



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Gustavo Teixeira Barandas

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE  
TUMORES DE MAMA  
INDUZIDOS POR 7,12-  
DIMETILBENZANTRACENO NUM  
MODELO EXPERIMENTAL**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Patologia Experimental,  
orientada pelo Professor Doutor Eduardo Leitão Costa e pela  
Professora Doutora Isabel  
Vitória Neves de Figueiredo Santos Pereira e apresentada à  
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2022





## **Agradecimentos**

Agradeço especialmente à minha família. Agradeço aos orientadores Professor Doutor Eduardo Costa e Professora Doutora Isabel Vitória. A todos os professores. À equipa técnica do Instituto de Anatomia Patológica da FMUC, nomeadamente ao Professor Vítor Sousa, à Dra. Ana Rodrigues e à Dra. Catarina Vilas-Boas.

À vida.



## Conteúdo

1)	Lista de Figuras .....	6
2)	Lista de Tabelas .....	8
3)	Lista de Abreviaturas .....	10
4)	Resumo .....	12
5)	Abstract .....	14
6)	Introdução .....	16
6.1)	Visão Geral.....	16
6.2)	A Glândula Mamária.....	18
6.3)	Definição e Etiologia do Cancro da Mama .....	20
6.4)	Avaliação e Classificação do Cancro da Mama.....	22
6.4.1)	Avaliação Histopatológica .....	22
6.4.2)	O Grau do Tumor.....	24
6.4.3)	O Estádio do Tumor.....	25
6.4.4)	O Subtipo Molecular do Tumor.....	25
6.5)	Tratamento do Cancro da Mama .....	28
6.5.1)	Cirurgia .....	29
6.5.2)	Radioterapia .....	29
6.5.3)	Quimioterapia .....	29
6.5.4)	Terapia Hormonal.....	30
6.5.5)	Terapia direcionada.....	30
6.5.6)	Imunoterapia.....	30
6.5.7)	Novos avanços.....	31
6.6)	Modelos Experimentais de Cancro de Mama .....	31
6.6.1)	Modelos <i>In Vitro</i> .....	32
6.6.2)	Modelos <i>In Vivo</i> .....	32
6.6.3)	Modelos <i>In Silico</i> .....	37
6.6.4)	Outros Modelos.....	38
7)	Objetivos.....	40
8)	Material e Métodos .....	42
9)	Resultados .....	48
10)	Discussão .....	58
11)	Conclusão.....	63
12)	Referências .....	65



## 1) Lista de Figuras

**Figura 1** - Incidência e mortalidade dos vários câncros a nível mundial.

**Figura 2** - Representação ilustrada da anatomia geral da mama na espécie humana. Adaptado a partir de European Society of Oncology.

**Figura 3** - Representação ilustrada da localização das glândulas mamárias em ratos. Adaptado a partir de The Laboratory Rat: Handbook of Experimental Animals

**Figura 4** - Representação esquemática da classificação do tumor de mama de acordo com as características histopatológicas, grau do tumor, estágio do tumor e subtipo molecular. Fonte: Sci. Pharm. 2020, 88, 32; doi:10.3390/scipharm88030032

**Figura 5** - Organograma representativo das abordagens de tratamentos sistêmicos em câncros de mama invasivo em fase inicial de acordo com a classificação molecular do tumor. Adaptado a partir de: [esmo.org/content/download/6593/114959/1/EN-Breast-Cancer-Guide-for-Patients](http://esmo.org/content/download/6593/114959/1/EN-Breast-Cancer-Guide-for-Patients)

**Figura 6** - Organograma representativo das diversas abordagens terapêuticas do cancro de mama.

**Figura 7** - Organograma representativo dos vários tipos de modelo experimental descritos neste trabalho.

**Figura 8** - Representação esquemática do desenvolvimento da glândula mamária de ratos fêmea durante a puberdade. A glândula mamária é constituída por diversos botões terminais (TEB) (A) que durante a puberdade se vão dividir em diversos alvéolos (AB) (B). Alvarado et al. / Life Sciences 173 (2017) 116–134

**Figura 9** - Representação, à esquerda do estrutura bidimensional do composto químico 7,12-dimetilbenzotraceno, e à direita do rato da estirpe Sprague-Dawley.

**Figura 10** - Esquema representativo dos passos-chave do protocolo F de IHC utilizado neste trabalho.

**Figura 11** - Organograma representativo do algoritmo de escolha de critérios de classificação de HER2.

**Figura 12** - Imagens representativas de microscopia ótica de tumores com coloração imunohistoquímica. A) marcação positiva de ER. B) Ausência de marcação de PR. C)

Ausência de marcação de HER2. D) Marcação positiva de Ki-67. E) Marcação negativa de Ki-67. Todas as imagens têm uma ampliação de 400X.

**Figura 13** - Gráfico representativo da comparação dos subtipos moleculares quanto à distribuição da média de marcação IHC dos biomarcadores ER e Ki-67 pela escala IxP.

**Figura 14** - Gráfico representativo da comparação dos graus do tumor quanto à distribuição da média de marcação IHC dos biomarcadores ER e Ki-67 pela escala IxP.

**Figura 15** - Gráfico representativo da comparação dos subtipos moleculares quanto ao grau tendo em conta a distribuição da média de marcação IHC do biomarcadore ER pela escala IxP.

**Figura 16** - Gráfico representativo da comparação dos subtipos moleculares quanto ao grau tendo em conta a distribuição da média de marcação IHC do biomarcadore Ki-67 pela escala IxP.

**Figura 17** - Gráfico representativo da distribuição dos tipos de padrão histológico pela escala IxP referente ao biomarcador ER.

**Figura 18** - Gráfico representativo da distribuição dos tipos de padrão histológico pela escala IxP referente ao biomarcador Ki-67.

## 2) Lista de Tabelas

**Tabela 1** – Classificação molecular de tumores de cancro de mama conforme a presença de recetores de estrogénio (ER), recetores de progesterona (PR), fator de crescimento epidermal humano (HER2) e Ki-67.

**Tabela 2** - Correspondência de método de recuperação antigénica e anticorpo utilizado para cada anticorpo-alvo.

**Tabela 3** – Recomendações para a avaliação da percentagem de marcação IHC dos biomarcadores ER e PR.

**Tabela 4** - Recomendação para classificar tumores do tipo Luminal de acordo com a percentagem de marcação IHC do biomarcador Ki-67.

**Tabela 5** – Níveis da escala do produto da Intensidade de marcação pela percentagem de marcação imunohistoquímica.

**Tabela 6** – Escalas de pontuação utilizadas para avaliar as características histopatológicas, necrose, reação estromal e infiltrado inflamatório.

**Tabela 7** – Representação da amostra utilizada no estudo em que se discrimina a malignidade, o grau e os padrões histológicos dos tumores.

**Tabela 8** - Distribuição dos casos Luminal A e Luminal B pelos níveis da escala IxP referente ao biomarcador ER. Pode observar-se o número de casos e percentagem respetiva.

**Tabela 9** - Distribuição dos casos Luminal A e Luminal B pelos níveis da escala IxP referente ao biomarcador Ki-67. Pode observar-se o número de casos e percentagem respetiva.

**Tabela 10** – Distribuição dos casos e respetiva percentagem por grau e subtipo molecular.

**Tabela 11** – Distribuição dos vários tipos de padrão histológico (número de casos e respetiva percentagem) em função do grau do tumor.

**Tabela 12** - Distribuição dos vários tipos de padrão histológico (número de casos e respetiva percentagem) em função do subtipo molecular do tumor.

**Tabela 13** - Distribuição dos casos Luminal A e Luminal B pela escala de pontuação de avaliação da característica histopatológica reação estromal. Pode observar-se o número de casos e a respetiva percentagem

**Tabela 14** - Distribuição dos casos Luminal A e Luminal B pela escala de pontuação de avaliação da característica histopatológica necrose. Pode observar-se o número de casos e a respetiva percentagem.

**Tabela 15** - Distribuição dos casos Luminal A e Luminal B pela escala de pontuação de avaliação da característica histopatológica infiltrado inflamatório. Pode observar-se o número de casos e a respetiva percentagem.



### 3) Lista de Abreviaturas

AJCC – American Joint Committee on Cancer

ASCO-CAP – American Society of Clinical Oncologists – College of American Pathologist

BACR1 – Gene do cancro da mama 1

BACR2 – Gene do cancro da mama 2

DMBA – 7,12-dimetilbenzatraceno

DCI – Carcinoma ductal invasivo

DCIS – Carcinoma ductal *in situ*

ER – Recetores de estrogénio

FISH – Hibridização *in situ* fluorescente

GLOBOCAN – Observatório Global para o Cancro

HER2 – Recetor do fator de crescimento epidermal humano 2

IHC - imunohistoquímica

InfC – Carcinoma inflamatório

InfDC – Carcinoma ductal inflamatório

InfLC – Carcinoma lobular inflamatório

IxP – multiplicação da intensidade pela percentagem de marcação

Ki-67 – Proteína nuclear relacionada com proliferação celular

LCI – Carcinoma Lobular invasivo

LCIS – Carcinoma lobular *in situ*

MC – Carcinoma Medulares

MNU – metilnitrosureia

OMS – Organização Mundial da Saúde

PARP - Poli-ADP ribose polimerase

PAH's – Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

PR – Recetores de progesterona

SqC – Carcinoma escamoso

TEB - Botões terminais

TMN – formação tubular, mitoses, alterações nucleares



## 4) Resumo

De acordo com GLOBOCAN, no ano 2020, o cancro da mama foi a neoplasia mais diagnosticada e a quarta com maior taxa de mortalidade, afetando principalmente indivíduos do sexo feminino.

O cancro é um processo que está associado a alterações genéticas geralmente provocadas por fatores ambientais, entre eles o tabagismo. Vários estudos estabelecem a relação entre a incidência do cancro de mama e a exposição ao fumo do tabaco em mulheres jovens. O tabagismo expõe esses indivíduos a um potente carcinogénico, o 7,12-dimetilbenzotraceno (DMBA), que também é utilizado para induzir o cancro de mama em modelos experimentais com ratos.

O cancro da mama é uma patologia amplamente estudada através de modelos experimentais, por isso, existe uma grande demanda de otimização e consequente caracterização de forma que se possam utilizar em estudos que pretendam avaliar o desenvolvimento da patologia bem como estudos de possíveis terapêuticas.

Este trabalho propôs-se fazer uma caracterização do subtipo molecular de tumores de mama induzidos por 7,12-dimetilbenzotraceno num modelo experimental *in vivo* de ratos Sprague-Dawley. Esta avaliação molecular consistiu em caracterizar a expressão de recetores de estrogénio (ER), de progesterona (PR), do recetor do fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2) e da proteína nuclear Ki-67 em células tumorais através de técnicas de imunohistoquímica em tumores resultantes de um trabalho anterior do nosso grupo de trabalho.

Os resultados revelam que os tumores pertencem ao subtipo molecular Luminal A e B (30% e 70%, respetivamente) pois são tumores dependentes de recetores hormonais, e no caso dos Luminal B apresentam expressão intensa de Ki-67.

Este trabalho permitiu concluir que este modelo poderá ter utilidade para testar terapias hormonais ou para estudar o desenvolvimento de tumores dependentes de hormonas.

Palavras-chave: cancro da mama; modelo experimental; DMBA; caracterização; subtipo molecular.



## 5) Abstract

Accordingly to GLOBOCAN, In 2020, breast cancer was the most diagnosed neoplasm and the fourth with the highest mortality rate, affecting mainly female individuals.

Cancer is a process that is associated with genetic changes usually caused by environmental factors, including smoking. Several studies establish the relationship between the incidence of breast cancer and exposure to tobacco smoke in young women. Cigarette smoking exposes these individuals to a potent carcinogen, 7,12-dimethylbenzatrancene (DMBA), which is also used to induce breast cancer in experimental mouse models.

Breast cancer is a pathology widely studied through experimental models, so there is a great demand for optimization and consequent characterization so that they can be used in studies that intend to evaluate the development of the pathology as well as studies of possible therapies.

This work aimed to characterize the molecular subtype of breast tumors induced by 7,12-dimethylbenzatrancene (DMBA) in an *in vivo* experimental model of Sprague-Dawley rats. This molecular evaluation consisted of characterizing the expression of estrogen receptors (ER), progesterone (PR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) and the nuclear protein Ki-67 in tumor cells through immunohistochemical techniques in resulting tumors from a previous work of our working group.

The results reveal that the tumors subject to evaluation belong to the Luminal A and B molecular subtype (30% and 70%, respectively) as they are hormone receptor-dependent tumors, and in the case of Luminal B they present intense expression of Ki-67.

This work allowed us to conclude that this model may be useful to test hormone therapies or to study the development of hormone-dependent tumors.

Keywords: breast cancer; experimental model; DMBA; characterization; molecular subtype.



## 6) Introdução

### 6.1) Visão Geral

O cancro é uma patologia que lidera as principais causas de morte e que limita o aumento da esperança média de vida em todo o mundo (1).

De acordo com o Observatório Global para o Cancro (GLOBOCAN), estima-se que em 2020 ocorreram 19.3 milhões de novos casos de cancro e 10 milhões de casos que, infelizmente, resultaram na morte dos pacientes. Globalmente, o cancro e a mortalidade a ele associada estão a crescer de forma acelerada e este facto deve-se ao envelhecimento e crescimento da população assim como às mudanças na distribuição e prevalência nos fatores de risco, nomeadamente, os relacionados com o desenvolvimento socioeconómico (2)(3).

Analisando os dados recolhidos a nível mundial, sabemos que a região mais afetada pelo cancro - combinados os resultados de ambos os sexos - é a Ásia, onde ocorreram 50% dos casos e 58,3% das mortes. Na Europa ocorreram 22,8% dos casos e 19,6% de mortes, seguindo-se a América com 20.9% e 14,2%, respetivamente (3).

Os tipos de cancro mais diagnosticados, em ambos os sexos, são o cancro da mama (11,7%), seguindo-se os cancros do pulmão (11,4%) e colorretal (10,0%). Contudo, os que provocam mais mortalidade são os cancros do pulmão (18,0%), colorretal (9.4%) e fígado (8,3%). O cancro da mama embora seja o mais diagnosticado em ambos os sexos, provoca a morte em 6,9% dos indivíduos diagnosticados (5ª

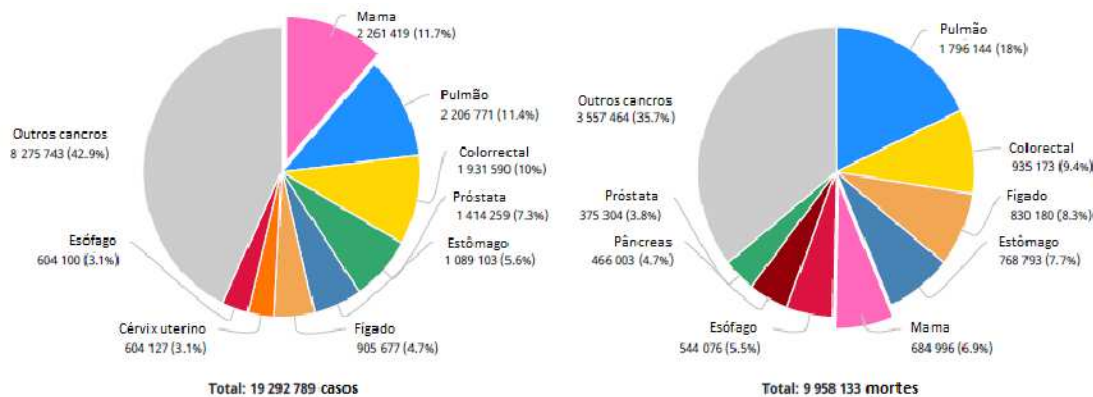


Figura 1 - Incidência e mortalidade dos vários cancros a nível mundial.

posição). No entanto, em indivíduos do sexo feminino é o cancro com maior taxa de mortalidade (15,5%) seguindo-se os cancros do pulmão e o colorretal (3).

Conforme os resultados obtidos em 2020 pelo GLOBACAN, o cancro da mama é o que apresenta maior incidência e é a quinta causa de morte, tendo sido diagnosticados aproximadamente 2,3 milhões de novos casos e 680 000 mortes. Os resultados demonstram que entre indivíduos de ambos os sexos é na Ásia onde se fazem mais diagnósticos de cancro da mama (45,4%) e onde, em termos globais, mais indivíduos morrem (50,5%), seguindo-se a Europa (23,5% e 20,7%, respetivamente) e a América (21,8% e 15,6%, respetivamente).

Nos países com alto e muito alto índice de desenvolvimento humano, o cancro da mama em mulheres é diagnosticado em 55,9%, em que 12,8% dos casos culminam com a morte das pacientes. Nos países com baixo e muito baixo índice de desenvolvimento humano não se diagnosticam tantos casos (29,7%) no entanto a mortalidade é mais alta (15%) (3)(4).

Os elevados níveis de incidência nos países com alto índice de desenvolvimento humano refletem a prevalência duradoura de fatores de risco associados ao ciclo hormonal e reprodutivo (menarca precoce, menopausa tardia, idade do primeiro nascimento, número reduzido de filhos, amamentação limitada, uso de terapia hormonal na menopausa e uso de contraceptivos orais) e fatores de risco associados ao estilo de vida (ingestão de álcool, obesidade e sedentarismo), assim como o aumento da deteção através de programas de rastreio ou diagnóstico oportunista através de mamografia (5).

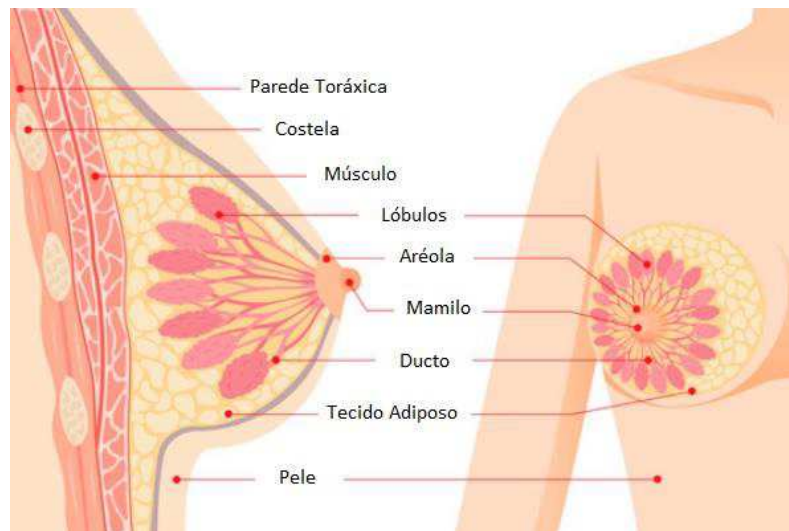
Nos países com baixos níveis de desenvolvimento humano há uma menor incidência, no entanto a mortalidade aumenta como acontece no caso dos países da África Ocidental (incidência de 41,5% e mortalidade de 22,3%) e da Melanésia (incidência de 50,5% e mortalidade de 27,5).(3) A elevada mortalidade reflete-se na quantidade e qualidade das infraestruturas de saúde disponíveis. De acordo com diversos estudos, outro fator importante é que os pacientes quando são diagnosticados já se encontram em fases avançadas da doença (6).

Um estudo realizado nos Estados Unidos da América, em indivíduos do sexo feminino, indica que 82% dos cancros foram diagnosticados em mulheres acima dos 50



anos de idade (mediana de 62 anos de idade) e 90% das mortes previstas deverão ocorrer neste grupo etário (mediana de 68 anos de idade) (7).

