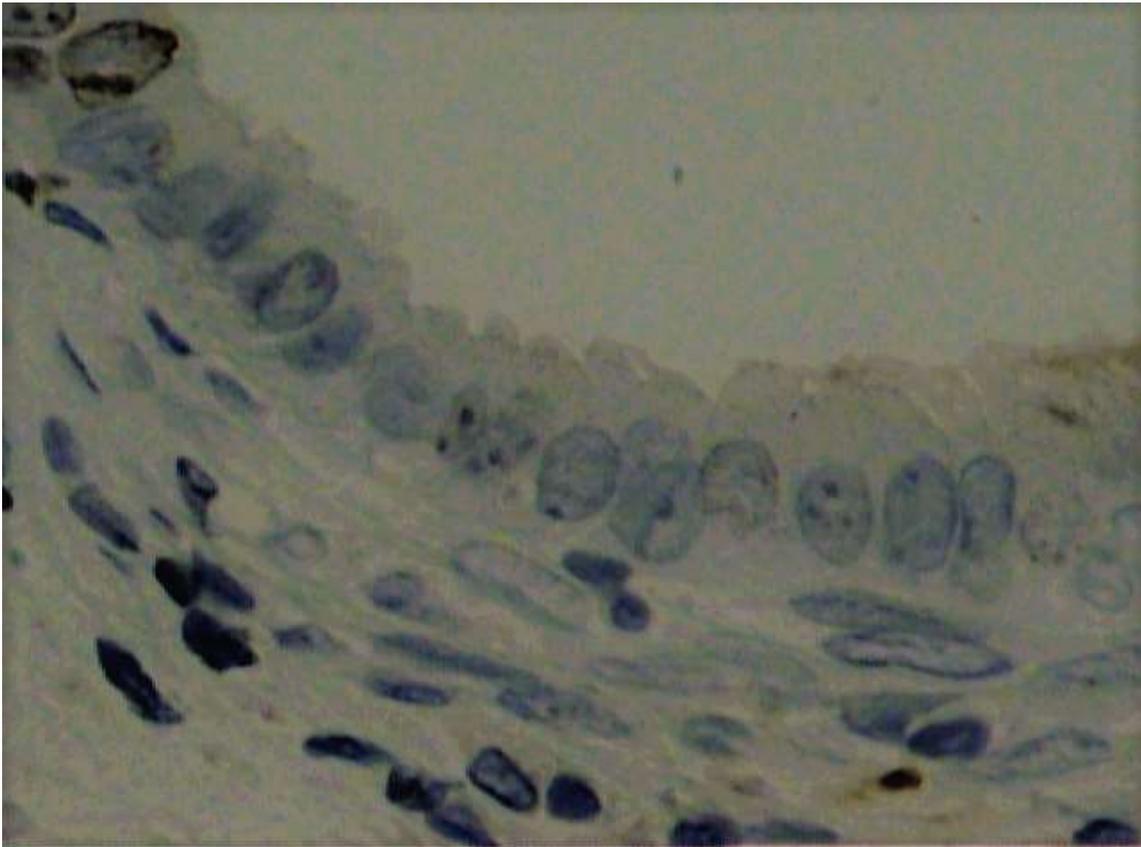
À Microscopia de Luz, as células do epitélio endometrial dos animais do grupo I (controle) apresentaram uma maior concentração de células com núcleo expressando o antígeno Ki-67 (Figura 6) em comparação ao grupo II (Anastrozol) (Figura 7), bem como metaplasia escamosa. A análise quantitativa mostrou porcentagens médias de núcleos corados com Ki-67 por 500 células no epitélio endometrial de ratas em estro permanente de $53,2 \pm 26,3$ e $5,9 \pm 7,1$, 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 endometrial dos animais dos grupos I e II (Figura 8).

Figura 6- Fotomicrografia de corte histológico do endométrio de rata androgenizada que recebeu propilenoglicol (veículo) por gavagem mostrando o endométrio com grande concentração de núcleos corados em marrom com anticorpo anti-Ki-67 MIB-5 e metaplasia escamosa (magnificação original x400).



Fonte: Arquivo Pessoal.

