

JOSÉ TADEU VICELLI

**ESTUDO HISTOLÓGICO DE MAMAS DE RATAS
CASTRADAS SUBMETIDAS À TERAPÊUTICA COM
ESTROGÊNIO, PROGESTOGÊNIO E TIBOLONA**

Tese de Doutorado

**ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. MARIA SALETE COSTA GURGEL
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. MARCELO ALVARENGA**

**Unicamp
2005**

JOSÉ TADEU VICELLI

**ESTUDO HISTOLÓGICO DE MAMAS DE RATAS
CASTRADAS SUBMETIDAS À TERAPÊUTICA COM
ESTROGÊNIO, PROGESTOGÊNIO E TIBOLONA**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Tocoginecologia, área de Tocoginecologia

**ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. MARIA SALETE COSTA GURGEL
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. MARCELO ALVARENGA**

**UNICAMP
2005**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

V662e Vicelli, José Tadeu
 Estudo histológico de mamas de ratas castradas
 submetidas à terapêutica com estrogênio, progestogênio e
 tibolona / José Tadeu Vicelli. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

 Orientadores : Maria Salete Costa-Gurgel; Marcelo
 Alvarenga
 Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Ciências Médicas.

 1. Terapia de reposição hormonal. 2. Modelos animais.
 3. Doenças mamárias. 4. Hormônios Esteróides Gonadais.
 4. Hormônios. I. Costa-Gurgel Maria Salete. II. Alvarenga,
 Marcelo. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
 de Ciências Médicas. IV. Título.

CT/fcm

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno: JOSÉ TADEU VICELLI

Orientadora: Prof^a. Dr^a. MARIA SALETE COSTA GURGEL

Co-Orientador: Prof. Dr. MARCELO ALVARENGA

Membros:

1.

2.

3.

4.

5.

**Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

Data: 30/05/2005

Dedico este trabalho...

*Aos meus pais:
José Vicelli (in memoriam) e Angélica,
pela formação pessoal e profissional que me proporcionaram.*

*À minha esposa, Sandra,
que sempre esteve ao meu lado
compartilhando cada momento da minha vida.*

*Aos meus filhos, Fernanda e Gustavo,
razão maior do meu viver.*

Agradecimentos

À Prof.^a Dr.^a Maria Salete Costa Gurgel pela confiança, amizade, incentivo, e, acima de tudo, por sua responsabilidade na orientação em todas as etapas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Alvarenga, excelente pesquisador em patologia mamária, pela disponibilidade e colaboração que possibilitaram a realização desta pesquisa, e sem o qual esta teria se tornado muito mais difícil.

À Prof.^a Dr.^a Ilza Maria Urbano Monteiro pela amizade, colaboração e compreensão, permitindo-me a realização da parte experimental desta pesquisa.

À Prof.^a Dr.^a Tereza Cristina, pelo incentivo e apoio na parte experimental deste estudo.

Ao Prof. Dr. Gustavo Antonio de Souza, chefe da Área de Oncologia e Patologia Mamária do CAISM-Unicamp, por ter autorizado a realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Aarão Mendes Pinto Neto pelo apoio, confiança na minha iniciação e desenvolvimento científico, além de contribuições com sugestões para o meu exame de qualificação.

À Prof.^a Dr.^a Lúcia Helena Simões da Costa Paiva pela inestimável colaboração durante o meu exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. José Antônio Simões por sua amizade, análise e sugestões no exame de qualificação.

Ao Dr. Paulo Anselmo Nunes Felipe pela orientação para o cálculo da dose dos medicamentos utilizados nos animais.

Ao Prof. Dr. Aníbal Faundes, exemplo de pesquisador a ser seguido, pelos seus conhecimentos que me foram transmitidos e que sempre serão úteis.

Aos membros da Banca Examinadora desta tese, que pelos trabalhos realizados e brilhantes trajetórias profissionais, com certeza, darão maior credibilidade a este estudo.

Aos meus amigos, Prof. Luiz Otávio e Prof. Dr. Délio Conde, pelas contribuições a este trabalho.

A todos os docentes, residentes, médicos contratados e equipe de enfermagem das áreas de Oncologia e Patologia Mamária do CAISM-Unicamp.

Aos profissionais Sirlei e Leonardo, pelo carinho na realização da análise estatística deste estudo.

Aos profissionais da ASTEC do CAISM: Sueli Chaves, Maria do Rosário Zullo, Cylene Camargo, William Alexandre de Oliveira, Neder Piagentini, Márcia Fussi, Gilberto Rogatto e Sueli Regina, pela amizade, dedicação, carinho e pelo excelente apoio técnico na estruturação e revisão deste trabalho, proporcionando a qualidade da apresentação.

Ao Lúcio, pela contribuição na parte de informática.

Ao Sr. Amilton Garcia pela disponibilidade e auxílio no manuseio dos animais.

Ao Roberto, do Instituto de Biologia, pela inestimável colaboração na orientação da castração dos animais.

À secretária da Comissão de Pós-Graduação, Margarete Amado S. Donadon, pela dedicação e ajuda ao longo da minha pós-graduação.

Às secretárias da oncologia, Neusa Aparecida e Sonia, pela dedicação e assistência aos médicos da área.

À Marli Monteiro, bibliotecária do Centro Médico de Campinas, pela colaboração na pesquisa das referências bibliográficas.

A todas as pessoas que de alguma forma participaram com sugestões, críticas ou palavras de incentivo.

A todos os meus amigos e colegas do CAISM da Unicamp.

*Existem coisas que o tempo só aprimora.
O conhecimento, a experiência, a capacidade de ver com outros olhos.
É preciso tê-lo como aliado, mestre, e amigo na mágica aventura da vida,
mas acima de tudo é preciso ter humildade de se descobrir aprendiz.*

J.Tadeu

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	ix
Resumo	xi
Summary	xiii
1. Introdução	15
2. Objetivos	26
2.1. Objetivo geral	26
2.2. Objetivos específicos	26
3. Publicação.....	27
4. Conclusões	49
5. Referências Bibliográficas.....	50
6. Bibliografia de Normatizações.....	56
7. Anexos	57
7.1. Anexo 1 – Sistema halométrico.....	57
7.2. Anexo 2 – Aspecto anatômico das glândulas mamárias da rata	60
7.3. Anexo 3 – Alterações histológicas em mamas de ratas submetidas à terapêutica com estrogênios, progestogênios e tibolona (Fotos)	61
7.4. Anexo 4 – Alterações histológicas observadas nas mamas de ratas submetidas à terapêutica com estrogênios, progestogênios e tibolona, segundo o esquema terapêutico ...	62

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

AS	(<i>Activity Secretary</i>) Atividade Secretora
AMP	Acetato de Medroxiprogesterona
CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
CEEA	Comissão de Ética na Experimentação Animal
DAA	Dose Animal-Alvo
DMBA	Dimetilbenzantraceno
EUA	Estados Unidos da América
E2	Benzoato de Estradiol
F	Freqüência
FAC	Freqüência para Animal Conhecido
FDC	Fator Dose para Animal Conhecido
FFC	Fator Freqüência para Animal Conhecido
HAN	Hiperplasia Alvéolo-Nodular
HEB	Hiperplasia Epitelial da Unidade Ductal Terminal Lobular
HE	Hematoxilina-eosina
IB	Instituto de Biologia
IC 95%	Intervalo de Confiança a 95%

IMC	Índice de Massa Corpórea
Kg	Kilograma (s)
Lob	Lóbulo Mamário
MWS	<i>Million Women Study</i>
N	Número (s)
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	(<i>Odds Ratio</i>)
T	Tibolona
TFA	Taxa de Frequência para Animal-Alvo
TMB	Taxa Metabólica Basal
TME	Taxa Metabólica Específica
TH	Terapia Hormonal
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
WHO	<i>World Health Organization</i>
=	Igual a
μ	Micra(s)
%	Porcentagem
+	Positivo

Resumo

Objetivo: avaliar as alterações histológicas das mamas de ratas castradas submetidas à terapêutica com esteróides sexuais: benzoato de estradiol, acetato de medroxiprogesterona e tibolona. **Material e Método:** foi realizado um estudo experimental com 40 ratas não púberes, sendo 20 sem prole (grupo A) e 20 que procriaram e amamentaram sua prole (grupo B). Todas as ratas foram submetidas à ooforectomia bilateral e após quatro semanas foram alocadas, aleatoriamente, nos subgrupos: A1, A2, A3, A4, A5 e B1, B2, B3, B4, B5. Foram submetidas a tratamento hormonal com benzoato de estradiol, acetato de medroxiprogesterona, tibolona e placebo durante dez semanas. Os esteróides foram administrados seguindo os esquemas: A1 e B1 – benzoato de estradiol; A2 e B2 – acetato de medroxiprogesterona; A3 e B3 – benzoato de estradiol e acetato de medroxiprogesterona; A4 e B4 – tibolona; A5 e B5 - placebo. Após o término do tratamento, os animais foram sacrificados e suas segundas glândulas mamárias torácicas retiradas para análise histológica. Os parâmetros avaliados foram: proliferação epitelial da unidade terminal alveolar, atipias de células epiteliais e atividade secretora. A associação entre as variáveis histológicas e os diversos esquemas terapêuticos foi avaliada através do cálculo do *odds ratio* e seu

respectivo intervalo de confiança de 95%. **Resultados:** foram observadas alterações histológicas em 29 ratas: hiperplasia moderada (52,5%), hiperplasia alvéolo-nodular (42,5%), atipia sem proliferação (35%), hiperplasia leve (32,5%), atividade secretora (20%) e hiperplasia severa (5%). Em ratas sem prole observou-se 1,3 mais chances, em relação ao grupo-controle, de apresentar hiperplasia alvéolo-nodular no grupo que recebeu estrogênio, hiperplasia moderada no grupo tratado com progestogênio, e hiperplasia alvéolo-nodular e atipia sem proliferação epitelial com a associação estrogênio e progestogênio. No grupo com prole observou-se 1,3 mais chances de apresentar atividade secretora com o uso de estrogênio. **Conclusões:** a hiperplasia epitelial e atipia sem proliferação epitelial associaram-se, mais intensamente, à terapia combinada de estradiol e acetato de medroxiprogesterona, principalmente no grupo sem prole.

Summary

Objective: To evaluate breast histologic changes in castrated female rats treated with sex steroids: estradiol benzoate, medroxyprogesterone acetate and tibolone. **Materials and Methods:** An experimental study was conducted of 40 non pubertal rats, 20 with no offspring (group A) and 20 with breastfed offspring (group B). All rats underwent bilateral ovariectomy. After four weeks these rats were randomly allocated to subgroups: A1, A2, A3, A4, A5 and B1, B2, B3, B4, B5. Animals were treated with estradiol benzoate, medroxyprogesterone acetate, tibolone and placebo during 10 weeks. Steroids were given to subgroups as follows: A1 and B1 – estradiol benzoate; A2 and B2 – medroxyprogesterone acetate; A3 and B3 – estradiol benzoate and medroxyprogesterone acetate; A4 and B4 – tibolone; A5 and B5 – placebo. After the end of treatment, the animals were sacrificed and their second thoracic mammary glands were removed for histologic analysis. Parameters evaluated were: epithelial cell proliferation in terminal end bud, epithelial cells with secretory activity and cell atypia in terminal ducts and buds or terminal alveoli. Contingency tables were used to evaluate the association between histologic variables and diverse therapeutic regimens. Data was statistically analyzed by calculating the odds ratio and its respective

95% confidence interval. **Results:** histologic changes were found in 29 rats: moderate hyperplasia (52.5%), hyperplastic alveolar nodule (42.5%), epithelial atypia without proliferation (35%), mild hyperplasia (32.5%), secretory activity (20%) and severe hyperplasia (5%). In rats with no offspring, it could be found 1.3 times more hyperplastic alveolar nodule in the group that received estradiol than control, moderate hyperplasia in the group that received medroxyprogesterone acetate and, hyperplastic alveolar nodule and epithelial atypia without proliferation in the group treated with estradiol plus medroxyprogesterone acetate. In the rats with offspring it could be found 1.3 times more secretory activity with estradiol. **Conclusions:** epithelial hyperplasia and epithelial atypia without proliferation are strongly associated to combined therapy with estradiol plus medroxyprogesterone acetate, mainly in the rats without offspring.