## 6.2) A Glândula Mamária



*Figura 2 - Representação ilustrada da anatomia geral da mama na espécie humana. Adaptado a partir de European Society of Oncology.*

A glândula mamária feminina em humanos (figura 2) é constituída por 15 a 25 lóbulos de glândula composta, cuja função é secretar leite de forma a nutrir os recém-nascidos. Este processo é regulado pelo sistema endócrino. Cada lóbulo é separado dos contíguos por uma camada de tecido conjuntivo denso e muito tecido adiposo. No tecido extra glandular podem encontrar-se vasos sanguíneos, linfáticos e nervos. Os lóbulos são considerados glândulas individualizadas pois apresentam o seu próprio ducto excretor. Na extremidade de cada ducto encontram-se estruturas túbulo-alveolares revestidas por um epitélio cúbico simples com funções secretoras. O desenvolvimento da glândula mamária durante a puberdade deve-se ao aumento do estrogénio circulante e compreende o aumento de volume, desenvolvimento de um mamilo proeminente e proliferação de ductos galactóforos(8). As alterações hormonais em cada ciclo menstrual induzem ondas de proliferação no epitélio mamário, enquanto a gravidez leva a uma extensa ramificação ductal e alveologénese(9).

A estrutura histológica da glândula mamária varia de acordo com idade, sexo e estado fisiológico do indivíduo (8)(10).

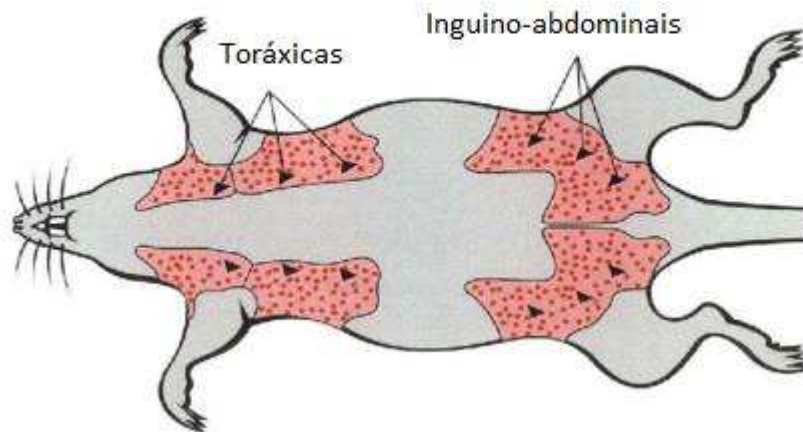


Figura 3 - Representação ilustrada da localização das glândulas mamárias em ratos. Adaptado a partir de *The Laboratory Rat: Handbook of Experimental Animals*

A glândulas mamárias de ratos do sexo feminino são compostas por seis pares de glândulas mamárias com um mamilo, localizadas simetricamente nos dois lados do corpo, três em cada lado na região torácica e 3 em cada lado na região inguinal, como se pode observar na figura 3. Ao contrário do que acontece nas mulheres, a glândula mamária em ratos fêmea é pouco desenvolvida e apenas pode ser identificada através da presença de mamilo. A glândula mamária é constituída por dois tipos de tecido: parênquima e estroma (tecido conjuntivo, adiposo e vascular) e o seu crescimento é dependente de hormonas como estrogénio e progesterona, assim como em mulheres. Cada glândula tem uma organização túbulo-alveolar e ramifica-se em ductos e alvéolos secretores nas zonas terminais. Estas porções terminais estão ligadas a ductos lactíferos principais que por sua vez drenam para um seio e cada seio no mamilo. Os alvéolos são constituídos por um epitélio cúbico ou colunar secretor e está rodeado por células mioepiteliais. As estruturas distais de cada porção secretora formam botões – botões terminais (TEB) - contendo várias camadas de células indiferenciadas. Os animais do sexo masculino têm pequenas quantidades de tecido mamário glandular, no entanto pouco desenvolvido e sem mamilo (11)(12).

### 6.3) Definição e Etiologia do Cancro da Mama

Cancro é a denominação que se aplica aos tumores malignos ou a uma neoplasia maligna(13). Uma neoplasia caracteriza-se pela formação de uma massa de tecido anormal, cujo crescimento ultrapassa e não é coordenada com o dos tecidos normais persistindo depois da remoção do estímulo que iniciou a alteração. Esta persistência deve-se a alterações genéticas hereditárias ou induzidas, que permitiram o desenvolvimento das primeiras células tumorais que se tornam autónomas embora que dependentes nutricionalmente do organismo (14).

O cancro é uma doença complexa que se desenvolve em várias etapas em que as células vão perdendo as suas funções biológicas normais, e manifesta-se de forma diferente consoante a diversidade dos indivíduos. Durante estas etapas o organismo perde a capacidade de resolver os danos causados através de mecanismos próprios do sistema imunitário e as células tumorais vão proliferando e resistindo, podendo invadir tecidos e desenvolver metástases, e em último caso provocar a morte do indivíduo(15). Este processo de várias etapas de desenvolvimento do cancro denomina-se carcinogénese e tem as seguintes fases: iniciação, promoção, malignização e progressão(16).

A ocorrência de cancro está associada a mutações genéticas e alterações epigenéticas, principalmente causadas por exposição a fatores ambientais, como químicos ou radiação, ou mais raramente hereditárias(17).

As mutações genéticas ocorrem em genes do DNA que codificam proteínas. As células em que os seus genes adquirem mutações vão passar a sintetizar proteínas em excesso, ou a não sintetizar, e vão tornar-se disfuncionais. As células que adquirem estas transformações. Estas alterações podem levar à inativação de genes supressores de tumores, à ativação de oncogenes ou genes relacionados com a morte celular programada(18, 19).

As alterações epigenéticas não são mutações no DNA, mas interações casuais entre genes e os respetivos fenótipos(20). São alterações hereditárias do fenótipo das células independentemente de existirem mutações na sequência de DNA. Normalmente refere-se à epigenética o estudo da cromatina e DNA envolvidos na modificação pós-

translacional das histonas. Um dos principais mecanismos epigenéticos denomina-se de metilação e pode desempenhar um papel desadequado quer na ativação, quer na inibição de diversas vias de sinalização, que possam estar envolvidas em processos tumorais(21–23). A perda de capacidade de metilação de DNA está relacionada com a carcinogénese(24). Este facto foi verificado, por um trabalho inovador realizado pelo nosso grupo de investigação, revelando que num modelo experimental de indução de tumores de mama com 7,12-dimetilbenzotraceno (DMBA) em ratos existe redução da metilação de DNA nos tumores com maior grau(25).

Como outros cancros, os cancros da mama são colónias celulares que derivam de células com múltiplas alterações genéticas, adquiridas através da influência da exposição hormonal, suscetibilidades genéticas inerentes ou exposição a fatores ambientais. Estes cancros podem ser hereditários aparecendo em mulheres com mutações em genes supressores de tumores como o BRCA1 e BRCA2, p53 ou CHEK2 (26)(13)(27)(28). A maioria destes genes desempenha papéis complexos e interrelacionados na manutenção da integridade genómica. Assim que uma célula apresentar danos no DNA deve ocorrer uma paragem no ciclo celular para que haja reparação ou morte por apoptose. Uma vez detetado o dano no DNA os genes p53 e CHEK2 induzem a paragem do ciclo celular, enquanto os genes BRCA1 e BRCA2 promovem a sua reparação. Se algumas destas funções forem prejudicadas aumenta a probabilidade do dano no DNA se manter e a mutação ser transmitida a novas células (13). Os genes BRCA1 e BRCA2 aumentam o risco de desenvolver cancro da mama até 3% em mulheres com idade inferior a 30 anos e de 50 a 80% de mais risco em mulheres com idade superior a 70 anos(29). As mutações no gene p53 aparecem em 25% de todos os tumores, em 80% dos tumores de mama do tipo basal e 40 a 50% em tumores de mama do tipo triplo negativo(28).

O desenvolvimento de cancro da mama está também associado a fatores ambientais como a exposição a radiação ou químicos que induzem efeito semelhante ao estrogénio (13). A maioria destes cancros aparece em mulheres pós-menopausa e apresentam uma expressão aumentada de recetores de estrogénio. Os metabolitos de estrogénio desempenham um papel crucial neste processo pois provocam mutações no

DNA(30). Outro motivo para o aparecimento de cancros esporádicos são os fatores ambientais, nomeadamente exposição a produtos químicos como os derivados do tipo de regime alimentar, o consumo de álcool, ou o tabagismo. De acordo com alguns estudos existe um aumento de 9% de risco de ocorrência de cancro da mama em antigos fumadores comparados com não fumadores e de 16% em fumadores comparados com não fumadores(31). Outros estudos indicam que o risco de desenvolver cancro da mama é maior em fumadores que tenham iniciado este hábito por volta dos 17 anos de idade ou antes(32) , ou durante a puberdade (33).

O tabagismo e a consequente exposição a compostos químicos presentes no fumo do tabaco são amplamente estudados para se tentar entender o potencial de desenvolvimento de cancro da mama. Neste campo, diversos estudos destacam a importância na carcinogénese de compostos como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH's) – como o caso do 7,12-dimetilbenzantraceno, presente no fumo do tabaco(34)(35) - , aminas aromáticas e N-nitrosaminas(36), devido ao seu potencial de induzirem aduções no DNA e mutações no gene p53 (37) (38)(39).

#### 6.4) Avaliação e Classificação do Cancro da Mama

Os sistemas de classificação do cancro da mama visam diferenciar os diversos tipos de cancro de mama com base nas suas características morfológicas e moleculares, permitindo seleccionar o melhor método de tratamento e prever com maior eficácia os resultados espectáveis (40). Os cancros de mama podem ser caracterizados através do tipo histopatológico, grau do tumor, estágio do tumor e subtipos moleculares, conforme se representa esquematicamente na Figura 4 e desenvolvido adiante.

##### 6.4.1) Avaliação Histopatológica

A avaliação histopatológica permite a caracterização de tumores quanto à sua localização e morfologia com base numa avaliação microscópica do tipo celular,

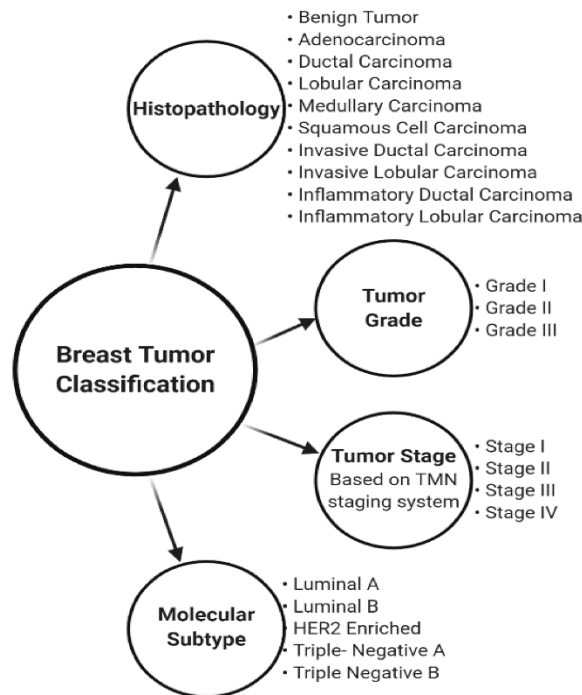


Figura 4 - Representação esquemática da classificação do tumor de mama de acordo com as características histopatológicas, grau do tumor, estágio do tumor e subtipo molecular. Fonte: Sci. Pharm. 2020, 88, 32; doi:10.3390/scipharm88030032

forneendo informações acerca do volume do tumor, presença ou ausência de massas ou margens, textura, tipo histológico e arquitetura. De acordo com a localização dos tumores, eles podem ser classificados como lobulares ou ductais, se se encontrarem nos lóbulos ou nos ductos mamários, respetivamente. Para além desta classificação os tumores também podem ser divididos em *in situ* e invasivos, dependendo da morfologia das células. Os tumores *in situ*, também denominados de carcinomas não invasivos. No entanto, também podem evoluir para cancros invasivos, sendo fundamental o diagnóstico adequado e a terapia apropriada para essa condição. Estes tumores de mama não invasivos podem ser divididos em duas categorias: o Carcinoma Lobular *In Situ* (LCIS) e o Carcinoma Ductal *In Situ* (DCIS). Os DCIS estão limitados aos ductos e lóbulos pela membrana basal, não invadem os linfáticos e vasos sanguíneos e não podem produzir metástases, como tal têm geralmente melhor prognóstico. Os tumores LCIS são frequentemente multicêntricos e bilaterais (ambas as mamas) e as suas células apresentam semelhanças morfológicas às do carcinoma lobular invasivo e têm ausência de expressão de e-caderina – proteína transmembranar responsável pela adesão epitelial(41) podendo ser, por vezes, o precursor do carcinoma invasivo. Segundo a quarta edição do documento de Classificação de Tumores da Mama da Organização

Mundial da Saúde (OMS)(42), existem mais de vinte tipos de cancro da mama invasivos, sendo os mais frequentes o Carcinoma Ductal Invasivo (DCI) e o Carcinoma Lobular Invasivo (LCI). Existem casos raros de DCI - os Carcinomas Medulares (MC) -, que normalmente não metastizam, têm crescimento lento, podem apresentar algumas células imunitárias nos limites dos tumores e são mais comuns em mulheres com a mutação BRCA1. Os Carcinomas Metaplásicos são um tipo outro tipo muito raro de DCI onde se podem encontrar tipos celulares, que normalmente não seriam encontradas na mama - células fusiformes, ósseas e escamosas - apresentando um desenvolvimento clínico agressivo e um mau prognóstico. Um tipo específico de carcinoma metaplásico é o Carcinoma Escamoso (SqC), que apresenta células escamosas. Outro tipo de cancro de mama invasivo é o Carcinoma Inflamatório (InfC), que se subdivide em Carcinoma Inflamatório Ductal (InfDC) e Carcinoma Inflamatório Lobular (InfLC). Este caracteriza-se pelo seu potencial de metastizar os gânglios linfáticos da pele e do peito. O InfC é um carcinoma muito agressivo com progressão rápida, diagnóstico difícil e tardio e com mau prognóstico quando comparado a outros tipos de cancro de mama(13)(43).

Para ser feita uma avaliação de malignidade do tumor são utilizados critérios como atipias celulares, perda do padrão túbulo-alveolar, ausência de células, invasão do estroma, angiogénese e integridade da membrana basal (44). Apesar de existirem diferenças estruturais entre os carcinomas de mama em humanos e ratos, estes partilham bastantes semelhanças morfológicas, por isso foi estabelecida uma padronização que permite uma utilização comparativa em patologia experimental recorrendo ao uso da terminologia descritiva e modificadores convencionais(45)(46)(34). A caracterização histopatológica dos tumores permite categorizar as proliferações celulares considerando o seu comportamento e padrão histológico entre: não neoplásicas, neoplásica benignas e malignas, e estas últimas em malignas *in situ* e malignas invasivas. Relativamente ao tipo de padrão histológico estas dividem-se em: papilar, escamoso, glandular, tubular, comedo ou cribiforme (45)(47)(48).

#### 6.4.2) O Grau do Tumor

O grau do tumor é determinado pelo *Nottingham Grading System* (NGS) ou *Elston and Elis Scarff-Bloom Richardson* em que é atribuída uma classificação numérica de 0 a 9, onde o grau I corresponde de 3 a 5 pontos, grau II de 6 e 7 pontos e grau III de 8 e 9 pontos. Para obter esta classificação avaliam-se três características celulares distintas – formação de padrão tubular/glandular, pleomorfismo nuclear e contagem mitótica – de forma a cada um dos parâmetros possa ser classificado de 0 a 3 pontos. Os tumores com pior prognóstico serão os que se encontram em grau III(13)(48). Para melhorar a comparação de modelos experimentais de carcinogénese com tumores humanos utiliza-se adicionalmente a avaliação de características baseadas na patologia humana (46) como a percentagem de tipo histológico cribiforme, microcalcificação, invasão e reação estromal, secreções, necrose, hemorragia, apoptose e infiltrado inflamatório (45)(44)(48).

#### 6.4.3) O Estádio do Tumor

O estágio dos tumores é frequentemente avaliado segundo o Sistema TMN - desenvolvido pelo *American Joint Committee on Cancer* (AJCC). Este sistema de avaliação permite categorizar os tumores em quatro estádios: 0, I, II, III e IV. Conforme o Sistema TMN o estágio I tem um prognóstico melhor que o estágio IV – pior prognóstico. No estágio 0 encontram-se os tumores *in situ*. No estágio I enquadram-se os tumores invasivos de pequenas dimensões (aproximadamente 2 cm). No estágio II, os tumores têm dimensões de aproximadamente 5 cm ou menores e poderão apresentar nódulos axilares. Os tumores de com maiores dimensões, maior quantidade de gânglios e fixação na parede torácica são classificados como tumores de estágio III. Os tumores com metástases são tumores de estágio IV(13)(48).

#### 6.4.4) O Subtipo Molecular do Tumor

A classificação do tipo molecular nos cancros da mama é feita através da avaliação da expressão de determinados genes, proteínas ou recetores de membrana



celular como os recetores de estrogénio (ER), recetores de progesterona (PR), recetor do fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2) e a proteína Ki67 (49)(50)(51).

O estrogénio e a progesterona estão sequencialmente envolvidos no desenvolvimento da glândula mamária, principalmente através de um mecanismo parácrino (52). Tanto em tecidos normais como em tumores, as células que apresentam estes recetores estimulam a secreção de fatores que influenciam a divisão celular nas células que não os apresentam. É importante ter em conta que as funções de PR e ER estão interligadas, nomeadamente a transcrição do PR que depende de mecanismos de transcrição mediados pelo ER. Os carcinomas de mama evidenciam aproximadamente 85% de recetores estrogénio (13)(53).

O recetor do fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2) é uma glicoproteína transmembranar que está envolvida no controle do crescimento celular e atua como co-recetor de vários fatores de crescimento(54). O HER2 encontra-se sobre-expresso em aproximadamente 20% dos cancros da mama (55).

O Ki-67 é uma proteína nuclear não-histónicas e um marcador de proliferação celular expresso nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular. Tem funções de regulação do ciclo celular processamento de RNA ribossómico e organização do DNA (56). Os tumores com alta taxa de proliferação têm um prognóstico pior (13)(48).

*Tabela 1 – Classificação molecular de tumores de cancro de mama conforme a presença de recetores de estrogénio (ER), recetores de progesterona (PR), fator de crescimento epidermal humano (HER2) e Ki-67.*

	<i>ER</i>	<i>PR</i>	<i>HER2</i>	<i>Ki-67</i>
<i>Luminal A</i>	+	+/-	-	Baixo
	+/-	+		
<i>Luminal B</i>	+	+/-	-	Alto/ Baixo
	+/-	+	+	
<i>Sobreexpressão de HER2</i>	-	-	+	Alto
<i>Triplo negativo A – Tipo Basal</i>	-	-	-	Alto
<i>Triplo negativo B – Tipo Normal</i>	-	-	-	Baixo

Baseado em análises de imunohistoquímica (IHC) o cancro da mama é classificado em 5 grupos distintos: 1) Luminal A; 2) Luminal B, 3) sobreexpressão de HER2, 4) Triplo Negativo A ou Tipo Basal e 5) Triplo Negativo B ou Tipo Normal (57), conforme se pode observar na tabela 1 no capítulo dos materiais e métodos. Os 5 subtipos moleculares serão descritos de seguida: 1) Luminal A: normalmente apresenta positividade de ER e PR, negatividade de HER2 e baixa positividade de KI-67, tendo um grau inferior e melhor prognóstico; 2) Luminal B: normalmente apresenta positividade de ER e PR, negatividade de HER2, podendo alguns casos serem positivos, e alguma ou muita positividade de KI-67, tendo um pior prognóstico que o Luminal A; 3) Rico em HER2: apresenta negatividade de ER e PR, positividade de HER2 e de KI-67, tendo um pior prognóstico que os descritos anteriormente; 4) Triplo negativo A ou Tipo Basal: apresenta negatividade de ER, PR e HER2 e alta positividade de KI-67, sendo comum em mulheres com mutações do gene BRCA1, está associado a metástases e tem um pior prognóstico que os descritos anteriormente; 5) Triplo negativo B ou Tipo Normal: apresenta negatividade de ER, PR e HER2 e baixa positividade de KI-67, pouca presença de claudina (proteína relacionada com adesão celular(58)) e têm o pior prognóstico de todos os já descritos(48)(50)(51) (59)(60).

