



**Contributo para um melhor
conhecimento do efeito da Sinvastatina
no cancro da mama através do estudo
com células 4T1 em modelo *in vivo*.**

Ana Sofia Santos Custódio
Coimbra, 2009

Dissertação de Mestrado em Patologia Experimental
apresentada à
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra,
2009

ÍNDICE

1 Índice

1	Índice	7
2	Agradecimentos	11
3	Resumo	15
4	Introdução	21
4.1	Colesterol e cancro	21
4.1.1	Perspectivas históricas	21
4.1.2	Fisiologia e homeostase do colesterol	22
4.1.3	As vias SREBP e PI3-K/Akt	28
4.1.4	Hormonas esteróides e via SREBP	32
4.1.5	A via Hedgehog, colesterol e cancro	33
4.1.6	Colesterol e ciclo celular	37
4.1.7	“Jangada lipídica” e cancro	38
4.2	Estatinas	42
4.2.1	Farmacologia e pleomorfismo das estatinas	42
4.2.2	Estatinas e cancro	45
4.3	Cancro da Mama	49
4.4	Modelos experimentais	53
5	Objectivos do estudo experimental	57
6	Material e métodos	61
6.1	Material	61
6.2	Procedimentos experimentais	62
7	Resultados	69
8	Discussão	91
9	Conclusões	99
10	Considerações finais	103
11	Bibliografia	107

AGRADECIMENTOS

2 Agradecimentos

Este trabalho científico e experimental não poderia ter sido executado sem o suporte científico de orientadores, o ânimo e apoio da família e dos amigos. Não podia iniciar a sua exposição sem deixar um profundo e sincero agradecimento àqueles que directa ou indirectamente contribuíram para que ele fosse realizado. Enumerar pessoas é uma perspectiva redutora, é correr o risco de, por lapso, não referir algumas das pessoas mais empenhadas em que nunca desanimasse na realização deste mesmo trabalho. Sendo assim, este agradecimento é genérico e sobretudo àqueles que ficaram felizes com o seu desenvolvimento, pois é sobretudo a eles que estas palavras se dirigem.

Apesar das razões que explicitarei, não queria deixar de recordar algumas pessoas, que certamente estão no grupo acima referido. Começando pela minha família, tenho de agradecer o apoio incondicional e inigualável do meu marido, o Pedro, dos meus pais e irmão em todo o meu percurso.

Por outro lado, o apoio científico e a amizade dos meus directores, Prof. Doutor Carlos Freire de Oliveira e Prof. Doutor Paulo Moura, e dos meus orientadores, Prof. Doutora Margarida Figueiredo Dias e Prof. Doutor António Silvério Cabrita, são aqui lembrados com estima. Uma palavra de agradecimento ainda para todos aqueles que, directa ou indirectamente, partilharam o seu tempo em prol de uma vontade comum de dar um passo em frente no conhecimento científico, nomeadamente a Prof. Doutora Helena R. Fernandes e a Dra. Karen Cavalcante.

Queria ainda agradecer a todas as outras pessoas, familiares, amigos, colegas, conhecidos, que de uma forma ou de outra deram o seu contributo para a realização desta dissertação, com conselhos ou simplesmente fazendo de mim uma pessoa feliz

por os ter ao meu lado. Sem eles o caminho seria muito mais árduo, impossível mesmo de transpôr.

Gostava de reconhecer e agradecer as instituições que acolheram e financiaram este trabalho, o CIMAGO (Centro de Investigação em Meio Ambiente, Genética e Oncobiologia), o Instituto de Patologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, o Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto e o Laboratório da Merck Sharp & Dohme.

A todos eles, os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

3 Resumo

As estatinas pertencem ao grupo terapêutico redutor dos níveis plasmáticos do colesterol, através da inibição da enzima hepática 3-Hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase. As estatinas são muito usadas no tratamento da hipercolesterolemia mas, além da sua acção de inibição da síntese de colesterol, as estatinas apresentam outras actividades biológicas, incluindo um potencial efeito anti-neoplásico.

Esta pleiotropia atribuível às estatinas resultaria em parte da inibição da síntese do colesterol e de intermediários isoprenoides da via do mevalonato.

Apesar de alguns estudos laboratoriais terem demonstrado que as estatinas lipofílicas como sinvastatina, tinham a capacidade de induzir apoptose, reduzir a proliferação celular e inibir a capacidade de metastização duma variedade de linhagens celulares neoplásicas, incluindo células mamárias, os resultados dos estudos epidemiológicos são divergentes, não sendo possível, à luz dos dados experimentais e epidemiológicos publicados, estabelecer com nitidez a relação risco/benefício das estatinas com o cancro.

Mais estudos são necessários quer estudos experimentais quer estudos epidemiológicos para confirmar e tentar perceber melhor os potenciais mecanismos anti-cancerígenos das estatinas, nomeadamente no cancro da mama.

Assim, foi desenhado um estudo experimental totalmente original que permitisse avaliar o efeito quimiopreventivo e terapêutico da sinvastatina, uma das estatinas mais utilizada no ser humano, numa situação de cancro da mama de mau prognóstico.

Para esse efeito, usámos 40 murganhos fêmeas Balb/c e células da linha celular 4T1 de adenocarcinoma mamário de

murgancho para realizar o nosso estudo. Os murganchos fêmeas foram divididos em quatro grupos, o grupo I (GI), o grupo II (GII), o grupo III (GIII) e o grupo IV (GIV), sendo que neste último os animais não foram submetidos a nenhum procedimento experimental. Nos GI, GII e GIII, foram injectadas células 4T1 no dorso dos murganchos. No GI e GII, foi realizada uma administração de sinvastatina intraperitoneal (25mg/Kg e 50mg/Kg, respectivamente), 3 vezes por semana durante 6 semanas com início sete dias antes da inoculação celular. Os animais do GIII foram tratados unicamente com soro fisiológico. Após este intervalo de tempo, os murganchos foram sacrificados e os tumores removidos. Foram avaliados a taxa de aparecimento de neoplasias, o volume das neoplasias, os receptores de estrogénio, a proliferação e a apoptose nas células neoplásicas, as três últimas usando técnicas de imunohistoquímica (IHQ).

Os tumores de GIII apresentaram um volume médio superior ao dos tumores de GI e GII com uma diferença estatisticamente significativa em relação ao GI ($p=0,011$), não tendo sido detectadas diferenças significativas entre os volumes médios dos tumores de GI e GII. O GIII apresentou igualmente uma maior taxa de localizações secundárias de tumores. No entanto, apesar da diferença entre a percentagem de metástases de GI, GII e GIII ser acentuada, ela não apresenta significado estatístico ($p = 0,35$ e $p= 0,62$).

A marcação para RE foi mais intensa em GII e GI com diferenças estatisticamente significativas entre GII e GIII ($p < 0,005$) e, igualmente, entre o GI e GIII ($p = 0,004$). Os tumores de GIII apresentaram a maior taxa de marcação com PCNA, com diferenças estatisticamente significativas quando comparamos com os outros grupos, GI ($p < 0,005$) e GII ($p < 0,005$), demonstrando que a proliferação celular é superior neste grupo. A marcação para a Caspase 3, um marcador pró-apoptose, foi mais intensa em GI e

GII, com diferenças estatisticamente significativas aquando da comparação com o grupo controlo GIII, $p < 0,005$, demonstrando uma maior reacção de apoptose nos grupos tratados com sinvastatina. A marcação para o Bcl2, um marcador anti-apoptose, foi equilibrada entre os três grupos, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos.

Os resultados obtidos através deste modelo experimental são concordantes com a existência de uma acção anti-proliferativa e pró-apoptose da sinvastatina em células tumorais de cancro da mama.

As estatinas, nomeadamente a sinvastatina, parecem ser uma promissora opção terapêutica no cancro, nomeadamente no cancro da mama de mau prognóstico, embora sejam necessários mais estudos para poder chegar a uma conclusão.

INTRODUÇÃO

4 Introdução

4.1 Colesterol e cancro

4.1.1 Perspectivas históricas

A associação entre colesterol e cancro não é novidade. Há mais de um século, Holden Webb sugeriu que o cancro poderia ter a sua origem na cristalização do colesterol nas células vivas¹; cerca de oito anos depois, foi demonstrada a acumulação de colesterol nas células tumorais². Com uma surpreendente previdência, White² apontou para uma possível associação entre o colesterol e a regulação da proliferação celular. Na segunda metade do último século, as atenções centraram-se no potencial papel do colesterol e dos seus derivados oxidados na carcinogénese em modelos experimentais animais³.

Nos anos 70, uma melhor compreensão dos mecanismos de regulação da homeostase do colesterol nas células permitiu relançar o debate como o demonstra esta citação de Chen *et al*:

“ Se a síntese de esteróis é, sob condições normais, necessária à proliferação celular é, então possível que uma síntese anormal de esteróis possa levar células normais a uma proliferação descontrolada e consequente *status* celular de malignidade”⁴.

Desde os anos 70, tem-se evidenciado um interesse crescente na relação entre dieta, colesterol e cancro⁵. Alguns estudos iniciais até sugeriram que um nível plasmático baixo de colesterol poderia estar associado a um aumento do risco de cancro⁶; no entanto, sabe-se actualmente que esta relação poderá ser um efeito e não uma causa da doença tumoral. Outros estudos

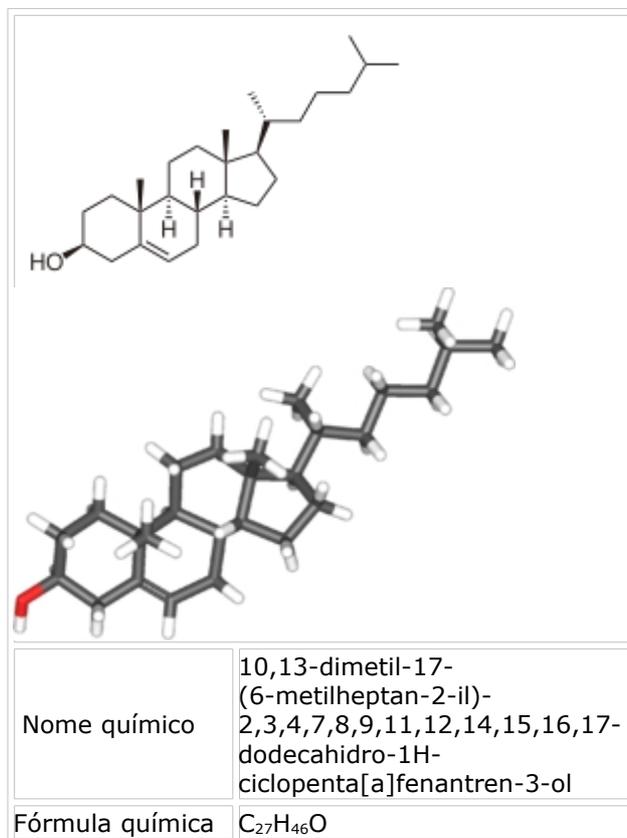
têm sistematicamente demonstrado uma relação positiva entre os níveis plasmáticos do colesterol e alguns tipos de cancro⁷.

Mais recentemente, uma ligação mais evidente entre colesterol e cancro tem sido sugerida em estudos baseados em determinados inibidores da síntese do colesterol: as estatinas.

4.1.2 Fisiologia e homeostase do colesterol

O colesterol é um lípido da família dos esteróis com um papel central em inúmeros processos bioquímicos. O nome tem origem no grego *chole-* (bile) e *stereos* (sólido), e o sufixo químico *-ol* para um álcool, já que o colesterol foi identificado pela primeira vez na sua forma sólida em pedras de vesícula biliar em 1769 pelo francês François Poulletier de la Salle⁸.

Os elementos presentes na fórmula química do colesterol são o carbono, o oxigénio e o hidrogénio. A estrutura química do colesterol contém quatro anéis de carbono A, B, C e D (núcleos ciclo-pentano-fenantrínicos). O grupo hidroxilo –OH no carbono 3 (C3) do colesterol pode ser esterificado por um ácido gordo, tornando a molécula totalmente hidrofóbica (Quadro1).



Quadro 1 – Fórmula química do colesterol.

O colesterol encontra-se nas membranas celulares de todos os tecidos do corpo humano, sendo um componente fundamental para a formação e estabilidade membranar. Ele pode também ser esterificado em cadeias longas de ácidos gordos formando ésteres de colesterol, os quais são totalmente hidrofóbicos, não fazendo parte da constituição das membranas biológicas.

Para além do seu papel importante na formação das membranas celulares, o colesterol também é o precursor metabólico de vários metabolitos, tais como os ácidos e sais biliares, hormonas esteróides como o cortisol e a aldosterona nas glândulas supra-

renais e as hormonas sexuais como a progesterona, os estrógenos e a testosterona. O colesterol é igualmente importante para o metabolismo das vitaminas lipossolúveis, incluindo as vitaminas A, D, E e K.

Recentemente, o colesterol tem sido relacionado com processos de sinalização celular, pelo facto de poder ser um dos componentes das chamadas "jangadas lipídicas" na membrana plasmática.

O colesterol é sintetizado no retículo endoplasmático das células ou derivado da dieta, sendo que neste último caso ele é transportado pela via sanguínea pelas lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e é incorporado pelas células através de endocitose mediada por receptores LDL em vesículas cobertas de clatrina na membrana plasmática e, então, hidrolisado em lisossomas.

O colesterol é sintetizado primariamente da acetil CoA através da cascata da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase em diversas células e tecidos. Cerca de 20 a 25% da produção total diária, ou seja, cerca de 1 g/dia, ocorre no fígado; outros locais de maior taxa de síntese incluem os intestinos, glândulas adrenais e órgãos reprodutivos.

As principais etapas da biosíntese do colesterol estão resumidas na Figura 1, onde se evidenciam algumas das principais enzimas e produtos intermediários desta via de biosíntese do colesterol, incluindo a enzima HMG-CoA redutase e os principais precursores do colesterol como o mevalonato, geranyl pirofosfato e farnesil pirofosfato. Estão igualmente representados os pontos onde a biosíntese do colesterol pode ser interrompida por alguns fármacos, nomeadamente as estatinas que, tal como se verifica, têm a capacidade de inibir a acção da HMG-CoA redutase.

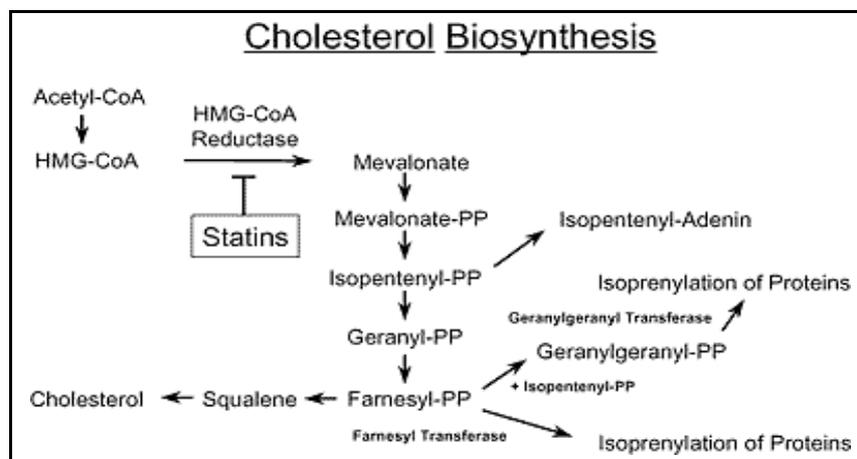


Figura 1 – A via metabólica da HMG-CoA reductase.

(Fonte: Journals on the web - Drug News Perspect 2002, 15 (2):
85)

Para que seja possível uma melhor avaliação e compreensão de algumas das recentes ligações evidenciadas entre colesterol e cancro, será importante conhecer a complexa base molecular da homeostase do colesterol.

Tal como anteriormente descrito, o colesterol é um componente fundamental dos organismos eucariotos. Além do seu papel fundamental de barreira, o colesterol é o precursor de vários metabolitos e regula igualmente a actividade dos transportadores membranares, canais de iões, moléculas de sinalização e vesículas membranares de transporte formadas durante a endocitose.

No entanto, o excesso de colesterol é tóxico e, portanto, a sua concentração celular deverá ser mantida sob um apertado controlo metabólico; qualquer alteração na homeostase do colesterol conduz a condições patológicas tendo como exemplo major a aterosclerose, com consequentes doenças cardiovasculares, estando esta relação causa-efeito muito bem estabelecida⁹ desde há longa data.

Apesar dos mecanismos reguladores envolvidos na homeostase do colesterol serem ainda só parcialmente compreendidos, sabemos que a biossíntese do colesterol é controlada directamente pelos seus níveis no retículo endoplasmático e posterior transdução dessa informação através da expressão de vários genes¹⁰. O elemento chave envolvido neste processo de regulação da biossíntese do colesterol é uma família de factores de transcrição membranares, a proteína de ligação ao elemento de resposta a esterol (SREBP - Sterol Regulatory Element Binding Proteins).

Uma elevada concentração de colesterol na dieta leva a uma redução global na produção endógena, enquanto uma ingestão reduzida leva ao efeito oposto. O principal mecanismo regulador é, então, a sensibilidade da SREBP ao colesterol intracelular no retículo endoplasmático. Na presença do colesterol, a SREBP liga-se a duas outras proteínas: SCAP (SREBP-cleavage activating protein) e Insig-1. Quando os níveis de colesterol caem, a Insig-1 dissocia-se do complexo SREBP-SCAP, permitindo que o complexo migre para o aparelho de Golgi, onde a SREBP é clivada pela S1P e S2P (site 1/2 protease), duas enzimas que são activadas pela SCAP quando os níveis de colesterol estão baixos. A SREBP clivada migra, então, para o núcleo e age como um factor de transcrição, ligando-se ao elemento regulatório de esterol (SRE - Sterol Regulatory Element) de diversos genes para estimular a sua transcrição. Entre os genes transcritos estão o receptor LDL, a HMG-CoA redutase e a ácido gordo sintetase (FAS - fatty acid synthase)¹¹ que têm como função aumentar os níveis plasmáticos de colesterol: o receptor LDL capta o LDL circulante na corrente sanguínea, ao passo que a HMG-CoA redutase leva a uma produção endógena aumentada de colesterol¹² (Figura 2).

