Marcos José Alves Júnior

ANGIOGÊNESE, CÉLULAS-TRONCO NEOPLÁSICAS CD34+ E SINVASTATINA EM MODELO DE CARCINOGÊNESE MAMÁRIA INDUZIDA QUIMICAMENTE

CAMPINAS



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

ANGIOGÊNESE, CÉLULAS-TRONCO NEOPLÁSICAS CD34+ E SINVASTATINA EM MODELO DE CARCINOGÊNESE MAMÁRIA INDUZIDA QUIMICAMENTE

Marcos José Alves Júnior

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP para obtenção de título de Mestre em Farmacologia. Sob orientação do Prof. Dr. André Almeida Schenka

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652 BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS UNICAMP

Al87a	Alves Júnior, Marcos José, 1985 - Angiogênese, células-tronco neoplásicas CR34+ e sinvastatina em modelo de carcinogênese mamária induzida quimicamente / Marcos José Alves Júnior. – Campinas, SP : [s.n.], 2012.
	Orientador : André Almeida Schenka. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.
	 Neurovascularização patológica. Células- tronco neoplásicas. Sinvastatina. Antígenos CD34. Imuno-histoquímica. Schenka, André Almeida. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Angiogenesis, CD34+ cancer stem-cells and simvastatin in a chemically induced mammary carcinogenesis model. Palavra-chave em inglês: Neurovascularization, pathologic Neoplastic stem cells Simvastatin Antigens,CD34 Immunohistochemistry Titulação: Mestre em Farmacologia Banca examinadora: André Almeida Schenka [Orientador] Maria Salete Costa Gurgel Laura Ferreira de Rezende Franco Data da defesa: 29-02-2012 Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado

MARCOS JOSÉ ALVES JÚNIOR

Orientador: Prof. Dr. Andre Almeida Schenka

nic

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 29/02/2012

Dedico este trabalho à meus pais, Marcos José Alves e Solange de Oliveira Alves por permitirem que toda essa trajetória tenha sido possível investindo, acreditando e incentivando sempre, além do amor e carinho incondicionais.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. André Almeida Schenka, pela oportunidade oferecida ao acreditar em mim para a realização desse trabalho ciente de todas as dificuldades que esta ação traria. Agradeço também por toda orientação neste projeto, sempre contribuindo com seu conhecimento científico e com sua amizade.

Aos meus pais, à minha irmã Juliana e aos meus avós (vivos ou não), cuja convivência me fazem desenvolver meu caráter e princípios, além do apoio, torcida, carinho e incentivo constantes.

Aos amigos André, Cristielle, Marina, Philipi e Valéria por toda "assessoria técnico-científica", amizade, carinho e momentos de descontração.

Aos amigos Ana Paula, Andrezza, Carolina, Caroline, Danilo, Juliana, Thiago e Thyelle pelos momentos agradáveis e divertidos juntos.

Às minhas amigas e "conselheiras" Prof. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo e Prof. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes por me mostrarem em um momento nebuloso que a premissa que tenho de Ciência é a correta e, dessa forma, indiretamente me levarem a ser agraciado com este trabalho.

Ao secretário da pós-graduação, Bruno Alves Pereira, pela paciência, compreensão e inestimável apoio em todas as ocasiões.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia pela simpatia e por permitirem um ambiente de trabalho amigável, em especial ao Miguel e à Denise pelo cuidado e dedicação aos animais mantidos no biotério.

Às equipes dos Laboratórios de Patologia Experimental do Hospital AC Camargo e CAISM/UNICAMP por permitirem o uso de suas dependências e equipamentos.

"Be bloody, bold, and resolute: Laugh to scorn The power of man: for none of woman born Shall harm Macbeth"

William Shakespeare in Macbeth: Ato 4, Cena 1

SUMÁRIO

		Lista de siglas e abreviaturasxvii
		Lista de figurasxxi
		Lista de tabelasxxv
		RESUMOxxvii
		ABSTRACTxxix
1-		INTRODUÇÃO
	1.1-	Angiogênese
	1.2-	Células-tronco neoplásicas e câncer de mama
	1.3-	Estatinas47
2-		JUSTIFICATIVAS
3-		OBJETIVOS
4-		MATERIAL E MÉTODOS
	4.1-	Animais e indução tumoral
	4.2-	Protocolo de tratamento

	4.3-	Coleta e exame macroscópico60
	4.4-	Processamento histológico
	4.5-	Avaliação Morfológica61
	4.6-	Reação imuno-histoquímica64
	4.7-	Análise quantitativa de imunocoloração para CD3465
	4.8-	Análise estatística
5-		RESULTADOS
	5.1-	Caracterização da amostra
	5.2-	Caracterização histopatológica geral no presente protocolo
	5.3-	Caracterização da Angiogênese76
	5.4-	Células-tronco CD34+84
	5.5-	Correlação entre Angiogênese e Células-tronco CD34 ⁺
	5.6-	Correlação entre Angiogênese e outras variáveis biológicas
	5.7-	Correlação entre Células-tronco CD34+ e outras variáveis biológicos

6-		DISCUSSÃO	
	6.1-	Caracterização Histopatológica	
	6.2-	Angiogênese	
	6.3-	Células-tronco Neoplásicas	
7-		CONCLUSÕES	
8-		REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
9-		ANEXO	

Lista de siglas e abreviaturas

AAS:	André Almeida Schenka
ABCG:	ATP-binding cassette sub-family G
ALVT:	Area luminal vascular total
ANOVA:	Análise de variância
bFGF:	Basic fibroblastic growth factor
CEUA:	Comissão de Etica no Uso de Animais
CGA:	Campo de grande aumento
CMA:	Campo de médio aumento
COBEA:	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CSC:	Cancer stem-cell
CT:	Célula-tronco
CTN:	Célula-tronco neoplásica
DAB:	Tetraidrocloreto de 3,3'-diaminobenzidina
DMBA:	7,12-dimetilbenz(a)antraceno
DP:	Desvio padrão
FCTN:	Frequência de Células-Tronco Neoplásicas CD34+
GC:	Grupo Controle
GCSF:	Granulocyte colony stimulation factor
GE:	Grupo Experimental
HE:	Hematoxilina-eosina
HIF:	Hypoxia-inducible factor
HMG-CoA:	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
HRP:	Horseradish peroxidase
ICV:	Indice de contorno vascular
IL-6:	Interleucina-6
LSAB:	Labeled streptavidin biotin

MDR1:	Multidrug resistance gene 1
MVD:	Densidade microvascular
OMS:	Organização Mundial de Saúde
PBS:	Phosphate buffered solution
Pgp:	Glicoproteína P
SBCAL:	Sociedade Brasileira para Ciência de Animais de Laboratório
SC:	Stem-cell
TGF-β:	Transforming growth fator β
UDLT:	Unidade ducto-lobular terminal
UNICAMP:	Universidade Estadual de Campinas
VEGF:	Vascular endotelial growth factor

Lista de figuras

Figura 1:	Estruturas químicas dos inibidores da hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-CoA)
Figura 2:	Mecanismo de inibição de colesterol pelas estatinas e seus efeitos no sistema cardiovascular, na prevenção de câncer e nas células-tronco embrionárias humanas
Figura 3:	Protocolo experimental
Figura 4:	Medição de tumor mamário após exérese59
Figura 5:	Composição histológica percentual média dos tumores do GE 1 e GE 2 de ratas Sprague-Dawley fêmeas72
Figura 6:	Percentual médio de área necrótica observada nos tumores do GE 1 e GE 2 de ratas Sprague-Dawley fêmeas74
Figura 7:	Número de mitoses em dez campos observados nos tumores do GE 1 e GE 2 de ratas Sprague-Dawley fêmeas
Figura 8:	Número de estruturas vasculares no GC 1 e GC 2 de ratas Sprague- Dawley fêmeas
Figura 9:	Número de estruturas vasculares no GC, GE 1 e GE 2 de ratas Sprague-Dawley fêmeas
Figura 10:	Fotomicrografias ilustrativas da expressão de CD34 em estruturas vasculares do GE1 (A), GE2 (B), GC (C) e células-tronco em tumor não tratado (D)
Figura 11:	Area luminal total, em micrômetros quadrados, no GC 1 e GC 2 de ratas Sprague-Dawley fêmeas
Figura 12:	Area luminal total, em micrômetros quadrados, no GC, GE 1 e GE 2 de ratas Sprague-Dawley fêmeas
Figura 13:	Indice de Contorno Vascular do GC, GE 1 e GE 2 de ratas Sprague- Dawley fêmeas
Figura 14:	Número de células-tronco CD34+ no GC 1 e GC 2 de ratas Sprague- Dawley fêmeas
Figura 15:	Número de células-tronco CD34+ no GC, GE 1 e GE 2 de ratas Sprague-Dawley fêmeas
Figura 16:	Correlação entre o número de células-tronco CD34+ e o número de estruturas microvasculares em todos os grupos estudados de ratas Sprague-Dawley fêmeas

Figura 17:	Correlação entre o número de estruturas microvasculares e a percentagem de componente ductal nos GE 1 e GE 2 de ratas Sprague-Dawley fêmeas
Figura 18:	Correlação entre o número de estruturas microvasculares e grau tubular nos GE 1 e GE 2 de ratas Sprague-Dawley fêmeas90
Figura 19:	Correlação entre o número de estruturas microvasculares e a percentagem de necrose nos GE 1 e GE 2 de ratas Sprague-Dawley fêmeas
Figura 20:	Correlação entre o número de estruturas microvasculares e o índice mitótico nos GE 1 e GE 2 de ratas Sprague-Dawley fêmeas
Figura 21:	Correlação entre o número de células-tronco neoplásicas CD34+ e a percentagem de componente ductal nos GE 1 e GE 2 de ratas Sprague-Dawley fêmeas
Figura 22:	Correlação entre o número de células-tronco neoplásicas CD34+ e grau tubular nos GE 1 e GE 2 de ratas Sprague-Dawley fêmeas
Figura 23:	Correlação entre o número de células-tronco neoplásicas CD34+ e a percentagem de necrose nos GE 1 e GE 2 de ratas Sprague-Dawley fêmeas
Figura 24:	Correlação entre o número de células-tronco neoplásicas CD34+ e índice mitótico nos GE 1 e GE 2 de ratas Sprague-Dawley fêmeas

Lista de tabelas

Tabela 1:	Tabela 1: Classificação histológica de neoplasias mamárias humanas estabelecida pela OMS62
Tabela 2:	Caracterização da amostra tumoral nos respectivos grupos experimentais
Tabela 3:	Frequência de casos em cada categoria de grau histológico final (grau de diferenciação)73

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais frequente e a primeira causa de óbito por neoplasia em mulheres. A despeito de toda a pesquisa e todos os progressos realizados até o momento, a morbimortalidade ainda é alta em pacientes em estádio avançado. Recentemente, foi descrito um novo modelo de carcinogênese no qual as células-tronco (CT) seriam responsáveis pela origem, heterogeneidade morfológica e autorrenovação das neoplasias malignas. Apoiando essa teoria, observam-se, na maioria das neoplasias sólidas, células com características biológicas e fenotípicas de CT, as quais são designadas células-tronco neoplásicas (CTN). Estando associadas à resistência terapêutica e recidivas tumorais a longo prazo, as CTNs constituem um importante alvo de estudos fisiopatológicos e farmacológicos. Além das CTNs, outro importante alvo terapêutico em câncer de mama é representado pela angiogênese tumoral. Contudo, raros são os estudos focados nas interrelações dessas duas estratégias. As estatinas constituem um grupo de fármacos utilizados no tratamento de primeira linha das dislipidemias e na prevenção de suas consequências cardiovasculares. Além dos efeitos antidislipidêmicos, são descritas propriedades antineoplásicas, cujas bases parecem estar associadas a ações antiapoptóticas e antiangiogênicas, ainda não totalmente esclarecidas. Resultados preliminares in vitro de Gauthaman et al. e in vivo do grupo de pesquisa em que o presente trabalho se insere apontam um efeito inibitório de estatinas (principalmente as lipofílicas) sobre CTN mamárias humanas e murinas. Assim sendo, buscou-se neste trabalho elucidar o efeito da sinvastatina sobre angiogênese tumoral, CTNs CD34+, além de investigar possíveis interrelações fisiopatológicas desses importantes elementos tumorais. Para tanto, utilizou-se um modelo consagrado de carcinogênese mamária (baseado na indução com 7,12-dimetilbenz(a)antraceno [DVIBA]) em ratas Sprague-Dawley, sendo a primeira vez em que o fenômeno de angiogênese é descrito neste modelo. Após a aplicação do protocolo experimental e a eutanásia dos animais controles e experimentais, suas linhas mamárias (contendo ou não tumores) foram avaliadas morfologicamente e do ponto de vista de imunoexpressão de CD34. Nos animais tratados com sinvastatina (na dose de 40mg/kg), houve uma maior representação tecidual relativa do subtipo histológico

"carcinoma ductal" quando comparado ao tecido tumoral virgem de tratamento, fato que sugere um efeito da sinvastatina sobre a plasticidade morfológica das neoplasias induzidas pelo DMBA. Também se observou redução significativa da densidade microvascular do tecido tumoral tratado em relação ao não tratado. Contudo, não foi observado efeito significante da sinvastatina sobre as CTNs CD34+, neste modelo, o que contraria resultados *in vitro* relatados na literatura, bem como resultados *in vivo* deste grupo de pesquisa. Em conclusão, neste modelo, o tratamento crônico (14 dias) com sinvastatina (na dose de 40mg/kg, ao dia - dose comparada à utilizada na terapêutica antidislipidêmica em seres humanos), apresenta efeito antiangiogênico e modulador da heterogeneidade morfológica em tumores mamários induzidos pelo DVIBA. (448 palavras)

Palavras-chave: angiogênese, célula-tronco neoplásica, sinvastatina, CD34, imuno-histoquímica.