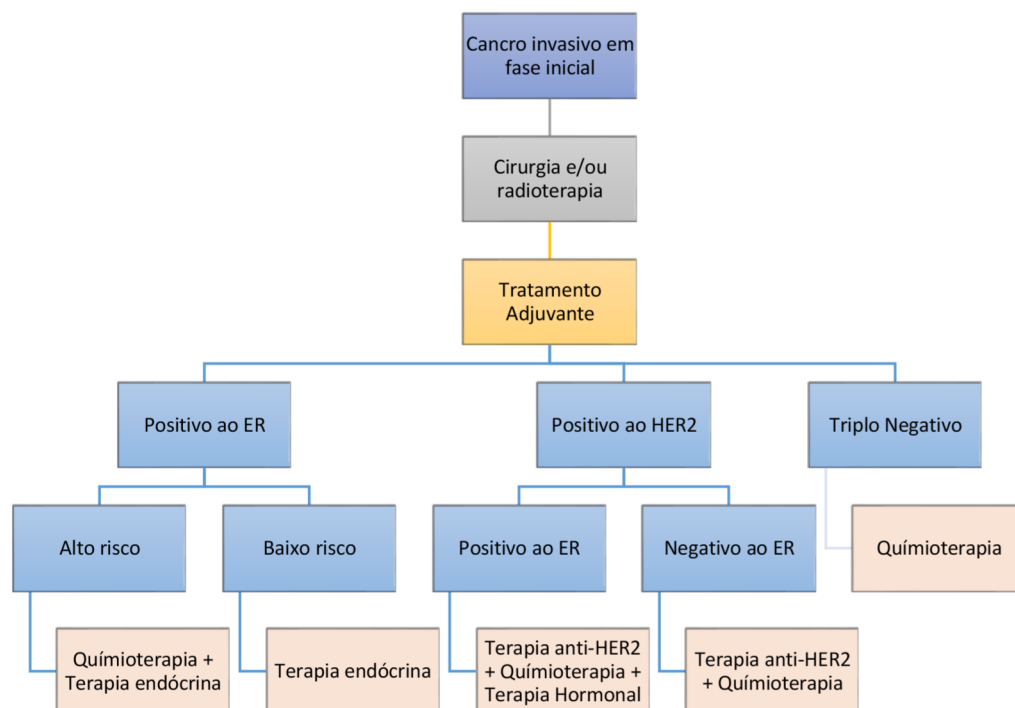


Figura 5 - Organograma representativo das abordagens de tratamentos sistémicos em cancros de mama invasivo em fase inicial de acordo com a classificação molecular do tumor. Adaptado a partir de: [esmo.org/content/download/6593/114959/1/EN-Breast-Cancer-Guide-for-Patients](http://esmo.org/content/download/6593/114959/1/EN-Breast-Cancer-Guide-for-Patients)

O consenso alargado na adoção da classificação imunohistoquímica (IHC) dos subtipos moleculares do cancro da mama permitem ao mesmo tempo recolher informações sobre terapêutica e prognóstico (61)(62)(63). Mediante o subtipo da doença e as amostras e linfonodos recolhidos em cirurgia é escolhida uma via terapêutica, conforme se observa na figura 5 (64). O triplo negativo é o subtipo de tumor mais difícil e desafiante de tratar, no entanto, novas terapias direcionadas estão a tornar-se disponíveis, por exemplo os inibidores PARP nos pacientes com mutações do gene BRCA. Terapias com anticorpos monoclonais têm sido efetivos no tratamento de pacientes com tumores ricos em HER2 e pacientes com tumores do tipo Luminal A e B têm beneficiado de terapias hormonais(65).

### 6.5) Tratamento do Cancro da Mama

O estudo do cancro da mama durante os últimos anos permitiu desenvolver uma panóplia de terapêuticas para o seu tratamento (Figura 6). Estas terapêuticas podem dividir-se em terapias localizadas – cirurgia e radioterapia – e terapias sistémicas – quimioterapia, terapia hormonal, terapia direcionada e imunoterapia.

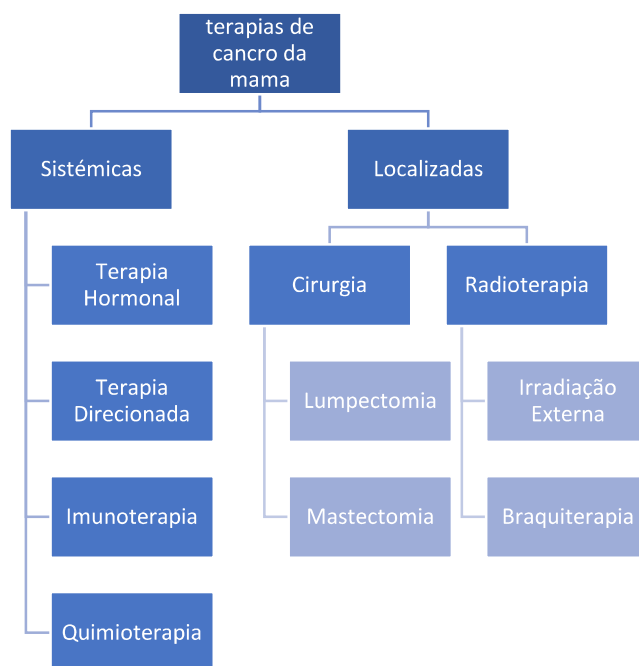


Figura 6 - Organograma representativo das diversas abordagens terapêuticas do cancro de mama.

### 6.5.1) Cirurgia

Os tratamentos localizados são usados para tratar os tumores de forma a minimizar o impacto nos tecidos saudáveis do organismo através de cirurgia – tratamento preferencial nas primeiras fases de desenvolvimento do tumor – ou de radioterapia(66)(67). Para o tumor ser removido podem ser desempenhados dois tipos de cirurgia: a lumpectomia ou cirurgia conservativa da mama – na qual se remove o tumor e uma porção de tecido envolvente podendo também ser aplicada radiação posteriormente – e a mastectomia – na qual se remove a totalidade da mama(66).

### 6.5.2) Radioterapia

A utilização de radiação como forma de terapêutica é caracterizada pela aplicação raios-x de alta energia na área do tumor com a finalidade de destruir as células cancerígenas que são mais sensíveis a este tipo de radiação(67). A dosagem de radiação aplicada depende da idade dos pacientes, estágio do tumor, se fez cirurgias anteriormente ou outro tipo de terapias(68). Podem ser utilizados dois métodos para realizar a radioterapia: radiação interna ou braquiterapia e radiação externa.

A técnica de radiação externa consiste em aplicar diretamente na zona tumoral uma fonte emissora de radiação e é a forma mais comum de tratamento(69). Na braquiterapia é introduzida a fonte de radiação no tecido mamário, podendo ela ser líquida (radioisótopo) ou um dispositivo sólido(70).

### 6.5.3) Quimioterapia

Na aplicação de tratamentos sistêmicos utilizam-se fármacos que vão entrar no sistema circulatório(66). Um desses tipos de tratamento é a quimioterapia e caracteriza-se pela administração de fármacos que vão destruir as células cancerígenas e limitar o seu crescimento. Este tipo de tratamento é preferencialmente aplicado em cancro do tipo triplo negativo(71). Segundo as diretrizes da *American Cancer Society* a quimioterapia é recomendada antes (tratamento neoadjuvante) e depois da cirurgia (tratamento adjuvante). A sua aplicação depende do estágio do tumor e envolve moléculas como os taxanos, antraciclinas ou agentes alquilantes, em fases iniciais do

cancro, e para além das referidas anteriormente, antibióticos citotóxicos, análogos de pirimidinas, e outros, em fases avançadas, por exemplo quando existe metástases, podendo serem combinados vários destes agentes(59).

#### 6.5.4) Terapia Hormonal

A terapia hormonal ou endócrina é aplicada em tumores que apresentam recetores hormonais de estrogénio e progesterona nas suas células. Estas terapias podem bloquear recetores hormonais ou reduzir os níveis circulantes de estrogénio e progesterona impedindo o crescimento e proliferação de células tumorais(72). O fármaco mais utilizado neste tipo de terapia é o Tamoxifen e atua como modulador dos recetores de estrogénio(73).

#### 6.5.5) Terapia direcionada

Outro tipo de terapêutica sistémica é a direcionada como é o exemplo da terapia com anticorpos monoclonais conjugados com agentes citotóxicos(74). Esta terapia é semelhante à quimioterapia, no entanto, menos agressiva, pois é direcionada às células tumorais, não provocando danos na células normais. A aplicação da terapia direcionada consiste em produzir anticorpos que são específicos para proteínas membranares como é o caso do HER2 ou proteínas quinases, que estão relacionadas com o crescimento e proliferação celular, respetivamente(75)(13). Os fármacos mais utilizados são o Trastuzumab para cancro positivos para HER2 e o Lapatinib que é um inibidor de quinases, utilizado em cancros em estádios avançados(70).

#### 6.5.6) Imunoterapia

Existe ainda outra forma de terapêutica sistémica que é a imunoterapia. A imunoterapia consiste em administrar nas pacientes fármacos que estimulam o sistema imunitário a destruir a células cancerígenas. Estes fármacos vão ligar-se a estruturas celulares específicas tornando as células tumorais acessíveis ao agentes do sistema imunitário, permitindo que estes possam combater o desenvolvimento do tumor(76).

### 6.5.7) Novos avanços

Embora existam diversos tipos de terapêuticas disponíveis é importante que se continue a estudar de forma a melhorar o nosso conhecimento acerca do cancro da mama permitindo o aparecimento de novos tratamentos e se melhore a eficácia dos já existentes. Recentemente, tem-se desenvolvido novas estratégias de administrar e entregar fármacos aos tumores, como é o exemplo das nanopartículas(77). Num destes trabalhos desenvolveram-se nanopartículas revestidas a ouro com afinidade ao recetor de membrana EGFR, que foram estimuladas por fonte térmica, induzindo a destruição do tumor(25).

### 6.6) Modelos Experimentais de Cancro de Mama

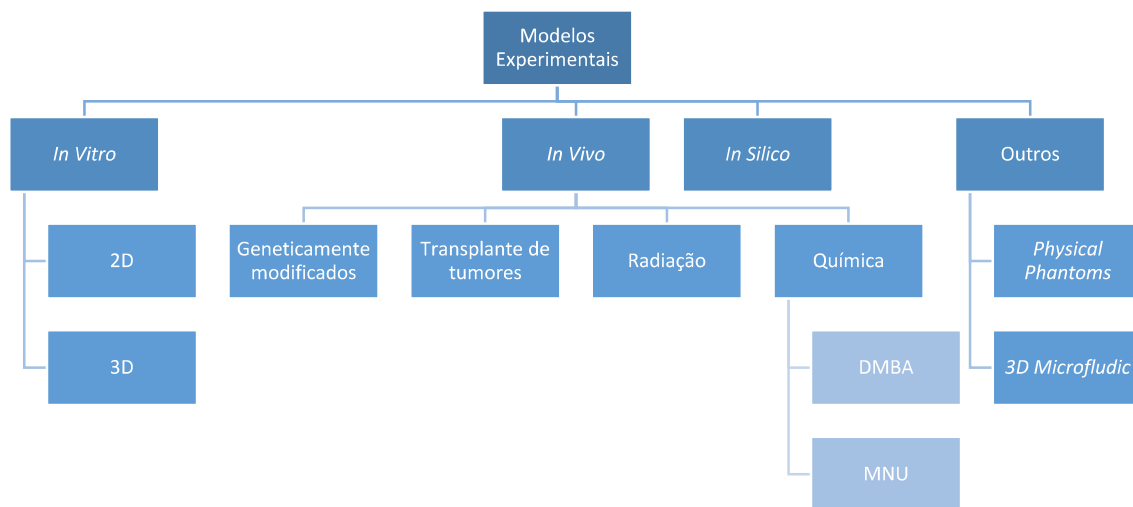


Figura 7 - Organograma representativo dos vários tipos de modelo experimental descritos neste trabalho.

Anos de estudos acerca do cancro da mama culminaram com avanços no entendimento das suas bases patológicas, da sua progressão, e que nos permitem compreender a sua etiologia e desenvolver ferramentas de diagnóstico e terapêutica. Para se melhorar e aprofundar o conhecimento e otimizar processo investigativo deve-

se recorrer a modelos de experimentação que permitam mimetizar as propriedades e ambiente dos tumores de forma eficaz(78).

Atualmente existem vários tipos de modelos, nomeadamente, os modelos *in vitro*, *in vivo*, *in silico* e outros modelos onde se incluem modelos tridimensionais não biológicos, como se pode observar na figura 7(79). Os diversos tipos de modelos experimentais serão descritos de seguida.

#### 6.6.1) Modelos *In Vitro*

Nos modelos de experimentação *in vitro* vão ser utilizadas uma ou várias linhas celulares em meio de cultura, em modelos bidimensionais ou tridimensionais. Estes modelos permitem o estudo de vários mecanismos intracelulares, bem como intercelulares, tais como mecanismos de sinalização celular, metabolismo, absorção e excreção de substâncias, metástases e proliferação celular, sempre em ambiente controlado. A necessidade de estudar mecanismos mais complexos como a interação celular com a matriz extracelular levou à necessidade de desenvolver modelos *in vitro* tridimensionais. A utilização *in vitro* modelos é vantajosa porque são baratos e de fácil manutenção, existe uma grande variedade de linhas celulares e estão sujeitos a menos constrangimentos éticos. No entanto, não simulam adequadamente o microambiente tumoral e ao fim de algumas gerações começam a aparecer mutações indesejáveis(78)(79).

#### 6.6.2) Modelos *In Vivo*

Modelos *in vivo*, são modelos em que se utilizam organismos vivos, ou seja, um sistema fisiológico no qual se pode explorar a iniciação, invasão e metástases do cancro e que represente um passo adicional aos estudos *in vitro* e clínicos(80). Estes modelos devem permitir a análise de fenómenos biológicos e genéticos, devem apresentar uma histologia e histopatologia semelhantes às dos animais em estudo, permitir a indução de tumores através de agentes ambientais e poderem desempenhar programas terapêuticos inovadores de forma a obterem resultados preditivos em ensaios clínicos com humanos e animais(81)(79).

Para se fazer investigação sobre cancro da mama através de modelos animais pode-se recorrer preferencialmente a animais como canídeos, felídeos e roedores(82). Os modelos de cães e gatos são interessantes pois desenvolvem espontaneamente tumores malignos semelhantes aos humanos. Os gatos são bons modelos para estudar a incidência e padrão de metástases(83). Os modelos utilizando cães têm vantagens em avaliar comportamento biológico e tipo histológico dos tumores(84). Apesar do descrito anteriormente, os modelos de roedores, nomeadamente, ratos – *Rattus norvegicus* – e murganhos – *Mus musculus* – são os mais utilizados na união europeia para fazer investigação experimental(12)(85). Existe em cada espécie diversas colónias que apresentam diferenças na sua variabilidade genética, podendo esta ser importante para a escolha do modelo. Dependendo da uniformidade genética destas estirpes elas podem ser divididas em *inbred* ou *outbred*. As estirpes *inbred* têm uma grande uniformidade genética, o que permite reduzir os animais em estudo, melhorar a uniformidade estatística, e têm como os principais estirpes os Fischer nos ratos ou os BALB/c nos murganhos. As estirpes *outbred* apresentam grande variabilidade genética que é o que se sucede nas populações humanas. As principais estirpes são os ratos Wistar ou Sprague-Dawley ou os murganhos Black Swiss(86, 87). A utilização de modelos de roedores é vantajosa pois estes animais são baratos, pequenos, fáceis de alojar e de manipular. Outra característica importante é que apresentam 90% de homologia do genoma com humanos(88) e no caso de utilização de ratos, permitem desenvolver tumores com alta dependência hormonal(89).

Existem vários modelos *in vivo* para investigar o cancro da mama, como são o caso dos modelos ambientais. Estes modelos são os de indução química, de transplante de tumores, de radiação e geneticamente modificados(79).

Os modelos *in vivo* de indução química são modelos que consistem na indução de tumores através do contacto com compostos químicos que as pessoas podem contactar diariamente, nomeadamente, 7,12-dimetilbenzatráceno (DMBA) e N-metil-N-nitrosureia (MNU) que podem induzir tumores em ratos semelhantes histologicamente e geneticamente aos descritos em humanos(90)(12).

O DMBA é um hidrocarboneto aromático policíclico pouco solúvel em água e altamente lipofílico e facilmente distribuído e absorvido pelo organismo(35)(91). São



conhecidos efeitos adversos provocados por este composto a toxicidade que condiciona a atividade do sistema imunitário, efeitos mutagénicos, teratogénicos e carcinogénicos(91). O DMBA está presente no fumo dos cigarro, no carvão, no petróleo, na combustão de motores e na carne grelhada e assados. Este composto pode ser absorvido pela pele, pelo sistema respiratório e gastrointestinal. A inalação do fumo do tabaco pode ser um dos exemplos da exposição ao DMBA(92)(93)(91)(94)(95). Este composto de ação carcinogénica indireta que necessita de ser previamente ativado pelo citocromo p-450 localizado no fígado, e que pode fazer aduções no DNA(96)(97). O DMBA liga-se ao recetor de hidrocarbonetos do citosol, tornando-se ativo e dirigindo-se para o núcleo, onde se vai associar a uma proteína ligando-se a sítios específicos do DNA, induzindo mutações(98)(99).

O DMBA é um carcinogénico que desenvolve um elevado número de tumores semelhantes ao que se encontram em humanos em termos de histologia (25). Em termos moleculares os tumores são maioritariamente dependentes de hormonas (12), o que os assemelha bastante aos observado em humanos (até 85% apresentam recetores de estrogénio) (13). Para além do mais, este composto permite simular os efeitos nocivos do tabagismo, pois está presente no fumo do tabaco (100). Este facto torna a utilização do modelo pertinente, pois existem estudos que argumentam que o desenvolvimento de cancro de mama está relacionado com o hábito de consumo de tabaco durante a puberdade e adolescência(32)(31), idade em que os TEB estão em desenvolvimento(8)(96). Este carcinogénico permite o estudo de tumores que não metastizam, de perfil invasivo e maioritariamente de grau I. No que diz respeito ao bem estar animal, estes tumores não apresentam grande severidade(25).

Vários estudos demonstram que a utilização de modelos de indução cancro da mama em ratos utilizando DMBA estimula o desenvolvimento de carcinomas in situ e invasivos nos botões terminais (TEB) e proliferação dos ductos(101)(102).