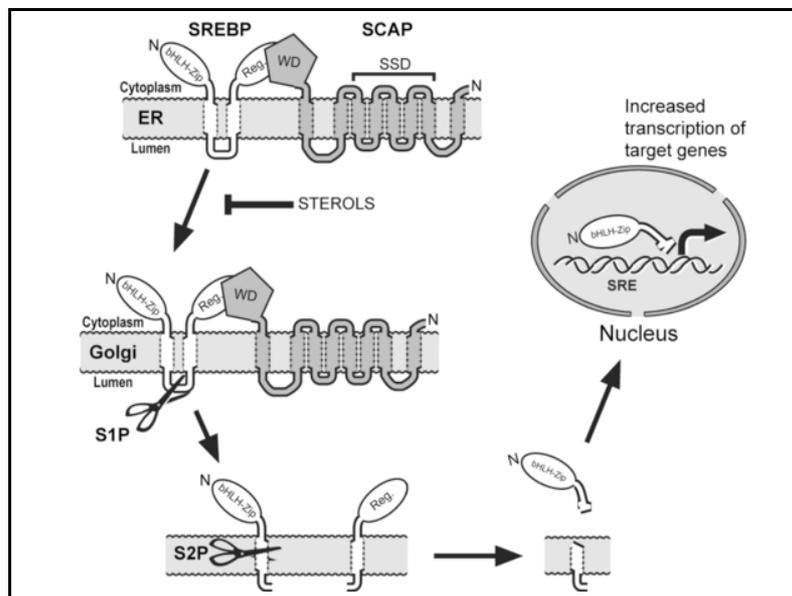


Figura 2 – A via reguladora da proteína de ligação ao elemento de resposta a esterol - SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Proteins). SCAP: SREBP-Cleavage Activating Protein; S1P e S2P: site 1/2 protease; SRE: elemento regulador de esterol; ER: retículo endoplasmático.

(Fonte: *Cell* 1997, 89 (3): 331– 40)

Uma via do SREBP correctamente funcionando é um elemento necessário para a proliferação celular como veremos (pág. 16).¹³

Este mecanismo foi, em grande parte, devidamente esclarecido e evidenciado por Michael S. Brown e Joseph L. Goldstein nos anos 70 tendo sido agraciados com o Prémio Nobel de Fisiologia / Medicina em 1985.¹⁴

4.1.3 As vias SREBP e PI3-K/Akt

Estudos recentes têm evidenciado uma possível ligação entre o sistema SREBP da homeostase lipídica e a via PI3-K/Akt.

Todas as células eucariotas contêm complexas redes de uma classe de proteínas, proteínas-cinases, que actuam como “sensores” no controlo e propagação da informação do meio exterior e na organização do seu próprio sistema, permitindo manter uma resposta rápida e apropriada às alterações a que são sujeitas.

Desde a sua descoberta como um proto-oncogene, em 1991, a Akt, uma proteína-cinase específica para treoninas/serinas, também designada como proteína cinase B, tornou-se num dos focos de maior atenção devido ao seu papel importante como regulador em diversos processos celulares, nomeadamente no crescimento celular, ciclo celular e proliferação celular, actuando directa ou indirectamente sobre algumas cascatas activadoras e inibidoras.¹⁵

Tem igualmente um papel importante na mediação da sobrevivência celular, inibindo directamente diferentes sinais pró-apoptóticos como o Bad e a família de factores de transcrição - “*forkhead family*”, ou indirectamente, através da alteração de centros reguladores da morte celular, nomeadamente a p53.¹⁵

É, ainda, um dos mais importantes reguladores da sinalização da insulina e do metabolismo da glicose, através dos produtos do proto-oncogene Akt 2.¹⁵

A Akt encontra-se inactiva nas células em repouso, tornando-se activa após fosforilação. A fosforilação da Akt acentua a proliferação das células neoplásicas e metastização, além de contribuir para a resistência aos citostáticos e radioterapia, tendo um papel primordial no desenvolvimento e progressão de vários

cancros, ao promover o crescimento celular e evitar que ocorra apoptose.¹⁶

A proteína Akt encontra-se na membrana citoplasmática e tem um domínio cinase treoninas/serinas e um domínio PH ("*pleckstrin homology*") no seu terminal amino, constituindo a maior parte do domínio regular. É activada através de receptores cinase de tirosinas, integrinas, receptores de células T e células B, receptores de citosina, proteínas G acopladas a reguladores e outros estímulos que induzem a acumulação de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PI-3,4,5-P3) que, posteriormente, se une ao terminal PH da Akt através da fosfatidilinositol 3-cinase (PI3-K).¹⁵

A forma activa da Akt proporciona um "sinal de sobrevivência" que protege as células da apoptose.¹⁵ A Akt é regulada pelo gene Ras, que ao activar esta cascata, contribui para a formação de células malignas e desenvolvimento de cancro. O domínio PH responde a factores de crescimento, assim como à forma activa da PI3-K, mediando a translocação da cinase Akt do citosol para a membrana plasmática, como resposta à activação da PI3-K, que por sua vez depende do comportamento das células em relação ao factor de crescimento.¹⁷

Uma vez bem posicionada na membrana, através da sua ligação ao PIP3, a Akt pode, então, ser fosforilada pelas suas cinases activadas, PDK1 (*phosphoinositide dependent Kinase 1*) e PDK2 (*phosphoinositide dependent Kinase 2*) que vão fosforilar a Akt em dois locais, a treonina 308 e a serina 473, respectivamente. Outras moléculas podem igualmente actuar como PDK2, tais como a "*integrin-linked Kinase*" (ILK) e a "*mitogen-activated protein kinase activated protein kinase-2*" (MAPKAPK2).¹⁵

A Akt activada tem, desta forma, a capacidade de activar ou desactivar a sua miríade de substratos através da sua actividade cinase (Figura 3).

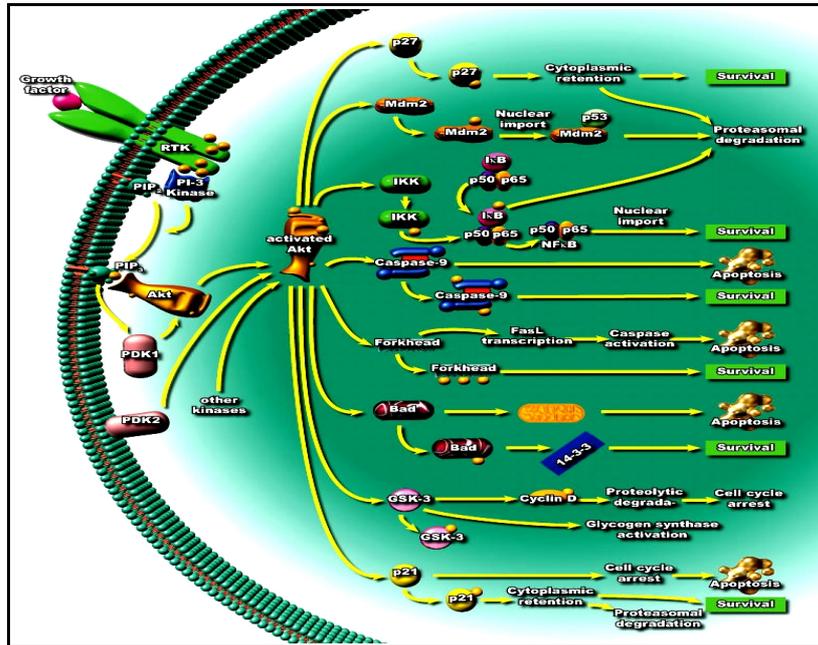


Figura 3 – Via de ativação da Akt

(Fonte: www.emdbiosciences.com/htm/cbc/akt.htm).

Como anteriormente referido, vários estudos recentes revelaram uma ligação entre a via PI3-K/Akt e a via SREBP da homeostase do colesterol.¹⁸⁻²²

Alguns estudos¹⁸⁻²⁰ usaram inibidores farmacológicos da via PI3-K/Akt e demonstraram uma diminuição concomitante da resposta da via SREBP a factores de crescimento ou insulina. Um estudo de Zhou *et al*¹⁹ identificou o SREBP como uma molécula chave da angiogénese em resposta ao factor de crescimento vascular endotelial (VEGF) e demonstrou que a via PI3-K/Akt tinha um papel fundamental regulador desta via SREBP, com activação de genes promotores, assim como do receptor LDL e FAS. Os genes-alvo da via SREBP induzidos pela Akt foram identificados em trabalhos experimentais com microarrays, usando linhas celulares de células epiteliais humanas com expressão de Akt activo. Estes genes identificados incluem FAS, HMG-CoA sintetase e redutase.²¹

Outro estudo de Du *et al*²² evidenciou o papel da via PI3-K/Akt no metabolismo celular do colesterol através do seu efeito no mecanismo de transporte do complexo SREBP/SCAP do retículo endoplasmático para o aparelho de Golgi e, por conseguinte, na activação do SREBP; a inibição da PI3-K ou uma forma dominante de Akt desactivada interrompe o transporte do complexo SREBP/SCAP e impede, conseqüentemente, a activação do SREBP com efeitos a jusante previsíveis como a inibição dos genes-alvo da via SREBP (FAS, HMG-CoA redutase e receptor LDL) e diminuição da síntese de colesterol e ácidos gordos.

A relação entre as vias SREBP e PI3-K/Akt pode ser explicada pelo facto da síntese de novas membranas celulares (via SREBP) ser um pré-requisito absolutamente necessário para o crescimento e proliferação celular (via PI3-K/Akt).²²

A ligação entre estas duas vias (SREBP e PI3-K/Akt), devido a necessidade duma síntese contínua de novas membranas celulares nos processos neoplásicos, torna-se uma perspectiva aliciante para futuras estratégias terapêuticas.

4.1.4 Hormonas esteróides e via SREBP

Outros trabalhos ²³⁻²⁶, estudando a ligação entre hormonas esteróides e via SREBP, permitiram igualmente estabelecer uma associação entre o colesterol e a doença neoplásica.

Um trabalho de Heemers *et al* ²³ descreve como os androgénios estimulam a expressão de genes lipogénicos em células de cancro da próstata através do aumento da expressão da SCAP.²³ Nestas situações de hiper-expressão da SCAP, a proteína de retenção Insig fica rapidamente saturada e o excesso da SCAP transporta a SREBP para o aparelho de Golgi levando à sua activação mesmo na presença de altos níveis de colesterol.²⁴ Em outro estudo ²⁵, os mesmos investigadores identificaram a presença de um elemento de resposta aos androgénios no intrão 8 do gene do SCAP permitindo uma activação contínua da SREBP na presença de androgénios. Além disso, este último estudo evidenciou que o elemento de resposta aos androgénios do gene SCAP também era sensível aos glucocorticóides. Em consequência desta última conclusão, e à luz de alguns estudos recentes que sugeriram o papel dos glucocorticóides na resistência terapêutica de alguns cancros sólidos, com aumento de crescimento tumoral e aparecimento de metástases ²⁶, poder-se-ia tirar como ilação que este aumento do crescimento tumoral e aparecimento de metástases associado aos glucocorticóides seria, em parte, mediado pela hiper-expressão da SCAP e, conseqüente, aumento da síntese de colesterol e ácidos gordos.

4.1.5 A via Hedgehog, colesterol e cancro

A cascata de sinalização de Hedgehog permite, da mesma forma, estabelecer uma ligação entre o colesterol e o cancro.

A via de sinalização de Hedgehog, descoberta em 1995 na drosófila²⁷, representa um elemento fundamental no desenvolvimento embrionário, com um papel igualmente importante nos organismos adultos²⁸. Com efeito, estudos recentes revelaram o papel desta via de sinalização na regulação das células estaminais e na manutenção e regeneração dos tecidos adultos, tendo sido igualmente relacionada com a carcinogénese.^{29,30} Existem três proteínas Hedgehog (Hh)- proteínas de sinalização intercelular, nos mamíferos: Indian hedgehog (Ihh), Desert hedgehog (Dhh) e Sonic hedgehog (Shh), sendo este último o ligando mais bem caracterizado nos mamíferos.

A cascata de sinalização de Hedgehog inicia-se com um complexo receptor transmembranar formado por duas moléculas, o *Patched* (Ptch), o receptor propriamente dito, e uma segunda proteína, o *Smoothened* (Smo); este último é inibido pelo Ptch quando este se apresenta isoladamente. Mas quando ocorre uma interacção entre um ligando e o Ptch, este bloqueio desaparece e a proteína Smo interage com uma cascata de sinalização que resulta na activação de factores de transcrição da família *Glucagon-like immunoreactive factor* (Gli1, Gli2 e Gli3), com consequente transcrição de genes alvo da via Hedgehog como os genes Myc, ciclinas D e E, componentes da via do *Epidermal Growth Factor* (EGF) e da angiogénese, como o *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF) ou o *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF).^{31,32}

O colesterol tem várias ligações com esta via de sinalização Hedgehog.

Em primeiro lugar, as proteínas Hedgehog têm ligações covalentes com o colesterol, nomeadamente a proteína Shh que se vai ligar, no domínio carboxilo do seu N-terminal, a uma molécula de colesterol. Em segundo lugar, os 12 domínios transmembranares do receptor Ptch incluem cinco domínios transmembranares sensíveis aos esteróis, como já foi observado anteriormente no caso de outras proteínas que participam no metabolismo do colesterol, nomeadamente a proteína SCAP.³³

Finalmente, vários estudos ³⁴⁻³⁶ mostraram, através da utilização de inibidores da biossíntese do colesterol, que defeitos enzimáticos nos últimos passos desta via com consequente diminuição dos níveis do colesterol, estavam associados a anomalias da via de sinalização de Hedgehog; assim, nestes estudos, o colesterol aparece como um elemento necessário ao bom funcionamento da via de Hedgehog. O colesterol vai provavelmente permitir uma alteração conformacional do receptor Ptch, através dos seus 5 domínios transmembranares sensíveis aos esteróis, permitindo a subsequente activação do Smo iniciando, desta forma, a cascata de sinalização de Hedgehog.³⁴⁻³⁶

Como acontece com outras vias envolvidas no desenvolvimento, uma actividade inapropriada da via de sinalização de Hedgehog pode ser carcinogénica.³⁷ Esta via Hedgehog encontra-se alterada em cerca de 20-25% dos cancros humanos, parecendo desempenhar, numa grande maioria, um papel causal.³⁸ O melhor exemplo é o caso do carcinoma das células basais, um resultado infelizmente comum da exposição solar com danificação das duas cópias do gene Ptch pela luz ultravioleta.³⁹

Um estudo recente ⁴⁰ mostrou que as moléculas PI3-K e Akt eram essenciais para a via de sinalização da proteína Sonic Hedgehog; considerando a ligação anteriormente descrita entre as vias Akt e SREBP, isto permitiria estabelecer outra ligação, embora indirecta, entre o colesterol e o cancro. A figura 4 propõe um modelo onde as

três vias (SREBP, PI3-K/Akt e Hedgehog) estão interligadas e podem estar envolvidas na iniciação e desenvolvimento do processo neoplásico.⁴¹

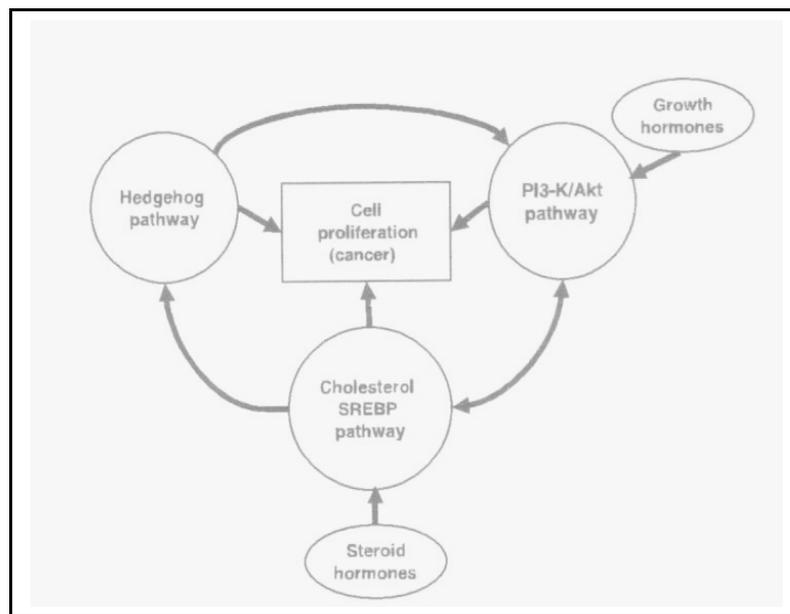


Figura 4 – Vias de sinalização envolvendo o colesterol que podem convergir para carcinogénese.

(Fonte: Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 2007; 34: 135-41).

No entanto, um estudo recente de Bijlman *et al*⁴² sugeriu que não seria o colesterol *per se* o factor essencial na actividade da via de sinalização de Hedgehog, mas outro metabolito da via do mevalonato, um dos principais precursores do colesterol. A vitamina D3 é formada pela acção da luz ultravioleta na molécula 7-deidrocolesterol, um precursor imediato do colesterol e este

esterol encontra-se muito aumentado na doença genética – Síndrome de Smith-Lemli-Opitz (SLOS). Esta síndrome, caracterizada por anomalias do desenvolvimento, é causada pela deficiência de 7-deidrocolesterol redutase que catalisa a transformação do 7-deidrocolesterol em colesterol (Figura 1).

Nesse estudo de Bijlman *et al*⁴² foi demonstrado que a vitamina D3 podia ligar-se e inibir a proteína *Smothered* (Smo) e, subsequentemente, a cascata de sinalização de Hedgehog. Assim, na síndrome SLOS, a acumulação de 7-deidrocolesterol e o aumento da produção de vitamina D3 proporcionam uma explicação alternativa para o desenvolvimento das anomalias observadas nesta síndrome, não parecendo estar associado somente a um baixo nível de colesterol. Este papel da vitamina D3 permite uma nova abordagem da ligação colesterol e via de Hedgehog e aponta para um caminho de investigação combinando vitamina D3 e cancro.⁴³

4.1.6 Colesterol e ciclo celular

A regulação do ciclo celular desempenha um papel fundamental no desenvolvimento dos tumores associados à via de Hedgehog.⁴⁴ O ciclo celular é o conjunto de processos pelo qual passam todas as células, incluindo as células neoplásicas, para poderem proliferar. Um estudo de Fernandez *et al*⁴⁵, utilizando inibidores com capacidade de bloquear a síntese do colesterol abaixo do seu precursor mevalonato, evidenciou a necessidade da presença de colesterol para a transição da fase G2-M do ciclo celular. Noutro estudo de Suarez *et al*⁴⁶ foi demonstrado que o grupo 3 β -hidroxilo e a dupla ligação em C5 da estrutura dos esteróis eram necessários para a proliferação celular e progressão do ciclo celular.

