

Departamento de Zoologia
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

**Cancro da mama e Inibidores da Aromatase: avaliação biológica do
exemestano na linha celular MCF-7aro**

Soraia Miliza da Cruz Santiago Mamede de Melo, 2009

Índice

Capítulo 1. Introdução	1
1.1. Incidência do cancro da mama estrogénio – dependente e factores de risco	2
1.2. Importância do estrogénio no cancro da mama estrogénio-dependente.....	4
1.3. Receptores de estrogénio e vias de sinalização celular	5
1.4. Importância da enzima aromatase no cancro da mama	8
1.5. Estratégias terapêuticas na terapia endócrina para o cancro da mama	9
1.5.1. Moduladores e inactivadores selectivos dos RE (SERMs e SERDs).....	11
1.5.2. Inibidores da Aromatase (IAs)	12
1.5.3. O inibidor exemestano na clínica	14
1.6. Efeitos da terapia hormonal endócrina na proliferação e morte celular	16
Capítulo 2. Objectivo	20
Capítulo 3. Materiais e Métodos	22
3.1. Materiais e reagentes	23
3.1.1. Materiais	23
3.1.2. Reagentes.....	23
3.2. Culturas celulares	24
3.2.1. Subculturas	24
3.3. Ensaio da avaliação da actividade da aromatase em microsomas	26
3.4. Análise da Morfologia.....	26
3.4.1. Coloração de Giemsa.....	27
3.4.2. Coloração de Hoechst.....	27
3.5. Análise da viabilidade e proliferação celular	28
3.5.1. Ensaio de MTT e LDH	28
3.5.2. Ensaio de incorporação de Timidina tritiada.....	29
3.6. Análise do ciclo celular	30
3.7. Análise da morte celular.....	31
3.8. Análise Estatística	32

Capítulo 4. Resultados	33
4.1. Avaliação da inibição da actividade da aromatase	34
4.2. Estudos morfológicos	35
4.3. Análise da viabilidade e proliferação celular	42
4.4. Análise do ciclo celular	45
4.5. Análise da morte celular	47
Capítulo 5. Discussão e Conclusão	50
Referências bibliográficas	54

Agradecimentos

Na realização da minha tese de mestrado tive a oportunidade de contar com o apoio, confiança e ajuda de várias pessoas. Sem elas, a concretização deste projecto não teria sido tão bem sucedida.

À Prof. Doutora Georgina agradeço a forma como orientou o meu trabalho, a sua dedicação, empenho e amizade. Pelos desafios que me foi colocando ao longo do trabalho, exigência e espírito crítico que me foi inculcando.

À Prof. Doutora Natércia Teixeira agradeço-lhe por me ter proporcionado a oportunidade de realização deste projecto, acreditando nas minhas capacidades e por todas as valiosas contribuições que impôs neste trabalho.

A ambas agradeço o acompanhamento, apoio e amizade que sempre demonstraram nestes primeiros passos que dei pela investigação. Embora ainda tenha sido um caminho muito curto, asseguro que a vossa contribuição foi decisiva para o meu enriquecimento pessoal e científico.

À Prof. Doutora Isabel Luci, pelo apoio e disponibilidade irrestrita que me tem dado desde o início do mestrado, quer como coordenadora do curso, quer como minha orientadora na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

À Doutora Margarida Borges o auxílio que sempre prestou na realização das análises por citometria de fluxo, bem como o contributo das suas discussões para a concretização desta tese.

Aos meus colegas do laboratório de bioquímica agradeço-lhes toda a simpatia e amabilidade com que me receberam, e por todos os momentos de diversão e descontração que me proporcionaram. Em especial ao Bruno, à Margarida Cepa, à Cristina e à Margarida Azevedo por me terem ajudado a percorrer os primeiros caminhos da ciência. Um muito obrigado também à D. Casimira, à Ana Paula e ao

Daniel pela eficiência e disponibilidade que sempre demonstraram. A todos eles agradeço-lhes por terem partilhado esta experiência comigo.

Aos meus pais, deixo um agradecimento especial, por todo o apoio e compreensão com que sempre me recompensaram ao longo de toda a minha formação enquanto pessoa. Ao meu irmão e à Carolina pela ajuda e auxílio que sempre impuseram neste trabalho, assim como pelas horas dispendidas. Obrigado por todo o vosso amor, carinho e dedicação.

