ANDRÉ LISBOA RENNÓ

EFEITOS DAS ESTATINAS SOBRE CÉLULAS-TRONCO NEOPLÁSICAS EM MODELO MURINO DE CARCINOGÊNESE MAMÁRIA POR INDUÇÃO QUÍMICA

Campinas

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

ANDRÉ LISBOA RENNÓ

EFEITOS DE DUAS ESTATINAS SOBRE CÉLULAS-TRONCO NEOPLÁSICAS EM MODELO MURINO DE CARCINOGÊNESE MAMÁRIA POR INDUÇÃO QUÍMICA

ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. André Almeida Schenka

Tese de doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP para obtenção de título de Doutor em Farmacologia.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO

FINAL DA TESE DEFENDIDA POR ANDRÉ

LISBOA RENNÓ, E ORIENTADO PELO PROF.

DR. ANDRÉ ALMEIDA SCHENKA

_____

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

R295e

Rennó, André Lisboa, 1984-
Efeitos de duas estatinas sobre células-tronco neoplásicas em modelo murino de carcinogênese mamária por indução química / André Lisboa Rennó. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: André Almeida Schenka.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Neoplasias da mama. 2. Células-tronco neoplásicas. 3. 9,10-Dimetil-1,2-benzantraceno. 4. Inibidores de hidroximetilglutaril-CoA redutases. I. Schenka, André Almeida,1976-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effects of two statins on neoplastic stem cells in a murine model of chemical induced mammary carcinogenesis
Palavras-chave em inglês:
Breast neoplams
Neoplastic stem cells
9,10-Dimethyl-1,2-benzanthracene
Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitors
Área de concentração: Farmacologia
Titulação: Doutor em Farmacologia
Banca examinadora:
André Almeida Schenka [Orientador]
Elaine C. de Oliveira
Eliane Maria Ingrid Amstalden
Noeme Sousa Rocha
Heitor Moreno Junior
Data de defesa: 30-07-2014
Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

ANDRÉ LISBOA RENNÓ

Orientador (a) PROF(A). DR(A). ANDRÉ ALMEIDA SCHENKA

MEMBROS:

1. **PROF(A). DR(A). ANDRÉ ALMEIDA SCHENKA** _____
2. **PROF(A). DR(A). ELAINE C. DE OLIVEIRA** _____
3. **PROF(A). DR(A). ELIANE MARIA INGRID AMSTALDEN** _____
4. **PROF(A).DR(A). NOEME SOUSA ROCHA** _____
5. **PROF(A).DR(A). HEITOR MORENO JUNIOR** _____

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 30 de julho de 2014

Dedico este trabalho aos meus pais Paulo e Virgínia pelo amor incondicional, por sempre me incentivarem, educarem e por me darem todas as condições possíveis por estar onde estou. À toda minha família, principalmente às minhas avós Myrian e Joséfina e aos meus avôs Elzo e César.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, a razão suprema.

Ao professor Dr. André Almeida Schenka pela oportunidade e confiança dada ao meu trabalho, pelo incentivo, orientação e ensinamento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

À CAPES, pelo apoio financeiro que tornou possível a realização deste trabalho.

Às professoras Dra. Liliana e Dra. Ingrid e ao Dr. Edson pela contribuição no exame de qualificação.

À toda equipe do Laboratório de Histomorfometria e Patologia Molecular Aplicada por toda ajuda, troca de informação e amizade.

Aos meus amigos Marcos Alves Junior, Monalisa Nogueira, Priscila Kanashiro Redondo, Philipi Souza e Valéria Barbosa pela amizade e ajuda nos experimentos.

Aos amigos do laboratório de Fisiopatologia da Diabetes: Danilo Ferreira, Carolina Solon, Caroline Mesquita, Ana Paula Barbosa, Andrezza Kinote, Jualiana Faria e Thiago Matos.

Ao Prof. Dr. Gabriel Anhê pelo auxílio e interpretações dos resultados.

Aos amigos do laboratório de Farmacologia e Bioquímica: Igor Rapp, Mariana Leite, Mariana Pittoco, Lourdes Dias, Raquel Lorenzetti, Fabiana Fonseca e José Ílton.

Aos amigos Paulo Latuf e Caroline Bondarik do Laboratório de Patologia Experimental.

Ao amigo Gilberto Franchi do departamento do CIPOI.

Aos amigos Danilo Antonini, Maria Cecília, Cibele Maria Esteves, Rafaella Carneir e Ana Carolina Afonso o do Lab. de Bioquímica do IB.

À Fernanda Carvalho pela ajuda na tradução do resumo para o inglês.

À todos, que de certa forma contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigado!

"Embora ninguém possa voltar atrás e fazer
um novo começo, qualquer um pode começar

agora e fazer um novo fim"

Chico Xavier

SUMÁRIO

PÁG

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....xxi

RESUMO.....xxiii

ABSTRACT.....xxv

1 INTRODUÇÃO.....27

1.1 Câncer de mama.....27

1.2 Tirosina Quinase B (Akt).....30

1.3Tirosina Quinase SRC.....33

1.4 Células-tronco neoplásica.....35

1.4.1 CD44.....39

1.4.2 CD24.....40

1.4.3 CD133.....41

1.4.4 EpCAM.....42

1.5 Dimetilbenz-(a)-antraceno (DMBA) como modelo de carcinogênese mamária.....44

1.6 Estatinas.....46

2 JUSTIFICATIVA.....53

3 OBJETIVOS.....55

4 MATERIAL E MÉTODOS.....57

4.1 Localização de realização dos experimentos.....57

4.2 Animais e aspectos éticos.....57

4.3 Padronização das doses das estatinas.....57

4.3.1 Avaliação bioquímica.....58

4.3.2 Necropsia.....59

4.3.3 Avaliação histológica.....59

4.4 Modelo de carcinoma mamário.....60

4.4.1 Indução tumoral.....61

4.4.2 Avaliação histopatológica.....61

4.4.3 Imuno-histoquímica.....62

4.4.4 Western Blotting.....63

4.5 Análise estatística.....64

5 RESULTADOS.....65

5.1 Avaliação farmacológica e toxicológica das estatinas.....65

5.2 Atividades antineoplásicas das estatinas.....74

5.2.1 Indução química por DMBA.....74

5.2.2 Avaliação antineoplásica das estatinas.....76

5.2.3 Análise das proteínas quinases.....84

5.2.4 Análise de células progenitoras e células-tronco neoplásicas.....87

5.2.5 Correlações da expressão de CP/CTNs e variáveis biológicas.....91

6 DISCUSSÃO.....95

6.1 Caracterização farmacológica e toxicológica das estatinas.....95

6.2 Ações antineoplásicas das estatinas.....97

7 CONCLUSÃO.....101

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....103

9 ANEXOS.....111

LISTA DE FIGURAS

PAG

Figura 1. Estrutura mamária.....28

Figura 2. Via intracelular da Akt.....31

Figura 3. Via intracelular da SRC.....34

Figura 4. Células-tronco e células tronco-neoplásicas.....36

Figura 5. Via bioquímica da HMG-CoA redutase.....47

Figura 6. Estruturas químicas das estatinas.....48

Figura 7. Desenho experimental da padronização das doses das estatinas.....58

Figura 8. Desenho experimental para o modelo de carcinoma mamário e testes das estatinas.....60

Figura 9. Análise do perfil lipídico.....67

Figura 10. Análise de miotoxicidade.....68

Figura 11. Avaliação histopatológica da musculatura esquelética.....69

Figura 12. Análise da função hepática.....70

Figura 13. Avaliação histopatológica do fígado.....71

Figura 14. Avaliação histopatológica do fígado de ratos tratados com estatinas.....72

Figura 15. Análise da creatinina sérica.....72

Figura 16. Avaliação histopatológica renal.....73

Figura 17. Avaliação macroscópica dos tumores de mama induzidos por DMBA.....75

Figura 18. Neoplasias mamária induzidas pelo tratamento agudo por DMBA.....75

Figura 19. Progressão do volume tumoral total....78

Figura 20. Progressão do volume tumoral primário....79

Figura 21. Incremento da massa tumoral....79

Figura 22. Números de tumores desenvolvidos 80

Figura 23. Percentagem média de carcinoma ductal invasivo na composição histológica das neoplasias induzidas por DMBA....81

Figura 24. Percentual médio de necrose....82

Figura 25. Índice mitótico....83

Figura 26. Índice proliferativo pelo Ki67....83

Figura 27. Expressão proteico de pSRC e SRC....85

Figura 28. Expressão proteico de pAkt e Akt....86

Figura 29. Expressão proteico de PTEN....86

Figura 30. Frequência de células CD133+....88

Figura 31. Frequência de células CD24+....88

Figura 32. Frequência de células CD44+....89

Figura 33. Frequência de células EpCAM....89

Figura 34. Imunoexpressão de marcadores de células progenitoras/células-tronco neoplásicas....90

Figura 35. Imunoexpressão de marcadores de células progenitoras/células-tronco....91

Figura 36. Correlações entre células progenitoras/células-tronco neoplásicas e variáveis tumorais....93

Figura 37. Correlação entre imunomarcação de células progenitoras/células-tronco neoplásicas....94

Figura 38. Número de células progenitoras/células-tronco neoplásicas e o grau histológico final....94

LISTA DE TABELAS

PÁG

Tabela 1. Principais marcadores imunofenotípicos de células-tronco, células progenitoras e células-tronco neoplásicas em diferentes neoplasias malignas.....38

Tabela 2. Classificação de subtipos histológicos de neoplasias mamárias de ratas.....45

Tabela 3 Perfil farmacocinético e farmacodinâmico das diferentes estatinas estatinas.....49

Tabela 4. Características dos marcadores imunológicos de células-tronco, células progenitoras e células tronco-neoplásicas.....63

Tabela 5. Frequência de casos em cada categoria de grau histológico final seguindo o sistema de Notthingham e em acordo com a Organização Mundial de Saúde.....82

Tabela 6. Correlação entre marcadores de células progenitoras/células-tronco neoplásicas e fatores preditivos de comportamento biológico dos tumores.....93

Tabela 7. Correlação entre marcadores de células progenitoras/células-tronco neoplásicas (colocalização tecidual).....93

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

Akt- Proteína quinase

pAkt- Proteína quinase na forma fosforilada

ALDH1- aldeído desidrogenase 1 *(Aldehydedehydrogenase 1)*

ALT- Alanina transaminase

AST-Aspartato transaminase

CK- Creatinina quinase

CGA-Campo de grande aumento

CMA- Campo de médio aumento

CP- Célula progenitora

CPs- Células progenitoras

CPA- Campo de pequeno aumento

CT- Célula-tronco

CTs- Células-tronco

CTN- Célula-tronco neoplásica

CTNs- Células-tronco neoplásica

DMBA- Dimetilbenz(a)antraceno

DAB-diaminobenzidina

ESA- Antígeno epitelial específico (*Ephitelial specific antigen)*

HDL- Lipoproteína de alta densidade *(High density lipoprotein)*

Her-2 –Human epidermanl growth factor receptor 2

HMG-CoA - 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A

INCA- Instituto Nacional do Câncer

LDL- Lipoproteína de baixa densidade *(Low density lipoprotein)*

MNU- n-metil-n-nitrosourea

mTOR- mammalian target of rapamycin

Oct-4– Octâmero de ligação do fator de transcrição 4

OMS- Organização Mundial da Saúde

PIP3- phosphatidylinositol-triphosphate

Pgp- Glicoproteína G

PTEN- Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10

Sca-1– Antígeno de célula tronco 1

SRC- tirosina quinase SRC

pSRC- tirosina quinase SRC na forma fosforilada

VLDL- Lipoproteína de baixíssima densidade *(Very low density lipoprotein)*

UA- Unidades arbritárias

RESUMO

O câncer mamário é a neoplasia maligna mais incidente e a principal causa de óbito por malignidade no sexo feminino no Brasil e no mundo. Estipula-se que há mais de 1.2 milhões de novos casos anuais de câncer de mama, e que a heterogeneidade e a complexidade molecular do câncer de mama dificultam estratégias terapêuticas de prevenção e tratamento desta doença. Atualmente, acredita-se que, em diversas neoplasias, incluindo o câncer de mama, a célula alvo de mutações cumulativas responsáveis pelo desenvolvimento do fenótipo canceroso é uma célula-tronco adulta. Independentemente da origem da neoplasia (se em célula madura/diferenciada ou em CT), é possível constatar *in vitro* e *in vivo*, na grande maioria dos tumores malignos, uma subpopulação de células indiferenciadas, com características fenotípicas de célula-tronco. Tais células são designadas como "células tronco cancerosas ou neoplásicas (CTNs)". Com frequência, especula-se se as CTNs seriam responsáveis pela heterogeneidade morfológica e molecular de algumas neoplasias mamárias. Em conjunto, essas peculiaridades das CTNs as tornam importantes alvos no desenvolvimento de novas abordagens farmacoterapêuticas antineoplásicas. Recentemente, Gauthaman *et al* (2009) demonstraram de forma inédita em estudos *in vitro* que estatinas apresentam efeito inibitório específico sobre células tronco embrionárias com alterações cariotípicas e células de linhagens neoplásicas mamárias com fenótipo CTN, não afetando o crescimento de células tronco normais. As estatinas são inibidores competitivos da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) e são amplamente utilizada para o tratamento de doenças cardiovascular primário e secundário. Além de amplamente utilizadas na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares secundárias a dislipidemias, evidências cumulativas apontam para um possível papel destas drogas na prevenção ou regressão de processos neoplásicos. Entre os efeitos antineoplásicos comprovados das estatinas, destacam-se: a inibição da proliferação celular, a promoção de apoptose, a inibição da angiogênese e a prevenção de metástases. Assim, buscou-se neste trabalho elucidar o efeito da sinvastatina e pravastatina sobre células progenitoras e CTNs e em algumas vias de sinalização intracelular em modelo de carcinogênese mamária (baseado na indução com 7,12 dimetilbenz(a)antraceno[DMBA]) em ratas Sprague-Dawley. Após um tratamento de 14 dias com as estatinas, as mamas das ratas foram analisadas para verificar a imunoexpressão de células progenitoras e CTNs (CD133, CD24, CD44 e EpCAM), variáveis biológicas (volume tumoral, mitose, índice proliferativo) além da análise proteica de Akt e Src. A maior dose da sinvastatina testada (40 mg/Kg) diminui o número de tumores desenvolvidos, volume e incremento tumoral e os índices de proliferação celular. Não houve alteração da percentagem de necrose com o tratamento com as estatinas. Ainda, sinvastatina diminuiu os níveis da fosforilação da Akt e aumento da PTEN, não havendo diferenças significantes nos níveis da Src. Sinvastatina também foi capaz de reduzir o número de células positivas CD133, CD24 e CD44. Pelas doses testadas, não houve diferença dos parâmetros biológicos analisados com o tratamento com a pravastatina. Em conclusão, neste modelo, o tratamento crônico com a sinvastatina apresentou efeitos citostáticos, ações reguladoras na via da Akt além do controle de células progenitoras e CTNs em modelo *in vivo* de carcinoma mamário.

Palavras-Chaves: Neoplasia de mama, Células-tronco neoplásicas, 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno, inibidores de hidroximetilglutaril-CoA

ABSTRACT

Breast cancer is the malignant neoplasm with the highest incidence and the main cause of death by cancer within females in Brazil and in the world. It is estimated that there are over 1.2 million new annual cases of breast cancer. The heterogeneity and the molecular complexity of this type of cancer complicate the therapeutic strategies for its prevention and treatment. Nowadays, it is believed that in many different neoplasms, including breast cancer, the cell which is the target of cumulative mutations responsible for the development of the cancerous phenotype is an adult stem cell. Regardless the origin of the neoplasm (whether in mature/differentiated cell or in SC), a subpopulation of undifferentiated cells with phenotypic characteristics of stem cells can be seen in vitro and in vivo in most malignant tumours. These cells are designated as "neoplastics or cancer stem cells (CSCs)". It is often especulated whether CSCs would be responsible for the molecular and morphological heterogeneity in some breast neoplasms. The peculiarities of the CSCs make them a relevant/an important/a serious object for the development of new antineoplastic pharmacotherapeutic approaches. Recently, Gauthaman et al (2009) demonstrated in unprecedented in vitro studies that statins exhibit specific inhibitory effect on embryonic stem cells with karyotypic alterations and neoplastic mammary cell lines with phenotype CSC, not affecting the growth of normal stem cells. Statins are competitive inhibitors of coenzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl A (HMG-CoA) reductase and are widely used for the primary and secondary treatment of cardiovascular diseases. Moreover, cumulative evidence points to a possible role of these drugs in the prevention or regression of neoplastic processes. Amongst the proven anticancer effects of statins, some of them stand out such as: inhibition of cell proliferation, promotion of apoptosis, inhibition of angiogenesis and metastasis prevention. Thus, this study sough to elucidate simvastatin and pravastatin effects on progenitor cells and NSCs, and on some signaling pathways in breast carcinogenesis model (based on induction 7,12 dimethylbenz (a) anthracene [DMBA]) in female Sprague-Dawley rats. After a 14 days treatment with the statins, the rats' breasts were examined to verify immunostaining of progenitor cells and CSCs (CD133, CD24, CD44 and EpCAM), biological variables (tumor volume, mitosis, proliferation index) in addition to protein analysis of Akt and Src. The highest dose of the tested simvastatin (40mg/kg) decreased the number of tumors developed, volume and tumor growth as well as the cell proliferation index. There was no change in the percentage of necrosis to treatment with statins. Furthermore, simvastatin decreased the levels of Akt phosphorylation and increased PTEN levels, without significant differences in Src levels. Simvastatin was also able to reduce the number of CD133, CD24 and CD44 positive cells. For the doses tested, there was no difference on the analyzed parameters in the treatment with pravastatin. As a conclusion, in this model, chronic treatment with simvastatin showed cytostatic effects, regulatory actions towards Akt, as well as the control of CSCs and progenitor cells in the in vivo model of mammary carcinoma.

Keywords: breast neoplams, neoplastic stem cells, 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene, hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitors.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de Mama

A mama é um tecido formado por células epiteliais luminais (ductais e alveolares), células mioepiteliais e basais (1,2,3). Estas células se organizam em ductos e estruturas alveolares, e têm a função de produzir e secretar leite (4,5) (Figura 1). A glândula mamária é um dos únicos órgãos que não estão totalmente desenvolvidos após o nascimento, tendo diversas modificações estruturais e funcionais durante a puberdade, na fase lútea do ciclo menstrual, na gravidez e lactação (4,6). Todos os tipos celulares encontrados na mama podem sofrer mutações sucessivas, levando a um desenvolvimento do câncer mamário.

O câncer de mama afeta mais de 1,38 milhões de mulheres por ano, sendo a neoplasia mais comum e a principal causa de óbito dentre as malignidades do sexo feminino no mundo todo (7,8,9). No Brasil, além de ser a neoplasia mais prevalente do sexo feminino, é a causa de obtido mais abrangente dentre esta doença (10). A heterogeneidade e a complexidade molecular do câncer de mama dificultam estratégias terapêuticas de prevenção e tratamento da doença (11). Ao menos, 25% dos casos de neoplasias mamária tem algum tipo de resistência terapêutica (7).

Nos carcinomas, a transformação maligna é causada em parte por múltiplas mutações genéticas (12). O envolvimento dos oncogenes ainda não é muito bem esclarecido, porém, há evidencias de mudanças nos proto-oncogenes e nos genes supressores de tumores (12). Dentre um proto-oncogene que é ativado no inicio de um câncer mamário, está a SRC (12).

Nos últimos anos foram sugeridas algumas hipóteses sobre a origem e manutenção do câncer. Dentre as novas hipóteses estipuladas, está a teoria que o tumor pode se desenvolver através das células basais, ou seja, através de células-tronco (CTs) (13). As células-tronco podem acumular erros em seus ácidos nucleicos originando células tronco neoplásicas (CTNs) (13). Estas células neoplásicas podem resistir a diversas modalidades terapêuticas anti-neoplásicas, pré-dispor a metástase e aumento a heterogeneidade do tecido (8,14).

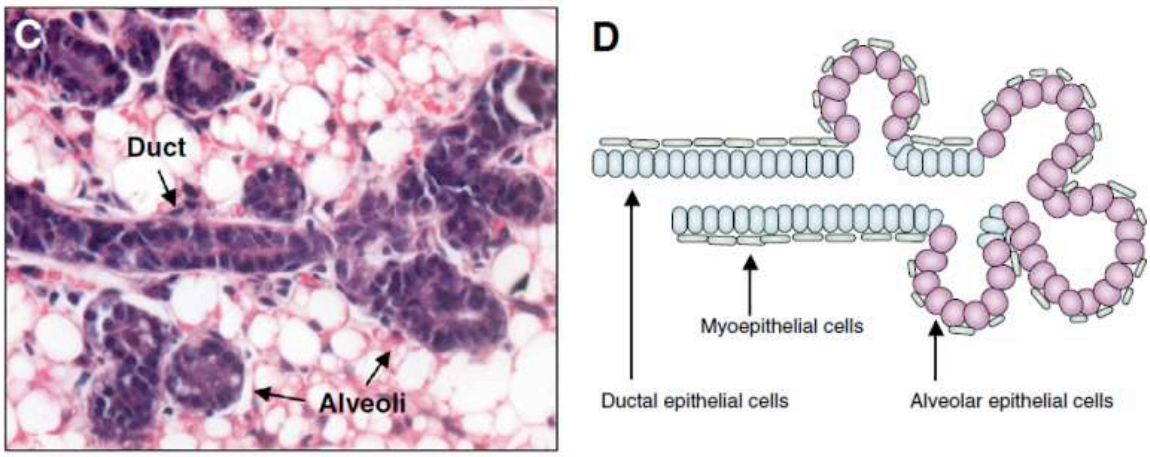

Figura 1 Estrutura mamária. Foto micrografia e esquema ilustrativo das células e estruturas mamárias (3).

A transformação de uma célula epitelial mamária em uma célula cancerosa evolve diversos processos com alterações nos sinais intracelulares de vias de transdução adquirindo a célula maligna uma maior sobrevivência e um aumento dos fatores de crescimento (15,16). O câncer de mama é influenciado por hormônios sexuais (estradiol e progesterona) e fatores de crescimento (16,17). Fatores ambientais como obesidade, dieta, resistência periférica à insulina acompanhada com hiperinsulinemia, sedentarismo, período pré-menopausa, fatores hormonais, socioeconômicos e genéticos são citados como fatores de risco de desenvolvimento da neoplasia (16,18). Para o controle do câncer de mama é necessário medidas de prevenção, que depende da identificação de determinantes para a doença, no requesito de iniciação e progressão neoplásica (6).

O câncer de mama pode ser dividido em dez subtipos histológicos. Clinicamente, utiliza-se uma classificação básica do subtipo determinado pela expressão de receptores hormonais (estrogênio e/ou progesterona), pela expressão de fator de crescimento epididermal humano (HER2) e pela marcação negativa (triplo-negativo) que não expressa nenhum dos marcadores citados (7,19). Mais da metade dos casos de carcinomas são hormônios dependentes (16).

O subtipo histológico mais comum é o receptor estrogênio (ER) e progesterona (PR) positivos, também classificados como luminal A ou lumunial B (7). Estes receptores são ativados pelos hormônios estradiol ou progesterona, ativando fatores de crescimento (7). Subtipos positivos pra HER2 representam em média 20% dos casos (7). HER2 promove a proliferação e ajuda na

sobrevida celular (7,20). Já tumor triplo-negativo, também denominado como tipo basal, representa de 10 a 20% dos casos (7,19). Em todos os subtipos podem-se observar quadros de metástases. Os tecidos mais acometidos pelas metástases do tumor primário mamário são: osso, pulmão, fígado e cérebro (20). Quadros de metástases leva a um pior prognóstico e diminui a chance de cura (20).

Independentemente do subtipo histológico, inúmeros casos têm resistência a diversas terapias utilizadas, como inibidores dos receptores hormonais, imunoglobulinas, radioterapia e a quimioterapia (7,19,20). Ainda, há opção de tratamento de tumores mamários com inibidores da ciclo-oxigenase (e.g. aspirina) e mais recentemente com drogas que diminuem o metabolismo (e.g. metformina) (16). Dentre os mecanismos de resistências terapêuticas, estão a presenças de proteínas de resistência a múltiplas drogas, como transportadores ABC e a glicoproteína P, além da sinalização intracelular da proteína quinase Akt (7). Akt é expresso em tecidos neoplásicos e não neoplásicos e regula diversas funções celulares, como a proliferação e diferenciação (7).

1.2 Tirosina Quinase B (Akt)

Fisiologicamente, as fosfatases participam na ativação de diversos fatores de crescimento (21). As fosfatases podem ser ativadas pelos receptores de tirosina quinase, levando a uma cascata de sinalizações intracelulares (22). Sinalizações celulares provenientes das fosfatases geram uma transdução na cascata de moléculas intracelulares que estão envolvidas na proliferação, sobrevivência, síntese proteica, no metabolismo, na diferenciação e na motilidade celular (22,23). Dentre as fosfatases, encontra-se a fosfatidilinositol quinase (PIKs) no qual sua ativação leva a regulação de múltiplas funções celulares (15). Entre as PIKs, está a família PI3K, responsável principalmente pela regulação do crescimento celular e pela prevenção de processos de apoptose (15).

Ao ativar a PI3K, formam-se segundos mensageiros como 3,4,5-PIP_3. Estes mensageiros podem levar a ativação de diversas proteínas, como a serina/treonina quinase Akt, também chamada como proteína quinase B (15,23). Akt é uma proteína com diversas isoformas (Akt-1, Akt-2, Akt-3) e esta é considerada uma mediadora crítica para diversas ações celulares, como proliferação celular, metabolismo, sobrevivência, invasão e migração celular, angiongênese, apoptose e na reparação do DNA (15, 22, 24). Quando há ativação da Akt, diversas etapas e segundos mensageiros são ativados, como a proteína mTOR, Bcl-2, Bax e caspase-9 (15; 25,26) (Figura 2). A Akt pode ser fosforilada em diferentes sítios, como na tirosina 308 e na serina 473 (24).

Proteínas citoplasmáticas como a PTEN pode controlar impedir a fosforilação da Akt ao diminuírem a geração de PIP_3 (15, 27). Em diversos carcinomas são observados uma diminuição da expressão da PTEN com sua perda de função, aumentando a atividade da Akt, levando a um pior prognóstico (22, 27, 28, 29).

Estes mecanismos de regulações celulares, não estão ligados apenas em células diferenciadas, mas também em células tronco e progenitores (CP) (30). Modelos murinos de câncer de próstata demonstraram que ao inibir a PTEN, há uma expansão de CTs e CPs (29). Ainda, há hipóteses que a via PTEN/Akt tem funções importantes na regulação de CTs e CPs mamárias (29). Em CTNs, há um aumento a fosforilação da Akt no sítio da serina 473 (30). Testes experimentais demonstram que ao inativar a PTEN em células tronco (CT) embrionárias, resulta na geração de tumores em camundongos nude (21).

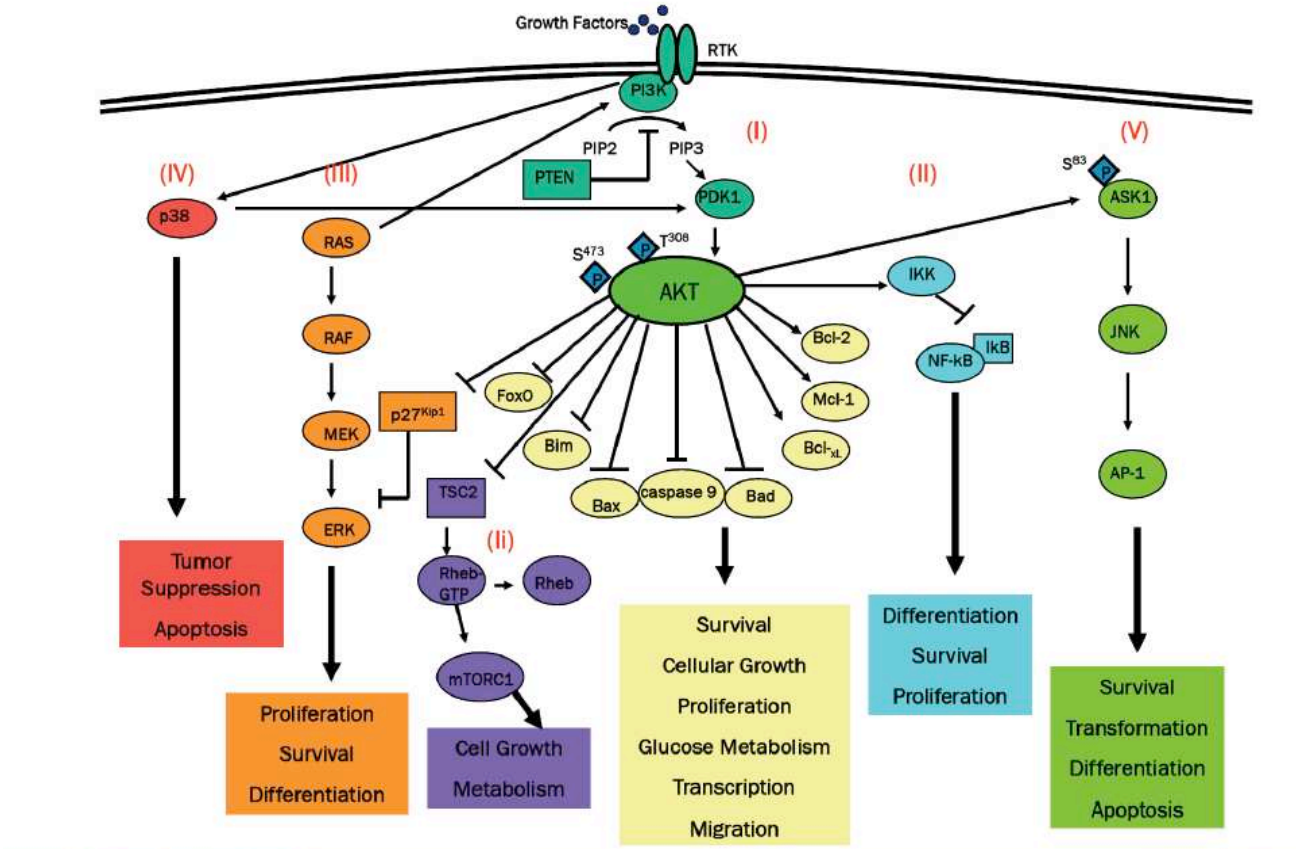

Figura 2 Via intracelular da Akt. Sinalização intracelular da Akt e suas ações biológicas (24).