Estes estudos conduzem a novas perspectivas na interação colesterol - cancro.

4.1.7 “Jangada lipídica” e cancro

A membrana plasmática é formada por lípidos, proteínas e glicoproteínas com uma disposição em bicamada de fosfolípidos com a inserção de outras moléculas (proteínas, açúcares, colesterol) na sua estrutura. A membrana plasmática permite uma permeabilidade selectiva controlando, desta forma, a entrada e a saída de moléculas e iões. Cerca de 70% das proteínas que a compõem são qualificadas como intrínsecas, ficando solidamente aderentes à sua estrutura. As proteínas extrínsecas (30% das proteínas membranosas) estão fracamente ligadas à superfície da membrana plasmática por forças electrostáticas, deslocando-se intensamente no mosaico-fluido que caracteriza a membrana plasmática e que é o modelo teórico, actualmente aceite para a estrutura da membrana, proposto por Singer e Nicholson em 1972.⁴⁷ Este modelo foi evoluindo na última década com a inclusão das “jangadas lipídicas” (*lipid rafts*) que são micro-domínios ricos em colesterol e esfingolípidos que fornecem uma plataforma para as proteínas de sinalização celular; além disso, estas “jangadas” não são estáticas, estes domínios podem difundir-se mais ou menos livremente através da membrana plasmática, considerada como um líquido tridimensional, e levar com elas os componentes proteicos que estão naquela zona.⁴⁸ (Figura 5).

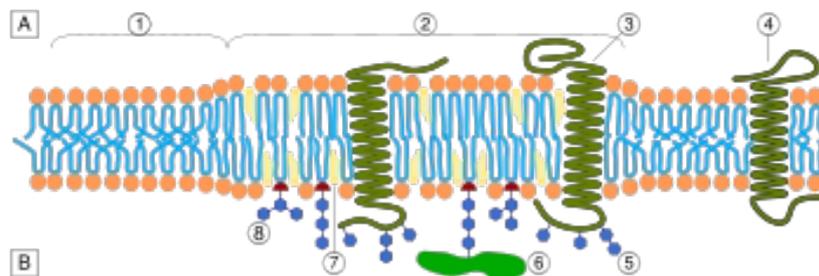


Figura 5 – A organização das “jangadas lipídicas”. A: espaço intracelular ou citosol; B: espaço extracelular ou lúmen das vesículas/aparelho de Golgi; 1: membrana sem “jangadas” (*non-raft membrane*); 2: “jangada lipídica”; 3: “jangada lipídica” associada a proteína transmembranar; 4: proteína membranar sem “jangada” (*non-raft membrane protein*); 5: modificações de glucosilação; 6: proteína numa âncora de glicosilfosfatidilinositol (*GPI anchor protein*); 7: colesterol; 8: glicolípido.
(Fonte: cellbiology.med.unsw.edu.au/.../lecture0803.htm)

As “jangadas lipídicas”, ao integrarem a proteína caveolina 1 na sua estrutura, formam invaginações designadas de cavéolas (*caveolae*); a caveolina 1 liga-se especificamente ao colesterol na membrana plasmática.⁴⁹ Vários estudos⁵⁰⁻⁵³ têm atribuído à caveolina 1 um papel na carcinogénese. Num estudo de Williams *et al*⁵⁰, a ablação genética do gene da caveolina 1 atrasou o desenvolvimento de cancro da próstata num modelo experimental animal TRAMP (*Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate*). Curiosamente em estudos realizados em células de cancro da mama, foi mostrado que a inactivação do gene da caveolina 1, exclusivamente encontrado em células de cancro da mama com receptores de estrogénio positivos, promovia alterações pré-malignas.⁵¹ Estes dados sugerem que as vias sensíveis ao colesterol podem actuar de forma diferente consoante o tecido-alvo.

Além disso, num estudo de referência de Zhuang *et al*⁵² que usou células negativas para caveolina 1, foi demonstrado que alterações dependentes do colesterol, a nível das "jangadas lipídicas" das células tumorais, podiam alterar os mecanismos de transdução celulares, independentemente das caveolinas. Os autores mostraram que o aumento dos níveis circulantes de colesterol num modelo de xenoinxerto de cancro da próstata humano em murganhos SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*), estava associado à promoção do crescimento e sobrevivência tumoral, tendo atribuído este efeito ao aumento da activação da via PI3-K/Akt pelas "jangadas lipídicas" ricas em colesterol. Um estudo mais recente⁵³ mostrou que os níveis de colesterol nos micro-domínios das "jangadas lipídicas" regulavam a apoptose das células de cancro da próstata através da via de sinalização/transdução Akt; neste estudo, as células tumorais tratadas com 2-hidroxiprofil-beta-ciclodextrina (HPCD), para esgotar o colesterol membranar, apresentavam uma taxa de apoptose maior através da inibição da via Akt.

Este papel do colesterol a nível das "jangadas lipídicas" na regulação de vias de sinalização celular e, conseqüentemente, na carcinogénese, foi, igualmente, evidenciado em células de cancro da mama.⁵⁴⁻⁵⁶

Outro estudo⁵⁷ evidenciou que as "jangadas lipídicas" ricas em colesterol podiam ser potenciais locais de sinalização celular hormonal não genómica, nomeadamente no cancro da próstata, através de receptores nucleares para androgénios com activação da sua função não genómica, interagindo com outras proteínas de transdução de sinal no citoplasma. Outras moléculas foram igualmente apontadas a nível das "jangadas lipídicas" como moléculas de sinalização chave, nomeadamente o receptor do factor de crescimento epidermal (EGFR),⁵⁸ considerado como um prometedo alvo terapêutico na patologia neoplásica.⁵⁹ Além disso, o

receptor *Patched* da proteína Hedgehog foi associado à proteína caveolina 1 nas "jangadas lipídicas" ricas em colesterol das membranas plasmáticas.⁶⁰

Assim, todas as estratégias terapêuticas visando a diminuição do nível de colesterol, nomeadamente as estatinas - inibidores da HMG-CoA redutase, podem eventualmente ser consideradas estratégias quimiopreventivas e/ou quimioterapêuticas através da interrupção da sinalização mediada pelas "jangadas lipídicas" nas células tumorais.⁵²

4.2 Estatinas

4.2.1 Farmacologia e pleomorfismo das estatinas

As estatinas, inibidoras da 3-Hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase, pertencem ao grupo terapêutico redutor dos níveis plasmáticos do colesterol, inibindo a enzima hepática HMG-CoA redutase - principal enzima limitadora da síntese de colesterol - permitindo, desta forma, uma diminuição importante das concentrações de colesterol.⁶¹ As estatinas são muito usadas no tratamento da hipercolesterolemia plasmática, tendo-se verificado, ao longo da última década, um aumento significativo na sua utilização clínica.⁶²

Existem cerca de 8 membros conhecidos da família das estatinas com diferentes graus de hidrofobia, desde estatinas muito hidrofóbicas como cerivastatina, lovastatina e sinvastatina até estatinas parcialmente hidrofóbicas como rosuvastatina.⁶¹

O metabolismo das estatinas é exclusivamente hepático, a maioria sendo metabolizada através do citocromo P450 (lovastatina, sinvastatina, atorvastatina), tornando-as mais sensíveis a alguns fármacos que interferem com o citocromo P450.⁶³ As estatinas são consideradas agentes seguros, com efeitos secundários adversos raros como miopatia, rabdomiólise e consequente insuficiência renal. Este risco aumenta com a dose prescrita e com algumas interações medicamentosas (papel do citocromo P450); uma elevação das enzimas hepáticas pode ocorrer nas primeiras semanas da sua utilização mas é totalmente reversível com a paragem do tratamento.⁶³

As estatinas têm uma estrutura esteróide similar à HMG-CoA e competem com esta última pela ligação com a HMG-CoA redutase, tendo, as estatinas, uma maior afinidade com a enzima,

resultando numa inibição directa da biosíntese do colesterol⁶⁴ (Figura 6).

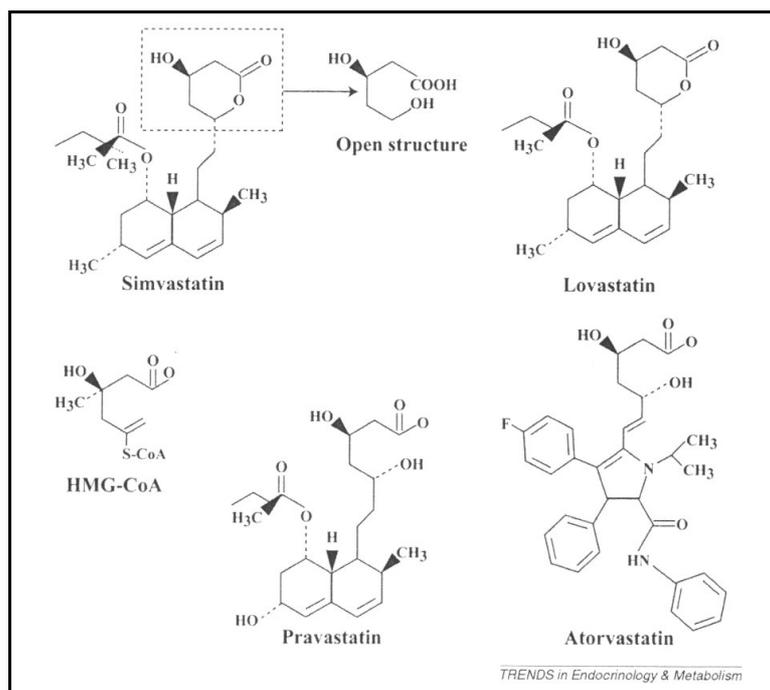


Figura 6 – Estrutura do HMG-CoA e dos principais inibidores do HMG-CoA.

(Fonte: Trends in Endocrinology and Metabolism 2003; 19 (4): 87)

As estatinas têm também a capacidade de diminuir as HDL (*High Density Lipoproteins*) e os triglicéridos, aumentar a expressão dos receptores das LDL (*Low Density Lipoproteins*) nos hepatócitos, diminuindo os níveis plasmáticos desta lipoproteína^{61,65} e, conseqüentemente, diminuir a progressão da aterosclerose e a incidência de episódios cardiovasculares nos doentes com doença coronária.⁶⁶⁻⁶⁹

Fora a sua acção de inibição da síntese de colesterol, as estatinas apresentam outras actividades biológicas; este pleomorfismo das estatinas é responsável pelos outros benefícios destes fármacos.⁷⁰

As estatinas apresentam uma acção anti-inflamatória^{65,71} melhorando a função endotelial com estabilização da placa aterosclerótica; este efeito é independente da capacidade de diminuição dos níveis de colesterol.⁷² Estes fármacos podem, então, ser usados na prevenção primária e secundária de doenças vasculares como enfarte do miocárdio e AVC em doentes de alto risco.⁷³

As estatinas demonstraram induzir diversas respostas clínicas quando administradas ao ser humano. Estas acções incluem, entre outras, efeitos benéficos na insuficiência cardíaca não isquémica,⁷⁴ efeitos antihipertensores,⁷⁵ redução do risco de várias formas de demência,⁷⁶ efeito antitrombótico⁷⁷ e diminuição da proteinúria e da progressão da insuficiência renal.⁷⁸

Outra propriedade muito interessante das estatinas é o seu potencial efeito anti-neoplásico; vários estudos laboratoriais demonstraram que as estatinas tinham a capacidade de induzir apoptose, reduzir a proliferação celular através de interferência eficaz com o ciclo celular e inibir a capacidade de metastização duma grande variedade de linhagens celulares neoplásicas, nomeadamente células mamárias⁷⁹⁻⁸⁴.

4.2.2 Estatinas e cancro

As estatinas apresentaram, em vários estudos *in vitro* e *in vivo*, efeitos polimórficos importantes em várias etapas da carcinogénese como proliferação e sobrevivência celular, angiogénese e migração celular.⁸⁵⁻⁸⁷

Os mecanismos pelos quais as estatinas actuam para obter estes efeitos anti-neoplásicos permanecem, ainda, parcialmente desconhecidos.

Como referido no capítulo anterior, a inibição da síntese de colesterol com a consequente redução dos seus níveis plasmáticos pode explicar parte destas acções anti-cancerígenas através do seu papel preponderante na estrutura e função da membrana plasmática, nalgumas vias importantes de sinalização, quer genómicas quer não genómicas, e no ciclo celular.

No entanto, alguns precursores do colesterol cuja síntese também fica inibida pelas estatinas (Figura 1) demonstraram ter um papel importante neste pleomorfismo das estatinas, nomeadamente os isoprenóides da via do mevalonato.

Um estudo *in vitro* com os precursores das estatinas, compactina e mevinolina, permitiu concluir que a inibição da síntese de colesterol induzia uma diminuição do crescimento celular, enquanto o suplemento de mevalonato tinha a capacidade de reverter esse efeito inibitório, contrariamente à adição de colesterol que se revelou ineficaz. Estes dados constituíram a primeira evidência científica de que, para além do colesterol, outros produtos derivados da via do mevalonato estariam implicados no controlo do crescimento celular⁸⁹.

Assim esta pleiotropia atribuível às estatinas resultaria em parte da inibição da síntese de intermediários isoprenóides da via do mevalonato (e da biossíntese do colesterol), em particular o farnesil pirofosfato e o geranylgeranyl pirofosfato. Os isoprenóides participam

na modificação pós-transdução de um conjunto de proteínas intracelulares que, ao intervirem na transdução de sinal, afectam, por exemplo, a regulação do crescimento e diferenciação celular, a expressão genética, o ordenamento do citoesqueleto, a mortalidade celular, o transporte proteico e lipídico, o transporte nuclear e a defesa do hospedeiro.⁹⁰

Estas propriedades anti-proliferativas e pró-apoptóticas *in vitro* e *in vivo* poderão ter relevantes implicações clínicas quer na prevenção, quer no tratamento de algumas patologias neoplásicas; conseqüentemente, vários estudos epidemiológicos, estudos observacionais e ensaios clínicos com distribuição aleatória foram realizados, infelizmente, com resultados divergentes.⁹¹

A maioria destes estudos iniciais não avaliou o risco de cancro como um primeiro resultado das estatinas mas em segunda análise, no contexto da avaliação da eficácia destas substâncias na redução da mortalidade e morbidade cardiovascular.

Meta-análises recentemente publicadas analisaram os dados de vários ensaios clínicos com distribuição aleatória, com o objectivo de avaliar a associação entre estatinas e o risco global⁹²⁻⁹⁴ de cancro ou risco específico para determinado cancro^{95,96}.

O risco relativo (RR) para a incidência global de cancro varia nos vários estudos de 0,5 a 1,8, com os valores extremos provenientes de estudos com uma população com menos de 500 doentes. Quando o risco combinado para todos os cancros é avaliado, nenhuma associação estatisticamente significativa foi encontrada em nenhuma das meta-análises mais recentes com RR de 0,99 (95% de intervalo de confiança = 0,94-1,04)⁹³ e RR de 1,02 (0,97-1,07).⁹²

Embora os ensaios clínicos com distribuição aleatória sejam considerados como o "gold standard" para estabelecer uma relação de causalidade, a associação entre estatinas e cancro não pode ser considerada uma questão encerrada. Com efeito, apesar da riqueza

das evidências fornecidas pelos ensaios clínicos com distribuição aleatória, estes estudos, citados anteriormente, apresentam um *follow-up* muito curto impedindo de tirar conclusões definitivas sobre a relação entre as estatinas e o risco de cancro. Outra preocupação a ter, antes de tirar conclusões destes ensaios clínicos com distribuição aleatória, é a obrigatoriedade de critérios de inclusão muito restritos, limitando a generalização dos dados encontrados para uma população mais típica.⁹¹

Dadas as limitações dos ensaios clínicos com distribuição aleatória para avaliar o papel das estatinas na carcinogénese, os estudos observacionais aparecem como alternativas para aumentar o nosso conhecimento dessa relação.

Alguns dos maiores estudos observacionais mostraram uma diminuição da incidência global de cancro associada ao uso de estatinas na ordem de 14% a 36%⁹⁷⁻¹⁰⁰, por vezes, com reduções ainda maiores para determinado tipo de cancro¹⁰²⁻¹⁰⁵: redução de 65% do risco de cancro da próstata (0,19-0,63); redução de 51% do risco de cancro da mama (0,38-0,62); redução de 47% do risco de cancro colo-rectal (0,38-0,74). No entanto, alguns estudos observacionais mostraram, pelo contrário, que não havia nenhuma associação significativa entre estatinas e cancro, e, até, mesmo em alguns estudos, foi evidenciado um aumento da incidência de cancro associado a estes fármacos¹⁰⁵⁻¹⁰⁸. Todavia, uma meta-análise de vinte estudos observacionais tipo caso-controlo, publicada recentemente, revelou uma associação estatisticamente significativa entre o uso de estatinas e a redução da incidência global de cancro¹⁰⁹.

Estas discrepâncias podem ser devidas a algumas limitações destes estudos observacionais¹⁰⁹. Primeiro, existe sempre a probabilidade de má caracterização da exposição aos fármacos (estatinas) devido a falhas na fiabilidade dos dados colhidos na história clínica dos participantes dos estudos. No entanto, o auto-

relatório da história farmacológica, apesar de imperfeito, é um método razoável para o estudo de fármacos, nomeadamente das estatinas que são uma medicação crónica facilmente lembrada. Além disso, existe também nestes estudos, um grande potencial de variáveis de confusão devido ao estilo de vida; com efeito, factores como baixa actividade física, obesidade, dieta rica em gorduras saturadas, tendem a agrupar-se e podem estar, igualmente, associados ao uso de estatinas e risco de ocorrência de cancro.