Figura 7- Fotomicrografia de corte histológico do endométrio de rata andogenizada que recebeu anastrozol 0,125 mg/dia por gavagem mostrando o endométrio com ausência de núcleos corados em marrom com anticorpo anti-Ki-67 em comparação ao grupo controle e ausência de metaplasia escamosa (magnificação original x400).



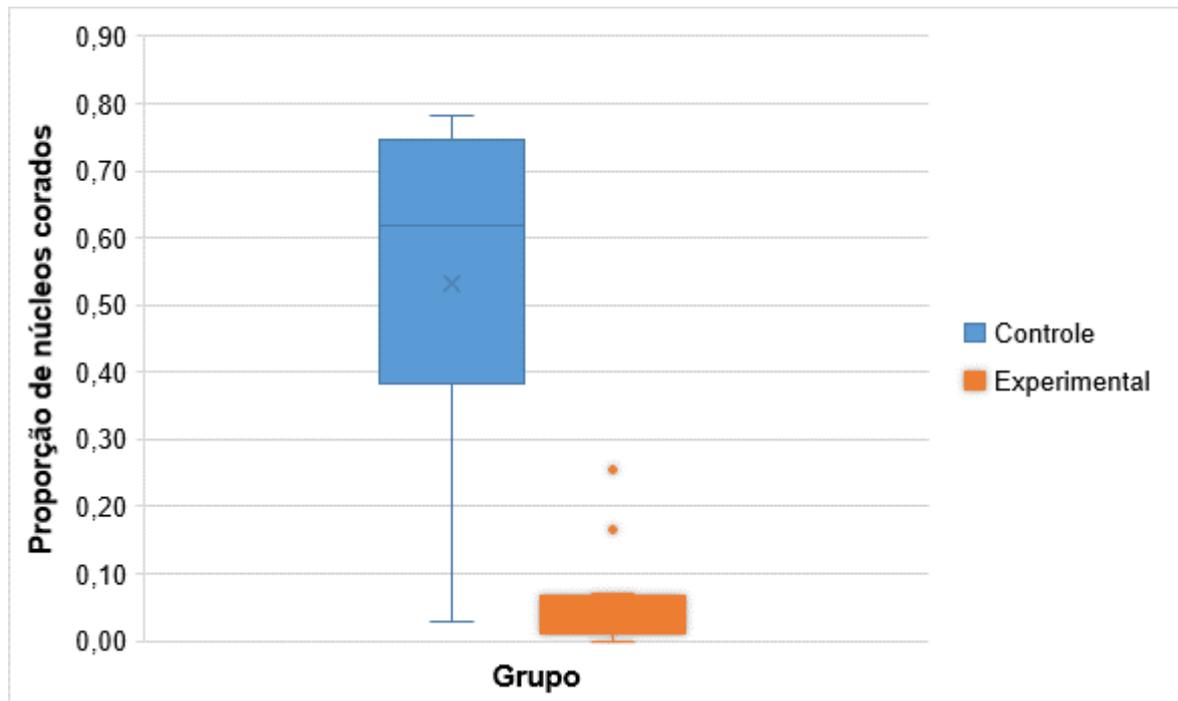
Fonte: Arquivo Pessoal.

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

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

Grupo	N	Média	Erro Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Controle (I)	14	53,2	26,3	61,9	12,8	78,4
Experimental (II)	14	5,9 *	7,1	4,1	0,0	25,6

Figura 8 - Boxplot da porcentagem de núcleos corados por grupo de ratas (n=28).
Teresina, PI, Brasil, 2016



($p < 0,001$)

O uso do tamoxifeno para tratamento e quimioprevenção do câncer de mama, por longos períodos, pode promover alterações proliferativas no endométrio que vão desde uma hiperplasia até carcinomas. Os inibidores de aromatase também são indicados para o tratamento do câncer de mama, contudo não apresentam esse efeito adverso. Isto justifica a importância do estudo do efeito do anastrozol, inibidor de aromatase de terceira geração, no endométrio.