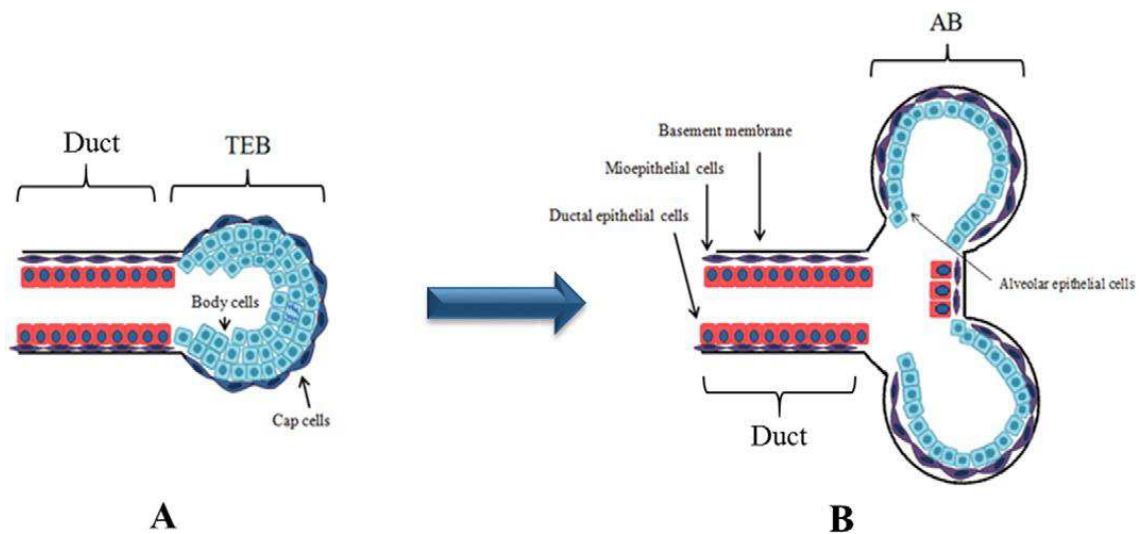
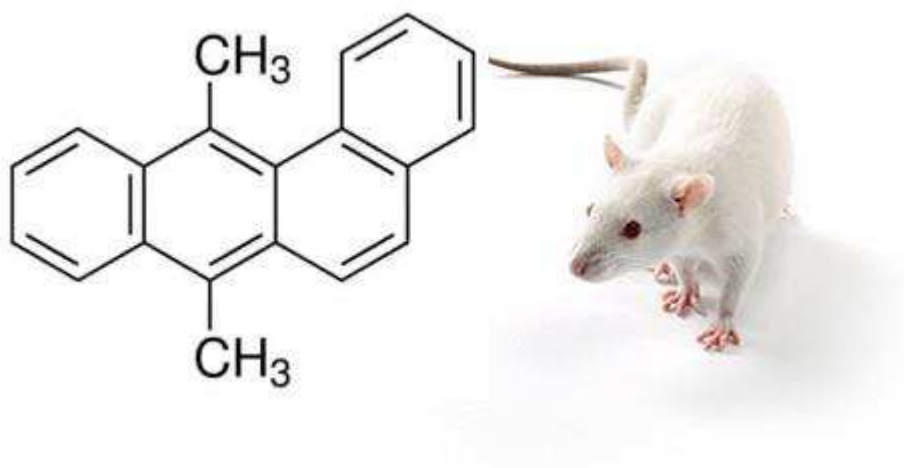


Figura 8 - Representação esquemática do desenvolvimento da glândula mamária ratos fêmea durante a puberdade. A glândula mamária é constituída por diversos botões terminais (TEB) (A) que durante a puberdade se vão dividir em diversos alvéolos (AB) (B). Alvarado et al. / *Life Sciences* 173 (2017) 116–134

A rápida expansão do epitélio glandular que ocorre durante a puberdade – em ratos corresponde ao período entre os 45 e os 55 dias de idade - tem uma importância fundamental na iniciação da carcinogénese (figura 8). Este facto deve-se à alta taxa proliferativa (o ciclo de replicação celular é de aproximadamente 13 horas) de células pluripotentes que permite a alongamento ductal e ramificação (103). As células pluripotentes, ou estaminais, têm um ciclo replicativo curto, que conseqüentemente limita o tempo de reparação do DNA, contribuindo para maior susceptibilidade dos TEB (104). Estas células têm elevada passibilidade de sofrer alterações do DNA que podem resultar na formação células neoplásicas que poderão desenvolver o tumor primário ou uma geração de células potencialmente metásticas. Todos os motivos referidos anteriormente fazem dos TEB o local mais comum para a iniciação carcinogénica(103)(12).

A maioria dos tumores de mama em ratos e murganho causados por DMBA são carcinomas dependentes de hormonas e são o resultado de uma troca dos nucleótidos adenina por timina no 61º códon do gene Ha-ras(98)(105)(106)(102).

O DMBA sendo administrado entre 50 e os 56 dias de idade por gavagem, com uma dose única de 50 a 100 mg/kg pode induzir um elevado número de tumores mamários com 100% de incidência em ratos Sprague -Dawley. Em ratos Wistar o DMBA induz muitos tumores, no entanto, em menor quantidade comparando com os Sprague-Dawley.



*Figura 9 - Representação, à esquerda do estrutura bidimensional do composto químico 7,12-dimetilbenzatraceno, e à direita do rato da estirpe Sprague-Dawley.*

Por sua vez, o MNU é um agente alquilante direto que provoca mutações no DNA promovendo a troca do nucleótido guanina por adenina no 12º códon do gene Ha-ras(107) e não necessita de bioativação prévia(12)(79). Uma única injeção intraperitoneal de metilnitrosureia (MNU), por volta dos 50 dias de idade, com uma dose de 50 mg/kg, é suficiente para induzir tumores mamários com uma incidência de 100% em Ratos Sprague-Dawley(12)(79)(102)(108). O composto MNU pode também ser administrado por outras vias, nomeadamente, subcutânea, intravenosa ou gavagem, no entanto, o número de tumores é mais elevado por administração intraperitoneal(107).

Comparando os tumores induzidos com DMBA e MNU, os induzidos por DMBA são menos agressivos, menos invasivos e sem metástases em órgãos distantes, enquanto que os induzidos por MNU tendem a ser mais agressivos e metastizantes(102)(109).

Estes modelos são vantajosos pois já estão bem descritos, permitem controlar fatores ambientais e estudar a carcinogénese mamária desde a iniciação, à promoção e

progressão. No entanto, são modelos que demoram muito tempo a serem aplicados até se obterem os resultados expectáveis(79).

Também é possível induzir tumores da mama através de radiação. Neste modelo os animais são expostos a um tipo de radiação, sendo que a glândula mamária é um dos tecidos mais sensíveis. São estudos muito recomendados para estudar efeitos de radiação, no entanto, ainda são necessários mais estudos para clarificar protocolos(79)(89).

Os modelos *in vivo* de transplante de tumores consistem em transplantar células vivas de um tumor ou um tumor sólido obtido a partir de um dador. Estes tumores podem ser aplicados em espécies distintas (modelos *Xenograft*) ou em indivíduos da mesma espécie (modelos *Allograft*). Estes modelos estão bem estabelecidos neste campo de estudo e são utilizados principalmente para novos fármacos e terapêuticas. A utilização deste tipo de modelo tem a vantagem de normalmente viabilizar o estudo de metástase apesar dos elevados custos de tempo e monetários que lhes estão inerentes(110)(111).

Por último, serão abordados os modelos *in vivo* geneticamente modificados. Nestes modelos utilizam-se estirpes de animais que foram geneticamente modificados, quer através de modificação, adição ou remoção de sequências de DNA. As principais alterações envolvem a expressão aumentada de oncogenes ou a perda de genes supressores de tumores(112). Estes modelos são valiosos para estudar mutações de uma forma muito específica, bem como aspetos biológicos e fisiopatológicos do cancro da mama. Um dos pontos contra, para a escolha deste modelo, é que as mutações são induzidas em todas as células do animal e por outro lado, o padrão metástico é diferente do que o que acontece humanos(79).

### 6.6.3) Modelos *In Silico*

Para além dos modelos anteriormente descritos, existem também os modelos *in silico*. Estes modelos foram criados para desempenhar estudos biológicos sem usar entidades biológicas, permitindo alto controlo sobre a experiência, aumentando o

número de variáveis e eliminando preocupações éticas. Os modelos *in silico* utilizam equações matemáticas através de recursos computacionais de elevado desempenho, podendo recolher e analisar dados em estudos prévios e aplicá-los de forma preditiva. Permitem identificar fatores que influenciam o surgimento do cancro, avaliação metabólica, diagnóstico e tratamento ou criar modelos 3D dos tecidos. Os modelos *in silico* podem ser muito úteis para auxiliar na tomada de decisão (79, 113, 114).

#### 6.6.4) Outros Modelos

Existem mais dois modelos de interesse para além dos já mencionados, que são os casos dos modelos são os *physical phantoms* e os *3D microfluidic*.

Os modelos *physical phantoms* são estruturas físicas criadas para mimetizar propriedades biológicas da estrutura tumoral e dos tecidos. São principalmente utilizados otimizar técnicas de diagnóstico através de imagem, como por exemplo, de raio-x, micro-ondas ou espectroscopia. Têm um valor acrescentado pois permitem avaliar o impacto da radiação nos tumores e tecidos envolventes em casos de exposição a radioterapia(115)(116)(117). No entanto, estes modelos são difíceis de contruir tendo em conta a estrutura biológica e a precisão de mimetizaras suas propriedades.

Os modelos *3D microfluidic* são sistemas tridimensionais de canais de dimensões da ordem do micrómetro que podem ser abastecidos periféricamente através de sistemas de bombagem com células e fluidos. Uma vez que o sistema tem células pode ser considerado um modelo *in vitro*, no entanto, como podem ser adicionados fluidos permite que este se aproxime a um modelo *in vivo*. Estes modelos apresentam potencial para mimetizar o microambiente tumoral o que o torna um excelente modelo para investigação farmacológica, de modelação de doenças ou metastização tumoral. A sua conceção, produção e manipulação, bem como material específico dos sistemas são elementos que desencorajam a sua utilização(79)(118).

Não existe um modelo ideal que se aplique a todas as questões e temas de estudo, sendo necessário ter em conta todas as vantagens e desvantagens dos modelos

disponíveis. Para a escolha de um modelo deverá ser feito um estudo prévio, tendo em conta o tema de estudo, os recursos disponíveis, preferências dos investigadores e questões éticas.

## 7) Objetivos

Existe a necessidade de desenvolver modelos experimentais de cancro da mama que estejam estudados aprofundadamente nos vários ramos científicos (119). O conhecimento alargado sobre características bioquímicas, genéticas, clínicas ou histopatológicas serão muito importantes para auxiliar a tomada de decisão na escolha de um modelo experimental para estudo da doença quer em relação ao desenvolvimento tumoral, diagnóstico ou à terapêutica. Neste sentido este trabalho tem como objetivo a caracterização do subtipo molecular de tumores de mama induzidos por 7,12-dimetilbenzotraceno em ratos Sprague-Dawley. Esta caracterização consiste em avaliar a presença ou ausência de diferentes estruturas moleculares presentes nas células tumorais através de técnicas de imunohistoquímica. As estruturas que pretendemos estudar são os recetores de estrogénio (ER), de progesterona (PR), do fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2) e a proteína nuclear Ki-67.





## 8) Material e Métodos

O material utilizado foi obtido a partir de um projeto anteriormente desenvolvido e aprovado que utilizou um modelo experimental *in vivo* com ratos (*Rattus norvegicus*) da estirpe Sprague Dawley onde se induziram quimicamente tumores mamários através da administração do composto químico 7,12-dimetilbenzantraceno.

A utilização de ratos fêmea neste modelo de carcinogênese em glândulas mamárias garantiu que houvesse bastantes semelhanças ao comportamento tumoral observado em humanos em termos genéticos, bioquímicos e histopatológicos(120)(121).

A administração foi feita através de gavagem, numa única dose de 65 mg/kg, aos 50 dias de idade, de acordo com o protocolo estabelecido pelo nosso grupo de trabalho (25, 34). Às 27 semanas os animais foram sacrificados e sujeitos a necrópsia sendo recolhidos várias órgãos e tumores para análise posterior. Esses tumores foram preservados em formol tamponado a 10% e impregnados em blocos de parafina. Os tumores obtidos foram classificados histologicamente de acordo com o seu comportamento e padrão histológico sendo que foram identificados os padrões histológicos predominantes, bem como o grau de cada tumor, de acordo com o descrito no capítulo da introdução. A partir destes resultados foram selecionadas 33 amostras de tumores malignos invasivos, com diferentes padrões histológicos predominantes e diferentes graus.

A utilização do material resultante deste projeto permite respeitar a regra dos 3R's, favorecendo a redução do número de animais sujeitos a experimentação.

A partir das amostras obtidas foram feitos cortes histológicos de aproximadamente 3  $\mu\text{m}$  com um micrótomo Leica RM2255, de forma a serem aplicadas técnicas imunohistoquímica através da utilização do aparelho Leica Bond-Max. Os anticorpos e respetivos tampões de recuperação antigénica utilizados formam os seguintes:

Tabela 2 - Correspondência do método de recuperação antigénica e anticorpo utilizado para cada anticorpo-alvo.

Anticorpo Alvo	Recuperação antigénica	Anticorpo utilizado
Recetor de Estrogénio	Tampão citrato	Primary Mouse Monoclonal Estrogen Receptor, Clone 6F11, REF: PA0151, Leica Biosystems
Recetor de Progesterona	Tampão EDTA	Primary Mouse Monoclonal Progesterone Receptor, Clone 16, REF: PA0312, Leica Biosystems
Recetor Epidermal Humano 2	Tampão EDTA	Primary Mouse Monoclonal C-erbB-2, Oncoprotein, Clone CB11, REF: PA0983, Leica Biosystems
Ki-67	Tampão EDTA	Primary Mouse Monoclonal Ki67, Clone MM1, REF: PA0118, Leica Biosystems

A técnica de coloração de imunohistoquímica utilizada compreende os passos-chave descritos no esquema da figura 10 e corresponde ao Protocolo F de IHC do dispositivo Leica Bond-Max utilizado no Instituto de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

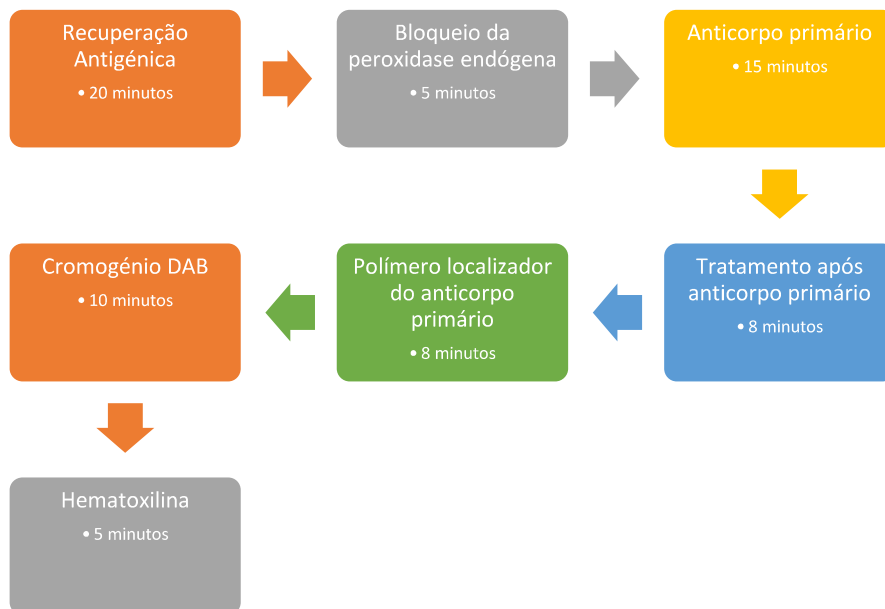


Figura 10 - Esquema representativo dos passos-chave do protocolo F de IHC utilizado neste trabalho.

Posteriormente utilizou-se o digitalizador Aperio CS2-LEICA de lâminas histopatológicas. Para se fazerem estudos qualitativos e quantitativos das imagens obtidas utilizou-se o *software* Aperio eSlide Manager concebido pela LEICA, que permite

determinar a intensidade da coloração numa escala numérica de 0 a 3 e a percentagem de marcação efetiva do anticorpo numa escala numérica percentual de 0 a 100%.

Para se realizar a avaliação da expressão dos quatro biomarcadores utilizados - ER, PR, HER2 e Ki-67 – e classificar os tumores de acordo com um subtipo molecular utilizaram-se recomendações (49, 122) que estão descritas na tabela 1 no capítulo da introdução deste trabalho. A classificação do subtipo molecular dos tumores de mama foi feita utilizando as *guidelines* mais recomendadas internacionalmente. As recomendações de avaliação são descritas de seguida.

Os painéis de especialistas da *American Society of Clinical Oncology–College of American Pathologists* (ASCO-CAP) e da *European Society for Medical Oncology* recomendam a testagem de ER e PR em tumores invasivos. Estas duas sociedades médicas recomendam que em caso de haver imunomarcação de 1 a 100% os tumores sejam considerados positivos. Neste trabalho, os tumores são considerados pouco positivos com uma imunomarcação positiva de 1 a 10% e negativos no limite de 0 e 1% (tabela 3). Os mesmos princípios foram aplicados na testagem do biomarcador PR (123)(124).

Tabela 3 – Recomendações para a avaliação da percentagem de marcação IHC dos biomarcadores ER e PR.

ER / PR		
Negativo	Pouco Positivo	Positivo
> 1 %	≤ 1 %	≤ 10 %

Na avaliação da expressão da proteína HER2 recorreu-se às recomendações da ASCO-CAP (123). Segundo a ASCO-CAP, recomenda-se o uso de um algoritmo que define valores positivos, ambíguos e negativos consoante a expressão da proteína HER2 e do respetivo gene: um resultado positivo de HER2 é a coloração IHC de 3+ que corresponde a uma coloração uniforme e intensa da membrana de mais de 30% das células tumorais invasivas, ou uma coloração de fluorescência de hibridização situ (FISH) com o resultado de mais de seis cópias do gene HER2 por núcleo ou um resultado FISH com a razão (sinais do gene HER2 por sinais do cromossoma 17) de mais de 2,2; um resultado negativo é uma coloração IHC de 0 ou 1+, ou seja, uma coloração fraca ou incompleta da membrana

celular, um resultado FISH de menos de 4,0 cópias do gene HER2 por núcleo ou resultado FISH com a razão de HER2 por cromossoma 17 inferior a 1,8. Os resultados ambíguos, são os 2+, e correspondem a uma coloração uniforme ou não, de pelo menos 10% das células. Estes casos determinam a realização dos testes FISH(125)(126). Na figura 11 pode visualizar a informação anterior de forma esquematizada.