Concluindo, à luz dos dados epidemiológicos publicados, a relação risco/benefício das estatinas em relação ao cancro não está clara. No entanto, as limitações desses estudos epidemiológicos, referidas anteriormente, e as fortes evidências nos estudos *in vitro* e *in vivo* a favor dum papel protector das estatinas, só apontam para a necessidade de mais estudos, quer estudos *in vitro* e *in vivo* para melhor compreensão dos potenciais mecanismos biológicos das estatinas a nível da carcinogénese, quer estudos epidemiológicos desenhados especificamente para avaliar o efeito das estatinas na incidência de cancro, com uma população com uma amostra adequada e um "follow-up" suficientemente longo.

4.3 Cancro da Mama

O cancro da mama é a segunda causa de morte em mulheres americanas desde 1987. Em cada ano 29% de novos cancros e 16% das mortes por cancro em mulheres americanas são por cancro da mama. A sua incidência aumenta com a idade, verificando-se uma ligeira diminuição a partir dos 60 anos. Nos Estados Unidos, segundo dados de 2002, uma em cada oito mulheres tem a probabilidade de desenvolver cancro da mama durante a sua vida e uma probabilidade de 3,6% de morrer dessa doença. A incidência do cancro da mama tem aumentado gradualmente ao longo dos últimos 25 anos à escala mundial¹¹⁰. Parte desse aumento tem sido atribuído à detecção mais precoce de pequenos tumores, relacionada com campanhas de esclarecimento e consciencialização do problema e, ainda, aos progressos do equipamento de mamografia que têm permitido melhor resolução, levando a diagnóstico de tumores de pequenas dimensões (inferior a 2 cm). Internacionalmente há países com taxas de cancro da mama diferentes dos Estados Unidos. No Japão a incidência global deste cancro é um quinto da descrita e os países subdesenvolvidos também têm taxas específicas por idade inferiores às dos Estados Unidos. Em alguns países desenvolvidos, como Suécia e Reino Unido, as taxas de incidência e mortalidade deixaram de aumentar e poderão estar a diminuir. As mulheres afro-americanas têm piores taxas de sobrevivência e menos doença localizada do que as mulheres caucasianas¹¹⁰. Nestas mulheres as taxas de mamografias de rastreio são inferiores levando a que, embora a taxa de incidência para este cancro seja menor, a taxa de mortalidade seja, contudo, maior.

Em Portugal a incidência de cancro da mama varia um pouco com as regiões, tendo-se contabilizado um total de 18265 casos de cancro da mama de 2001 a 2006, com cerca de cinco mil

novos casos por ano; em 2006, houve 4309 novos casos de cancro da mama em Portugal e 1542 doentes morreram nesse ano vítimas desse cancro ¹¹¹. A perspectiva epidemiológica internacional e nacional, para o cancro da mama continua a justificar o investimento na abordagem cuidadosa do problema, nomeadamente na prevenção e tratamento eficaz.

As estratégias para diminuir a incidência e a taxa de mortalidade do cancro da mama devem passar pela prevenção primária, quimioprevenção, rastreio eficaz (prevenção secundária) e progressos terapêuticos (prevenção terciária). Assim, a detecção cada vez mais precoce de lesões malignas de cancro da mama devido aos progressos na área da Imagiologia, nomeadamente com a mamografia e mais recentemente, com o mamógrafo digital, e a instituição de programas de rastreio como o Rastreio Nacional do Cancro da Mama, permitem um diagnóstico numa fase cada vez mais precoce e, conseqüentemente, um melhor prognóstico. Com efeito, vários estudos¹¹²⁻¹¹⁵ demonstraram que o diagnóstico de uma lesão de menor volume e menor estágio estava associado a um melhor prognóstico e que lesões não palpáveis apresentavam mais frequentemente um menor tamanho e grau histológico.

Em relação à prevenção terciária, vários progressos foram atingidos nestas últimas décadas, nomeadamente com a evolução da radioterapia permitindo uma diminuição do risco de recidiva local de cerca de 60% após cirurgia conservadora ou mastectomia, traduzindo-se por um benefício na sobrevida global a longo prazo¹¹⁶⁻¹¹⁷ e, tornando o tratamento conservador do cancro da mama, uma realidade válida para as formas precoces e unifocais, acessíveis a uma cirurgia conservadora com exérese completa do tumor e resultados estéticos aceitáveis¹¹⁸. O aparecimento de novos agentes como as antraciclina, a vinorelbina e os taxanos permitiu obter melhores resultados na sobrevivência global e intervalo livre de doença¹¹⁹⁻¹²⁰, quer quando usados na quimioterapia adjuvante com o

objectivo de lutar precocemente contra a disseminação metastática, quer quando usados na quimioterapia neo-adjuvante com os principais objectivos de diminuir o risco elevado de metástases nos casos de cancro da mama localmente avançado e, em todos os estádios de cancro da mama, de conseguir uma cirurgia conservadora posteriormente, quando esta não era possível inicialmente. A grande revolução a nível da hormonoterapia adjuvante foi o aparecimento dos inibidores da aromatase (IA), nomeadamente o anastrozol e o letrozol, no tratamento adjuvante do cancro da mama com receptores de estrogéneos positivos na mulher pós-menopáusia, num esquema sequencial com o tamoxifeno ou isolado durante cinco anos¹²¹. Outro progresso no tratamento do cancro da mama foi o desenvolvimento do transtuzumab, anticorpo monoclonal anti- HER 2, que associado à quimioterapia nos casos de cancro da mama HER 2 positivo, permitiu uma diminuição do risco relativo de recidiva em 50%¹²².

Apesar destes progressos enumerados anteriormente, pouco se tem conseguido em relação à prevenção primária e quimioprevenção.

Um esforço tem sido desenvolvido na tentativa de uma melhor compreensão entre incidência de cancro da mama e estilo de vida, nomeadamente a alimentação; a protecção do cancro da mama em modelos experimentais pode ser simulada, por exemplo, pela administração de uma combinação de micronutrientes antioxidantes, evitando os tumores de pior prognóstico¹²³.

Em relação à quimioprevenção¹²⁴, o único fármaco aprovado para este fim é o tamoxifeno, que tem sido prescrito, durante 5 anos, a mulheres de risco nos EUA. Na União Europeia, o tamoxifeno não foi aprovado para prevenção porque existem alguns riscos associados (risco tromboembólico e cancro do endométrio), embora pouco frequentes. Recentemente outro fármaco, o raloxifeno demonstrou a mesma eficácia que o tamoxifeno na prevenção do cancro da

mama e, embora não tenha risco de cancro uterino, mantém alguns efeitos secundários vasculares. Outros estudos que testem outros fármacos, são necessários, com o objectivo de encontrar uma prevenção primária mais eficaz e com menos efeitos secundários que o tamoxifeno e o raloxifeno, por exemplo o estudo IBIS II que avalia a eficácia quimiopreventiva do anastrozol nas mulheres pós-menopáusicas de alto risco para cancro da mama¹²⁴.

Assim, uma melhor informação e conhecimento sobre factores de risco, potenciais novos alvos terapêuticos e potenciais novos fármacos, como as estatinas, podem levar a um conseqüente melhor prognóstico para as mulheres em risco ou afectadas pelo cancro da mama.

Embora os estudos epidemiológicos sejam contraditórios, como referido anteriormente, alguns estudos *in vitro* e *in vivo* confirmaram as propriedades anti-proliferativas e pró-apoptose das estatinas em linhas celulares de cancro de mama⁷⁹⁻⁸⁴. No entanto os mecanismos mantêm-se não totalmente esclarecidos e são necessários mais estudos, tanto experimentais, como epidemiológicos, para poder considerar as estatinas como uma real opção terapêutica no cancro, nomeadamente no cancro da mama.

4.4 Modelos experimentais

O rato tem sido usado como modelo ideal nos estudos acerca dos mecanismos envolvidos na carcinogénese do cancro da mama, nomeadamente para investigar o papel protector de alguns fármacos. Primeiro, temos muita informação acerca da carcinogénese da glândula mamária do rato. Segundo, há muitas semelhanças entre as glândulas mamárias e os adenocarcinomas do rato e humanos, nomeadamente no que se refere à histologia e carcinogénese ¹²⁵.

Tanto a radiação como vários químicos são carcinogénios potentes capazes de induzir tumores mamários em ratos fêmeas. Destes, os mais frequentemente usados são o 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) ¹²⁵ e a metilnitrosourea (MNU) ¹²⁶. Embora haja diferenças ligeiras entre as estirpes, os tumores mamários podem ser induzidos em várias estirpes de ratos *inbred* ou *outbred*, tais como os ratos Sprague–Dawley (NSD) e os Wistar–Furth (WF).

Na maioria destes modelos experimentais de cancro da mama, os ratos não apresentam metástases durante os 3 a 6 meses de duração do estudo, com excepção de alguns estudos que relataram metástases mais precoces em ratos esplenectomizados previamente à indução carcinogénica ¹²⁷⁻¹³⁰. No entanto, podemos induzir no animal uma neoplasia mamária e metástases mais rapidamente usando um modelo experimental tipo xenoenxerto, com injeção directa de células tumorais mamárias de origem humana, ou aloenxerto, com injeção directa de células tumorais mamárias de rato/murganho, como no modelo experimental de cancro da mama com células 4T1. Estas células tumorais mamárias de murganho, 4T1, são células pouco imunogénicas com características de crescimento, invasão e metastização semelhantes às células tumorais da glândula mamária humana no estágio IV. As

células 4T1, após duas semanas de inoculação, têm uma grande capacidade de invasão e metastização para o pulmão, fígado, gânglios linfáticos, osso e cérebro. Em estudos experimentais, têm sido utilizadas para avaliar o efeito anti-tumoral de alguns fármacos, uma vez que estas células permitem a identificação e avaliação de eventos celulares e moleculares existentes na interacção célula-fármaco, o que é da maior relevância clínica para os humanos¹³¹⁻¹³².

Há vários mecanismos que podem prevenir a formação de um tumor, nomeadamente a supressão da carcinogénese ou o bloqueio da fase de promoção tumoral. A protecção do cancro da mama em modelos experimentais pode ser simulada, por exemplo, pela administração de uma combinação de micronutrientes antioxidantes, inibindo o desenvolvimento de tumores de pior prognóstico¹²³. A administração de alguns fármacos pode, também, permitir a prevenção da carcinogénese mamária nomeadamente a administração das estatinas, como vimos anteriormente. A sinvastatina, uma das estatinas mais comercializadas tanto nos Estados Unidos como na Europa, difere da lovastatina pela presença de um grupo metilo adicional na cadeia, tornando-a mais potente¹³³ (Figura 6).

Os modelos experimentais usando a inoculação directa de células tumorais nos animais, modelos xenoenxerto ou aloenxerto, são avaliados através do estudo em murganhos, nomeadamente murganhos imunodeprimidos (Balb/c) permitindo um desenvolvimento mais eficaz e rápido dos cancros e respectivas metástases, sendo um modelo excelente para o estudo de potenciais fármacos quimiopreventivos ou terapêuticos e respectivos mecanismos de acção.

**OBJECTIVOS DO ESTUDO
EXPERIMENTAL**

5 Objectivos do estudo experimental

Tendo em conta as bases teóricas da temática abordada e as divergências nos vários estudos epidemiológicos, ficou clara a necessidade de realizar mais estudos, tanto epidemiológicos, como experimentais, para melhor compreensão e avaliação dos potenciais mecanismos anti-cancerígenos das estatinas, nomeadamente no cancro da mama, e respectiva aplicabilidade prática.

Desta forma, o objectivo deste estudo foi desenvolver um modelo experimental que permitisse avaliar o efeito anti-metastático da sinvastatina, uma das estatinas mais utilizada em terapêutica humana, numa situação de cancro da mama de mau prognóstico.

MATERIAL E MÉTODOS

6 Material e métodos

O estudo experimental decorreu no Instituto de Patologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto. As orientações referidas pela Portaria nº 1005/92 de 23 de Outubro e pela Portaria nº 1131/97 de 7 de Novembro foram integralmente respeitadas, e todos os procedimentos relacionados com a manipulação de animais foram aprovados pela Direcção Geral de Veterinária (Divisão de Bem-Estar Animal).

6.1 Material

Animais e manutenção:

Para a realização do presente estudo foram utilizados 40 murganhos fêmeas imunodeficientes da estirpe Balb/c com 6 semanas de vida. Os murganhos foram expostos às suas novas condições ambientais uma semana antes do início do estudo experimental. Foram mantidos 5 murganhos por caixa de plástico transparente, sob condições de temperatura e humidade constantes, ciclos de 12 horas escuro/luz, e em condições de esterilidade e assepsia ideais; foram-lhes fornecidas comida autoclavada e água *ad libitum*.

Linha celular e manutenção:

As células tumorais mamárias de murganho 4T1 (Promochem – CRL-2539) foram cultivadas em monocamada, em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) com

10% de soro fetal bovino, 100µg/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina e foram mantidas numa incubadora humidificada a 37°C e com 5% de CO₂ na atmosfera.

Fármaco e anticorpos:

O cloreto de sódio de sinvastatina foi usado no estudo *in vivo* e foi fornecido pelo Laboratório da Merck Sharp & Dohme. As soluções de cloreto de sódio de sinvastatina foram armazenadas por congelação a -20°C.

Foram utilizados vários anticorpos para as técnicas de imunohistoquímica: avaliação dos Receptores de Estrogénio - RE (Imgenex - IMG 80333); avaliação da proliferação celular, o PCNA (Dako - U 7032); avaliação da apoptose, o Bcl-2 (Imgenex - IMG 5688), o Bax (Imgenex - IMG 5684) e a Caspase 3 (Imgenex - IMG 144A).

6.2 Procedimentos experimentais

Foi avaliado o efeito anti-carcinogénico e anti-metastático da sinvastatina num modelo *in vivo* usando murganhos imunodeprimidos Balb/c inoculados com células 4T1.

As células 4T1 (10⁴ células) foram injectadas por via subcutânea no dorso de 30 murganhos BALB/c (grupo I, II e III) com 8 semanas de vida. No dia da injeção das células, as mesmas foram submetidas à acção de 2 ml de uma solução de tripsina-EDTA a 0,25%, durante 2 minutos, para se destacarem do frasco, e ressuspensas num volume conhecido de meio de cultura. Após a contagem das células usando um hemocitómetro, calculou-se o volume de meio de cultura que era necessário retirar da suspensão

mãe de forma a obtermos 10^4 células. A porção retirada foi centrifugada e ressuspensa em 50 μ l de soro fisiológico e colocada no canhão da agulha com o auxílio de uma micropipeta. A seringa foi então, adaptada e as células injectadas no dorso dos murganhos Balb/c.

Os 40 murganhos foram divididos em quatro grupos de 10 murganhos cada, de forma aleatória.

Para avaliar o efeito quimiopreventivo da sinvastatina, iniciou-se o tratamento com sinvastatina ou cloreto de sódio simples 7 dias antes da inoculação das células tumorais 4T1 (murganhos com 7 semanas de vida) e para avaliar o efeito anti-metastático, manteve-se a administração durante 6 semanas (Figura 7):

- Grupo I (GI): 10 murganhos tratados com 25mg/Kg de sinvastatina intraperitoneal, 3 vezes por semana durante 6 semanas; iniciou-se 7 dias antes da inoculação celular.
- Grupo II (GII): 10 murganhos tratados com 50mg/Kg de sinvastatina intraperitoneal, 3 vezes por semana durante 6 semanas; iniciou-se 7 dias antes da inoculação celular.
- Grupo III, grupo de controlo (GIII): 10 murganhos não tratados com sinvastatina, mas submetidos a injeção intraperitoneal, 3 vezes por semana durante 6 semanas de cloreto de sódio; inicia-se 7 dias antes da inoculação celular.
- Grupo IV (GIV): 10 murganhos sem inoculação celular nem injeção intraperitoneal com sinvastatina ou soro fisiológico.

O peso dos murganhos foi avaliado semanalmente de forma a poder adequar correctamente as doses de sinvastatina administradas.

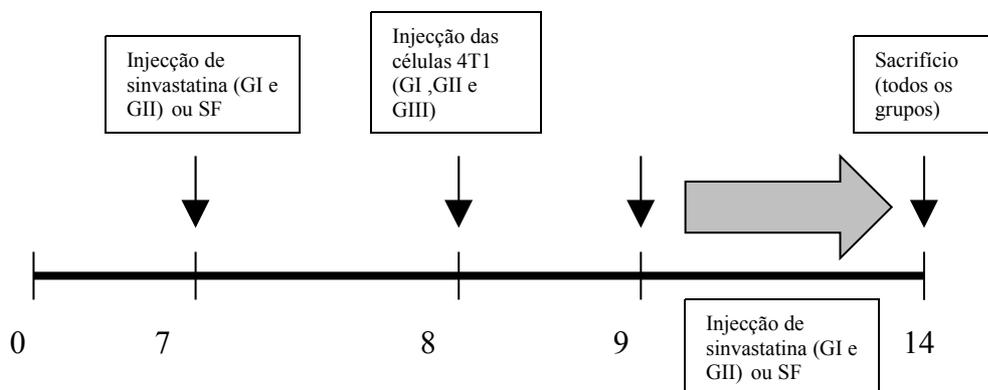


Figura 7 – Esquema do procedimento experimental.

Foi avaliado o estado geral, o comportamento e o peso dos animais semanalmente. O aparecimento de tumores era inspeccionado, por observação e palpação, igualmente com frequência semanal, desde as 8 semanas até às 14 semanas. Às 14 semanas de vida, todos os murganhos foram sacrificados por deslocamento cervical e realizou-se a necropsia completa. A presença de todos os nódulos tumorais foi confirmada na necrópsia. Os tumores foram posteriormente medidos, tendo o seu volume sido calculado mediante a fórmula:

$$V = (a^2 * b)/2,$$

onde **V** é o volume do tumor, **a** o maior eixo e **b** o menor eixo.