No câncer de mama a via de PI3K/Akt está superativada (15, 28). Dependendo do subtipo histológico (se positivo para hormônio receptor ou para Her-2) do câncer mamário, há uma mudança na expressão de PI3K, PTEN e Akt (15). Em outras neoplasias sólidas como cólon, reto, ovário, pâncreas, endométrio, encéfalo e em melanomas observa-se também um aumento destas proteínas acompanhadas com um aumento de atividade (15, 31). A expressão de Akt está ligada à resistência terapêutica (22).

Na neoplasia mamária, observa-se uma perda da função da PTEN, o que pode levar a uma maior ativação da Akt (15). Akt é um possível alvo-terapêutico e diversos inibidores que diminuem sua fosforilação estão sendo estudados (15). Como Akt participa de diversas funções celulares além da regulação da proliferação, muitos efeitos adversos pelo uso de seus inibidores são de origem metabólica, como a hiperglicemia (15).

Testes *in vitro,* demonstraram um possível efeito inibitório do grupo farmacológico das estatinas na sinalização da Akt (32). Sinvastatina foi capaz de diminuir a fosforilação da Akt em cultura de células de câncer de próstata, sendo este efeito dose-dependente (32). Junto com este efeito, foi possível observar um aumento da apoptose, inibição da migração celular e diminuição da proliferação, todos relacionados com a diminuição da fosforilação (32). Em modelos experimentais *in vitro* utilizando culturas de MCF-7 (de câncer mamário de humanos), sinvastatina, fluvastatina e pravastatina aumentaram a expressão de PTEN e a expressão de seu mRNA (33). Já em experimentos *in vivo* utilizando camundongos nude injetados com células mamárias cancerosas, sinvastatina foi capaz de diminuir significantemente a fosforilação da Akt e aumentar a expressão de PTEN (27).

1.3 Tirosina Quinase SRC

A família de proteínas tirosina quinase consiste em nove membros, o Lyn, Fyn, Lck, Yes, Hck, Blk, Fgr, Yrk e SRC, sendo estes presentes na maioria dos tecidos, incluindo a mama (34, 35). SRC é uma proteína tirosina quinase de 60 kDa localizada na membrana do lado intracelular (36, 37). Uma vez ativada, a SRC está envolvida na regulação normal e de processos oncogênicos, como a proliferação, diferenciação e motilidade e adesão celular, além de participar de processos de angiongênese (34, 36, 38) (Figura 3). A SRC possui três sítios de fosforilação na tirosina: 215, 416 e 527 (34, 36, 37). A fosforilação da tirosina dos sítios 215 e 416 ativa as funções excitatórias da proteína, enquanto que a fosforilação do sítio 527 tem um efeito inibitório da atividade da SRC (37).

SRC está implicado no desenvolvimento e progressão de diversos tumores, como de próstata, pulmão, mama, gastrointestinal como no estômago, cólon e do reto, pancreático e melanoma (34, 35, 36). Na neoplasia, a SRC encontra-se não apenas ancorada a membrana plasmática, mas também livre no citoplasma (37, 39, 40). O aumento da expressão de SRC no tecido é um indicativo de pior prognóstico (34, 40).

No câncer de mama há diversos sinais intracelulares envolvendo a fosforilação da SRC e o caráter de malignidade (36). Há aumento da expressão da SRC de 30 a 40 vezes no tecido canceroso em comparação à mama normal e marcação positiva para fosforilação nos sítios tirosina 416 e 527 correlaciona-se com incidência de metástase (34, 36, 37, 39). Na neoplasia mamária, a SRC é caracterizada por (1) superexpressão e aumento da fosforilação, (2) participação na sinalização com a HER, (3) disseminação de células cancerosas para o tecido ósseo e (4) resistência a diversas terapias (eg: transtuzumab) (41, 42).

Há uma correlação com os níveis de SRC e carcinomas ductais *in situ* com alto grau agressividade, alto grau nuclear, alto índice de necrose, alto índice de proliferação (marcação para Ki67) e de positividade para HER2 (17, 43). Ainda, em tumores mamários positivos para HER2, há uma relação da ativação da PI3K/Akt e SRC (36, 41). SRC pode regular a progressão do ciclo celular ativando a via PI3K/Akt, provavelmente pela SRC poder controlar parcialmente a habilidade da PTEN de inibir a fosforilação da Akt (34). Para tumores mamários positivos para receptores de estrogênio e progesterona, não há uma correlação com os níveis de SRC (12, 40). Já em tumores

mamários triplo negativos, há uma correlação com a expressão da SRC fosforilada na tirosina 215 (40).

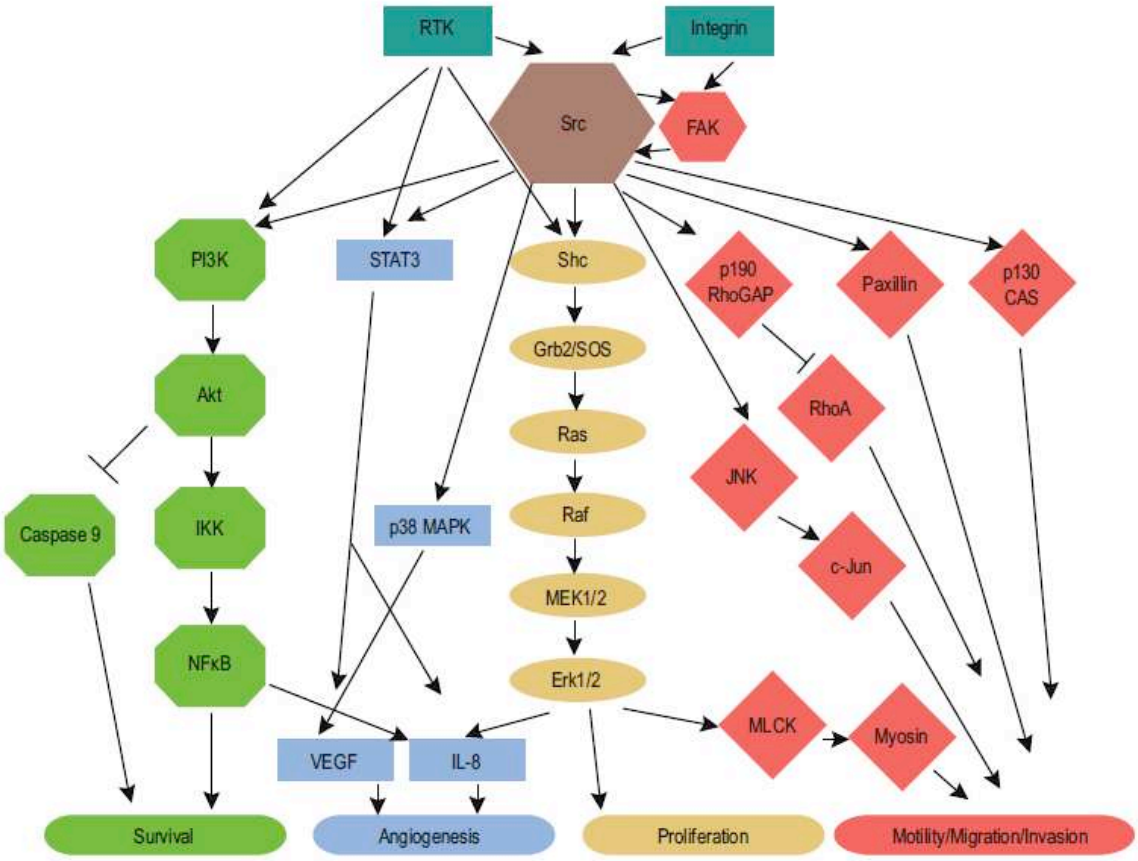

Figura 3 Via intracelular da SRC. Sinalização intracelular da SRC e suas ações biológicas (36).

1.4 Células-Tronco Neoplásicas

Existem diversos tipos de células-tronco (CT), sendo que estas são classificadas como embrionária, fetal, umbilical ou adulta (44). Estas células têm duas propriedades principais, como (1) a capacidade de auto-renovação e (2) a de originar diferentes linhagens celulares (8).

Em conjunto, essas características conferem às CT um papel fundamental tanto em processos fisiológicos tais como na formação de órgãos durante a embriogênese, renovação natural de epitélios ou reparação/cicatrização de tecidos lesados. No tecido mamário CT adultas podem se diferenciar em tecido ductal ou alveolar epitelial e em células mioepiteliais (45).

As CTs podem se expandir de forma simétrica ou assimétrica, originando duas novas células tronco filhas, ou uma nova célula tronco e uma célula-progenitora (CP), para posterior diferenciação a uma célula madura epitelial (11, 45, 46). A auto-renovação celular é controlada através de diversos genes como Bmi-1, Notch, Wnt e citocinas como TGF-□ (45, 46).

As CTs estão ligadas também a processos patológicos, como em processos degenerativos, processos inflamatórios e em particular na gênese e manutenção de neoplasias malignas (8). Atualmente, acredita-se que em diversas neoplasias, a célula alvo de mutações cumulativas responsáveis pelo desenvolvimento do fenótipo canceroso seja a CT adulta (45).

Independentemente da origem da neoplasia (se em célula madura/diferenciada ou em CT), é possível constatar *in vitro* e *in vivo*, na grande maioria dos tumores malignos, uma subpopulação de células indiferenciadas, com características fenotípicas de célula tronco, que em geral correspondem a menos de 1% da neoplasia (8). Essas células são designadas como “células tronco cancerosas ou neoplásicas (CTN)” (figura 4).

Com frequência, especula-se que as CTN poderiam ser responsáveis pela heterogeneidade morfológica e molecular de algumas neoplasias (como os carcinomas mama e ovário) (11, 45). Embora representem, geralmente, pequena parcela da neoplasia total, as CTN têm sido associadas em inúmeros estudos à capacidade de maior resistência aos principais protocolos terapêuticos anti-neoplásicas – especialmente, à quimioterapia, à radioterapia e à imunoterapia (8, 11). Essas modalidades parecem atuar de forma eficaz apenas sobre as células diferenciadas da neoplasia, reduzindo significantemente essa subpopulação e deixando para trás CTN. As CTNs expressam

moléculas como MDR1 e ABCG2, o que parece conferir a resistência das terapias já citadas (8). Tanto CT e CTNs têm habilidade maior de proteger o DNA de danos em comparação a células diferenciadas (20).

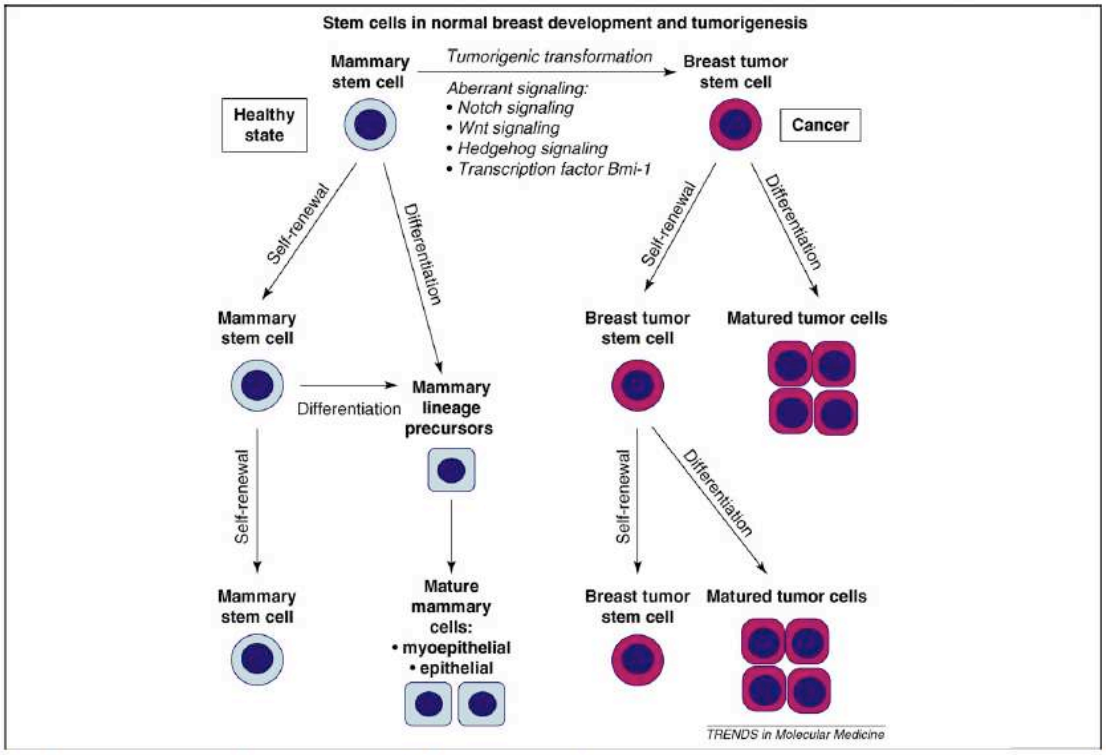

Figura 4 Células-tronco e células-tronco neoplásicas. Células-tronco e células-tronco neoplásicas mamárias e processos de divisão e diferenciação celular (8).

Acredita-se que estas células proliferariam lentamente, levando anos para reconstituir a neoplasia original em níveis detectáveis pelos principais métodos laboratoriais e imagenológicos de diagnóstico. Dessa forma, as CTN poderiam estar implicadas diretamente em recidivas em longo prazo (mais de 5 anos pós-remissão), observadas em algumas neoplasias como o câncer mamário após a remoção do tumor primário (11, 45). Por isto, criam-se hipóteses que terapias convencionais não removem ou tratam com sucesso as CTNs (45).

Na última década, evidências científicas cumulativas têm demonstrado que a proporção de CTN em uma neoplasia pode estar associada a: comportamento biológico mais agressivo (e.g., maior capacidade de invasão/metastatização), maior risco de recidiva (principalmente em longo

prazo) e, por conseguinte, pior prognóstico (11). A relação entre CTN e parâmetros de valor prognóstico/preditivo de resposta terapêutica em malignidades torna este fenótipo celular um alvo essencial em pesquisas sobre fisiopatologia do câncer e farmacologia de anti-neoplásicos, direcionadas para o aprimoramento das estratégias atuais de tratamento do câncer (11). Grande parte da literatura neste tema se desenvolveu há menos de 10 anos, inicialmente envolvendo neoplasias hematológicas (em particular, leucemias) e, posteriormente, neoplasias sólidas, com destaque para a pesquisa relacionada ao câncer de mama (47).

No câncer de mama, a presença de CTN foi estabelecida em linhagens celulares, modelos experimentais murinos e em tecido humano, através de diferentes técnicas, dentre as quais se destacam: o teste de efluxo do corante Hoechst, a formação de mamosferas em cultura de suspensão, a imunofenotipagem por citometria de fluxo e por imuno-histoquímica (48). Sabe-se que na mama, as células tronco podem se diferenciar em ductos ou alvéolos epiteliais, além de células mioepiteliais (11).

A escolha do melhor método de identificação de CTN é controversa (3, 49). Em favor dos métodos de imunofenotipagem, temos o fato de serem mais factíveis (menos complexos/trabalhosos) e envolverem menor custo (com reagentes, equipamentos e profissionais), sendo, portanto mais facilmente adaptáveis a diferentes tecidos/modelos, bem como à rotina de laboratórios de pesquisa e, futuramente, de serviços assistenciais. Nesse sentido, as técnicas imuno-histoquímicas, em particular, apresentariam ainda a vantagem de permitir o estudo *in situ* (i.e., contextualizado) das CTN, com correlação morfológica, arquitetural e topográfica (uma vez que as células são observadas em seu contexto histológico habitual). Dado que nenhum marcador é absolutamente específico para CTN, essa correlação citoarquitetural/topográfica poderia não só reduzir as chances de falsos positivos (reação cruzada com elementos tissulares normais – difícil de ser avaliada por citometria de fluxo, por exemplo), como poderia fornecer *insights* a respeito do papel biológico específico das CTN em várias neoplasias (3, 49).

A identificação de CTN por métodos imunológicos tem permitido, recentemente, estudos visando não só confirmar no câncer de mama o valor prognóstico dessas células, como também avaliar fármacos que atuem sobre células neoplásicas diferenciadas/comprometidas e sobre as CTN, sem acarretar dano às CT normais (11). As CTNs expressam moléculas específicas como

proteínas e glicoproteínas na superfície da membrana plasmática, no citoplasma ou no núcleo e se caracterizam pela ausência de outras moléculas (8, 50).

O perfil imunofenotípico de uma CTN pode variar de (1) neoplasia por neoplasia, (2) para cada espécies de mamíferos, (3) dos diversos modelos experimentais, (4) da técnica utilizada (imuno-histoquímica e citometria) e (5) do tipo amostras (*in vitro* ou *in vivo*) (8).

Dentre as moléculas específicas expressas por estas células, encontram-se CD34, CD133, CD44, ALDH, ESA, Sca-1, EpCAM, Oct4 ou combinações como $CD44^{+}/CD24^{-}$ (51). Estes marcadores são os mais utilizados para indicativos de CTN, sendo usados nas pesquisas científicas e nos estudos de CTNs (50, 52). Na tabela 1, encontram-se informações sobre a expressão destes marcadores imunofenotípicos das mais diversas neoplasias.

Além das proteínas expressas citadas, as CTNs expressam em abundancia receptores de hormônios de crescimento, sendo que altos níveis séricos do hormônio de crescimento pré-dispõe um risco maior do desenvolvimento do câncer de mama (11). Estrogênio e progesterona são citados como fatores que induzem o aumento da produção do hormônio de crescimento por células mamárias (11).

Tabela 1. Principais marcadores imunofenotípicos de CT, CP e CTNs em diferentes neoplasias malignas (8, 51).

Marcador	Sinonímia	Órgão/Tecido
CD133	Prominina-1	Mama, próstata e pâncreas
CD24	-	Mama
CD44	-	Mama e próstata
EpCAM	Antígeno epitelial-específico	Mama e pâncreas
CD34	-	Intestino, fígado e pâncreas
Oct-4	-	Mama
Sca-1	Antígeno de célula tronco	Mama, próstata, medula óssea

1.4.1 CD44

CD44 é uma glicoproteína de transmembrana contendo domínios extrecelulares e um domínio único intracelular (53). Existe uma forma padrão para CD44 e mais de dez isoformas (CD44v1-10) originadas de um único gene que contém 10 éxons (53, 54). Esta molécula tem um peso de 85-90 kDa e é expresso em diferentes tecidos como a mama, tecido linfático, cérebro e fígado (53).

Em mamíferos, CD44 é um receptor de adesão celular junto com o ácido hialurônico, componente mais abundante da matrix extracelular. (53, 55, 56). Em tecidos não neoplásicos a forma padrão e algumas isoformas são expressas em células mioepiteliais, epiteliais, fibroblastos do estroma, capilares sanguíneos e em linfócitos extravasculares (53). Na mama, alguns estudos demonstram ausência da marcação para CD44 no tecido e outros apontam uma marcação membranal positiva nas células epiteliais (53). Modelos experimentais utilizando camundongos $CD44^{-}/CD44^{-}$ observaram uma diminuição na formação e dos tamanhos dos ductos e alvéolos terminais mamários, indicando uma ação direta na proliferação celular (55). Hormônios reprodutivos podem influenciar a expressão desta molécula nos tecidos (53).

Em células neoplásicas, a ativação do CD44 leva a regulação da agregação celular, proliferação, migração e de processos angiogênicos (53). Observam-se expressão desta glicoproteína no tumor de mama, próstata, pele, gastrointestinal, ovário, pulmão e rim (53, 54). Em lesões benignas da mama, CD44 é detectada na região do epitélio alveolar, ductal (região luminal) e no mioepitélio, indicando possível relação dessa molécula com o índice de proliferação (53). Em tumores mamários invasivos, células CD44 positivas são classificadas como CP (55). Já em tumores mamários com a presença de metástase, CD44 está superexpresso nas células epiteliais, indicando possível marcador para a progressão tumoral, metástase e para avaliação do prognóstico (53). Estudos demonstraram a correlação da superexpressão de CD44 com alto grau histológico e sobrevida em cânceres de mama (55). Outros estudos *in vivo* sugerem que em diversas situações o CD44 pode inibir a progressão tumoral e diminuir o risco de metástase (55).

Experimentos *in vitro* utilizando cultura celular de câncer de próstata, demonstraram que células CD44 positivas estão ligadas à proliferação, migração e invasão e disseminação metastática

celular enquanto que nas células cancerosas mamárias CD44 está ligado a remodelação do citoesqueleto e aumento do índice de metástase e invasão (55) .

Recentemente, CD44 tem sido associado como marcador de CT na mama normal e na mama com lesões neoplásicas (57). Técnicas mais refinadas utilizam a imunomarcação dupla para $CD44^{+}/CD24^{-/baixa}$ para identificação mais precisa CTNs (57, 58). Células com este perfil representa um subpopulação equivalente a 10-20% da massa total tumoral em neoplasias mamárias (50, 57). Células com este perfil têm a capacidade de gerar diferentes linhagens celulares e possui resistência contra as terapias convencionais (57).

1.4.2 CD24

CD24 é uma proteína de adesão pequena ancorada a membrana de peso de 30 a 70 kDa, formada por 27 a 30 aminoácidos (59, 60). CD24 é encontrada em células do sistema hematopoiético (pré-linfócitos B e precursores de neutrófilos), em tecidos nervosos e em epitélios, como os queratinóticos e no túbulo renal (60). Em mama normal, CD24 é raramente expresso (61, 62). Células com CD24 expressam grandes quantidades de genes implicados no metabolismo de carboidratos e no RNA splicing (58).

A marcação de CD24 é na membrana apical e na membrana citoplasmática e em alguns casos pode ser expresso no citoplasma (58, 61). Outros autores afirmam que células CD24 positivas são células luminais diferenciadas (58). Sua expressão é utilizada para avaliação de CTNs, mas outros trabalhos demonstraram que esta molécula é expressa em CP do epitélio mamário e outros como células mais diferenciadas (59, 63).

Em tumores, CD24 é um dos responsáveis pela tumorigenese e pela progressão tumoral. Sua expressão é correlacionada com um mau prognóstico e com uma baixa sobrevida no câncer mamário, de pulmão, ovário, próstata e de bexiga (59, 60, 61). A proteína CD24 em modelos experimentais *in vivo* pode promover a invasão tecidual, facilitando o movimento da célula pelo tecido e pela penetração no endotélio (60). Ainda em tumores, CD24 estimula a proliferação celular (60). Tumores de ovário e de mama, CD24 geralmente é expresso em períodos mais avançados da doença (59).

Em modelos *in vitro* sugere a importância do CD24 para imigração e invasão celular (64, 65). Células de metástases mamárias expressam CD24 (58).

1.4.3 CD133

CD133 ou prominin-1 é uma glicoproteína de transmembrana pentamétrica (120 kDa) e é codificado pelo gene *PROM1* (30, 66). Esta molécula é transmembranal e é encontrada na membrana apical das células e em alguns casos no citoplasma (66, 67). Esta glicoproteína está ligada diretamente ao aumento do conteúdo do DNA celular, podendo observar um prolongamento das fases G1-G0 do ciclo celular o que contribui para a base da formação tumoral (44). Ainda não são conhecidas outras possíveis funções desta molécula, mas cita-se um envolvimento ao estresse bioenergético celular (50, 68). Dentre as vias intracelulares envolvidas na expressão e regulação desta molécula estão a mTOR, Akt, Wnt e SRC (30, 68, 69 , 70). Em experimentos *in vitro* de amostras de tumores de cabeça e pescoço CD133 aumenta a fosforilação da SRC, potencializando a malignidade da célula tumoral (69). Em modelos *in vivo* em camundongos NOD/SCID células mamárias CD133 conseguem desenvolver novas massas tumorais (71). No tecido mamário, modelos de *knockout* para CD133 não afeta a renovação celular, mas a ramificação dos ductos e alvéolos mamários (68). Células neoplásicas que expressam CD133 são citadas como responsáveis pela iniciação, propagação e recidiva de diversos tumores (72).

CD133 é expressa em células-tronco embrionárias, CT normais, células sanguíneas progenitoras e em CTNs (68). CD133 é utilizado para a identificação de células- tronco somáticas e/ou células CP em diversos tecidos, incluindo o tecido mamário, pancreático e em neuroblastomas (66 70, 71, 73). Tumores de cólon, do cérebro, próstata, de fígado, cabeça e pescoço e tumores mamário invasivos expressam uma subpopulação de células CTNs CD133 positiva na membrana celular (69, 74). As células CD133 positivas têm a capacidade da auto-renovação celular associado com a divisão assimétrica (50).

Diversos estudos anatomo-patológicos demonstram que a alta expressão de CD133 em diversas amostras de tumores sólidos se correlaciona positivamente com um pior prognóstico, sobrevida do paciente, estágio e tamanho tumoral, como no câncer de mama, pulmão, cólon, próstata, ovário, estômago, fígado, bexiga e cérebro (67, 68, 71). Estudos correlacionam a

expressão positiva desta molécula com aumento da angiogênese no tecido tumoral e em processos de recidivas (68, 69). Em carcinomas mamários triplo-negativo (receptores de estrogênio e progesterona e marcação para *HER2*) ou em carcinomas mamários invasivos (negativos para receptores de estrogênio), há uma correlação com metástase nos linfonodos axilares (71, 74).

Células CD133 positivas estão associadas à resistência terapêutica, principalmente no tratamento quimioterápico e na radioterapia (68, 72). Estas células que expressam esta proteína podem ser importantes alvos terapêuticos já que estão ligadas a diversos processos fisiopatológicos da neoplasia (73).

1.4.4 EpCAM

EpCAm (Ephitelial Cell Adhesion Molecule) é uma proteína de tramsmembrana de 40 kDa constituída por 314 aminoácidos sendo que 26 destes são encontrados na área intracelular (75, 76, 77). EpCAM é um marcador usado para identificar células epiteliais, CPs e CTs e CTNs (77, 78).

Esta proteína tem diversos sinônimos, como KSA e ESA ou TACSTD1 (Tumor-associated calcium signal transducer protein 1-precursor) (79). Esta proteína tem como função estabilizar adesões entre as células no tecido, na proliferação e no ciclo celular, na migração celular e na autorenovação celular (em CTNs) (76, 78, 80). Durante o desenvolvimento embrionário há expressão desta molécula em diversos tecidos (ex: hepatócitos, células gástricas, mioepitelias) e em tecidos maduros/adultos há uma ausência desta molécula (80).

EpCAM é superexpresso em cânceres como na mama, próstata, ovário, pulmão, hepático, de rins e tumores gástricos (75, 78, 80). Nestes tumores, há produção de diferentes versões de EpCAM, sendo que a expressão desta molécula correlaciona-se com diminuição da sobrevida nos pacientes (75, 80). Nos tumores, ainda não sabe o certo a função de EpCAM, cita-se que esta molécula está relacionada com a progressão neoplásica, aumento de mecanismo de resistência a apoptose a pré dispor metástases (76) e outros reportam que a diminuição da expressão leva a quadros de metástase (81).

Em amostras de mamas humanas, EpCAM é expressa no epitélio luminal (82). Na mama de camundongos, a ativação de EpCAM pode levar a um aumento do número de ductos e da produção

de proteínas do leite (75). Há uma redução de processos de apoptose, aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas e aumento da proliferação celular no tecido mamário (75). Já em lesões benignas da mama EpCAM é expressa em baixas concentrações na região luminal das células epiteliais e superexpresso no epitélio dos carcinomas mamários (76, 83).

EpCAM está mais expresso em tumores ductais que lobulares (80, 83). O mecanismo que leva superexpressão ainda não é claro, mas há hipóteses do envolvimento da disfunção da proteína p53 (76). Ainda, na mama EpCAM está ligado com a sinalização de CT, tornando esta molécula, um alvo terapêutico promissor (76). A expressão desta molécula nas neoplasias mamárias também correlaciona com o aumento do volume tumoral, da frequência de mitose e o do pleomorfismo nuclear (81).

1.5 Dimetilbenz-(a)-antraceno (DMBA) como modelo de carcinogênese mamária.

Modelos animais são amplamente usados para o estudo da carcinogênese mamária (5). Para o estudo da carcinogênese mamária é comum utilizar modelos experimentais de indução química em ratas Sprague-Dawley, Wistar-Furth e em camundongos (6). As espécies de ratas têm grande chance do desenvolvimento de neoplasmas mamário e as lesões desenvolvidas se assemelham com as lesões de humanas (5, 84). Para estes modelos químicos, utilizam-se animais jovens e virgens (6, 17).