Resumo

Breast cancer is the most common malignancy and the leading cause of death from cancer among females worldwide. Despite all the research and all the progress achieved so far, the morbidity and mortality due to this cancer remains high in patients at advanced stages. Recently, it was described a new model of carcinogenesis in which stem cells (SC) could be responsible for the origin, morphological heterogeneity and self-renewal of cancer. In support of this theory, it has been observed, in most solid tumors, the presence of cells showing phenotypic and biological characteristics of stem cells, which have thus been designated cancer stem cells (CSC). Being associated with the rapeutic resistance and tumor recurrence in the long run, CSCs constitute an important target in pharmacological and pathophysiological studies. In addition to CSCs, promising therapeutical targets also include tumor angiogenesis. Nevertheless, very few studies have focused on the interrelations of these two strategies. Statins are first-line antidyslipidemic drugs which have been shown to possess anti-neoplastic properties possibly related to anti-apoptotic and/or anti-angiogenic effects (although these putative mechanisms have not yet been entirely investigated). Based on preliminary results of Gauthaman et al. (in vitro data) and of our group (in vivo data), indicating that statins (specially the lipophilic ones) may have a specific inhibitory effect over mammary CSCs, we sought to elucidate the *in vivo* effect of simvastatin on tumor angiogenesis and CD34+ CSC, simultaneously; this was achieved using a well-recognized carcinogenesis model, where a single dose of 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) is used to induce of mammary tumors in Sprage-Dawley female rats. Of notice, this is the first time angiogenesis is quantitatively and morphologically assessed in this model. Our results show that

simvastatin significantly increases the relative participation of invasive ductal carcinoma as a subcomponent of the induced mixed tumors, suggesting that this drug may modulate the morphologic plasticity of DMBA-induced mammary neoplasms. It was also observed a significant reduction in the microvessel density (MVD) of treated tumor tissue, when compared to that of untreated specimens. No significant difference was seen in terms of CD34+CSC number, when comparing treated and untreated tissues, which is in clear contrast to *in vitro* results reported in the literature and to our own *in vivo* results (using other CSC markers). In conclusion, in the present protocol, simvastatin, at the dose of 40mg/kg daily for 14 days (which is comparable to the anti-dyslipidemic doses used in humans), has anti-angiogenic and morphologic effects on DMBA-induced mammary tumors, but no significant action on CD34+ CSCs. (413 words)

Keywords: angiogenesis, cancer stem cell, simvastatin, CD34, immunohistochemistry.

Abstract

1- Introdução

1.1 - Angiogênese

A angiogênese pode ser conceituada como a formação de novos vasos a partir de células endoteliais maduras oriundas de um leito vascular préexistente^[1,2,3,4], sendo o principal mecanismo de neoformação vascular durante a vida pós-natal^[5,6] e requer a ação coordenada de uma variedade de fatores de crescimento e moléculas de adesão celular em células endoteliais e murais^[7].

A angiogênese está implicada tanto em processos fisiológicos quanto em condições patológicas^[3,8]. Fisiologicamente, é descrita (1) em tecidos que sofrem renovação ou modificações cíclicas (e.g., endométrio, ovário e mama) e (2) em situações de inflamação e reparo tissular autolimitados (e.g., cicatrização). No padrão fisiológico, a angiogênese se caracteriza por um processo rigidamente regulado, de curta duração, homogêneo e hierárquico, com artérias musculares e elásticas, arteríolas, capilares, vênulas pós-capilares, pequenas e médias veias^[9,10]. No contexto patológico, ocorre em: inflamações crônicas (e.g., artrite reumatoide), doenças metabólicas (e.g., diabetes mellitus) e processos neoplásicos (benignos e malignos). Na forma patológica, os vasos neoformados são ramificados e de distribuição irregular, com formação de "shunts" arteriovenosos, sem padrão hierárquico. Além disso, seu funcionamento é anômalo, já que possuem fenestrações irregulares e maior permeabilidade às proteínas e plasma^[10,11]. Três condições principais geralmente levam à angiogênese patológica: tumor, inflamação e hipóxia. Essas condições estimulam a expressão de genes angiogênicos, sendo o mais importante o fator induzível por

hipóxia (HIF)-1α, que regula um estimulante angiogênico conhecido como fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)^[12].

Do ponto de vista teleológico, qualquer que seja o contexto biológico considerado, a angiogênese parece atuar favorecendo a perfusão sanguínea do tecido em questão^[13], o que resulta, de um lado, em um melhor aporte de oxigênio, nutrientes, hormônios, fatores de crescimento e células inflamatórias/ do sistema imunitário, e, de outro, em uma dissipação mais eficiente de produtos finais (geralmente tóxicos) do metabolismo celular (e.g., CO₂, ácido lático, etc.). Este papel, conhecido como "efeito perfusional", está intimamente ligado aos processos de proliferação e crescimento dos tecidos orgânicos normais e neoplásicos^[5]. Até certo tamanho, os tecidos conseguem realizar estas trocas através de difusão passiva direta. A partir de certas dimensões (1-2mm³), o crescimento do tecido fica condicionado a um sistema de perfusão sanguínea promovido por vasos neoformados^[14,15]. A ideia de que a angiogênese seria fundamental para o crescimento neoplásico é sustentada por duas linhas de pesquisa: uma é baseada na administração de substâncias angioinibitórias (e não citostáticas para células tumorais), como os análogos da Fumagillina (e.g., TNP 470), que inibem o crescimento de tumores experimentais; a outra se baseia na inibição do crescimento tumoral in vivo, mas não in vitro (onde não há vasos), mediante o bloqueio imunofarmacológico de agentes pró-angiogênicos, como o VEGF e bFGF^[7,16]. Além do efeito "perfusional", as células endoteliais dos vasos neoformados liberam para as células tumorais importantes citocinas (e.g., IL-6 e GCSF) e fatores de crescimento que atuam paracrinamente, estimulando a proliferação celular^[8,17,18]. Algumas destas substâncias também atuam de forma autócrina sobre as próprias células endoteliais, retroalimentando a angiogênese.

Postula-se que, quanto maior a proliferação de um tecido neoplásico, maior seriam as suas necessidades metabólicas e, consequentemente, mais expressivo deveria ser o grau de neoangiogênese^[5,19]. Sendo os tumores malignos geralmente de crescimento mais rápido que os benignos, poder-se-ia prever uma maior vascularização naqueles do que nestes. Pela mesma analogia, entre as malignidades, pode-se supor que os tumores mais agressivos (crescimento mais acelerado e ou potencialmente metastatizantes) também apresentariam índices de angiogênese maiores. Ainda em relação às neoplasias malignas, um aumento na vascularização poderia, em tese, favorecer a disseminação sistêmica, aumentando as chances de uma célula cancerosa ganhar a circulação^[5,20].

Em conjunto, estas três suposições, se confirmadas, teriam grande impacto diagnóstico (no diferencial entre entidades morfologicamente semelhantes), prognóstico (suplantando ou complementando outros fatores estabelecidos) e terapêutico (principalmente, na indicação de estratégias de tratamento baseadas em agentes antiangiogênicos). Embora tenham sido testadas exaustivamente em inúmeros tumores, nas últimas décadas, estas hipóteses foram apenas parcialmente confirmadas^[21]. Além disso, apesar do número crescente de fármacos antiangiogênicos em teste ou em implantação (e.g., Bevacizumab, Sorafenib, Sunitinib, Aflibercept, Talidomida, etc) no tratamento de malignidades (e.g., mama, mieloma múltiplo, câncer de próstata, etc.), importantes lacunas no conhecimento acerca da fisiopatologia, biologia

molecular e farmacologia da angiogênese tumoral ainda impedem seu aproveitamento clínico pleno como alvo de estratégias terapêuticas.

Um passo importante no preenchimento dessas lacunas seria a caracterização do fenômeno de angiogênese em modelos experimentais bem estabelecidos de carcinogênese quimicamente induzida, como o baseado na administração de 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) em ratas Sprague-Dawley. Embora seja um modelo muito citado na literatura, especialmente pela elevada taxa de sucesso e especificidade para indução de câncer mamário, o protocolo de carcinogênese induzida por DMBA foi muito pouco explorado como modelo para estudo da angiogênese^[22].

Diferentes métodos de mensuração podem ser utilizados na avaliação da angiogênese tumoral. Do ponto de vista histomorfológico, a angiogênese neoplásica pode ser estudada por meio de duas abordagens principais: (1) através da análise de aspectos quantitativos (morfométricos) dos vasos neoformados e (2) através do estudo de substâncias pró e antiangiogênicas, em nível gênico ou, mais comumente, de expressão proteica. Do ponto de vista quantitativo, a primeira abordagem - considerada a forma mais direta de se avaliar o grau de vascularização de um tumor – é representada na vasta maioria dos estudos através da variável "densidade microvascular" (*microvessel density* ou MVD, em inglês)^[16, 19,21,23,24,25,26,27].

A MVD é o método de quantificação de angiogênese mais utilizado na literatura^[21,23,25,26]. Pode ser definida como um valor médio de contagem de vasos, obtido através de uma metodologia historicamente pouco consensual, isto é,

variável de estudo para estudo. Na maioria dos estudos, são contadas estruturas microvasculares intratumorais em áreas de maior concentração vascular ("hotspots"), fora de áreas escleróticas ou de necrose^[21,23,25,26]. Define-se como "microvaso", qualquer estrutura vascular, representada em secção transversal, longitudinal ou tangencial, que se apresente nitidamente separada de outras estruturas semelhantes^[21,23,25,26]. De acordo com esta norma, dois ou mais microvasos adjacentes (e não contíguos no corte histológico analisado) devem ser contabilizados como estruturas separadas, mesmo que na realidade correspondam a segmentos de único vaso tortuoso que "corta" o plano de secção histológica mais de uma vez. Além disso, para ser considerada como um microvaso, a estrutura em questão não pode apresentar parede muscular^[26]. Não é necessário apresentar lúmen no corte histológico avaliado. Contudo, estando presente, não há critérios bem estabelecidos que definam seu diâmetro máximo. Alguns estudos propõem um diâmetro máximo de 350µm (ou o equivalente a cerca 50 hemácias enfileiradas), outros simplesmente não definem qualquer limite ^[26,28]. Outro ponto de controvérsia diz respeito ao número de campos analisados e ao diâmetro de campo/objetiva utilizados para tanto. Na literatura, o número de áreas analisadas varia de 2 a 5, enquanto o diâmetro de campo varia de 0,3mm² a 1.452mm²^[21,23,25,26].

A principal aplicação prática da MVD tem sido sua utilização como fator preditivo de crescimento tumoral agressivo, potencial metastático e, consequentemente, de sobrevida^[13]. Weidner e seus colaboradores^[20] demonstraram que a MVD em mulheres com carcinoma ductal invasor da mama é

um fator preditivo independente para comportamento agressivo. Estes autores encontraram um aumento no risco de metástase de 1,17x para cada aumento de 10 vasos no MVD. A maioria dos estudos subsequentes mostrou uma correlação entre MVD e vários parâmetros prognósticos^[26,29], sendo a MVD um preditor significante para recidiva local, sobrevida geral e livre de doença, em pacientes com câncer de mama sem metástases linfonodais^[16].

Inicialmente, as estruturas microvasculares resultantes do fenômeno de necangiogênese eram identificadas utilizando-se colorações histológicas de rotina. (e.g., hematoxilina-eosina) e critérios morfológicos simples (e.g., presença de lúmen e hemácias em seu interior). Desde o princípio, os pesquisadores puderam constatar que tais protocolos eram pouco acurados e fidedignos, devido às limitações técnicas e ao elevado grau de subjetividade inerentes aos método. Com o advento da imuno-histoquímica, vários marcadores foram utilizados com sucesso para revelar de forma objetiva e fidedigna os microvasos relacionados à angiogênese tumoral^[21,23,25,26]. Dentre os marcadores mais comumente empregados/relatados, destacam-se: o antígeno relacionado ao fator VIII (fator de Von Willebrand), o CD34 e a molécula CD31/PECAM-1. Estes marcadores são chamados em conjunto de "panendoteliais"^[21], pois não permitem a distinção entre vasos sanguíneos e linfáticos, ou entre vasos recentes e antigos. Dentre os marcadores panendoteliais, destaca-se o CD34, pela frequência com que foi empregado na literatura.

O CD34 é uma glicofosfoproteína de superfície expressa em célulastronco linfohematopoiéticas, células endoteliais vasculares, fibroblastos
embrionários e células dendríticas *fibroblast-like* em tecidos conjuntivos^[30,31,32]. Recentemente, dois consensos internacionais sobre metodologia em avaliação de angiogênese, expressando a opinião de pesquisadores renomados nesta área, recomendaram a utilização do CD34^[23,33]. Além de gozar da preferência dos especialistas na área de angiogênese, do ponto de vista objetivo, o CD34 é comprovadamente o marcador mais sensível e tecnicamente reprodutível, dentre os panendoteliais ^[23,33].