Após colheita, os tumores foram fixados numa solução de formol tamponado, incluídos em parafina, cortados e os fragmentos foram colocados sobre lâminas, onde posteriormente foram submetidos à técnica de coloração base com solução de

hematoxilina-eosina e a técnicas de imunohistoquímica com anticorpos primários que marcavam RE, PCNA, Bax, Caspase 3 e Bcl-2 tendo sido usados como controlos positivos um tumor com marcação conhecida para os três primeiros marcadores e amígdala para a Caspase 3. Foi utilizado o Envision+ System-HRP (DAB), da Dako, que é uma técnica de marcação realizada em duas etapas. Como kits de marcação foram utilizados os K4010 e K4012 (Dako), conforme os anticorpos primários fossem de coelho ou de murganho, respectivamente. Posteriormente, foi calculada a relação entre células marcadas e células não marcadas dos tumores e a taxa de marcação positiva, após terem sido seleccionados, aleatoriamente e de forma cega, vários campos de ampliação das lâminas correspondentes aos tumores (H9) dos três grupos em estudo.

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada através da utilização do programa informático SPSS, tendo-nos servido do teste de Levene, teste de Mann-Whitney-U, na presença de heterogeneidade de variâncias, e teste de t-Student, na presença de homogeneidade de variâncias, para avaliação das diferenças, entre os diferentes grupos, nos volumes dos tumores e a intensidade de marcação com os vários marcadores de imunohistoquímica: RE, marcador de proliferação celular (PCNA) e marcadores de apoptose (Bax, Caspase 3 e Bcl-2). O teste de Fischer foi utilizado para comparação entre os diferentes grupos da percentagem de tumores desenvolvidos.

Para avaliar possíveis patologias concomitantes ou localizações tumorais secundárias, foram retirados as glândulas mamárias, os ovários, o útero, o coração, os rins, os pulmões, o fígado, o baço, o esófago, o cólon, o esterno e o fémur. Todos os órgãos foram pesados e analisados macroscopicamente, antes de terem sido fixados em formol tamponado, processados segundo o procedimento descrito e corados com uma solução de hematoxilina-

eosina. Em seguida, foram analisados microscopicamente. Os pesos dos órgãos foram depois correlacionados com os pesos dos murganhos respectivos em cada grupo, pelo cálculo do coeficiente de Pearson r . Além disso, os quocientes peso do órgão/peso do murganho foram comparados entre grupos usando o teste de Mann-Whitney-U.

RESULTADOS

7 Resultados

Dos 40 murganhos utilizados, dois foram eliminados do estudo experimental, por morte prematura dos animais, não tendo sido possível realizar necrópsia nestes dois casos. Desta forma, os 10 murganhos dos grupos I e IV e apenas 9 murganhos dos grupos II e III reuniram as condições para poderem ser considerados nos resultados, correspondendo a um rendimento de indução de 95%.

$$\text{Rendimento} = n^{\circ} \text{ animais no final} / n^{\circ} \text{ de animais no início} = 38/40 \\ = 0,95$$

Os pesos, avaliados semanalmente, correspondiam, no final do estudo experimental, em média \pm desvio -padrão, a 21,75 \pm 1,95g, 22,14 \pm 1,54g, 24,29 \pm 1,33g e 23,16 \pm 0,93g nos grupos I, II, III, e IV, respectivamente. Verificaram-se diferenças estatisticamente significativas comparando os pesos dos grupos I e II com o grupo III (Tabela 1).

Grupos Comparados	Peso médio (g)	Significância estatística - p
GI GIII	21,75 24,29	p = 0,005
GII GIII	22,14 24,29	p = 0,006
GI GII	21,75 22,14	p = 0,63
GIII GIV	24,29 23,16	p = 0,04
GI GIV	21,75 23,16	p = 0,05
GII GIV	22,14 23,16	p = 0,09

Tabela 1 – Estudo comparativo entre os diferentes grupos em relação à média do peso dos murganhos, no final do estudo experimental, usando o teste de t- Student, com cálculo da significância estatística (p).

GI – injeção de células e tratamento com sinvastatina 25mg/Kg;
 GII – injeção de células e tratamento com sinvastatina 50mg/Kg;
 GIII – injeção de células e soro fisiológico; GIV – sem injeção de células nem tratamento com sinvastatina ou soro fisiológico.

Em GI e GIII, surgiram tumores em todos os murganhos (100%), enquanto que em GII surgiram em 7 murganhos (77,8%). Como era de esperar, nenhum tumor apareceu em GIV. Nos murganhos em que surgiram tumores, estes eram únicos e localizados no local do aloenxerto. (Figuras 8-12)

Embora a diferença na taxa de incidência de tumores entre GI, GII e GIII ser acentuada, ela não apresenta significado estatístico ($p = 0,21$, utilizando o teste de Fischer), provavelmente porque a amostra não é suficientemente elevada.

Foram detectadas localizações secundárias de tumores em alguns órgãos analisados macro e microscopicamente:

- Em GIII: 4 murganhos apresentaram metastização à distância - 44,4% (2 com localizações secundárias no fígado, 1 no pulmão e 1 no fígado e pulmão)
- Em GII: 2 murganhos apresentaram metastização à distância - 22,2% (2 com localizações secundárias no pulmão)
- Em GI: 2 murganhos apresentaram metastização à distância - 20% (2 com localizações secundárias no pulmão)

Apesar da diferença entre a percentagem de metástases em GI, GII e GIII ser acentuada, ela não apresenta significado estatístico ($p = 0,35$ quando comparamos GII e GIII e $p = 0,62$ quando comparamos GI e GIII, utilizando o teste de Fischer), provavelmente porque a amostra não é suficientemente elevada (Figura 13).

Por outro lado, tendo sido considerado para o cálculo somente os ratinhos com tumores, o volume médio dos tumores (VMT) em cada grupo era $222,5\text{mm}^3 \pm 168,3\text{mm}^3$ (GI), $227,6\text{mm}^3 \pm 416\text{mm}^3$ (GII) e $555,7\text{mm}^3 \pm 361,7\text{mm}^3$ (GIII). Apenas a diferença entre o grupo III e o grupo I tem significado estatístico ($p=0,011$), utilizando o teste de Mann-Whitney-U (Tabela 2).

Grupos comparados	Volume médio dos tumores (mm ³)	Significância estatística - p
GI GIII	222,5 555,7	p = 0,011
GII GIII	227,6 555,7	p = 0,093
GI GII	222,5 227,6	p = 0,972

Tabela 2 – Estudo comparativo entre os diferentes grupos em relação ao volume médio dos tumores usando o teste de Mann-Whitney U ou t-Student, com cálculo da significância estatística (p).
 GI – injeção de células e tratamento com sinvastatina 25mg/Kg;
 GII – injeção de células e tratamento com sinvastatina 50mg/Kg;
 GIII – injeção de células e soro fisiológico.

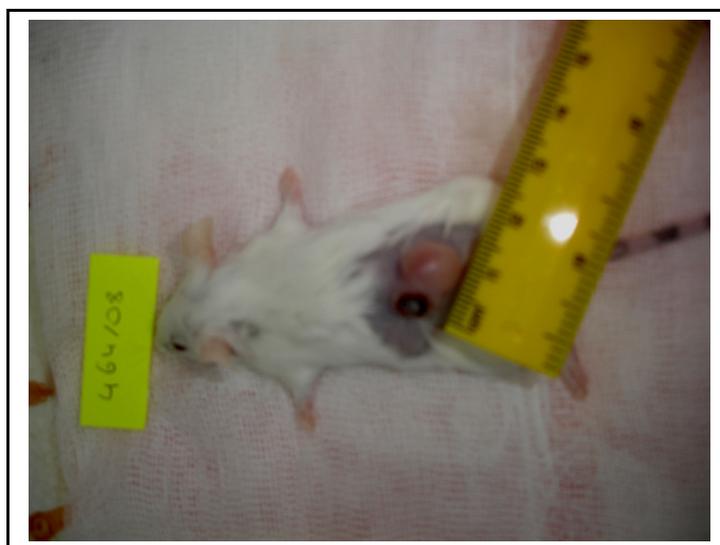


Figura 8 – Aspecto macroscópico de tumor do grupo I

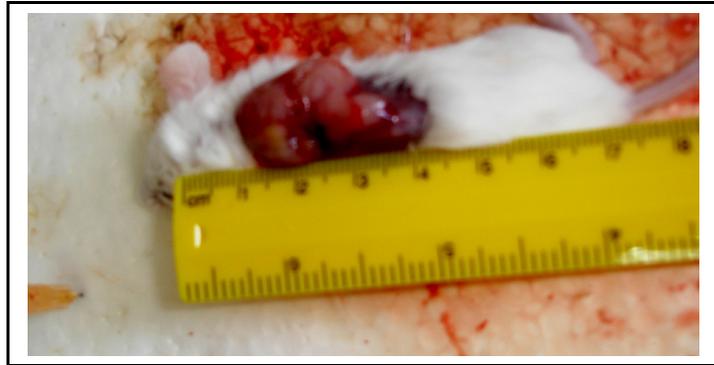


Figura 9 – Aspecto macroscópico de tumor do grupo III

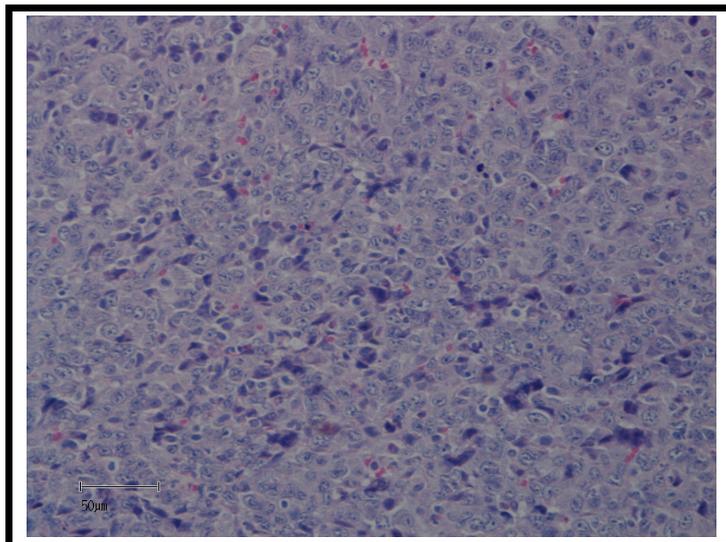


Figura 10 – Tumor do grupo I. Coloração com solução de hematoxilina-eosina

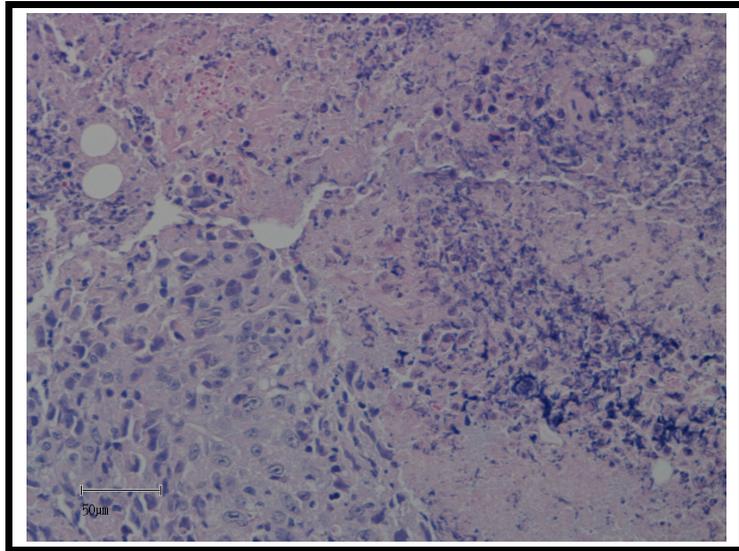


Figura 11 – Tumor do grupo II. Coloração com solução de hematoxilina-eosina

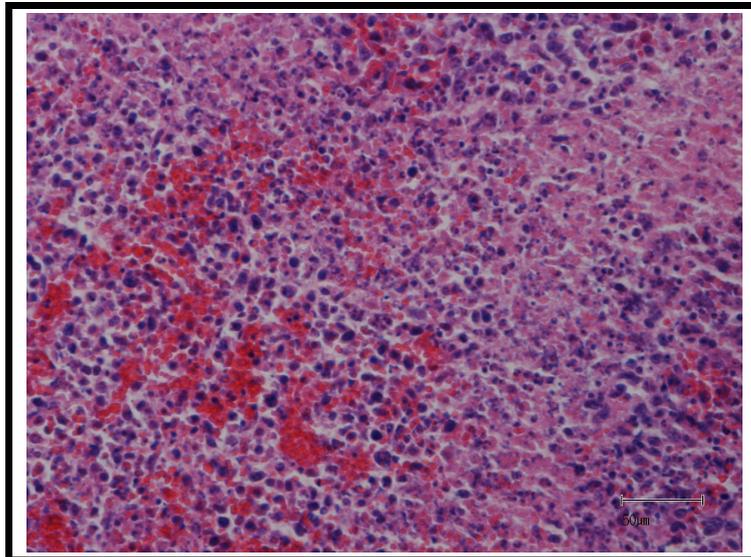


Figura 12 – Tumor do grupo III. Coloração com solução de hematoxilina-eosina

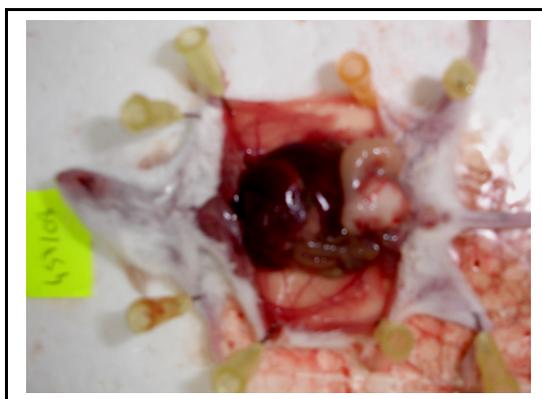


Figura 13 – Murganho do grupo III em decúbito dorsal após incisão mediana expondo a cavidade abdominal com metastização hepática e espenomegália.

Ao analisarmos o coeficiente de Pearson r relativo às relações entre os pesos dos órgãos e os pesos dos murganhos verificamos que não há diferenças estatisticamente significativas entre os vários grupos. Existe uma boa correlação entre o peso do fígado ($r=0,78$) e do útero ($r=0,78$) e o peso dos murganhos no GI, a qual desaparece nos restantes grupos, sobretudo no GIV. Quando comparados os quocientes peso médio do órgão/peso do murganho, usando o teste de Mann-Whitney-U, não foram nunca encontradas diferenças estatisticamente significativas. (Tabela 3).

	Fígado	Baço	Pulmão	Rim	Ovário	Útero	Coração
GI	r=0,78 p=0,56	r=0,59 p=0,36	r=0,31 p=0,87	r= 0,39 p=0,56	r=0,58 p=0,67	r=0,78 p=0,21	r=0,41 p=0,62
GII	r=0,64 p=0,63	r=0,42 p=0,31	r=0,32 p=0,35	r=-0,24 p=0,48	r=0,67 p=0,72	r=0,32 p=0,56	r=0,69 p=0,19
GIII	r=0,31 p=0,36	r=-0,13 p=0,77	r=0,07 p=0,23	r=0,52 p=0,77	r=0,36 p=0,32	r=-0,36 p=0,17	r=0,34 p=0,16
GIV	r=0,34	r=0,03	r=-0,34	r=-0,11	r=0,14	r=-0,31	r=-0,13

Tabela 3 – Relação entre os pesos dos órgãos e os pesos dos murganhos através do cálculo do coeficiente de Pearson r e a significância estatística (p) da diferença entre os grupos dos quocientes peso do órgão/peso do murganho usando o teste de Mann-Whitney-U, considerando os quatro grupos estudados (GI, GII, GIII e GIV).

Em relação ao estudo imuno-histoquímico dos vários marcadores utilizados, foi calculada a média de marcação positiva, bem como o desvio-padrão, erro-padrão e intervalo de confiança de 95%, após a avaliação da relação entre marcação positiva e marcação negativa nas lâminas dos tumores dos diferentes grupos.

A marcação para os RE e marcadores de apoptose (Bax, Caspase 3 e Bcl2) foi de fraca intensidade nos três grupos avaliados, inferior a 10 %, apesar da positividade verificada nas lâminas controlo relativas a cada marcador (Tabela 4-7 e Figuras 14-23). Os resultados obtidos da marcação para Bax não foram considerados devido à marcação de muito fraca intensidade nos três grupos avaliados, inferior a 2%.

A marcação para PCNA foi de maior intensidade nos três grupos, com alto índice proliferativo no grupo III (cerca de 64%). (Tabela 8 e Figuras 24-26).

Quando comparadas as médias de marcação positiva para os vários marcadores avaliados (RE, Caspase 3, Bcl2 e PCNA), usando o teste de t-Student ou o teste de Mann-Whitney U, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos excepto para Bcl2 (Tabela 9).

	Média	DP	EP	IC 95%
GI	0,079	0,128	0,02	0,059-0,099
GII	0,113	0,126	0,023	0,091-0,137
GIII	0,015	0,024	0,004	0,011-0,019

Tabela 4 – Média da marcação positiva para receptores estrogénios (RE) nos três grupos de estudo com cálculo do desvio-padrão (DP), erro-padrão (EP) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

	Média	DP	EP	IC 95%
GI	0,015	0,013	0,002	0,013-0,017
GII	0,024	0,022	0,007	0,031-0,018
GIII	0,002	0,003	0,0006	0,002-0,003

Tabela 5 – Média da marcação positiva para o marcador de apoptose Bax nos três grupos de estudo com cálculo do desvio-padrão (DP), erro-padrão (EP) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

	Média	DP	EP	IC 95%
GI	0,072	0,015	0,003	0,069-0,075
GII	0,087	0,024	0,004	0,083-0,091
GIII	0,029	0,015	0,003	0,026-0,032

Tabela 6 – Média da marcação positiva para o marcador de apoptose Caspase 3 nos três grupos de estudo com cálculo do desvio-padrão (DP), erro-padrão (EP) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

	Média	DP	EP	IC 95%
GI	0,153	0,068	0,012	0,14-0,165
GII	0,118	0,063	0,011	0,107-0,129
GIII	0,126	0,067	0,013	0,12-0,139

Tabela 7 – Média da marcação positiva para o marcador de apoptose Bcl2 nos três grupos de estudo com cálculo do desvio-padrão (DP), erro-padrão (EP) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

	Média	DP	EP	IC 95%
GI	0,125	0,178	0,032	0,097-0,161
GII	0,053	0,113	0,02	0,035-0,075
GIII	0,637	0,112	0,02	0,62-0,66

Tabela 8 – Média da marcação positiva para o marcador de proliferação celular PCNA nos três grupos de estudo com cálculo do desvio-padrão (DP), erro-padrão (EP) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

Grupos comparados	RE	Bax	Caspase3	Bcl2	PCNA
GI / GIII	p=0,004	-	p<0,005	p=0,25	p<0,005
GII / GIII	p<0,005	-	p<0,005	p=0,31	p<0,005
GI / GII	p=0,26	-	p=0,005	p=0,05	p=0,108

Tabela 9 – Avaliação da significância estatística (p) aquando da comparação entre os três grupos em estudo em relação à média da marcação positiva, para os vários marcadores avaliados por imunohistoquímica, usando o teste de Mann-Whitney U ou t-Student.