Ao Diogo, agradeço-lhe pelo companheirismo, dedicação e todo o apoio e encorajamento que sempre impôs. Obrigado pela alegria que me transmite e pelos momentos que pudemos partilhar até então.

A todos vós apresento o meu agradecimento profundo. Obrigado por me deixarem aprender!

Abstract

Breast cancer remains a public health issue on a global scale, and there is an important general trend to increase more specific interventions to obtain efficacious treatment, with less toxic side effects. Estrogens are pivotal in the growth and development of normal and neoplastic mammary tissue, and mediate their action via the estrogen receptors (ER). Based on this knowledge there are several therapeutic approaches to block estrogen actions: use of estrogen receptor modulators (SERMs), like tamoxifen, and estrogen receptor downregulators (SERDs), such as fulvestrant, which directly target estrogen receptors; or use of aromatase inhibitors (AIs). Aromatase is responsible for the final step of estrogen biosynthesis, and its inhibition has been considered as an important target in the treatment of estrogen-dependent breast cancer. In fact, the use of synthetic AIs has shown to be an effective alternative to the classical treatment with tamoxifen, for post-menopausal women with ER-positive breast cancer. Exemestane is a potent third-generation steroidal aromatase inhibitor used in cancer therapy. However, its mechanism of action as AI in cells is not totally understood neither is the eventual development of resistance in some patients. This work allowed the study of the *in vitro* effects of exemestane, in cell viability and proliferation, cell cycle progression, and induction of cell death in an ER-positive aromatase-overexpressing breast cancer cell line (MCF-7aro). This compound causes a reduction in cell viability and has the ability to inhibit the proliferative action of testosterone in MCF-7aro cells in a dose- and time-dependent manner which was accompanied by induction of cell cycle arrest in G0/G1 phase. In addition to morphological alterations, such as membrane blebbing, and condensation and fragmentation of chromatin, exemestane induced increased binding of annexin V to MCF-7aro cells suggesting that the decrease in cell viability may be also explained by cell death possibly by apoptosis. The results suggest that MCF-7aro could be used as an *in vitro* model of aromatase- driven breast cancer for evaluation of growth-inhibitory effects of compounds used in hormonal therapy and may help in the elucidation of the mechanisms of interaction of AIs with cancer cells in breast cancer tissue, allowing the finding of more potent and selective endocrine therapies.

Keywords: breast cancer, MCF-7aro cell line, estrogen-receptors, aromatase inhibitors, cell proliferation, cell death, apoptosis.

Resumo

O cancro da mama é uma questão de saúde pública a uma escala global sendo necessário cada vez mais, tratamentos eficazes e com menor toxicidade. Os estrogénios possuem um papel importante no crescimento dos tecidos normal e neoplásico mamário, sendo a sua acção mediada através dos receptores de estrogénio (RE). Assim, existem várias abordagens terapêuticas de bloqueio dos seus efeitos: uso de modeladores selectivos dos receptores de estrogénio (SERMs) como o tamoxifeno e inactivadores (SERDs) como o fulvestran, que actuam directamente a nível dos RE, e de compostos inibidores da aromatase (IAs). A aromatase, é responsável pelo passo final da biossíntese do estrogénio, e a sua inibição tem sido considerada um alvo terapêutico importante no cancro da mama estrogénio-dependente. De facto, o uso de IAs demonstrou ser uma alternativa eficaz ao tratamento clássico com o tamoxifeno para mulheres pós-menopáusicas com cancro da mama RE-positivo. O exemestano é um potente inibidor da aromatase de terceira geração usado na terapia. No entanto, os mecanismos de acção dos IAs a nível celular não estão totalmente esclarecidos nem os porquês da ocorrência de resistências ao tratamento. Este trabalho permitiu avaliar os efeitos *in vitro* do exemestano a nível da viabilidade, proliferação celular, e indução de morte numa linha celular de cancro da mama contendo receptores de estrogénio e que expressa níveis elevados de aromatase (MCF-7aro). Este composto provoca uma redução da viabilidade e uma inibição da proliferação celular induzida pela testosterona, de modo dependente da dose e do tempo de exposição com retenção do ciclo celular na fase G0/G1. Para além de alterações morfológicas tais como *blebs* de membrana, condensação e fragmentação de cromatina induz um aumento na ligação da Anexina V às células sugerindo também morte celular, possivelmente por apoptose.