1.2- Células-tronco neoplásicas e câncer de mama

As células-tronco (CTs) podem ser definidas através de duas propriedades principais: (1) a capacidade de autorrenovação e (2) a de originar diferentes linhagens celulares^[34]. As CTs podem se dividir de forma simétrica ou assimétrica, originando duas novas células tronco filhas, ou uma nova célula idêntica a si e uma célula progenitora, comprometida em originar uma linhagem de células mais maduras (mais diferenciadas) e comprometidas com um fenótipo funcional específico ^[35,36,37]. A autorrenovação celular das CTs é controlada por diversos genes como o Bmi-1, o Notch, o Wht e aqueles associados à citocinas como o TGF- $\beta^{[35,36]}$. Em conjunto, essas características (autorrenovação e capacidade de originar multilinhagens) conferem às CTs um papel fundamental tanto em processos fisiológicos (formação de órgãos durante a embriogênese, renovação natural de epitélios, reparação/cicatrização de tecidos lesados, etc), como em processos patológicos – em particular, na gênese e manutenção de neoplasias malignas^[34,36].

As células-tronco são classificadas segundo o período de desenvolvimento do organismo e o tecido de origem em: células-tronco embrionárias, de cordão umbilical e adultas (sendo a capacidade de originar múltiplas linhagens decrescente nesta ordem). As células-tronco adultas compõem pequena percentagem das células encontradas em sistemas orgânicos maduros, onde dão origem a tipos celulares específicos. Em geral, tais células são de vida longa, comportamento quiescente/latente (baixo índice proliferativo) e geram, através de mitoses assimétricas, não só novas células-tronco, mas também uma progênie comprometida, que populam e/ou renovam o órgão considerado^[38]. No caso do tecido mamário, essa progênie comprometida (originada a partir de CT adultas) inclui todos os tipos celulares que compõem o seu tecido funcional ou parênquima^[36].

O parênquima das glândulas mamárias é organizado do ponto de vista macro- e microanatômico em uma estrutura ramificante comparável a uma "árvore composta de galhos ocos"^[39]. Histologicamente, suas unidades morfofuncionais básicas, chamadas de unidades ducto-lobulares terminais (UDTLs), possuem (1) uma camada interna de células epiteliais que delimitam um lúmen (onde a secreção láctea é lançada e conduzida até o meio externo) e (2) uma camada externa de células mioepiteliais que secretam a lâmina basal (separando o parênquima mamário do estroma fibroadiposo) e possuem atividade contrátil (necessária para a progressão da secreção láctea ao longo do sistema ductal)^[39]. As glândulas mamárias possuem a capacidade de se remodelarem através dos ciclos de gravidez, lactação e involução durante o período de vida feminino, sendo

esta habilidade atualmente atribuída às células-tronco (CT) residentes na mesma. Acredita-se que essas células sejam capazes de realizar três funções fundamentais: dar origem a tecidos da glândula mamária adulta durante o desenvolvimento intra e extrauterino; permitir grande expansão e remodelamento tissular durante múltiplos ciclos de gravidez, lactação e involução; e, com menor frequência, servir como reserva para reparo em eventual dano tissular^[38]. As CTs adultas da mama podem realizar tais funções, uma vez que podem originar por mitoses assimétricas os principais tipos celulares mencionados acima: as células epiteliais e mioepiteliais. Vale mencionar que as CTs da mama se assemelham muito às células micepiteliais das UDLTs, tanto do ponto de vista morfológico (aspecto indiferenciado) quanto imunofenotípico (expressão de p63, e.g.). Essa constatação resultou na criação do termo "célula basal" que reúne tanto as CTs adultas da mama, como as células micepiteliais de aspecto indiferenciado. Embora seja muito empregado na literatura, especialmente em discussões diagnósticas (onde a presença de uma camada contínua de células basais é importante para definir malignidade), este termo deve ser evitado à luz dos conhecimentos atuais, devido à sua imprecisão.

Na última década, o conceito de CT mamária tem sofrido uma expansão considerável: além dos vários papéis fisiológicos discutidos acima, têm sido postuladas funções específicas e importantes em contexto patológico – especialmente na origem e desenvolvimento das neoplasias malignas. As mutações que iniciam um carcinoma mamário parecem se acumular em células

que persistem durante a vida de uma mulher, visto que há um aumento exponencial na incidência de câncer de mama com a idade.

A evolução de uma célula normal em uma totalmente transformada requer a desregulação de múltiplos processos celulares e, de acordo com os modelos clássicos de carcinogênese, esses eventos podem ocorrer em qualquer célula. Mais recentemente, contudo, devido a essa característica cumulativa e tardia do desenvolvimento neoplásico, tem-se especulado que a célula alvo de modificações genéticas cumulativas seria na prática uma célula quiescente, com potencial multilinhagem – propriedades tipicamente observadas em células-tronco e em células progenitoras imaturas. Esse raciocínio levou ao desenvolvimento da chamada hipótese de carcinogênese das células-tronco neoplásicas (CTN) segundo a qual os alvos preferenciais para transformação oncogênicas seriam células-tronco adultas ou células progenitoras primordiais com potencial de autorrenovação preservado^[36,38,40]. Cumpre ressaltar que essa hipótese configura um novo paradigma de carcinogênese que vem ganhando credibilidade na última década por meio de evidências científicas cumulativas, e que se contrapõe ao modelo clássico de carcinogênese no qual as neoplasias se originariam a partir de mutações sucessivas em qualquer célula de um tecido (independente do seu status de maturação/diferenciação)^[41].

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/funcionais de célula-tronco, que em geral correspondem

a menos de 1% da neoplasia^[34]. Essas células são designadas como "célulastronco tumorais, cancerosas ou neoplásicas (CTNs)". Com frequência, especulase que as CTNs poderiam ser responsáveis pela heterogeneidade morfológica e molecular de algumas neoplasias (como os carcinomas mamários e ovarianos). Além disso, as CTNs têm sido associadas em inúmeros estudos à capacidade de algumas malignidades de resistir às principais modalidades terapêuticas antineoplásicas – especialmente, à quimioterapia e à radioterapia^[37]. Essas modalidades parecem atuar de forma eficaz apenas sobre as células diferenciadas da neoplasia (especialmente as de maior índice proliferativo), reduzindo significantemente essa subpopulação e deixando para trás as CTNs; 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 CTNs poderiam estar implicadas diretamente em recidivas em longo prazo (mais de 5 anos pós-remissão), observadas em algumas neoplasias como o câncer mamário^[37].

Os fatores que tornam as CTNs mais resistentes à terapêutica antineoplásica não estão totalmente elucidados, mas parecem estar relacionados ao fato das CTNs (1) estarem na maior parte do tempo em estado quiescente (sendo que a maioria das estratégias terapêuticas são mais efetivas em células em ciclo) e (2) expressarem moléculas transportadoras de xenobióticos (transportadores de efluxo), que impedem o acúmulo citosólico de fármacos antineoplásicos^[34]. Dentre esses transportadores de efluxo, que constituem o substrato molecular para o fenômeno de resistência a múltiplas drogas, destacam-

se a glicoproteína P (Pgp) - produto do gene MDR1 ("*multidrug resistance gene*1" ou ABCG1) -, bem como a proteína codificada pelo gene ABCG2 (*ATP-binding cassette sub-family G member 2*). A proliferação lenta das CTNs também explicaria porque as recidivas de alguns tumores (como os carcinomas mamários, os osteossarcomas e os sinoviossarcomas) podem demorar mais de 10 anos para tornarem-se detectáveis pelos métodos imagenológicos e laboratoriais disponíveis^[42].

Na última década, evidências científicas cumulativas tem demonstrado que a proporção de CTNs 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^[37]. 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 antineoplásicos. Grande parte da literatura neste tema desenvolveu-se há menos de 10 anos, inicialmente envolvendo neoplasias hematológicas (leucemias) e, posteriormente, neoplasias sólidas, com destaque para a pesquisa relacionada ao câncer de mama^[43].

O grande interesse no estudo do câncer mamário se deve, pelo menos em parte, ao fato desta neoplasia representar a forma mais prevalente de neoplasia maligna e a principal causa de óbito, dentre as malignidades do sexo feminino, no mundo todo^[34,44]. Estima-se em mais de 1,2 milhões de novos casos por ano, no mundo^[45]. No câncer de mama, a presença de CTNs 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, a imunofenotipagem por citometria de fluxo e por imuno-histoquímica^[46]. A escolha do melhor método de identificação de CTN é controversa^[38,47].

Do ponto de vista imunofenotípico, CTs e CTNs caracterizam-se por um padrão ou perfil de expressão de moléculas, as quais são representadas principalmente por proteínas e glicoproteínas, encontradas na superfície, no citoplasma ou no núcleo dessas células. Esse perfil ou assinatura molecular é definido tanto pela expressão típica de algumas moléculas (e.g., CD34, CD133, Ckit/CD157, p63, ESA, Oct-4, Sca-1 etc) quanto pela ausência característica de outras moléculas (i.e., CD24). O perfil imunofenotípico característico de uma CTN pode variar: (1) de neoplasia para neoplasia, em função da histogênese ou do subtipo histológico das mesmas; (2) entre espécies animais/modelos experimentais diferentes; (3) de acordo com a técnica de imunofenotipagem utilizada (citometria de fluxo vs. imuno-histoquímica, i.e.); (4) segundo a abordagem experimental (in vitro vs. in vivo); e (3) dentro de um mesmo tumor, sugerindo a coexistência de clones distintos e/ou de subclasses funcionais diferentes de CTNs^[34]. Além disso, nem sempre o perfil imunofenotípico de determinada CTN coincide perfeitamente com o perfil da CT normal correspondente, o que indica que algumas destas moléculas possam ter um papel importante para a manutenção do próprio fenótipo neoplásico ou maligno^[34].

Grande parte desta variabilidade imunofenotípica parece estar relacionada ao fato destes marcadores serem moléculas envolvidas na interação da CT (normal ou neoplásica) com o seu nicho, sendo essa interação dinâmica. Assim, variando-se o microambiente celular ou o momento da dinâmica de interação, diferentes padrões imunofenotípicos podem ser encontrados (sem mencionar as diferencas técnicas inerentes a cada método de imunofenotipagem. as quais podem favorecer a preservação e a detecção de alguns marcadores em detrimento de outros). É importante ressaltar que, independente dessa imunofenotípica (parcialmente variabilidade decorrente de questões metodológicas), a existência de perfis imunofenotípicos específicos para CTs e CTNs permite a detecção dessas células em diferentes contextos experimentais, o que por sua vez favorece e agiliza enormemente a realização de estudos sobre essas células, voltados para o entendimento de aspectos fisiopatológicos e para o desenvolvimento de aplicações clínicas (i.e., testes diagnósticos, ferramentas de avaliação prognóstica/preditiva de resposta terapêutica e estratégias de tratamento, em particular, farmacológicas)^[43].

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^[46]. A detecção de CTNs mamárias envolve a pesquisa de moléculas tipicamente associadas ao fenótipo de células tronco/progenitora, através de técnicas imunológicas como

imuno-histoquímica e a citometria de fluxo. Esta abordagem baseia-se na premissa de que as CTNs devem conservar pelo menos parcialmente a expressão de antígenos característicos da célula de origem (seja uma CT ou progenitora primitivas normais) – um conceito amplamente demonstrado em estudos recentes^[48,49,50]. Dentre os marcadores mais utilizados na literatura, encontram-se: o ALDH1 (um marcador alternativo ao teste do *ALDEFLUOR*), CD133, ESA/EPCAM, CD34 e a combinação CD44/CD24 (sendo o perfil CD44+/CD24-indicativo de CTN)^[51,52,53,54].

Em favor dos métodos de detecção de CTNs baseados em imunofenotipagem, tem-se o fato de serem mais factíveis (menos complexos/laboriosos) 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 das CTN in situ ou "contextualizado", isto é, com correlação morfológica, arquitetural e topográfica (uma vez que as células são observadas em seu contexto histológico real). Dado que nenhum marcador é isolada e absolutamente específico para o fenótipo CTN, essa correlação citoarquitetural/topográfica poderia não só reduzir as chances de falsos positivos (reação cruzada com elementos tissulares normais difíceis de serem distinguidos à citometria de fluxo, por exemplo), como poderia fornecer insights a respeito do papel biológico específico das CTN em várias neoplasias. 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 especificamente sobre CTN, sem acarretar dano às CT normais^[37]. Em conjunto, as vantagens das técnicas de imunofenotipagem tem levado alguns autores a declarar que estas abordagens de detecção de CTNs deverão suplantar brevemente as demais, como padrão ouro^[55].

Finalmente, estudos recentes sugerem que os tumores malignos sejam compostos por uma hierarquia celular quiada por CTNs^[40]. Acredita-se que as interações entre as CTN e o estroma sejam componentes críticos para a história natural da neoplasia, especialmente no que diz respeito ao processo de metastatização - o evento que mais intimamente se associa à mortalidade por câncer. O processo de metastatização é um fenômeno complexo que depende direta ou indiretamente da aquisição de algumas habilidades por parte das células neoplásicas. Dentre essas habilidades, destacam-se: a capacidade de migração através do tecido conjuntivo, a capacidade de invasão vascular, de indução de angiogênese e de implantação em tecidos distantes da neoplasia primária. Na última década, inúmeros autores têm sugerido que as CTNs poderiam ter um papel modulador destas capacidades, ora produzindo diretamente os fatores de crescimento e as citocinas reguladoras desses processos (angiogênese, digestão enzimática de matriz extracelular, capacidade migratória, etc.), ora induzindo sua produção em células do estroma (macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, etc.)^[43].