1. Introdução

O climatério representa o período de transição entre a vida reprodutiva da mulher e a senilidade, caracterizando-se por diminuição gradual da função ovariana, que se traduz clinicamente por diversos sinais e sintomas decorrentes da deficiência estrogênica (WHO, 1981).

Na atualidade estima-se que as mulheres apresentem expectativa de viver aproximadamente um terço de suas vidas no período de pós-menopausa, de forma que várias alternativas de tratamento dirigidas para esse grupo têm sido propostas, incluindo medidas de ordem comportamental, mudanças no estilo de vida e hábitos alimentares, exercícios físicos e a utilização de medicamentos hormonais e não hormonais (Genazzani et al., 2001).

A terapia hormonal (TH) representa o tratamento de escolha para os sintomas da síndrome do climatério e teve seu início em 1942 nos EUA, popularizando-se nos anos 60. Seu crescimento deveu-se à transição demográfica verificada em países do Primeiro Mundo, o que está ocorrendo atualmente nos

países em desenvolvimento, como o Brasil, ocasionando um considerável aumento da população de mulheres climatéricas e na pós-menopausa (IBGE, 2004).

Na atualidade, existem evidências da melhora da qualidade de vida das mulheres que fazem uso de TH. Os estrogênios exercem efeitos benéficos na maioria dos órgãos e sistemas, incluindo ossos e dentes, sistema nervoso central, olhos, cólon (Christiansen, 2001; Lobo, 2001; Writing Group For Women'S Health Initiative Investigators, 2002).

Entretanto, a crescente incidência do câncer de mama e o conceito de hormônio-dependência dessa neoplasia têm causado polêmica entre médicos, pacientes e epidemiologistas, pela possibilidade de a TH aumentar a velocidade de progressão de tumores mamários subclínicos ou de promover transformação maligna do epitélio mamário (Cohen e Ellwein, 1990; Russo e Russo, 2004).

A relação existente entre o câncer de mama e o estrogênio foi documentada há mais de 150 anos, embora até os dias atuais ainda restem dúvidas a respeito do modo exato de ação das substâncias hormonais sobre o epitélio mamário, em especial os esteróides.

Em 1967, Jensen et al. desenvolveram a técnica para o estudo da interação estrógeno-receptor *in vitro*, tornando possível examinar, em fragmentos de tecidos, o complexo estrógeno-receptor. No ano seguinte ficaram esclarecidos os mecanismos pelos quais ocorriam os transportes do estradiol até o núcleo da célula, através de sua combinação ou ligação com o receptor citoplasmático (Gorski et al., 1968; Jensen et al., 1968). Ficava assim demonstrado que os tecidos

possuidores destes receptores hormonais, entre eles a mama, poderiam responder à ação destes hormônios.

As mamas são consideradas glândulas complexas, heterogêneas e exócrinas, e órgão-alvo de diversos estímulos hormonais. Diversos hormônios como os estrógenos e a progesterona e, ainda, certos tipos de glicocorticóides influenciam a diferenciação dos componentes do parênquima e estroma mamários, por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos. Ainda de maneira indireta, a prolactina, a insulina, a tiroxina e o hormônio do crescimento completam o ciclo de desenvolvimento das mamas, causando uma progressão ordenada das células em repouso para um estado funcional e estrutural diferenciado. Esses mesmos estímulos hormonais operam, também, durante o ciclo menstrual induzindo modificações periódicas. As mudanças estruturais da mama ocorrem durante toda a vida da mulher: puberdade, vida reprodutiva e menopausa (Keineberg et al., 1985; Russo e Russo, 1998).

O lóbulo ou unidade ducto-lobular terminal é a unidade morfofuncional da glândula mamária e, provavelmente, séde das primeiras alterações que podem resultar no câncer (Jensen e Wellings, 1974). Estudos em animais demonstraram que o ducto terminal é revestido por epitélio estratificado, com certo índice de proliferação e baixa perda de células (Russo e Russo, 1987). A atividade proliferativa do epitélio do ducto terminal justificaria sua susceptibilidade à transformação neoplásica.

King, em 1991, descreveu o papel do estrogênio na carcinogênese mamária e baseou-se em três aspectos principais:

- a) sua capacidade de gerar tumores mamários em roedores;
- b) sua ação mitogênica no epitélio mamário normal e em linhagens de células de câncer de mama;
- c) em fatores epidemiológicos que conferem proteção, como a ooforectomia e eventos ligados aos aspectos hormonais que aumentam o risco de desenvolvimento do câncer de mama como a menarca precoce, menopausa tardia, primeiro parto a termo em idade tardia, entre outros.

Entretanto, acreditava-se que a progesterona e seus derivados sintéticos, os progestogênios, pudessem ser protetores da ação estrogênica nas células mamárias baseando-se nos efeitos anti-estrogênico e antiproliferativo exercidos por esse hormônio no endométrio (King e Witehead, 1986). Porém, outros estudos contrariavam essa premissa (Going et al., 1988; Bergkvist et al., 1989). De forma diversa ao que ocorre no endométrio, a divisão celular no ducto terminal é mais intensa na segunda fase do ciclo menstrual, possivelmente pela ação sinérgica da progesterona com o estrógeno. A proliferação celular fisiológica está intimamente relacionada com ciclos ovulatórios, nos quais há formação de corpo lúteo e secreção ativa de progesterona (Pinotti et al., 1983; Nazario et al., 1995).

Está comprovado que quanto mais precoce a menarca e mais tardia a menopausa maior o risco de desenvolver câncer de mama, e isto, também, está relacionado com os ciclos ovulatórios e a ação da progesterona nas células do ducto terminal (Trichopoulos et al., 1972; Hardy et al., 1993; Kelsey et al., 1993).

A ação dos progestogênios, no entanto, permanece não totalmente esclarecida. Existem evidências de que estes hormônios agem de forma proliferativa (King, 1993; Nazário et al., 1995; Soderqvist et al., 1998; Simpson et al., 2000), enquanto outros estudos apontam indícios de que os progestogênios possam ter ação protetora contra a proliferação celular na mama, atuando na diferenciação celular e possível estímulo à apoptose, ou morte celular programada (Formby e Wiley, 1999; Lange et al., 1999).

Os dados conflitantes a respeito do uso dos progestogênios sobre o risco de desenvolver câncer de mama, levantaram muitas dúvidas sobre sua utilização na TH (Colditz et al., 1995).

Estudos demonstram que a incidência do câncer de mama eleva-se a partir dos 50 anos (DiSaia e Creasman, 1997), o que coincide com a fase de transição do climatério. Sabendo-se que há no climatério um declínio marcante da secreção de esteróides ovarianos, que impõe freqüentemente a TH, muitas dúvidas surgiram sobre a gênese do câncer de mama.

Algumas teorias surgiram para explicar a carcinogênese mamária nessas mulheres. Alguns autores diziam que a diminuição da progesterona facultaria aos baixos níveis de estrógenos agirem sem oposição, embora as mulheres histerectomizadas que fizeram TH somente com estrogênios não apresentassem risco elevado de câncer de mama (Dupon e Page, 1991).

Vorher (1987) estudou a correlação existente entre o câncer de mama e os níveis estrogênicos plasmáticos, mostrando que na fase de declínio dos estrógenos,

fase de transição climatérica ou de menopausa, eleva-se consideravelmente a incidência de câncer de mama, mostrando, em princípio, efeitos biológicos aparentemente opostos.

Em 1997, o *Collaborative Group of Hormonal Factors* realizou revisão sistemática avaliando mais de 51 estudos, provenientes da América do Norte e Europa, observando que o risco de câncer de mama aumentou em mulheres sob TH, e que este risco era maior quanto mais prolongado o tempo de uso. Foram analisadas 53 mil mulheres com câncer de mama e confrontadas com 108 mil controles, verificando-se que o início da TH aos 50 anos coincidiu com discreta e não significativa elevação do risco de câncer de mama, e que houve uma elevação de 2, 6 e 12 casos, respectivamente, após 5, 10 e 15 anos de TH. Concluíram, ainda, que a incidência de câncer de mama declina progressivamente após a menopausa, na razão de 2,7% ao ano, e que a elevação do risco é maior para usuárias recentes e antigas de TH. Mas também que o risco entre as mulheres usuárias era maior nas com índice de massa corpórea (IMC) menor, quando comparadas às com IMC maior, levando a inferir que o hiperestrogenismo poderia ser considerado fator de proteção, ao invés de fator de risco.

Deste modo abriu-se uma discussão a respeito da TH ideal; e outros estudos prospectivos, aleatorizados e duplos-cegos foram realizados. O *Women's Health Initiative* (WHI), cujos resultados foram publicados em 2002, evidenciou aumento do risco cardiovascular, além de confirmar uma elevação da incidência de câncer de mama com TH, com o esquema utilizando estrogênios conjugados e acetato de medroxiprogesterona (Rossouw et al., 2002).

Outras vias de administração de TH, como a transdérmica, foram aventadas, passando-se a utilizar doses menores em virtude dos efeitos colaterais. Novos estudos clínicos surgiram e confirmaram os benefícios da TH de baixa dosagem. O principal deles é o chamado *Women's Hope Study*, um estudo prospectivo, multicêntrico, randomizado, envolvendo 1805 mulheres na menopausa com idade de 40 a 65 anos, e que foi desenvolvido para estudar os efeitos de diferentes tipos de estrogênios conjugados, tanto isolados como combinados com acetato de medroxiprogesterona, mostrando não ocorrer diferenças no tratamento dos sintomas climatéricos no metabolismo ósseo, no metabolismo glicídico e no sistema hemostático com terapia hormonal de baixa dose (Lobo, 2001, Utian et al., 2001).

Drogas alternativas também surgiram como a tibolona, um derivado da 19-nor-testosterona como a noretisterona, que possui, simultaneamente, efeitos estrogênicos, androgênicos e progestagênicos. Estudos em animais mostraram que esta droga possui 1/10 da atividade estrogênica do etinilestradiol, sendo considerado um estrogênio fraco. Tem atividade progestagênica menor que a noretisterona, com cerca de 1/8 de sua potência. A atividade androgênica corresponde a 1/20 da atividade androgênica da metiltestosterona, sendo um androgênio fraco e sem atividade mineralocorticóide (Van Der Vies, 1987).

Estudos *in vitro* demonstraram que a tibolona reduz a taxa de proliferação celular e a apoptose em células mamárias normais e de cânceres hormônio-dependentes, além de reduzir a produção local de estradiol em culturas celulares de mama, por meio de inibição das enzimas sulfatase e 17-beta-hidroxiesteróide, uma ação tecidual específica semelhante à do tamoxifeno (Gompel et al., 2002).