A exemplo de outros estudos, usamos ratas em estro permanente com o objetivo de mimetizar mulheres sob estímulo estrogênico constante sem a ação antogônica da progesterona, sendo portanto, o modelo ideal para o estudo do efeito de drogas antiestrogênicas (RODRIGUES-JÚNIOR, D.M. et al., 2012; PATRIARCA *et al.*, 1996). Os animais receberam anastrozol via oral, através de sonda de gavagem, por ser a via de utilização rotineira pelas mulheres. A droga foi diluída em propilenoglicol, que é um veículo neutro, inodoro e incolor, permitindo administrar a droga nas diluições e dosagens pré-definidas. Foram utilizadas ratas por serem animais de fácil manipulação, sem custo para aquisição e por apresentarem estrutura morfológica do endométrio similar ao da mulher (WESTWOOD, 2008).

Foi utilizada, neste trabalho, a dose de 0,5 mg/Kg ou 0,125 mg/animal/dia. A dose de anastrozol utilizada em estudos com ratas é de difícil padronização. As diferenças, na absorção e no metabolismo, dificultam o estabelecimento de uma correspondência da dose entre a mulher e a rata. Ratas apresentam um metabolismo mais intenso do que os seres humanos, em decorrência disto, uma dose peso-equivalente nestes animais poderia não reproduzir os níveis séricos, a distribuição do anastrozol nos tecidos e os efeitos observados em mulheres (LIEN *et al.*, 1991). A dose utilizada no presente estudo foi estabelecida de acordo com os trabalhos de Kubatka et al. (2008) e Sadlonova et al. (2009). Esses estudos concluíram que a dose de 0,5 mg/Kg de anastrozol em um modelo convencional de ratas na pré-menopausa é equivalente à dose clínica diária de anastrozol (1 mg) administrado em mulheres com câncer de mama. O período de administração da droga foi de 28 dias, ou seja, aproximadamente seis ciclos estrais 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, o epitélio endometrial apresentou alta concentração de células em

atividade proliferativa. Esses achados estão de acordo com os poucos estudos publicados na literatura como o de Badway et al, 2015, que para estudar o efeito do anastrozol no crescimento e na secreção de estradiol de células endometrióticas em cultura, utilizaram células endometrióticas cultivadas in vitro, às quais foi adicionado 10ug/ml de testosterona como substrato para a aromatase intracelular e posteriormente anastrozol (200 e 300 ug/ml) e constataram que a testosterona aumentou a secreção de estradiol nas células enquanto o uso do inibidor de aromatase inibiu tanto a secreção de estradiol quanto o crescimento das células endometrióticas.

No presente trabalho também foi avaliado o efeito do anastrozol na proliferação celular no endométrio tópico de ratas que tiveram seu endométrio espessado por um constante estímulo estrogênico graças a aplicação de testosterona logo ao nascimento (estro permanente) e pode-se verificar que a proliferação celular diminuiu, no grupo experimental, de maneira significativa uma vez que a contagem de núcleos corados pelo Ki- 67 foi expressivamente maior no endométrio das ratas que não receberam a medicação, tal achado pode ser explicado pela ação antiestrogênica do anastrozol que pôde ser bem demonstrada nesse modelo experimental onde a produção de estrógenos pelos ovários é mantida constante sem contudo provocar ovulação e luteinização uma vez que a área do hipotálamo anterior responsável pela liberação de gonadotrofinas e pela ovulação foi lesada pela aplicação da testosterona (BARRACLOUGH;GORSKI, 1961).

Previamente, alguns trabalhos na literatura avaliaram os efeitos dos inibidores de aromatase na endometriose experimental induzida em ratas(ALTINTAS *et al.*,2010; BILOTAS *et al.*,2010; OLIVARES *et al.*,2013; YILDIZ *et al.*, 2016). Estes autores mostraram uma significativa redução no tamanho de implantes endometrióticos em ratas com o uso do anastrozol comparado ao raloxifeno, letrozol, celecoxib e imatinib respectivamente, demonstrando que os implantes endometrióticos não respondem somente ao estradiol produzido pelos ovários, mas também ao sintetizado pela enzima aromatase no próprio tecido endometriótico. No presente estudo, não foi utilizado o modelo de endometriose experimental. Entretanto, foi avaliado o efeito do anastrozol no endométrio tópico de ratas em estro permanente através da expressão do antígeno Ki-67. Até onde investigamos nenhum trabalho na literatura havia

estudado o efeito do anastrozol diretamente no endométrio de ratas sob constante estímulo estrogênico.