1.3- Estatinas

Nos últimos anos, o desenvolvimento de agentes farmacológicos antineoplásicos tem sofrido uma importante mudança de paradigma. A antiga busca por quimioterápicos citotóxicos, que invariavelmente resultara em drogas de elevada toxicidade, tem dado lugar à busca por drogas de baixa toxicidade que possam ser utilizadas no controle do câncer por longos períodos, aumentando e melhorando a sobrevida do paciente, à semelhança do modelo de tratamento de outras doenças crônicas. Essa busca tem se iniciado principalmente pela reavaliação de fármacos de baixa toxicidade, já utilizados com sucesso em outras doenças (e.g., hipertensão arterial, diabetes mellitus, dislipidemias, etc.). Neste contexto, cumpre destacar o papel emergente das estatinas. As estatinas são inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-coA) redutase, sendo esta uma enzima crítica na via de biossíntese do colesterol^[56]. A HMG-coA redutase catalisa a formação ácido mevalônico - etapa limitante de velocidade na via de síntese do colesterol^[57]. Uma vez que as estatinas diminuem a biossíntese endógena do colesterol, estes fármacos são utilizados na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares associadas a dislipidemias^[56].

As estatinas podem ser dividas entre dois grupos: (1) as lipofílicas (sinvastatina, mevastatina, lovastatina, fluvastatina e atorvastatina) e (2) as hidrofílicas (rosuvastatina e pravastatina)^[57]. Estes grupos não apresentam diferenças significantes no que diz respeito ao efeito desejado – o antilipemiante. Contudo, apresentam diferenças farmacocinéticas que podem resultar em efeitos tóxicos distintos: enquanto as estatinas lipofílicas estão mais frequentemente

associadas à hepato e miotoxicidade, as hidrofílicas estão associadas a maior risco de nefrotoxicidade^[56,58].



Figura 1: Estruturas químicas dos inibidores da hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-CoA).[59]

Além do efeito antilipemiante, pelo qual são conhecidas, as estatinas parecem exercer efeitos outros farmacológicos independentes da síntese de mevalonato. Nos últimos trinta anos, foram relatados: efeitos imunomodulatórios, ações anti-inflamatórias, diminuição de radicais livres de oxigênio e efeitos antineoplásicos^[56,59,60,61]. Estudos epidemiológicos em indivíduos do sexo feminino

sugerem que o uso das estatinas pode reduzir o risco de incidência de câncer mais de 20%^[62,63,64]. Além disso, um número crescente de estudos experimentais tem demonstrado que as estatinas podem exercer efeito citotóxico (indução de morte celular), citostático (supressão de crescimento) e potencializador de outros agentes antitumorais (incluindo aumento de eficácia quimiopreventiva), quando utilizados como agente antineoplásico, no tratamento de neoplasias já estabelecidas (previamente induzidas)^[65,66]. Nesse sentido, as evidências mais fortes são representadas por: (1) estudos in vivo, utilizando camundongos com câncer mamário ErB2(+), nos quais o uso de sinvastatina e lovastatina resultou em diminuição significante do crescimento do tumor^[68]: (2) estudos demonstrando que a lovastatina, além de inibirem o crescimento tumoral em camundongos, reduz as chances de ocorrência de metástases^[71,72]: (3) trabalhos *in vitro*, onde a lovastatina aumentou a comunicação intercelular (fluxo de moléculas) através de junções do tipo gap, influenciando nos níveis intracelulares de cálcio e alterando vias de sinalização intracelular ligadas a crescimento e sobrevivência celular em células de adenocarcinomas mamários^[74]; e, finalmente, (3) estudos *in vivo*, onde os efeitos da lovastatina foram verificados e associados à indução de apoptose e parada do ciclo celular entre as fases G0 e G1^[75]. Em conjunto, esses dados apontam para o grande potencial desta classe de fármacos não só na prevenção, como no tratamento/controle de neoplasias malignas a longo prazo. Até o momento, pôde-se constatar que os tumores que mais respondem à ação antitumoral das estatinas são: os gliomas, as neoplasias malignas de pele, de cólon e de mama^[64].

Até o momento, o conhecimento a cerca dos mecanismos de ação antineoplásica destas drogas é bastante restrito. São propostas ações dependentes e independentes do ácido mevalônico. As dependentes do mevalonato incluem o bloqueio de processos que são regulados por esta molécula, tais como: biossíntese e prenilação de intermediários de isopronóides de proteína-G (RHO A, B, C e CEBPE/F), o que impediria a autorrenovação celular^[67,68]. Entre as ações que independem da síntese de mevalonato, destacase uma possível ação controladora dos níveis dos genes p21 e p27, o que também acarretaria diminuição da proliferação celular^[69]. A inibição da proliferação celular também poderia estar relacionada à prevenção da transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular, através da inibição de quinases que facilitariam a progressão celular ou através do aumento de reguladores que inibiriam o ciclo celular^[67]. As estatinas também parecem ser capazes de desencadear a apoptose através de fatores intrínsecos e extrínsecos, isto é, através do estímulo à síntese de proteína BAX (molécula pró-apoptótica), combinado à diminuição dos níveis de BCL2 (uma proteína antiapoptótica)^[56,70]. Finalmente, cita-se que as estatinas seriam capazes de inibir a apoptose por meio de alterações dos níveis do gene p53^[70].

Especificamente na carcinogênese mamária, há evidências de que diferentes estatinas podem suprimir o crescimento e ou induzir apoptose em linhagens celulares de adenocarcinoma mamário, sendo esse efeito associado à supressão da via MEK/Erk, à redução dramática nas atividades de ligação do NF-

κB e AP-1 DNA, bem como à elevação no nível das proteínas supressoras de tumor p21 de maneira dose-dependente^[66].

Em relação à angiogênese, o efeito parece ser complexo: em baixas concentrações, semelhantes às concentrações plasmáticas de pacientes em terapia a longo prazo, as estatinas podem induzir a angiogênese ao culminar na produção de óxido nítrico, enquanto que, em altas concentrações, as estatinas são antiangiogênicas através de mecanismos apoptóticos^[12,77].



Figura 2: Mecanismo da inibição de colesterol pelas estatinas e seus efeitos no sistema cardiovascular, na prevenção de câncer e nas células-tronco embrionárias humanas.[56]

Nos estudos que caracterizam os efeitos antineoplásicos das estatinas, não se relata o grau de susceptibilidade de subpopulações de CTNs à ação das estatinas, como possível mecanismo de ação antineoplásica. Apenas recentemente, Gauthaman *et al.*^[78] 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. Dados preliminares de nosso grupo (não publicados), demonstram pela primeira vez que a ação anti-CTN descrita por Gauthaman *et al.* também ocorre *in vivo*, embora pareça estar restrita a alguns tipos de estatinas e alguns subtipos de CTNs mamárias.

Levando em consideração que os efeitos moduladores de angiogênese das estatinas são potencialmente úteis para novas aplicações terapêuticas e que a ação direta na angiogênese tumoral e/ou nas CTN são estratégias promissoras para o tratamento do câncer de mama, o presente trabalho se faz importante para o estudo desses efeitos no desenvolvimento tumoral e as interrelações dessas duas estratégias em um modelo de carcinogênese mamária, visto a controvérsia dos resultados reportados sobre os efeitos das estatinas^[12,78] e a falta de dados específicos para a sinvastatina.

2- Justificativas

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

- Impacto epidemiológico do câncer de mama e falha terapêutica em estádios avançados, determinando a necessidade de estudos que permitam maior compreensão sobre esse câncer e o desenvolvimento novas estratégias terapêuticas.
- Oportunidade de avaliação de um paradigma de carcinogênese inovador, promissor e ainda pouco explorado – a célula tronco neoplásica (CTN).
- Ausência de estudos avaliando as interrelações fisiopatológicas entre CTN e angiogênese.
- Ausência de estudos avaliando a ação da sinvastatina (estatina mais prescrita e com quebra de patente recente) simultaneamente sobre angiogênese tumoral e um subtipo específico de CTN (a CTN CD34+).
- Oportunidade de avaliar angiogênese e CTNs utilizando um marcador imuno-histoquímico único: o CD34.
- Ausência de estudos caracterizando o fenômeno de angiogênese no modelo experimental de carcinogênese mamária induzida por DMBA (um dos modelos de carcinogênese mamária quimicamente induzida mais utilizados, de maior taxa de sucesso de indução e maior especificidade para neoplasias mamárias).
- Ausência de estudos caracterizando a presença de CTNs CD34+ no modelo experimental de carcinogênese mamária induzida por DMBA.

- Oportunidade de validação da técnica de imuno-histoquímica como métodos padrão para a detecção de CTNs mamárias e estudo simultâneo de angiogênese em modelos experimentais de carcinogênese mamária.
- Contribuição para a aplicabilidade clínica das estatinas no tratamento farmacológico do câncer de mama ao confrontar essas duas condições prevalentes (uso de estatinas e câncer de mama) frente aos resultados obtidos.
- Indicar o grande potencial para o tratamento do câncer por parte de um fármaco de uso habitual em dislipidemias, baixa toxicidade e baixo custo financeiro, o que resulta em maior acessibilidade da sociedade a um tratamento e aumento da perspectiva de vida.

3-Objetivos

Geral

Caracterizar o fenômeno de angiogênese neste modelo de carcinogênese mamária:

- Estabelecendo possíveis relações entre grau de vascularização e CTN CD34+;
- Avaliando os efeitos da sinvastatina sobre a angiogênese e as CTN CD34+.

Específicos

 Caracterizar quantitativamente o fenômeno de angiogênese em tecido mamário normal e neoplásico;

 Caracterizar quantitativamente as CTs CD34+ em tecido mamário normal e neoplásico;

 Descrever os efeitos da sinvastatina simultaneamente sobre a angiogênese e as CTs CD34+ em tecido mamário normal e neoplásico;

 Avaliar a existência de associações entre angiogênese, CTN e outras variáveis biológicas (tipo histológico, grau de diferenciação, necrose e índice mitótico).

4- Material e Métodos

4.1- Animais e indução tumoral

Quarenta e cinco (45) ratas fêmeas virgens Sprague-Dawley provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB-UNICAMP), pesando entre 200-300g foram adaptadas durante uma semana ao Biotério do Departamento de Farmacologia-Unicamp e submetidas ao protocolo de tratamento, iniciado antes de completarem 45 dias de vida. As ratas foram mantidas em gaiolas plásticas (cinco animais/gaiola) alimentadas com ração para roedores (Nuvital®) e água "ad libitum", sob temperatura controlada de 22±2°C e fotoperíodo de 12 horas (fotofase-escotofase). Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos como mostra a Figura 3.



Figura 3: Protocolo experimental.

Nos grupos experimentais, o carcinoma mamário foi induzido através de uma única dose de 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA), na concentração de 100 mg/Kg de animal, diluída em 1 mL de óleo de soja e administrada intragastricamente por gavagem (adaptado de Barros *et al.*^[79]), enquanto que os grupos controle não foram induzidos quimicamente com o DMBA. Os protocolos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UNICAMP, protocolo nº 2335-1) e realizadas seguindo as recomendações éticas gerais da Sociedade Brasileira para Ciência de Animais de Laboratório – SBCAL (antigo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal - COBEA).

4.2- Protocolo de tratamento

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (como mostrado na Figura 3), sendo, então submetidos aos seguintes protocolos experimentais:

- a. Grupo Controle 1 (GC1; n= 6) animais não induzidos e tratados com
 1 mL de óleo de soja ao dia, administrado por gavagem (i.g.) durante
 14 dias;
- b. Grupo Controle 2 (GC2; n= 15) animais não induzidos e tratados com sinvastatina (40 mg/kg/dia) diluída em 1 mL de óleo de soja ao dia, administrado por gavagem (i.g.) durante 14 dias;
- c. Grupo Experimental 1 (GE1; n= 12) animais induzidos e tratados com 1 mL de óleo de soja ao dia, administrado por gavagem (i.g.)

durante 14 dias, após desenvolvimento de tumor com medidas de 1 cm em cada um de seus três maiores diâmetros perpendiculares;

d. Grupo Experimental 2 (GE2; n= 12) – animais induzidos e tratados com Sinvastatina (40 mg/kg/dia) diluída em 1 mL de óleo de soja ao dia, administrado por gavagem (i.g.) durante 14 dias, após desenvolvimento de tumor com medidas de 1 cm em cada um de seus três maiores diâmetros perpendiculares.

Durante todo o protocolo, os animais foram acompanhados diariamente, com avaliação de peso, bem como exame clínico geral, visando à identificação de síndromes decorrentes do desenvolvimento da neoplasia. Durante as avaliações clínicas, o maior tumor de cada animal foi mensurado em seus maiores diâmetros perpendiculares com paquímetro digital, sendo o volume determinado segundo à fórmula:



$$V = \frac{Comprimento. Largura. Altura. \pi}{6}$$

Figura 4: Medição de tumor mamário após exérese.