Estudos experimentais utilizando modelo animal, onde se induziu tumores pelo dimetil-benzantraceno, a tibolona através de seu isômero 3 alfa- OH- tibolona atuando sobre receptores estrogênicos, propiciam no tecido mamário inibição das enzimas sulfatase e 17-beta hidroxisteróide desidrogenase, responsáveis pela transformação de estrogênios menos potentes, como a estrona, em mais potentes como o estradiol (Chetrite e Pasqualine, 1997).

Estes dados demonstram que, diferentemente das demais drogas usadas na TH, a tibolona não só não estimularia a mama - não aumentando a incidência de câncer – como também poderia protegê-la. Entretanto, um estudo multicêntrico, observacional, internacional avaliando o uso da tibolona, publicou recentemente seus resultados com 1 milhão de mulheres, demonstrando que o risco relativo foi de 1,45 para câncer de mama entre as usuárias de tibolona (Million Women Study, 2003).

Desta maneira, os efeitos dos esteróides sexuais sobre a glândula mamária têm sido analisados por vários tipos de estudos, mas por envolver a interação sinérgica de proteínas, fatores de crescimento e outros hormônios além dos esteróides sexuais, sua reprodução tornou-se complexa. Pesquisas *in vitro* são de difícil reprodução em humano, pois além de serem complexas envolvem questões éticas e técnicas.

Vários fatores também podem atuar como variáveis confundidoras, interferindo nos resultados. Desta maneira, muitas das pesquisas sobre a ação dos esteróides sexuais na glândula mamária são desenvolvidas em modelos experimentais.

Assim, a ação dos esteróides sexuais tem sido amplamente estudada em ratas da linhagem Sprague-Dawley. Nessas ratas a glândula mamária passa por uma fase inicial de proliferação dependente de estrogênios, seguida de fase de diferenciação iniciada com os ciclos estrais e que se completam com a prenhez a termo (Russo e Russo, 1987). A susceptibilidade desses animais para o desenvolvimento de tumores mamários ou lesões pré-malignas tem propiciado a utilização desta linhagem de ratas em pesquisas sobre alterações histológicas decorrentes da ação dos esteróides sexuais nesta glândula.

Pesquisas utilizando o modelo experimental murino (Russo et al, 1983; 1989; 1990; Russo e Russo, 1991; 1996; Thonpson e Singh, 2000) merecem destaque, não só por estudarem a carcinogênese mamária em ratas associada a determinados fatores considerados de risco para o câncer de mama, como também por estabelecer correlação com a mama humana feminina. Considera-se o modelo murino um bom modelo experimental porque as mamas das ratas sofrem as mesmas modificações morfológicas e cinéticas que as humanas, sobretudo com relação a fatores como idade, fatores reprodutivos e ação dos esteróides sexuais. Além disso, propicia a obtenção da mama de forma integral, permitindo a avaliação histológica de forma bastante abrangente e representativa.

Vários pesquisadores passaram a utilizar o modelo murino para estudos de carcinogênese mamária e de alterações histológicas da mama com os esteróides sexuais. Russo e Russo (1991), ao estudarem a cinética celular por meio de mensuração da síntese de DNA na unidade ductal-terminal-lobular de ratas aos 45 dias -- que foram tratadas com esquemas de terapia de acetato de

medroxiprogesterona (AMP), noretinodrel associado ao mestranol, gonadotrofina coriônica e hormônio lactogênio placentário durante 21 dias - comparando com os grupos controle e de ratas ooforectomizadas, observaram que não houve proliferação celular pelo AMP em baixa dose, por gonadotrofina, como também pela associação de noretinodrel e mestranol, havendo proliferação pelo AMP em altas doses e pelo hormônio lactogênio placentário. Observaram, ainda, que a ooforectomia reduziu a atividade proliferativa e que a cinética celular não era regulada por níveis hormonais sistêmicos, e sim por mecanismos locais intermitentes relacionados ao grau de diferenciação de cada estrutura específica.

No mesmo ano, Russo et al., estudando a carcinogênese mamária em ratas sob influência da prenhez e da gonadotrofina coriônica, demonstraram que ambas as situações induziam à diferenciação da glândula mamária, que morfológicamente apresentava redução do número de unidades ducto-terminal-lobulares, havendo proteção contra a carcinogênese e, no caso da gonadotrofina, foi dose-dependente.

Guzman et al. (1999) estudaram ratas expostas à carcinogênese química, tratando-as com associação de estradiol e progesterona, que propicia níveis hormonais comparáveis aos encontrados durante a prenhez, e obtiveram alta eficácia do tratamento hormonal na proteção contra a carcinogênese química. Bartstra et al. (1998) estudando ratas de diversas idades tratadas com estradiol e expostas à carcinogênese observaram que o tratamento aumentou o risco de desenvolvimento de lesões cancerosas mamárias. Já, Thonpson e Singh (2000) observaram, nas mamas de ratas tratadas com benzantraceno, diversas lesões

pré-malignas classificando e comparando-as àquelas desenvolvidas nas mamas humanas femininas.

Assim, em virtude de contradições encontradas em relação à ação dos esteróides sexuais na mama e da importância que a TH assumiu em mulheres no período do climatério, quer no sentido terapêutico como no preventivo, mostra-se relevante pesquisar a ação desses esteróides no epitélio da glândula mamária, com o intuito de estudar as alterações histológicas decorrentes da ação de diferentes esquemas de TH, contribuindo para uma melhor orientação futura às mulheres no período do climatério e pós-menopausa.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da terapêutica com estrogênio, progestogênio e tibolona sobre as características histológicas das mamas de ratas não púberes, castradas, com e sem prole.

2.2. Objetivos específicos

- Descrever as alterações histológicas epiteliais observadas nas mamas de ratas após tratamento com esteróides sexuais em diferentes esquemas terapêuticos.
- Avaliar a associação destas alterações histológicas com o esquema terapêutico: estrogênio e progestogênio isolados, tibolona e a associação de estrogênio com progestagênio.
- Avaliar se ter ou não prole interfere na ocorrência destas alterações histológicas nas mamas de ratas submetidas à terapêutica com esteróides sexuais.

3. Publicação

Artigo 1 - **Alterações histológicas em mamas de ratas tratadas com esteróides sexuais**

Alterações histológicas em mamas de ratas tratadas com esteróides sexuais

Breast histologic changes in female rats treated with sex steroids

Dr. José Tadeu Vicelli¹, Profa. Dra. Maria Salete Costa-Gurgel², Prof. Dr. Marcelo Alvarenga²

1 - Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher da Universidade Estadual de Campinas.

2- Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Trabalho realizado no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

Rua Alexander Flemming, 101 – Cidade Universitária “Zeferino Vaz”

Barão Geraldo, Campinas, SP

CEP – 13083-881

Endereço para correspondência:

Profa. Dra. Maria Salete Costa-Gurgel

Departamento de Tocoginecologia – FCM/Unicamp

Rua Alexander Flemming, 101 – Cidade Universitária “Zeferino Vaz”

Barão Geraldo, Campinas, SP

CEP – 13083-881

Fone/fax: (19) 3788-9305

e-mail: salete@caism.unicamp.br

Resumo

Objetivo: avaliar as alterações histológicas em mamas de ratas submetidas à terapêutica com estrogênio, progestogênio e tibolona. **Métodos:** estudo experimental com 40 ratas, sendo 20 sem prole (grupo A) e 20 com prole (grupo B). Todas as ratas foram castradas e, após quatro semanas, alocadas aleatoriamente em subgrupos: A1, A2, A3, A4, A5 e B1, B2, B3, B4, B5. Os esteróides foram administrados da seguinte forma: A1 e B1 – benzoato de estradiol; A2 e B2 – acetato de medroxiprogesterona; A3 e B3 – benzoato de estradiol e acetato de medroxiprogesterona; A4 e B4 - tibolona; A5 e B5 - placebo. Após dez semanas de tratamento, os animais foram sacrificados e suas glândulas mamárias submetidas à análise histológica. Os parâmetros avaliados foram: proliferação epitelial, atividade secretora e atipias epiteliais nas unidades de ductos ou alvéolos terminais. A associação entre os achados histológicos e os esquemas terapêuticos foi avaliada através do *odds ratio* e intervalo de confiança de 95%. **Resultados:** alterações histológicas foram observadas em 29 ratas: hiperplasia moderada (52,5%), hiperplasia alvéolo-nodular (42,5%), atipia sem proliferação (35%), hiperplasia leve (32,5%), atividade secretora (20%) e hiperplasia severa (5%). Em ratas sem prole observou-se 1,3 mais chances, em relação ao grupo-controle, de apresentar hiperplasia alvéolo-nodular no grupo que recebeu estrogênio, hiperplasia moderada no grupo tratado com progestogênio, e hiperplasia alvéolo-nodular e atipia sem proliferação epitelial com a associação entre estrogênio e progestogênio. **Conclusões:** hiperplasia moderada e atipia epitelial associaram-se à terapia combinada de estrogênio e progestogênio, e o antecedente de prole reduziu a ocorrência destas alterações e de hiperplasia alvéolo-nodular.

Palavras-chave: mama, proliferação epitelial, esteróides sexuais, atipia epitelial.

Summary

Objective: to evaluate the association between breast histologic changes in female rats undergoing therapy with sex steroids. **Methods:** An experimental study was conducted of 40 castrated female non-pubertal rats, 20 had given birth (Group B) and 20 had no offspring (Group A). All rats underwent bilateral ovariectomy. After four weeks, these rats were randomly allocated to subgroups: A1, A2, A3, A4, A5 and B1, B2, B3, B4, B5. Steroids were given to subgroups as follows: A1 and B1 – estradiol benzoate; A2 and B2 – medroxyprogesterone acetate; A3 and B3 - estradiol benzoate and medroxyprogesterone acetate; A4 and B4 – tibolone; A5 and B5 - placebo. After 10 weeks of treatment, the animals were sacrificed and their mammary glands were analyzed. Histologic parameters evaluated were: epithelial cell proliferation, epithelial cells with secretory activity; and cell atypia in terminal duct units and buds or terminal alveoli. The association between microscopic analysis and diverse therapeutic regimens were analyzed by calculating the odds ratio and its respective 95% confidence interval. **Results:** Histologic changes were observed in 29 rats: moderate hyperplasia (52.5%), hyperplastic alveolar nodule (42.5%), epithelial atypia (35%), mild hyperplasia (32.5%), secretory activity (20%) and severe hyperplasia (5%). In rats with no offspring it could be found 1.3 times more hyperplastic alveolar nodule in the group treated with estradiol than control, moderate hyperplasia in those received medroxyprogesterone acetate and, hyperplastic alveolar nodule and epithelial atypia in the group treated with estradiol plus medroxyprogesterone acetate. In the rats with offspring it could be found 1.3 times more secretory activity with estradiol. **Conclusions:** epithelial hyperplasia and epithelial atypia without proliferation are strongly associated to combined therapy with estradiol plus medroxyprogesterone acetate, mainly in the rats without offspring.

Key-words: breast, epithelial proliferation, sex steroids, epithelial atypia.

Introdução

Nas últimas décadas estudos demonstraram os benefícios da terapia hormonal (TH) no climatério, representados pelo alívio de sintomas, prevenção e tratamento da atrofia urogenital e da osteoporose^{1,2,3}. Apesar dos benefícios da TH, o seu uso pode apresentar alguns efeitos indesejáveis como o aumento do risco de câncer de mama^{4,5,6}. Existem diversos esquemas de TH, porém os mais utilizados são o uso exclusivo de estrogênio ou a associação deste com progestagênio.