GI – injeção de células e tratamento com sinvastatina 25mg/Kg;

GII – injeção de células e tratamento com sinvastatina 50mg/Kg;

GIII – injeção de células e soro fisiológico.

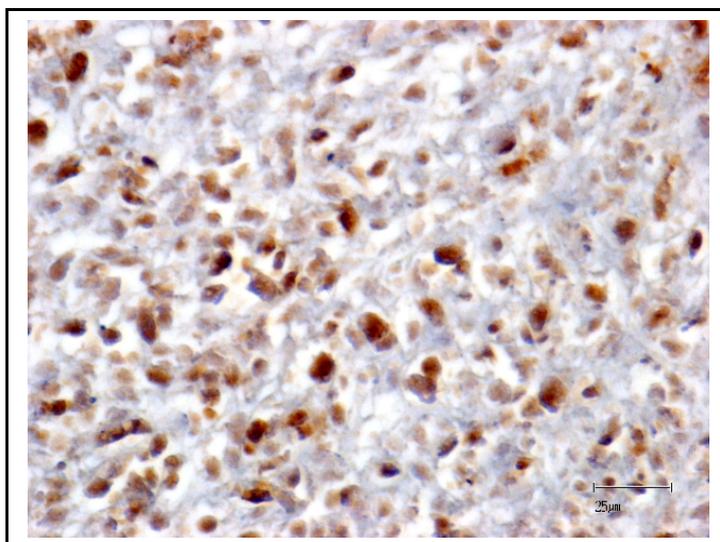


Figura 14 – Tumor de GI. Marcação por imuno-histoquímica dos RE

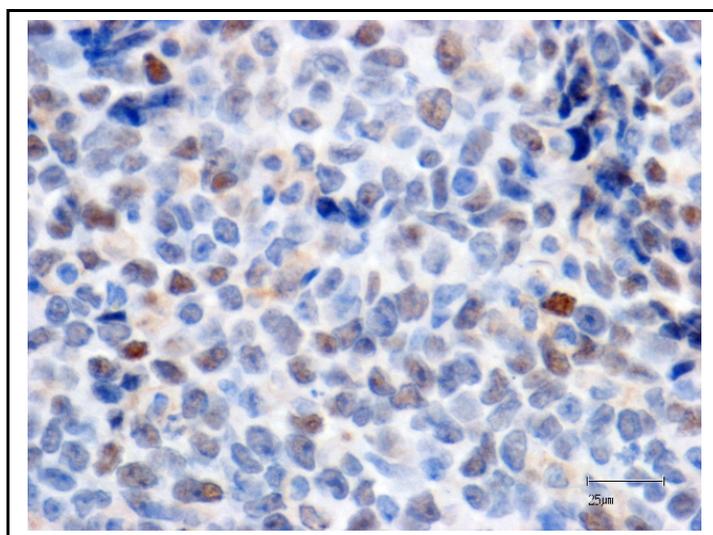


Figura 15 – Tumor de GII. Marcação por imuno-histoquímica dos RE

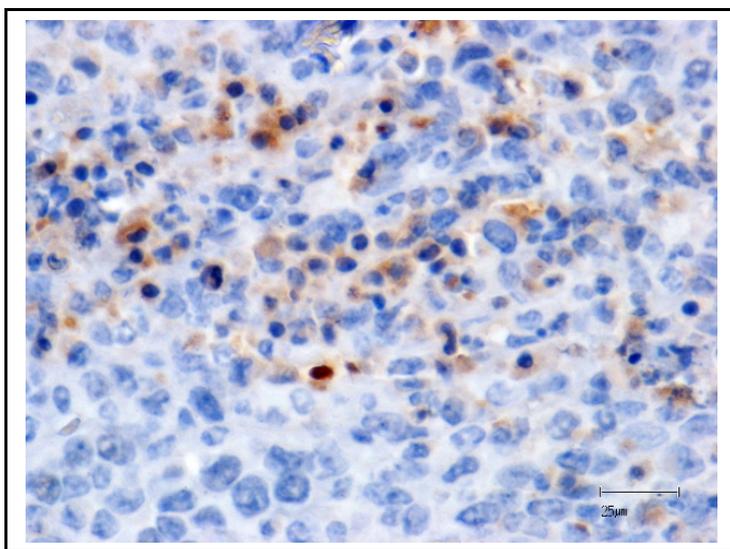


Figura 16 – Tumor de GIII. Marcação por imuno-histoquímica dos RE

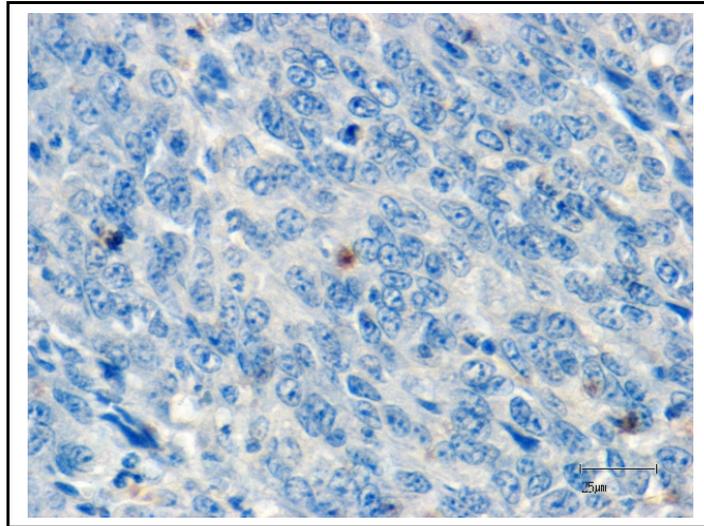


Figura 17 – Tumor de GI. Marcação por imuno-histoquímica da Caspase 3

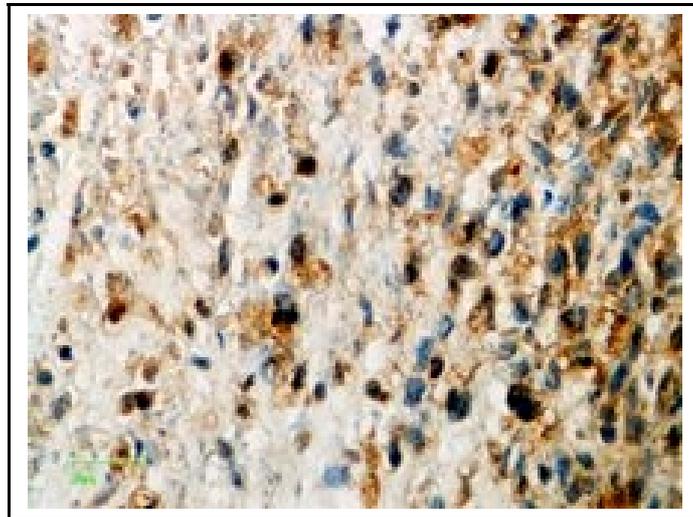


Figura 18 – Tumor de GI. Marcação por imuno-histoquímica do Bcl2

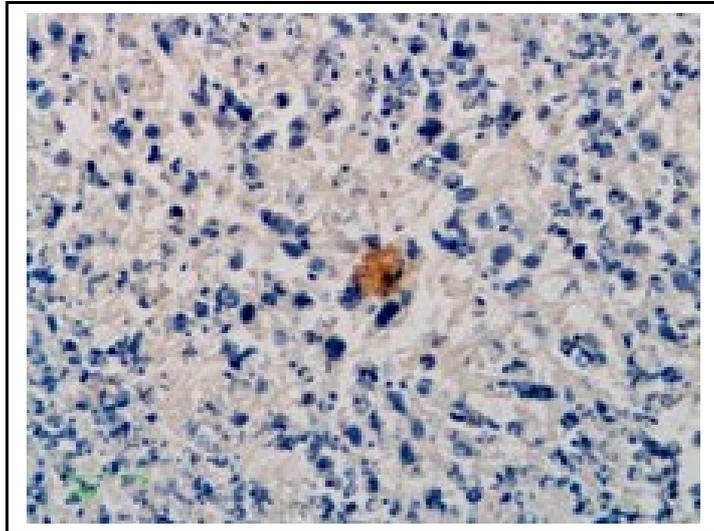


Figura 19 – Tumor de GII. Marcação por imuno-histoquímica da Caspase 3

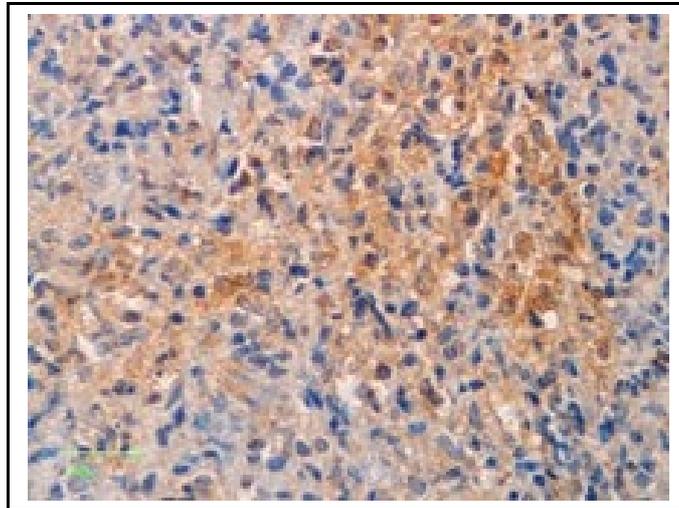


Figura 20 – Tumor do GII. Marcação por imuno-histoquímica do Bcl2

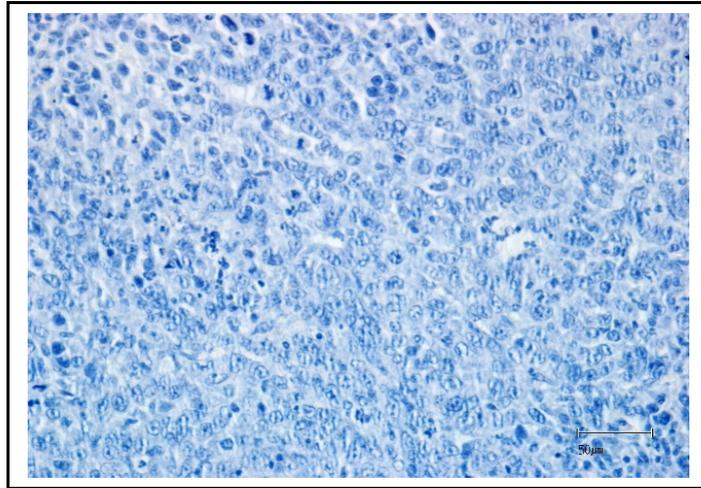


Figura 21 – Tumor de GIII. Marcação por imuno-histoquímica da Caspase 3

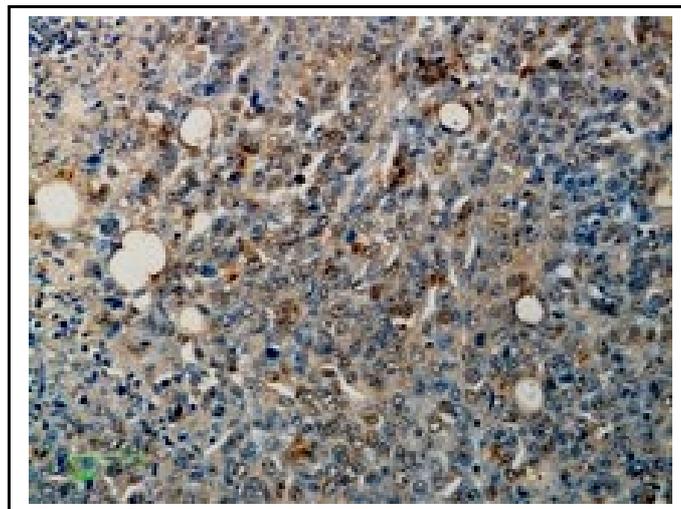


Figura 22 – Tumor de GIII. Marcação por imuno-histoquímica do Bcl2

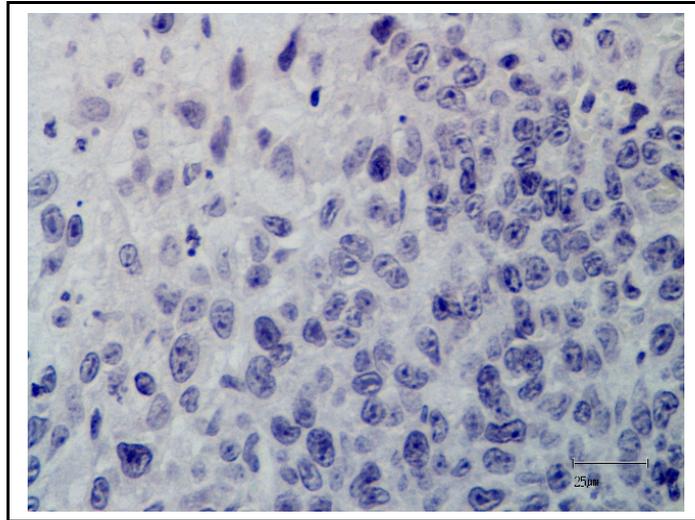


Figura 23 –Marcação por imuno-histoquímica do Bax. Tumor de GI.

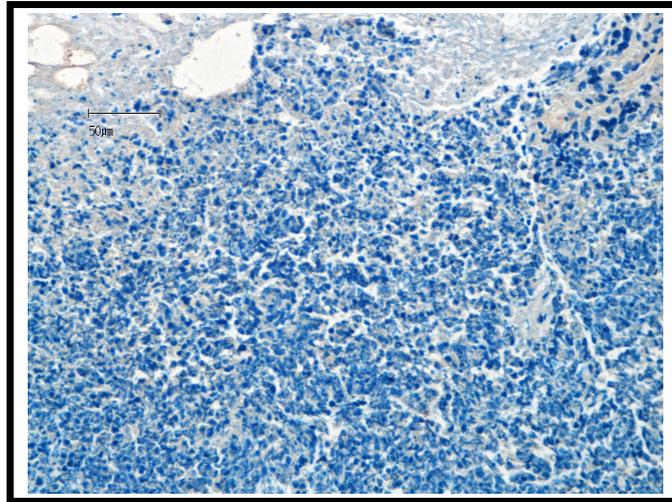


Figura 24 – Tumor de GI. Marcação por imuno-histoquímica do PCNA

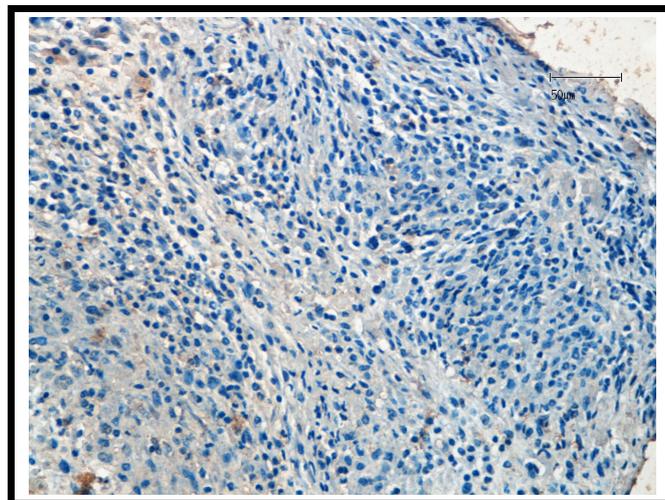


Figura 25 – Tumor de GII. Marcação por imuno-histoquímica do PCNA

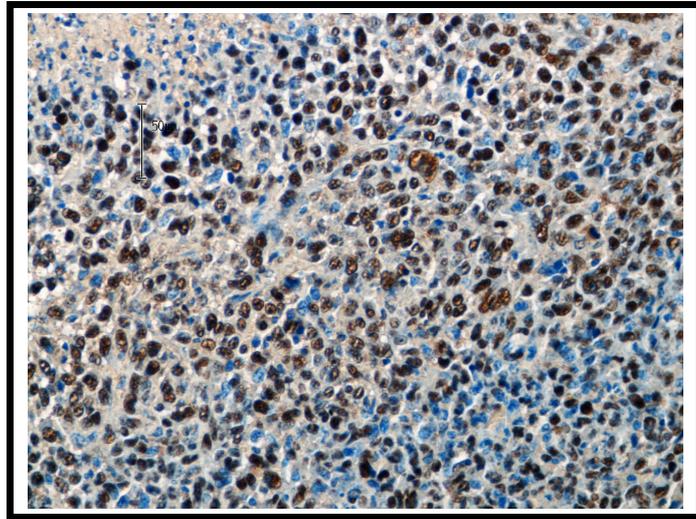


Figura 26 – Tumor de GIII. Marcação por imuno-histoquímica do PCNA

DISCUSSÃO

8 Discussão

Os efeitos polimórficos das estatinas, inibidoras da HMG-CoA redutase, a nível da carcinogénese, actuando na proliferação e sobrevivência celulares, angiogénese e migração celular, foram evidenciados, como referido anteriormente, em vários estudos *in vitro* e *in vivo*.⁸⁵⁻⁸⁷

Estas acções anti-neoplásicas atribuíveis às estatinas resultariam da inibição da síntese de colesterol, que constitui um elemento preponderante na estrutura e função da membrana plasmática e nalgumas vias importantes de sinalização, assim como, da inibição da síntese de intermediários isoprenoides da via do mevalonato, que participam na modificação pós-transdução de um conjunto de importantes proteínas intracelulares⁹⁰.