4.3- Coleta e exame macroscópico

Após o fim do protocolo experimental, as ratas foram submetidas à eutanásia por aprofundamento anestésico com isoflurano. Foram retiradas e examinadas macroscopicamente ambas as linhas mamárias das ratas dos grupos controle e, nos grupos experimentais, as linhas mamárias contendo os tumores induzidos. Após exérese, os tumores foram mensurados nos três maiores diâmetros perpendiculares (para cálculo do volume final, conforme descrito acima) e avaliados quanto às características macroscópicas (aspecto geral/coloração da superfície externa, consistência e aspecto geral/coloração da superfície de corte). Nesta etapa foi definida uma variável anatomopatológica significante neste trabalho: o volume do maior tumor. Todos os animais foram submetidos à necropsia para avaliação de doença metastática e outras comorbidades (incluindo efeitos tóxicos decorrentes dos tratamentos). O protocolo de necropsia incluiu avaliação macro e microscópicos de todos os órgãos, com maior atenção para: cérebro, fígado, pulmão, coração, rim, medula óssea e musculatura esquelética.

4.4- Processamento histológico

Secções de, no máximo, 3 mm de espessura obtidas de cada tumoração encontrada, foram fixados por imersão em formalina 10% tamponada, durante 24h, e, em seguida, transferidas para um solução de etanol 70%, onde permaneceram até o momento do processamento histológico. As amostras foram então processadas para a inclusão em parafina em processador automático de tecidos (histotécnico), de acordo com protocolo de rotina do laboratório (desidratação em bateria de etanol em concentrações crescentes, diafanização em xilol e embebição em parafina). Ao fim do processamento, os fragmentos foram incluídos em bloco de parafina. De cada bloco de parafina, foi obtido inicialmente uma secção de 4-5 µm de espessura, para confecção de lâmina histológica. Estas lâminas foram coradas em hematoxilina-eosina (HE) para seleção do melhor bloco, do ponto de vista de qualidade de fixação/processamento histológico e representação de tecido neoplásico viável. No presente trabalho, foram encaminhados para avaliação imuno-histoquímica (imunocoloração para CD34) apenas um bloco por animal, sendo este representativo da "melhor" secção do tumor de maior volume (i.e., secção com maior representação de tumor viável e melhor preservação após processamento técnico).

4.5- Avaliação morfológica

Além de servir à seleção do bloco a ser encaminhado à avaliação imuno-histoquímica, a lâmina corada em HE mencionada acima também foi utilizada para a avaliação morfológica do maior tumor em cada animal. Nesta avaliação, foram utilizadas as seguintes variáveis:

 Tipo histológico predominante: variável categórica que informa o principal subtipo histológico que compõe a neoplasia (lembrando que a maioria das neoplasias induzidas pelo DMBA são mistas, ou seja, constituídas por mais de um tipo histológico). A classificação do componente histológico predominante levou em consideração os critérios estabelecidos pela OMS (2003) para neoplasias humanas, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1: Classificação histológica de neoplasias mamárias humanas estabelecida pela OMS.

WHO histological classification of tumours of the breast

Epithelial tumours		Adenomas	
Invasive ductal carcinoma, not otherwise specified	8500/3	Tubular adenoma	8211/0
Mixed type carcinoma		Lactating adenoma	8204/0
Pleomorphic carcinoma	8022/3	Apocrine adenoma	8401/0
Carcinoma with osteoclastic giant cells	8035/3	Pleomorphic adenoma	8940/0
Carcinoma with choriocarcinomatous features		Ductal adenoma	8503/0
Carcinoma with melanotic features			
Invasive lobular carcinoma	8520/3	Myoepithelial lesions	
Tubular carcinoma	8211/3	Myoepitheliosis	
Invasive cribriform carcinoma	8201/3	Adenomyoepithelial adenosis	
Medullary carcinoma	8510/3	Adenomyoepithelioma	8983/0
Mucinous carcinoma and other tumours with abundant mucin		Malignant myoepithelioma	8982/3
Mucinous carcinoma	8480/3		
Cystadenocarcinoma and columnar cell mucinous carcinoma	8480/3	Mesenchymal tumours	
Signet ring cell carcinoma	8490/3	Haemangioma	9120/0
Neuroendocrine tumours		Angiomatosis	
Solid neuroendocrine carcinoma		Haemangiopericytoma	9150/1
Atypical carcinoid tumour	8249/3	Pseudoangiomatous stromal hyperplasia	
Small cell / oat cell carcinoma	8041/3	Myofibroblastoma	8825/0
Large cell neuroendocrine carcinoma	8013/3	Fibromatosis (aggressive)	8821/1
Invasive papillary carcinoma	8503/3	Inflammatory myofibroblastic tumour	8825/1
Invasive micropapillary carcinoma	8507/3	Lipoma	8850/0
Apocrine carcinoma	8401/3	Angiolipoma	8861/0
Metaplastic carcinomas	8575/3	Granular cell tumour	9580/0
Pure epithelial metaplastic carcinomas	8575/3	Neurofibroma	9540/0
Squamous cell carcinoma	8070/3	Schwannoma	9560/0
Adenocarcinoma with spindle cell metaplasia	8572/3	Angiosarcoma	9120/3
Adenosquamous carcinoma	8560/3	Liposarcoma	8850/3
Mucoepidermoid carcinoma	8430/3	Rhabdomyosarcoma	8900/3
Mixed epithelial/mesenchymal metaplastic carcinomas	8575/3	Osteosarcoma	9180/3
Lipid-rich carcinoma	8314/3	Leiomyoma	8890/0
Secretory carcinoma	8502/3	Leiomyosarcoma	8890/3
Uncocytic carcinoma	8290/3		
Adenoid cystic carcinoma	8200/3	Fibroepithelial tumours	001010
Acinic cell carcinoma	8550/3	Fibroadenoma	9010/0
Giycogen-rich clear cell carcinoma	8315/3	Phyliodes tumour	9020/1
Sebaceous carcinoma	8410/3	Benign	9020/0
Initialititatory carcinolita	0030/3	Dordernine	9020/1
Lobular neoplasia	0520/2	Ivialigname Deriduetal stremel escence leux arede	9020/3
Intraductal proliferative losione	0320/2	Mommony bemostore	9020/3
Ileual duetal bunaralasia		Wallind y Hallal Olla	
Elat enithelial atvoia		Tumours of the ninnle	
Atvoical ductal hyperplasia		Ninnle adenoma	8506/0
Ductal carcinoma in situ	8500/2	Syringomatous adenoma	8407/0
Microinvasive carcinoma	0000/2	Paget disease of the ninnle	8540/3
Intraductal nanillary neonlasms		r aget about of the hippin	0010/0
Central papilloma	8503/0	Malignant lymphoma	
Peripheral papilloma	8503/0	Diffuse large B-cell lymphoma	9680/3
Atypical papilloma		Burkitt lymphoma	9687/3
Intraductal papillary carcinoma	8503/2	Extranodal marginal-zone B-cell lymphoma of MALT type	9699/3
Intracystic papillary carcinoma	8504/2	Follicular lymphoma	9690/3
Benign epithelial proliferations			
Adenosis including variants		Metastatic tumours	
Sclerosing adenosis			
Apocrine adenosis		Tumours of the male breast	
Blunt duct adenosis		Gynaecomastia	
Microglandular adenosis		Carcinoma	
Adenomyoepithelial adenosis		Invasive	8500/3
Radial scar / complex sclerosing lesion		In situ	8500/2

¹ Morphology code of the International Classification of Diseases for Oncology (ICD-0) {921} and the Systematized Nomenclature of Medicine (http://snomed.org). Behaviour is coded /0 for benign tumours, /2 for in situ carcinomas and grade 3 intraepithelial neoplasia, /3 for malignant tumours, and /1 for borderline or uncertain behaviour.

- % do tipo histológico predominante: percentual médio do subtipo histológico predominante estimado após análise de toda a superfície do corte histológico. Para esta avaliação, observou-se toda a superfície do corte histológico em campo de médio aumento buscando identificar os tipos histológicos componentes do tumor e contabilizar o valor relativo de cada um em dado tumor, quando na existência de mais de um tipo histológico.
- Grau histológico (do componente de carcinoma ductal): para graduação histológica do componente de carcinoma ductal foi utilizado o sistema de Nottingham (segundo a padronização da OMS para neoplasias humanas [2003]). Neste sistema, são avaliados três aspectos da neoplasia: formação tubular (que recebe uma pontuação de 1 a 3), pleomorfismo nuclear (1-3 pontos) e índice mitótico (1-3 pontos). O somatório final das 3 pontuações resulta em um escore final (grau histológico final) que permite a classificação da neoplasia em: bem diferenciada (total= 3-5 pontos), moderadamente diferenciada (total= 6-7 pontos) e pouco diferenciada (total= 8-9 pontos). Este esquema é o mais adotado na literatura humana, sendo aqui utilizado pela primeira vez neste modelo de carcinogênese.
- Índice mitótico do componente ductal: esta variável foi definida como o número total de figuras de mitose em dez campos aleatórios de grande aumento (i.e., utilizando a objetiva de 40X de um microscópio Eclipse E200 [Nikon, Tokio, Japão]), o que equivale a uma área de 1,935 mm². Esta padronização também segue as recomendações da OMS (2003), mencionadas anteriormente.

 % de necrose do componente ductal: percentual médio de necrose morfológica estimado após análise de toda a superfície do corte histológico.

Todas as avaliações foram realizadas por dois observadores, simultaneamente (em coobservação), previamente treinados e cegos para o protocolo experimental em questão. Os resultados expressam o consenso obtido no momento da leitura das lâminas, entre esses observadores. Uma amostra aleatória de 10% dos casos foi reexaminada por patologista experiente em Patologia Mamária (AAS), sendo a concordância interobservadores (AAS vs. Consenso de dois observadores) analisada por meio da medida de Kaplan. Foi considerada como satisfatória uma concordância maior que 0.8 ("concordância quase perfeita").

4.6- Reação imuno-histoquímica

Secções de 4-5 μ m de espessura foram obtidas dos blocos selecionados para imuno-histoquímica e colocadas em lâminas previamente tratadas com substância adesiva - organosilano (lâminas "silanizadas"). Essas lâminas foram então desparafinizados em banhos de xilol, reidratadas em álcool etílico nas concentrações decrescentes de 100%, 80% e 50% e lavadas em água corrente e destilada. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada por meio de três banhos de H₂O₂ 10 volumes, com duração de cinco minutos, seguidos de lavagens em PBS. Para recuperação antigênica, foi utilizada uma panela a vapor T-fall. No interior dessa, as lâminas foram imersas em tampão citrato de sódio, em pH 6,0 durante 30 minutos a 95 $^{\circ}$ C e, a seguir, lavadas em água corrente.

A incubação com o anticorpo primário anti-CD34 (policional de cabra antihumano com reatividade contra tecidos murinos; Santa Ouz, EUA; cat # sc7045; 1:2000) se deu durante a noite (overnight), por 18 horas a 4 °C. Após a incubação, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS, sob agitação, secadas e incubadas com o sistema de revelação LSAB+ System – HRP (DakoCytomation, K0690, Carpinteria, CA, EUA) baseado em anticorpo secundário biotinilado marcado com peroxidase, com solução DAB (tetraidrocloreto de 3-3'-diaminobenzidina, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos da América) como substrato cromogênico.

Os cortes foram então contracorados com hematoxilina de Harris por um minuto, desidratados e montados em lamínulas e resina Entellan[®] (Merck, Dermstad, Alemanha). A observação dos tecidos foi realizada em microscópio óptico (Eclipse E200, Nikon, Tokio, Japão).

Para validação do método, utilizou-se como controles negativos secções seriadas de cada tumor, não incubadas com o anticorpo primário. Além disso, secções histológicas de carcinoma mamário humano contendo vasos sabidamente positivos para os marcadores vasculares acima mencionados foram utilizadas como controles positivos a cada bateria de coloração.

4.7 - Análise quantitativa da imunocoloração para CD34

A digitalização e a análise das lâminas foi realizada de modo automático em equipamento integrado, constituído por *scanner* de lâmina total (ScanScope XT, APERIO, EUA), servidor de 1Tbyte e programa de análise

imagens dedicado. Imagens estáticas TIFF, provenientes da lâmina virtual obtida com o procedimento de escaneamento, foram recuperadas através do software ImageScope (Aperio Technologies Inc., USA). Foram obtidas seis imagens de *hotspots* vasculares (áreas com maior concentração de microvasos) e seis imagens de *hotspots* de CTNCD34+, sempre em médio aumento (200X). Nas imagens de *hotspots* vasculares foram determinadas as seguintes variáveis:

- Densidade de microvasos (MVD): número médio de estruturas vasculares discretas (média de 6 campos de médio aumento).
- Área luminal vascular total (ALVT): médias dos somatório das áreas luminais vasculares em cada imagem (média de seis campos de médio aumento).
- Índice de contorno vascular (ICV): grau de irregularidade dos microvasos determinada através da fórmula perímetro/várea da estrutura vascular (média de dez estruturas vasculares aleatórias).

Nas imagens de hotspots de CTNCD34+ foi determinada a seguinte variável:

 Frequência de CTNCD34+ (FCTN): número médio de CTNCD34+ em seis campos de médio aumento.

4.8 - Análise estatística

Para comparações entre grupos, em se tratando de variáveis categóricas, foi utilizado o teste de Qui-quadrado.

Para comparações entre grupos, envolvendo variáveis quantitativas contínuas, foi utilizado o teste T de Student (2 grupos) ou ANOVA seguida do teste posthoc de Tukey (>2 grupos).

Para estabelecer o grau de correlação entre variáveis de angiogênese, CTNCD34+ e anatomopatológicas em geral, foram utilizados gráficos de dispersão com curva ajustada e regressão linear com o cálculo do r de Pearson.