Além destes esteróides, a tibolona - um esteróide sintético - vem sendo utilizada para o tratamento dos sintomas climatéricos, possuindo ações estrogênica, progestagênica e androgênica⁷. Estudos experimentais demonstraram que, *in vitro*, a tibolona reduz a proliferação de células mamárias e a produção de estradiol⁸, enquanto *in vivo* reduz o volume tumoral de carcinomas mamários⁹. Contudo, estudos de coorte demonstraram aumento do risco relativo para desenvolvimento de câncer de mama em usuárias de tibolona^{6,10}. Dessa forma, permanece incerto o papel da tibolona na indução de alterações proliferativas e no risco de câncer de mama.

Hofseth et al. (1999)¹¹, estudando biópsias de mamas de mulheres na pós-menopausa, observaram que a proliferação do epitélio mamário foi maior em usuárias de TH, principalmente em usuárias de estrogênio e progestagênio, quando comparadas a um grupo de não usuárias de TH. Nesse mesmo estudo verificou-se que a maioria das alterações localizava-se na unidade ducto-lobular terminal, onde se desenvolve a maior parte dos cânceres de mama. Estudos experimentais também verificaram alterações proliferativas nas mamas de ratas ooforectomizadas submetidas à TH¹².

As glândulas mamárias humana e da rata exibem alterações proliferativas comparáveis quando submetidas à TH, suportando a validade do estudo dessas alterações no modelo murino na pós-menopausa¹². O uso do modelo animal permite a avaliação do efeito direto da TH sobre o tecido mamário, eliminando-se os efeitos de potenciais variáveis confundidoras que podem estar presentes em ensaios clínicos como idade, tempo de menopausa e tempo de uso de TH¹³.

Considerando esses aspectos realizou-se o presente estudo com o objetivo de avaliar a associação de alterações histológicas epiteliais nas mamas de ratas castradas

após tratamento exclusivo com estrogênio, progestagênio e tibolona e com a associação de estrogênio-progestagênio segundo o esquema terapêutico e se o antecedente de prole interfere nesta associação.

Materiais e Métodos

Trata-se de estudo experimental, no qual foram utilizadas 40 ratas (*Rattus Norvegicus*) da linhagem Wistar com 250 dias de vida, sendo que 20 já procriaram e amamentaram suas proles (grupo B) enquanto que as outras 20 não tiveram prenhez (grupo A). As ratas foram castradas sob anestesia geral com injeções intraperitoneais de cetamida (Vetaset^R. Fort Dodge Laboratories) e xilazina (Rompum^R Bayer) ambas na dose de 50mg/kg^{14,15}, ficando em observação por 3 semanas a fim de esgotar a ação dos esteróides ovarianos endógenos e entrarem em fase de hipoestrogenismo, permitindo que o tecido mamário fique em repouso¹⁶. O hipoestrogenismo foi confirmado antes do início da terapêutica pela realização de esfregaços vaginais¹⁷.

Os tratamentos hormonais foram realizados por dez semanas, sendo que as dosagens foram calculadas segundo tabela de cálculo halométrico, que converte a dose utilizada em humano para a correspondente na espécie animal utilizada no estudo:

1-benzoato de estradiol (E₂), 37,6 µg/rata/7 dias diluído em óleo de amendoim estéril, que é o veículo original do produto, de tal forma que a dosagem está contida em 0,1ml da solução; 2-acetato de medroxiprogesterona na forma de depósito na dosagem de 11, 28mg/rata/23 dias (AMP) diluído em solução fisiológica, de tal forma que a dosagem está contida em 0,1ml da solução final; 3-benzoato de estradiol (E₂) 37,6 µg/rata/7 dias + acetato de medroxiprogesterona na forma de depósito na dosagem de 11, 28 mg/rata/23 dias (AMP) 4-tibolona, 200µg/rata/dia. Os estrogênios e progestogênios foram administrados por via subcutânea na região dorsal dos animais, uma vez ao dia. A tibolona foi administrada por via oral, uma vez ao dia, diluída em água para ser administrada por gavagem.

Cada animal foi alocado, aleatoriamente, em dez subgrupos de quatro ratas (A1, A2, A3, A4, A5 e B1, B2, B3, B4, e B5) e assim designados segundo o tipo de

tratamento: A1 e B1 – Benzoato de estradiol e placebo para o AMP (solução fisiológica); A2 e B2 – Acetato de medroxiprogesterona e placebo para E₂ (óleo de amendoim); A3 e B3 – Benzoato de estradiol e acetato de medroxiprogesterona; A4 e B4 – Tibolona e placebo (óleo de amendoim e solução fisiológica); A5 e B5 – Placebo (solução fisiológica e óleo de amendoim).

Os animais permaneceram no biotério do Laboratório de Pesquisas Bioquímicas do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) em caixas com iluminação de 12 horas/dia e temperatura constante, além de água e alimentação *ad libitum*. Os quatro animais de cada subgrupo foram mantidos em uma única caixa com cuidados diários e limpeza. Ao final de dez semanas todas as ratas foram sacrificadas em câmara de CO₂¹⁸. Em seguida foram dissecadas e removidas as segundas glândulas mamárias torácicas, juntamente com a pele que as recobre. Todo o material obtido foi imediatamente fixado em formalina a 10%, tamponado (pH 7,4) e enviado ao Laboratório de Patologia Experimental do CAISM/ Unicamp. Após 24 horas de fixação o tecido mamário foi recortado, submetido ao processamento histológico, incluído em blocos de parafina e recortado em micrótomo de 4µ de espessura, colocado em várias lâminas e corado pela técnica de hematoxilina – eosina (HE).

Foram avaliados todos os blocos correspondentes à totalidade das mamas de cada rata pelo mesmo patologista, sem que este conhecesse a terapêutica a que cada rata havia sido submetida, utilizou-se um microscópio Nikon E 200 com objetiva de 40 vezes. Foram analisados a proliferação epitelial e atípicas celulares nas unidades de ductos terminais e os brotos ou alvéolos terminais, sendo que o exame foi realizado baseando-se em um sistema de graduação histopatológico para anomalias epiteliais induzidas por 7,12- dimetilbenzantraceno (DMBA) em tecido mamário de fêmeas de ratos. O sistema de graduação histopatológica referente à hiperplasia epitelial e células epiteliais com atividade secretora seguiu critérios padronizados e estabelecidos previamente¹⁹, e foram classificados conforme a seguinte descrição: normal; atipia sem proliferação epitelial; HEB 1 - hiperplasia epitelial da unidade ductal terminal lobular leve; HEB 2 – hiperplasia epitelial da unidade ductal terminal lobular moderada; HEB 3 - hiperplasia

epitelial da unidade ductal terminal lobular severa; HAN - hiperplasia alvéolo-nodular; atividade secretora em células epiteliais. Para a análise dos dados foram feitas tabelas de contingência e calculado o *odds ratio* com respectivo intervalo de confiança de 95%, sendo utilizado o programa de computador SAS, 2001.

Esse estudo seguiu as normas da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia (IB) da Unicamp, sendo aprovado pelo protocolo de nº 651-1.

Resultados

Ao final de dez semanas de terapia hormonal ou placebo, 29 ratas apresentaram alterações epiteliais focais em suas glândulas mamárias, sendo: hiperplasia epitelial da unidade ductal terminal lobular leve ou HEB 1 em 13 casos (32,5%), hiperplasia epitelial da unidade ductal terminal lobular moderada ou HEB 2 em 21 casos (52,5%), hiperplasia epitelial da unidade ductal terminal lobular severa ou HEB 3 em dois casos (5%), hiperplasia alvéolo-nodular ou HAN em 17 casos (42,5%), atipia sem proliferação epitelial em 14 casos (35%) e atividade secretora (AS) em 8 casos (20%). Onze ratas (27,5%) apresentavam mamas histologicamente normais ao final do estudo (Figura 1).

Analisando as alterações histológicas segundo o antecedente de prole e de acordo com o esquema terapêutico, observou-se que, no grupo sem prole, no subgrupo tratado com E2 todas as ratas desenvolveram HEB 2 ou 3, HAN e um caso apresentou atipia epitelial sem proliferação. No subgrupo tratado com AMP isoladamente todas as ratas apresentaram HEB 2, três delas atipia sem proliferação epitelial, dois casos de HAN e dois casos de atividade secretora. No subgrupo tratado com a associação de estrogênio e progestogênios todas as ratas desenvolveram HEB 2 ou 3, HAN e atipia sem proliferação epitelial. No subgrupo tratado com tibolona observaram-se duas ratas sem alterações mamárias e as outras duas apresentaram HEB 2, atipia sem proliferação e atividade secretora. No grupo placebo, três ratas apresentaram apenas foco único de HEB 1 (Tabela 1).

Analisando as alterações histológicas observadas no grupo com prole (grupo B) notamos que com o tratamento exclusivo com estrogênio sete ratas desenvolveram HEB 1 ou 2 e quatro delas apresentaram atividade secretora. Nenhuma atipia celular foi observada. As ratas tratadas com AMP exclusivo apresentaram padrão semelhante em relação às HEB, porém houve três casos de HAN e uma rata desenvolveu atipia sem proliferação epitelial. Já no subgrupo tratado com associação de estrogênio com progestogênios, observaram-se índices de 100% para a HEB 2, HAN e atipia sem proliferação. As ratas tratadas com tibolona desenvolveram apenas HEB 1 em três casos e 100% das ratas no subgrupo placebo tinham mamas histologicamente normais (Tabela 1).

Ao se avaliar as chances de desenvolvimento das alterações histológicas segundo o esquema terapêutico, observou-se que dentre as ratas sem prole (grupo A), aquelas expostas isoladamente ao E2 tiveram, pelo menos, 1,3 mais chances de desenvolver HAN em comparação ao grupo-controle. Aquelas submetidas à terapêutica com AMP isolado tiveram aumento da chance de mesma magnitude para desenvolvimento de HEB 2. Já as ratas tratadas com E2 + AMP tiveram aumento significativo, e de mesma magnitude, para o desenvolvimento de atipias sem proliferação epitelial e HAN. O subgrupo tratado com tibolona não apresentou aumento da chance de desenvolver qualquer alteração histológica mamária em relação ao grupo-controle (Tabela 2). A mesma análise feita no grupo de ratas com prole (grupo B) demonstrou haver associação entre a terapêutica de estrogênio e progestogênios combinados com a presença de atividade secretora nas células epiteliais (Tabela 3).

Discussão

Nas condições do presente estudo houve associação dos esteróides sexuais com proliferação e atipias epiteliais e, ainda, com atividade secretora. Efeito este demonstrado tanto com os estrogênios quanto com os progestogênios, embora o maior efeito tenha sido observado nos animais que receberam a associação de estrogênios com progestogênios.

As alterações epiteliais avaliadas neste estudo foram, principalmente, proliferação epitelial e atipias celulares nas unidades de ductos ou alvéolos terminais, e atividade secretora, baseando-se no sistema de graduação histopatológico para anomalias epiteliais induzidas por 7,12- dimetilbenzantraceno (DMBA) em tecido mamário de fêmeas de ratos ¹⁹. Sistema muito semelhante é utilizado na maioria dos estudos *in vivo* que se utilizaram do modelo murino ^{12, 20}.