Os resultados deste trabalho indicam que a linha celular MCF-7aro poderá ser usada como modelo de estudo dos efeitos *in vitro* de compostos usados na terapia endócrina e contribuir para a elucidação dos mecanismos de interacção dos IAs com as células cancerígenas e descoberta de novas terapias endócrinas mais potentes e selectivas.

Palavras-chave: cancro da mama, linha celular MCF-7aro, inibidores da aromatase, proliferação celular, morte celular, apoptose.

Abreviaturas

<i>atg</i>	Autophagy related genes
<i>BRC1</i>	Breast cancer 1
<i>BRC2</i>	Breast cancer 2
DAPK	Proteína cinase associada-morte
DMSO	Dimetilsulfóxido
E ₁	Estrona
E ₂	17β – estradiol
EGFR	Factor de crescimento epidérmico
ERE	<i>Estrogen response elements</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
G418	Geneticina
Gn-RH	Hormona libertadora de gonadotropinas
HER2	Receptor tipo-2 do factor de crescimento epidérmico
IAs	Inibidores da aromatase
ICI 182780	<i>Fulvestran</i>
IDL	Intervalo livre de doença
IES	<i>International Exemestan Study</i>
IGF-IR	Receptor I de factor de crescimento tipo insulina
INFARMED	Autoridade Nacional do Medicamento Produtos de Saúde, I.P
IP	Iodeto de propídeo
LDH	Lactato desidrogenase
MEM	Meio mínimo essencial de Eagle
MISS	<i>Membrane-initiated steroid signaling</i>
MMP	Potencial de membrana mitocondrial
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MTT	3-(4,5- dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio
PBS	Tampão fosfato salino
PE	Ficoeritrina
PS	Fosfatilinosítido 3'-OH

PKB	Proteína cinase B
RE- α	Receptor de estrogénio α
RE- β	Receptor de estrogénio β
RE+	Receptor de estrogénio positivo
RE –	Receptor de estrogénio negativo
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
rpm	Rotações por minuto
SBF	Soro bovino fetal
SBF-CT	Soro bovino fetal pré-tratado com carvão activado
SERDs	<i>Selective estrogen receptor downregulators</i>
SERMs	<i>Selective estrogen receptor modulators</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
TEAM	<i>Tamoxifen or Exemestan Adjuvant Multicenter Study</i>
TAM	Tamoxifeno
TNF	Factor de necrose tumoral

Índice de figuras

Figura 1. Biossíntese de hormonas sexuais esteróides.....	5
Figura 2. Vias de sinalização genómica e não genómica mediadas pelos receptores de estrogénio.	7
Figura 3. Principais estratégias terapêuticas no bloqueio da acção do estrogénio.	10
Figura 4. Mecanismo de actuação do Tamoxifeno (TAM).....	12
Figura 5. Alterações morfológicas observadas durante 3 dias de incubação com exemestano por microscopio de contraste de fase e coloração de Giemsa.	36
Figura 6. Alterações morfológicas observadas durante 3 dias de incubação com exemestano por coloração de Hoechst.....	37
Figura 7. Alterações morfológicas observadas durante 6 dias de incubação com o exemestano por microscopia de contraste de fase e coloração de Giemsa.....	38
Figura 8. Alterações morfológicas observadas durante 6 dias de incubação com o exemestano por coloração de Hoechst	39
Figura 9. Alterações morfológicas observadas durante 9 dias de incubação com o exemestano por microscopia de contraste de fase e coloração de Giemsa.....	40
Figura 10. Alterações morfológicas observadas durante 9 dias de incubação com o exemestano por coloração de Hoechst.....	41
Figura 11. Alterações na viabilidade celular – MTT – na linha celular MCF-7aro, durante 3 a 9 dias de incubação com exemestano (2,5 – 15 µM).....	43
Figura 12. Alterações na libertação da enzima lactato desidrogenase na linha celular MCF-7aro, durante 3 a 9 dias de incubação com exemestano (2,5 – 15 µM).	43
Figura 13. Alterações a nível da proliferação celular (nível de síntese de DNA) na linha celular MCF-7aro, durante 3 a 9 dias de incubação com exemestano (2,5 – 15 µM)....	44