No entanto, existem divergências nos vários dados epidemiológicos publicados, não sendo possível obter uma conclusão clara sobre o verdadeiro potencial anti-neoplásico das estatinas, nomeadamente em relação ao cancro da mama⁷⁹⁻⁸⁴.

Novos estudos, tanto epidemiológicos, como experimentais serão necessários para confirmar e tentar estabelecer uma explicação científica para estas considerações sobre esses potenciais mecanismos anti-cancerígenos das estatinas, nomeadamente no cancro da mama.

Tendo em conta estas considerações, elaborámos um estudo experimental com o objectivo de avaliar o efeito quimiopreventivo e anti-metastático da sinvastatina no contexto de cancro da mama de mau prognóstico.

Para esse efeito, usámos um modelo experimental tipo aloenxerto com injeção directa de células tumorais mamárias de murganho, 4T1, cujas características de crescimento, invasão e metastização

se assemelham às propriedades das células tumorais da glândula mamária humana no estágio IV.

Foram definidos quatro grupos, grupo I e II com inoculação de células 4T1 e tratados com sinvastatina em doses de 25mg/Kg e 50mg/Kg, respectivamente, grupo III com inoculação de células 4T1 e tratados com soro fisiológico e grupo IV sem inoculação celular nem tratamento.

Avaliando a resposta clínica dos diferentes grupos, evidenciou-se uma menor incidência de tumores em GII com 77,8% enquanto que GI e GIII apresentavam 100% de incidência; uma maior taxa de metastização foi demonstrada em GIII com 44,4% (GI e GII apresentavam 20% e 22,2%, respectivamente) embora a diferença não apresentasse significado estatístico, quer na incidência dos tumores ($p = 0,21$), quer na taxa de metastização ($p = 0,35$ e $p = 0,62$), provavelmente devido ao tamanho reduzido da amostra. O volume médio dos tumores (VMT) apresentou-se claramente superior em GIII em relação a GI e GII, tratados com sinvastatina com uma diferença estatisticamente significativa entre o GI e GIII. Estes dados estão a favor de uma acção anti-neoplásica e anti-metastática da sinvastatina neste modelo experimental.

Na avaliação dos tumores por técnicas de imuno-histoquímica, foram utilizados um marcador para os RE, um marcador de proliferação, o PCNA, e marcadores de apoptose, o Bax, a Caspase 3 e o Bcl2.

A marcação para receptores RE foi de fraca intensidade nos três grupos avaliados. As células 4T1 utilizadas neste estudo não secretam RE, explicando essa fraca marcação; no entanto, alguns estudos ^{134,135} demonstraram a acção anti-neoplásica da sinvastatina quer em células com RE positivos, quer em células com RE negativos. Num estudo recente de Song *et al* ¹³⁶, a sinvastatina evidenciou a capacidade de induzir a secreção de RE em células estaminais da medula óssea, podendo-se colocar a hipótese duma

possível estimulação da secreção de RE nas células 4T1 por parte da sinvastatina, o que apontaria para uma possível associação benéfica entre sinvastatina e hormonoterapia nos casos de cancro da mama inicialmente hormono-resistentes. No nosso estudo, apesar da marcação ser fraca, inferior a 12%, a marcação foi mais intensa no GII, grupo tratado com 50mg/Kg de sinvastatina, seguido do GI, grupo tratado com 25mg/Kg de sinvastatina, com diferenças estatisticamente significativas entre GII e GIII ($p < 0,005$) e, igualmente, entre o GI e GIII ($p = 0,004$). No entanto, apesar destes resultados se correlacionarem com a hipotética capacidade da sinvastatina em induzir a secreção de RE, seria imprudente tirar ilações destes resultados pelo tamanho reduzido da amostra; serão necessários mais estudos, com amostras mais alargadas e desenhados com o objectivo primário de avaliar esta hipótese, utilizando preferencialmente, linhagens celulares humanas de cancros da mama hormono-resistentes e hormono-sensíveis.

Os tumores de GIII, grupo sem tratamento com sinvastatina, apresentaram a maior taxa de marcação com PCNA, com diferenças estatisticamente significativas quando comparamos GIII com GI ($p < 0,005$) e GII ($p < 0,005$), evidenciando, desta forma, que a proliferação é superior neste grupo, onde os tumores são igualmente mais volumosos. Não existem diferenças de marcação com significado estatístico entre GI e GII. O PCNA, uma sub-unidade da polimerase de ADN, tem um papel central na síntese de ADN sendo um biomarcador da proliferação celular. Os dados encontrados no nosso estudo, são concordantes com a hipótese da sinvastatina ter uma acção anti-proliferativa nas células neoplásicas.

No que diz respeito à marcação para Caspase 3, um marcador pró-apoptose, a marcação foi significativamente mais intensa em GI e GII, quando comparados com GIII ($p < 0,005$). Esta diferença com significado estatístico mantém-se aquando da

comparação entre GI e GII ($p=0,005$); GII apresenta maior marcação que GI, evidenciando, desta forma, uma maior capacidade de apoptose nos grupos tratados com sinvastatina, com um efeito proporcional à dose administrada de sinvastatina, ou seja, quanto maior a dose de sinvastatina, maior a taxa de apoptose. Estes dados são concordantes com a hipótese da sinvastatina ter uma acção pró-apoptótica nas células neoplásicas.

No entanto, serão necessários mais estudos para validar estes dados, tendo em conta a muito fraca intensidade de marcação para a proteína Bax, outro marcador pró-apoptose (inferior a 2%), razão pela qual os resultados imuno-histoquímicos para Bax não foram considerados no nosso estudo.

Em relação à marcação para o Bcl2, um marcador anti-apoptose, a marcação foi equilibrada, não se verificando diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos. Os mecanismos anti-neoplásicos da sinvastatina poderão não envolver a via do Bcl2, apesar de estudos anteriores terem demonstrado uma diminuição da expressão do Bcl2 nalgumas células neoplásicas tratadas com sinvastatina¹³⁷⁻¹³⁸, nomeadamente no cancro da mama¹³⁹. No entanto, o nosso estudo foi inconclusivo em relação ao marcador Bcl2.

A apoptose consiste num processo da máxima importância na eliminação do nosso organismo de células hiperproliferativas e pre-neoplásicas. Assim, a indução da apoptose nas células tumorais pode ser considerado como um mecanismo protector contra o desenvolvimento e progressão da doença neoplásica. Este mecanismo é modulado por agentes anti-apoptóticos e pró-apoptóticos, envolvendo uma grande variedade de proteínas. Por conseguinte, para obter um melhor conhecimento desses mecanismos controladores da apoptose, fomos avaliar o efeito da sinvastatina em proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas da família Bcl2. As proteínas desta família têm um papel importante na

indução da apoptose e são consideradas alvos terapêuticos no cancro ¹⁴⁰⁻¹⁴¹. O Bcl2, uma oncoproteína, funcionando como um supressor da apoptose; com efeito, a sua inibição leva a regressão tumoral ¹⁴²⁻¹⁴³. Por outro lado, o Bax, uma proteína pró-apoptótica, apresenta-se activado, predominando em relação ao Bcl2, promovendo a apoptose ¹⁴⁴⁻¹⁴⁵. Alguns estudos evidenciaram que a relação Bax/Bcl2 aumenta no processo de apoptose ¹⁴³. No entanto, a muito fraca intensidade de marcação para Bax do nosso estudo (inferior a 2%) e a incapacidade de tirar conclusões em relação a expressão do Bcl2, não nos permite corroborar estes dados impondo a necessidade de mais estudos.

As mitocôndrias são participantes proeminentes no processo de apoptose e a proteína pró-apoptótica, Bax, tem um papel importante na indução da disfunção mitocondrial ¹⁴⁶. Esta proteína vai estimular a permeabilização da membrana externa da mitocôndria, com consequente libertação citoplasmática do citocromo c que, por sua vez, vai activar o processo de proteólise das caspases, nomeadamente da Caspase 3, produzindo as alterações morfológicas e bioquímicas da apoptose ¹⁴⁶. O nosso estudo evidenciou um aumento da expressão da Caspase 3 com o tratamento com sinvastatina, apontando para uma provável activação da apoptose através da disfunção da via mitocondrial. No entanto, são necessários mais estudos, nomeadamente *in vitro*, com avaliação da expressão do citocromo c e proteínas do citoesqueleto celular.

Os resultados obtidos através deste modelo experimental são concordantes com a existência de uma acção anti-proliferativa e pró-apoptótica da sinvastatina em células tumorais de cancro da mama. No entanto, por se tratar de um modelo experimental com aloenxerto, este apresenta uma limitação inerente à utilização de células tumorais mamárias de murganho, não sendo possível transpôr directamente estes resultados para o ser humano. No

entanto, como referido anteriormente, as células 4T1 apresentam características semelhantes às das células tumorais mamárias humanas no estágio IV, fornecendo ótimas condições para o estudo da carcinogénese. Permanece, no entanto, a necessidade de estudos posteriores em modelos experimentais com xenoinxerto, utilizando células tumorais mamárias humanas.

Este estudo permitiu corroborar a hipótese de um potencial efeito anti-neoplásico da sinvastatina em células tumorais mamárias através da activação de agentes pró-apoptose, a Caspase 3, e inibição de agentes envolvidos na proliferação celular, o PCNA. É igualmente interessante notar que este estudo apontou para uma possível capacidade da sinvastatina em induzir a secreção de RE; no entanto, são necessários mais estudos, quer *in vivo* com amostras mais alargadas, quer *in vitro*, para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos a nível celular.

CONCLUSÕES

9 Conclusões

Este estudo experimental realizado num modelo *in vivo* permite concluir que a sinvastatina parece apresentar um efeito quimiopreventivo e terapêutico numa situação de cancro da mama de mau prognóstico. Através dos resultados dos estudos de imunohistoquímica, verificamos que este efeito anti-neoplásico envolve a activação de processos pró-apoptóticos e a inibição da proliferação celular.

Apesar de serem necessários mais estudos tanto epidemiológicos como experimentais, nomeadamente com modelos com xenoenxerto utilizando células tumorais mamárias humanas, podemos considerar as estatinas como uma promissora opção terapêutica no cancro, nomeadamente no cancro da mama e, possivelmente, no cancro da mama hormono-resistente.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

10 Considerações finais

Os estudos recentes mostram-nos que as estatinas apresentam efeitos polimórficos importantes em várias etapas da carcinogénese como proliferação e sobrevivência celular, angiogénese e migração celular. Os nossos resultados parecem evidenciar que a sinvastatina, uma estatina lipofílica, tem o potencial necessário para inibir a proliferação celular e activar os processos de apoptose, num contexto de carcinoma da mama de mau prognóstico.

Algumas suposições, em relação aos mecanismos de acção da sinvastatina, podem ser tiradas dos nossos resultados como uma provável activação da apoptose através da disfunção da via mitocondrial e uma possível capacidade da sinvastatina em induzir a secreção de RE em células inicialmente hormono-resistentes. Estes dados permitem abrir novos caminhos no desafio do tratamento do cancro da mama. No entanto, como referido anteriormente, são necessários mais estudos, quer *in vitro* com melhor avaliação dos mecanismos celulares envolvidos, quer *in vivo* com amostras mais alargadas e com modelos com xenoinxertos utilizando células humanas de cancro da mama. Com efeito, a evidência de vias inibitórias do crescimento dos tumores, como no caso da sinvastatina, leva-nos a empenhar todos os esforços no sentido de caracterizar estas vias reguladoras, com o objectivo de obter novas armas terapêuticas eficazes no tratamento do cancro.

A área da oncologia, nomeadamente o cancro da mama, apresenta ainda, infelizmente, uma vastidão de conhecimentos por adquirir; são exemplos de territórios por desvendar, as vias de regulação e da angiogénese, os mecanismos hormonais, as influências ambientais e genéticas na carcinogénese, os resultados epidemiológicos inexplicáveis, bem como o mecanismo do processo de metastização.

Vários esforços têm sido desenvolvidos para estudar os mecanismos etiológicos e fisiopatológicos do cancro, tendo sempre em vista o diagnóstico precoce e o tratamento. Porém, actualmente há um grande interesse em relação à quimioprevenção e prevenção primária com consequente melhor prognóstico para as mulheres em alto risco para cancro da mama. As estatinas representam uma real possibilidade de nova arma terapêutica no cancro da mama quer como quimioprevenção quer como tratamento, nomeadamente por mecanismos anti-metastáticos.

BIBLIOGRAFIA

11 Bibliografia

- 1 - Webb JH. Cancer, its nature and treatment. Lancet 1901: 976.
- 2 - White C. The occurrence of crystals in tumours. J Pathol Bacteriol 1909 ; 13 : 3-10.
- 3 - Bischoff F. Carcinogenesis through cholesterol and derivatives. Prog Exp Tumor Res 1963; 3: 412-44.
- 4 - Chen HW, Kandutsch AA, Heiniger HJ. The role of cholesterol in malignancy. Prog Exp Tumor Res 1978; 22: 275-316.
- 5 - Byers T, Nestle M, McTiernan A, et al. American Cancer Society guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: Reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. CA Cancer J Clin 2002; 52 (2): 92-119.
- 6 - Kritchevsky SB, Kritchevsky D. Serum cholesterol and cancer risk: an epidemiologic perspective. Ann Rev Nutr 1992; 12: 391-416.
- 7- Bravi F, Scotti L, Bosetti C, et al. Self-reported history of hypercholesterolaemia and gallstones and the risk of prostate cancer. Ann Oncol 2006; 17(6): 1014-7.
- 8 - Olson RE. Discovery of the Lipoproteins, Their Role in Fat Transport and Their Significance as Risk Factors. J Nutr 1998 ; 128: 439-43.
- 9 - Simons K, Ikonen E. How cells handle cholesterol. Science 2000; 290(5497): 1721-6.
- 10- Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS. Protein sensors for membrane sterols. Cell 2006;124(1): 35-46.
- 11- Horton JD, Shah NA, Warrington JA, et al. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100(21): 12027-32.
- 12 - Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. Cell 1997; 89 (3): 331-40.
- 13 - Goldstein JL, Rawson RB, Brown MS. Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein

pathway for feedback regulation of lipid synthesis. Arch Biochem Biophys 2002; 397(2): 139-48.

14 - www.nobelprize.org. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1985

15 - Downward J. Mechanism and consequences of activation of protein kinase B/Akt. Curr Opin Cell Biol 1998; 10: 262-67;

16- Altomare DA, Testa JR. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. Oncogene 2005; 24 (50): 7455-64.

17-Semba S, Itohi N, Ito M., et al. Down regulation of PIK3CG, a Catalytic Subunit of phosphatidylinositol 3-OH Kinase, by CpG Hypermethylation in Human Colorectal Carcinoma. Clin Canc Res 2000; 8: 3824-31.

18- Demoulin JB, Ericsson J, Kallin A, et al. Platelet-derived growth factor stimulates membrane lipid synthesis through activation of phosphatidylinositol 3-kinase and sterol regulatory element-binding proteins. J Biol Chem 2004; 279 (34): 35392-402.

19 - Zhou RH, Yao M, Lee TS, et al. Vascular endothelial growth factor activation of sterol regulatory element binding protein: a potential role in angiogenesis. Circ Res 2004; 95 (5): 471-8.

20- Hegarty BD, Bobard A, Hainault I et al. Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory element-binding protein-1c. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102: 791-6

21- Porstmann T, Griffiths B, Chung YL, et al. PKB/Akt induces transcription of enzymes involved in cholesterol and fatty acid biosynthesis via activation of SREBP. Oncogene 2005; 24 (43): 6465-81.

22- Du X, Kristiana I, Wong J, et al. Involvement of Akt in ER-to-Golgi transport of SCAP/SREBP: a link between a key cell proliferative pathway and membrane synthesis. Mol Biol Cell 2006; 17 (6): 2735-45.

23- Heemers HV, Verhoeven G, Swinnen JV. Androgen activation of the sterol regulatory element-binding protein pathway: Current insights. Mol Endocrinol 2006; 20 (10): 2265-77.

24- Yang T, Espenshade PJ, Wright ME, et al. Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. Cell 2002; 110 (4): 489-500.

- 25- Heemers H, Verrijdt G, Organe S, et al. Identification of an androgen response element in intron 8 of the sterol regulatory element-binding protein cleavage-activating protein gene allowing direct regulation by the androgen receptor. *J Biol Chem* 2004; 279 (29): 30880-7.
- 26 - Herr I, Pfizenmaier J. Glucocorticoid use in prostate cancer and other solid tumours: implications for effectiveness of cytotoxic treatment and metastases. *Lancet Oncol* 2006; 7 (5): 425-30.
- 27- www.nobelprize.org. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1995 - Nobel Prize for discovery of the genetic control of early embryonic development
- 28 - Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* 2001; 15 (23): 3059-87.
- 29 - Xie J, Murone M, Luoh SM, et al. Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature* 1998; 391 (6662): 90-2.
- 30 - Chen JK, Taipale J, Young KE, et al. Small molecule modulation of Smoothed activity. *PNAS* 2002; 99 (22): 14071-6.
- 31- Osterlund T, Kogerman P. Hedgehog signalling: how to get from Smo to Ci and Gli. *Trends Cell Biol* 2006; 16 (4): 176-80.
- 32- Pasca di Magliano M, Hebrok M. Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 903-11.
- 33- Kuwabara PE, Labouesse M. The sterol-sensing domain: multiple families, a unique role? *Trends Genet* 2002; 18 (4): 193-201.
- 34- Cooper MK, Wassif CA, Krakowiak PA, et al. A defective response to Hedgehog signaling in disorders of cholesterol biosynthesis. *Nat Genet* 2003; 33 (4): 508-13.
- 35-Chen JK, Taipale J, Cooper MK et al. Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothed. *Genes Dev* 2002; 16: 2743 -8.
- 36- Koide T, Hayata T, Cho KW. Negative regulation of Hedgehog signaling by the cholesterologenic enzyme 7-dehydrocholesterol reductase. *Development* 2006; 133 (12): 2395-405.
- 37- Kelleher FC, Fennelly D, Rafferty M. Common critical pathways in embryogenesis and cancer. *Acta Oncol* 2006; 45 (4): 375-88.