Tumores podem ser induzidos quimicamente com a administração de 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) ou N-nitroso-N-metilurea (NMU), sendo modelos complexos com diversas etapas de carcinogênese como iniciação, promoção e progressão (6, 17, 84). Estes modelos de carcinogênese são muito utilizados e úteis, pois reproduz um modelo próximo ao carcinoma gerado em humanos e microscopicamente os tumores dividem critérios próximos de malignidade (5, 6, 17). Na tabela 2 demonstra a classificação dos tumores mamários em ratas (84).

DMBA é um hidrocarboneto poliaromático policíclico que ao ser metabolizado por oxidação e produz diol-epoxide, que se liga ao DNA criando pontos de mutações (6, 18, 25). O resultado da lesão no DNA é o aumento da expressão e de mutações no oncogenes Ras e c-erb B (18). Estipula-se também, que o DMBA pode suprimir células do sistema imunológico, como o linfócito natural killer e diminuir concentrações séricas de imunoglobulinas, contribuindo para o desenvolvimento da neoplasia (18).

Neste modelo de carcinogênese, podem ser desenvolvidos carcinomas ductais, papilares, fibroademonas e adenomas, e não se observa quadros de metástase (6). Presença de agentes antioxidantes podem inibir a iniciação e a promoção da carcinogênese dada pela ação do DMBA (18). Ainda, nos tumores desenvolvidos observam-se um aumento da expressão de Akt e dos receptores de tirosina quinase no tecido neoplásico mamário (25).

Tabela 2. Classificação de subtipos histológicos de neoplasias mamárias de ratas (84).

I.Neoplasma Epitelial

A. Lesão Benigna

1. Papiloma intraductal
2. Cistoadenoma papelífero
3. Adenoma

(a)Tubular

(b) Lactação

B. Lesões Precancerígenas

Proliferação intraductal

C. Lesões Malignas

1.Carcinoma Ductal in situ

(a)Papelífero ductal

(b)Ductal sólido e cribriforme

(c)Ductal comedal

2. Carcinoma Invasivo

(a)Papilar

(b)Cribriforme

(c)Comedal

(d) Tumor

II Neoplasias Estromais

A. Benigno

Fibroma

B. Maligno

Fibrosarcoma

III Neoplasia Epitelial Estromal

A. Benigno

Fibroadenoma

B. Maligno

Carcinomasarcoma

IV Lesões não neoplásicas

Alterações císticas

(a) Ductal

(b) Lobular

1.6- Estatinas

As estatinas são inibidores competitivos da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA), sendo esta uma enzima responsável pela biossíntese do colesterol (44). A inibição da HMG-CoA redutase faz com que diminua a síntese de ácido mevalonico, sendo este um importante precursor de componentes isoprenóides (moléculas de cadeias longas e caráter hidrofóbico) e do colesterol (85, 86, 87) (figura 5). As estatinas são capazes de diminuir no plasma o colesterol e triglicérides totais, as lipoproteínas VLDL-c e LDL-c, além de aumentar HDL-c (87, 88, 89). No fígado, as estatinas são capazes de aumentar os receptores e a recaptação de LDL-c (90). Por estes mecanismos farmacológicos, as estatinas são utilizadas na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares primárias e secundárias (44, 91).

A inibição de HMC-CoA é dada pelo grupo farmacofórico, um anel aromático hidrofóbico capaz de se ligar de maneira reversível com o sítio ativo da enzima HMG-CoA (figura 6) (87). Lovastatina e a sinvastatina são pró-drogas e tem em sua estrutura química um anel aromático com lactona (87). Estas duas drogas necessitam ser hidrolisados para ser ativado a uma forma hidroxi-ácido, com atividade farmacológica na inibição da enzima HMG-CoA (87).

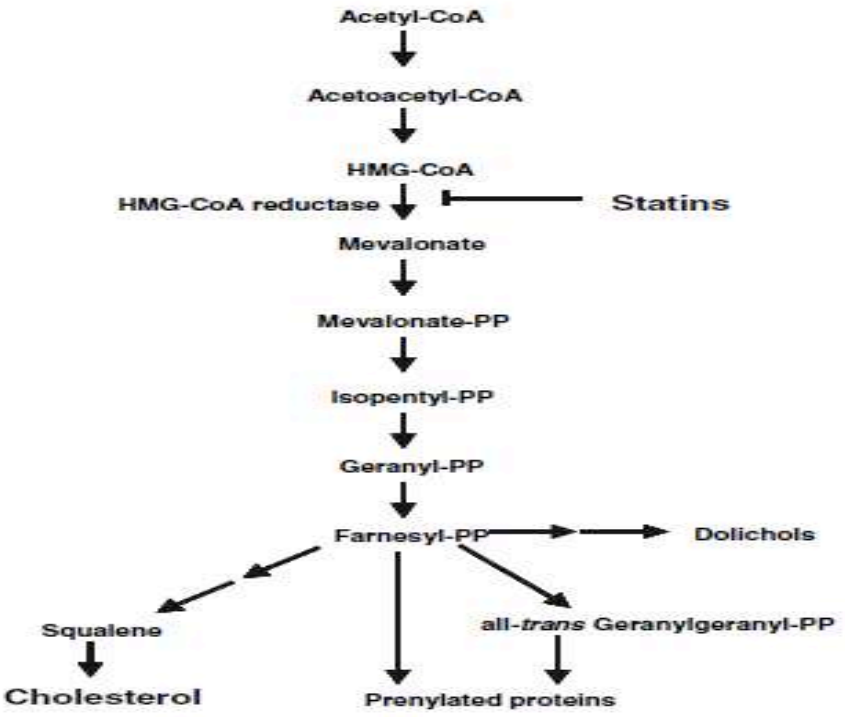

Figura 5 Via bioquímica da HMG-CoA redutase. Biossíntese do colesterol pela ação enzimática HMG-CoA e a ação inibitória das estatinas (87).

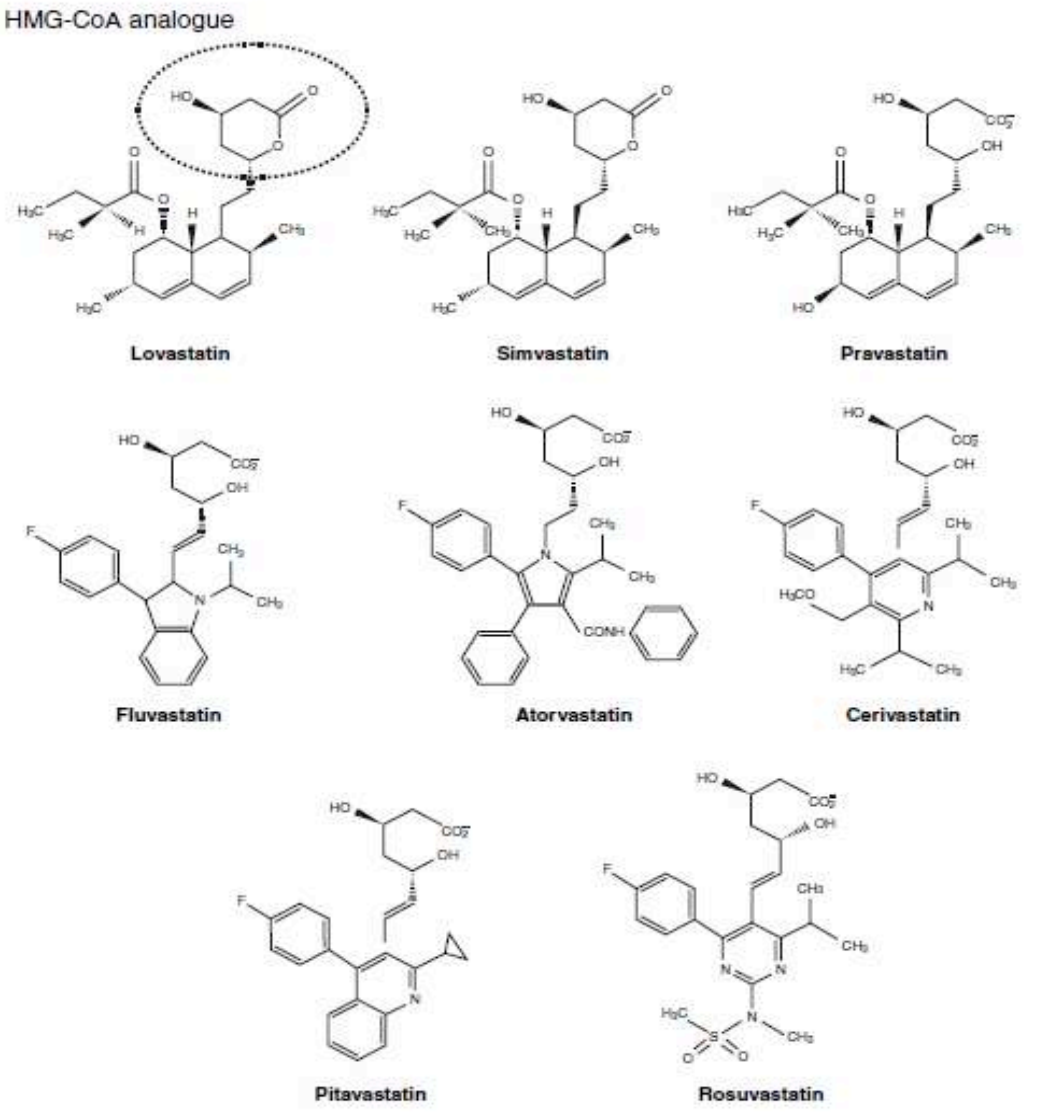

Figura 6 Estruturas químicas das estatinas. Estruturas químicas dos inibidores da hidroximetil glutaril coenzima A (HMG-CoA). Circulado encontra-se o grupo farmacofórico responsável pela inibição da ação enzimática (87).

HMG-CoA é encontrada principalmente nos hepatócitos, mas também é presente em outros tecidos periféricos, como coração, vasos sanguíneos, cérebro e mama (92, 93, 94). Nas mamas de lactentes, há um aumento da expressão e da função desta enzima em comparação com mamas de

virgens (92). O pico de atividade enzimática na mama encontra-se no período diurno, diferente da atividade no fígado que é maior no período noturno (92, 95).

Os inibidores da HMG-CoA podem ser divididos entre dois grupos: (1) as lipofílicas (sinvastatinas, mevastatinas, lovastatinas, fluvastatinas, atorvastatinas, pitavastatina) e (2) hidrofílicas (rosuvastatinas e pravastatinas) (85). Mevastatina e lovastatina são compostos naturais (derivados de fungos), sinvastatina e pravastatina são moléculas semi-sintéticas enquanto fluvastatina, atorvastatina, rosuvastatatina, pitavastatina são sintéticos (44, 87, 96). Estes grupos parecem não ter um efeito farmacológico distinto, porém cita-se que as estatinas lipofílicas podem causar efeitos colaterais mais abrangentes, principalmente miopatias (44, 97). Estas drogas se diferem entre si pelas propriedades farmacocinéticas e pelo tempo de ação nos sítios ativos (96) (Tabela 3).

Tabela 3. Perfil farmacocinético e farmacodinâmico das diferentes estatinas (90).

	IC_{50} HMGCoA Redutase (nM)	Absorção Oral (%)	Biodisponibilidade (%)	Ligação a Proteína (%)	$T_{1/2}$ β(h)	Vd (L/Kg)	Metabolismo CYP450
Pravastatina	4	35	18	50	1-3	0,46	(3A4)
Lovastatina	2-4	30	5	>98	2-5	-	3A4
Sinvastatina	1-2	60-65	<5	>95	2-5	-	3A4
Fluvastatina	3-10	98	30	>98	1-3	0,42	2C9
Atorvastatina	1,16	30	12	>98	7-20	5,4	3A4
Rosuvastatina	0,16	50	20	90	20	1,7	2C9
Pitavastatina	0,1	80	60	96	10-13	0,70	2C9

No geral, o uso das estatinas é considerado seguro e graves reações adversas são raras (87). Entre as reações adversas mais comuns observados pelo uso das estatinas estão a miotoxicidade, levando a quadros de rabdomiólise, proteinúria (pelas estatinas hidrofílicas), disfunção hepática, problemas neurológicos e riscos de desenvolvimento de diabetes melitus tipo II (87, 90, 98).

Lesões no músculo esquelético, como a mialgia e miopatias, são os efeitos adversos mais comuns com o uso das estatinas (90). Nestes pacientes é comum ter o aumento das enzimas creatinina kinase (CK) séricas (90). Os mecanismos que levam a mialgia ainda não são muito claros, mas observam-se disfunções na mitocôndria e aumento da expressão de atrogin-1 (gene envolvido na atrofia muscular) (90). Os problemas musculares podem levar a problemas renais como a rabdomiólise, com quadros de proteinúria, hematúria e quadros de insuficiência renal (90). Menos comum que as miopatias, o uso da estatina pode levar a um desenvolvimento de hepatotoxicidade, levando a um aumento da concentração sérica de enzimas transaminases, como a ALT (90). Já o risco de desenvolvimento de diabetes melitus tipo II pode ser pelo fato que as estatinas estimulam a criação de resistência periférica dos tecidos com a insulina (90).

Além do uso em terapias hiperlipidêmicas, as estatinas podem exercer efeitos farmacológicos independentes da produção de mevalonato, como efeitos imunomodulatórios, antiinflamatórios, diminuição de radicais livres de oxigênio e efeitos anti-neoplásicos (44, 98, 99). Tais efeitos anti-neoplásicos podem ser dados por as estatinas prevenirem ou regredirem diversos processos tumorais (99, 100, 101).

Pesquisas em indivíduas do sexo feminino revelaram que os usos das estatinas podem diminuir o risco de incidência de câncer mais de 20% (102, 103, 104). Estes resultados sugerem que as estatinas utilizadas sozinhas ou em combinações com outros agentes antitumorais estão associados com a diminuição do risco de câncer (85). Entre os tumores que mais respondem à ação antitumoral das estatinas, encontram-se os cânceres de pele, cólon, reto, mama, pulmão, próstata, no osso além de leucemias (101, 104). Tanto as estatinas lipofílicas e hidrofílicas tem propriedades anti-neoplásicas, mas no geral, as drogas lipofílicas são mais efetivas (91).

Entre os efeitos anti-neoplásicos das estatinas observados, incluem inibição da proliferação celular, promoção de apoptose, inibição da angiogênese e a prevenção de metástases (44, 101). Tais efeitos podem justificados pela inibição da síntese de mevalonato ou por efeitos farmacológicos paralelos, no qual se observam alterações dos níveis de oncogenes. O exato modo de ação antiproliferativo celular e pro apoptótico pelas estatinas nas células cancerosas ainda não são muito bem esclarecidos (27).

Por as estatinas inibirem a síntese de mevalonato, estas bloqueiam a biossíntese e a prenilação de intermediários de isopronóides de proteína-G, como Rho A, B, C, Ras e CEBPE/F, o que impede a auto-renovação celular (86, 105, 106). Já ações que independem da síntese de mevalonato, podem controlar níveis dos genes p21 e p27, diminuindo a proliferação celular (86). Ainda, há hipóteses que as estatinas controlem em partes o processo de diferenciação celular (91).

A inibição da proliferação celular também pode ser dada pela prevenção da transição da fase G1 a fase S ou da fase G2 a M do ciclo celular, com a regulação de quinases que facilitam a progressão celular ou pelo aumento de reguladores que inibem o ciclo celular (86, 105). As estatinas também podem desencadear a apoptose por fatores intrínsecos e extrínsecos, como o controle da proteína Bax combinado com a diminuição dos níveis de Bcl_2, uma proteína anti-apoptótica (44, 107). Além destes, cita-se que as estatinas inibem apoptoses por alterações dos níveis do gene de p53 (108). Altas doses das estatinas podem reduzir a vascularização tumoral (91) além de diminuir o potencial metástatico em células cancerosas (109).

Estudos *in vivo* em camundongos com câncer mamário ErB2(+) tiveram resultados positivos com a utilização de estatinas como sinvastatinas e lovastatinas, no qual houve diminuição do crescimento do tumor (105). Outros estudos apontaram que a lovastatina além de inibirem o crescimento tumoral em camundongos, diminui a chances de incidência de metástases (108). Em modelos de carcinogênese mamária de indução química por N-metil-N-nitrosoureia (NMU) em ratas Sprague-Dawley, a rosuvastatina, atorvastatina e a sinvastatina foram capazes de prevenir a formação de neoplasia mamária e de retardar o aumento do volume tumoral desenvolvido (110, 111, 112, 113). Neste modelo de indução química, foi observado uma ação anti-neoplásica dose-dependente. Dentre as ações que justificam em partes a ação das estatinas, está o aumento da expressão de Bax e diminuição de Bcl_2 e de Ki-67 (110, 111, 112, 113).

Já em testes *in vitro*, a lovastatina aumentou a comunicação intracelular da junção gap, influenciando os níveis intracelulares de cálcio, alterado sinalizações intracelulares de células de adenocarcinomas tumorais mamários (114) e a sinvastatina inibiu a ação de invasão por estas células pela inibição de H-Ras (115). Em células de hepatomas, sinvastatina induz a apoptose e conduz o aumento da fase do ciclo celular G0 e G1 (116). O mesmo efeito farmacológico foi observado no tratamento utilizando lovastatina nas células de glioma (117). Cerivastatina é capaz

de diminuir a fosforilação de Akt e níveis de RhoA em culturas celular de carcinoma mamário de humanos (118).

Entre os estudos *in vivo* e *in vitro* que caracterizam esses efeitos anti-neoplásicos citados, não se relata o grau de susceptibilidade de subpopulações de CTs e CTN à ação das estatinas. Apenas recentemente, Gauthaman *et al* (119) demonstraram de forma inédita que estatinas lipofílicas apresentam efeito inibitório específico sobre células tronco embrionárias com alterações cariotípicas e células de uma linhagem neoplásica mamária com fenótipo CTN, não afetando o crescimento de células tronco normais. Estas CTs embrionárias neoplásicas perderam a capacidade de gerar outras células e de se proliferar, principalmente por as estatinas lipofílicas diminuírem os níveis da proteína de Rho A (106, 119).

2. JUSTIFICATIVAS

A realização do presente trabalho baseia-se nas seguintes justificativas:

- Frente ao impacto epidemiológico mundial do câncer de mama (neoplasia mais prevalente e principal causa de óbito por câncer entre as mulheres), é necessário o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas farmacológicas que incorporem novos paradigmas de carcinogênese.

- As células tronco neoplásicas (CTN) representam um paradigma inovador e bastante promissor para estudos de fisiopatologia do câncer e de desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas anti-neoplásicas, já que parecem estar implicadas na falha terapêutica em longo prazo.

- Existem indícios *in vitro* de que as estatinas lipofílicas exercem um efeito inibitório sobre células tronco neoplásicas (além dos efeitos inibitórios reconhecidos sobre células neoplásicas diferenciadas), sem afetar de maneira adversa células normais. Contudo, até o momento, esse efeito não foi verificado em modelos *in vivo*, nem com a utilização de estatinas hidrofílicas.

- Paucidade de estudos avaliativos de possíveis ações antineoplásicas de estatinas lipofílicas e hidrofílicas.

3. OBJETIVOS

Geral

Avaliar a ação de duas estatinas (uma lipofílica e uma hidrofílica) sobre células-tronco neoplásicas, no carcinoma mamário induzido quimicamente, através de um modelo experimental em ratas Sprague-Dawley.

Específicos

- Estabelecer doses experimentais para cada estatina com base no seu perfil toxicológico.
- Determinar o volume tumoral total (VTT), a expressão de marcadores CTN e avaliar variáveis histopatológicas indicativas de comportamento e prognóstico (percentagem de necrose, índice de proliferação celular, número de mitoses, tipo e graduação histológica).
- Verificar possíveis correlações entre as principais variáveis de análise (VTT e CTN) e as demais variáveis histopatológicas.
- Verificar possíveis correlações entre diferentes marcadores CTN utilizados.
- Descrever comparativamente os efeitos das estatinas avaliadas sobre parâmetros mencionados acima.
- Investigar a participação da via SRC e Akt no mecanismo de ação das estatinas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Locais de realização dos experimentos

Os experimentos e as análises foram realizados no Laboratório Histomorfometria e Patologia Molecular Aplicada (LHIAP)/FARMACOLOGIA/FCM (UNICAMP) e em colaboração com o Laboratório de Patologia Experimental (LAPE)/CIPED/FCM (UINCAMP), Laboratório da Fisiopatologia da Diabetes /FARMACOLOGIA/FCM (UNICAMP), Laboratório de Farmacologia e Bioquímica /FARMACOLOGIA/FCM (UNICAMP) e o Laboratório de Patologia Experimental e Molecular do Hospital do Câncer A. C. Camargo/ Fundação Antônio Prudente.

4.2- Animais e aspectos éticos

Ratas inbreads fêmeas virgens Sprague-Dawley provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB-UNICAMP), pesando entre 150-180g foram adaptadas durante uma semana ao Biotério do Departamento de Farmacologia- Unicamp e submetidos aos tratamentos no período de 40 a 45 dias de vida. As ratas foram mantidas em gaiolas plásticas (cinco animais/gaiola), alimentadas com ração para roedores (Nuvital®) e água “ad libthium”, sob temperatura de 22±2C em foto período de 12 horas (claro/escuro). Foram realizados diariamente observações clínicas dos animais (peso, avaliação de sinais e sintomas de dor, sofrimento).

Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no uso de animais da Universidade Estadual de Campinas (CEUA-IB-UNICAMP), protocolo n° 2335-1. Seguiram-se as recomendações éticas gerais da Sociedade Brasileira para Ciência de Animais de Laboratório-SBCAL. Todos os procedimentos experimentais foram orientados e avaliados por um médico veterinário responsável.

4.3 Padronização das Doses das Estatinas

No primeiro desenho experimental foi realizada a padronização das doses das estatinas a serem utilizadas, sendo que as doses escolhidas para o teste foram retiradas da literatura (120, 121). Os animais foram divididos em 9 grupos: grupo controle (C) tratado com óleo durante 14 dias (n=6); grupo sinvastatina tratado com 20 (S20), 40 (S40), 80 (S80) e 100 mg/kg (S100) (n=6/grupo); grupo pravastatina tratado com 50 (P50), 100 (P100), 150 (P150) e 250 mg/kg (P250) (n=6/grupo). O tratamento foi diário, por via intragástrica (com auxílio de agulha de gavagem) durante 14 dias consecutivos. Após o tratamento coletou-se sangue para testes bioquímicos e realizou-se necropsia dos animais.

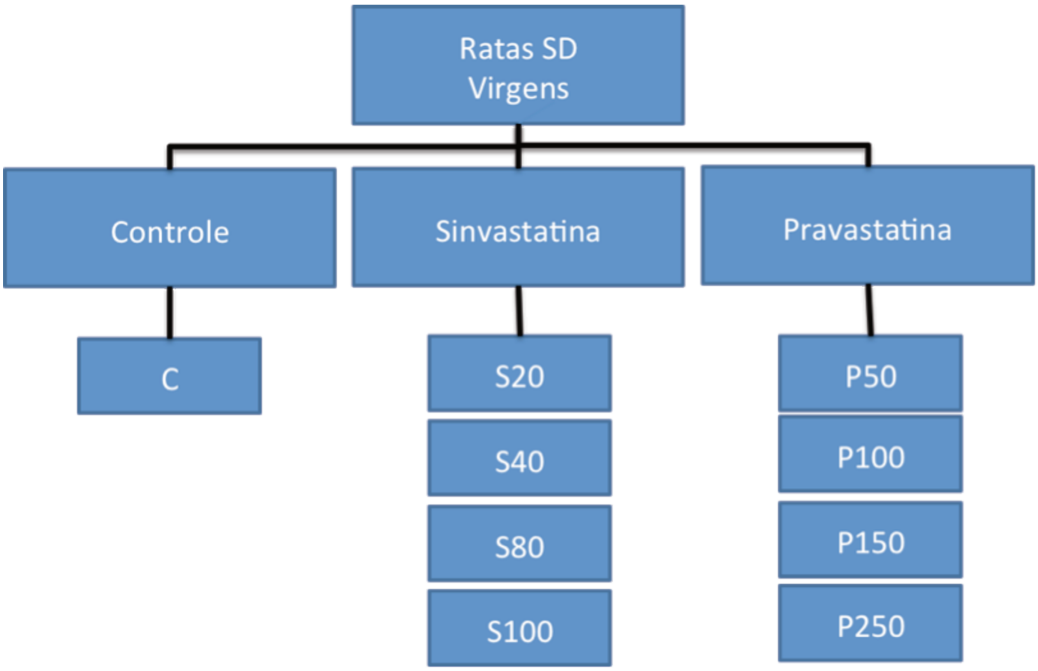

Figura 7 Desenho experimental da padronização das doses das estatinas. Protocolo experimental da padronização da sinvastatina e pravastatina.

4.3.1 Avaliação bioquímica

Instante antes de eutanasiar os animais procedeu-se à coleta de amostras de sangue destes (já anestesiados), através de punção cardíaca. O sangue foi depositado em tubos Eppendorf de plástico e logo centrifugado a 12.000 *g* por 10 min em temperatura ambiente para a obtenção do plasma (centrifuga modelo 5415 R, Eppendorf, Alemanha). O sobrenadante foi separado e armazenado a 4ºC até a realização dos testes bioquímicos.

Os parâmetros bioquímica foram analisados através de kits comercais para testes colorimétricos (BioClin®, Brasil) e procedeu-se a conduta da análise de acordo com a bula do fabricante. Foram analisados os marcadores: VLDL-c, HDL-c, LDL-c, colesterol total, triacilglicerol total, enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato transaminase (AST), enzimas musculares creatina quinase (CK) e para avaliar a função renal a creatinina sérica.

Para a quantificação de todos os marcadores analisados, utilizou-se o espectrofotômetro DU 800 (Beckman Coulter, EUA).

4.3.2 Necropsia

No final do protocolo experimental, as ratas foram anestesiadas com isoflurano e eutanasiadas por aprofundamento anestésico e deslocamento cervical. Foram avaliados macroscopicamente e microscopicamente: sistema nervoso central, trato digestório, fígado, rins, pulmão, baço, músculo cardíaco e músculo esquelético (masseter superficialis, parede abdominal, gastrocnemius e bíceps brachii). Para a avaliação microscópica procedeu-se métodos histológicos utilizando parafina.

4.3.3 Avaliação Histopatológica

Para a coleta dos tecidos, os ratos foram anestesiados com isoflurano e perfundidos via aorta com salina heparinizada para retirar o sangue dos tecidos. Após o sacrifício dos mesmos, foram coletados amostras do sistema nervoso central, trato digestório, fígado, mamas, rins, pulmão, baço, músculo cardíaco e músculo esquelético (masseter superficialis, parede abdominal, gastrocnemius e bíceps brachii) para análise histológica. Os tecidos foram fixados em paraformoldeído 10% (preparado em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4) durante 24h e processados para a microscopia de luz.

Após desidratação em gradientes decrescentes de álcool e diafanização com xilol, os tecidos foram embebidos e incluídos em parafina (Histosec, Merck). Os blocos de parafinas foram secionados em micrótomo (Leica RM 2245, Alemanha) com espessura de 4-5 μm.

As secções preparadas conforme descrito acima foram coradas com hematoxilina-eosina e analisadas em microscopia de luz usando um microscópio Leica DM 5000 B. As imagens foram capturadas usando câmera CCD LEICA CTR 5000.

Nas amostras do músculo esquelético (masseter superficialis, parede abdominal, gastrocnemius e bíceps brachii) foi calculada a percentagem de fibras com sinais de necrose (média de 5 campos de médio aumento/estrutura muscular). As imagens foram analisadas manualmente por 2 observadores (cegos às intervenções), utilizando o programa Image J (NIH, USA).

4.4 Modelo de carcinoma mamário

No segundo desenho experimental realizado consistiu no teste de doses selecionadas das estatinas em modelo de carcinoma mamário induzido quimicamente. Nesta fase, os animais foram divididos nos seguintes grupos: (1) indução sem tratamento com estatinas (DMBA, n=12/grupo); (2) indução + tratamento com sinvastatina em duas doses (20mg/Kg [DMBA+S20] ou 40 mg/kg [DMBA+S40], e (3) indução + tratamento com pravastatina em duas doses (50mg/Kg [DMBA+P50] ou 150 mg/kg [DMBA+P150] (n=6/grupo) e grupos sem indução tumoral e sem tratamento com estatinas C (n=6/grupo) e sem indução tratados com duas doses de sinvastatina (20 mg/Kg [S20] ou 40 mg/Kg [S40]) ou duas doses pravastatina (50 mg/Kg [P50] ou 150 mg/Kg [P150]) (n=6/grupo).