Figura 14. Regiões delineadas para a análise do ciclo celular.	45
Figura 15. Efeito do exemestano no ciclo celular.	46
Figura 16. Regiões delineadas para a análise da viabilidade celular e apoptose.	48
Figura 17. Efeito do exemestano na morte celular por apoptose.	48

Índice de tabelas

Tabela I. Factores de risco para o cancro da mama.....	3
Tabela II. Estrutura química de diferentes inibidores da aromatase.	14
Tabela III. Inibição da actividade da aromatase a nível dos compostos exemestano e formestano..	34
Tabela IV. Efeito do composto exemestano (2,5-10 μ M) no ciclo celular.	46
Tabela V. Efeito do composto exemestano a nível da morte celular em MCF-7aro.....	49

Capítulo 1.

Introdução

1.1. - Incidência do cancro da mama estrogénio – dependente e factores de risco

O cancro da mama é uma das doenças com maior impacto na nossa sociedade, não só por ser muito frequente, e associado a uma imagem de gravidade, mas também porque envolve um órgão cheio de simbolismo na maternidade e na feminilidade. Na Europa, estimativas de 2004 indicavam o aparecimento de 371 000 novos casos e a morte de 129 900 mulheres (Boyle & Ferlay, 2005). Em Portugal, anualmente são detectados 4 500 novos casos de cancro da mama, e cerca de 1 500 mortes (Bastos *et al*, 2007). Nos últimos anos, contudo, tem-se observado uma tendência para um decréscimo nas percentagens de mortalidade do cancro da mama em países desenvolvidos. Este facto surge do resultado combinado de uma melhor educação, do aumento e divulgação de programas de *screening* e da aplicação de terapias mais selectivas e eficazes.

Vários factores contribuem para aumentar o risco de aparecimento do cancro da mama (Tabela 1). Para além do sexo, a idade e os factores hereditários/genéticos revelam-se como factores de predisposição relevantes nesta área. De facto, nos anos 90, Hall *et al*, descobriram que o cancro da mama de origem hereditária estava associado a uma mutação num dos genes localizados no cromossoma *17q21* (Hall *et al.*, 1990). Esta descoberta iniciou uma nova procura que culminou na identificação de 2 genes principais associados ao cancro da mama hereditário, o *breast cancer 1 (BRCA1)* e o *breast cancer 2 (BRCA2)*. Estes genes são responsáveis por manter o curso adequado do ciclo celular, pela reparação de erros introduzidos no ADN, sendo também parte integrante do processo de diferenciação celular. Embora as estruturas e localizações de ambos os genes difiram, aparentemente as suas funções são as mesmas pois os seus transcritos estão envolvidos nos mesmos processos.

Outros factores associados à prevalência do cancro da mama são os estímulos ambientais, o tabagismo e alcoolismo, bem como as práticas de amamentação em países desenvolvidos e o uso de terapias de substituição hormonal.

Contrariamente, a manutenção de um estilo de vida saudável, com a prática regular de exercício físico e a manutenção de um peso corporal estável associado a uma dieta equilibrada, bem como a gravidez encontram-se associados a uma baixa incidência de cancro da mama (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2002).

Embora os cuidados com os pacientes portadores de cancro da mama seja uma área multidisciplinar, é importante aumentar os alvos de intervenção em todas as especialidades de forma a se obter um tratamento eficaz com menos efeitos citotóxicos para os órgãos e tecidos.

	Risco Relativo	Alto Risco
Idade	>10	Indivíduos com uma certa idade
Localização Geográfica	5	Países desenvolvidos
Densidade da mama	>5	Tecido mamário extensivamente denso, visível em mamografias
Idade de menarca	3	Antes dos 11 anos
Idade da menopausa	2	Depois dos 54 anos
Idade da primeira gravidez	3	Primeiro filho depois dos 40 anos
Historial familiar	≥2	Cancro da mama em primeiro grau relativo
Antecedentes de tumores de mama benignos	4-5	Hiperplasia atípica
Cancro na outra mama	>4	Antecedente de cancro da mama
Grupo socioeconómico	2	Grupos de baixo e alto status socioeconómico
Índice de massa corporal (IMC)		
Pré-menopausa	0.7	Elevado IMC
Pós-menopausa	2	Elevado IMC
Consumo de álcool	1.07	Aumento de 7% por cada bebida diária
Exposição a radiação	3	Exposição anormal em raparigas depois dos 10 anos
Amamentação e paridade	O risco relativo decresce para os 4-3% para os 12 meses de amamentação, em adição a uma redução de 7% por cada nascimento	Mulheres que não amamentam
Utilização de hormonas exógenas		
Contraceptivos orais	1.2	Utilizadores correntes
Terapia de substituição hormonal	1.66	Utilizadores correntes

Tabela I. Factores de risco para o cancro da mama (retirado de Veronesi et al, 2005).