É possível fazer uma analogia entre as alterações descritas nas mamas de ratas com as observadas na mama humana. A assim denominada HEB (hiperplasia epitelial da unidade ductal terminal lobular) pode ser graduada em 1, 2 e 3, correspondendo possivelmente às hiperplasias leve, moderada e grave ou severa. A HEB 1 corresponderia, na mulher, à hiperplasia ductal típica (HDT) leve, alteração considerada sem risco para câncer invasor; a HEB 2, à HDT moderada, alteração considerada de risco leve (duas vezes) para o câncer invasor; e a HEB 3, à hiperplasia ductal atípica (HDA), lesão associada a risco cinco vezes aumentado para o câncer invasor da mama ²¹.

Observou-se, também, a presença de atipias celulares sem proliferação epitelial muito semelhantes às alterações designadas de atipia plana na mama humana feminina segundo os critérios da OMS, sendo que estas não haviam sido descritas anteriormente em ratas. Esta entidade é caracterizada por células epiteliais nativas constituídas em camadas simples ou por três a cinco camadas e com atipias leves. Segundo a classificação da OMS, seria uma lesão intermediária entre a HDT e HDA, porém não há na literatura evidências suficientes para estimativa de risco relacionado com câncer invasor ²¹.

Em humanos, a atipia epitelial plana tem sido denominada por outros patologistas como alteração ou hiperplasia de células colunares com atipias ²²⁻²³ ou, ainda CAPSS – “columnar alteration with prominent apical snouts and secretions” ²⁴ - traduzida como alteração colunar epitelial com secreção do tipo decapitação ²⁵. Atualmente, o nível de risco subsequente para o desenvolvimento de carcinoma invasivo associado com estas lesões com atipias é desconhecido. No entanto, já se encontram estudos que verificaram que o risco relativo das lesões colunares em geral foi 2,08 vezes maior que os controles e, para as lesões colunares com atipia, o risco foi de 2,32 ²⁶.

A hiperplasia alvéolo-nodular (HAN), lesão epitelial caracterizada por área nodular bem delimitada, constituída de agrupamentos de ductulos e alvéolos terminais, cujas células caracterizam-se pelo citoplasma vacuolizado semelhante a células apócrinas, apesar da denominação “hiperplasia”, acredita-se que reflita atividade secretora no epitélio. É alteração descrita apenas em ratas e sem correspondência na mama humana¹⁹. No entanto, estudos mais recentes em modelo murino evidenciaram associação dessa entidade com o desenvolvimento de carcinoma mamário induzido por DMBA, podendo ser considerada como potencial lesão precursora de neoplasias²⁷. Não existem evidências até o momento de que essas suposições possam ser correlacionadas em modelo humano.

Estudos anteriores avaliaram a ação dos esteróides sexuais em mamas de ratas e as doses utilizadas foram muito variadas e muitas vezes elevadas, até com o objetivo de induzir alterações pré-malignas ou malignas²⁸. Como se sabe, o estrogênio pode ser mitogênico em doses elevadas²⁹ e poderia alterar o índice mitótico falseando a verdadeira ação dos esteróides sexuais nas mamas, quando as mesmas fossem dadas em doses fisiológicas. Essa pesquisa objetivou-se a descrever as alterações histológicas encontradas nas mamas com as variações de doses análogas às usadas por mulheres climatéricas, correlacionando as doses dos esteróides sexuais usados na mulher ao modelo murino, através de cálculo halométrico, equacionando a dose de acordo com o peso e o metabolismo animal³⁰⁻³¹. Além disso, as ratas foram selecionadas de tal forma que o número de ciclos estrais que tiveram foram correspondentes aos da mulher no período da menacme, para que suas mamas sofressem as ações dos hormônios endógenos dos ciclos estrais desde a puberdade até a época em que foram castradas. Tentou-se, desta forma, simular a seqüência de eventos ao longo da vida reprodutiva da mulher.

Neste estudo houve associação dos estrogênios com a hiperplasia das células epiteliais mamárias. Isto ficou demonstrado no grupo de ratas que usou estrogênio apresentando muito mais HEB que o grupo-controle. Não se observou associação dos estrogênios isoladamente com atipias celulares em qualquer dos grupos de animais, com ou sem prole, embora na literatura existam estudos que evidenciam ação genotóxica do 17 B estradiol sobre as células mamárias^{32,33}.

Em estudos experimentais, com modelos animais observou-se que a progesterona não é protetora da carcinogênese mamária, evidenciando a ausência de bloqueio da atividade proliferativa estrogênica por ação do progestagênio, aliada ao estímulo proliferativo epitelial^{11,34,36}. Observou-se, ainda, maior atividade mitótica na fase lútea^{29, 37, 38}.

Em ampla revisão sobre a ação da progesterona na proliferação de células epiteliais mamárias, concluiu-se que esse hormônio pode agir estimulando a proliferação, a diferenciação celular ou levar à morte celular programada, dependendo da interação com vários fatores secundários, muitos ainda desconhecidos¹¹.

Os resultados deste estudo mostram que o esquema terapêutico de progestagênio quando utilizado isoladamente também causou aumento da atividade proliferativa celular mamária que foi estatisticamente significativo em relação ao grupo-controle e equivalente ao grupo que usou esquema terapêutico com estrogênio. Isso leva a inferir que, neste estudo, o progestagênio potencializou o efeito estrogênico e que não houve necessidade da ação estrogênica prévia para sua ação. Todavia, não se pode afirmar que o progestagênio reverte a ação dos estrogênios ou que necessite da ação prévia destes para agir na mama.

De fato, Bässler (1970)³⁹ observou que a administração de AMP induziu maior proliferação de células acinares e nossos achados estão de acordo com a literatura, que propõe que o estrógeno atuaria estimulando a proliferação celular e o progestágeno faria o mesmo, além de induzir a diferenciação quando há ação estrogênica^{40,41}. Ainda, a progesterona aumentaria a atividade mitótica, à semelhança da ação estrogênica e, quanto maior a atividade proliferativa maior a chance de surgir erro genético aleatório ou de permitir a manifestação de uma alteração genômica induzida por um carcinógeno⁴². Os resultados desta nossa pesquisa estão de acordo com tais informações visto que a progesterona aumentou a proliferação celular.

Os esteróides sexuais mesmo que acarretem a diferenciação celular, denotada pela presença de secreção, ao estimularem a atividade proliferativa mamária podem propiciar manifestação das alterações carcinogênicas celulares. Assim, se o processo de proliferação e diferenciação mamária ocorrer antes da ação do agente carcinogênico diminui-se a chance de desenvolvimento do câncer no futuro⁴³, pois menos células

indiferenciadas estarão presentes. Tal fato pode explicar a observação de que o AMP administrado em ratas na fase puberal diminui o risco de desenvolvimento tumoral, enquanto a administração após essa fase não propicia o mesmo efeito protetor⁴⁴. O mesmo explica a proteção conferida pela primeira gestação a termo em idade precoce. Neste estudo, o fato de ter prole parece ter influenciado de forma significativa a resposta celular aos esteróides sexuais, pois no grupo sem prole houve associação com três dos quatro esquemas terapêuticos utilizados, o AMP associado com HEB 2 e os esquemas E2 e E2+AMP associados com HAN, lesão de característica benigna e que denota uma resposta do tipo secretora, por ter ocorrido em ácino, um tecido mais diferenciado. Ainda nesse grupo sem prole, a combinação E2 + AMP associou-se à atipia epitelial.

No estudo atual, a tibolona não mostrou associação com HEB ou atipia celular mamária em qualquer dos grupos estudados. Esses resultados encontram respaldo em estudos sobre a ação da tibolona na mama, por meio de células normais obtidas de mastoplastia redutora, de mulheres com idade inferior aos 25 anos. Após sete dias sob ação da tibolona, ocorreu lenta diminuição na taxa de proliferação das células epiteliais⁴⁵.

Muito embora este estudo não tenha objetivado avaliar risco para câncer e sim alterações histológicas nas mamas, podemos inferir que a proliferação celular, assim como as atipias encontradas com alguns esquemas terapêuticos, possam estar relacionadas com risco aumentado para câncer de mama. Assim sendo, o risco poderia estar relacionado à terapêutica de associação de estrogênios com progestogênios e com a de estrogênios isolados. Já com relação à tibolona, não houve associação com proliferação ou atipia celular.

A maior contribuição deste estudo talvez seja a de subsidiar maiores informações sobre a ação destas substâncias sobre o tecido mamário normal e, com isso, nortear a escolha terapêutica nas mulheres na menopausa. Isso parece ser de fundamental importância nos dias atuais onde se discute esquemas com associações progestogênicas como, por exemplo, a trimestral ou quadrimestral, visando minimizar a exposição a este grupo de esteróide⁴⁶. Estudam-se, também, baixas dosagens de esteróides sexuais e associações de estrogênio com progestogênios de ação específica para seus receptores, e isso deve ser encarado como um incentivo à pesquisa e à disponibilização de substâncias

que poderiam agir como progestogênios no endométrio e não na mama, ou seja, seriam moduladores seletivos de receptores de progesterona, à semelhança dos moduladores seletivos de receptores de estrógeno⁴⁷.

Conclusões

A hiperplasia epitelial e atipia sem proliferação epitelial associaram-se, mais intensamente, à terapia combinada de estradiol e acetato de medroxiprogesterona, principalmente no grupo de ratas sem antecedente de prole.

Referências Bibliográficas

1. Maclenan A, Lester S, Moore. Oral oestrogen replacement therapy versus placebo for hot flushes (Cochrane Review). In: The Cochrane Libray, Issue 3, 2002. Oxford: Update Software.
2. Torgerson DJ, Bell-Ssyer SE. Hormone replacement therapy and prevention of nonvertebral fractures: a meta-analysis of randomized trials. *JAMA* 2001; 285:2891-7.
3. Oldenhave A, Jaszmann LJ, Haspeles AA, Everaerd WT. Impact of climateric on well-being: a survey based on 5213 women 39 to 60 years old. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 168:772-780.
4. Collaborative Group On Hormonal Factors In Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy; collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies 52705 women with breast cancer and 108411 women without breast cancer. *Lancet* 1997; 50:1047-59.
5. Writing Group for the WHI Investigators. Risk and benefits of estrogen plus progestin en healthy post menopausal women: principal results. From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002; 288:321-3.
6. Million Women Study Collaborators Breast cancer and hormone- replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 2003; 362:419-27.
7. Rymer JM. The effects of tibolone. *Gynecol Endocrinol* 1998;12:213-20.