Um valor de P inferior a 0,05 foi considerado como estatisticamente significativo. Todas as análises foram realizadas no software GraphPad Prism 5.0 para Windows.

5- RESULTADOS

5.1- Caracterização da amostra

A Tabela 2 indica a caracterização da amostra dos dois grupos experimentais para o tempo para desenvolvimento, massa e volume tumoral. Os dados são apresentados através das médias dos grupos e valores mínimos e máximos obtidos para cada critério.

Caracterização da Amostra													
	Desenvolvimento tumoral												
	Tempo (dias)			Volume maior tumor (cm ³)			Massa (g)						
Grupo	Mín	Média	Máx	Mín	Média	Máx	Mín	Média	Máx				
GE 1 (n = 12)	30	53	80	0,09	2,67	6,87	0,14	3,69	9,51				
GE 2 (n = 12)	30	56	77	0,04	0,82	2,44	0,09	2,19	5,35				

Tabela 2: Caracterização da amostra nos respectivos grupos experimentais.

5.2- Caracterização histopatológica geral no presente protocolo

Composição histológicas das neoplasias

A maioria das neoplasias induzidas pelo DMBA era constituída por tumores sólidos mistos (i.e., tumores constituídos por mais de um componente ou subtipo histológico). A Figura 5 apresenta os principais tipos histológicos encontrados em cada tumor e sua participação relativa (em termos percentuais médios) na composição do tumor. Através dessa figura, pode-se observar que o tipo histológico predominante nos tumores de ambos os grupos experimentais é o tipo histológico "carcinoma ductal invasivo". Vale constatar, contudo que a participação (representatividade) relativa deste subtipo histológico é maior nos tumores tratados com sinvastatina.

Depois dos subtipo "carcinoma ductal", os tipos histológicos mais prevalentes nesta amostra de tumores foram: os carcinomas papilíferos e os tumores filoides histologicamente malignos. Não foram observados focos intra ou peritumorais de Carcinoma *in situ*. Também não foram encontrados tumores mamários benignos isolados ou concomitantes às neoplasias malignas. Finalmente, no exame necroscópico, não foram evidenciados sinais de doença metastática (nodal ou sistêmica) ou sinais de neoplasias de outras linhagens celulares concomitantes (linfomas, sarcomas, etc.).

Grau histológico (aplicável apenas ao componente de carcinoma ductal invasivo)

A Tabela 3 mostra a distribuição das neoplasias induzidas com componente de carcinoma ductal invasivo, de acordo com o grau histológico final deste, determinado segundo o sistema de Nottingham (sistema de classificação recomendado pela Organização Mundial da Saúde). Pode-se observar que os tumores induzidos pelo DMBA (segundo o protocolo estabelecido neste estudo, ou seja, com padronização pelo volume do maior tumor e não pelo tempo de indução) são em sua maioria representados por tumores de baixo grau histológico (bem diferenciados). Nota-se também que, neste protocolo de indução, não foram observados casos pouco diferenciados. Finalmente, pode-se constatar a ausência de diferenças significantes entre grupos na distribuição dos casos quanto ao grau histológico.

Necrose

A percentagem média de necrose (tecido tumoral não viável) em ambos os grupos experimentais é apresentada na Figura 6. Como se pode constatar a partir desta Figura, o percentual de necrose é baixo (<15%) em ambos os grupos, não havendo ainda diferença significante entre os mesmos.

Índice mitótico

A Figura 7 mostra o índice mitótico dos tumores, expresso em número de figuras de mitose por 10 campos de grande aumento (400X). Como se pode observar, a semelhança do que ocorre na análise de necrose, o índice mitótico é baixo (comparável a um escore 1 do sistema Nottingham) em ambos os grupos experimentais, sem diferenças significantes entre eles.



Figura 5: Composição histológica percentual média dos tumores do Grupo Experimental 1 (tumor não tratado; n=12) e Grupo Experimental 2 (tumor tratado com sinvastatina; n=12) de ratas Sprague-Dawley fêmeas. Os resultados representam a média dos casos observados em cada grupo. P<0,0001 (%componente ductal: GE1 x GE2, Qui-quadrado).
Tabela 3: Frequência de casos em cada categoria de grau histológico final (grau de diferenciação). (P>0,05, Qui-quadrado).

Grau Histológico Final (Nottingham)			
	Grau Histológico Final		
Grupo	1	2	3
Grupo Experimental 1 (n=12)	10	2	0
Grupo Experimental 2 (n=12)	9	3	0



Figura 6: Percentual médio de área necrótica observada nos tumores do Grupo Experimental 1 (tumor não tratado; n=12) e Grupo Experimental 2 (tumor tratado com sinvastatina; n=12) de ratas Sprague-Dawley fêmeas. Os resultados representam a média das observações. Teste t não pareado. P=0,6656.



Figura 7: Número de mitoses em dez campos observados nos tumores do Grupo Experimental 1 (tumor não tratado; n=12) e Grupo Experimental 2 (tumor tratado com sinvastatina; n=12) de ratas Sprague-Dawley fêmeas. Os resultados representam a média ± DP das observações. Teste t não pareado. P=0,5646.

5.3- Caracterização da Angiogênese

Para a caracterização da vascularização normal da glândula mamária de ratas Sprague-Dawley e da angiogênese nos tumores induzidos, foram analisadas 2 variáveis quantitativas (densidade de microvasos [MVD] e área luminal vascular total [ALVT]) e uma variável qualitativa (o índice de contorno vascular [ICV]).

A Figura 8 apresenta a MVD dos grupos Controle 1 (animais normais não tratados) e Controle 2 (animais normais tratados com sinvastatina). A partir desta Figura, pode-se constatar que em tecido mamário murino normal, a vascularização se mantem ao redor de 3-4 vasos por campo de médio aumento. Não havendo diferença significativa entre esses dois grupos, os mesmos foram unidos em um único grupo Controle (para efeito de comparação com os grupos Experimentais 1 e 2, na sequência).

Na Figura 9, apresentamos os valores de MVD para o grupo Controle unificado e os grupos Experimentais 1 e 2. Neste gráfico, notam-se diferenças de vascularização significativas entre os 3 grupos analisados. Resumidamente, há um aumento de vascularização no grupo Experimental não tratado (GE1) em relação ao grupo Controle (P<0.01) e uma redução significante no Grupo Experimental tratado (GE2) em comparação ao GE1 (P<0.05).

A Figura 10 ilustra a marcação imunoistoquímica para o fenômeno da angiogênese, bem como a marcação das células-tronco CD34+.

Em relação à análise de área luminal vascular total (Figura 11 e 12), observamos, novamente, a ausência de diferença entre os dois grupos Controles (motivando sua unificação) e o mesmo aumento de vascularização no GE1 em relação ao grupo controle (*P*<0,05), conforme descrito na variável MVD. Desta vez, contudo, não são observadas diferenças significantes em termos de área vascular entre os grupos Experimentais 1 e 2.

A Figura 13 apresenta o Índice de Contorno Vascular (ICV), variável que descreve de maneira mais objetiva o grau de irregularidade das estruturas vasculares analisadas. Nesta Figura, observa-se um aumento significativo (*P*<0,05) no grau de irregularidade do vasos do Grupo Experimental 1, em relação ao do Grupo Controle (fruto da unificação dos grupos Controle 1 e 2, já justificada anteriormente). Deve-se notar também que o ICV do Grupo Experimental 2 apresenta valor intermediário em relação aos valores dos dois grupos supracitados; ou, referido de outra forma, não se constatam diferença significante entre GE2 e GC1, nem entre GE2 e GE1.



Figura 8: Número de estruturas vasculares no Grupo Controle 1 (tecido normal; n= 6) e Grupo Controle 2 (tecido normal tratado com sinvastatina; n=15) de ratas Sprague-Dawley fêmeas. Os resultados representam média ± DP das contagens. Teste t não pareado, P=0,3202.



Figura 9: Número de estruturas vasculares nos Grupos Controles (tecido normal tratado e não tratado com sinvastatina; n=21), Grupo Experimental 1 (tumor não tratado; n=12) e Grupo Experimental 2 (tumor tratado com sinvastatina; n=13) de ratas Sprague-Dawley fêmeas. Os resultados representam a média \pm DP das contagens. ANOVA + Tukey. *P<0,001 (GC x GE 1); #P<0,01 (GE 1 x GE 2).



Figura 10: Fotomicrografias illustrativas da expressão de CD34 em estruturas vasculares do grupo experimental 1 (A), grupo experimental 2 (B), grupo controle unificado (C) e células-tronco em tumor não tratado (D). Seta: célula-tronco neoplásica positiva.



Figura 11: Área luminal total, em micrômetros, no Grupo Controle 1 (tecido normal; n= 6) e Grupo Controle 2 (tecido normal tratado com sinvastatina; n=15) de ratas Sprague-Dawley fêmeas. Os resultados representam a média ± DP das medidas. Teste t não pareado. P=0,8356.



Figura 12: Área luminal total, em micrômetros quadrados, no Grupo Controle (tecido normal tratado e não tratado com sinvastatina; n= 21), Grupo Experimental 1 (tumor não tratado; n=12) e Grupo Experimental 2 (tumor tratado com sinvastatina; n=13) de ratas Sprague-Dawley fêmeas. Os resultados representam a média \pm DP das medições. ANOVA, Teste de Comparação Múltipla de Tukey. *P<0,01 (GC x GE 1), #P<0,05 (GC x GE 2).



Figura 13: Índice de Contorno Vascular (variável relacionada o grau de irregularidade dos vasos) do Grupo Controle (tecidos normais tratados e não tratados com sinvastatina; n= 21), Grupo Experimental 1 (tumor não tratado; n=12) e Grupo Experimental 2 (tumor tratado com sinvastatina; n=13) de ratas Sprague-Dawley fêmeas. Os resultados representam a média \pm DP das medições. ANOVA, Teste de Comparação Múltipla de Tukey. *P<0,05 (GC x GE 1).

5.4- Células-Tronco CD34+

Os resultados das contagens de células-tronco CD34+ dos grupos Controle 1 e Controle 2 estão representados na Figura 14. Da mesma forma como ocorrido com os resultados de MVD e área luminal vascular total, não houve diferença significativa entre esses dois grupos. Esta constatação motivou sua união (para efeito de comparação com os grupos Experimentais).

Na Figura 15, o número de células-tronco nos 3 grupos analisados pode ser apreciado, sendo constatado um aumento significativo (*P*<0,05) no número de células-tronco CD34+ nos tecidos tumorais de ambos os grupos Experimentais quando comparados ao grupo Controle. Não há contudo, diferenças significantes entre os grupos Experimentais 1 e 2.

5.5- Correlação entre Angiogênese e Células-tronco CD34+

A relação entre a frequência de microvasos (MVD) e a frequência média de células-tronco CD34+ está representada na Figura 16. Como se pode constatar, não houve correlação significante entre essas duas variáveis (r=0,1119). Com o intuito de aumentar o "N" da amostra (e também por que, em tese, a relação entre células tronco e vasos não deveria ser afetada significantemente pelo contexto biológico) todos os grupos foram analisados em conjunto nesta etapa do estudo.



Figura 14: Número de células-tronco CD34+ no Grupo Controle 1 (tecido normal; n=6) e Grupo Controle 2 (tecido normal tratado com sinvastatina; n=15) de ratas Sprague-Dawley fêmeas. Os resultados representam a média ± DP das medidas. Teste t não pareado. P=0,7073.



Figura 15: Número de células-tronco CD34+ nos Grupo Controle (tecidos normais; n=21), Grupo Experimental 1 (tumor não tratado; n=12) e Grupo Experimental 2 (tumor tratado com sinvastatina; n=13) de ratas Sprague-Dawley fêmeas. Os resultados representam a média \pm DP das medições. ANOVA, Teste de Comparação Múltipla de Tukey. *P<0,001 (GC x GE 2), #P<0,01 (GC x GE 1).



Figura 16: Correlação entre o número de células-tronco CD34+ e o número de estruturas microvasculares em todos os grupos estudados (N=46) de ratas Sprague-Dawley fêmeas. Correlação não significante. Vermelho: ponto outlier. r=0,1818.

5.6- Correlação entre Angiogênese e outras variáveis biológicas

As variáveis biológicas utilizadas nas análises em questão foram: percentagem de componente de carcinoma ductal invasivo, grau histológico, percentagem de necrose e índice mitótico. Por se tratarem de variáveis calculáveis somente nos grupos Experimentais, essas análises foram realizadas apenas nestes dois grupos, em conjunto.

A correlação entre a angiogênese e (1) componente de carcinoma ductal (Figura 17), (2) grau histológico (Figura 18), (3) necrose (Figura 19) e (4) índice mitótico (Figura 20) não atingiu significância estatística, sendo caracterizada por valores de *r de Pearson* que variaram entre 0,2906 e -0,3343.

5.7- Correlação entre Células-tronco neoplásicas CD34+ e outras variáveis biológicas

As variáveis biológicas utilizadas nas análises em questão foram as mesmas adotadas para a correlação da angiogênese. Da mesma forma, por se tratarem de variáveis calculáveis somente nos grupos Experimentais, essas análises foram realizadas apenas nestes dois grupos, em conjunto.

A correlação entre número de CTNCD34+ e (1) componente de carcinoma ductal (Figura 21), (2) grau histológico (Figura 22), (3) necrose (Figura 23) e (4) índice mitótico (Figura 24) não atingiu significância estatística, sendo caracterizada por valores de *r de Pearson* que variaram entre 0,4323 e -0,3539.