1.2. - Importância do estrogénio no cancro da mama estrogénio-dependente

Os estrogénios estão envolvidos em numerosos processos fisiológicos e, sendo primariamente reconhecidos como a hormona sexual feminina encontram-se envolvidos no desenvolvimento e manutenção dos órgãos sexuais femininos, no ciclo reprodutivo e reprodução, mas também participam em funções neuroendócrinas, metabolismo normal dos ossos e lipídios. No âmbito do cancro de mama, o papel do estrogénio já se encontra bem estabelecido. Sabe-se que o estrogénio está associado à indução da proliferação celular no tecido glandular da mama, podendo assim, actuar quer na iniciação quer na promoção do cancro da mama estrogénio-dependente. O estrogénio também pode ser metabolizado em compostos genotóxicos que podem contribuir para o processo carcinogénico.

Os estrogénios, tal como outras hormonas esteróides, são sintetizados a partir do colesterol numa sequência de transformações químicas que culminam na conversão de androstenediona e testosterona a estrona (E_1) e 17β -estradiol (E_2) através da enzima aromatase (Figura 1). Um factor chave na incidência desta doença parece ser a quantidade de precursores esteróides (C_{19}) disponíveis para a reacção de aromatização em locais extragonadais (Labrie *et al.*, 1997). Em mulheres pós-menopáusicas a principal fonte de produção de esteróides C_{19} é o córtex adrenal, originando-se assim, a androstenediona, dihidroepiandrostenona (DHEA) e dihidroepiandrostenona-sulfato (DHEAS). As hormonas DHEA e DHEAS estão presentes na circulação em concentrações bastante superiores aquelas encontradas para as hormonas sexuais esteróides activas, formando por isso, um grande reservatório de precursores que estão disponíveis para a conversão em estrogénio em numerosos locais periféricos.

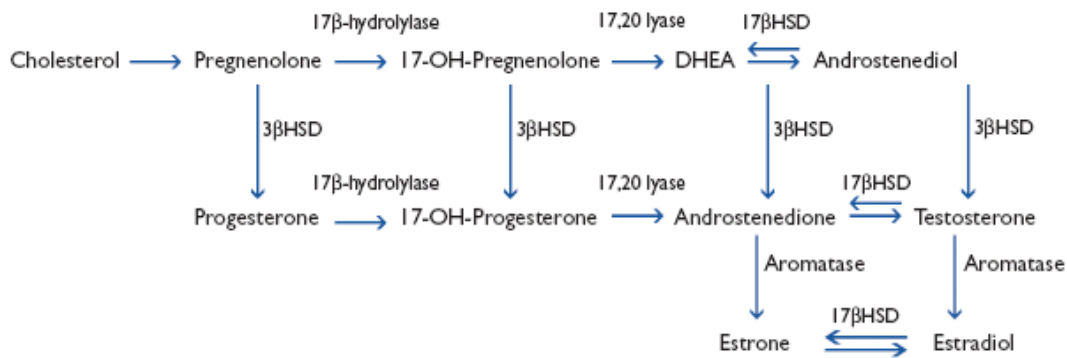


Figura 1. Biossíntese de hormonas sexuais esteróides.

Os níveis de estrogénio presentes na circulação são bastante mais baixos em mulheres pós-menopáusicas e homens do que em mulheres pré-menopáusicas e grávidas. No entanto, as células cancerígenas da mama em mulheres pós-menopáusicas podem ser estimuladas por estrogénio proveniente de duas fontes. Por um lado do estrogénio que surge da actividade aromatásica, e por outro do aumento das concentrações locais do estrogénio, produzido como resultado da sobre-expressão da aromatase no tecido tumoral. Desta forma, o efeito estrogénico no desenvolvimento e manutenção do cancro da mama, pode surgir do resultado combinado de uma acção parácrina ou autócrina (Chen, 1998).