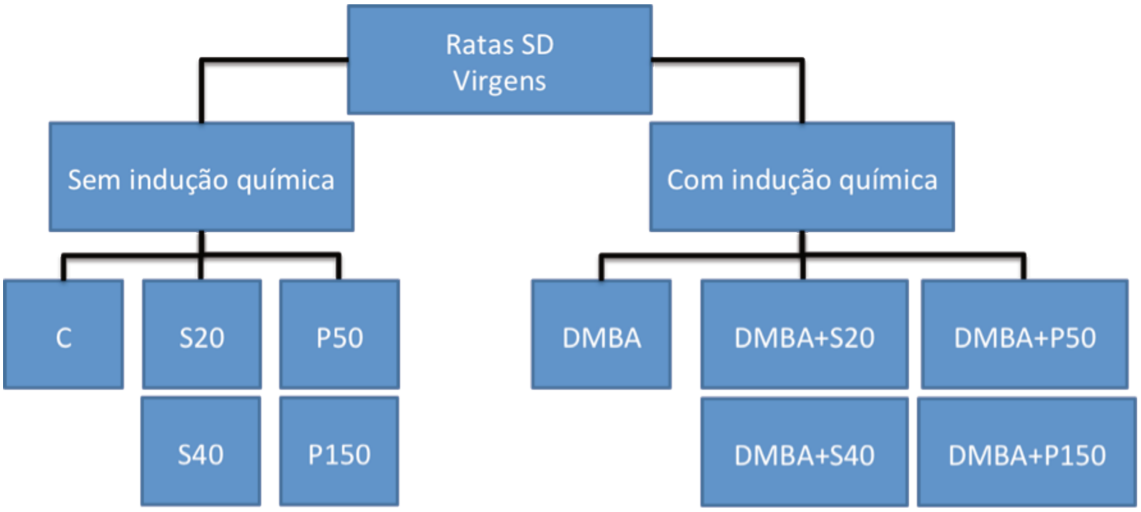

Figura 8 Desenho experimental para o modelo de carcinoma mamário e testes das estatinas. Protocolo experimental com o modelo de carcinogênese mamária e as doses utilizadas das estatinas.

Após o desenvolvimento macroscópico da neoplasia mamária aproximadamente 1 cm de largura e comprimento, realizou-se o tratamento com as estatinas com as doses propostas, uma vez ao dia, por via intragástrica (com auxílio de agulha de gavagem) durante 14 dias consecutivos.

Durante todo protocolo os animais foram acompanhados diariamente, com avaliação de peso, e exames clínicos gerais, visando identificar síndromes decorrentes do desenvolvimento da neoplasia. Durantes as avaliações os tumores foram mensurados em seus maiores diâmetros perpendiculares com auxílio de um paquímetro digital, sendo o volume calculado segundo à formula:

V=Comprimento x Largura x Altura x /6

No final do tratamento os animais foram eutanasiados e procedeu-se para a análise macro e microscópica das mamas e dos órgãos. Realizou-se o procedimento de western blotting com as mamas com tumor ou não.

4.4.1 Indução Tumoral

O carcinoma mamário foi induzido através de uma única dose de 7,12-dimetilbenz-(a)-antraceno (DMBA), de 100mg/Kg de peso vivo, diluída em 1mL de óleo de soja) administrada intragastricamente por gavagem (protocolo modificado de Barros et al, 2004). Os animais tinham no entre 40 e 45 dias de vida (6).

4.4.2 Avaliação Histopatológica

Todos os animais foram submetidos a necropsia completa para investigação de doença metastática, neoplasias primárias sincrônicas (em sítios não mamários), além de possíveis comorbidades (ex: efeitos tóxicos causados pelo tratamento farmacológico). Após fixação por imersão em formalina tamponada 10% por 24 horas, os tecidos foram submetidos a processamento histológico automatizado e inclusão em parafina. Cortes histológicos de 4-5 μm foram corados com hematoxilina-eosina ou foram utilizados para o procedimento de imuno-histoquímica utilizando lâminas polarizadas (immunoslides).

Foram avaliadas as principais características morfológicas dos tumores: tipo(s) histológico(s), grau histológico final (segundo o sistema de Nottingham/OMS, 2012), percentual de necrose (4 campos de pequeno aumento/tumor) e índice mitótico (10 campos de grande aumento/tumor). Em tecidos não mamários, procedeu-se à análise histopatológica observando possíveis alterações toxicológicas ou decorrentes de metástase.

Para a análise histométrica as lâminas foram digitalizadas em scanner de lâminas ScanScope XT (Aperio Techonologies Inc., EUA). As imagens foram analisadas manualmente por 2 co-observadores (cegos às intervenções), utilizando o programa Image J (NIH, USA). Para a captura

de imagens para finalidade de ilustração, foi utilizado microscópio óptico (Leica DM 5000 B, Alemanha) e documentada em sistema de fotomicroscopia digital (câmera CCD LEICA CTR 5000).

4.4.3. Imunoistoquímica

Para detecção de Ki67 e de marcadores para CPs e CTNs, realizou-se o método de imuno-histoquímica. Após a desparafinização e hidratação, os cortes histológicos foram submetidos a bloqueio da peroxidase endógena (três banhos de H_2O_2 10 volumes, de 5 minutos cada), recuperação antigênica por calor úmido (imersão em solução tampão citrato de sódio pH 6.0 ou EDTA pH 9.0 por 30min, em panela de vapor, a 95°C) e incubação 'overday' com o anticorpo primário anti-Ki67, anti-CD133 , anti-CD24, anti-CD44, anti-EpCAM. Como método de detecção, foi utilizado sistema livre de biotina, baseado em polímero marcado com peroxidase, ligado a anticorpo anti-imunoglobulina de coelho (Novolink, Novocastra, UK); para a revelação da reação, utilizou-se um substrato cromogênico - a solução DAB (tetraidrocloreto de 3-3'-diaminobenzidina, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, Estados Unidos da América) na proporção de 0,06g para 100mL de PBS-, 500μl de H_2O_2 a 20 volumes e 1mL de DMSO (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos da América), por cinco minutos. Os cortes foram então contracorados com hematoxilina de Mayer, desidratados e montados em lamínulas e resina Entellan® (Merck, Dermstad, Alemanha).

Seis imagens aleatórias foram obtidas em campo de médio aumento (CMA- 20x) dentro de macrorregiões previamente identificadas como "hot-spots". As imagens foram analisadas manualmente por 2 observadores (cegos às intervenções e ao marcador imuno-histoquímico), utilizando o programa Image J (NIH, USA). Os resultados foram expressos em número de células positivas/6CMA para cada marcador.

Tabela 4. Características dos marcadores imunológicos de células-tronco, células progenitoras e células tronco-neoplásicas

Anticorpo	Diluição	Tipo	Marca
CD133	1:250	Policlonal de coelho	Abnova (EUA)
CD24	1:200	Policlonal de coelho	ABBIOTEC (EUA)
CD44	1:200	Policlonal de coelho	Abcam (EUA)
EPCAM	1:200	Monoclonal de coelho	Abnova (EUA)
Ki67	1:300	Policlonal de coelho	Abnova (EUA)

4.4.4 Western blotting

Procedeu-se à eletroforese com gel de SDS 10% de amostras de mamas com ou sem neoplasia. Após a corrida eletroforética, transferiram-se as proteínas para membrana de PVDF (Hybond-P, Amersham bioscience, EUA) pelo método de Towbin (122). Após a transferência, realizou-se o teste de Ponceau para averiguar a transferência das proteínas e bloqueou-se sítios inespecíficos com soluções de leite 5%. Incubou-se a membrana com anticorpos primários anti-pSRC (monoclonal, Millipore, EUA, 1:750), anti-SRC (monoclonal, Millipore, EUA, 1:1000), anti-pAkt (policlonal, Santa Cruz, EUA, 1:500), anti-Akt (policlonal, Santa Cruz, EUA, 1:500) e anti-PTEN (policlonal, Santa Cruz, EUA, 1:1000).

Foi incubado o anticorpo secundário IgG-peroxidase anti-coelho (KPL, EUA, 1:10000) e procedeu-se para o processo de revelação com kits de quimioluminescência (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific) e documentadas com filme fotográfico (Kodak, São José dos Campos, SP, Brasil). Para controle interno, procedeu-se western blotting com anti-GAPDH (monoclonal, Sigma, EUA, 1:500).

Os cálculos foram realizados a partir da densitometria óptica utilizando o programa UN-SCAN-IT gel 6.1, EUA.

4.5 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média±erro padrão da média (EPM). Para a análise entre grupos envolvendo variáveis quantitativas, foi utilizado ANOVA seguido do teste de Bonferroni ou teste t Student (para dois grupos). Para variáveis categóricas, foi utilizado o teste Fisher. Para correlações entre as variáveis utilizaram-se gráficos de dispersão com curva ajustada e regressão linear com cálculo do r de Pearson.

Valores de *p* inferiores que 0,05 foram considerados estaticamente significativos. O software GradphPad Prism 5.0 para Windows foi utilizado tanto na estatística descritiva como na inferencial.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação farmacológica e toxicológica das estatinas

Foram testadas quatro doses diferentes para cada estatina, sendo doses de 20, 40, 80 ou 100 mg/Kg para sinvastatina (estatina lipofílica) e 50, 100, 150 ou 250 mg/Kg para pravastatina (estatina hidrofílica). Para cada dose foram avaliados diversos marcadores bioquímicos para o perfil lipídico (colesterol total e triacilglicerol total, VLDL-c, LDL-c e HDL-c), avaliação de miotoxicidade no músculo esquelético (CK), análise de hepatotoxicidade (ALT, AST) e avaliação renal (creatinina).

O perfil lipídico é demonstrado na figura 9. Apenas a maior dose testada de sinvastatina foi capaz de diminuir o colesterol total em comparação ao grupo controle (Figura 9 A). Doses acima de 40 mg/Kg para sinvastatina e doses a partir de 100 mg/Kg de pravastatina diminuíram os níveis séricos de triacilglicerol (figura 9 B) e de VLDL-c (figura 9 C). Não foi observado nenhuma alteração significativa na quantificação de HDL-c (figura 9 D) e de LDL-c (figura 9 E). Apenas as menores doses testadas de ambas as drogas não tiveram nenhum efeito farmacológico sob o perfil lipídico avaliado.

Para a avaliação da miotoxicidade foi quantificado no sangue a enzima CK e realizado a avaliação histopatológica de quatro músculos esqueléticos diferentes: masseter superficialis, parede abdominal, gastrocnemius e bíceps brachii. As duas maiores doses da sinvastatina (80 e 100 mg/Kg) e a maior dose da pravastatina (250 mg/Kg) testada, elevaram os níveis de CK, indicando lesões musculares (figura 10 A). Nas maiores doses testadas da sinvastatina foi possível observar fibras necróticas em todos os músculos esqueléticos avaliados, sendo muito mais intenso na maior dose testada (figura 10 B, C, D e E). Dentre as lesões microscópicas observadas, estão a mionecrose com lesões delta e a presença de inflamação aguda (figura 11). Não houve lesões macroscópica e microscópica do músculo cardíaco e de amostras do músculo liso com o tratamento das estatinas.

A figura 12 demonstra a quantificação de enzimas hepáticas. ALT e AST são enzimas liberadas no sangue quando há lesões hepáticas agudas e crônicas respectivamente. O tratamento com a maior dose da sinvastatina elevou o níveis séricos dessas duas enzimas de maneira significante. Não houve alteração da concentração sérica destas enzimas com animais tratadas com pravastatina. Para a complementação da avaliação de sinais toxicológicos no fígado, houve análises

microscópica das três zonas hepáticas (figura 13): zona I (região da artéria e veia hepática e canículos biliares), zona II (rica em sinusoides) e zona III (região da veia centrolobular). Sinvastatina 100 mg/Kg causou inflamação na zona I e discreta esteatose microvacuolar na zona II(Figura 14 A). Em animais tratados com a pravastatina na dose de 250 mg/Kg observou-se pequenos focos inflamatórios na zona II e III (Figura 14 B).

As figuras 15 e 16 demonstram o perfil renal dos animais tratados com sinvastatina e pravastatina. A maior dose da pravastatina elevou os níveis séricos de creatinina, um indicativo da diminuição da função renal. Ainda, nestes animais, foram observados focos inflamatórios na área do córtex renal. Tratamento com a sinvastatina não resultou em lesões renais.

Foram avaliados macroscopicamente e microscopicamente tecidos como: estômago, intestino, baço, pulmão, cérebro e mama. Por avaliações histomorfológicas, estes tecidos não apresentaram lesões celulares, inflamações ou outras comorbidades. Na mama, não houve alteração de número de células ou mudanças estruturais nos ductos ou alvéolos.

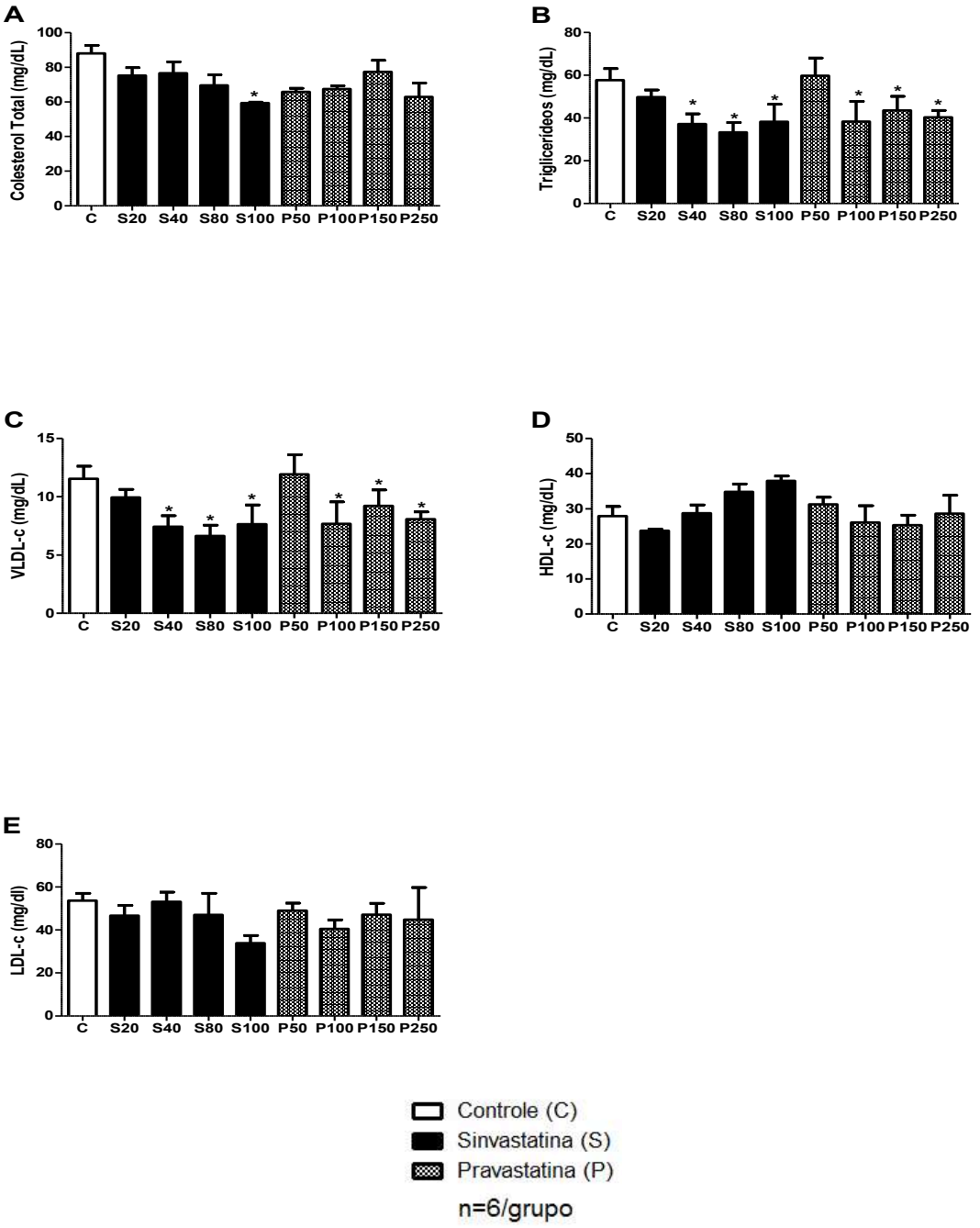

Figura 9. Análise do perfil lipídico. Quantificação das concentrações séricas de colesterol total (A), triglicerídeos (B), VLDL-c (C), HDL-c (D) e LDL-c (E) dos grupos C, S20, S40, S80, S100, P50, P100, P150 e P250. As barras representam média± EP. *p<0.05 comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

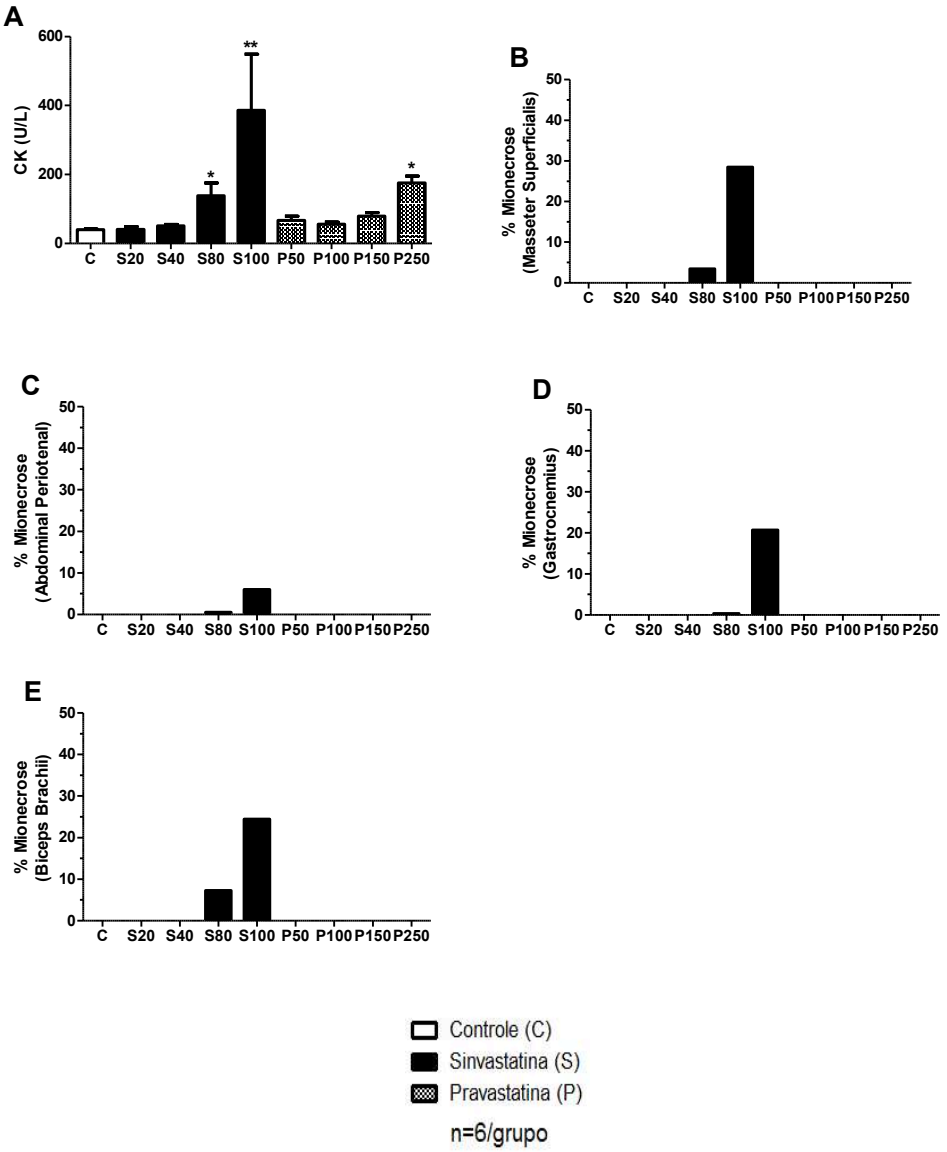

Figura 10. Análise da miotoxicidade. Análise das concentrações séricas de CK (A) e percentagem média de necrose nos músculos masseter superficialis (B), abdominal periotenal (C), gastrocnemius (D) e bíceps brachii (E) dos grupos C, S20, S40, S80, S100, P50, P100, P150 e P250. As barras representam média±EP em A, e média da percentagem em B, C, D e E. A percentagem da mionecrose foi realizada pela análise de 5 campos de médio aumento (200x). **p<0.01 e *p<0.05 comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

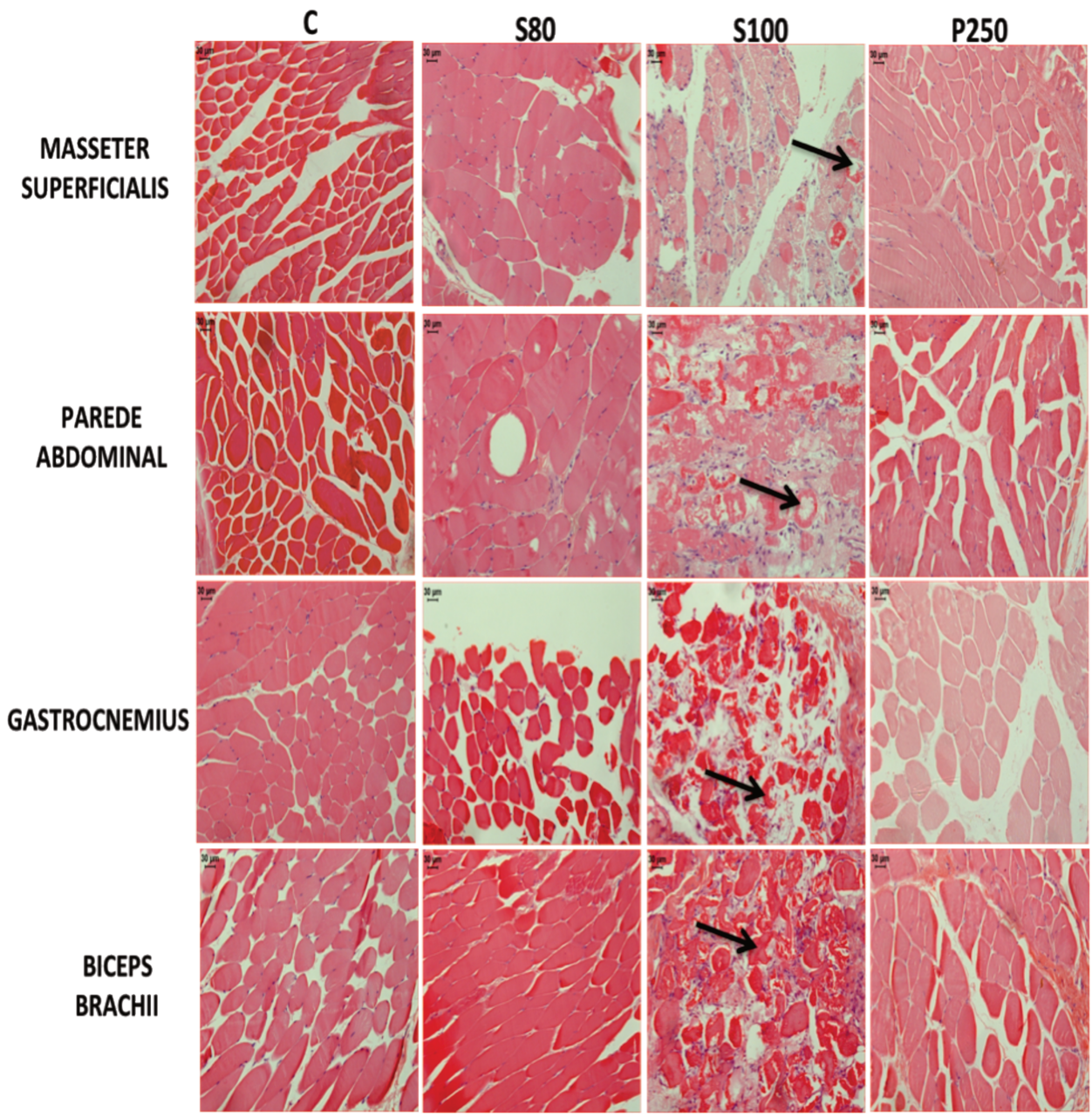

Figura 11.Avaliação Histopatológia da musculatura esquelética. Análise histopatológica de amostras de músculo esquelético (masseter superficialis, abdômen, gastrocnemius e bíceps brachii) dos grupos C, S80, S100 e P250. Setas: alterações morfológicas e mionecrose. Hematoxilina e eosina, barra de escala=30 µm.

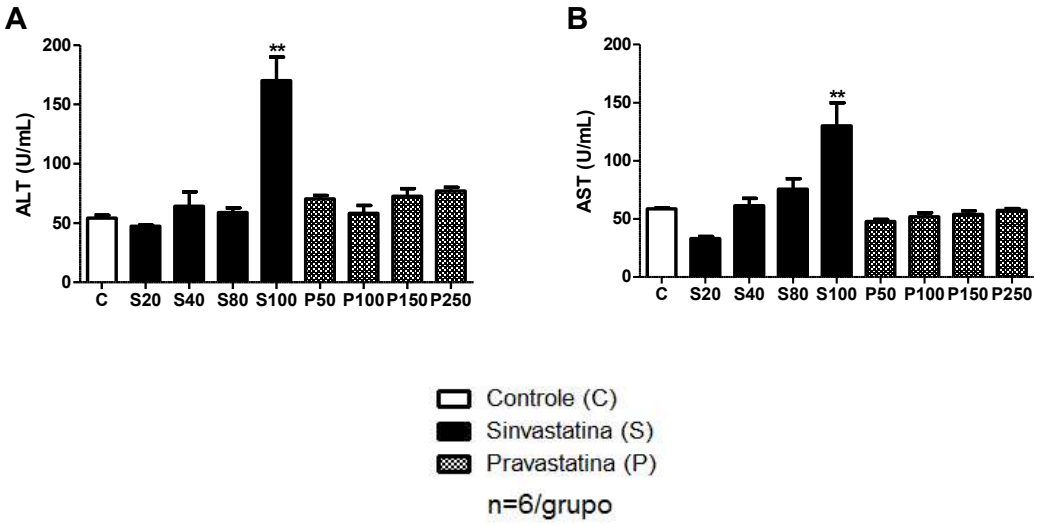

Figura 12 Análise da função hepática. Análise das concentrações séricas de ALT (A) e AST (B) dos grupos C, S20, S40, S80, S100, P50, P100, P150 e P250. As barras representam as média±EP. **p<0.01 comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

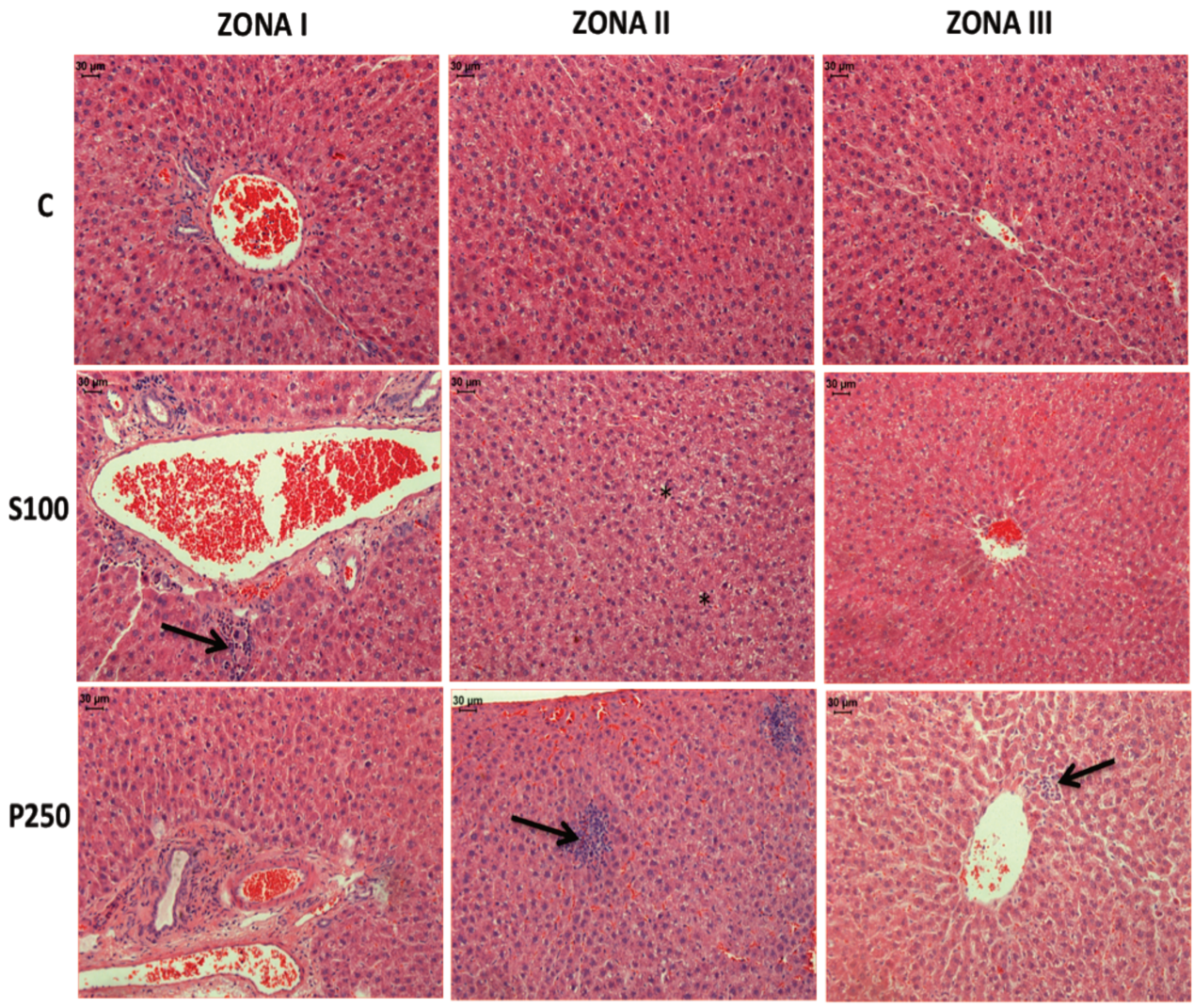

Figura 13 Avaliação histopatológica do fígado. Avaliação histopatológica das zonas I, II e III do tecido hepático dos grupos C, S100 e P250. Setas= infiltrado inflamatório; *= esteatose microvacuolar. Hematoxilina e eosina, barra de escala=30 µm.