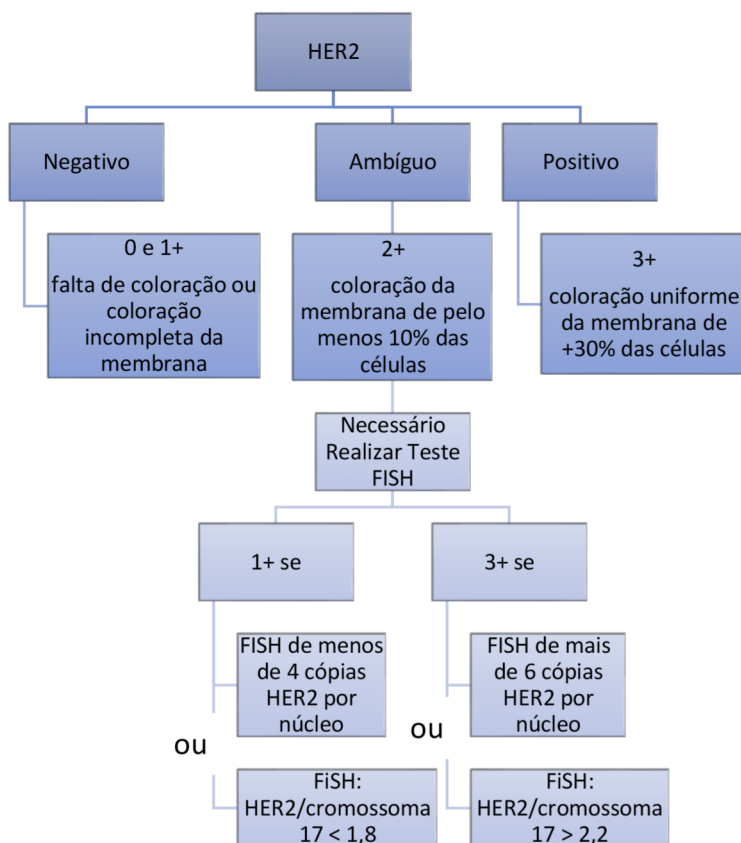


Figura 11 - Organograma representativo do algoritmo de escolha de critérios de classificação de HER2.

Embora existam problemas na determinação do valor de Ki67, o *European Group on Tumor Markers* e o grupo de trabalho internacional sobre Ki67 recomendam que o biomarcador seja usado para determinar o prognóstico, considerando valores baixos quando menos de 10% das células estiverem coradas e valores altos quando mais de 25% de células coradas(127–129). Os valores seguros para estratificar os pacientes de alto risco com cancro do tipo Luminal são os maiores ou iguais a 20% de marcação IHC(130). Conforme se pode ler na tabela 4 os tumores Luminal A apresentam uma marcação inferior a 20 % enquanto os tumores Luminal B apresentam uma marcação maior ou igual a 20%.

Tabela 4 – Recomendação para classificar tumores do tipo Luminal de acordo com a percentagem de marcação IHC do biomarcador Ki-67.

% Ki67	
< 20%	≥20%
Luminal A	Luminal B

Os resultados obtidos foram trabalhados aplicando-se uma escala numérica contínua. Esta escala numérica compreende valores de 0 a 300 que são provenientes do produto da intensidade pela percentagem de marcação (IxP). Os valores obtidos são distribuídos pelos seguintes níveis: de 0 a 10, nível I; 11 a 100, nível II; 101 a 200, nível III e de 201 a 300, nível IV, como se pode ver na tabela seguinte:

Tabela 5 – Níveis da escala do produto da Intensidade de marcação pela percentagem de marcação imunohistoquímica.

Nível I	Nível II	Nível III	Nível IV
0 a 10	11 a 100	101 a 200	201 a 300

Para complementar os resultados avaliaram-se os seguintes parâmetros histopatológicos: reação estromal, necrose e infiltrado inflamatório. Estes parâmetros foram avaliados aplicando-se uma escala numérica progressiva. Através da observação microscópica atribuiu-se uma pontuação de 0 a 3 a cada característica histopatológica conforme se pode ler na tabela 6.

Tabela 6 – Escalas de pontuação utilizadas para avaliar as características histopatológicas, necrose, reação estromal e infiltrado inflamatório.

Necrose	Reação estromal	Infiltrado inflamatório
0 – Ausente	0 - Ausente	0 - Ausente
1 – Focal (10%)	1 – Ligeiro	1 – Ligeiro
2- Moderado (20-70%)	2 – Moderado	2 – Moderado
3 – Extensivo (>80%)	3 - Elevado	3 - Elevado

Os dados foram editados e categorizados no Microsoft® Excel e foi realizada uma análise descritiva inicial. Posteriormente, foi realizada análise estatística por meio do

Programa GraphPad Prism 9<sup>®</sup>. Todos os valores apresentados foram expressos em percentagem ou em valor médio  $\pm$  erro padrão da média. Foram aplicados testes não paramétricos para comparar amostras independentes. O teste de Kruskal-Wallis foi usado para fazer comparações entre mais de 2 grupos e o teste de Mann-Whitney foi usado para fazer comparações apenas entre dois grupos. Na aplicação dos testes estatísticos foi considerado o valor de  $p < 0,05$ .

## 9) Resultados

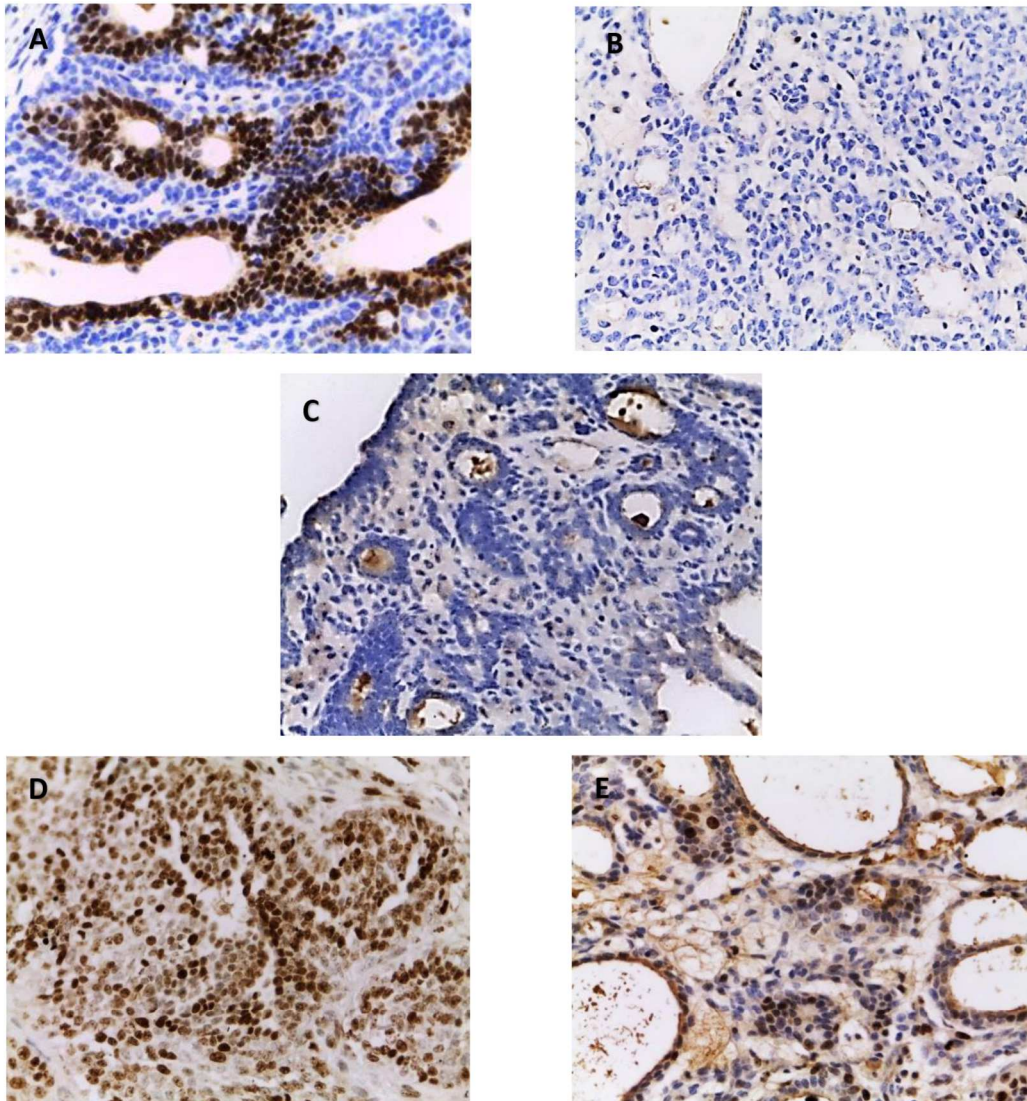
Como ponto de partida para se realizar este trabalho utilizaram-se 33 tumores malignos invasivos, em que 20 são de grau I, 6 são de grau II e 7 de grau III. Nestes tumores podemos observar diversos padrões histológicos, tais como o tubular, o papilar, o cribiforme e o comedo, conforme se pode observar na tabela seguinte.

*Tabela 7 – Representação da amostra utilizada no estudo em que se discrimina a malignidade, o grau e os padrões histológicos dos tumores.*

<b>33 Tumores Malignos Invasivos</b>						
20 de Grau I		6 de Grau II			7 de Grau III	
3	17	1	4	1	5	2
Tubular	Papilar	Tubular	Papilar	Cribiforme	Cribiforme	Comedo

Estes tumores formam sujeitos a técnicas de imunohistoquímica (IHC) de forma a avaliar os biomarcadores recetores de estrogénio (ER), recetores de progesterona (PR), recetor do fator de crescimento epidermal humano II (HER2) a proteína de proliferação Ki-67. Os resultados obtidos demonstram que os tumores expressam ER em todos os casos. Quanto à expressão de PR todos os casos são negativos. As amostras em que se utilizaram anticorpos para identificar HER2 mostram que todos os tumores são negativos para este recetor. Quanto proteína de proliferação Ki-67 a marcação IHC revela que todos os casos são positivos. Na figura seguinte podem-se observar os resultados da aplicação das técnicas de IHC.





*Figura 12 - Imagens de microscopia ótica representativas de tumores com coloração imunohistoquímica. A) marcação positiva de ER. B) Ausência de marcação de PR. C) Ausência de marcação de HER2. D) Marcação positiva (65%) de Ki-67. E) marcação positiva (15%) de Ki-67. Todas as imagens têm uma ampliação de 400X.*

Mediante esta avaliação em que se utilizaram os critérios e algoritmos referidos nos materiais e métodos foi possível classificar os tumores de acordo com os subtipos moleculares descritos na Tabela 1. Os tumores estudados foram classificados como pertencendo aos subtipos moleculares Luminal A e Luminal B. A maioria dos tumores - 70% que correspondem a 23 casos - foram classificados com Luminal B, e os restantes foram classificados como Luminal A - 30% que correspondem a 10 casos.



Tabela 8 - distribuição dos casos Luminal A e Luminal B pelos níveis da escala IxP referente ao biomarcador ER. Pode observar-se o número de casos e percentagem respetiva.

IxP de ER							
Luminal A				Luminal B			
Nível I	Nível II	Nível III	Nível IV	Nível I	Nível II	Nível III	Nível IV
0	7 (70,0%)	3 (30,0%)	0	2 (8,8%)	16 (69,5%)	4 (17,4%)	1 (4,3%)

A análise da distribuição dos tumores Luminal A e Luminal B pela escala IxP referente ao marcador ER (Tabela 8) mostrou que os tumores Luminal A estão distribuídos em 70,0% no nível II e 30,0% no nível III. Não existem tumores Lumina A nos níveis I e IV. Os tumores Luminal B estão distribuídos em 69,5% no nível II, 17,4% no nível III, 8,8% no nível I e 4,3% no nível IV.

Tabela 9 – distribuição dos casos Luminal A e Luminal B pelos níveis da escala IxP referente ao biomarcador Ki-67. Pode observar-se o número de casos e percentagem respetiva.

IxP de Ki-67							
Luminal A				Luminal B			
Nível I	Nível II	Nível III	Nível IV	Nível I	Nível II	Nível III	Nível IV
7 (70,0%)	3 (30,0%)	0	0	0	16 (69,5%)	5 (26,2%)	2 (4,3%)

A distribuição da percentagem de casos com subtipo molecular A e B pela escala IxP referente ao marcador Ki-67 (Tabela 9) demonstra que 70,0% do tumores Luminal A encontram-se no nível I e 30,0% no nível II. Não existem tumores Luminal B distribuídos pelo nível I. 69,5% dos tumores Luminal B estão distribuídos pelo nível II, 26,2% no nível III e 4,3% no nível IV.

Tabela 10 – Distribuição dos casos e respetiva percentagem por grau e subtipo molecular.

	Grau I	Grau II	Grau III
<b>Luminal A</b>	6 (60,0%)	3 (30,0%)	1 (10,0%)
<b>Luminal B</b>	14 (61,0%)	3 (13,0%)	6 (26,0%)

Os resultados que se observam na Tabela 10 indicam que a 60,0% dos tumores Luminal A são de grau I, 30,0% grau II e 10,0 % de grau III. Os tumores Luminal B são 61,0% de grau I, 13,0% de grau II e 26,0% de grau III.

*Tabela 11 – Distribuição dos vários tipos de padrão histológico (número de casos e respetiva percentagem) em função do grau do tumor.*

	<b>Grau I</b>	<b>Grau II</b>	<b>Grau III</b>
<b>Tubular</b>	4 (19,0%)	1 (16,7%)	0
<b>Papilar</b>	17 (81,0%)	4 (66,7%)	0
<b>Cribiforme</b>	0	1 (16,7%)	5 (71,4%)
<b>Comedo</b>	0	0	2 (28,6%)

Através da leitura da Tabela 11 pode-se ver a distribuição dos tipos de padrão histológico pelos graus do tumor. Os tumores de grau I apresentam 81,0% dos tumores com padrão histológico tubular e 19,0% com padrão tubular. Os tumores de grau II apresentam 16,7% dos tumores com padrão histológico tubular, 66,7% com padrão tubular e 16,7% com padrão cribiforme. Os tumores de grau III apresentam 71,4% dos tumores com padrão histológico cribiforme e 28,6% com padrão comedo.

*Tabela 12 - Distribuição dos vários tipos de padrão histológico (número de casos e respetiva percentagem) em função do subtipo molecular do tumor.*

	<b>Luminal A</b>	<b>Luminal B</b>
<b>Tubular</b>	1 (10,0%)	3 (13,2%)
<b>Papilar</b>	8 (80,0%)	13 (56,2%)
<b>Cribiforme</b>	1 (10,0%)	5 (21,8%)
<b>Comedo</b>	0	2 (8,8%)

Os dados obtidos que se podem observar na Tabela 12 mostram que os tumores Luminal A apresentam 80,0% de tumores com padrão histológico papilar, 10,0% com padrão tubular e 10,0% com padrão cribiforme. Os tumores Luminal B apresentam 56,1% dos tumores com padrão papilar, 21,7% com padrão cribiforme, 13,1% com padrão tubular e 8,7% dos tumores com padrão comedo.

Para se estudar os tumores Luminal A e B na forma como estes se comportam em relação a algumas características histopatológicas (reação estromal, infiltrado inflamatório e necrose) aplicaram-se os critérios descritos na tabela 5.

*Tabela 16 - Distribuição dos casos Luminal A e Luminal B pela escala de pontuação de avaliação da característica histopatológica reação estromal. Pode observar-se o número de casos e a respetiva percentagem.*

Reação Estromal							
Luminal A				Luminal B			
Ausente	Ligeiro	Moderado	Elevado	Ausente	Ligeiro	Moderado	Elevado
0	0	6 (60,0%)	4 (40,0%)	0	4 (17,4%)	13 (56,5%)	6 (21,6%)

Na Tabela 13 podem-se observar os resultados referentes a reação estromal presente nos tumores Luminal A e B. De acordo com os dados obtidos, 60,0% do tumores Luminal A apresentam uma reação estromal moderada e 40,0% apresentam reação estromal elevada. Não existem tumores Luminal A com reação estromal ausente ou ligeira. Os tumores Luminal B apresentam 56,5% de reação estromal elevada, 21,6% elevada e 17,4% ligeira. Não existem tumores Luminal B sem reação estromal.

*Tabela 17 - Distribuição dos casos Luminal A e Luminal B pela escala de pontuação de avaliação da característica histopatológica necrose. Pode observar-se o número de casos e a respetiva percentagem.*

Necrose							
Luminal A				Luminal B			
Ausente	Focal	Moderado	Extensivo	Ausente	Focal	Moderado	Extensivo
7 (70,0%)	3 (30,0%)	0	0	11 (47,8%)	6 (26,1%)	0	6 (26,1%)

Relativamente à característica histopatológica necrose (Tabela 14) podemos verificar que 70,0% dos tumores Luminal A não apresentam necrose e 30,0% apresentam necrose focal. Os tumores Luminal A não apresentam necrose moderada ou extensa. Em 47,8% dos tumores Luminal B não se observa necrose, enquanto que nos restantes casos, observa-se 26,1% de necrose focal e 26,1% de necrose extensiva. Os tumores Luminal B não apresentam necrose moderada.

Tabela 18 - Distribuição dos casos Luminal A e Luminal B pela escala de pontuação de avaliação da característica histopatológica infiltrado inflamatório. Pode observar-se o número de casos e a respetiva percentagem.

Infiltrado Inflamatório							
Luminal A				Luminal B			
Ausente	Ligeiro	Moderado	Elevado	Ausente	Ligeiro	Moderado	Elevado
0	1 (10,0%)	5 (50,0%)	4 (40,0%)	0	5 (21,8%)	11 (47,8)	7 (30,4%)

Conforme se pode observar na Tabela 15 todos os tumores Luminal A e B apresentam infiltrado inflamatório. Os tumores Luminal A apresentam infiltrado inflamatório ligeiro em 10,0% dos casos, moderado em 50,0% dos casos e elevado em 40,0% dos casos. Por sua vez tumores Luminal B apresentam infiltrado inflamatório ligeiro em 21,8% dos casos, moderado em 47,8% dos casos e elevado em 30,4% dos casos.

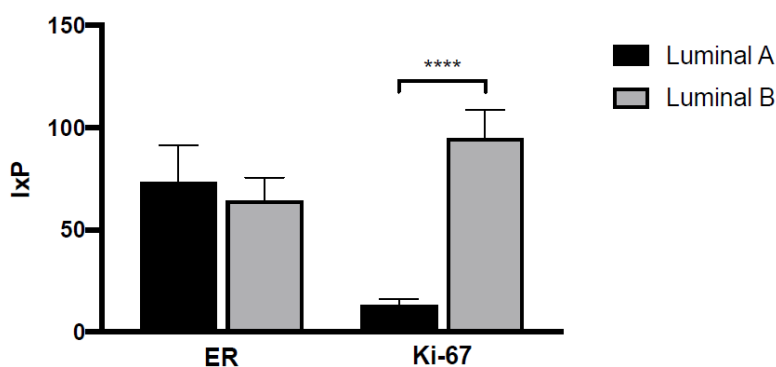


Figura 13 – Gráfico representativo da comparação dos subtipos moleculares Luminal A e Luminal B quanto à distribuição da média de marcação IHC dos biomarcadores ER e Ki-67 pela escala IxP. (\*\*\*\* -  $P < 0.05$ )

Na Figura 13 verifica-se que o biomarcador ER apresenta uma marcação média de coloração imunohistoquímica (IHC) de  $73,0 \pm 18,1$  em tumores Luminal A e de  $64,1 \pm 11,3$  em tumores Luminal B. Quanto ao biomarcador Ki-67, este apresenta uma marcação média de  $13,0 \pm 3,0$  em tumores Luminal A e de  $94,8 \pm 13,8$  em tumores

Luminal B. Existe uma diferença estaticamente significativa quando se compara a marcação média de IHC de Ki-67 em tumores Luminal A e B ( $P < 0.0001$ ).