8. Gompel A, Chaouat M, Jacob D, Perrot JY, Kloosterboer HJ, Rostene W. In vitro studies of tibolone in breast cells. *Fertil Steril* 2002; 78:351-9.
9. Kloosterboer HJ, Schoonen W, Deckers G. Effects of progestagens and org od 14 in vitro and in vivo tumor models. *J Steroid Biochem* 1994; 49:311-8.
10. Stahlberg C, Pedersen AT, Lynge E, Andersen ZJ, Keiding N, Hundrup YA et al. Increased risk of breast cancer following different regimens of hormone replacement therapy frequently used in Europe. *Int J Cancer* 2004; 109: 721-7.
11. Hofseth LJ, Raafat AM, Osuch JR, Pathack DR, Slomski CA, Haslam SZ. Hormone replacement therapy with estrogen or estrogen plus medroxyprogesterone acetate is associated with increased epithelial proliferation in the normal postmenopausal breast. *J Clinical Endocrinology & Metabolism* 1999, 84: 4559-65.
12. Russo J, Russo IH. Role of hormones in cancer e initiation and progression. *J Mamary Gland Biol Neoplasia* 1998; 3:49-61.
13. Clarkson TB, Appt SE, Wood CE, Cline JM. Lessons to be learned from animal studies on hormones and breast. *Maturitas* 2004; 49: 79-89.
14. Yang NN, Bryant HU, Hardikar S, Sato M, Galvin RJS, Glasebrook AL. et al. Estrogen and raloxifene stimulate transforming growth factor β 3 gene expression in rat bone: a potential mechanism for estrogen-or roloxifene - mediated bone maintenance. *Endocrinology* 1996; 137:2075-84.
15. Bolscher MT, Netelenbos JC, Barto R, Buuren LM, Vijgh WJF. Estrogen regulation of intestinal calcium absorption in the intact and ovariectomized adult rat. *J Bone Min Res* 1999; 14:197-202.
16. Ciocca DR. Parente A, Russo J. Endocrinologic milieu and susceptibility of the rat mamary gland to carcinogenesis. *Am J Pathol* 1982; 109:47-56.
17. Shorr E. A new technic for staining vaginal smears: III, a single differential stain. *Science* 1941; 94:545-6.
18. Black LJ, Sato M, Rowley ER, Magee DE, Bekele A, Willians DC. et al. Raloxifene (LY 139481 HCL) prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hipertrophy en ovariectomized rats. *J Clin Invest* 1994; 93:63-9.

19. Alvarenga M, Cavalcanti TC, Tahin QS. Histopathologic grading system for epithelial abnormalities induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) in female rat mammary tissue. *Breast Dis* 1989; 2:71-9.
20. Russo J, Russo IH. Experimentally induced mammary tumors in rats. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 39:7-20.
21. World Health Organization. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Lyon, IARC Press 2003.p64-7.
22. Rosen PP. Rosen's Breast Pathology 2nd ed, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
23. Schnitt SJ. The diagnosis and management of pre-invasive disease. Flat epithelial atypia: classification, pathologic features and clinical significance. *Breast Cancer Res* 2003; 5:263-8.
24. Fraser JL, Raza S, Chorny K; Connolly JL, Schnitt SJ. Columnar alteration with prominent apical snouts and secretions. *Am J Surg Pathol* 1998; 22:1521-27.
25. Alvarenga M. Tumores da mama. In: Billis A, Vassallo J (Ed). *Patologia Diagnóstica de Tumores*. Campinas. 2004. 205-98
26. Shaaban AM, Sloane JP, West CR, Moore FR, Jarvis C, Williams EMI, Foster CR. Histopathologic types of benign breast lesions and the risk of breast cancer. *Am J Surg Pathol* 2002; 26:421-30.
27. Thompson HJ, Singh M. Rat models of premalignant breast disease. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2000; 5:409-20.
28. Briand R. Hormone dependent mammary tumors in mice and rats as a model for human breast cancer. *Anticancer Res*. 1983; 3:273.
29. Soderqvist G, Isaksson E, Schoiultz B, Carlstrom K, Tani E, Skoog L. Proliferation of breast epithelial cells In healthy women during the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176:123-8.
30. Sedgwick CJ. Allometric scaling and emergency care: the importance of body size. In: Fowler, M.E. *Zoo & wild animal medicine*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1993.

31. Pachaly, JR, Brito HFV. Interspecific allometric scaling. In: Fowler, M.E.; Cubas, Z.S. *Biology, medicine, and surgery of South American wild animals*. Iowa State University: Press/Ames, 2001. p475-80.
32. Russo J, Russo IH. Genotoxicity of steroidal estrogens. *Trends Endocrinol Metab* 2004; 5:211-4.
33. Lieher JG. Genotoxicity of the steroidal oestrogens oestrone and oestradiol: possible mechanism of uterine and mammary cancer development. *Human Reprod Update* 2001; 7:273-81.
34. Shi YE, Liu YE, Lippman ME, Dickson RB. Progestins and antiprogestins in mammary tumour growth and metastasis. *Hum Reprod* 1994; 9:162-73 Supplement 1.
35. Koukoulis GA. Hormone replacement therapy and breast cancer risk. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 900:422-8.
36. Simpson HW, Cornélissen G, Katinas G, Halberg F. Meta-analysis of sequential luteal-cycle-associated changes in human breast tissue. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 63:171-3.
37. King RJB. A discussion of roles of o estrogen and progestin in human mammary carcinogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991; 39:811-8.
38. Nazário ACP, Lima GR, Simões MJ, Novo NF. Cell kinetic of the human mammary lobule during the proliferative and secretory phase of the menstrual cycle. *Bull Assoc Ande* 1995; 79:23-7.
39. Bässler R. The morphology of hormone induced structural changes in the female breast. *Curr Top Pathol*, 53:1-89, 1970.
40. Mustafa IA, Bland KI. Physiologic effects of steroid hormones and postmenopausal hormone replacement on the female breast cancer risk *Ann Surg* 1998; 228: 638-51.
41. Chen CL, Weiss, NS, NEWCOMB P, BARLOW W, White E. Hormone replacement therapy in relation to breast cancer *JAMA* 2002; 287 :734-41
42. Russo J, RUSSO I H. Differentiation and breast cancer. *Medicina (B.Aires)* 1997; 57:81-91. Supplement II.
43. Grubbs CJ, Farnell DR, Hill DL, MCDONOUGH K C. Chemoprevention of N-nitroso- methylurea-induced mammary cancers by pretreatment with 17 β - estradiol and progesterone. *J Natl Cancer Inst* 1985; 74: 927-31.

44. Russo J, Russo I. Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. *Lab Invest* 1987; 57:112-37.
45. Gompel A, Kandouz M, Siromachkova A. The effect of tibolona on proliferation, differentiation and apoptosis in normal breast cells. *Gynecol Endocrinol*,1997:(Suppl 1):7-9.
46. Bortoletto C C R, Gonçalves W J, Baracat E C, Rodrigues de Lima G, Giusa- Chiferi M G. Morphological evaluation of the endometrium of postmenopausal estrogen treatment and taking medroxyprogesterone acetate at 2,3 and 4 month. *Acta Obstet. Gynecol Scand* 1997;76: 76.
47. Black L J, Sato M, Rowley E R, Magee D E, Bekele A, Williams D C, et al. Raloxifene (LY 139481 HCl) prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats. *J Clin Invest* 1994; 93: 63-69.

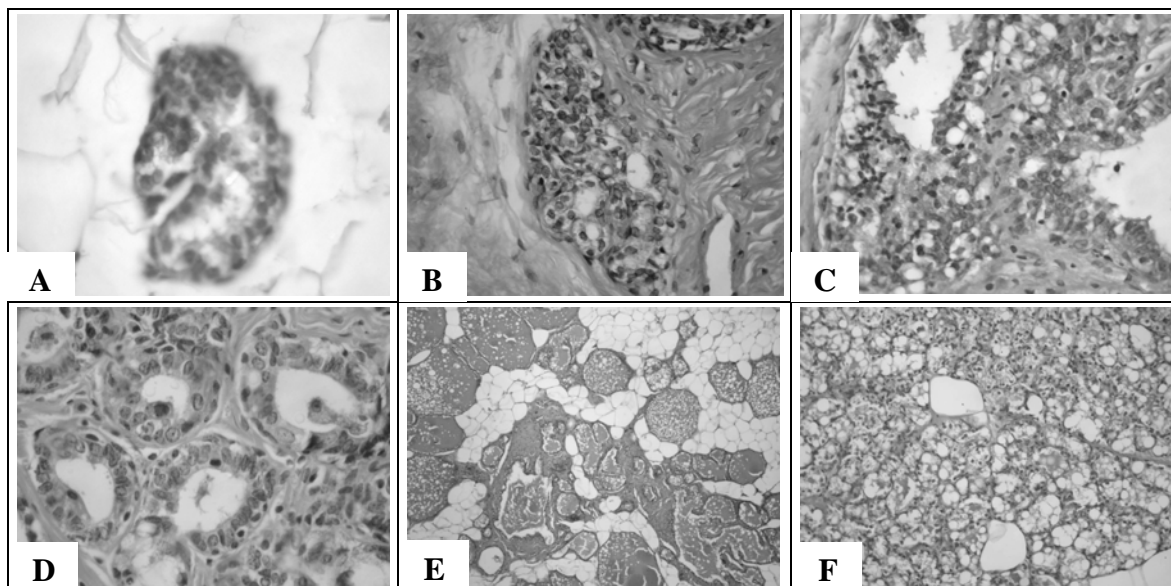


Figura 1 – Alterações histológicas observadas em mamas de ratas castradas e submetidas à terapêutica com esteróides sexuais e tibolona. A- HEB 1; B- HEB 2; C- HEB 3; D- atipia sem proliferação epitelial; E-HAN; e F- atividade secretora.

TABELA 1: DISTRIBUIÇÃO DAS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM MAMAS DE RATAS DE ACORDO COM A TERAPÊUTICA COM ESTERÓIDES SEXUAIS E SEGUNDO O ANTECEDENTE DE PROLE (N = 40)

Alterações Histológicas	E ₂		AMP		E ₂ +AMP		T		Placebo		Total	
	Prole		Prole		Prole		Prole		Prole		Prole	
	Sem (4)	Com (4)	Sem (4)	Com (4)	Sem (4)	Com (4)	Sem (4)	Com (4)	Sem (4)	Com (4)	Sem (20)	Com (20)
Normal	0	0	0	0	0	0	2	1	1	4	3	5
HEB 1	0	4	0	3	0	0	0	3	3	0	3	10
HEB 2	3	3	4	2	3	4	2	0	0	0	12	9
HEB 3	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0
Atipia	1	0	3	1	4	4	1	0	0	0	9	5
HAN	4	0	2	3	4	4	0	0	0	0	10	7
AS	0	4	2	1	0	0	1	0	0	0	3	5

HEB – hiperplasia epitelial da unidade ductal terminal lobular

HAN - hiperplasia alvéolo-nodular

AS – Atividade secretora

(n)

TABELA 2: ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM MAMAS DE RATAS SEM PROLE SUBMETIDAS À TERAPÊUTICA COM ESTERÓIDES SEXUAIS (n = 20) - OR (IC 95%)

Alterações Histológicas	Tratamentos				
	E ₂ (n =4)	AMP (n =4)	E ₂ + AMP (n =4)	T (n =4)	Placebo (n =4)
HEB 1	-	-	-	-	1,0
HEB 2	21,0 (0,6 – 690,0)	81,0 (1,3 - 5046,7)	21,0 (0,6 - 690,0)	9,0 (0,3 - 271,7)	1,0
HEB 3	3,9 (0,1 – 126,7)	-	3,9 (0,1 - 126,7)	-	1,0
Atipia	3,9 (0,1 – 126,7)	21,0 (0,6 - 690,0)	81,0 (1,3 - 5046,7)	3,9 (0,1 - 126,7)	1,0
HAN	81,0 (1,3 – 5046,7)	9,0 (0,3 - 271,7)	81,0 (1,3 - 5046,7)	-	1,0
AS	-	9,0 (0,3 - 271,7)	-	3,9 (0,1 - 126,7)	1,0

HEB - hiperplasia epitelial da unidade ductal terminal lobular

HAN – hiperplasia alvéolo-nodular

AS – atividade secretora

TABELA 3: ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM MAMAS DE RATAS COM PROLE SUBMETIDAS À TERAPÊUTICA COM ESTERÓIDES SEXUAIS (n = 20) - OR (IC 95%)

Alterações Histológicas	Tratamentos				
	E ₂ (n =4)	AMP (n =4)	E ₂ + AMP (n =4)	T (n =4)	Placebo (n =4)
HEB 1	3,9 (0,1 – 126,7)	21,0 (0,6 – 690,0)	-	21,0 (0,6 – 690,0)	1,0
HEB 2	21,0 (0,6 – 690,0)	9,0 (0,3 – 271,0)	3,9 (0,1 – 126,7)	-	1,0
HEB 3	-	-	-	-	1,0
Atipia	-	3,9 (0,1 – 32,3)	3,9 (0,1 – 126,7)	-	1,0
HAN	-	21,0 (0,6 – 690,0)	81,0 (1,3 – 5046,7)	-	1,0
AS	81,0 (1,3 – 5046,7)	3,9 (0,1 – 32,3)	-	-	1,0

HEB - hiperplasia epitelial da unidade ductal terminal lobular

HAN - hiperplasia alvéolo-nodular

AS - atividade secretora

4. Conclusões

- As alterações histológicas mais frequentes foram: hiperplasia epitelial moderada, seguida pela hiperplasia alvéolo-nodular; atipia epitelial sem proliferação e hiperplasia epitelial leve.
- A hiperplasia moderada associou-se à terapia isolada, tanto de estradiol como de acetato de medroxiprogesterona, porém a associação foi maior com o uso combinado destes esteróides. A atipia epitelial sem proliferação também se associou à terapia combinada.
- O antecedente de prole diminuiu a chance de ocorrência: de hiperplasia alvéolo-nodular com a terapia isolada de estradiol; de hiperplasia moderada com o uso de AMP isolado; e de atipia sem proliferação epitelial e de hiperplasia alvéolo-nodular com a terapia combinada de estradiol e AMP.