No presente estudo, mostrou-se 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 antígeno KI-67 no epitélio endometrial de ratas em estro permanente. O grupo controle, representado pelas ratas em estro permanente que receberam o propilenoglicol, apresentou um percentual bem maior de células coradas que o grupo experimental mostrando que a administração de anastrozol diminuiu verdadeiramente a proliferação celular no endométrio das ratas. Isso pode ser explicado pois o anastrozol se liga temporária e reversivelmente à enzima aromatase impedindo que essa enzima faça a conversão de androgênios em estrogênios nas células da granulosa no ovário bem como impede também a conversão em estrogênio, nos tecidos periféricos, dos androgênios produzidos no córtex da supra renal (DA SILVA et al, 2007; DA SILVA et al., 2009).

Assim, mesmo sabendo das limitações e das dificuldades de extrapolação de resultados obtidos em animais para seres humanos, a diminuição da proliferação celular no endométrio de ratas em estro permanente com o uso de anastrozol relatada neste estudo, é favorável a hipótese do uso dessa medicação como uma alternativa ao uso do tamoxifeno, em mulheres na pós menopausa, nas quais os baixos níveis de estrogênio no endométrio promovem uma ação agonista do tamoxifeno nos receptores de estrógenos, o que pode culminar com o desenvolvimento de hiperplasias, pólipos e até mesmo carcinomas. Contudo, mais estudos laboratoriais e clínicos dos efeitos do anastrozol no endométrio de mulheres se fazem necessários para confirmar nossos resultados bem como para esclarecer possíveis efeitos adversos dessa medicação.

O anastrozol administrado na dose de 0,5 mg/Kg/dia durante 28 dias consecutivos, levou a uma redução estatisticamente significativa da expressão do antígeno Ki-67 no endométrio de ratas em estro permanente.

ALTINTAS, D. Comparison of the effects of raloxifene and anastrozole on experimental endometriosis. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**. v.150, p. 84-87,2010.

ATTAR, E.; BULUN, S.E. Aromatase inhibitors: the next generation of therapeutics for endometriosis? **Fertil Steril**. v.5, p.1307-1318,2006.

BADAWY, S.Z.A. et al. Aromatase inhibitor (anastrozole) affects growth of endometrioma cells in culture. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**. v. 188, p.45-50,2015.

BARRA, M.B. O uso da imunoistoquímica no diagnostic: indicações e limitações. **Rev AMRIGS**, v.50, n. 2, p. 173-184, 2006.

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.

BILOTAS, M. at al. Effect of aromatase inhibitors on ectopic endometrial growth and peritoneal environment in a mouse model of endometriosis. **Fertil Steril**. v.8, p. 2513-2518, 2010.

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.

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

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

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

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 urethralepithelium of castrated adult female rats treated with tamoxifen. **Gynecological Endocrinology.** v. 25, p. 282-286, 2009.

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.

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.

FISHER, B. et al. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the national surgery adjuvant breast and bowel project P – 1 study. **J Natl Cancer Inst.** v. 90, n. 18, p. 1371-1388, 1998.

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

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

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.

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.

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

HASHIM, H.A. Potential role of aromatase inhibitors in the treatment of endometriosis. **International Journal of Women's Health.** v. 6, p.671-680, 2014.

HOFFMAN, B. L. et al. Ginecologia de Williams. São Paulo: Artmed, 2014. 1402p.

HOWELL A. et al. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. [Lancet](#). v.365, n.9453, p.60-62, 2005.

HU, R. et al. Molecular mechanisms of tamoxifen-associated endometrial cancer (Review). **ONCOLOGY LETTERS**. v.9,p.1495-1501, 2015.

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.

IZAWA M. et al. An epigenetic disorder may cause aberrant expression of aromatase gene in endometriotic stromal cells. **Fertil Steril**, v.89, n.5, p.1390-1396, 2008.

JEON, S.J. et al. Endometrial polyp surveillance in premenopausal breast cancer patients using tamoxifen. **Obstet Gynecol Sci**. v.60,n.1,p.26-31,2017.