- 38- Briscoe J, Therond P. Hedgehog signaling: from the *Drosophila* cuticle to anti-cancer drugs. *Dev Cell* 2005; 8: 143–51.
- 39- Wicking C, McGlenn E. The role of Hedgehog signalling in tumorigenesis. *Cancer Lett* 2001 Nov 8; 173 (1): 1-7.
- 40- Riobó NA, Lu K, Ai X, et al. Phosphoinositide 3-kinase and Akt are essential for Sonic Hedgehog signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103 (12): 4505-10.
- 41- Brown AJ. Cholesterol, statins and cancer. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34 (3): 135-41.
- 42 - Bijlsma MF, Spek CA, Zivkovic D, et al. Repression of smoothened by patched-dependent (pro-)vitamin D3 secretion. *PLoS Biol* 2006; 4 (8): e232.
- 43- Holick MF. Vitamin D: its role in cancer prevention and treatment. *Prog Biophys Mol Biol* 2006; 92 (1): 49-59.
- 44- Adolphe C, Hetherington R, Ellis T, et al. Patched1 functions as a gatekeeper by promoting cell cycle progression. *Cancer Res* 2006; 66 (4): 2081-8.
- 45- Fernández C, Martín M, Gómez-Coronado D, et al. Effects of distal cholesterol biosynthesis inhibitors on cell proliferation and cell cycle progression. *J Lipid Res* 2005; 46 (5): 920-9.
- 46- Suárez Y, Fernández C, Ledo B, et al. Sterol stringency of proliferation and cell cycle progression in human cells. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1734 (2): 203-13.
- 47- Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 1972; 175 (23): 720-31.
- 48- Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997; 387 (6633): 569-72.
- 49- Murata M, Peränen J, Schreiner R, et al. VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92 (22): 10339-43.
- 50- Williams TM, Lisanti MP. Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288 (3): 494-506.

- 51- Sotgia F, Rui H, Bonuccelli G, et al. Caveolin-1, mammary stem cells, and estrogen-dependent breast cancers. *Cancer Res* 2006; 66 (22): 10647-51.
- 52- Zhuang L, Kim J, Adam RM, et al. Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts. *J Clin Invest* 2005; 115 (4): 959-68.
- 53- Oh HY, Lee EJ, Yoon S, et al. Cholesterol level of lipid raft microdomains regulates apoptotic cell death in prostate cancer cells through EGFR-mediated Akt and ERK signal transduction. *Prostate* 2007; 67 (10): 1061-9.
- 54- Storch CH, Eehalt R, Haefeli WE, et al. Localization of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in lipid rafts/caveolae and modulation of its activity by cholesterol in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 323 (1): 257-64.
- 55- Liu Y, Sun R, Wan W, et al. The involvement of lipid rafts in epidermal growth factor-induced chemotaxis of breast cancer cells. *Mol Membr Biol* 2007; 24 (2): 91-101.
- 56- Palmer CP, Mahen R, Schnell E, et al. Sigma-1 receptors bind cholesterol and remodel lipid rafts in breast cancer cell lines. *Cancer Res* 2007; 67 (23): 11166-75.
- 57- Freeman MR, Cinar B, Lu ML. Membrane rafts as potential sites of nongenomic hormonal signaling in prostate cancer. *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16 (6): 273-9.
- 58- Hager MH, Solomon KR, Freeman MR. The role of cholesterol in prostate cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006; 9 (4): 379-85.
- 59- Chinnaiyan P, Harari PM. Clinical advancement of EGFR inhibitors in cancer therapy. *Meth Mol Biol* 2006; 327: 189-202.
- 60- Karpen HE, Bukowski JT, Hughes T, et al. The sonic hedgehog receptor patched associates with caveolin-1 in cholesterol-rich microdomains of the plasma membrane. *J Biol Chem* 2001; 276 (22): 19503-11.
- 61- Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990; 343 (6257): 425-30.
- 62- Boudreau DM, Gardner JS, Malone KE, et al. The association between 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A inhibitor use and breast carcinoma risk among postmenopausal women: a case-control study. *Cancer* 2004; 100 (11): 2308-16.

- 63- Armitage J. The safety of statins in clinical practice. *Lancet* 2007; 370: 1781-90
- 64- Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* 2001; 292 (5519): 1160-4.
- 65- Jain MK, Ridker PM. Anti-inflammatory effects of statins: clinical evidence and basic mechanisms. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4 (12): 977-87.
- 66- Abramson J, Wright J. Are lipid-lowering guidelines evidence-based? *Lancet* 2007; 369 (9557): 168-9.
- 67- Law MR, Wald NJ, Rudnicka AR. Quantifying effect of statins on low density lipoprotein cholesterol, ischaemic heart disease, and stroke: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2003; 326 (7404): 1423.
- 68- Wilson P, D'Agostino R, Levy D, et al. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1998; 97 (18): 1837-47.
- 69- Nissen S, Nicholls S, Sipahi I, et al. Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial. *JAMA* 2006; 295 (13): 1556-65.
- 70- Ito MK, Talbert RL, Tsimikas S. Statin-associated pleiotropy: possible beneficial effects beyond cholesterol reduction. *Pharmacotherapy* 2006; 26 (7): 85-97.
- 71- Forrester JS, Libby P. The inflammation hypothesis and its potential relevance to statin therapy. *Am J Cardiol* 2007; 99 (5): 732-8.
- 72- Schoenhagen P, Tuzcu EM, Apperson-Hansen C, et al. Determinants of arterial wall remodeling during lipid-lowering therapy: serial intravascular ultrasound observations from the Reversal of Atherosclerosis with Aggressive Lipid Lowering Therapy (REVERSAL) trial. *Circulation* 2006; 113 (24): 2826-34.
- 73- Thavandiranathan P, Bagai A, Brookhart MA, et al. Primary prevention of cardiovascular diseases with statin therapy: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med* 2006; 166 (21): 2307-13.
- 74- Lipinski MJ, Abbate A, Fuster V, et al. Drug insight: statins for nonischemic heart failure--evidence and potential mechanisms. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007; 4 (4): 196-205.

- 75- Chopra V, Choksi PU, Cavusoglu E. Beyond lipid lowering: the anti-hypertensive role of statins. *Cardiovasc Drugs Ther* 2007; 21 (3): 161-9.
- 76- Jick H, Zornberg GL, Jick SS et al. Statins and the risk of dementia. *Lancet* 2000; 356 (9242): 1627-31.
- 77- Puccetti L, Pasqui AL, Auteri A et al. Mechanisms for antiplatelet action of statins. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2005; 5 (2): 121-6.
- 78- Campese VM, Park J. HMG-CoA reductase inhibitors and renal function. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007; 2 (6): 1100-3.
- 79- Kozar K, Kaminski R, Legat M et al. Cerivastatin demonstrates enhanced antitumor activity against human breast cancer cell lines when used in combination with doxorubicin or cisplatin. *Int J Oncol* 2004; 24 (5): 1149-57.
- 80- Shibata MA, Kavanaugh C, Shibata E et al. Comparative effects of lovastatin on mammary and prostate oncogenesis in transgenic mouse models. *Carcinogenesis* 2003; 24 (3): 453-9.
- 81- Mück AO, Seeger H, Wallwiener D. Inhibitory effects of statins on the proliferation of human breast cancer cells. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2004; 42 (12): 695-700.
- 82- Koyuturk M, Ersoz M, Altioek N. Simvastatin induces apoptosis in human breast cancer cells: p53 and estrogen receptor independent pathway requiring signalling through JNK. *Cancer Lett* 2007; 250 (2): 220-8.
- 83- Shibata MA, Ito Y, Morimoto J et al. Lovastatin inhibits tumor growth and lung metastasis in mouse mammary carcinoma model: a p53-independent mitochondrial-mediated apoptotic mechanism. *Carcinogenesis* 2004; 25 (10): 1887-98.
- 84- Denoyelle C, Vasse M, Körner M et al. Cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, inhibits the signalling pathways involved in the invasiveness and metastatic properties of highly invasive breast cancer cell lines: an in-vitro study. *Carcinogenesis* 2001; 22 (8): 1139-48.
- 85- Wong WW, Dimitroulakos J, Minden MD et al. HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. *Leukemia* 2002; 16 (4): 508-19.
- 86- Bocan TM. Pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Curr Opin Investig Drugs* 2002; 3 (9): 1312-7.

- 87- Davidson MH. Clinical significance of statin pleiotropic effects: hypotheses versus evidence. *Circulation* 2005; 111 (18): 2280-1.
- 88- Waldman A, Kritharides L. The pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors: their role in osteoporosis and dementia. *Drugs* 2003; 63 (2): 139-52.
- 89- Schmidt RA. Evidence for post-translational incorporation of a product of mevalonic acid into Swiss 3T3 cell proteins. *J Biol Chem* 1984; 259: 10175-80.
- 90- Edwards PA, Ericsson J. Sterols and isoprenoids: signalling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Ann Rev Biochem* 1999; 68: 157-85.
- 91- Moorman PG, Hamilton RJ. Statins and cancer risk: what do we know and where do we go from here? *Epidemiology* 2007; 18 (2): 194-6.
- 92- Dale KM, Coleman CI, Henyan NN, et al. Statins and cancer risk: a meta-analysis. *JAMA* 2006; 295 (1): 74-80.
- 93- Bonovas S, Filioussi K, Tsavaris N, et al. Statins and cancer risk: a literature-based meta-analysis and meta-regression analysis of 35 randomized controlled trials. *J Clin Oncol* 2006; 24 (30): 4808-17.
- 94- Bjerre LM, LeLorier J. Do statins cause cancer? A meta-analysis of large randomized clinical trials. *Am J Med* 2001; 110 (9): 716-23.
- 95- Bonovas S, Filioussi K, Tsavaris N, et al. Use of statins and breast cancer: a meta-analysis of seven randomized clinical trials and nine observational studies. *J Clin Oncol* 2005; 23 (34): 8606-12.
- 96- Dellavalle RP, Drake A, Graber M, et al. Statins and fibrates for preventing melanoma. *Cochrane Database Syst Ver* 2005; (4): CD003697.
- 97- Friis S, Olsen JH. Statin use and cancer risk: an epidemiologic review. *Cancer Invest* 2006; 24 (4): 413-24.
- 98- Blais L, Desgagné A, LeLorier J. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors and the risk of cancer: a nested case-control study. *Arch Int Med* 2000; 160 (15): 2363-8.
- 99- Graaf MR, Beiderbeck AB, Egberts AC, et al. The risk of cancer in users of statins. *J Clin Oncol* 2004; 22 (12): 2388-94.

- 100- Friis S, Poulsen AH, Johnsen SP, et al. Cancer risk among statin users: a population-based cohort study. *Int J Cancer* 2005; 114 (4): 643-7.
- 101- Fortuny J, de Sanjosé S, Becker N, et al. Statin use and risk of lymphoid neoplasms: results from the European Case-Control Study EPILYMPH. *Cancer Epidemiol Biom Prev* 2006; 15 (5): 921-5.
- 102- Poynter JN, Gruber SB, Higgins PD et al. Statins and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005; 352 (21): 2184-92.
- 103- Shannon J, Tewoderos S, Garzotto M, et al. Statins and prostate cancer risk: a case-control study. *Am J Epidemiol* 2005; 162 (4): 318-25.
- 104- Kochhar R, Khurana V, Bejjanki. Statins to reduce breast cancer risk: a case-control study in US female veterans. *J Clin Oncol* 2005; 23: 514-5.
- 105- Murtola TJ, Tammela TL, Lahtela J, et al. Cholesterol-lowering drugs and prostate cancer risk: a population-based case-control study. *Cancer Epidemiol Biom Prev* 2007; 16 (11): 2226-32.
- 106- Coogan PF, Rosenberg L, Palmer JR, et al. Statin use and the risk of breast and prostate cancer. *Epidemiology* 2002; 13 (3): 262-7.
- 107- Iwata H, Matsuo K, Hara S, et al. Use of hydroxy-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors is associated with risk of lymphoid malignancies. *Cancer Sci* 2006; 97 (2): 133-8.
- 108- Kaye JA, Jick H. Statin use and cancer risk in the General Practice Research Database. *Br J Câncer* 2004; 90 (3): 635-7.
- 109- Taylor ML, Wells BJ, Smolak MJ. Statins and cancer: a meta-analysis of case-control studies. *Eur J Cancer Prev* 2008; 17 (3): 259-68.
- 110- Douglas Campos-Outcalt, MD. 20 Problemas Frequentes em Cuidados de Saúde Preventivos. Lisboa: McGraw-Hill de Portugal 2002; 275-304.
- 111- European Cancer Incidence and Mortality by Country. GLOBOCAN 2002 Estimates (IARC). www-dep.iarc.fr/globocan/database.htm
- 112- Tabar L, Duffy SW, Krusemo UB. Detection method, tumour size and node metastases in breast cancers diagnosed during a trial of breast cancer screening. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1987, 23: 959-62.

- 113- Bassett LW, Liu TH, Giuliano AE et al. The prevalence of carcinoma in palpable vs impalpable mammographically detected lesions. *AJR Am J Roent* 1991, 157: 21-4.
- 114- Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumour size, lymph node status, and survival in 24740 breast cancer cases. *Cancer* 1989, 63: 181-7.
- 115- Tabar L, Fagerberg G, Day N et al. Breast cancer treatment and natural history: new insights from results of screening. *Lancet* 1992, 339: 412-4.
- 116- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Favourable and unfavourable effects on long-term survival of radiotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2000; 355 (9217):1757-70.
- 117- Clarke M, Collins R, Darby S et al. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; 366 (9503): 2087-106.
- 118- Mauriac L, Luporsi E, Cutuli B et al. Standards, options and recommendations for the management of patients with infiltrating non metastatic breast cancer. *Gynecol Obstet Fertil* 2003; 31 (3): 284-315.
- 119- Abrial C, Van Praagh I, Delva R et al. Pathological and clinical response of a primary chemotherapy regimen combining vinorelbine, epirubicin, and paclitaxel as neoadjuvant treatment in patients with operable breast cancer. *Oncologist* 2005; 10 (4): 242-9.
- 120- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; 365 (9472): 1687-717.
- 121- Ryan PD, Goss PE. Adjuvant hormonal therapy in peri- and postmenopausal breast cancer. *Oncologist* 2006; 11 (7): 718-31.
- 122- Smith I, Procter M, Gelber RD et al. 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* 2007; 369 (9555): 29-36.
- 123- Dias MF, Sousa E, Cabrita S et al. Chemoprevention of DMBA-Induced Mammary Tumors in Rats by a Combined Regimen of Alpha-Tocopherol, Selenium, and Ascorbic Acid. *Breast J* 2000; 6: 14-9.

- 124- Cuzick J. IBIS II: a breast cancer prevention trial in postmenopausal women using the aromatase inhibitor anastrozole. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008; 8 (9): 1377-85.
- 125- Russo J, Gusterson BA, Rogers AE, et al. Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab Invest* 1990; 62: 244-278.
- 126- Gullino PM, Pettigrew HM, Grantham FH. N-nitrosomethylurea as mammary gland carcinogen in rats. *J Natl Cancer Inst* 1975; 54: 401-14.
- 127- Fisher ER, Shoemaker RH, Sabnis A. Relationship of hyperplasia to cancer in 3-methylcholanthrene-induced mammary tumorigenesis. *Lab Invest* 1975; 33: 33-42.
- 128- Haslam SZ, Bern HA. Histopathogenesis of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced rat mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 4020-4.
- 129- Middleton PJ. The histogenesis of mammary tumours induced in the rat by chemical carcinogens. *Br J Cancer* 1965; 19: 830-39.
- 130- Kim U. Metastasizing mammary carcinomas in rats: Induction and study of their immunogenicity. *Science* 1970; 167: 72-4.
- 131- Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr Protoc Immunol* 2001; 20: 20.
- 132- Tao K, Fang M, Alroy J. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC Cancer* 2008; 8: 228.
- 133- Jones PE. Comparison of the efficacy and safety of rosuvastatin versus atorvastatin, simvastatin, and pravastatin across doses (STELLAR Trial)". *Am J Cardiol* 2003; 92 (2): 152-60.
- 134- Xanthopoulos JM, Romano AE, Majumdar SK. Response of Mouse Breast Cancer Cells to Anastrozole, Tamoxifen, and the Combination. *J Biomed Biotechnol* 2005; 1: 10-9.
- 135- Ford CE, Ekström EJ, Andersson T. Wnt-5a signaling restores tamoxifen sensitivity in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *PNAS* 2008; 106 (10): 3919-24.
- 136- Song C, Jingying W, Quansheng S, et al. Simvastatin induces estrogen receptor-alpha (ER-α) in murine bone marrow stromal cells. *J. Bone Miner Metab* 2008; 26: 213-7.
- 137- Konturek PC, Burnat G, Hahn EG Inhibition of Barrett's adenocarcinoma cell growth by simvastatin: involvement of COX-2 and apoptosis-related proteins. *J Physiol and Pharm* 2007; 58 (3): 141-8.

- 138- Wong WL, Dimitroulakos J, Minden MD et al. HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. *Leukemia* 2002; 16 (4): 508-19.
- 139- Koyuturk M, Ersoz M, Altioek N. Simvastatin induces apoptosis in human breast cancer cells: p53 and estrogen receptor independent pathway requiring signalling through JNK. *Cancer Lett* 2007; 250 (2): 220-8.
- 140- Baell JB, Huang DC. Prospects for targeting the Bcl-2 family of proteins to develop novel cytotoxic drugs. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 851-63.
- 141- Goodsell DS. The molecular perspective: Bcl-2 and apoptosis. *Stem Cells* 2002; 20: 355-6
- 142- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; 275: 1132-6
- 143- Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, et al. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 7834-8.
- 144- Salmons GS, Brady HJ, Verwijs-Jansen M, et al. The Bax:Bcl-2 ratio modulates the response to dexamethasone in leukaemic cells and is highly variable in childhood acute leukaemia. *Int J Cancer* 1997; 71: 959-65.
- 145- Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 1997; 139: 1281-92.
- 146- Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309-12.