5. Referências Bibliográficas

Bartstra RW, Bentvelzen PAJ, Zoetelief J, Mulder AH, Broerse JJ, Bekkum DW. The influence of estrogen treatment on induction of mammary carcinoma in rats single-dose gamma irradiation at different ages. **Radiat Res** 1998; 150:451-8.

Bergkvist L, Adami HO, Persson I, Hoover R, Schairer C. The risk of breast cancer after estrogen and estrogen-progestin replacement. **N Engl J Med** 1989; 321:293-7.

Chetrite G, Pasqualine JR. Steroid sulphotransferase and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities in Ishikawa human endometrial adenocarcinoma cells. **J Steroid Biochem Mol Biol** 1997; 61:27-34.

Christiansen C. Hormone replacement therapy for the postmenopausal woman. **Maturitas** 2001; 38:51-5.

Cohen SM, Ellwein LM. Cell proliferation in carcinogenesis. **Science** 1990; 249:1007-11.

Colditz GA, Hankinson SE, Hunter DJ, Willett WE, Manson JE, Stampfer MJ. Et al. The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women. **N Engl J Med** 1995; 332:1589-93.

Collaborative Group On Hormonal Factors In Breast Cancer Breast cancer and hormone replacement therapy; collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies 52705 women with breast cancer and 108411 women without breast cancer. **Lancet** 1997; 50:1047-59.

DiSaia PJ, Crasman WT. Breast diseases. In: DiSaia PJ, Crasman WT. Clinical gynecologic oncology. 5^a ed., St. Louis, Missouri: Mosby-Year Book Inc.; 1997. p.382-428.

Dupon W, De Page DL. Menopausal estrogen replacement therapy And breast cancer. **Arch Intern Med** 1991; 151:67-72.

Formby B, Wiley TS. Bcl-2, Survivin and variant CD44, v7-v10 are down regulated and p53 is up regulated in breast cancer cell, by progesterone: inhibition of cell growth and induction of apoptosis. **Mol Cell Biochem** 1999; 202:53-61.

Genazzani AR, Gadducci A, Gambacciani M. Controversial issues in climacteric medicine: II. Hormone replacement therapy and cancer. **Climacteric** 2001; 4:181-93.

Going JJ, Anderson TJ, Battersby S, Macintyre CCA. Proliferative and secretory activity in human breast during natural and artificial menstrual cycles. **Am J Pathol** 1988;130:193-204.

Gompel A, Chaouat M, Jacob D, Perrot JY, Kloosterboer HJ, Rostene W. In vitro studies of tibolone in breast cells. **Fertil Steril** 2002; 78:351-9.

Gorski J, Toft D, Shyamala C, Smith D, Notides A. Hormone receptors: studies on the interaction of estrogen with the uterus. **Recent Prog Horm Res** 1968 24:45-80.

Guzman RC, Yang J, Rajrumar L, Thordarson G, Chen X, Nandi S. Hormonal prevention of breast cancer: mimicking the protective effect of pregnancy. **Proc Natl Acad Sci** 1999; 96:2520-5.

Hardy EE, Pinotti JA, Osis MJD, Faundes A. Reproductive variables and breast cancer risk: a case control study carried out in Campinas, São Paulo. **Bol of Sait Panam** 1993; 152:93-102.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia Estatística. Diretoria de Pesquisas. Coordenação de População e Indicadores Sociais. Projeção da População do Brasil por sexo e idade 1980- 2050. Revisão 2004.

Jensen EV, De Sombre ER, Jungblut PW. Estrogen receptors in hormone-responsive tissues and tumors. In: Wissler RW, Dao TL, Wood SJr. eds. **Endogenous factors influencing host tumor balance**. University Of Chicago Press; 1967. p.30-68.

Jensen EV, Suzuki T, Kawashima T, Stumpf WE, Jungblut PW, De Sombre ER. A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. **Proc Natl Acad Sci Usa** 1968; 59:632-8.

Jensen SM, Willings SR. Atypical lobules, the common pre cancerous lesions do ductal carcinoma: a study of whole human breasts. **Lab Invest** 1974; 30:399.

Kelsey JL, Gamon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. **Epidemiol Rev** 1993; 15: 233-243.

King RJB, Witehead MI. Assessment of the potency of orally administered progestins In women. **Fertil Steril** 1986; 46:1062-6.

King RJB. A discussion of roles of o estrogen and progestin in human mammary carcinogenesis. **J Steroid Biochen Mol Biol** 1991; 39:811-8.

King RJB. Estrogen and progestin effects in human breast carcinogenesis **Breast Cancer Res Treat** 1993; 27:3-15.

Kleineberg DL, Niemann W, Flamm E, Cooper P, Babitsky G. Primate mamary development. **J Clin Invest** 1985; 75:1943-7.

Lange CA, Richer JK, Horwitz KB. Hipotesis: progesterone primes breast cancer cells for cross-talk with proliferative or antiproliferative signals. **Mol Endocrinol** 1999;13:829-36.

Lobo RA. News about the journal of Society for Gynecologic Investigation. **J Soc Gynecol Investing** 2001; 8:317.

Million Women Study Collaborators Breast cancer and hormone- replacement therapy in the Million Women Study **Lancet** 2003; 362:419-27.

Nazário ACP, Lima GR, Simões MJ, Novo NF. Cell kinetic of the human mammary lobule during. the proliferative and secretary phase of the menstrual cycle. **Bull Assoc Ande** 1995; 79:23-7.

OMS. Organização Mundial De Saúde. Report of a WHO Scientific Group- **Research on menopause.** WHO Technical Report Series, 670. Genebra, 1981.

Pinotti JA, Hardy EE, Faundes A. Ciclos ovulatórios y câncer de mama **Bol Acad Nac B Aires** 1983; 1:117-21.

Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML. et al. Risks and benefits of estrogen plus progesterin in healty postmenopausal women: principal results from de Women's Health. Initiative randomized controlled trial. **JAMA** 2002; 288:321-33.

Russo J, Tait L, Russo IH. Susceptibility to mammary gland to carcinogenesis: III. the cell of origem of rat mammary carcinoma. **Am J Pathol** 1983; 113:50-66.

Russo J, Russo I. Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. **Lab Invest** 1987; 57:112-37.

Russo IH, Gimotty P, Dupuis M, Russo J. Effect of medroxyprogesterone acetate on the response of the rat mammary gland to carcinogenesis. **Br J Cancer** 1989; 59:210-6.

Russo J, Gusterson BA, Rogers AE, Russo IH, Wellings SR, Zwieten J. Biology of disease: comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. **Lab Invest** 1990; 62:244-78.

Russo IH, Russo J. Progestagens and mammary gland development differentiation versus carcinogenesis. **Acta Endocrinol** 1991; 125:7-12.

Russo J, Russo IH. Role of hormones in cancer e initiation and progression. **J Mamary Gland Biol Neoplasia** 1998; 3:49-61.

Russo J, Russo IH. Experimentally induced mammary tumors in rats. **Breast Cancer Res Treat** 1996; 39:7-20.

Russo J, Russo IH. Genotoxicit of steroidal estrogens. **Trends Endocrinol Metab** 2004; 5:211-4.

Simpson HW, Cornélissen G, Katinas G, Halberg F. Meta-analysis of sequential luteal-cycle-associated changes in human breast tissue. **Breast Cancer Res Treat** 2000; 63:171-3.

Söderqvist G. Effects of sex steroids on proliferation in normal mammary tissue. **Ann Med** 1998; 30:511-24.

Thompson HJ, Singh M. Rat models of premalignant breast disease. **J Mam Gland Biol Neopl** 2000; 5:409-20.

Trichopoulos D, Mac Mahon B, Cole P. Menopause and breast cancer risk. **J Natl Cancer Inst** 1972; 48:605-13.

Utian WH , Shoupe D , Bachmann G , Pinkerton JV , Pickar JH. Relief of vasomotor symptoms and vaginal atrophy with lower doses of conjugated equine estrogens and medroxyprogesterone acetate. **Fertil Steril** 2001; 6: 1065-79.

Van Der Vies J. Pharmacological studies with (7 α , 17 α)-17-hicloxy-7-methyl-19-norpregn-5(10)-en-20-yn-3-one (org OD-14). **Maturitas** 1987; (suppl.1):15-24.

Vorherr H. Endocrinology of breast cancer. **Maturitas** 1987; 9:113-22.

Writing Group for the W.H.I Investigators Risk and benefits of estrogen plus progestin en healthy post menopausal women: principal results From the Women's Health initiative randomized controlled trial. **JAMA** 2002; 288:321-3.

Writing Group For The Women's Health Initiative. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy The Women's Health Initiative randomized controlled trial. **JAMA** 2004; 291:1701-12.

6. Bibliografia de Normatizações

FRANÇA, J.L.; BORGES, S.M.; VASCONCELLOS, A.C.; MAGALHÃES, M.H.A.
– **Manual para normatização de publicações técnico-científicas**. 4^a ed.,
Editora UFMG, Belo Horizonte, 1998. 213p.

Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses. Faculdade
de Ciências Médicas, UNICAMP. Ed. SAD – Deliberação CCPG-001/98
(alterada 2005).

7. Anexos

7.1. Anexo 1 – Sistema halométrico

Permite calcular, por extrapolação, as necessidades energéticas e a variação da atuação de drogas no organismo animal.