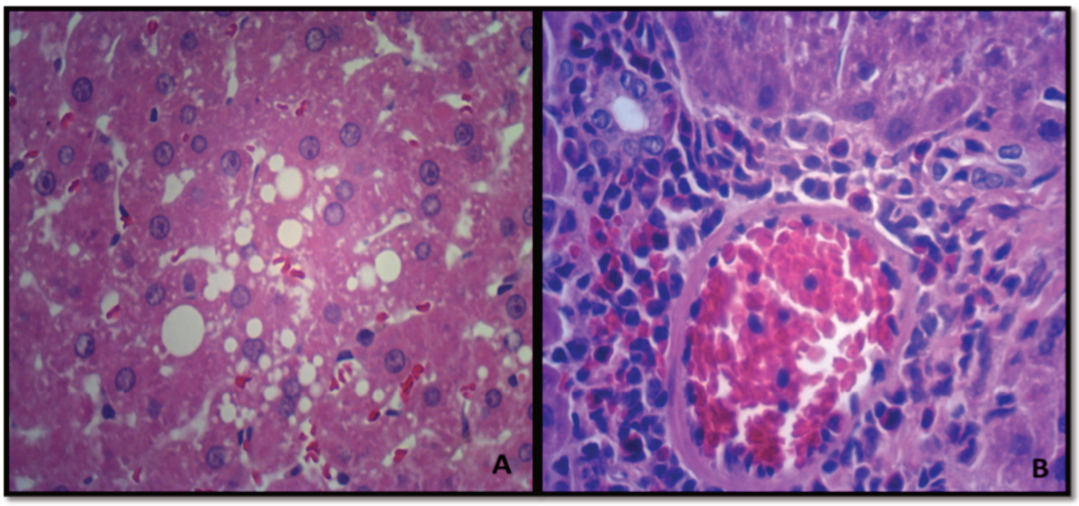

Figura 14 Avaliação histopatológica do fígado de ratos tratados com estatinas. (A) Alteração macrovacuolar de animais tratados com 100 mg/kg de sinvastatina e (B) processo inflamatório misto de animais tratados com 250 mg/kg de pravastatina.Hematoxilina e eosina (aumento de 400x).

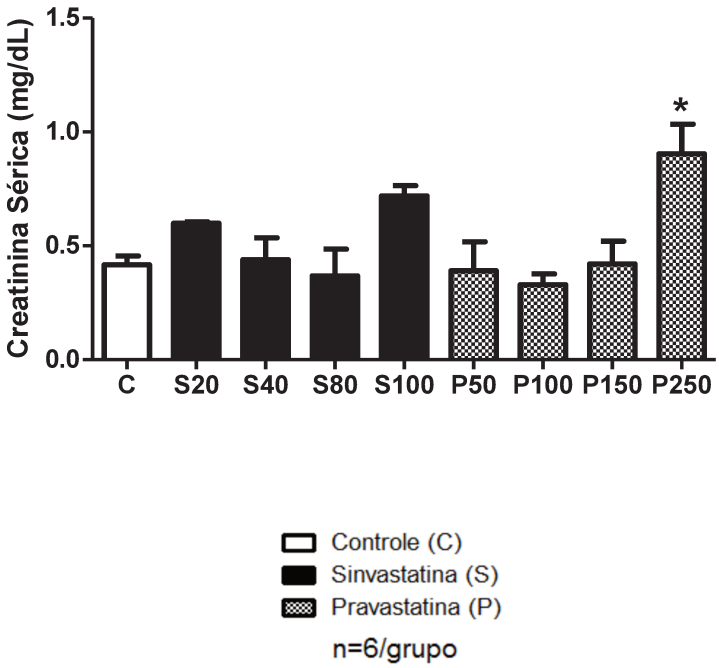

Figura 15 Análise de creatinina sérica. Avaliação das concentrações séricas de creatinina dos grupos C, S20, S40, S80, S100, P50, P100, P150 e P250. As barras representam as média±EP. *p<0.05 comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

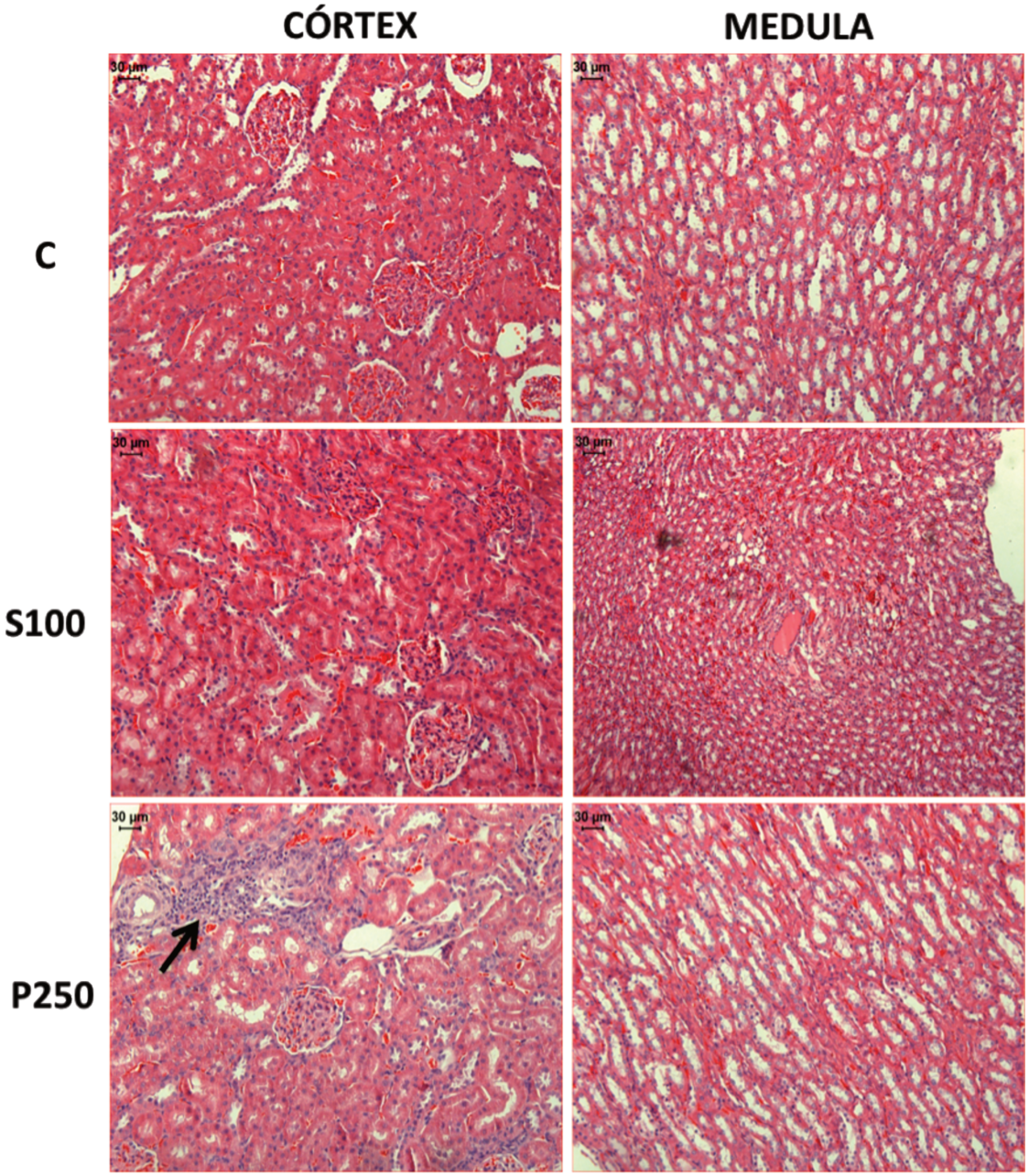

Figura 16 Avaliação histopatológica renal. Avaliação histopatológica da região cortical e medular do tecido renal dos grupos C, S100, P250. Seta= infiltrado inflamatório. Hematoxilina e eosina, barra de escala=30 µm.

5.2 Atividades antineoplásica das estatinas

5.2.1 Indução química por DMBA

Em uma média de sessenta dias após a indução química com o composto DMBA, todas as ratas, de todos os grupos experimentais (DMBA, DMBA+S20, DMBA+S40, DMBA+P50, DMBA+P150) desenvolveram de 1 a 6 nódulos malignos tumorais mamários macroscopicamente visíveis. O volume final variou de 0,06 a 9,15 cm^3 com peso na faixa de 0,08 a 13,53 gramas. Observou-se bilateralidade na maioria dos animais que desenvolveram mais de um tumor e houve grande variação nos sítios anatômicos das linhas mamárias quanto ao desenvolvimento neoplásico (figura 17 A).

No exame macroscópico, foi possível observar ulcerações cutâneas (figura 17 B) nos grupos DMBA (3/12), DMBA+S20 (1/6) e DMBA+P50 (1/6). Estas ulcerações foram detectadas no primeiro tumor palpável desenvolvido no animal.

Os tumores desenvolvidos em todos os grupos apresentaram contornos arredondados e ovolados com projeções irregulares e com boa delimitação em relação aos tecidos normais adjacentes (figura 18). Os tumores apresentavam coloração vermelhada/rosada, com pequenas áreas necro-hemorrágicas e consistência friável e macio. Os tumores de maiores tamanho/volume apresentaram material secretório avermelhado.

Em todos os grupos não foi observado nenhum sinal de metástase macro ou microscopicamente no pulmão, fígado, trato digestório, baço, coração, rins ou nos linfonodos próximos das mamas.

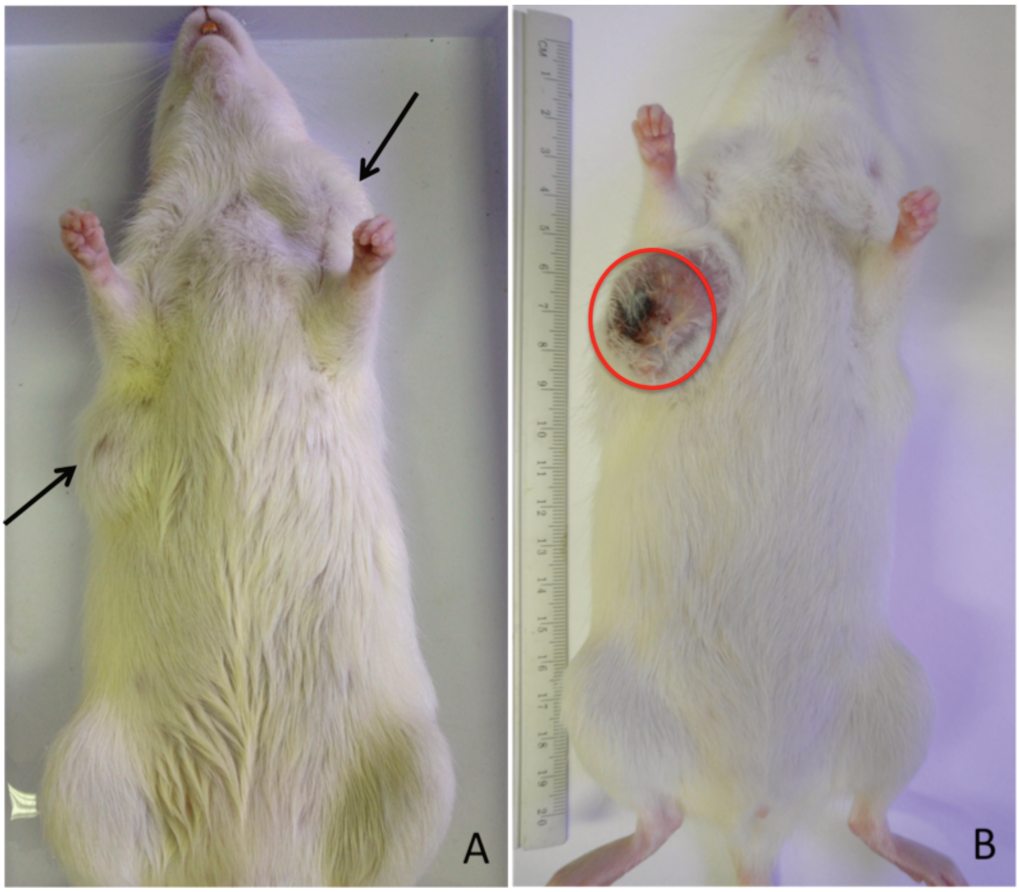

Figura 17 Avaliação Macroscópica dos tumores de mama induzidos por DMBA. Aspectos macroscópicos das neoplasias mamárias desenvolvidas, com bilateralidade (A) e ulcerações (B). Setas: tumor mamário; Círculo: área com ulceração. Os animais são do grupo DMBA.

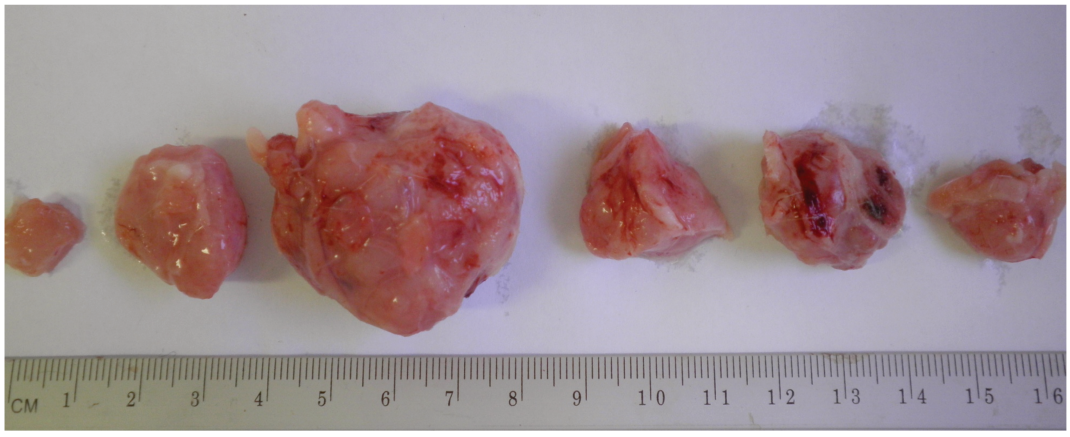

Figura 18 Neoplasias mamárias induzidas pelo tratamento agudo de DMBA. As amostras neoplásicas foram desenvolvidas em um único animal do grupo DMBA.

5.2.2 Avaliação antineoplásica das estatinas

Foram selecionadas duas doses de cada estatina para testar no modelo de carcinogênese mamária induzida pelo DMBA. Para a escolha das doses foram analisados os dados do primeiro desenho experimental realizado neste projeto (teste de toxicidade das estatinas) avaliando os parâmetros toxicológicos no músculo esquelético, rim e fígado, além da análise farmacológica no perfil lipídico. A primeira dose a ser escolhida foi a menor dose onde não foram observados efeitos farmacológicos nas frações lipídicas (20 mg/Kg para sinvastatina e 50 mg/Kg para pravastatina). A segunda dose escolhida foi aquela que obteve ação farmacológica nos lipídios, mas não foram observados comorbidades pelos parâmetros toxicológicos analisados (40 mg/Kg para sinvastatina e 150 mg/Kg para pravastatina).

Após a indução do tumor mamário e formação da massa cancerosa aproximadamente de um cm em dois comprimentos, iniciou-se o tratamento com as estatinas nas doses propostas, durante quatorze dias consecutivos. Durante todo tratamento com as estatinas, não houve sinais de toxicidade ou óbitos de animais.

Nas figuras 19 e 20 observam-se a progressão do volume tumoral total e do tumor primário respectivamente, durante o protocolo experimental. Em todos os casos, o tumor primário dominante foi o que obteve o maior volume e peso dentre todos os tumores desenvolvidos no mesmo animal. Em quase todos os tempos, todas as doses de todas as estatinas reduziram de um modo não significativo a média do volume tumoral e do tumor primário em comparação a media dos tumores do grupo DMBA. Apenas a maior dose da sinvastatina testada (40 mg/Kg) foi capaz de reduzir de modo significante em relação ao grupo controle DMBA, o volume tumoral total e do tumor primário dominante à partir do décimo segundo dia.

Na avaliação do incremento da massa tumoral (volume final – volume inicial), todos os grupos tiveram um aumento da massa tumoral em relação ao volume inicial (figura 21). Sinvastatina na maior dose testada teve um incremento menor em relação ao grupo não tratado (diferença de 80%). Já a maior dose testada da pravastatina (150 mg/Kg) teve um incremento maior que o grupo DMBA, porém não significante.

As ratas tratadas com as estatinas tiveram uma diminuição da média de neoplasmas desenvolvidas por animais (figura 22). Sinvastatina na dose de 40 mg/Kg teve uma média menor que dois tumores desenvolvidos, enquanto o grupo DMBA teve uma média maior que 3 tumores por animal.

A maioria das neoplasias desenvolvidas pela indução de DMBA era constituída por tumores sólidos mistos, ou seja, tumores constituídos por mais de uma combinação de diferentes subtipos histológicos. Dentre os subtipos histológicos desenvolvidos encontra-se o carcinoma ductal invasivo, tumor filoide e carcinoma papilífero invasivo (figura 23 B, C e D). O carcinoma ductal invasivo foi o subtipo histológico mais presente em todos os grupos, com percentagem acima de 80% na constituição tumoral (figura 23 A). Em tumores "puros" (com um único subtipo histológico) era constituído pelo carcinoma ductal invasivo. Não foram observados focos intra ou peritumorais de carcinoma *in situ*.

Animais tratados com sinvastatina e pravastatina tiveram aumento da percentagem do índice de carcinoma ductal em relação ao grupo DMBA. Nenhum destes dados foram significantes ($p>0,05$).

Ainda na análise histopatológica, foram avaliados diversos parâmetros das neoplasias, como pleomorfismo nuclear, formação tubular e índice de mitoses. Estes parâmetros foram utilizados para graduar os tumores seguindo o sistema de Nottingham. Tumores classificados como grau I (G1 ou baixo grau) são tumores bem diferenciados e tem melhor prognóstico em comparação aos tumores grau II e III (G2 e G3, alto grau). A tabela 5 indica a frequência de casos comparando grupo DMBA e os grupos da DMBA tratados com sinvastatina de acordo com a categoria de grau histológico final. Todos os grupos tiveram uma percentagem maior de tumores classificados como baixo grau histológico. O grupo DMBA+S teve uma maior incidência significante de tumores classificados como baixo grau quando comparado com o grupo DMBA ($p=0,0312$).

A percentagem média de necrose (tecido tumoral não viável) de todos os grupos é mostrada na figura 23. A média percentual de todos os grupos é baixa (<10%), não havendo diferença significante entre os mesmos.

A figura 24 mostra o índice de mitose dos tumores, expresso em número de células em mitose por 10 campos aleatórios de grande aumento (400x). A média do grupo DMBA foi de

aproximadamente de 10 células por campo. O grupo DMBA+S40 teve uma redução do número de mitose em relação ao grupo controle. Não foram observados valores significantes nos demais grupos quando comparado com o grupo DMBA.

Além da mitose, quantificou-se o índice de proliferação através da contagem de células positivas para Ki67 (figura 26). Esta contagem foi realizada em seis campos de médio aumento (200x). Ki67 é uma proteína expressa no núcleo, presente em células que se encontram ativas no ciclo celular. Em grupos não induzidos quimicamente com DMBA (C, S20, S40, P50 e P150), houve uma marcação nuclear positiva para esta proteína. Dentre estes grupos, não houve diferenças significantes entre os mesmos. Amostras tumorais tiveram uma positividade para Ki67 significantemente maior que os demais grupos não induzidos. Dentre os grupos induzidos, o tratamento com as estatinas diminuíram a média de positividade desta proteína, porém apenas significante no grupo de DMBA+S40 (67,63±46,68) quando comparado com o grupo DMBA (154,36±80,21).

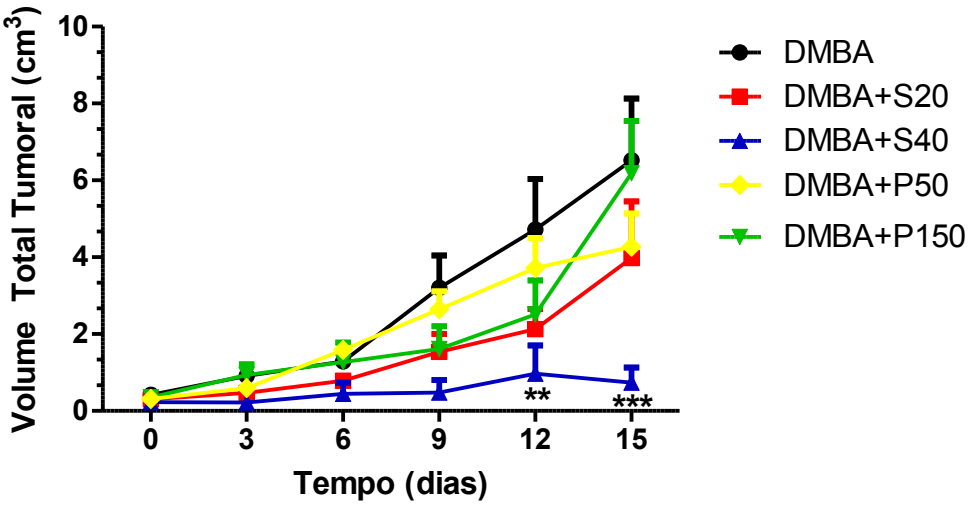

Figura 19 Progressão do volume tumoral total. Evolução do volume tumoral total durante o protocolo experimental. Os pontos representam a média ± EP. **p<0.01 e ***p<0.001 comparado com o grupo DMBA (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

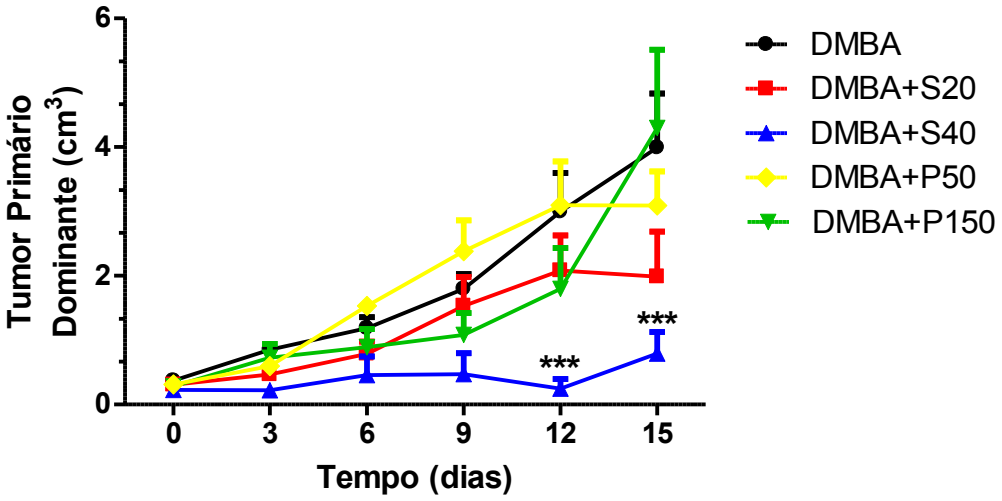

Figura 20 Progressão do volume tumoral primário. Evolução do volume do maior tumor durante o protocolo experimental. Os pontos representam a média ± EP. ***p<0.001 comparado com o grupo DMBA (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

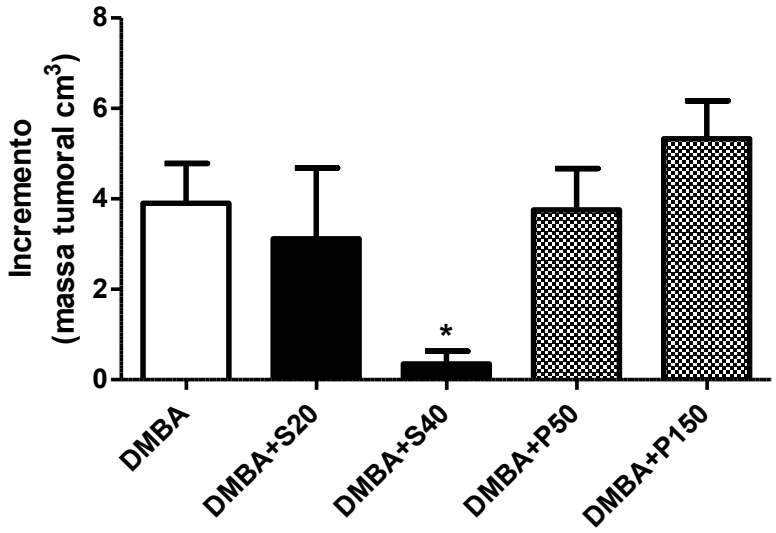

Figura 21 Incremento da massa tumoral. Incremento tumoral ao final do tratamento (volume final - volume inicial tumoral, expresso em cm^3) dos grupos DMBA, DMBA+S20, DMBA+S40, DMBA+P50 e DMBA+P150. As barras representam a média± EP. *p<0.05 comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

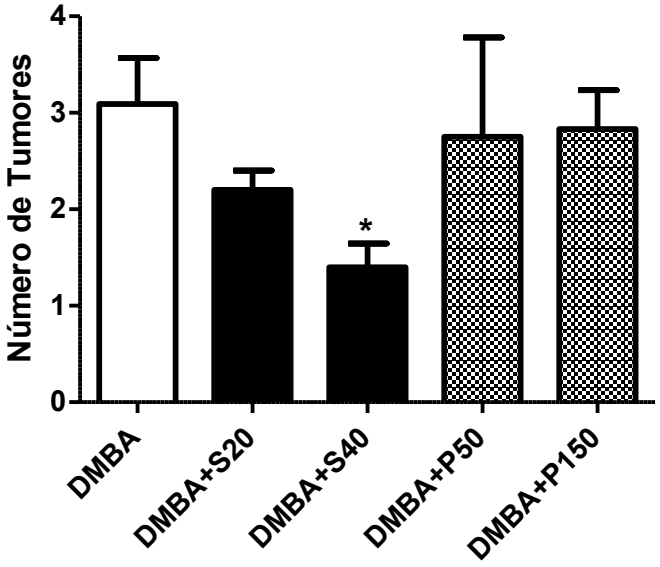

Figura 22 Números de tumores desenvolvidos. Média do número de tumores desenvolvidos nos grupos DMBA, DMBA+S20, DMBA+S40, DMBA+P50 e DMBA+P150. As barras representam a média± EP. *p<0.05 comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

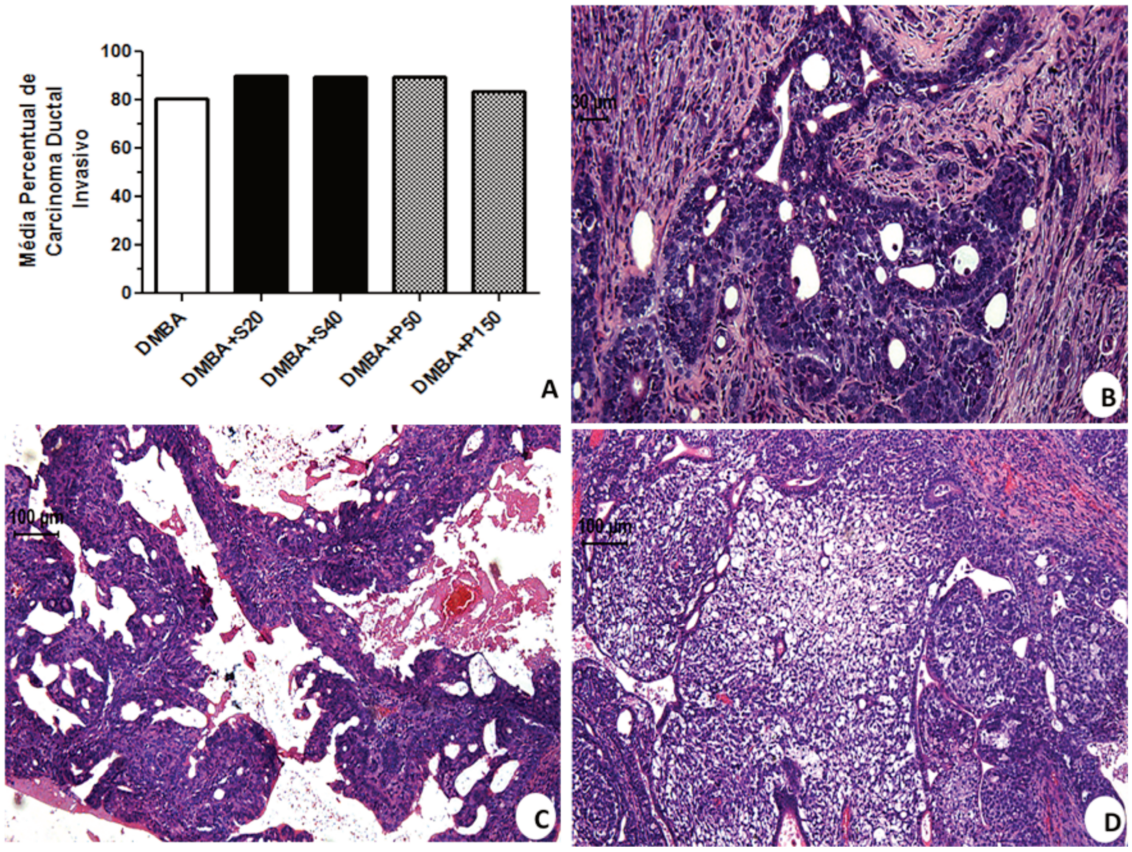

Figura 23. Percentagem média de carcinoma ductal invasivo na composição histológica das neoplasias induzidas pelo DMBA. Percentagem média de carcinoma ductal invasivo nos tumores (lembrando que a maioria das neoplasias é mista – ou seja, apresenta mais de um componente neoplásico) dos grupos DMBA, DMBA+S20, DMBA+S40, DMBA+P50 e DMBA+P150 (A), bem como fotomicrografias ilustrando diferentes subtipos histológicos observados na composição dos tumores: carcinoma ductal invasivo (B), carcinoma papilífero (C) e tumor filoide maligno (D). Hematoxilina e eosina, escala= 30 µm (B) e 100 µm (C e D).