Figura 17: Correlação entre o número de estruturas microvasculares e a percentagem de componente ductal nos Grupos Experimentais 1 e 2 (tecidos tumorais, tratados e não tratados; N=24) de ratas Sprague-Dawley fêmeas. Correlação não significante. r = -0,2551.



Figura 18: Correlação entre o número de estruturas microvasculares e grau tubular nos Grupos Experimentais 1 e 2 (tecidos tumorais, tratados e não tratados; N=24) de ratas Sprague-Dawley fêmeas. Correlação não significante. r = 0,2424.



Figura 19: Correlação entre o número de estruturas microvasculares e a percentagem de necrose nos Grupos Experimentais 1 e 2 (tecidos tumorais, tratados e não tratados; N=24) de ratas Sprague-Dawley fêmeas. Correlação não significante. r = -0,07525.



Figura 20: Correlação entre o número de estruturas microvasculares e o índice mitótico nos Grupos Experimentais 1 e 2 (tecidos tumorais, tratados e não tratados; N=24) de ratas Sprague-Dawley fêmeas. Correlação não significante. r = -0,04931.



Figura 21: Correlação entre o número de células-tronco neoplásicas CD34+ e a percentagem de componente ductal nos Grupos Experimentais 1 e 2 (tecidos tumorais, tratados e não tratados; N=24) de ratas Sprague-Dawley fêmeas. Correlação não significante. r = 0,1310.



Figura 22: Correlação entre o número de células-tronco neoplásicas CD34+ e o grau tubular nos Grupos Experimentais 1 e 2 (tecidos tumorais, tratados e não tratados; N=24) de ratas Sprague-Dawley fêmeas. Correlação não significante. r = -0,3615.



Figura 23: Correlação entre o número de células-tronco neoplásicas CD34+ e a percentagem de necrose nos Grupos Experimentais 1 e 2 (tecidos tumorais, tratados e não tratados; N=24) de ratas Sprague-Dawley fêmeas. Correlação não significante. Vermelho: ponto outlier. r = -0,1148.



Figura 24: Correlação entre o número de células-tronco neoplásicas CD34+ e índice mitótico nos Grupos Experimentais 1 e 2 (tecidos tumorais, tratados e não tratados; N=24) de ratas Sprague-Dawley fêmeas. Correlação não significante. Vermelho: ponto outlier. r = 0,002238.

6- DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo primordial avaliar o efeito de uma estatina lipofílica – a sinvastatina – simultaneamente sobre a angiogênese tumoral e sobre um tipo de célula-tronco – a que expressa CD34 –, em modelo experimental de carcinogênese mamária, sendo motivado por importantes lacunas no conhecimento geral acerca das células-tronco neoplásicas mamárias, de sua susceptibilidade *in vivo* às estatinas e de suas relações fisiopatológicas com o fenômeno de angiogênese. Outrossim, também pode-se justificar a realização deste trabalho diante da necessidade de um estudo sobre as relações entre angiogênese, células-tronco neoplásicas (CTNs) e estatinas, na medida em que angiogênese e CTNs constituem alvos terapêuticos emergentes e que as estatinas representam um paradigma farmacológico promissor no tratamento do câncer.

O modelo experimental de carcinogênese mamária adotado presta-se a oferecer carcinogênese após dose única do DMBA, apresentando alta especificidade para tumores mamários e alta taxa de sucesso em um prazo relativamente curto. Apesar da extensão de relatos desse modelo na literatura ele possui como limitações o fato de apresentar tumores bem delimitados, pouco invasivos e não metastáticos à despeito do que ocorre normalmente em tumores mamários humanos, além disso, como será discorrido adiante, os tumores desse modelo padronizados pelo tamanho apresentam baixo grau histológico.

Para tornar mais didática a discussão dos resultados deste trabalho, serão mantidas as divisões temáticas estabelecidas no item "Resultados".

97

6.1- Caracterização histopatológica

Com base nos achados obtidos nesta primeira etapa do trabalho, podese dizer que as neoplasias mamárias induzidas pelo DMBA, segundo o protocolo aplicado, são representadas por neoplasias malignas mistas ou compostas, com predomínio de carcinoma ductal invasivo, grau histológico final de Nottingham baixo, com necrose espontânea inconspícua e baixo índice mitótico. Em um primeiro momento, esses achados contrastam bastante com a literatura baseada neste modelo e com a experiência prévia deste grupo com o protocolo descrito por Barros et al.^[80]. Esperavam-se neoplasias mais heterogêneas, menos diferenciadas, com maior índice mitótico e maior percentagem de necrose espontânea. Os achados dissonantes encontrados no presente trabalho provavelmente devem-se a modificações protocolares que foram introduzidas com o intuito de facilitar a aplicação deste modelo em contexto farmacológico. No modelo clássico, o início dos protocolos experimentais é padronizado pelo tempo de indução que é, em geral, de três meses. Este protocolo resulta em uma elevada proporção de animais em caquexia, que não resistem aos protocolos de tratamento farmacológico crônico, dificultando a realização de estudos como o presente. Além disso, neste protocolo clássico, as neoplasias variam muito em termos de tamanho e característica biológicas, o que resulta em grande variância. intragrupo e, consequentemente, em grande dificuldade na demonstração de um efeito de tratamento estatisticamente significante. Por todos esses motivos, optouse por padronizar o início dos protocolos experimentais pelo tamanho dos tumores (sendo estabelecido, através de estudos-piloto, tumor com medidas de 1 cm em

98

cada um de seus 3 maiores diâmetros perpendiculares, que corresponde, na maioria dos casos, a um período de espera de oito semanas após a indução com DMBA). Deve-se considerar que, apesar da dissonância com a literatura e a obtenção de neoplasias histologicamente menos agressivas (menor índice necrótico e menor índice mitótico), as neoplasias do protocolo praticado neste estudo são mais homogêneas (do ponto de vista biológico) e mais próximas do contexto humano, onde a grande maioria das neoplasias são carcinomas ductais invasivos, com grau histológico final 1/2 (especialmente, em países que praticam protocolos de triagem populacional em larga escala, eficazes na promoção de diagnóstico precoce).

O baixo percentual de necrose espontânea nos tumores do presente estudo também favorece a sua aplicação em estudos focados no teste de novos fármacos antineoplásicos. Isso porque, em tumores com necrose espontânea expressiva submetidos a testes terapêuticos, é difícil avaliar até que ponto a necrose pós-tratamento se deve ao efeito citotóxico do fármaco em teste per se ou à própria tendência natural da neoplasia em entrar espontaneamente em morte celular. Além disso, o fato de serem neoplasias mistas (ou seja, que ainda conservam certa heterogeneidade morfológica intratumoral) e de baixo índice proliferativo – características intimamente ligadas ao papel fisiopatológicas das CTNs – sugere um participação significante de CTNs na fisiopatogênese dessas neoplasias o que, por sua vez, torna este modelo um ponto de partida interessante para o estudo de drogas com ação específica sobre CTNs.

Com relação aos efeitos da sinvastatina nesta etapa do trabalho, cumpre destacar que nos tumores tratados com este fármaco, observou-se uma maior representação relativa do subtipo histológico "carcinoma ductal", indicando um provável efeito da sinvastatina sobre a plasticidade morfológica dessas neoplasias. Em se tratando de um fármaco com possível ação antagonista sobre CTNs (células com fenótipo indiferenciado e capacidade de originar células morfologicamente muito distintas), esperava-se que essa estatina poderia influenciar não só a heterogeneidade morfológica das neoplasias induzidas pelo DMBA, mas principalmente seu grau de diferenciação (grau de semelhança com o tecido normal correspondente). Embora não tenha sido possível constatar tal ação neste estudo, não se pode ainda descartá-la totalmente. Isso porque o modelo de carcinogênese pelo DMBA, quando adaptado ao presente protocolo, possui um viés importante: não forma neoplasias pouco diferenciadas, ou seja, não induz neoplasias cujo grau de diferenciação poderia ser significantemente modificado pelo tratamento. Afinal, não se pode tornar uma neoplasia bem diferenciada (que é o caso da maioria das neoplasias aqui analisadas) ainda "mais" bem diferenciada (pelo menos, não com o sistema de graduação histológica aqui empregado).

Pode-se afirmar, por outro lado, que, no esquema posológico utilizado neste estudo (que propositalmente imita o esquema antilipemiante utilizado em humanos adultos) não foi possível constatar ação citotóxica evidente, já que não houve aumento na % de necrose nos animais tratados. Não se trata de negar a literatura prévia que relata este efeito, mas sim de lembrar que os efeitos citotóxicos significantes previamente relatados foram constatados em trabalhos

que fizeram otimização de dose. Cumpre destacar que, neste momento, estão em curso no presente grupo de pesquisa, estudos de otimização de doses, bem como estudos focados em outra forma mais sutil de morte celular (e portanto de citotoxicidade) – a apoptose.

6.2 Angiogênese

Nesta etapa do estudo, um dos principais achados foi o aumento de vascularização no tecido neoplásico induzido em relação ao tecido mamário normal, atestando a ocorrência de angiogênese tumoral no modelo em questão. A ocorrência de angiogênese tumoral neste modelo é ainda reforçada pelo aumento no grau de irregularidade dos vasos do tecido neoplásico (avaliado através da variável "índice de irregularidade vascular" [ICV]). Afinal, sendo a angiogênese tumoral um processo desregulado do ponto de vista de sinalização molecular, espera-se que vasos resultantes deste processo sejam defectivos, ou seja, mais tortuosos, com ramificações anômalas e propensos a vazamentos ou quebras da barreira endotelial^[10,11]. Em conjunto, essas constatações contribuem significantemente para sua validação deste modelo como um modelo experimental de estudo da angiogênese em carcinoma mamário adequado.

O segundo achado mais importante, foi a constatação de que o número de vasos induzidos pela angiogênese (microvasos) se reduz com o uso da sinvastatina. Este achado confirma pela primeira vez a ação antiangiogênica da sinvastatina neste importante modelo de carcinogênese. É importante lembrar que a ausência de efeito da sinvastatina sobre a área luminal vascular total não

101

invalida a conclusão estabelecida acima. Sabe-se que a concordância entre métodos de quantificação de angiogênese não é absoluta e que a MVD ainda goza da prerrogativa de ser o método de quantificação vascular mais robusto e mais utilizado na literatura^[13].

Outra constatação digna de nota, é o fato de não haver diferenças entre a vascularização dos tecidos mamários normais, tratados ou não com sinvastatina, sob quaisquer variáveis da avaliação de angiogênese. Esse dado é muito importante do ponto de vista toxicológico pois indica que a sinvastatina não afeta negativamente a vascularização e a angiogênese fisiológicas.

Finalmente, outro achado a ser analisado com cuidado, diz respeito aos valores de ICV do grupo experimental tratado com sinvastatina que se mostraram intermediários em relação aos valores do grupo Controle unificado e do grupo Experimental não tratado com sinvastatina. Interpretamos este achado como indicativo de um efeito parcial da sinvastatina sobre a morfologia de vasos anômalos resultantes da angiogênese tumoral. É provável que outros fatores modulares da plasticidade morfológica destes vasos, ainda não conhecidos e não controlados neste estudo, tem interferido nos resultados, impedindo uma avaliação clara do papel desta estatina neste contexto.

6.3- Células-tronco Neoplásicas

No que diz respeito às células-tronco neoplásicas CD34+, o único dado positivo foi constatar a sua presença pela primeira vez neste modelo experimental de carcinogênese mamária. Ao contrário do esperado^[5,20,43], o número de

CTNCD34+ não sofreu qualquer influência por parte do tratamento com sinvastatina, nem mostrou qualquer correlação com variáveis de angiogênese ou outras variáveis biológicas testadas. Não se pode, contudo, afirmar categoricamente que não existem relações entre CTNs e angiogênese, uma vez que outros tipos de CTNs não foram pesquisadas neste trabalho.

Estudos complementares para averiguar se este efeito é dose dependente ou não, bem como se envolve outros tipos de célulastronco/progenitoras ainda são necessários. Contudo, esse trabalho cumpriu seu objetivo em elucidar o efeito da sinvastatina sobre a angiogênese tumoral, CTNs CD34+, e a investigação de possíveis interrelações fisiopatológicas desses elementos tumorais, estabelecendo que, neste modelo, o tratamento crônico (14 dias) com sinvastatina (na dose de 40 mg/kg ao dia – dose comparada à utilizada na terapêutica antidislipidêmica em seres humanos), apresenta efeito antiangiogênico e modulador da heterogeneidade morfológica em tumores mamários induzidos pelo DMBA.

7- CONCLUSÕES

 A vascularização e o grau de irregularidade vascular do tecido neoplásico induzido pelo DMBA são maiores que os do tecido mamário normal, o que indica a ocorrência de angiogênese tumoral (i.e., proliferação de novos vasos induzida por células neoplásicas) neste modelo. Portanto, o presente protocolo constitui modelo adequado para o estudo de angiogênese tumoral em neoplasias mamárias invasoras.

• Da mesma maneira, a frequência de células com fenótipo de CT CD34+ é maior no tecido mamário neoplásico que no tecido mamário normal, indicando que o presente modelo de carcinogênese é adequado para futuros estudos fisiopatológicos e farmacológicos sobre CTNs, do tipo CD34+.