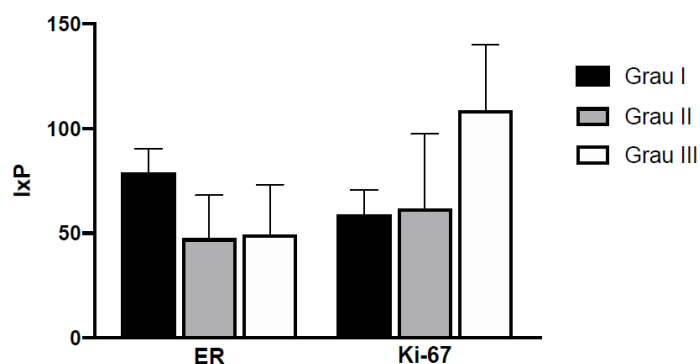


Figura 14 - Gráfico representativo da comparação dos graus do tumor quanto à distribuição da média de marcação IHC dos biomarcadores ER e Ki-67 pela escala IxP.

Na Figura 14 verifica-se que o biomarcador ER apresenta uma marcação média de coloração imunohistoquímica (IHC) de  $78,8 \pm 11,5$  em tumores grau I, de  $47,5 \pm 20,7$  em tumores grau II e de  $49,3 \pm 23,9$  em tumores de grau III. Quanto ao biomarcador Ki-67, este apresenta uma marcação média de  $59,0 \pm 11,5$  em tumores grau I, de  $61,8 \pm 35,8$  em tumores grau II e de  $108,6 \pm 31,5$  em tumores de grau III.

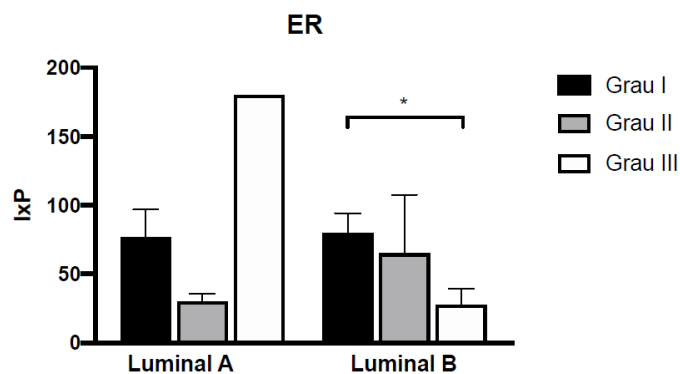


Figura 15 - Gráfico representativo da comparação dos subtipos quanto ao grau tendo em conta a distribuição da média de marcação IHC do biomarcadores ER pela escala IxP.

Os resultados da Figura 15 demonstram a marcação média do biomarcador ER em tumores do subtipo molecular Luminal A de grau I apresentam uma marcação média de IHC de  $76,7 \pm 20,3$ , de  $30,0 \pm 5,8$  em tumores grau II e de  $180,0 \pm 0$  em tumores de grau III. Os tumores do subtipo Luminal B de grau I apresentam uma marcação média de

79,6±14,4 em tumores grau I, de 65,0±42,5 em tumores grau II e de 27,5±11,8 em tumores de grau III. Existe uma diferença estaticamente significativa quando se compara a marcação média de IHC de ER em tumores Luminal B de grau I e grau III (P de 0,355).

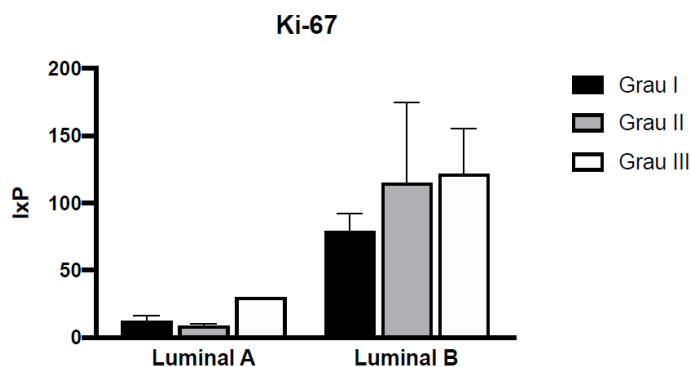


Figura 16 - Gráfico representativo da comparação dos subtipos moleculares quanto ao grau tendo em conta a distribuição da média de marcação IHC do biomarcadores ER pela escala IxP.

Na Figura 16 os resultados demonstram que a marcação média do biomarcador Ki-67 em tumores do subtipo molecular Luminal A de grau I apresentam uma marcação média de IHC de 12,5±3,8, de 8,3±1,6 em tumores grau II e de 30,0±6,0 em tumores de grau III. Quanto aos tumores do subtipo Luminal B de grau I apresentam uma marcação média de 78,9±13,2 em tumores grau I, de 115,0±59,6 em tumores grau II e de 121,7±33,8 em tumores de grau III.

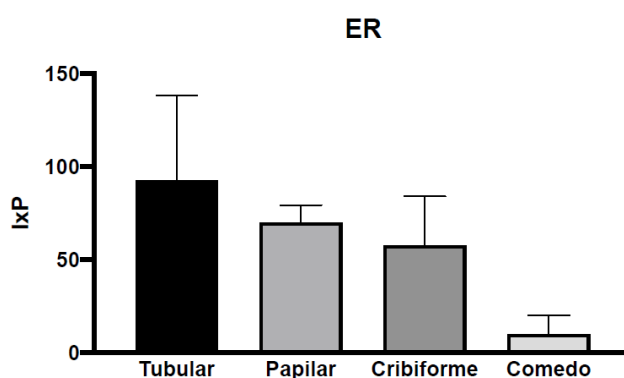


Figura 17 – Gráfico representativo da distribuição dos tipos de padrão histológico pela escala IxP referente ao biomarcador ER.

Os resultados da figura 17 mostram que os tumores com padrão predominantemente tubular apresentam uma marcação média IHC de recetores de estrogénio  $92,5 \pm 45,7$ , os tumores de padrão papilar apresentam uma média de  $70,0 \pm 9,5$ , os tumores de padrão cribiforme apresentam uma média de  $57,5 \pm 26,6$  e os tumores de padrão comedo apresentam uma média de  $10,0 \pm 10,0$ .

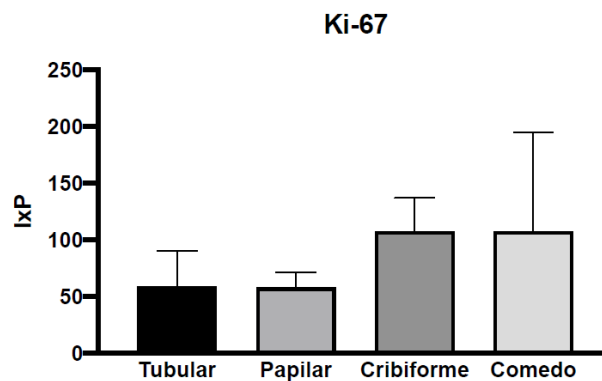


Figura 18 – Gráfico representativo da distribuição dos tipos de padrão histológico pela escala IxP referente ao biomarcador Ki-67.

Na figura 18 verifica-se que os tumores com padrão predominantemente tubular apresentam uma marcação média IHC de ki-67 de  $58,7 \pm 31,5$ , os tumores de padrão papilar apresentam uma média  $57,9 \pm 13,40$ , os tumores de padrão cribiforme apresentam uma média de  $107,5 \pm 26,6$  e os tumores de padrão comedo apresentam uma média de  $107,5 \pm 87,5$ .





## 10) Discussão

Este estudo pretendeu caracterizar o subtipo molecular de tumores de mama induzidos por 7,12-dimetilbenzotraceno em ratos Sprague-Dawley. A caracterização consistiu em avaliar a presença ou ausência de diferentes estruturas moleculares presentes nas células tumorais através de técnicas de imunohistoquímica. As estruturas que foram alvo de estudo foram os recetores de estrogénio (ER), de progesterona (PR), do fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2) e a proteína nuclear Ki-67. Através da utilização de critérios recomendados(122) foi possível determinar que os tumores induzidos neste modelo experimental podem ser classificados como tumores do subtipo molecular Luminal A em 30 % dos casos e Luminal B em 70 % dos casos. A classificação - Luminal - deve-se ao facto de os tumores serem positivos para recetores de hormonais, neste caso positivos para recetor de estrogénio e negativos para recetor de progesterona (ER+/PR-). A distinção entre tumores Luminal A e B é determinada pela avaliação da percentagem de marcação da proteína de proliferação Ki-67. Tumores com marcação de Ki-67 inferior a 20% serão Luminal do tipo A, e os tumores com marcação igual ou superior a 20% serão do tipo B. Os resultados que permitiram a classificação do subtipo molecular dos tumores encontram-se representados na Figura 12.

Quando se analisa a distribuição dos tumores pela escala de IxP (produto da intensidade pela percentagem de marcação IHC) referente ao ER percebemos que a maioria dos casos, tanto sejam Luminal A ou B, se distribuem principalmente pelos níveis I e II, não podendo afirmar que a quantidade de expressão de ER seja muito diferente entre os dois subtipos moleculares nem que este facto determine o pior prognóstico (Tabela 8).

No entanto, quando se faz o mesmo exercício, mas para o marcador Ki-67 percebe-se que os tumores Luminal A distribuem-se mais nos níveis I e II e os do tipo B mais nos níveis II, III e IV (Tabela 9). Pode-se então verificar que os tumores Luminal B estão mais distribuídos nos níveis mais altos da escala IxP e os Luminal A nos níveis mais baixos. Este facto parecer estar de acordo com o que é expectável nos tumores em humanos em que os tumores com pior prognóstico apresentam mais percentagem de marcação de Ki-67 (122, 131).

Quando se analisaram os dados obtidos neste trabalho quanto à relação do subtipo molecular e o grau do tumor (Tabela 10) percebeu-se que a os tumores Luminal A, são maioritariamente de grau I e que a percentagem de casos vai diminuindo à medida que o grau do tumor aumenta. Nos tumores Luminal B a distribuição por grau não é uniforme, sendo que a maioria dos tumores são de grau I. No entanto, a tendência é que haja um aumento dos tumores Luminal B de grau III. Comparando os dois subtipos moleculares podemos ver que as percentagens de tumores de grau I são idênticas. Estes dois subtipos moleculares apresentaram diferenças nos graus II e III. Os Luminal A vão ter maior percentagem de casos no grau II enquanto que os tumores Luminal B vão ter mais percentagem no grau III. Em resumo, pode-se perceber que a maioria dos tumores desenvolvidos são do tipo Luminal B e que têm um pior prognóstico. Um aspeto relevante é que embora estes tumores sejam maioritariamente de Grau I (60.8%), 26% são de grau III. Comparando tumores Luminal A e B, os segundos tendem a desenvolver mais tumores de grau III.

Conforme se pode observar na Figura 14 os tumores de Grau I apresentam maior valor médio de IxP referente ao biomarcador ER enquanto que os tumores de Grau II e III apresentam um valor médio de IxP inferior, embora que aproximado. Relativamente aos valores médio de IxP referente ao biomarcador Ki-67 existe uma aumento à medida que o Grau do tumor aumenta.

Comparando os graus dos tumores Luminal A e Luminal B quanto aos valores médios de IxP do biomarcador ER (Figura 15) percebemos que existe uma distribuição heterogénea dos pelos Graus I, II e III em tumores do subtipo Luminal A. No entanto, nos tumores Luminal B existe uma diminuição dos valores médios de IxP de ER à medida que o Grau do tumor aumenta, sendo que existe uma diferença estatisticamente significativa neste grupo (P de 0,335).

Quando se fez a comparação dos graus dos tumores Luminal A e Luminal B quanto aos valores médios de IxP do biomarcador Ki-67 (Figura 16) percebeu-se que existe uma distribuição heterogénea dos pelos Graus I, II e III com valores médios reduzidos em tumores do subtipo Luminal A. Nos tumores Luminal B existe um aumento acentuado dos valores médios de IxP de Ki-67 à medida que o Grau do tumor aumenta.

A análise dos resultados obtidos na Tabela 11 mostra que a maioria dos tumores de Grau I apresentam um padrão histológico papilar tal como os tumores de Grau II. Os tumores de Grau III apresentam na maioria casos com padrão cribiforme. É possível perceber que à medida que o grau do tumor aumenta o tipo de padrão histológico desenvolvido é mais agressivo.

Os dados acerca dos padrões histológicos desenvolvidos por tumores Luminal A e Luminal B (Tabela 12) revelam que a maioria dos tumores Luminal A apresentam um padrão histológico papilar, bem como os Luminal B, no entanto os Luminal B apresentam tendência a desenvolver padrões histológicos mais agressivos, como os cribiforme (21,8%) e comedo (8,8%) comparando com os Luminal A.

Durante a avaliação dos tipos de padrão histológico é importante considerar que os valores médios de IxP (escala do produto da intensidade pelo percentagem de marcação IHC) referentes ao biomarcador ER (Figura 17) diminuem à medida que os padrões são mais agressivos (de tubular para comedo). Os valores médios de IxP referentes ao biomarcador Ki-67 (Figura 18) aumentam à medida que os padrões são mais agressivos (de tubular para comedo). Estes dois resultados permitem-nos afirmar que os tumores desenvolvidos neste modelo com padrão histológico tubular, papilar, cribiforme ou comedo serão mais dependentes de hormonas conforme a ordem descrita (sendo o padrão tubular o mais dependente de hormona) e que se tornam mais invasivos pela ordem descrita (sendo o padrão comedo o mais invasivo).

Na figura 13 podemos observar que os tumores Luminal A e Luminal B têm um valor média do valor IxP de ER aproximado. No entanto quando observamos os dados referentes à média IxP de Ki-67 verificamos que existe uma diferença estatisticamente significativa ( $P < 0.0001$ ) entre os tumores Luminal A e Luminal B. Os tumores Luminal B apresentam maior média de IxP de Ki-67. Podemos concluir que os tumores Luminal B têm um perfil muito mais invasivo e proliferativo.

Avaliando as características histopatológicas podemos verificar que tanto os tumores Luminal A como os Luminal B apresentam uma reação estromal (Tabela 13) moderada ou elevada, factos que são expectáveis, tendo em conta que são tumores malignos invasivos. Quanto à necrose (Tabela 14) destaca-se que 26% dos tumores

Luminal B apresentam necrose extensiva e os tumores Luminal A e B apresentam infiltrado inflamatório (Tabela 15) distribuído de forma moderada e intensa.

Através da análise dos vários resultados é possível depreender que os tumores desenvolvidos neste modelo experimental têm semelhanças com os tumores que ocorrem em humanos e que este é um modelo que permite mimetizar vários aspetos da patologia.

Uma vez que todos os tumores obtidos são dependentes de hormonas, é possível conjecturar que este tipo de modelo será adequado para realizar estudos relacionados o desenvolvimento tumoral e terapêuticas hormonais. O uso deste modelo torna-se ainda mais importante pois sabemos que aproximadamente 70% dos cancros da mama femininos em humanos são dependentes de recetores hormonais (132) e que 80% dos tumores com recetores de estrogénio e progesterona respondem à terapia hormonal, ainda que apenas 40% dos tumores com apenas um destes tipos de recetor reagem à terapia hormonal (13).

Partindo desta última premissa deparamo-nos com o seguinte problema: neste trabalho todos os tumores tiveram um resultado negativo aos recetores de progesterona ao contrário do que descreve um estudo realizado anteriormente (102). Sabemos também que os recetores de estrogénio induzem a expressão de recetores de progesterona (133). A falta de marcação IHC dos recetores de progesterona pode dever-se a várias causas. Uma das causas é que os tumores podem efetivamente ter ausência de recetores de progesterona, pois estudos (133, 134) desenvolvidos em ratos indicam que os ER apenas induzem a expressão de PR se estiver presente Fator de Crescimento Epidermal (EGF) sugerindo a existência de uma relação importante entre recetores de EGF e/ou membros da família HER2 com os dois recetores hormonais. Como referido anteriormente, neste trabalho os tumores são negativos ao HER2. No entanto, esta hipótese parece ser pouco provável, pois estudos anteriores obtiveram resultados positivos para estes recetores(102). A repetição da técnica tentando variar alguns aspetos desta, como a recuperação antigénica amplificadores de sinal podem ser considerados na tentativa de resolução deste problema. Futuramente será pertinente testar novos anticorpos anti PR no sentido de perceber a questão relacionados com a sua ausência.



## 11) Conclusão

Este trabalho veio contribuir para a caracterização de um modelo experimental *in vivo* de indução química de tumores de mama através de 7,12-dimetilbenzatraceno. Podemos concluir que este trabalho permite desenvolver tumores de mama dependentes de recetores hormonais classificados com o subtipo molecular Luminal A e B. Os resultados obtidos neste trabalho acabam por ir ao encontro da falta de modelos experimentais para se estudar este tipo de cancro de mama que têm uma da ocorrência de aproximadamente de 70% (119).

Parece ser um modelo adequado a estudar o desenvolvimento tumoral em tumores dependentes de hormonas bem como para testar terapias hormonais.



## 12) Referências

1. BRAY F, LAVERSANNE M, WEIDERPASS E, Soerjomataram I. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer*. 2021. P. 127(16):3029-3030.
2. OMRAN, AR. The epidemiologic transition. A theory of the epidemiology of population change. *Milbank Mem Fund Q*. 1971. No. 49, p. 509–538.
3. SUNG, Hyuna, FERLAY, Jacques, SIEGEL, Rebecca L., LAVERSANNE, Mathieu, SOERJOMATARAM, Isabelle, JEMAL, Ahmedin and BRAY, Freddie. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021. Vol. 71, no. 3, p. 209–249. DOI 10.3322/caac.21660.
4. UNITED NATION. HUMAN DEVELOPMENT REPORT 2019 Beyond income, beyond averages, beyond today: Inequalities in human development in the 21st century. [online]. Available from: <https://hdr.undp.org/content/human-development-report-2019>
5. BRINTON LA, GAUDET MM, GIERACH GL. *Cancer Epidemiology and Prevention*. Oxford University Press, 2018.
6. ANN L COKER and NALAWANSHA, DHANUSHA A. PFLUM, Mary Kay. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & behavior*. 2017. Vol. 176, no. 5, p. 139–148. DOI 10.1016/S2214-109X(16)30259-5.Stage.
7. DESANTIS, Carol E., MA, Jiemin, GAUDET, Mia M., NEWMAN, Lisa A., MILLER, Kimberly D., GODING SAUER, Ann, JEMAL, Ahmedin and SIEGEL, Rebecca L. Breast cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2019. Vol. 69, no. 6, p. 438–451. DOI 10.3322/caac.21583.
8. JUNQUEIRA L, CARNEIRO J. *Histologia Básica*. 10th. Rio de Janeiro, 2004.
9. POLYAK, Kornelia. Breast cancer: Origins and evolution. *Journal of Clinical Investigation*. 2007. Vol. 117, no. 11, p. 3155–3163. DOI 10.1172/JCI33295. Breast cancer is not a single disease, but rather is composed of distinct subtypes associated with different clinical outcomes. Understanding this heterogeneity is key for the development of targeted cancer-preventative and -therapeutic interventions. Current models explaining inter- and intratumoral diversity are the cancer stem cell and the clonal evolution hypotheses. Although tumor initiation and progression are predominantly driven by acquired genetic alterations, recent data implicate a role for microenvironmental and epigenetic changes as well. Comprehensive unbiased studies of tumors and patient populations have significantly advanced our molecular understanding of breast cancer, but translating these findings into clinical practice remains a challenge.
10. JESINGER, Robert A. Breast anatomy for the interventionalist. *Techniques in Vascular and Interventional Radiology*. 2014. Vol. 17, no. 1, p. 3–9.
11. KRINKE, Georg. *The Laboratory Rat: Handbook of Experimental Animals* [online]. London : Academic Press, 2000. ISBN 1874480X. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124264007500376>
12. ALVARADO, Antonieta, FAUSTINO-ROCHA, Ana I., COLAÇO, Bruno and OLIVEIRA, Paula A. Experimental mammary carcinogenesis - Rat models. *Life Sciences*.