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.

KI-CHAN AN. Selective Estrogen Receptor Modulators.**AsiaSpine**.v.10,n.4,p.787-791, 2016.

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.

LIEN, E. A. et al. Distribution of tamoxifen and its metabolites in rat and human tissues during steady-state treatment. **Cancer Res**, v.51,n.18, p.4837-4844, 1991.

MASSON, P. **Tumeurs humaines. Histologic diagnostics et techniques.** 2 ed.Paris: Libraire Maloine, 1956, p.1061-1148.

MATSUZAKI,S. et al. Analysis of aromatase and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 messenger ribonucleic acid expression in deep endometriosis and eutopic endometrium using laser capture microdissection. **Fertil Steril.** v.85, p.308-313, 2006.

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, d'2009.

MORAES, A. V. S. et al. Efeitos da terapia estro-raloxifeno sobre o endométrio de ratas. **Rev Bras Ginecol Obstet.** v. 2, n.28, p. 101-106, 2006.

NOTHNICK,W.B., The emerging use of aromatase inhibitors for endometriosis treatment. **Reproduce Biologyand Endocrinology.** v. 9, n.87.p. 1-8, 2011.

OLIVARES, C.N. et al. Anastrozole and celecoxib for endometriosis treatment, good to keep them apart ?. **Reproduction.** v. 2, p.119- 126,2013.

OLIVEIRA, V.M., ALDRIGUI, J.M., RINALD, J.F. Current status of breast cancer chemoprevention. **Rev Assoc Med Bras.** v.52,n.6,p. 453 -459, 2006.

PATRIARCA, M.T. et al. Morphological action of tamoxifen in the endometrium of persistent estrous rats. **Acto Obstet Gynecol Scand.** V. 75,p.707- 710, 1996.

PAVONE, M.E.; BULUN, S.E. Aromatase inhibitors for the treatment of endometriosis. **Fertil Steril.** v.6, p.1370-1379, 2012.

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.

SAAD, E.,S. et al. Inibidores da aromatase no câncer de mama: da doença metastática ao tratamento adjuvante. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 48, p. 555-567, 2002.

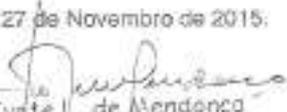
SADLONOVA, V. et al. Side effects of anastrozole in the experimental pre-menopausal mammary carcinogenesis. **Neoplasma**. v.56, n.2, p.124-129, 2009.

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.

YILDIZ, C. et al. Effect of imanitib on growth of experimental endometriosis in rats. **Eur. J Obstet Gynecol Reprod Biol**. v. 197, p.159 – 163, 2016.

ZHANG, L. et al. Tamoxifen has a proliferative effect in endometrial carcinoma mediated via the GPER/EGFR/ERK/cyclin D1 pathway: A retrospective study and an in vitro study. **Mol Cell Endocrinol**. v. 5, p. 51-61, 2016.

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 <small>Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, S/N, Vila Ininga, Teresina, Piauí, Brasil CEP: 64049-900. Telefone (88) 3215-3734 - e-mail: ceoa@ufpi.edu.br</small>	
 CERTIFICADO 	
<p>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.</p>	
<p>Teresina, 27 de Novembro de 2015.</p>  Profa. 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, no The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.

Re: Aromatase inhibitors in the treatment of endometriosis: a review

Review Article

By Danielle B De Andrade; Pedro Vitor Lopes-Costa, Ph.D; Benedito B da Silva

Dear Dr. Pedro Vitor Lopes-Costa,

We have received your article "Aromatase inhibitors in the treatment of endometriosis: a review" for consideration for publication in The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.

Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <https://ees.elsevier.com/sbmb/>

2. Enter these login details:

Your username is: pvlcosta@ig.com.br

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/SBMB/automail_query.asp

3. Click [Author Login]

This takes you to the Author Main Menu.

4. Click [Submissions Being Processed]

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System

The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology

Please note that the editorial process varies considerably from journal to journal. To view a sample editorial process, please click here:

http://ees.elsevier.com/eeshelp/sample_editorial_process.pdf

For further assistance, please visit our customer support site at

<http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of

topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials.

You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.