- **Cálculo da dosagem por taxa metabólica do animal:**
 - **Peso metabólico:** peso total expresso em Kg.
 - **Taxa metabólica basal (TMB):** expressa em Kcal, representa a energia mínima necessária para manter um organismo vivo com determinado peso, é a energia produzida pelo animal em situação de repouso.

$$\text{TMB} = (\text{peso metabólico}) \times K$$

Obs: K é uma constante específica para um determinado grupo de animal

- **Taxa metabólica específica (TME):** expressa em Kcal/dia indica a energia mínima produzida por um animal em um dia para cada kg de seu peso.

$$\text{TME} = (\text{peso metabólico}) \times K$$

- **Fator dose do animal conhecido (FDC):** é a dose conhecida dividida pela taxa metabólica específica do animal.

$$\text{FDC} = \text{dose conhecida} / \text{TME}$$

- **Dose animal-alvo (DAA):** é a taxa metabólica específica do animal alvo vezes o fator dose do animal conhecido.

$$\text{DAA} = \text{TME} \times \text{FDC}$$

- **Cálculo da dose através da TME** - exemplo do cálculo da dosagem do benzoato de estradiol em uma rata de 250g a partir da dose utilizada por uma mulher de 50Kg:

$$\text{TME da mulher} = (50) \times K, \text{ sendo } K=70 \quad \text{TME} = 0,3760 \times 70 = 26,324$$

$$\text{FDC} = \frac{0, \text{mg/Kg}}{26,324} \quad \text{FDC} = 0,0038$$

$$\text{DAA} = 98,99 \times 0,0038 \quad \text{DAA} = 0,3761 \text{mg/kg}$$

Sabendo que 1ml da substância tem 5mg, a **DAA = 0,07ml**

- **Cálculo da frequência da dose**

- **Frequência do animal conhecido (FAC)** = período em que é administrada a medicação / período de intervalo
- **Fator frequência do animal conhecido (FFC)** = frequência/ TME (animal conhecido)
- **Taxa de frequência para o animal-alvo (TFA)** = TME (animal-alvo) x Fator frequência (animal conhecido)
- **Frequência (F) animal alvo** = período em que é administrada a medicação/ taxa de frequência para o animal-alvo

Exemplo do cálculo da frequência de administração do benzoato de estradiol em uma rata de 250g, a partir da dosagem utilizada por uma mulher de 50Kg a cada 30 dias.

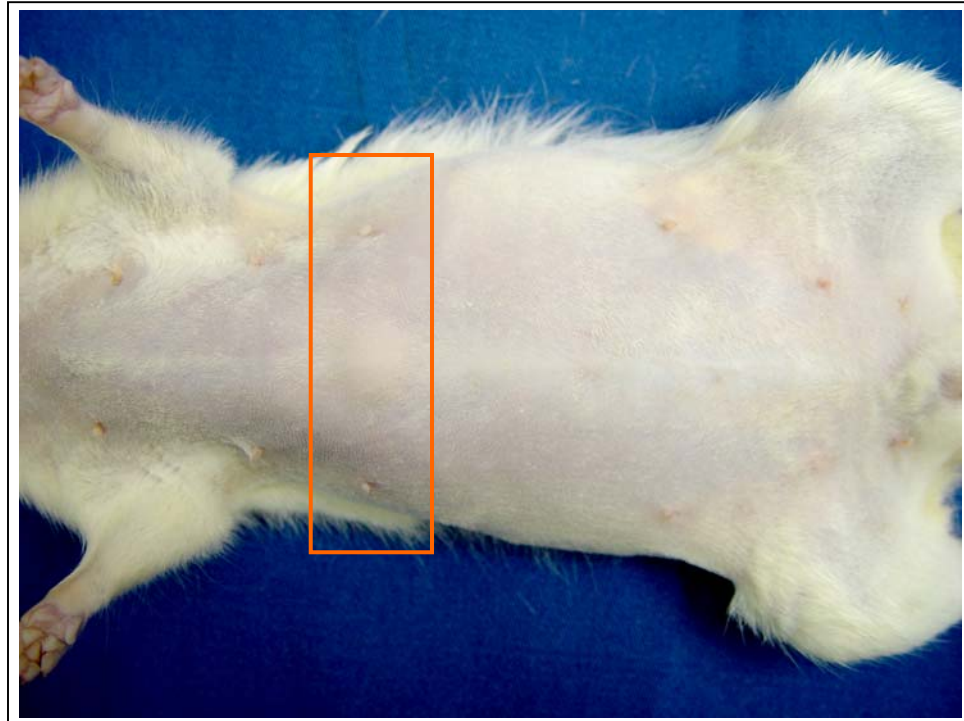
$$\mathbf{FAC} = 1/30 = 0,037$$

$$\mathbf{FFC} = 1/26,32 = 0,037 \quad \mathbf{FFC} = 0,04$$

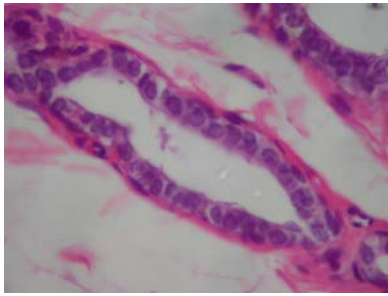
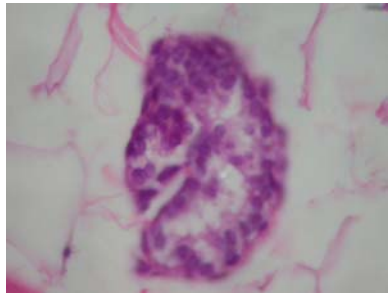
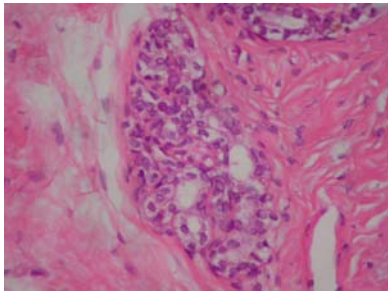
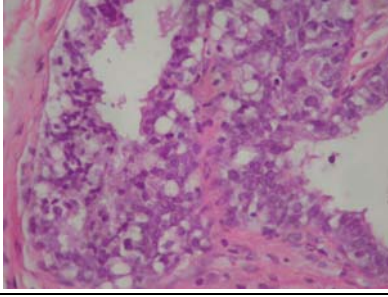
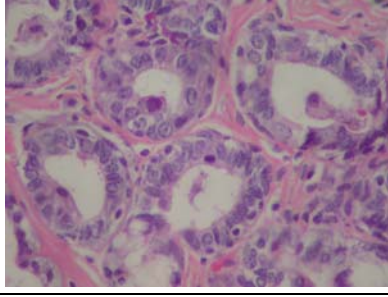
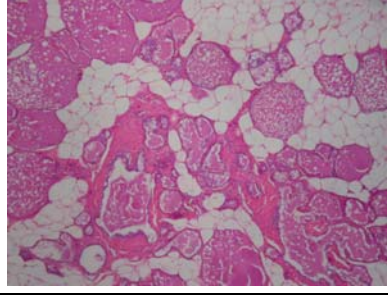
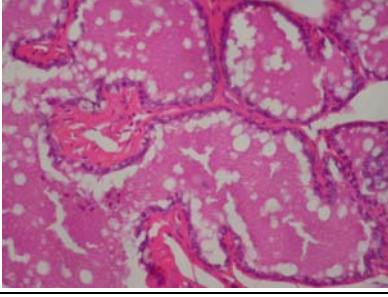
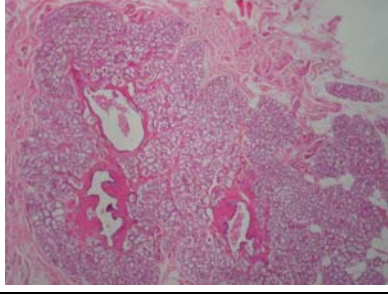
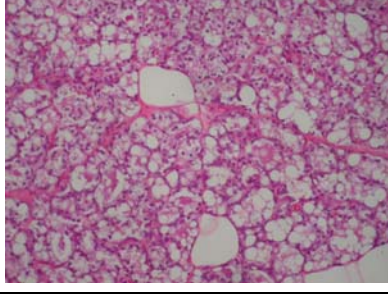
$$\mathbf{TFA} = 98,994 \times 0,04 = 3,959$$

$$\mathbf{F \text{ (animal-alvo)} = 30/3,59 = 7,6 \text{ dias}}$$

7.2. Anexo 2 – Aspecto anatómico das glândulas mamárias da rata.



7.3. Anexo 3 – Alterações histológicas em mamas de ratas submetidas à terapêutica com estrogênios, progestogênios e tibolona (Fotos)

		
normal	HEB1	HEB2
		
HEB3	Atipia sem proliferação	HAN – 40x
		
HAN – 250x	Atividade secretora – 40x	Atividade secretora – 250x

7.4. Anexo 4 – Alterações histológicas observadas nas mamas de ratas submetidas à terapêutica com estrogênios, progestogênios e tibolona, segundo o esquema terapêutico

Rata Número	Grupo A – sem prole		
	Subgrupo A1 - E2		
1	HEB 2 (raros focos)	HAN	atipia epitelial plana (focal)
2	HEB 2 (focal)	HAN	
3	HEB 2 (focal)	HAN	
4	HEB 3 (focal)	HAN	

Rata Número	Grupo A – sem prole		
	Subgrupo A2 - AMP		
1	HEB 2 (raros focos)	HAN	
2	HEB 2 (focal)	HAN	atipia epitelial plana (focal)
3	HEB 2 (focal)	AS (focal)	atipia epitelial plana (focal)
4	HEB 2 (focal)	AS (focal)	atipia epitelial plana (focal)

Rata Número	Grupo A – sem prole		
	Subgrupo A3 – E2 + AMP		
1	HEB 2 (focal)	HAN	atipia epitelial plana (focal)
2	HEB 2 (focal)	HAN	atipia epitelial plana (focal)
3	HEB 2 (focal)	HAN	atipia epitelial plana (focal)
4	HEB 3 (focal)	HAN	atipia epitelial plana (focal)

Rata Número	Grupo A – sem prole		
	Subgrupo A4 - tibolona		
1	HEB 2 (focal)	AS (focal)	
2	HEB 2 (focal)		
3	Normal		
4	Normal		

Rata Número	Grupo A – sem prole		
	Subgrupo A5 - placebo		
1	Normal		
2	HEB 1 (focal)		
3	HEB 1 (focal)		
4	HEB 1 (focal)		

Rata Número	Grupo B – com prole		
	Subgrupo B1 – E2		
1	HEB 1 (raros focos)	AS (difusa)	
2	HEB 2 (focal)	HEB 1 (raros focos)	AS (difusa)
3	HEB 2 (raros focos)	HEB 1 (raros focos)	AS (difusa)
4	HEB 2 (focal)	HEB 1 (raros focos)	AS (difusa)

Rata Número	Grupo B – com prole		
	Subgrupo B2 - AMP		
1	HEB 2 (raros focos)	HEB 1 (raros focos)	AS (difusa)
2	HEB 1 (raros focos)	HAN	
3	HAN		atipia epitelial plana (focal)
4	HEB 2 (focal)	HEB 1 (focal)	HAN

Rata Número	Grupo B – com prole		
	Subgrupo B3 – E2 + AMP		
1	HEB 2 (raros focos)	HAN	atipia epitelial plana (focal)
2	HEB 2 (raros focos)	HAN	atipia epitelial plana (focal)
3	HEB 2 (raros focos)	HAN	atipia epitelial plana (focal)
4	HEB 2 (raros focos)	HAN	atipia epitelial plana (focal)

Rata Número	Grupo B – com prole		
	Subgrupo B4 - tibolona		
1	Normal		
2	HEB 1 (focal)		
3	HEB 1 (focal)		
4	HEB 1 (focal)		

Rata Número	Grupo B – com prole		
	Subgrupo B5 - placebo		
1	Normal		
2	Normal		
3	Normal		
4	Normal		