2017. Vol. 173, p. 116–134. DOI 10.1016/j.lfs.2017.02.004.
13. KUMAR V, ABBAS A, Aster J. *Robbins and Contran - Pathologic Bases of Disease*. 9th. Philadelphia : Elsevier Saunders, 2017.
  14. WILLIS, RA. *The Spread of Tumours in the Human Body*. March 1953.
  15. Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer*. 2006 Dec;6(12):924-35. doi: 10.1038/nrc2013. Epub 2006 Nov 16. PMID: 17109012. .
  16. BARCELLOS-HOFF, Mary Helen, LYDEN, David and WANG, Timothy C. *The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis*. July 2013. England.
  17. Tanaka T. Chemoprevention of human cancer: biology and therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1997 Apr;25(3):139-74. doi: 10.1016/s1040-8428(97)00232-1. PMID: 9177939. .
  18. HANAHAN, Douglas and WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. March 2011. Vol. 144, no. 5, p. 646–674. DOI 10.1016/j.cell.2011.02.013.
  19. SHACTER, Emily and WEITZMAN, Sigmund A. Chronic inflammation and cancer. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*. February 2002. Vol. 16, no. 2, p. 217–26, 229; discussion 230-2.
  20. MORGAN, Hugh D, SANTOS, Fátima, GREEN, Kelly, DEAN, Wendy and REIK, Wolf. Epigenetic reprogramming in mammals. *Human molecular genetics*. April 2005. Vol. 14 Spec No, p. R47-58. DOI 10.1093/hmg/ddi114.
  21. DAWSON, Mark A and KOUZARIDES, Tony. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*. July 2012. Vol. 150, no. 1, p. 12–27. DOI 10.1016/j.cell.2012.06.013.
  22. TAN, Minjia, LUO, Hao, LEE, Sangkyu, JIN, Fulai, YANG, Jeong Soo, MONTELLIER, Emilie, BUCHOU, Thierry, CHENG, Zhongyi, ROUSSEAUX, Sophie, RAJAGOPAL, Nisha, LU, Zhike, YE, Zhen, ZHU, Qin, WYSOCKA, Joanna, YE, Yang, KHOCHBIN, Saadi, REN, Bing and ZHAO, Yingming. Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell*. September 2011. Vol. 146, no. 6, p. 1016–1028. DOI 10.1016/j.cell.2011.08.008.
  23. LI, Lili, LI, Chen, MAO, Haitao, DU, Zhenfang, CHAN, Wai Yee, MURRAY, Paul, LUO, Bing, CHAN, Anthony Tc, MOK, Tony Sk, CHAN, Francis KI, AMBINDER, Richard F and TAO, Qian. Epigenetic inactivation of the CpG demethylase TET1 as a DNA methylation feedback loop in human cancers. *Scientific reports*. May 2016. Vol. 6, p. 26591. DOI 10.1038/srep26591.
  24. GAMA-SOSA, M A, SLAGEL, V A, TREWYN, R W, OXENHANDLER, R, KUO, K C, GEHRKE, C W and EHRLICH, M. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic acids research*. October 1983. Vol. 11, no. 19, p. 6883–6894. DOI 10.1093/nar/11.19.6883.
  25. COSTA, Eduardo, FERREIRA-GONÇALVES, Tânia, CARDOSO, Miguel, COELHO, João M.P., GASPAR, Maria Manuela, FAÍSCA, Pedro, ASCENSÃO, Lia, CABRITA, António S., REIS, Catarina Pinto and FIGUEIREDO, Isabel V. A step forward in breast cancer research: From a natural-like experimental model to a preliminary photothermal approach. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21, no. 24, p. 1–28. DOI 10.3390/ijms21249681.

26. GRINDEDAL, Eli Marie, HERAMB, Cecilie, KARSRUD, Inga, ARIANSEN, Sarah Louise, MÆHLE, Lovise, UNDLIEN, Dag Erik, NORUM, Jan and SCHLICHTING, Ellen. Current guidelines for BRCA testing of breast cancer patients are insufficient to detect all mutation carriers. *BMC Cancer*. 2017. Vol. 17, no. 1, p. 1–13. DOI 10.1186/s12885-017-3422-2.
27. KLEIBLOVA P, L, Stolarova and KRIZOVA K, et al. Identification of deleterious germline CHEK2 mutations and their association with breast and ovarian cancer. *International Journal of Cancer*. 2019. Vol. 145, no. 7, p. 1782–1797.
28. KUMAR, Sumit, WALIA, Vijay, RAY, Maria and ELBLE, Randolph C. p53 in breast cancer: mutation and countermeasures. *Frontiers in Bioscience*. 2007. Vol. 12, no. 5, p. 4168–4178.
29. HA, Su Min, CHAE, Eun Young, CHA, Joo Hee, KIM, Hak Hee, SHIN, Hee Jung and CHOI, Woo Jung. Association of BRCA mutation types, imaging features, and pathologic findings in patients with breast cancer with BRCA1 and BRCA2 Mutations. *American Journal of Roentgenology*. 2017. Vol. 209, no. 4, p. 920–928.
30. PHAROAH, Paul D P, ANTONIOU, Antonis, BOBROW, Martin, ZIMMERN, Ron L, EASTON, Douglas F and PONDER, Bruce A J. Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. *Nature genetics*. May 2002. Vol. 31, no. 1, p. 33–36. DOI 10.1038/ng853.
31. LUO, Juhua, MARGOLIS, Karen L., WACTAWSKI-WENDE, Jean, HORN, Kimberly, MESSINA, Catherine, STEFANICK, Marcia L., TINDLE, Hilary A., TONG, Elisa and ROHAN, Thomas E. Association of active and passivesmoking with risk of breast cancer among postmenopausal women: A prospective cohort study. *Bmj*. 2011. Vol. 342, no. 7796, p. 536. DOI 10.1136/bmj.d1016.
32. JONES, Michael E., SCHOEMAKER, Minouk J., WRIGHT, Lauren B., ASHWORTH, Alan and SWERDLOW, Anthony J. Smoking and risk of breast cancer in the Generations Study cohort. *Breast Cancer Research*. 2017. Vol. 19, no. 1, p. 1–14. DOI 10.1186/s13058-017-0908-4.
33. GRAM IT, BRAATEN T, TERRY PD, SASCO AJ, ADAMI HO, LUND E, WEIDERPASS E. Breast cancer risk among women who start smoking as teenagers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. No. 14(1), p. 61–6.
34. DIAS M, CABRITA S, SOUSA E, FRANÇA B, PATRÍCIO J, Oliveira C. Benign and malignant mammary tumors induced by DMBA in female Wistar rats. *Eur J Gynaecol Oncol*. 1999. Vol. 20, no. 4, p. 285–8.
35. ZHAO J, CHEN J, JU Y, WU J, GENG C, YANG H. The effect of childbirth on Carcinogenesis of DMBA-induced breast cancer in female SD rats. *Chin J Cancer*. 2011. Vol. 30(11), p. 779–785.
36. HOWE, Louise and BROWN, Powel. Targeting the HER/EGFR/ErbB Family to Prevent Breast Cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011. Vol. 4, no. 8, p. 1149–1157. DOI 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0334.Targeting.
37. TERRY, Paul D. and ROHAN, Thomas E. Cigarette Smoking and the Risk of Breast Cancer in Women: A Review of the Literature. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2002. Vol. 11, p. 953–971.
38. ALEXANDROV, Ludmil B, NIK-ZAINAL, Serena, WEDGE, David C and APARICIO, Samuel A J R. Europe PMC Funders Group Signatures of mutational processes in

- human cancer. *Nature*. 2014. Vol. 500, no. 7463, p. 415–421.  
DOI 10.1038/nature12477.Signatures.
39. EL-BAYOUMY K. Environmental carcinogens that may be involved in human breast cancer etiology. *Chem Res Toxicol*. 1992. P. 5(5):585-90.
  40. SCHWARTZ, Theresa L., MOGAL, Harveshp, PAPAGEORGIOU, Christos, VEERAPONG, Jula and HSUEH, Eddy C. Metaplastic breast cancer: Histologic characteristics, prognostic factors and systemic treatment strategies. *Experimental Hematology and Oncology*. 2013. Vol. 2, no. 1, p. 1.
  41. HAJRA K, Fearon E. Cadherin and catenin alterations in human cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2002.
  42. SINN, Hans Peter and KREIPE, Hans. A brief overview of the WHO classification of breast tumors, 4th edition, focusing on issues and updates from the 3rd edition. *Breast Care*. 2013. Vol. 8, no. 2, p. 149–154.
  43. MANN PC, BOORMAN GA, LOLLIOI LO, McMartin DN. Proliferative Lesions of the Mammary Gland in Rats. *Guid Toxicol Pathol Soc Toxicol Pathol Regist Pathol Forces Inst Pathol*. 1996. No. 2.
  44. RUSSO, Irma H. and RUSSO, Jose. Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environmental Health Perspectives*. 1996. Vol. 104, no. 9, p. 938–967.
  45. COSTA, Irmgard, SOLANAS, Montserrat and ESCRICH, Eduard. Histopathologic Characterization of Mammary Neoplastic Lesions Induced With 7, 12 Dimethylbenz(a) anthracene in the Rat. *Arch Pathol Lab Med*. 2002. Vol. 126, no. August, p. 915–927.
  46. CARDIFF R, Wellings S. The Comparative Pathology of Human and Mouse Mammary Glands. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 1999. Vol. 4.
  47. FATTANEH A. TAVASSOLI, Devilee P. *Tavassoli FA, Devilee P, World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. Lyon, 2003.
  48. *American Joint Committee on Cancer - Staging Cancer Manual*. 8th. Chicago : Springer, 2018.
  49. PRAT, Aleix, KARGINOVA, Olga, PARKER, Joel S., FAN, Cheng, HE, Xiaping, BIXBY, Lisa, HARRELL, J. Chuck, ROMAN, Erick, ADAMO, Barbara, TROESTER, Melissa and PEROU, Charles M. Characterization of cell lines derived from breast cancers and normal mammary tissues for the study of the intrinsic molecular subtypes. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2013. Vol. 142, no. 2, p. 237–255.
  50. DAI, Xiaofeng, CHENG, Hongye, BAI, Zhonghu and LI, Jia. Breast cancer cell line classification and Its relevance with breast tumor subtyping. *Journal of Cancer*. 2017. Vol. 8, no. 16, p. 3131–3141. DOI 10.7150/jca.18457.
  51. SUBIK, Kristina, LEE, Jin Feng, BAXTER, Laurie, STRZEPEK, Tamara, COSTELLO, Dawn, CROWLEY, Patti, XING, Lianping, HUNG, Mien Chie, BONFIGLIO, Thomas, HICKS, David G. and TANG, Ping. The expression patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, KI-67 and AR by immunohistochemical analysis in breast cancer cell lines. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*. 2010. Vol. 4, no. 1, p. 35–41.
  52. ASSELIN-LABAT ML, VAILLANT F, Sheridan JM. Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling. *Nature*. 2010.
  53. TRABERT B, SHERMAN ME, KANNAN N, Stanczyk FZ. Progesterone and Breast

- Cancer. *Endocr Rev.* 2020. Vol. 41, no. 2, p. 320–44.
54. HAYES DF, Thor AD. c-erbB-2 in breast cancer: development of a clinically useful marker. *Semin Oncol.* 2002 Jun;29(3):231-45. *Semin Oncol.* 2002. Vol. 29, no. 3, p. 231–45.
  55. KUNTE, Siddharth, ABRAHAM, Jame and MONTERO, Alberto J. Novel HER2–targeted therapies for HER2–positive metastatic breast cancer. *Cancer.* 2020. Vol. 126, no. 19, p. 4278–4288.
  56. YAN, Jian, LIU, Xiao Long, HAN, Lu Zhe, XIAO, Gang, LI, Ning Lei, DENG, Yi Nan, YIN, Liang Chun, LING, Li Juan, YU, Xiao Yuan, TAN, Can Liang, HUANG, Xiao Ping and LIU, Li Xin. Relation between Ki-67, ER, PR, Her2/neu, p21, EGFR, and TOP II- $\alpha$  expression in invasive ductal breast cancer patients and correlations with prognosis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 2015. Vol. 16, no. 2, p. 823–829. DOI 10.7314/APJCP.2015.16.2.823.
  57. GOLDHIRSCH, A., WOOD, W. C., COATES, A. S., GELBER, R. D., THÜRLIMANN, B. and SENN, H. J. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: Highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. *Annals of Oncology.* 2011. Vol. 22, no. 8, p. 1736–1747.
  58. POMMIER, Roxane M., SANLAVILLE, Amélien, TONON, Laurie, KIELBASSA, Janice, THOMAS, Emilie, FERRARI, Anthony, SERTIER, Anne Sophie, HOLLANDE, Frédéric, MARTINEZ, Pierre, TISSIER, Agnès, MOREL, Anne Pierre, OUZOUNOVA, Maria and PUISIEUX, Alain. Comprehensive characterization of claudin-low breast tumors reflects the impact of the cell-of-origin on cancer evolution. *Nature Communications* [online]. 2020. Vol. 11, no. 1, p. 1–12. DOI 10.1038/s41467-020-17249-7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-17249-7>
  59. AMERICAN CANCER SOCIETY. Breast Cancer: Treatment Guideline for Patients. *Nccn.* 2019. No. September, p. 6.
  60. KENSLER K, et al. PAM50 Molecular Intrinsic Subtypes in the Nurses’ Health Study Cohorts. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2019. Vol. 28, no. 4, p. 798–806.
  61. ONITILLO, A. A., ENGEL, J. M., GREENLEE, R. T. and MUKESH, B. N. Breast Cancer Subtypes Based on ER/PR and Her2 Expression: Comparison of Clinicopathologic Features and Survival. *Clinical Medicine & Research.* 2009. Vol. 7, no. 1–2, p. 4–13.
  62. VAN POZNAK, Catherine, SOMERFIELD, Mark R., BAST, Robert C., CRISTOFANILLI, Massimo, GOETZ, Matthew P., GONZALEZ-ANGULO, Ana M., HICKS, David G., HILL, Elizabeth G., LIU, Minetta C., LUCAS, Wanda, MAYER, Ingrid A., MENNEL, Robert G., SYMMANS, William F., HAYES, Daniel F. and HARRIS, Lyndsay N. Use of biomarkers to guide decisions on systemic therapy for women with metastatic breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *Journal of Clinical Oncology.* 2015. Vol. 33, no. 24, p. 2695–2704. DOI 10.1200/JCO.2015.61.1459.
  63. CARLSON RW, ALLRED DC, ANDERSON BO, et al. Carlson RW, Allred DC, Anderson BO, et al. Breast cancer. Clinical practice guidelines in oncology. . 2009;7(2):122–192. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* :

- JNCCN*. 2009. Vol. 7, no. 2, p. 122–192.
64. ESMO. Breast Cancer Guide for Patients. [online]. Available from: <https://www.esmo.org/content/download/6593/114959/1/EN-Breast-Cancer-Guide-for-Patients.pdf>
  65. ZAMBALDE, Erika Pereira, ADAMOSKI, Douglas, GRADIA, Daniela Fiori, RABINOVICH, Iris, RODRIGUES, Ana Carolina, IVAN, Cristina, RIBEIRO, Enilze M.S.F., CALIN, George Adrian and DE OLIVEIRA, Jaqueline Carvalho. Transcribed Ultraconserved Regions Are Associated with Clinicopathological Features in Breast Cancer. *Biomolecules*. 2022. Vol. 12, no. 2.
  66. VERONESI, Umberto, CASCINELLI, Natale, MARIANI, Luigi, GRECO, Marco, SACCOZZI, Roberto, LUINI, Alberto, AGUILAR, Marisel and MARUBINI, Ettore. Twenty-Year Follow-up of a Randomized Study Comparing Breast-Conserving Surgery with Radical Mastectomy for Early Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2002. Vol. 347, no. 16, p. 1227–1232. DOI 10.1056/nejmoa020989.
  67. CASTANEDA SA, Strasser J. Updates in the Treatment of Breast Cancer with Radiotherapy. 2017 Jul;26(3):371-382. *Surg Oncol Clin N Am*. 2017. Vol. 26, no. 3, p. 371–382.
  68. DENG, Xinna, WU, Haijiang, GAO, Fei, SU, Ye, LI, Qingxia, LIU, Shuzhen and CAI, Jianhui. Brachytherapy in the treatment of breast cancer. *International journal of clinical oncology*. August 2017. Vol. 22, no. 4, p. 641–650. DOI 10.1007/s10147-017-1155-5.
  69. LIYANAGE, Piumi Y, HETTIARACHCHI, Sajini D, ZHOU, Yiqun, OUHTIT, Allal, SEVEN, Elif S, OZTAN, Cagri Y, CELIK, Emrah and LEBLANC, Roger M. Nanoparticle-mediated targeted drug delivery for breast cancer treatment. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer*. April 2019. Vol. 1871, no. 2, p. 419–433. DOI 10.1016/j.bbcan.2019.04.006.
  70. GIUGLIANO, Francesca Maria, FALIVENE, Sara, ESPOSITO, Emanuela, DI FRANCO, Rossella, MUTO, Matteo, D'AIUTO, Massimiliano and MUTO, Paolo. External radiotherapy for breast cancer in the elderly. *Aging clinical and experimental research*. February 2017. Vol. 29, no. Suppl 1, p. 149–157. DOI 10.1007/s40520-016-0655-x.
  71. YIN, Li, DUAN, Jiang Jie, BIAN, Xiu Wu and YU, Shi Cang. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Research*. 2020. Vol. 22, no. 1, p. 1–13. DOI 10.1186/s13058-020-01296-5.
  72. SHIEN, Tadahiko and IWATA, Hiroji. Adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 2020. Vol. 50, no. 3, p. 225–229. DOI 10.1093/jjco/hyz213.
  73. MUNAGALA, Radha, AQIL, Farrukh and GUPTA, Ramesh C. Promising molecular targeted therapies in breast cancer. *Indian journal of pharmacology*. May 2011. Vol. 43, no. 3, p. 236–245. DOI 10.4103/0253-7613.81497. In recent years, there has been a significant improvement in the understanding of molecular events and critical pathways involved in breast cancer. This has led to the identification of novel targets and development of anticancer therapies referred to as targeted therapy. Targeted therapy has high specificity for the molecules involved in key molecular events that are responsible for cancer phenotype such as cell growth, survival, migration, invasion, metastasis, apoptosis, cell-cycle

progression, and angiogenesis. Targeted agents that have been approved for breast cancer include trastuzumab and lapatinib, directed against human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) and bevacizumab, directed against vascular endothelial growth factor (VEGF). Several other targeted agents currently under evaluation in preclinical and clinical trials include inhibitors of epidermal growth factor receptor (EGFR), dual EGFR and HER2 inhibitors, VEGF/VEGFR inhibitors, and agents that interfere with crucial signaling pathways such as PI3K/AKT/mTOR and RAS/MEK/ERK; agents against other tyrosine kinases such as Src, insulin-like growth factor (IGF)/IGF-receptor (IGFR); agents that promote apoptosis such as Poly ADP ribose polymerase inhibitors; agents that target invasion and metastasis such as matrix metalloproteinases inhibitors and others. In this review, we highlight the most promising targeted agents and their combination with mainstream chemotherapeutic drugs in clinical trials.