• Embora não afete significantemente a angiogênese fisiológica (própria de tecidos normais), a sinvastatina parece inibir a angiogênese tumoral, um vez que há redução significante no número de microvasos (MVD) nos animais induzidos com DMBA e tratados com sinvastatina. Este efeito parece estar restrito à simples inibição da proliferação endotelial. A sinvastatina também parece modular a plasticidade morfológica dos vasos neoformados, uma vez que os valores de ICV nos animais induzidos e tratados, são intermediários entre os valores dos grupos Controle e Experimental não tratado. Estudos mais aprofundados são necessários para averiguar se este efeito é dose dependente ou não.

• Diferente dos resultados *in vitro* relatados na literatura (utilizando outros marcadores de CTN), a sinvastatina não parece interferir significantemente

com o número de CTN do subtipo CD34+ *in vivo*, neste modelo experimental e com o protocolo de tratamento testado.

• No presente modelo de carcinogênese induzida pelo DMBA não houve correlação entre número de células-tronco e variáveis de angiogênese, o que desfavorece (embora não descarte) a hipótese atual de que a CTN poderia guiar ou modular diretamente o fenômeno de angiogênese.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1. Green HSN. Heterologous transplantation of mammalian tumours. The transfer of human tumours to alien species. J Exp Med 1941; 73: 461-8.
- 2. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med 1971; 285: 1182-6.
- 3. Krebel RS. Tumour angiogenesis: past, present and the near future. Carcinogenesis 2000; 21: 505-15.
- 4. Sharma RA, Harris AL, Dalgleish AG, Steward WP, O'Byrne KJ. Angiogenesis as a biomarker and target in cancer chemoprevention. Lancet Oncol 2001; 2: 726-31.
- 5. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. J Biol Chem 1992; 267: 10931-4.
- Roland D, Ferder M, Kothuru R, Faierman T, Strauch B. Effects of pulsed magnetic energy on a microsurgically transferred vessel. Plast Reconstr Surg 2000; 105: 1371-4.
- 7. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a Therapeutic Target. Nature 2005; 438: 967-74.
- 8. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nat Med 1995; 1: 27-31.
- Gasparini G, Harris AL. Clinical Importance of the Determination of Tumor Angiogenesis in Breast Carcinoma: Much More Than a New Prognostic Tool. J Clin Oncol 1995; 13: 765-82.
- 10. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. Nature 2005; 438: 932-6.
- 11. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. Nat Med 2003; 9: 653-60.
- 12. Elewa HF, El-Remessy AB, Somanath PR, Fagan SC. Diverse Effects of Statins on Angiogenesis: New Therapeutic Avenues. Pharmacotherapy 2010; 30: 169-76.
- 13. Weidner N. The importance of tumor angiogenesis. Am J Clin Pathol 2004; 122: 675-7.
- 14. Gimbrone MA, Leapman S, Cotran RS, Folkman J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. J Exp Med 1972; 136: 261-76.

- 15. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in Cancer. Vasc Health Risk Manag 2006; 2: 213–9.
- 16. Weidner N. Tumor angiogenesis: review of current applications in tumor prognostication. Sem Diag Pathol 1993; 10: 302-13.
- 17. Fidler IJ, Ellis LM. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. Cell 1994; 79: 185-8.
- 18. Weidner N. Tumour vascularity and proliferation: clear evidence of a close relationship. J Pathol 1999; 189: 297-9.
- Schoell WM, Pieber D, Reich O, Lahousen M, Janicek M, Guecer F, Winter R. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in ovarian carcinoma: quantification of endothelial immunoreactivity by image analysis. Cancer 1997; 80: 2257-62.
- 20. Weidner N, Semple P, Welch W, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis. Correlation in invasive breast carcinoma. N Eng J Med 1991; 324: 1-6.
- 21. Hasan J, Byers R, Jayson GC. Intra-tumoral microvessel density in human solid tumours. Br J Cancer 2002; 86: 1566-77.
- Heffelfinger SC, Gear RB, Taylor K, Miller MA, Schneider J, LaDow K, Warshawsky D. DMBA-induced mammary pathologies are angiogenic in vivo and in vitro. Lab Invest 2000; 80: 485-92.
- 23. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, Gion M, Belien JA, de Waal RM, Van Marck E, Magnani E, Weidner N, Harris AL, Dirix LY. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. Eur J Cancer 2002; 38: 1564-79.
- 24. Offersen BV, Borre M, Overgaard J. Quantification of angiogenesis as a prognostic marker in human carcinomas: a critical evaluation of histopathological methods for estimation of vascular density. Eur J Cancer 2003; 39: 881-90.
- 25. Boyle J. Histological measurement of tumour angiogenesis. Eur J Cancer 2003; 39: 859-60.
- 26. Sharma S, Sharma MC, Sarkar C. Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprognostic perspective and significance of neoangiogenesis. Histopathol 2005; 46: 481-9.
- Rasila KK, Burger RA, Smith H, Lee FC, Verschraegen C. Angiogenesis in gynecological oncology - mechanism of tumor progression and therapeutic targets. Int J Gynecol Cancer 2005; 15: 710-26.
- Amis SJ, Coulter-Smith SD, Crow JC, Maclean AB, Perrett CW. Microvessel quantification in benign and malignant ovarian tumors. Int J Gynecol Cancer 2005; 15: 58-65.
- 29. Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. Breast Cancer Res Treat 1995; 36: 169-80.
- 30. Nickoloff BJ. The human progenitor cell antigen (CD34) is localized on endothelial cells, dermal dendritic cells, and perifollicular cells in formalin-fixed normal skin, and on proliferating endothelial cells and stromal spindle-shaped cells in Kaposi's sarcoma. Arch Dermatol 1991; 127: 523–9.
- 31. Krause DS, Fackler MJ, Civin Cl, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. Blood 1996; 87: 1–13.
- 32. Joseph A, Hossain P, Jham S, Jones RE, Tighe P, McIntosh RS, Dua HS. Expression of CD34 and L-Selectin on Human Corneal Keratocytes. Invest Ophthalmol Vis Sci 2003; 44: 4689–92.
- 33. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, Pezzella F, Viale G, Weidner N, Harris AL, Dirix LY. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. Eur J Cancer 1996; 32: 2474-84.
- 34. 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: 450-60.
- 35. Al-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and Solid Tumor Stem Cells. Oncogene 2004; 23: 7274-82.
- 36. Li Y, Rosen JM. Stem/Progenitor Cells in Mouse Mammary Gland Development and Breast Cancer. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2005; 10: 17-24.
- 37. Kakarala M, Wicha MS. Implications of the Cancer Stem-Cell Hypothesis for Breast Cancer Prevention and Therapy. J Clin Oncol 2008; 26: 2813-20.
- 38. Woodward WA, Chen MS, Behbod F, Rosen JM. On Mammary Stem Cells. J Cell Sci 2005; 118: 3585-94.

- 39. Richert MM, Schwertfeger KL, Ryder JW, Anderson SM. An atlas of mouse mammary gland development. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2000; 5: 227-41.
- 40. 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: 1302-13.
- 41. Smalley M, Ashworth A. Stem cells and breast cancer: A field in transit. Nat Rev Cancer 2003; 3: 832-44.
- 42. Harbeck N. Never too late: reducing late breast cancer relapse risk. Curr Med Res Opin 2008; 24: 3295-305.
- 43. Woodward WA, Sulman EP. Cancer stem cells: markers or biomarkers? Cancer Metastasis Rev 2008; 27: 459-70.
- 44. Shibata MA, Ito Y, Morimoto J, Otsuki Y. Lovastatin inhibits tumor growth and lung metastasis in mouse mammary carcinoma model: p53-independent mitochondrial-mediated apoptotic mechanism. Carcinogenesis 2004; 25: 1887-98.
- 45. Bacchi CE, Prisco F, Carvalho FM, Ojopi EB, Saad EV. Potential economic impacto f the 21-gene expression assay on the treatment of breast cancer in Brazil. Rev Assoc Med Bras 2010; 56: 186-91.
- 46. Stingl J. Detection and analysis of mammary gland stem cells. J Pathol 2009; 217: 229-41.
- 47. Dontu G. Breast cancer stem cell markers the rocky road to clinical applications. Breast Cancer Res 2008; 10: 110-1.
- 48. Kelly LM, Gilliland DG. Genetics of myeloid leukemias. Annu. Rev. Genomics Hum Genet 2002; 3: 179-98.
- 49. Jamieson C, Ailles L, Dylla S, Muijtjens M, Jones C, Zehnder JL, Gotlib J, Li K, Manz MG, Keating A, Sawyers CL, Weissman IL. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. N Engl J Med 2004; 351: 657-67.
- 50. Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer Stem Cells: An Old Idea—A Paradigm Shift. Cancer Res 2006; 66: 1883-90.

- 51. 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: R10.
- Li T, Su Y, Mei Y, Leng Q, Leng B, Liu Z, Stass SA, Jiang F. ALDH1A1 is a marker for malignant prostate stem cells and predictor of prostate cancer patients' outcome. Lab Invest 2010; 90: 234-44.
- 53. 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 cancers are characterized by negative estrogen receptor, positive human epidermal growth factor receptor type 2, and high Ki67 expression. Cancer Sci 2009; 100: 1062-8.
- 54. Gökmen-Polar Y, Nakshatri H, Badve S. Biomarkers for breast cancer stem cells: the challenges ahead. Biomarkers Med 2011; 5: 661-71.
- 55. Fillmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy Breast Cancer Res 2008; 10: 1-13.
- 56. Gauthaman K, Fong CY, Bongso A. Statins, stem cells, and cancer. J Cell Biochem 2009; 106: 975-83.
- 57. Jakobisiak M, Golab J. Statins can module effectiveness of antitumor therapeutic modalities. Med Res Rev 2010; 30: 102-35.
- 58. Nakahara K, Kuriyama M, Sonoda Y. Myopathy induced by HMG-CoA reductase inhibitors in rabbits: A pathological, electrophysiological and biochemical study. Toxicol Appl Pharmacol 1998; 152: 99-106.
- 59. Hamelin BA, Turgeon J. Hidrophilicity/lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors. TiPS 1998; 19: 26-37.
- 60. Schmidt 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: 217-24.
- 61. Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. Nat Med 2000; 6: 1399-402.
- 62. 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: 508-19.

- Blais L, Desgagne A, Lelorier J. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors and the risk of cancer: a nested case-control study. Arch Internal Med 2000; 160: 2363-8.
- 64. Graaf MR, Beiderbeck AB, Egberts ACG, Richel DJ, Guchelaar H. The risk of cancer in users of statins. J Clin Oncol 2004; 22: 2388-94.
- 65. Boudreau DM, Gardner JS, Malone KE. The association between 3-hydroxy-3methylglutary coenzyme A inhibitor use and breast carcinoma risk among post menopausal women: a case control study. Cancer 2004; 100: 2308-16.
- 66. Jakobisiak M, Golab J. Potential antitumor effects of statins. Int J Oncol 2003; 23: 1055-69.
- 67. Sassano A, Platanias LC. Statins in tumor suppression. Cancer Lett 2008; 260: 11-9.
- 68. Lee MH, Cho YS, Han YM. Sinvastatin suppresses self-renewal of mouse embryonic stem cells by inhibiting RhoA geranylgeranylation. Stem Cells 2007; 25: 1654-63.
- 69. Lubet RA, Boring D, Steele VE, Ruppert JM, Juliana MM, Grubbs CJ. Lack of efficacy of statins atorvastatin and lovastatin in rodent mammary carcinogenesis. Cancer Prev Res 2009; 2: 161-7.
- 70. Demierre MF, Higgins PD, Gruber SB, Hawk E, Lippman SM. Statins and cancer prevention. Nat Rev Cancer. 2005; 5: 930-42.
- 71. Agarwal B, Bhendwal S, Halmos B, Moss SF, Ramey WG, Holt PR. Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells. Clin Cancer Res 1999. 5; 2223-9.
- 72. Shibata MA, Kavanaught CC, 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: 453-9.
- 73. Shibata MA, Ito Y, Morimoto J, Otsuki Y. Lovastatin inhibits tumor growth and lung metastasis in mouse mammary carcinoma model: p53-independent mitochondrial-mediated apoptotic mechanism. Carcinogenesis 2004; 25: 1887-98.
- 74. Farina HG, Bublik DR, Alonso DF. Lovastatin alters cytoskeleton organization and inhibits experimental metastasis of mammary carcinoma cells. Clin Exp Metastasis 2007; 19: 551-9.
- 75. Wei N, Mi MT, Zhou Y. Influences of Iovastatin on membrane ion flow and intracellular signaling in breast cancer cells. Cell Mol Biol Lett 2007; 12: 1-15.

- 76. Gabrys D, Dörfler 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. Strahlenther Onkol 2008; 184: 48-53.
- 77. Kubatka P, Žihlavniková K, Kajo K, Péč M, Stollárová N, Bojková B, Kassayová M, Orendáš P. Antineoplastic Effects of Simvastatin in Experimental Breast Cancer. Klin Onkol 2011; 24: 41-5.
- 78. Walter DH, Zeiher AM, Dimmeler S. Effects of statins on endothelium and their contribution to neovascularization by mobilization of endothelial progenitor cells. Coron Artery Dis 2004; 15: 235-42.
- 79. 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: 962-73.
- 80. Barros ACSD, Muranaka ENK, Mori LJ, Pelizon HT, Iriya K, Giocondo G, Pinotti JA. Inducion of Experimental Mammary Carcinogenesis in Rats with 7,12dimethylbenz(a)anthracene. Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo 2004; 59: 257-61.

9- Anexo