Tabela 5. Frequência de casos em cada categoria de grau histológico final seguindo o sistema de Nottingham e em acordo com a Organização Mundial de Saúde.

Grupos	Baixo Grau (G1)	Moderado e Alto Grau (G2 and G3)
DMBA	6	4
DMBA+S	19	1

p=0.0312 entre grupo DMBA e DMBA+S (teste Fischer)

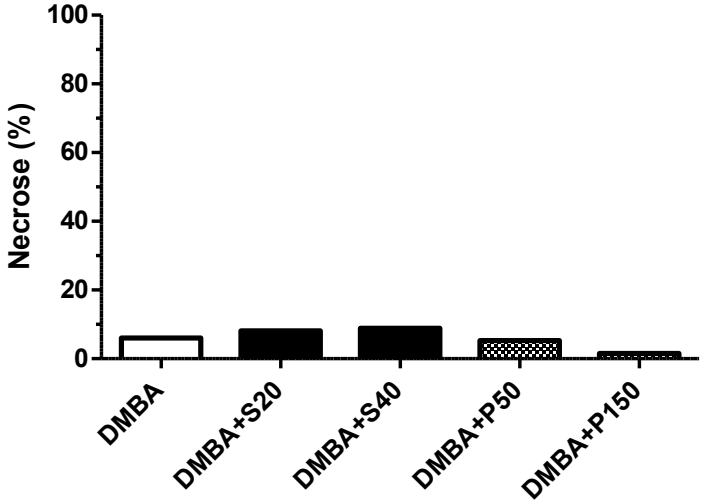

Figura 24 Percentual médio de necrose. Média de área necrótica de 4 campos de pequeno aumento nos grupos DMBA, DMBA+S20, DMBA+S40, DMBA+P50 e DMBA+P150. As barras representam as médias. Não houve diferença significante entre os grupos (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

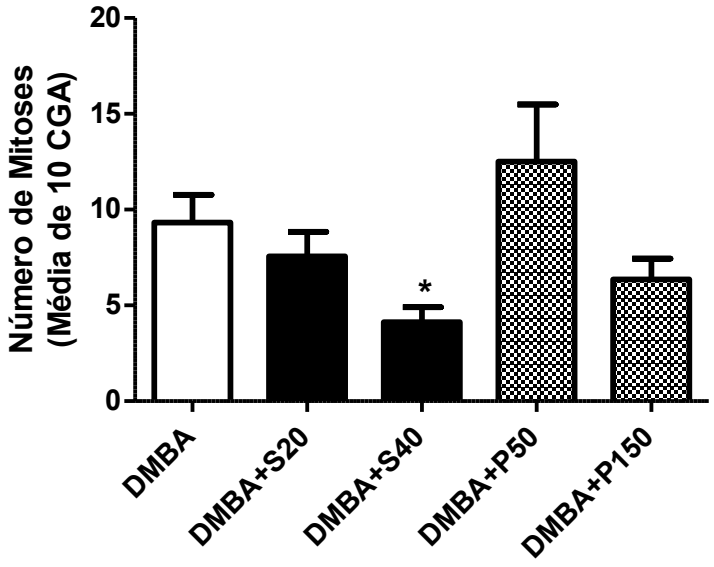

Figura 25 Índice mitótico. Número de mitoses em dez campos de grande aumento dos grupos DMBA, DMBA+S20, DMBA+S40, DMBA+P50 e DMBA+P150. Os resultados representam a média±EP * p<0,05 (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

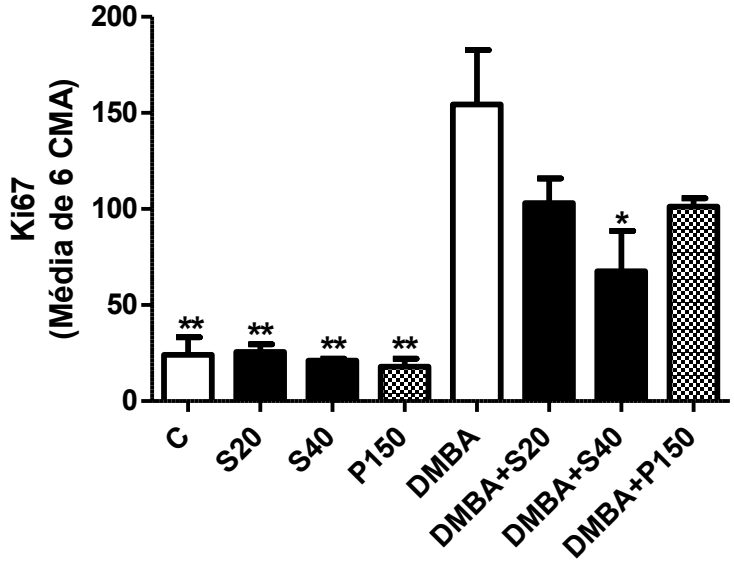

Figura 26 Índice proliferativo pelo Ki67. Número de células Ki67+ em 6 campos de médio aumento dos grupos C, S20, S40, P150, DMBA, DMBA+S20, DMBA+S40, DMBA+P150. As barras representam as média±erro padrão. **p<0.01 *p<0.05 comparado com o grupo DMBA (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

5.2.3 Análise das proteínas quinases

Para avaliação de mecanismo de ação antineoplásica das estatinas, foram quantificadas proteínas quinases que interferem diretamente no ciclo celular e em fatores de apoptose. Utilizou-se o método de western blotting, possibilitando a quantificação da expressão das proteínas por densitometria sendo expresso em unidades arbitrárias (UA). Para o controle endógeno desses experimentos, utilizou-se o marcador GAPDH. Foram analisados amostras de todos os grupos, com tumor mamário ou não.

A figura 26 mostra o perfil de expressão proteica da pSRC e da proteína total SRC. Não houve diferença na expressão da pSRC e SRC entre os grupos não neoplásicos (C, S20, S40, P50 e P150) e entre os grupos neoplásicos (DMBA, DMBA+S20, DMBA+S40, DMBA+P150). Com a comparação da pSRC e SRC, não houve diferenças significantes entre grupos não neoplásicos e grupos neoplásicos (figura 27 C e D). Porém, na relação pSRC/SRC houve diferenças significantes de todos os grupos não neoplásicos em comparação ao grupo DMBA (figura 27 B).

Para a avaliação da via da Akt foram quantificados a pAkt, Akt (figura 28) e a PTEN (figura 29), sendo a última uma proteína reguladora da fosforilação da Akt. Nos grupos neoplásicos, Akt, pAkt e a relação pAkt/Akt estão aumentados em comparação aos grupos não neoplásicos. Maior dose da sinvastatina testada diminuiu de um modo significante a fosforilação da Akt em comparação ao grupo DMBA, e não houve diferenças na quantificação da expressão da Akt. Na relação pAkt/Akt houve uma diminuição do grupo sinvastatina em comparação ao grupo DMBA. Entre os grupos não neoplásicos, não houve diferença significantes entre estes grupos, indicando que as estatinas no tecido normal, não interferem na via Akt.

A PTEN é uma proteína que foi expressa em mamas normais e em mamas neoplásicas. Não houve diferença da expressão dessa proteína entre os grupos de mama normais e mamas neoplásicas. Grupos DMBA+S40 aumento de modo significante a expressão da PTEN ($p<0.01$), quando comparada ao grupo controle.

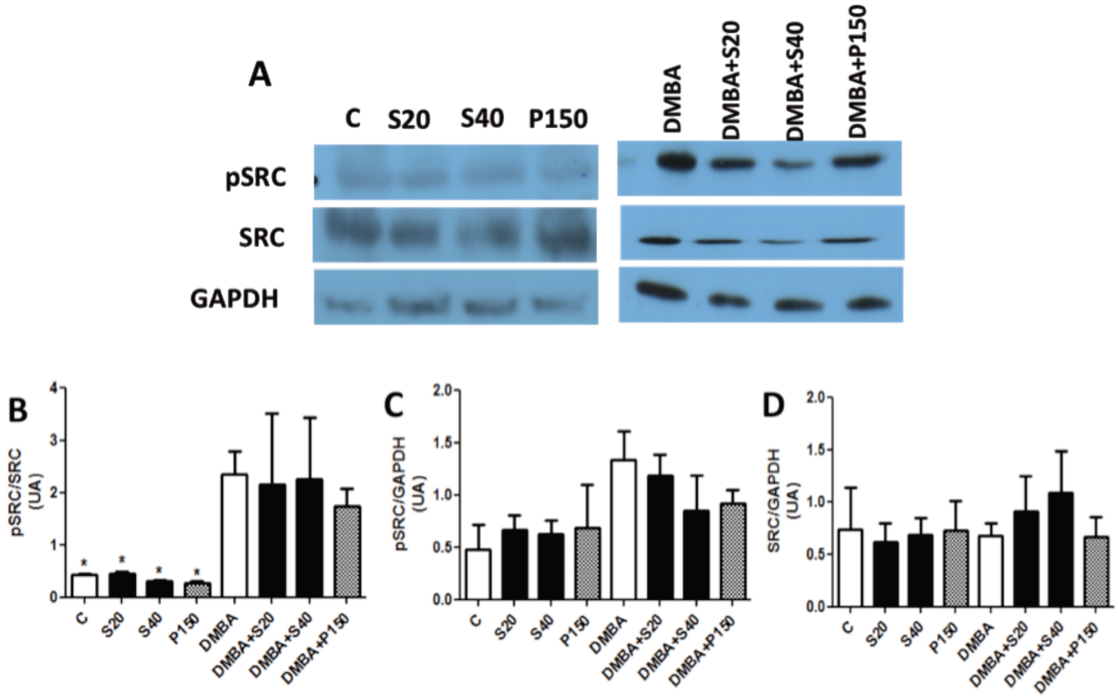

Figura 27. Expressão proteica de pSRC e SRC. Western Blot de pSRC e SRC de amostras das mamas dos grupos C, S20, S40 e P150, DMBA, DMBA+S20, DMBA+S40 e DMBA+P150. Ilustração do western blot dos grupos experimentais (A) e quantificação por unidades arbitrárias (UA) da relação pSRC/SRC (B), pSRC/GAPDH (C) e SRC/GAPDH (D). Os resultados representam a média±EP. *p<0.05, quando comparado ao grupo DMBA. (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

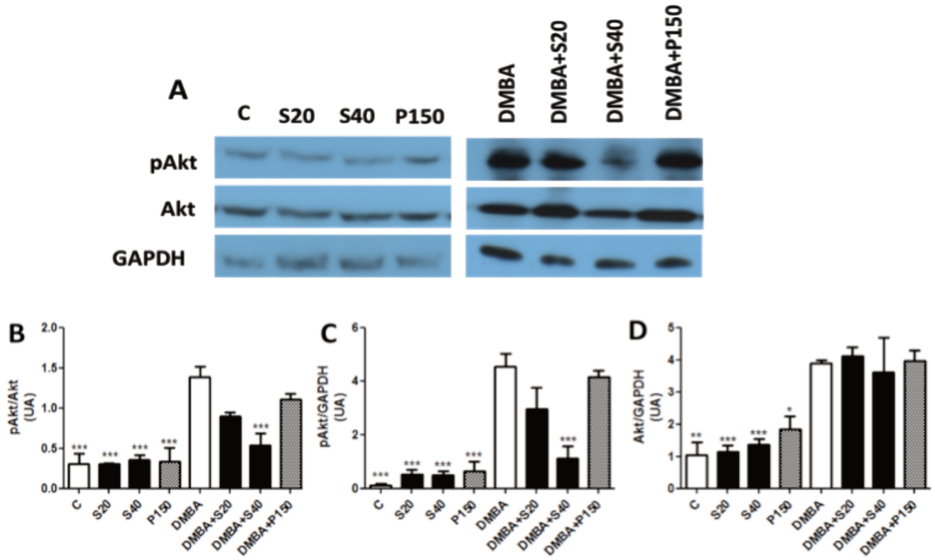

Figura 28 Expressão proteica de pAkt e Akt. Western Blot de pAkt (fosfo-Akt) e Akt de amostras de mamas de nos grupos C, S20, S40 e P150, DMBA, DMBA+S20, DMBA+S40 e DMBA+P150. Ilustração do western blot dos grupos experimentais (A) e quantificação por unidades arbitrárias (UA) da relação pAkt/Akt (B), pAkt/GAPDH (C) e Akt/GAPDH (D). Os resultados representam a média±EP. ***p<0,001 comparado com grupo DMBA (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

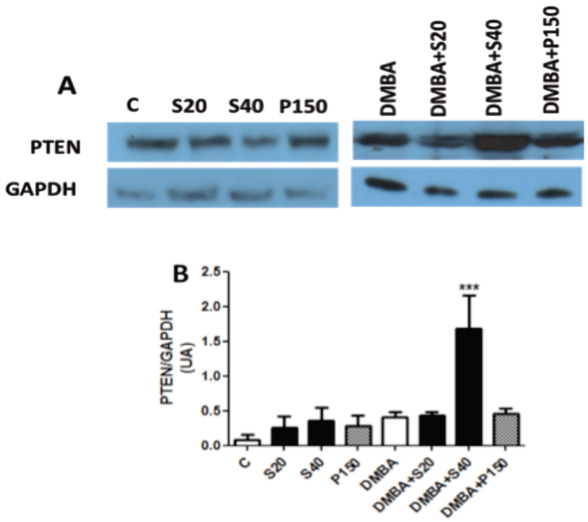

Figura 29. Expressão proteica de PTEN. Western Blot de PTEN de mamas de ratas Sprague-Dawley dos grupos C, S20, S40 e P150, DMBA, DMBA+S20, DMBA+S40 e DMBA+P150. Ilustração do western blot dos grupos experimentais (A) e quantificação por unidades arbitrárias (UA) de PTEN/GAPDH (B). Os dados foram normalizados por GAPDH. Os resultados representam a média±EP. ***p<0.001 comparado com grupo DMBA (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

5.2.4 Análise de células progenitoras e células-tronco neoplásicas

Para a avaliação de células-progenitoras, células-tronco e células-tronco neoplásicas, foi realizado uma análise de imunoexpressão. Utilizou-se marcadores imuno-histoquímicos específicos para estes tipos celulares, como CD133, CD24, CD44 e EpCAM. A análise foi procedida em amostras de glândulas mamárias normais e neoplásicas e encontram-se esquematizados nas figuras 29-32 e são ilustradas nas figuras 33 e 34. Para a avaliação, foram quantificadas seis diferentes campos de cada amostra, sendo os resultados expressos em média por campos.

Nos tumores desenvolvidos pela indução de DMBA, obteve-se a expressão de todos os marcadores citados. Já nas glândulas mamárias normais teve positividade para os marcadores CD133 e CD44.

CD133 é expresso em células epiteliais. A marcação é principalmente na membrana citoplasmática. CD133 é expressa em mamas sem lesões neoplásicas, sendo uma imunoexpressão menor ($p<0,001$) em comparação ao grupo neoplásico DMBA. O grupo DMBA teve uma média de 125 células positivas por campo enquanto que o grupo DMBA+S40 teve uma média menor que 75 células positivas ($p<0,001$). Tratamentos com a dose menor de sinvastatina ou com a pravastatina diminuíram a média de células CD133 positivas, porém não houve significância ($p>0,05$).

Já a marcação para CD24, foi negativa em mamas normais. As estatinas diminuíram a média de células CD24 positivas no tecido mamário neoplásico, porém apenas significante na maior dose sinvastatina (19,9 células/campo VS grupo DMBA 51,61 células/campo, $p<0,01$). CD24 é expressa na membrana das células epiteliais e em células luminais.

Como CD24, CD44 é expressa na membrana das células. No tecido mamário normal, CD44 é expressa em células mioepiteliais, enquanto que no tumor, a marcação é positiva para células epiteliais. A média de células positivas no tecido normal é ao redor de cinco células por campo, enquanto que no tecido tumoral chega a 20 células por campo. Animais com tumores tratados com as estatinas tiveram uma média menor que 20 células por campo, porém apenas o grupo DMBA+S40 teve uma diminuição significante em comparação ao grupo controle DMBA ($p<0,05$).

Na imunoexpressão de EpCAM, não houve médias significantes na comparação entre os grupos com mamas neoplásicas. Grupos tratados com DMBA e sinvastatina tiveram uma média

maior que os grupos DMBA e DMBA mais pravastatina. EpCAM é uma proteína expressa na membrana das células. Em amostras de mamas normais, não houve expressão desta proteína.

Em mamas não neoplásicas, nenhuma das estatinas, independentemente da dose testadas não houve interferência da imunoexpressão dos marcadores testados.

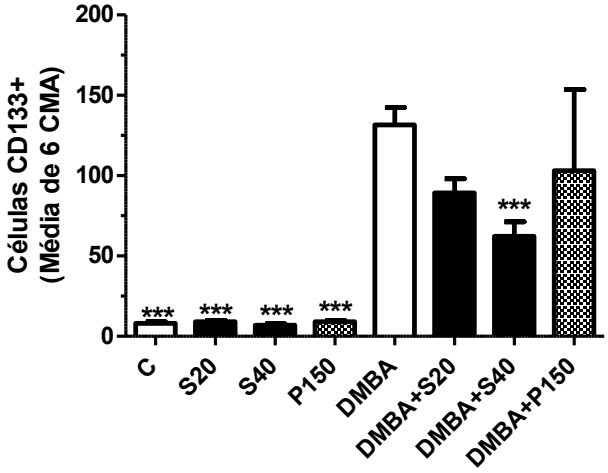

Figura 30. Frequência de células CD133+. Número de células CD133+ nos grupos C, S20, S40, P150, DMBA, DMBA+S20 e DMBA+S40, DMBA+P150. As barras representam a média±EP. ***p<0.001 comparado com o grupo DMBA (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

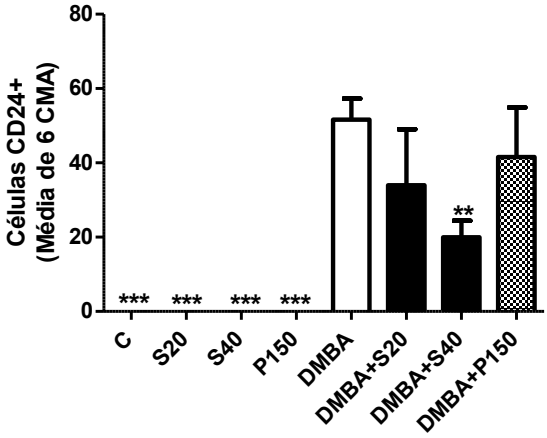

Figura 31 Frequência de células CD24+. Número de células CD24+ nos grupos C, S20, S40, P150, DMBA, DMBA+S20 e DMBA+S40 e DMBA+P150. As barras representam a média± EP. ***p<0.001 e **p<0.01 comparado com o grupo DMBA (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

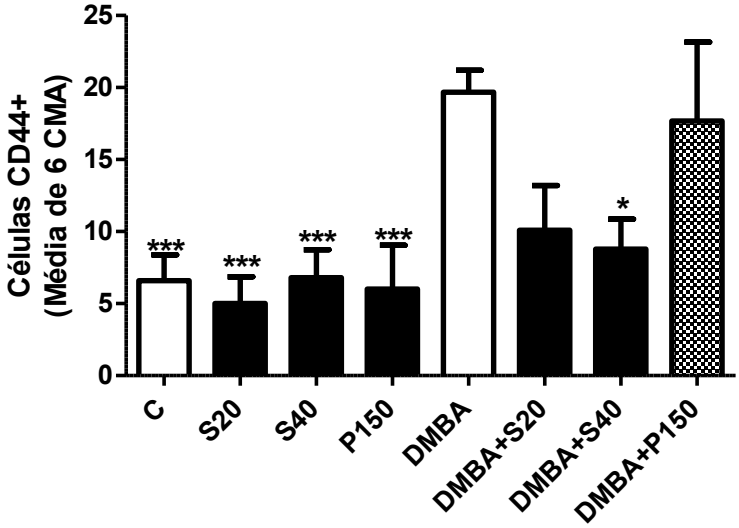

Figura 32 Frequência de células CD44+. Número de células CD44+ nos grupos C, S20, S40, P150, DMBA, DMBA+S20 e DMBA+S40 e DMBA+P150. As barras representam a média± EP. *p<0.05 e ***p<0.001 comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

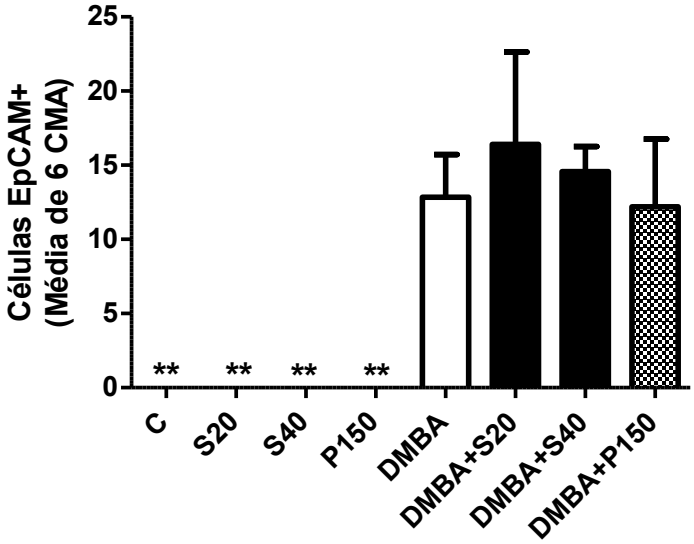

Figura 33 Frequência de células EpCAM+. Número de células EpCAM+ nos grupos C, S20, S40, P150, DMBA, DMBA+S20 e DMBA+S40 e DMBA+P150. As barras representam a média± EP. **p<0.01 comparado com o grupo controle (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

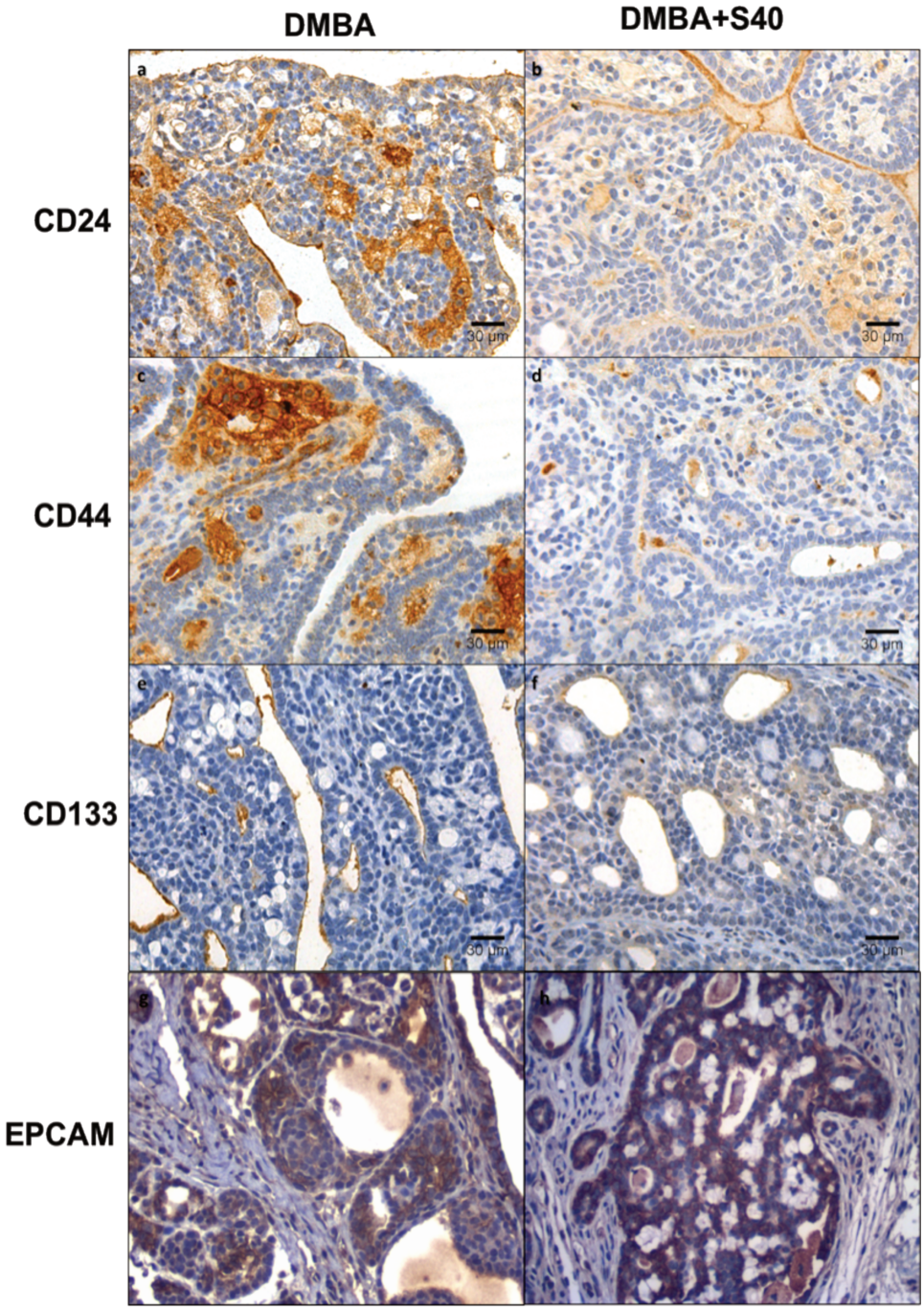

Figura 34 Imunoexpressão de marcadores de células progenitoras e células-tronco neoplásicas. Fotomicrografias ilustrativas da expressão de imunomarcadores em tecidos neoplásicos para células tronco neoplásicas dos grupos DMBA (coluna da esquerda) e DMBA+S40 (coluna da direita). CD24 (a,b), CD44 (c, d), CD133 (e, f), EPCAM (g, h). Imunoperoxidase, escala= 30 µm.

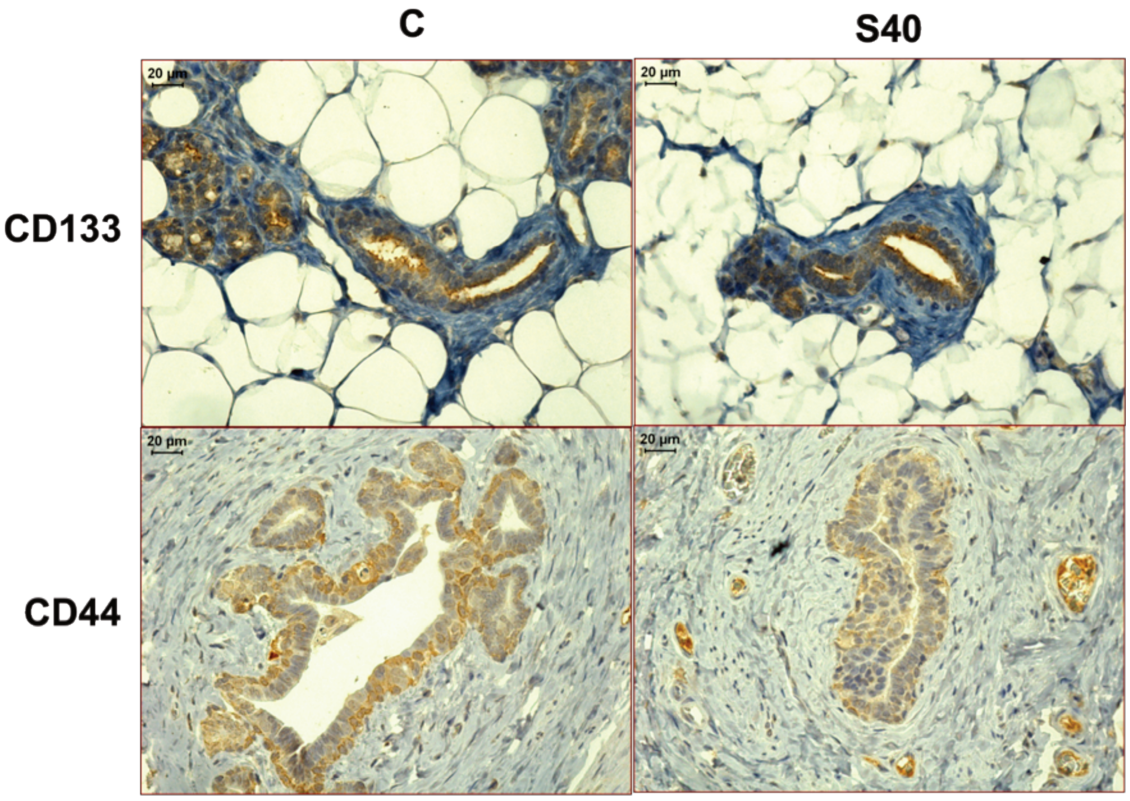

Figura 35 Imunoexpressão de marcadores de células tronco. Fotomicrografias ilustrativas da expressão de imunomarcadores para células-tronco em tecidos mamários não neoplásicos dos grupos C (coluna da esquerda) e S40 (coluna da direita). Imunoperoxidase, escala=20µm.