74. TRAY, Nancy, ADAMS, Sylvia and ESTEVA, Francisco J. Antibody-drug conjugates in triple negative breast cancer. *Future oncology (London, England)*. October 2018. Vol. 14, no. 25, p. 2651–2661. DOI 10.2217/fon-2018-0131.
75. GHADERI, Farzaneh, AHMADVAND, Simin, RAMEZANI, Amin, MONTAZER, Mehdi and GHADERI, Abbas. Production and characterization of monoclonal antibody against a triple negative breast cancer cell line. *Biochemical and biophysical research communications*. October 2018. Vol. 505, no. 1, p. 181–186. DOI 10.1016/j.bbrc.2018.09.087.
76. HU, Zishuo I, HO, Alice Y and MCARTHUR, Heather L. Combined Radiation Therapy and Immune Checkpoint Blockade Therapy for Breast Cancer. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. September 2017. Vol. 99, no. 1, p. 153–164. DOI 10.1016/j.ijrobp.2017.05.029.
77. ZHANG, Jing, TANG, Hua, LIU, Zefa and CHEN, Baoan. Effects of major parameters of nanoparticles on their physical and chemical properties and recent application of nanodrug delivery system in targeted chemotherapy. *International journal of nanomedicine*. 2017. Vol. 12, p. 8483–8493. DOI 10.2147/IJN.S148359.
78. BARRÉ-SINOUSI, Françoise and MONTAGUTELLI, Xavier. Animal models are essential to biological research: Issues and perspectives. *Future Science OA*. 2015. Vol. 1, no. 4, p. 4–6. DOI 10.4155/fso.15.63.
79. COSTA, Eduardo, FERREIRA-GONÇALVES, Tânia, CHASQUEIRA, Gonçalo, CABRITA, António S., FIGUEIREDO, Isabel V. and REIS, Catarina Pinto. Experimental models as refined translational tools for breast cancer research. *Scientia Pharmaceutica*. 2020. Vol. 88, no. 3, p. 1–29. DOI 10.3390/scipharm88030032.
80. HOLEN, Ingunn, SPEIRS, Valerie, MORRISSEY, Bethny and BLYTH, Karen. In vivo models in breast cancer research: progress, challenges and future directions. *Disease models & mechanisms*. April 2017. Vol. 10, no. 4, p. 359–371. DOI 10.1242/dmm.028274.
81. HANN, B and BALMAIN, A. Building “validated” mouse models of human cancer. *Current opinion in cell biology*. December 2001. Vol. 13, no. 6, p. 778–784. DOI 10.1016/s0955-0674(00)00283-0.

82. DE LAS MULAS JM, Reymundo C. Animal models of human breast carcinoma: canine and feline neoplasms. *Rev Oncol*. 2000. Vol. 2, no. 6, p. 274–81.
83. DE MARIA, Raffaella, OLIVERO, Martina, IUSSICH, Selina, NAKAICHI, Munekazu, MURATA, Tomoaki, BIOLATTI, Bartolomeo and DI RENZO, Maria Flavia. Spontaneous feline mammary carcinoma is a model of HER2 overexpressing poor prognosis human breast cancer. *Cancer research*. February 2005. Vol. 65, no. 3, p. 907–912.
84. MACEWEN, E G, PATNAIK, A K, HARVEY, H J and PANKO, W B. Estrogen receptors in canine mammary tumors. *Cancer research*. June 1982. Vol. 42, no. 6, p. 2255–2259.
85. COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. *Sétimo relatório de dados estatísticos sobre o número de animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos nos Estados-Membros da União Europeia*. 2008.
86. BREKKE, Thomas D., STEELE, Katherine A. and MULLEY, John F. Inbred or outbred? Genetic diversity in laboratory rodent colonies. *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 2018. Vol. 8, no. 2, p. 679–686. DOI 10.1534/g3.117.300495.
87. JENSEN, Victoria S., PORSGAARD, Trine, LYKKESFELDT, Jens and HVID, Henning. Rodent model choice has major impact on variability of standard preclinical readouts associated with diabetes and obesity research. *American Journal of Translational Research*. 2016. Vol. 8, no. 8, p. 3574–3584.
88. ANIMALRESEARCH.INFO. Rats. [online]. Available from: <https://www.animalresearch.info/en/designing-research/research-animals/rat/>
89. NANDI, Satyabrata, GUZMAN, Raphael C. and YANG, Jason. Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: A unifying hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995. Vol. 92, no. 9, p. 3650–3657. DOI 10.1073/pnas.92.9.3650.
90. MEDINA, Daniel. Chemical carcinogenesis of rat and mouse mammary glands. *Breast disease*. 2007. Vol. 28, p. 63–68. DOI 10.3233/bd-2007-28107.
91. POHANISH, RP. *Sittig's Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens*. Elsevier Science, 2011.
92. LIU, Yewei, YIN, Ting, FENG, Yuanbo, CONA, Marlein Miranda, HUANG, Gang, LIU, Jianjun, SONG, Shaoli, JIANG, Yansheng, XIA, Qian, SWINNEN, Johannes V, BORMANS, Guy, HIMMELREICH, Uwe, OYEN, Raymond and NI, Yicheng. Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*. 2015. Vol. 5, no. 5, p. 708–729. DOI 10.3978/j.issn.2223-4292.2015.06.01.
93. WARD, Mary H, CROSS, Amanda J, DIVAN, Hozefa, KULLDORFF, Martin, NOWELL-KADLUBAR, Susan, KADLUBAR, Fred F and SINHA, Rashmi. Processed meat intake, CYP2A6 activity and risk of colorectal adenoma. *Carcinogenesis*. June 2007. Vol. 28, no. 6, p. 1210–1216. DOI 10.1093/carcin/bgm009.
94. AGRAWAL, Annapurna, VERMA, Preeti and GOYAL, P. K. Chemomodulatory effects of Aegle marmelos against DMBA-induced skin tumorigenesis in swiss albino mice. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2010. Vol. 11, no. 5, p. 1311–1314.
95. DIMITROVA-SHUMKOVSKA, Jasmina, VEENMAN, Leo, RISTOSKI, Trpe,

- LESCHINER, Svetlana and GAVISH, Moshe. Decreases in binding capacity of the mitochondrial 18 kDa translocator protein accompany oxidative stress and pathological signs in rat liver after DMBA exposure. *Toxicologic Pathology*. 2010. Vol. 38, no. 6, p. 957–968. DOI 10.1177/0192623310379137.
96. RUSSO, J and RUSSO, I H. Atlas and histologic classification of tumors of the rat mammary gland. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. April 2000. Vol. 5, no. 2, p. 187–200. DOI 10.1023/a:1026443305758.
  97. AL-DHAHERI, Wafa S, HASSOUNA, Imam, AL-SALAM, Suhail and KARAM, Sherif M. Characterization of breast cancer progression in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*. September 2008. Vol. 1138, p. 121–131. DOI 10.1196/annals.1414.018.
  98. CURRIER, Nicolas, SOLOMON, Sandra E., DEMICCO, Elizabeth G., CHANG, Donny L.F., FARAGO, Marganit, YING, Haoqiang, DOMINGUEZ, Isabel, SONENSHEIN, Gail E., CARDIFF, Robert D., XIAO, Zhi Xiong Jim, SHERR, David H. and SELDIN, David C. Oncogenic signaling pathways activated in DMBA-induced mouse mammary tumors. *Toxicologic Pathology*. 2005. Vol. 33, no. 6, p. 726–737. DOI 10.1080/01926230500352226.
  99. IARC. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. 2010. Vol. 92, p. 1–853.
  100. LOOMIS TA, HAYES AW. *Loomis's essentials of toxicology*. Academic Press, 1996.
  101. RUSSO, J and RUSSO, I H. Experimentally induced mammary tumors in rats. *Breast cancer research and treatment*. 1996. Vol. 39, no. 1, p. 7–20. DOI 10.1007/BF01806074.
  102. ALVARADO, Antonieta, LOPES, Ana C., FAUSTINO-ROCHA, Ana I., CABRITA, António M.S., FERREIRA, Rita, OLIVEIRA, Paula A. and COLAÇO, Bruno. Prognostic factors in MNU and DMBA-induced mammary tumors in female rats. *Pathology Research and Practice*. 2017. Vol. 213, no. 5, p. 441–446. DOI 10.1016/j.prp.2017.02.014.
  103. STERNLICHT, Mark D. Key stages in mammary gland development: The cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Research*. 2005. Vol. 8, no. 1. DOI 10.1186/bcr1368.
  104. COLDITZ, G A and FRAZIER, A L. Models of breast cancer show that risk is set by events of early life: prevention efforts must shift focus. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 1995. Vol. 4, no. 5, p. 567–571.
  105. DANIEL, F B and JOYCE, N J. 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene--DNA adducts in Sprague-Dawley and Long-Evans female rats: the relationship of DNA adducts to mammary cancer. *Carcinogenesis*. August 1984. Vol. 5, no. 8, p. 1021–1026. DOI 10.1093/carcin/5.8.1021.
  106. SHULL, James D. The rat oncogenome: comparative genetics and genomics of rat models of mammary carcinogenesis. *Breast disease*. 2007. Vol. 28, p. 69–86. DOI 10.3233/bd-2007-28108.
  107. LU, J, JIANG, C, MITRENGA, T, CUTTER, G and THOMPSON, H J. Pathogenic characterization of 1-methyl-1-nitrosourea-induced mammary carcinomas in the



- rat. *Carcinogenesis*. January 1998. Vol. 19, no. 1, p. 223–227. DOI 10.1093/carcin/19.1.223.
108. FAUSTINO-ROCHA, Ana I, GAMA, Adelina, OLIVEIRA, Paula A, ALVARADO, Antonieta, NEUPARTH, Maria J, FERREIRA, Rita and GINJA, Mário. Effects of lifelong exercise training on mammary tumorigenesis induced by MNU in female Sprague-Dawley rats. *Clinical and experimental medicine*. May 2017. Vol. 17, no. 2, p. 151–160. DOI 10.1007/s10238-016-0419-0.
  109. PERŠE, M., CERAR, A., INJAC, R. and ŠTRUKELJ, B. N-methylnitrosourea induced breast cancer in rat, the histopathology of the resulting tumours and its drawbacks as a model. *Pathology and Oncology Research*. 2009. Vol. 15, no. 1, p. 115–121. DOI 10.1007/s12253-008-9117-x.
  110. SANO, Daisuke and MYERS, Jeffrey N. Xenograft models of head and neck cancers. *Head & neck oncology*. 2009. Vol. 1, p. 32. DOI 10.1186/1758-3284-1-32.
  111. EFERL, Robert and CASANOVA, Emilio. Mouse models of cancer: Methods and protocols. *Mouse Models of Cancer: Methods and Protocols*. 2015. P. 1–456. DOI 10.1007/978-1-4939-2297-0.
  112. F. FORABOSCO, M. LÖHMUS, L. RYDHMER, L.F. Sundström. Genetically modified farm animals and fish in agriculture: A review. *Livestock Science*. 2013. Vol. 153, no. 1–3, p. 1–9.
  113. COLQUITT, Richard B, COLQUHOUN, Douglas A and THIELE, Robert H. In silico modelling of physiologic systems. *Best practice & research. Clinical anaesthesiology*. December 2011. Vol. 25, no. 4, p. 499–510. DOI 10.1016/j.bpa.2011.08.006.
  114. JEAN-QUARTIER, Claire, JEANQUARTIER, Fleur, JURISICA, Igor and HOLZINGER, Andreas. In silico cancer research towards 3R. *BMC Cancer*. 2018. Vol. 18, no. 1, p. 1–12. DOI 10.1186/s12885-018-4302-0.
  115. IKEJIMBA, Lynda C, GRAFF, Christian G, ROSENTHAL, Shani, BADAL, Andreu, GHAMMRAOUI, Bahaa, LO, Joseph Y and GLICK, Stephen J. A novel physical anthropomorphic breast phantom for 2D and 3D x-ray imaging. *Medical physics*. February 2017. Vol. 44, no. 2, p. 407–416. DOI 10.1002/mp.12062.
  116. KIARASHI, Nooshin, NOLTE, Adam C, STURGEON, Gregory M, SEGARS, William P, GHATE, Sujata V, NOLTE, Loren W, SAMEI, Ehsan and LO, Joseph Y. Development of realistic physical breast phantoms matched to virtual breast phantoms based on human subject data. *Medical physics*. July 2015. Vol. 42, no. 7, p. 4116–4126. DOI 10.1118/1.4919771.
  117. ISLAM, Mohammad Tariqul, SAMSUZZAMAN, Md, ISLAM, Md Tarikul and KIBRIA, Salehin. Experimental breast phantom imaging with metamaterial-inspired nine-antenna sensor array. *Sensors (Switzerland)*. 2018. Vol. 18, no. 12. DOI 10.3390/s18124427.
  118. BAHCECIOGLU, Gokhan, BASARA, Gozde, ELLIS, Bradley W., REN, Xiang and ZORLUTUNA, Pinar. Breast cancer models: Engineering the tumor microenvironment. *Acta Biomaterialia*. 2020. Vol. 106, p. 1–21. DOI 10.1016/j.actbio.2020.02.006.
  119. CLARKE, Robert, JONES, Brandon C, SEVIGNY, Catherine M, HILAKIVI-CLARKE, Leena A and SENGUPTA, Surojeet. Experimental models of endocrine responsive

- breast cancer: strengths, limitations, and use. *Cancer drug resistance (Alhambra, Calif.)*. 2021. Vol. 4, no. 4, p. 762–783. DOI 10.20517/cdr.2021.33.
120. HOENERHOFF, M J, SHIBATA, M A, BODE, A and GREEN, J E. Pathologic progression of mammary carcinomas in a C3(1)/SV40 T/t-antigen transgenic rat model of human triple-negative and Her2-positive breast cancer. *Transgenic research*. April 2011. Vol. 20, no. 2, p. 247–259. DOI 10.1007/s11248-010-9406-5.
  121. CARDIFF, Robert D. Epilog: comparative medicine, one medicine and genomic pathology. *Breast disease* [online]. 2007. Vol. 28, p. 107–110. DOI 10.3233/bd-2007-28110. Available from: <https://doi.org/10.3233/bd-2007-28110>
  122. CADENAS, Cristina. Prognostic signatures of breast cancer: Perou’s molecular subtypes and schmidt’s metagenes. *EXCLI Journal*. 2012. Vol. 11, p. 204–207.
  123. CARDOSO, F., KYRIAKIDES, S., OHNO, S., PENALT-LLORCA, F., POORTMANS, P., RUBIO, I. T., ZACKRISSON, S. and SENKUS, E. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* [online]. 2019. Vol. 30, no. 8, p. 1194–1220. DOI 10.1093/annonc/mdz173. Available from: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz173>
  124. ALLISON, Kimberly H., HAMMOND, M. Elizabeth H., DOWSETT, Mitchell, MCKERNIN, Shannon E., CAREY, Lisa A., FITZGIBBONS, Patrick L., HAYES, Daniel F., LAKHANI, Sunil R., CHAVEZ-MACGREGOR, Mariana, PERLMUTTER, Jane, PEROU, Charles M., REGAN, Meredith M., RIMM, David L., SYMMANS, W. Fraser, TORLAKOVIC, Emina E., VARELLA, Leticia, VIALE, Giuseppe, WEISBERG, Tracey F., MCSHANE, Lisa M. and WOLFF, Antonio C. Estrogen and progesterone receptor testing in breast cancer: ASCO/CAP guideline update. *Journal of Clinical Oncology*. 2020. Vol. 38, no. 12, p. 1346–1366. DOI 10.1200/JCO.19.02309.
  125. WOLFF, Antonio C, HAMMOND, M Elizabeth H, SCHWARTZ, Jared N, HAGERTY, Karen L, ALLRED, D Craig, COTE, Richard J, DOWSETT, Mitchell, FITZGIBBONS, Patrick L, HANNA, Wedad M, LANGER, Amy, MCSHANE, Lisa M, PAIK, Soonmyung, PEGRAM, Mark D, PEREZ, Edith A, PRESS, Michael F, RHODES, Anthony, STURGEON, Catharine, TAUBE, Sheila E, TUBBS, Raymond, VANCE, Gail H, VAN DE VIJVER, Marc, WHEELER, Thomas M and HAYES, Daniel F. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. January 2007. Vol. 25, no. 1, p. 118–145. DOI 10.1200/JCO.2006.09.2775.
  126. WOLFF, Antonio C., HAMMOND, M. Elizabeth H., SCHWARTZ, Jared N., HAGERTY, Karen L., ALLRED, D. Craig, COTE, Richard J., DOWSETT, Mitchell, FITZGIBBONS, Patrick L., HANNA, Wedad M., LANGER, Amy, MCSHANE, Lisa M., PAIK, Soonmyung, PEGRAM, Mark D., PEREZ, Edith A., PRESS, Michael F., RHODES, Anthony, STURGEON, Catharine, TAUBE, Sheila E., TUBBS, Raymond, VANCE, Gail H., VAN DE VIJVER, Marc, WHEELER, Thomas M. and HAYES, Daniel F. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2007. Vol. 25, no. 1, p. 118–145. DOI 10.1200/JCO.2006.09.2775.

127. DUFFY, M. J., HARBECK, N., NAP, M., MOLINA, R., NICOLINI, A., SENKUS, E. and CARDOSO, F. Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). *European Journal of Cancer* [online]. 2017. Vol. 75, p. 284–298. DOI 10.1016/j.ejca.2017.01.017. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2017.01.017>
128. ACS, Balazs and LEUNG, Samuel C. Y. Systematically higher Ki67 scores on core biopsy samples compared to corresponding resection specimen in breast cancer: a multi-operator and multi-institutional study. *Modern Pathology*. 2022. No. February, p. 1–8. DOI 10.1038/s41379-022-01104-9.
129. LEUNG, SAMUEL C Y, et al. and (BIG-NABCG), on behalf of the International Ki67 in Breast Cancer Working Group of the Breast International Group and North American Breast Cancer Group. Analytical validation of a standardised scoring protocol for Ki67 immunohistochemistry on breast cancer excision whole sections: an international multicentre collaboration. *Histopathology* [online]. 2019. Vol. 75, no. 2, p. 225–235. DOI <https://doi.org/10.1111/his.13880>. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/his.13880>
130. BUSTREO, Sara, OSELLA-ABATE, Simona, CASSONI, Paola, DONADIO, Michela, AIROLDI, Mario, PEDANI, Fulvia, PAPOTTI, Mauro, SAPINO, Anna and CASTELLANO, Isabella. Optimal Ki67 cut-off for luminal breast cancer prognostic evaluation: a large case series study with a long-term follow-up. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2016. Vol. 157, no. 2, p. 363–371. DOI 10.1007/s10549-016-3817-9.
131. MALHOTRA, Gautam K., ZHAO, Xiangshan, BAND, Hamid and BAND, Vimla. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology and Therapy*. 2010. Vol. 10, no. 10, p. 955–960.
132. ZHUO LI, HONGRUI WEI, SIYAN LI, PEI WU, Xiaoyun Mao. The Role of Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Drug Design, Development and Therapy*. 2022. No. January, p. 305–314.
133. LANGE, Carol and YEE, Douglas. Progesterone and breast cancer. *Womens Health (Lond Engl)*. 2008. Vol. 4, no. 2, p. 151–162. DOI 10.2217/17455057.4.2.151.Progesterone.
134. ANKRAPP, D P, BENNETT, J M and HASLAM, S Z. Role of epidermal growth factor in the acquisition of ovarian steroid hormone responsiveness in the normal mouse mammary gland. *Journal of cellular physiology*. February 1998. Vol. 174, no. 2, p. 251–260. DOI 10.1002/(SICI)1097-4652(199802)174:2<251::AID-JCP12>3.0.CO;2-F.