5.2.5 Correlações da expressão de CP/CTNs e variáveis biológicas

Após a análise da imunoexpressão dos marcadores de CPs e CTNs, foram analisadas correlações com a frequência de positividade dos marcadores imuno-histoquímicos em relação a variáveis biológicas e morfológicas, como volume tumoral, percentagem ductal e de necrose, índice mitótico e o grau histológico final. Também correlacionou-se a positividade dos diferentes marcadores utilizados entre si.

A tabela 6 demonstra a correlação entre marcadores de CP/CTNs e fatores preditivo do comportamento biológico. Resumidamente, foram observadas as seguintes correlações significantes:

- Alta correlação positiva entre (1) a expressão de CD133 e (2) o volume tumoral, com r de Spearman de 0,7342 (figura 35 A).

- Alta correlação negativa entre (1) a expressão de CD133 e a (2) percentagem ductal, com r de Spearman de -0,8204 (figura 35 B).

- Baixa/média correlação positiva entre a (1) expressão de EpCAM e a (2) percentagem de necrose (r=0,6150).

Estas correlações indicam que quanto maior volume tumoral, maior a expressão de células CD133+. Ainda, quanto maior o caráter de diferenciação do tumor (maior percentagem ductal), menor a expressão de CD133 no tecido. Não houve associações estatisticamente significantes entre o número das demais células CPs/CTNs e as variáveis biológicas analisadas.

As correlações entre os marcadores CPs/CTNs estão datadas na tabela 7. Houve apenas uma baixa/média associação significante positiva apenas entre a expressão de CD24 e CD44 (r=0,6430) (figura 37).

A avaliação da correlação entre a positividade dos marcadores CPs/CTNs e o grau histológico é demonstrado na figura 38. Em tumores classificados como alto grau histológico, expressam em média mais células CD133+, CD24+ e EpCAM+ do que tumores com baixo grau. Porém, nenhuma das correlações foi significante ($p>0,05$).

Tabela 6. Correlação entre marcadores de células progenitoras/células-tronco e fatores preditivos de comportamento biológico dos tumores.

Marcador	Volume tumoral	% ductal	% necrose	Índice mitótico
CD133	**r 0,7342** **p 0,001**	**r -0,8204** **p 0,0018**	r -0,2049 p 0,4148	r -0,3211 p 0,1938
CD24	r 0,2845 p 0,2958	r -0,1499 p 0,5528	r -0,3362 p 0,1726	r 0,1438 p 0,5820
CD44	r 0,0197 p 0,9488	r -0,1931 p 0,5274	r -0,3192 p 0,2878	r 0,16 p 0,6016
EPCAM	r -0,2341 p 0,4010	r 0,0399 p 0,8890	r 0,6150 p 0,0147	r 0,3097 p 0,2813

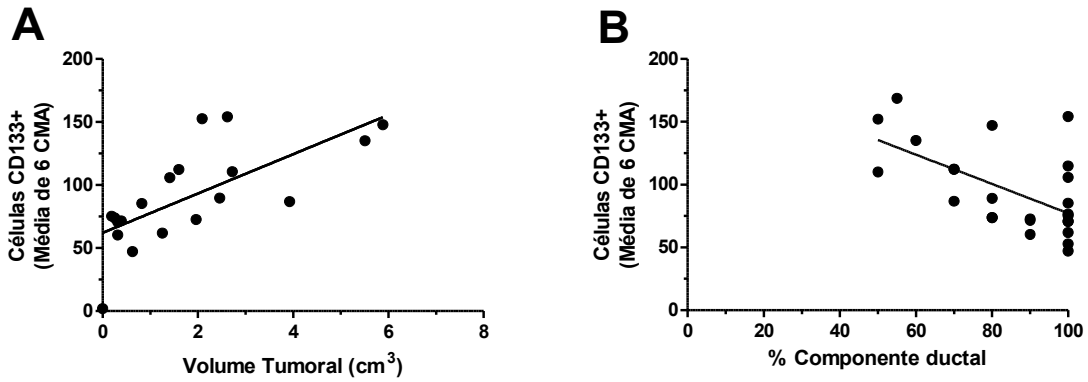

Figura 36 Correlações entre células progenitoras/células-tronco neoplásicas e variáveis tumorais. Correlações entre células CD133+ e volume tumoral ($p<0.01$) (A), e entre células CD133+ e percentagem do componente ductal ($p<0.01$) (B) em amostras de tumores mamários.

Tabela 7. Correlação entre marcadores de células progenitoras/células-tronco (colocalização tecidual).

EpCAM				
CD133	r=-0.2729 p=0.3251			
CD44	r=0.1703 p=0.5967	r=0.08810 p=0.7549		
CD24	r=0.5098 p=0.0904	r=0.5484 p=0.0649	**r=0.6430** **p=0.0177**	
	EpCAM	**CD133**	**CD44**	**CD24**

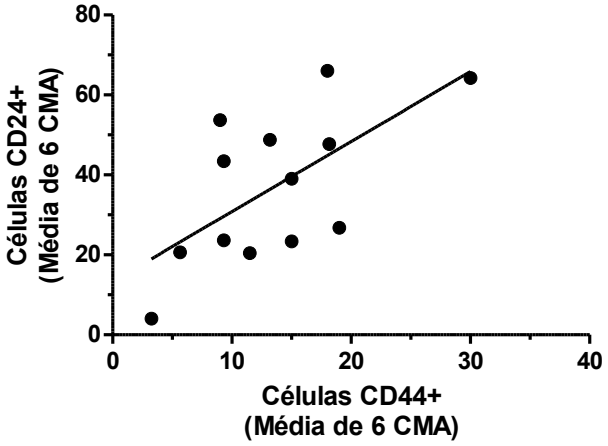

Figura 37 Correlação entre imunomarcação de células progenitoras/células-tronco neoplásicas. Correlação entre células CD24+ e CD44+ ($p<0.05$) de amostras de tumores mamários.

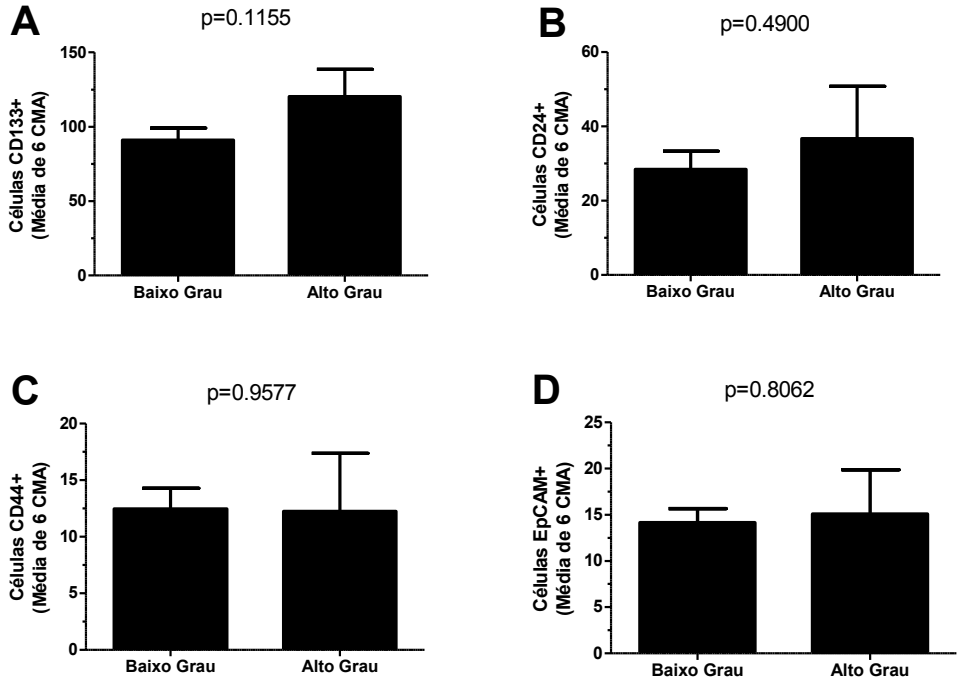

Figura 38 Número de células progenitoras/células-tronco neoplásicas positivas e o grau histológico final. Relação do índice de células positivas CD133+ (A), CD24+ (B), CD44+ (C) e EpCAM+ (D) com escore do sistema de Nottingham de tumores mamários. As barras representam a média± EP. $p>0,05$ (teste t Student).

6. DISCUSSÃO

6.1 Caracterização farmacológica e toxicológica das estatinas

Na primeira etapa deste trabalho, avaliaram-se diversas doses da sinvastatina (estatina lipofílica, administrada na forma de pró-farmaco) e da pravastatina (estatina hidrofílica). As diferentes classes lipofílica e hidrofílica se diferenciam pelas propriedades farmacocinéticas, farmacodinâmicas e pela incidência de toxicidade (87, 90).

Foram coletados dados da literatura para propor os testes das diversas doses, com uma variação de 20 a 100 mg/Kg para sinvastatina e 50 a 250 mg/Kg para a pravastatina (120, 121). Dose de 20 mg/Kg de sinvastatina tem uma ação farmacológica equivalente a uma dose de 50 mg/Kg de pravastatina. As doses testadas nos animais equivalem com a dosagem utilizadas na prática médica.

Ambas as drogas conseguiram modular o perfil lipídico das ratas Sprague-Dawley, principalmente na diminuição dos níveis séricos de VLDL-c e do triacilglicerol total. Apenas a maior dose da sinvastatina diminuiu de modo significante os níveis de colesterol-total. Este perfil farmacológico difere de modelos no qual usam animais com dislipidemias, obesos ou consumindo dietas hiperlipidêmicas, onde o uso das estatinas diminuem os níveis séricos do colesterol em doses mais baixas (121, 123, 124). Alguns modelos utilizando ratos normolipidêmicos, demonstram uma diminuição dos níveis séricos de VLDL-c e triacilglicerol, e não do colesterol total (88). Justifica-se este fato pela a capacidade da estatina neste caso, de diminuir a síntese e concentração do colesterol no fígado, havendo uma menor liberação de VLDL-c e consequentemente diminuindo os níveis de triacilgliceróis totais (88).

Além do perfil lipídico, optou-se avaliar diversos sistemas biológicos, como o sistema muscular esquelético, hepático e renal. Pela clínica, a maior incidência de efeitos adversos se concentra nestes sistemas/tecidos.

A avaliação da miotoxicidade foi observada através da quantificação da enzima creatina quinase total (CK). Ambas as drogas testadas levaram a quadros de miotoxicidade, principalmente nas doses mais elevadas. Microscopicamente foram analisados quatros músculo diferentes, sendo dois ricos em fibras musculares lentas (masseter superficialis e parade abdominal) e outros dois ricos em fibras musculares rápidas (gastrocnemius e bíceps brachii). Todos os músculos apresentaram lesões microscópicas acompanhadas de inflamação, mas apenas nos animais tratados com a sinvastatina. O caráter lipofílico parece ser importante na miotoxicidade, já que estas moléculas penetram mais facilmente nas células, em comparação com as estatinas hidrofílicas (Pierno et al., 1995). Dentre os possíveis mecanismos de ação toxicológica, os danos nos músculos esqueléticos estão associados à disfunção mitocondrial, a diminuição do influxo de cloro nas células e redução da concentração celular de ubiquinonas (90,125). Ubiquinona é uma molécula sintetizada à partir do ácido mevalônico, sendo esta essencial para a cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria (126). Ainda, estatinas podem aumentar a expressão do gene atrogina-1, responsável por causar atrofia no tecido (90).

O perfil hepático foi avaliado pela quantificação das enzimas ALT e AST além da análise microscópica das três zonas do tecido. Tanto a sinvastatina e pravastatina, nas maiores doses testadas levaram a quadros de hepatotoxicidade. As alterações hepáticas geralmente são doses-dependentes (126). Em humanos, há baixo relato através de dados da farmacovigilância relacionando hepatotoxicidade e o uso das estatinas (90). Modelos *in vivo* utilizando ratos, camundongos, coelhos e cães, indicam que o uso crônico das estatinas causa lesões no fígado e este dano pode se revertido caso tenha administração de ácido mevalônico (126). Isto pode explicar que, parte da lesão hepática é pela própria ação farmacológica da inibição da enzima HMG-CoA redutase. Nestes modelos citados, foram reportados aumento das enzimas transaminases e alterações morfológicas, resultados idênticos obtidos pelo nosso trabalho (126). Já em testes *in vitro* correlacionando as estatinas e células hepáticas, demonstraram que estas podem reduzir coenzima Q10 nas mitocôndrias dos hepatócitos, aumentando danos oxidativos no DNA, redução na síntese de ATP e aumento do índice de apoptose (127).

Já no sistema renal, não foi possível observar toxicidade com o uso da sinvastatina, apenas com a pravastatina. As lesões observadas se concentraram na região cortical, não tendo alterações na região medular. Estatinas hidrofílicas são mais excretadas pelo sistema renal em comparação às

lipofílicas, podendo aumentar o risco de nefrotoxicidade pelo uso deste grupo (87). Estudos com animais indicam que todas altas doses de estatinas lipofílicas ou hidrofílicas podem levar a toxicidade tubular, acompanhadas com quadros de proteinúria e hematúria (90, 107, 128). A proteinúria e hematúria são decorrentes de quadros clínicos de rabdomíolise (87). Em contraste, diversos modelos experimentais afirmam que o uso das estatinas pode reverter quadros de insuficiência e lesão renal (129, 130, 131).

De um modo geral, apenas as maiores doses da sinvastatina e pravastatina em tratamento crônico causaram algum efeito tóxico em ratas Sprague-Dawley. As menores doses foram bem toleradas por estes animais, pelo menos no tempo de tratamento proposto e avaliado. Pela clínica, as estatinas são drogas bem toleradas e amplamente utilizadas na clínica (87). O uso das estatinas concentra-se na prevenção e no tratamento de doenças cardiovasculares (119). Mais recentemente, veem se descobrindo outros efeitos farmacológicos deste grupo de fármacos. Dentre outras ações farmacológicas, encontram-se ações anti-inflamatórias, antiplaquetária e efeitos antineoplásicas em diversas neoplasias sólidas, como no câncer de mama (99, 119).

6.2 Ação antineoplásicas das estatinas

No sexo feminino, câncer de mama é a neoplasia maligna mais prevalente e a principal causa óbito (64, 73, 110). Nas duas últimas décadas, investiga-se que câncer de mama e outras neoplasias sólidas, são organizadas por uma hierarquia de subpopulações celulares, sendo que o tumor pode originar de uma única células neoplásica, em especial uma célula-tronco neoplásica (51, 73, 133. Além da importância da fisiopatologia das CTNs, estas também são consideradas biomarcadores para tumores com pior prognóstico e para resistências terapêuticas. CTNs podem ser importantes alvos terapêuticos para novos tratamentos farmacológicos (45, 51, 64, 134).

Métodos para detecção e identificação de CTNs têm diversas controvérsias. De um lado, a detecção de CTNs pela imuno-histoquímica recebeu diversos avanços com a utilização de imuno marcadores para CTNs, sendo agora considerados fatores de diagnósticos independentes ou para orientação de estratégias terapêuticas (45, 51, 64 134). Mesmo que alguns autores considerem

estes imuno marcadores como “não específicos” para o diagnóstico de células indiferenciadas ou para subclone de CTN, estes ainda não perdem o valor significativo clínico (45, 51, 64 134).

O uso de imuno marcadores para CTNs em modelos clássicos experimentais ainda são raros e poucos reportados pela literatura. Este trabalho desenvolvido é o primeiro a quantificar células que expressam imuno marcadores para CTNs e CPs em animais tratados com estatinas, possibilitando observar possíveis efeitos *in vivo* anti-CPs e anti-CTNs por parte dessa classe terapêutica.

Em nossos resultados, claramente observa-se um aumento da expressão CD133, CD24, CD44 e EpCAM nos tecidos mamários neoplásicos induzidos por DMBA, em comparação a mama controles sem lesões cancerosas. Este achado indica que o protocolo de indução por DMBA nos fornece um modelo adequado para estudos da fisiopatologia e farmacológicos focando em CPs e CTNs. O uso de DMBA é um dos modelos experimentais mais explorados no câncer de mama (17).

Recentemente Lee et al.,(59) e Gauthman et al., (44) usando modelos *in vitro*, sugeriram que a sinvastatina pode suprir o crescimento de células-tronco embrionárias cancerosas e CTNs respectivamente. Nestes trabalhos, sinvastatina não afetou ou teve efeitos citotóxicos nas células normais (CT e células diferenciadas). Em nossos resultados, estas drogas não alteraram a expressão de células CD133+, CD24+, CD44+ e EpCAM em tecidos mamários normais. Ainda

o tratamento crônico *in vivo* com a sinvastatina ou pravastatina no modelo de carcinogênese não desenvolveram efeitos tóxicos clássicos (como miotoxicidade, hepatotoxicidade e problemas renais).

Alguns estudos têm discutido os efeitos antineoplásicos das estatinas, em particular das lipofílicas, em modelos *in vivo* (32, 115, 117, 135). Dois trabalhos recentes demonstram que a sinvastatina teve significantes efeitos antineoplásicos em modelos de carcinogênese mamária por indução química. Kubatka et al.,(110,111,112,113) demonstrou uma redução profilática do número de animais desenvolvendo câncer de mama quando tratadas com sinvastatina ou atorvastatina. Igualmente, Lubet et al.,(105) descreveu a redução da carcinogênese mamária de ratas tratadas com atorvastatina ou lovastatina. Nestes trabalhos *in vivo*, as estatinas foram administradas antes e depois do desenvolvimento da neoplasia, sendo estudos de quimioprevenção. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com a sinvastatina pode prevenir o aumento do volume tumoral e o número de tumores desenvolvidos por animal. Ainda, é importante enfatizar que em nosso modelo

experimental, as estatinas foram administradas pós-formação do tumor. Com isto, os resultados encontrados seguem os mesmos princípios já discutidos na literatura.

Os efeitos no volume e no número de tumores pelo tratamento crônico com a sinvastatina parece ser dose-dependente, sendo a maior dose responsável pelos efeitos antineoplásicos. Na maior dose de sinvastatina testada, foi eficaz para reduzir significantemente a imunoexpressão de marcadores de CP e CTNs. Esta efeito de redução foi verificado em todos os marcadores testados, com exceção de EpCAM.

É de importância citar que sinvastatina inibiu células cancerosas, mas não células normais que expressavam marcadores de CP e CTNs. No tecido neoplásico, aparentemente não houve uma ação inibitória em específico em CP e CTNs, mas também em células diferenciadas. O controle do incremento tumoral não pode ser justificado pelo controle de CP e CTNs, já que estas células geralmente não representam mais que 10% das células tumorais. De uma perspectiva clínica, a evidência que a sinvastatina é capaz de afetar negativamente células indiferenciadas e diferenciadas neoplásicas, aumenta a chance de cura e abre novas perspectivas para novos tratamentos farmacológicos contra o câncer de mama.

O mecanismo da ação antineoplásica pela sinvastatina pode ser justificado em partes pelo controle da proliferação celular (efeito citostático) do que de indução de morte celular (efeito citotóxico). O efeito citostático é observado, pois houve uma redução do número de mitoses e da expressão de Ki67, não havendo alterações na percentagem de necrose. Ainda, sinvastatina foi capaz de diminuir o índice de Akt fosforilada no tecido neoplásico. Akt é uma proteína envolvida em diversas funções, como na diferenciação, apoptose e no ciclo celular (22, 24). Em partes, o controle da Akt pode ser justificado pelo aumento da PTEN, proteína inibitória da fosforilação da Akt. Nenhuma das estatinas controlou ou alterou de modo significante a via de sinalização da tirosina quinase SRC.

A maioria dos efeitos antineoplásicos e anti-CTNs é dada pela maior dose da sinvastatina testada, sugerindo uma ação dose-dependente. Esta mesma dose foi capaz de diminuir células que expressam CD133, CD24 e CD44. CD133, também chamada de prominina-1, é uma molécula de transmembrana que pode ser expressa no citoplasma e principalmente nas membranas celulares (66, 67, 71). A expressão de CD133 é descrita como um biomarcador encontrado em CT e CP

mamária, porém ainda desconhece funções específicas desta proteína no tecido (50, 64, 71). Células CD133+ tem a capacidade de autorenovação por divisões assimétricas (50). Diversos estudos relatam que os níveis CD133 no tumor correlacionam com a sobrevivência do paciente, estágio/desenvolvimento e volume tumoral (67, 71). Nossos resultados demonstram uma correlação positiva com o número de células CD133+ e o volume tumoral e inversamente correlacionado com a percentagem do componente ductal. Estas correlações indicam que, neste modelo, CD133 pode ter funções na proliferação e na diferenciação celular, favorecendo o crescimento tumoral e a heterogeneidade histológica.

Nos outros marcadores testados, não houveram boas/grandes correlações com os parâmetros biológicos, sugerindo que CD133 pode ser mais relevante no ponto fisiopatológico neste modelo experimental. Mesmo assim, a expressão de CD24 e CD44 estão ligadas a um pior prognóstico e a resistência terapêutica (55, 59). Alta dose de sinvastatina foi capaz de controlar todos estes marcadores.

Resumindo, este é o primeiro estudo que confirma o efeito inibitório da sinvastatina contra CPs/CTNs em modelo *in vivo*. Este efeito inibitório é específico para células cancerosas, não afetando células normais, podendo ser uma vantagem em relação ao ponto de vista terapêutico. Finalmente, este efeito é provavelmente justificado pela inibição da proliferação celular do que a promoção da morte celular. O controle de CPs/CTNs pela sinvastatina não parece ser específica para apenas um marcador ou subtipo de CPs/CTNs, diminuindo a chance da sobrevivência de clones resistentes e consequentemente podendo otimizar o processo terapêutico e o combate de resistência terapêutica.

7. CONCLUSÕES

- A sinvastatina em uso crônico diário possui atividade antineoplásica *in vivo*, em modelo murino de carcinogênese mamária quimicamente induzida.
- Essa atividade antineoplásica parece ser de natureza citostática, uma vez que está associada a diminuição da proliferação celular (redução de índice mitótico e de expressão de ki67) e não a aumento de morte celular (necrose).
- O efeito anti-neoplásico foi mais claro na maior dose testada, sugerindo tratar-se de uma efeito dose-dependente.
- Não foram detectadas ações antineoplásicas com a pravastatina (mesmo em doses bem mais altas que as utilizadas com a sinvastatina), sugerindo que o perfil de lipofilicidade da droga possa ser um aspecto importante de seu mecanismo de ação.
- Com relação ao mecanismo de ação da droga, o presente trabalho fornece duas possibilidades propostas dignos de nota:
    - Em primeiro lugar, as ações antineoplásicas estão significantemente associadas à redução no número de células que expressam marcadores de CTN. A redução de CTNs pela sinvastatina, resultando em desaceleração do crescimento neoplásico constitui um mecanismo altamente provável que poderia explicar pelo menos parte das ações da sinvastatina em nível celular. Cumpre lembrar que nenhuma estatina demonstrou efeitos deletérios sobre CT normais, o que confirma o perfil de segurança clínica desta classe de droga, muito bem estabelecido na literatura.
    - Em segundo lugar, as ações antineoplásicas da sinvastatina estão igualmente associadas à uma redução nos níveis de Akt fosforilada. Este mecanismo, por sua vez, poderia explicar mesmo que parcialmente as ações da sinvastatina em nível molecular, na medida em que a Akt (especialmente em sua forma ativa/fosforilada) é uma molécula de sinalização intracelular de grande importância para proliferação e diferenciação celulares.
    - Limitações do estudo: tendo sido estabelecido com a preocupação de demonstrar ações antineoplásicas e de forma inédita os efeitos anti-CTN *in vivo* das estatinas, o presente delineamento experimental não permite verificar com profundidade a

relevância relativa desses possíveis mecanismos de ação, tão pouco uma eventual relação entre eles. Todas essas questões serão cuidadosamente analisadas nos próximos meses pelo grupo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1.Schnitt SJ, Collins LC. Biopsy interpretation of the breast. 2009. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 481.

2.Allred DC. Ductal carcinoma in situ: terminology, classification and natural history. Journal Natl Cancer Inst Monogr. 2010; 41: 134-138.

3.Woodward, WA., Chen MS., Behbod F., Rosen JM. On Mammary stem cells. J Cell Sci. 2005; 118: 3585-3594.

4.Villadsen R, Fridriksdottir AJ, Ronnov-Jessen L, Gudjonsson T, Rank F, LaBerge MA, Bissell MJ, Petersen OW. Evidence for a stem cell hierarchy in the adult human breast. The Journal of Cell Biology. 2007; 177: 87-101.

5.Costa I, Solanas M, Escrich E. Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesion induced with 7,12 dimethylbenz(a)anthracene in the rat. Arch Pathol. Lab. Med. 2002; 126: 915-927.

6.Barros ACSD, Muranaka ENK, Mori LJ, Pelizon HT, Iriya K, Giocondo G, Pinotti JA. Induction of Experimental Mammary Carcinogenesis in Rats with 7,12 dimethylbenz(a)anthracene. *Rev Hosp Clín Fac Med S Paulo*. 2004; 59: 257-261.

7.Martin HL, Smith L, Tomlinson DC. Multidrug-resistant breast cancer: current perspectives. Breast Cancer: Targets and Therapy. 2014; 6: 1-13.

8.Klonisch T., Wiechec E., Hombach-Klonisch S., Ande SR., Wesselborg S., Schulze-Osthoff K., Los M. Cancer stem cell markers in common cancers – therapeutic implications. *Trends* Mol Med. 2008; 14: 450-460.

*9.*Shibata MA, Ito Y, Morimoto J, Otsuki Y. Lovastatin inhibits tumor growth and lung metastasis in mouse mammary carcinoma model: a p53-independent mitochondrial-mediated apoptotic mechanism. 2004; 25: 1887-1898.

10.Bacchi CE, Prisco F, Carvalho FM, Ojopi EB, Saad ED. Potential economic impacto f the 21-gene expression assay on the treatment of breast cancer in Brazil. Rev. Assoc. Med. Bras. 2010; 56:186-191.

11.Kakarala M. and Wicha MS. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. Journal Clinical Oncology. 2009; 26: 2813-2820.

12.Ito Y, Kawakatsu H, Takeda T, Tani N, Kawaguchi N, Noguchi S, Sakai T, Matsuura N. Activation of c-Src is inversely correlated with biological aggressiveness of breast carcinoma. Breast Cancer Research and Treatment. 2002; 76: 261-267.

*13.*Smalley M, Ashworth A. Stem cells and breast cancer: a field in transit. Nat. Rev. Cancer. 2003; 3:832-844.

14.Noronha CP, Ferreira JMO, Oliveira MM, Santos MO, Rebelo MS, Reis SS, Lima RJC. Brasil. Ministério da saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estatimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, INCA, 2007.

15.Hernandez-Aya LF, Gonzalez-Ângulo AM. Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathways in breast cancer. 2011; 16: 404-414.

16.Macciò A, Madeddu C Obesity, inflammation, and postmenopausal breast cancer: therapeutic implications. The Scientific World Journal. 2011; 11: 2020-2036.

17.Peña D, Pontillo C, García MA, Cocca C, Alvarez L, Chiappini F, Bourguignon N, Frahm I, Bergoc R, Pisarev DK, Randi A. Alterations in c-Src/HER-1 and estrogen receptor alfa signaling pathways in mammary gland and tumours of hexachlorobenzene-treated rats. Toxicology. 2012; 293: 68-77.

18.Kaufmann Y, Kornbluth J, Feng Z, Fahr M, Schaefer RF, Klimberg S. Effect of glutamine on the initation and promotion phases of DMBA-induced mammary tumor development. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition. 2003; 27: 411-418.
19.Clark O, Botrel TEA, Paladini L, Ferreira MBA. Targeted therapy in triple-negative metastatic breast cancer: a systematic review and meta-analysis. Core Evidence. 2014; 9: 1-11.
20.Duru N, Candas D, Jiang G, Li JJ. Breast cancer adaptive resistance: HER2 and cancer stem cell repopulation in a heterogeneous tumor society. Journal Cancer Reasearch Clinical Oncology. 2014; 140: 1-14.
21.Zhang Q, Claret FX. Phosphatases: the new brakes for cancer development?. Enzyme Research. 2012; 1-11.
22.Cidado J, Park BH. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathways for breast cancer therapy. Journal Mammary Gland. Biol. Neoplasia. 2012; 1-11.
23.Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signaling pathways: insights into insulin action. Nature Reviews. 2006; 7: 85-96.
24.Jazirehi AR, Wenn PB, Damavand. Therapeutic implications of targeting the PI3Kinase/AKT/mTOR signaling module in melanoma therapy. American Journal Cancer. 2012; 2: 178-191.
25.Todorova VK, Harms SA, Harms BS, Luo S, Kaufmann Y, Babb KB, Klimberg VS. Oral Glutamina (AES-14) supplementation inhibitis PI-3K/Akt signaling in experimental breast cancer. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition. 2003; 27: 404-414.
26.Condé C, Gloire G, Piette J. Enzymatic and non-enzymatic activities of SHIP-1 in signal transduction and cancer. Biochemical Pharmacology. 2011; 82: 1320-1334.
27.Gosh-Choudhury N, Mandal CC, Gosh-Choudhury N, Gosh-Choudhury G. Simvastatin induces derepression of PTEN expression via NFkB to inhibit breast cancer cell growth. Cellular Signaling. 2010; 22:749-758.
28.Yi YW, Kang HJ, Kim HJ, Hwang JS, Wang A, Bae I. Inhbition of constitutively activated phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway enhances antitumor activity of chemotherapeutic agents in breast cancer susceptibility gene 1-defective breast cancer cells. Molecular Carcinogenesis. 2012; 1-9.
29.Korkaya H, Paulson A, Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Brown M, Dutcher J, Clouthier SG, Wicha MS. Regulation of mammary stem/progenitor cells by PTEN/Akt/beta-catenin signaling. Plos Biology. 2009; 7: 1-14.
30.Wang JY, Chang CC, Chiang CC, Chen WM, Hung SC. Silibinin suppresses the maintenance of colorectal cancer stem-like cells by inhibiting PP2A/AKT/mTOR pathways. Journal of Cellular Biochemistry. 2012; 113: 1733-1743.
31.Fuhler GM, Brooks R, Toms B, Iyer S, Gengo EA, Park MY, Gumbletom M, Viernes DR, Chisholm JD, Kerr WG. Therapeutic potential of SH2 domain-containing inositol-5'-phosphatase 1 (SHIP1) and SHIP2 inhibition in cancer. Molecular Medicine. 2012; 18:65-75.
32.Kochuparambil ST, Al-Husein B, Goc A, Soliman S, Somanath PR. Anticancer efficacy of simvastatin on prostate cancer cells and tumor xenografts is associated with inhibition of akt and reduced prostate-specific antigen expression. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2011; 336: 496-505.
33.Teresi RE, Planchon SM, Waite KA, Eng C. Regulation of the PTEN promoter by statins and SREBP. Human Molecular Genetics. 2008; 17: 919-928.
34.Lu Y, Yu Q, Liu JH, Zhang J, Wang H, Koul D, McMurray JS, Fang X, Yung WKA, Siminovitch KA, Mills GB. Src family protein-tyrosine kinase alter the function of PTEN to regulate phosphatidylinositol 3-kinase/AKT cascades. The Journal of Biological Chemistry. 2003; 41: 40057-4066.
35.Mayer EL, Krop IE. Advances in targeting SRC in the treatment of breast cancer and other solid malignancies. Clinical Cancer Research. 2010; 16: 3526-3532.
36.Wheeler DL, Iida M, Dunn EF. The role of Src in solid tumors. The Oncologist Clinical Pharmacology. 2009; 14:667-678.

37.Kanomata N, Kurebayashi J, Kozuka Y, Sonoo H, Moriya T. Clinocopathological significance of Y416Src and Y527Src expression in breast cancer. Journal Clinical Pathology. 2011; 1-9.
38.Marcotte R, Smith HW, Sanguin-Gendreau V, Mcdonough RV, Muller WJ. Mammary epithelial-specific disruption of c-SRC impairs cell cycle progression and tumorigenesis. Medical Sciences. 2011; 1-6.
39.Ottenhoff-Kalff AE, Rijksen G, Beurden EACM, Hennipman A, Michels AA, Staal GEJ. Characterization of protein tyrosine kinase from human breast cancer: involvement of the c-src oncogene product. Cancer Research. 1992; 52: 4773-4778.
40.Elsberger B, Tan BA, Mitchell TJ, Brown SBF, Mallon EA, Tovey SM, Cooke TG, Brunton VG, Edwards J. Is expression or activation of Src kinase associated with cancer-specific survival in ER-, PR- and HER2- negative breast cancer patients?. The American Journal of Pathology. 2009; 175: 1389-1397.
41.Montero JC, Seoane S, Ocaña A, Pandiella A. Inhibition of Src family kinases and receptor tyrosine kinases by dasatinib: possible combinations in solid tumours. Molecular Pathways. 2011; 1-20.
42.Xu H, Washington S, Verderame MF, Manni A. Role of non-receptor and receptor tyrosine kinases (TKs) in the antitumor action of alfa-difluoromethylornithine (DFMO) in breast cancer cells. Breast Cancer Research Treatment. 2008; 112: 255-261.
43.Wilson GR, Cramer A, Welman A, Knox F, Swindell R, Kawakatsu H, Clarke RB, Dive C, Bundred NJ. Activated c-SRC in ductal carcinoma in situ correlates with hig tumour grade, high profileration and HER2 positivity. British Journal of Cancer. 2006; 95: 1410-1414.
44.Gauthaman K, Fong CY, Bongso A. Statins, stem cells, and cancer. J Cell Biochem. 2009; 106: 975-983.
45.Li Y., Rosen JM. Stem/progenitor cells in mouse mammary gland development and breast cancer. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2005; 10: 17-24.
46.Al-Haji M, Clarke MF. Self-renewall and solid tumor stem cells. *Oncogene.* 2004; 23: 7224-7282.
47. Woodward J, Sassano A, Nissim H. Statin-dependent suppression of the Akt/mammalian target of rapamycin signaling cascade and programmed cell death 4 up-regulation in renal cell carcinoma. Clinical Cancer Research. 2008; 14: 4640-4649.
48.Stingl J. Detection and analysis of mammary gland stem cells. Journal of Pathology. 2009; 217: 229-241.
49.Dontu G. Breast cancer stem cell markers – the rocky road to clinical applications. Breast Cancer Research. 2008; 10: 110-111.
50.Wright MH, Calcagno AM, Salcido CD, Carlson MD, Ambudkar SV, Varticovski L. Brca1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24– and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics. Breast Cancer Res. 2008; 10(1): 1-10.
51.Gokmen-Polar Y, Nakshatri H, Badve S. Biomarkers for breast cancer stem cells: the challenges ahead. Biomarkers Med. 2011; 5: 661–671.
52.Morimoto K, Kim SJ, Tanei T, Shimazu K, Tanji Y, Taguchi T, Tamaki Y, Terada N, Noguchi S. Stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1-positive breast cancer are characterized by negative estrogen receptor, positive human epidermal growth factor receptor type 2, and high Ki67 expression. Cancer Sci. 2009; 100: 1062-1068.
53.Paltian V, Alldinger S, Baumgärtner W, Wohlsein P. Expressoin of CD44 in canine mammary tumours. Journal Comp. Pathology. 2009; 141: 237-247.
*54.*Simonetti S, Terracciano L, Zlobec I, Kilic E, Stasio L, Quarto M, Pettinato G, Insabato L. Immunophenotyping analysis in invasive micropapillary carcinoma of the breast: role of CD24 and CD44 isoforms expression. The Breast. 2012; 21: 165-170.
55.Louderbough JMV, Brown JA, Nagle RB, Schroeder JA. CD44 promotes epithelial mammary gland development and exhibits altered localization during cancer progression. Genes and Cancer. 2011; 8: 771-781.
56.Tse GMK, Tan P-H, Ma TKF, Gilks CB, Poon CSP, Law BKB. CD44 is useful in the differentiation of benign and malignant papillary lesions of the breast. Journal Clinical Pathology. 2005; 58: 1185-1188.

57.Horiguchi K, Toi M, Horiguchi S, Sugimoto M, Naito Y, Hayashi Y, Ueno T, Ohno S, Funata N, Kuroi K, Tomita M, Eishi Y. Predictive value of CD24 and CD44 for neoadjuvant chemotherapy response and prognosis in primary breast cancer patients. Journal Medicine Dent Sci. 2010; 57: 165-175.
58.Park SY., Lee HE., Li H., Shipitsin M., Gelman R., Polyak K. Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. Clinical Cancer Research. 2010; 16: 876-887.
59.Lee JH, Kim SH, Lee ES. CD24 overexpression in cancer development and progression: a meta-analysis. Oncology Reports. 2009; 22, 1149-1156.
60.Baumann P, Cremers N, Kroese F, Orend G, Chiquet-Ehrismann R, Uede T, Yagita H, Sleeman JP. CD24 expression causes the acquisition of multiple cellular properties associated with tumor growth and metastasis. Cancer Research. 2005; 65: 10783-10793.
61.Kristiansen G, Winzer KJ, Mayordomo E, Bellach J, Schlüns K, Denkert C, Dahl E, Pilarsky C, Altevogt O, Guski H, Dietel M. CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer. 2003; 9: 4906-4913.
62.Horiguchi K, Toi M, Horiguchi S, Sugimoto M, Naito Y, Hayashi Y, Ueno T, Ohno S, Funata N, Kuroi K, Tomita M, Eishi Y. Predictive value of CD24 and CD44 for neoadjuvant chemotherapy response and prognosis in primary breast cancer patients. J. Med. Sci. 2010; 57:165-175.
*63.*Sleeman KE, Kendrick H, Ashworth A, Isacke CM, Smalley MJ. CD24 staining of mouse mammary gland cells defines luminal epithelial, myoepithelial/basal and non-epithelial cells. 2005; 8: 1-6.
64.Keysar SB., Jimeno A. More than markers: biological significance of cancer stem cell-defining molecules. Molecular Cancer Therapeutics. 2010; 9: 2450-2457.
65.Bircan S, Kapucuologlu N, Baspinar S, Inan G, Candir O. CD24 expression in ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of breast: an immunohistochemistry-based pilot study. Pathology-Research and Pratice. 2006; 202: 569-576.
66.Immervoll H., Hoem D., Sakariassen PO., Steffensen OJ., Molven A. Expression of the “stem cell marker” CD133 in pancreas and pancreatic ductal adenocarcinomas. BMC Cancer. 2008; 48: 1-14.
67.Fan L, He F, Liu H, Zhu J, Liu Y, Yin Z, Wang L, Guo Y, Wang Z, Yan Q, Huang G. CD133: a potential indicator for differentiation and prognosis of human cholangiocarcinoma. BMC Cancer. 2011; 11(320), 1-8.
68.Yu X, Lin Y, Yan X, Tian Q, Li L, Lin EH. CD133, stem cells and cancer stem cells: myth or reality?. Curr Colorectal Cancer Rep. 2011; 7: 253-259.
69.Chen YS, Wu MJ, Huang CY, Lin SC, Chuang TH, Yu CC, Lo JF. CD133/Src axis mediates tumor initiating property and epithelial-mesenchymal transition of head and neck cancer. Plos one. 2011; 6: 1-11.
70.Sartelet H, Imbriglio T, Nyalendo C, Haddad E, Annabi B, Duval M, Fetni R, Victor K, Alexendrov L, Sinnett D, Fabre M, Vassal G. CD133 expression is associtated with poor outcome in neuroblastoma via chemoresistence mediated by the AKT pathway. Histopathology. 2012; 1-12.
71.Qun L, Zheng LJG, Feng J, Hui-Ting D. Expression of CD133, PAX2, ESA, and GPR30 in invasive ductal breast carcinomas. Chinese Medical Journal. 2009; 122**:** 2763-2769.
72.Ai Z, Pan H, Chentao TS, Lv C, Wang Y, Tong S, Liu H. Arsenic oxide targets targets stem cell marker CD133/promini-1 in gallbladder carcinoma. Cancer Letters. 2011; (310): 181-187.
73.Lorico A., Rappa G. Phenotypic heterogeneity of breast cancer stem cells. Journal of Oncology. 2011; http://dx.doi.org/10.1155/2011/135039.
74.Zhao P, Lu Y, Jiang X, Li X. Clinocopathological significance and prognostic value of CD133 expression in triple-negative breast carcinoma. Cancer Science. 2011; 102: 1107-1111.
75.Baeuerle PA, Gires O. EpCAM (CD326) finding its role in cancer. British Journal of Cancer. 2007; 96: 417-423.
76.Cimino A, Halushka M, Illei P, Wu X, Sukumar S, Argani P. Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) is overexpressed in breast cancer metastases. Breast Cancer Research Treatment. 2010; 123: 701-708.

77.Keller P, Arendt LM, Skibinski A, Logvinenko T, Klenna I, Dong S, Smith AE, Prat A, Perou CM, Gilmore H, Schnitt S, Naber SP, Garlick JA, Kuperwasser C. Defining the cellular precursors to human breast cancer. PNAS. 2011; 1-6.
78.Munz M, Baeuerle PA, Gires O. The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. Cancer Research. 2009; 69: 5627-5629.
79.Spizzo G, Gastl G, Wolf D, Gunsilius E, Steurer M, Fong D, Amberger A, Margreiter R, Obrist P. Correlation of Cox-2 and Ep-CAM overxpression in human invasive breast cancer and it impact on survival. British Journal of Cancer. 2003; 88: 574-578.
80.Armstrong A, Eck SL. A new therapeutic target for an old cancer antigen. Cancer Biology and Therapy. 2003; 4: 320-325.
81.Agboola AJ, Pish EC, Rakha EA, Powe DGP, Macmillan RG, Ellis IO, Green AR. EpCAM expression is an indicator of recurrence in basal-like breast cancer. Breast Cancer Research Treatment. 2011; 133 (2): 575-582.
82.Spizzo G, Obrist P, Ensinger C, Theuri I, Dünser M, Ramoni A, Gunsilius E, Eibl G, Mikuz G, Gastl G. Prognostic significance of Ep-CAM and Her-2/neu overexpression in invasive breast cancer. International Journal Cancer. 2002; 98:883-888.
83.Spizzo G, Fong D, Wurm M, Ensinger C, Obrist P, Hofer C, Mazzoleni G, Gastl G, Went P. EpCAM expression in primary tumour tissue and metastases: an immunohistochemical analysis. Journal of Clinical Pathology. 2011; 64: 415-420.
84.Russo J, Russo I. Atlas and histologic classification of tumors of the rat mammary gland. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia. 2000; 5: 187-200.
85.Jakobisiak M, Golab J. Statins can modulate effectiveness of antitumor therapeutic modalities. Medical Research Reviews. 2010; 30: 102-135.
86.Demierre MF, Higgins PDR, Gruber SB, Hawk E, Lippman SM. Statins and cancer prevention. Nature. 2005; 5:930-942.
*87.*Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. Fundamental and Clinical Pharmacology. 2004; 19: 117-125.
88.Roglans N, Verd JC, Peris C, Alegret M, Vázquez M, Adzet T, Díaz C, Hernández G, Laguna JC, Sánchez. High doses of atorvastatin and simvastatin induce key enzymes involved in VLDL production. Lipids. 2002; 37: 445-454.
89.Bilal R, Zakaria M, Usman A, Aftab S, Zia A. Antuhyperlipidaemic effects of Eugenia jambolana fruit in diet induced hyperlipidaemic rats. Journal Pak. Med Assoc. 2011; 61: 433-437.
*90.*Sirtori CR. The pharmacology of statins. Pharmacological Research. 2014; 1-9.
91.Hindler K, Cleeland CS, Rivera E, Collard CD. The role of statins in cancer therapy. The Oncologist Prevention. 2006; 11: 306-315.
92.Gibbons GF, Pullinger R. Regulation of cholesterol synthesis in the liver and mammary gland of the lactating rat. Biochemical Journal. 1983; 212: 843-848.
93.Eisa-Beygi S, Ekker M, Moon TW, Macdonald RL, Wen XY. Developmental processes regulated by the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) pathway: highlights from animal studies. 2014; 1-29.
94.Borgquist S, Jögi A, Pontén F, Ryden L, Brennan DJ, Jirström. Prognostic impact of tumour-specific HMG-CoA reductase expression in primary breast cancer. Breast Cancer Research. 2008; 1-11.
*95.*Smith RAW, Middleton B, West DW. Diurnal varation in the fraction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in the active form in the mammary gland of the lactating rat. Biochemical Journal. 1986; 239: 285-293.
96.Chan KKW, Oza AM, Siu LL. The statins as anticancer agents. Clinical Cancer Research. 2003; 9:10-19.
97.Nakahara K, Kuriyama M, Sonoda Y, Yoshidome H, Nakagawa H, Fujiyama J, Higuchi I, Osame M. Myopathy induced by HMG-CoA reductase inhibitors in rabbtis: a pathological, electrophysiological, and biochemical study. Tox. And Applied Pharmacology. 1998; 152:99-106.

98. Schimidt F, Groscurth P, Kermer M, Dichgans J, Weller M. Lovastatin and phenylacetate induce apoptosis, but not differentiation, in human malignant glioma cells. Acta Neuropathol. 2001; 101:217-224.
99.Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. Nature Medicine. 2000; 6: 1399-1402.
100.Wong WW, Dimitroulakos J, Miden MD, Penn LZ. HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: The statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. Leukemia. 2002; 16: 508-519.
*101.*Sassano A., Platanias LC. Statins in tumor suppression. Cancer Lett. 2008; 260: 11-19.
102.Blais L, Desgagne A, Lelorier J. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors and the risk of cancer: a nested case-control study. Archives of Internal Medicine. 2000; 160: 2363-2368.
103.Graaf MR, Beiderbeck AB, Egberts AC *et al*.. The risk of cancer in users of statins. J. Clin. Oncol. 2004; 22: 2388-2394.
104.Boudreau DM, Gardner JS, Malone KE. The association between 3-hydroxy-3-methylglutary coenzyme A inhibitor use and breast carcinoma risk among post menopausal women: a case control study. Cancer. 2004; 100: 2308-2316.
105.Lubet RA., Boring D., Steele VE., Ruppert JM., Juliana MM., Grubbs C. Lack of efficacy of the statins atorvastatin and lovastatin in rodent mammary carcinogenesis. Cancer Prevention Research 2009; 2: 161-167.
106.Lee MH., Cho YS., Han YM. Simvastatin suppresses self-renewal of mouse embryonic stem cells by inhibiting RhoA geranylgeranylation. Stem Cells. 2007; 25: 1654-1663.
107.Wood WG, Igbavboa U, Eckert GP. Statins, Bcl-2, and apoptosis: cell death or cell protection? Mol. Neurobiol. 2013; 48:308-314.
*108.*Shibata MA, Kavanaugh, Shibata E, Abe H, Nguyen P, Otsuki Y, Trepel JB, Green JE. Comparative effects of lovastatin on mammary and prostate oncogenesis in transgenic mouse models. Carcinogenesis. 2003; 24: 453-459.
109.Farina HG, Bublik DR, Alonso DF, Gomez DE. Lovastatin alters cytoskeleton organization and inhibits experimental metastasis of mammary carcinoma cells. Clin. Exp. Metastasis. 2002; 19: 551-559.
110.Kubatka P, ihlavnikova K, Kajo K, Pe M, Stollarova N, Bojkova B, Kassayova M, Orendaš P. Antineoplastic Effects of Simvastatin in Experimental Breast Cancer. Klin Onkol. 2011; 24: 41–45.
111.Kubatka P, Zihlavnikova K, Solar P, Kajo K, Valentova V, Pec M, Bojkova B, Kassayova M, Stollarova N, Ahlers I. Antitumor effects of atorvastatin in the chemoprevetion of rat mammary carcinogenesis. Biologia Section Cellular and Molecular Biology. 2011; 66: 727-734.
112.Kubatka P, Kajo K, Zihlavnikova K, Adamicova K, Vybohova D, Pec M, Nosal V, Stollarova N, Bojkova B, Kassayova M, Orendas P. Immunohistochemical and histomorphological analysis of rat mammary tumours after simvastatin treatment. Neoplasma. 2012; 59: 1-17.
113.Kubatka P, Katarína Z, Kajo K, Nadezda S, Pec M, Bianka B, Monika K, Orendas P, Ahlers P. Rosuvastatin in the chemoprevention of n-methyl-n-nitrosourea-induced mammary carcinogenesis in female rats. Acta Veterinaria. 2011; 61: 445-460.
114.Wei N, Mi MT, Zhou Y. Influences of lovastatin on membrane ion flow and intracellular signaling in breast cancer cells. Cell Mol. Biol. Lett. 2007; 12: 1-15.
115.Kang S., Kim ES., Moon A. Simvastatin and lovastatin inhibit breast cell invasion induced by H-Ras. Oncology Reports. 2009; 21: 1317-1322.
116.Relja B, Meder F, Wilhelm K, Henrich D, Marzi I, Lehnert. Simvastatin inhibits cell growth and induces apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest in hepatic cancer cells. International Journal of Molecular Medicine. 2010; 26: 735-741.
117.Gabrys D, Dorfler A, Yaromina A, Hessel F, Krause M, Oertel R, Baumann M. Effects of lovastatin alone or combined with irradiation on tumor cells *in vitro* and *in vivo.* Strahlentherapie und Onkologie. 2008; 184: 48-53.
118.Denoyelle C, Albanese P, Uzan G, Hong L, Vannier JP, Soria J, Soria C. Molecular mechanism of the anti-cancer activity of cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, on aggrevsive human breast cancer cells. Cellular Signalling. 2003; 15: 327-338.

119. Gauthaman K, Manasi N, Bongso A. Statins inhibit the growth of variant human embryonic stem cells and cancer cells in vitro but not normal human embryonic stem cells. Br J Pharmacol. 2009; 157: 962-973.
120. Butterweck V, Zdrojewski I, Galloway C, Frye R, Derendorf H. Toxicological and pharmacokinetic evaluation of concomitant intake of grapefruit juice and simvastatin in rats after repeated treatment over 28 days. Planta Med. 2009; 75: 1196-1202.
121. Pierno S, Didonna MP, Cippone V, De Luca A, Pisoni M, Frigeri A, Nicchia GP, Svelto M, Chiesa G, Sirtori C et al. Effects of chronic treatment with statins and fenofibrate on rat skeletal muscle: a biochemical, histological and electrophysiological study. British J. of Pharmacology. 2006; 149:909-919.
122. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacralamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. 1979; 76:4350-4354.
123. Diaz-Zagoya JC, Asenjo-Barrón JC, Cárdenas-Vázquez R, Martinez F, Juárez-Oropeza. Comparative toxicity of high doses of vastatins currently used by clinicians, in CD-1 male mice fed with a hypercholesterolemic diet. Life Sciences. 1999; 9: 947-956.
124. Funatsu T, Kakuta H, Takasu T, Noguchi M, Suzuki M, Miyata K. Experimental model of prostprandial hypertriglyceridemia in sucrose-fed rats and effectiveness of atorvastatin model. Metabolism. 2003; 52: 609-615.
125. Westwood FR, Scott RC, Mardsen AM, Bigley A, Randall K. Rosuvastatin: characterization of induced myopathy in the rat. Toxicol. Pathol. 2008; 36:345-352.
126. McDonald JS, Halleck M. The toxicology of HMG-CoA reductase inhibitors: prediction of human risk. Toxicologic Pathology. 2004; 32: 26-41.
127. Tavintharan S, Ong CN, Jeyaseelan K, Sivakumar M, Lin SC, Sum FC. Reduce mitochondrial coenzyme Q10 levels in HepG2 cells treated with hig-dose simvastatin: a possible role in statin-induced hepatotoxicity? Toxicology and Applied Pharmacology. 2007; 223: 173-179.
128. Jabbari M, Rostami Z, Jenabi A, Zahedi-Shoolami L, Mooraki A. Simvastatin ameliorates gentamicin-induced renal injury in rats. Saudi. J. Kidney Dis. Transpl. 2011; 22: 1181-1186.
129. Lee MH, Cho YS, Han YM. Simvastatin suppresses self-renewal of mouse embryonic stem cells by inhibiting RhoA geranylgeranylation. Stem Cells. 2007; 25: 1654-1663.
130. Argawal R. Statin induced proteinuria: renal injury or renoprotection? J. Am. Soc. Nephrol. 2004; 15: 2502-2503.
131. Argawal R. Effects of statins on renal function. Mayo. Clin. Proc. 2007; 82:1381-1390.
132. Shunmugavel A, Khan M, Chou PC, Dhindsa RK, Martin MM, Copay AG, Subach BR, Schuler TC, Bilgen M, Orak JK, Singh I. Simvastatin protects bladder and renal function following spinal cord injury in rats. Journal of Inflammation. 2010; 7: 1-17- XX
133. Mannello F. Understanding breast cancer stem cell heterogeneity: time to move on to a new research paradigm. BMC Medicine 2013; 169: 1-5.
134. Gehbeh H, Sleiman GM, Manogaran PS, Al-Mazrou, Barhoush E, Al- Mohanna FH, Tulbah A, Al-Faqeeh K, Adra CN. Profiling of normal and malignant breast tissue show CD44high/CD24low phenotype as a predominant stem/progenitor marker when used in combination with Ep-CAM/CD49f markers. BMC Cancer. 2013; 289: 1-14.
135. Wu H, Jiang H, Lu D, Xiong Y, Changsheng Q, Zhou D, Mahmood A, Chopp M. Effect of simvastatin on glioma cell proliferation, migration, and apoptosis. Neurosurgery. 2009; 65: 1087-1097.
136. Asslan R, Pradines A, Favre G, Gaillard FL. Tyrosine kinase-dependet modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in human breast adenocarcinoma SKBR-3 cells. Biochemical Journal. 1998; 330, 241-246.
137. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Wicinski J, Cervera N, Finetti P, Hur M, Diebel ME, Monville F, Dutcher J, Brown M, Viens P, Xerri L, Bertucci F, Stassi G, Dontu G, Birnbaum D, Wicha MS. Breast Cancer Cell Lines Contain Functional Cancer Stem Cells with Metastatic Capacity and a Distinct Molecular Signature. Cancer Res. 2009; 69: 1302-1313.

138.Cheng L, Ramesh AV, Flesken-Nikitin A, Choi J, Nikitin AY. Mouse models for cancer stem cell research. Toxicology Pathology. 2010; 38: 62-71.
139.Elewa HF, El-Remessy AB, Somanath PR, Fagan SC. Diverse Effects of Statins on Angiogenesis: New Therapeutic Avenues. *Pharmacotherapy.* 2010; 30, 169-176.
140.Gopalan A, Yu W, Sanders BG, Kline K. Eliminating drug resistant breast cancer stem-like cells with combination of simvastatin and gamma-tocotrienol. Cancer Letters. 2012; http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.10.003.
141.Johnson NB, Collins LC. Less common variants and mimics of DCIS. Surgical Pathology. 2012; 529-544.
142.Karamboulas C, Ailles L. Developmental signaling pathways in cancer stem cells of solid tumors. Biochimica et Biophysica Acta. 2012; http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.008
143.Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, Van de Vijver MJ. WHO Classification of tumours of the breast. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2012.
144.Li YC, Park MJ, Ye SK, Kim CW, Kim YN. Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol-depleting agents; American Journal of Pathology. 2006; 168: 1107-1118.
145.Medema JP. Cancer stem cells: the challenges ahead. Nature Cell Biology. 2013; 15: 338-344.
146.Potter SM, Dwyer RM, Hartmann MC, Khan S, Boyle MP, Curran CE, Kerin MJ. Influence of stromal-epithelial interactions on breast cancer in vitro and in vivo. Breast Cancer Research Treatment. 2012; 131 (2):401-4011.
*147.*Schnitt SJ, Collins LC. Biopsy Interpretation of the breast. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2009; 481.
*148.*Sharma D, Smits BMG, Eichelberg MR, Meilahn AL, Muelbl MJ, Haag JD, Gould MN. Quantification of ephitelial cell differentiation in mammary glands and carcinomas from DMBA- and MNU exposed rats. Plos One. 2011; 6:1-9.
149.Soltanian S., Matin MM. Cancer stem cells and cancer therapy. *Tumor Biol.* 2011; 32: 425-440.
150.Sterzynska K, Kempisty B, Zawierucha P, Zabel M. Analysis of the specificity and selectivity of anti-EpCAM antibodies in breast cancer cell lines. Folia Histochemica Et Cytobiologica. 2012; 50: 534-541.
151.Tiede BJ, Owens LA, Li F, DeCoste C, Kang Y. A novel mouse model for non-invasive single marker tracking of mammary stem cells in vivo reveals stem cell dynamics throughout pregnancy. Plus One. 2009; 4: 1-10.
152.Torsvik A, Bjerkvig R. Mensenchymal stem cell signaling in cancer progression. Cancer Treatment Reviews. 2012; http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2012.03.005
153.Velasco-Velazquez MA, Homsi N, De La Fuente M, Pestell RG. Breast cancer stem cells. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2012; http://10.1016/j.biocel.2011.12.020.
154.Xiao Y, Yearsley K, Jones S, Barsky H. The lymphovascular embolus of inflammatory breast cancer expresses a stem cell-like phenotype. American Society for investigative Pathology. 2008; 173: 561-574.
155.Wang YK, Zhu YL, Qiu FM, Zhang T, Chen ZG, Zheng S, Huang J. Activation of Akt and MAPK pathways enhances the tumorigenicity of CD133+ primary colon cancer cells. Carcinogenesis. 2010; 31: 1376-1380.

9. ANEXO

UNICAMP

CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto **"EFEITOS DE ESTATINAS LIPOFÍLICAS E HIDROFÍLICAS SOBRE A EXPRESSÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS TRONCO NEOPLÁSICAS EM MODELO MURINO DE CARCINOGÊNESE MAMÁRIA: UM ESTUDO IMUNO-HISTOMÉTRICO COMPARATIVO"** (protocolo nº **2335-1**), sob a responsabilidade de **Prof. Dr. André Almeida Schenka / André Lisboa Rennó**, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **21 de fevereiro de 2011**.

Campinas, 21 de fevereiro de 2011.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
http://www.ib.unicamp.br/ceea/