1.3. - Receptores de estrogénio e vias de sinalização celular

Os efeitos fisiológicos do estrogénio na promoção do cancro da mama são principalmente mediados pela interacção entre o estrogénio e os seus receptores nucleares específicos (Green., 1990), o receptor de estrogénio α (RE- α) e o receptor de estrogénio β (RE- β) (Weigel & Roman, 2001). Estes receptores pertencem a uma família de factores de transcrição regulados pelos seus ligandos (Osborne *et al*, 2001). Embora representem transcritos de diferentes genes, *ERS1* (RE- α) e *ERS2* (RE- β) (Mosselman *et al*, 1996), possuem alguma similaridade estrutural, apresentando 59% de homologia em aminoácidos, a nível do domínio de ligação ao ligando. Contudo

sofreram alguma divergência evolutiva, sugerindo assim, uma diferenciação dos RE- α e RE- β em termos de actuação. Embora ambas as isoformas do receptor de estrogénio sejam expressas na glândula mamária normal, o RE- α desempenha um papel crítico no seu desenvolvimento (Bocchinfuso & Korach, 1997), sendo que a sua expressão é bastante amplificada em lesões mamárias hiperproliferativas e em muitos cancros da mama. A forma de actuação do RE- β ainda não está totalmente esclarecida devido à sua recente descoberta. No entanto, têm surgido evidências no sentido da atribuição de um papel supressor tumoral contrastando com a acção da isoforma α (Skliris et al, 2003). Recentemente, Chen *et al* (2009), sugeriram um mecanismo molecular que medeia a função do RE- β_1 como supressor de células cancerígenas da mama, através da interacção com a proteína Id1.

Conhecem-se dois mecanismos de sinalização mediada pelo estrogénio, a via genómica e a via não-genómica (Figura 2). A sinalização genómica mediada pelos RE, também denominada de *nuclear initiated steroid signaling* (NISS), é assim iniciada quando se estabelece a ligação do estrogénio ao seu receptor. Consequentemente ocorre a fosforilação, dimerização e recrutamento de proteínas co-activadoras para o complexo estrogénio-receptor. Esta activação também pode ser conduzida por várias cinases, num processo denominado – activação independente do ligando (Osborne *et al*, 2001). Este complexo então interage com sequências específicas – *estrogen response elements* (ERE) – presentes na região promotora dos genes, que conjuntamente com proteínas co-reguladoras influenciam a transcrição de genes de resposta ao estrogénio (McKenna *et al*, 1998) importantes na regulação da função celular, crescimento e diferenciação e que conduzem ao crescimento e progressão do cancro da mama (Osborne *et al*, 2001).

Alternativamente, os RE podem influenciar a transcrição de genes que não possuam a sequência ERE, sendo regulados por outros factores de transcrição que se ligam a sequências reguladoras de DNA alternativas.

Durante o processo de sinalização mediado pelo estrogénio, a co-activação ou a co-repressão de genes relacionados com a apoptose ou inibição do ciclo celular, pode explicar os efeitos da terapia hormonal como também pode contribuir para algumas formas de resistência como as observadas para o caso do fármaco tamoxifeno.

A via de sinalização intracelular também pode ser activada por um pool de receptores de estrogénio presentes no citoplasma ou na membrana plasmática, iniciando uma sinalização celular bastante mais rápida. Este modo, não genómico, de actuação dos receptores de estrogénio é também conhecido como *membrane-initiated steroid*

signaling (MISS) (Nemere *et al*, 2003) (Figura 2). A activação destes receptores induzida por fosforilação, resulta na activação de receptores de factores de crescimento (receptor I do factor de crescimento tipo insulina - IGF-IR; receptor factor de crescimento epidermal – EGFR; receptor tipo-2 do factor de crescimento epidérmico - HER2) (Kahlert *et al*, 2000; Ranzandi *et al*, 2003). Este “cross-talk” entre os RE e as vias de receptores de factores de crescimento ajudam a manter activa a via de sinalização que permite a sobrevivência das células cancerígenas da mama (Shou *et al*, 2004).

A compreensão da biologia dos RE revelou complexas interações com outras vias de transdução de sinal. Torna-se assim crítico avaliar outras características moleculares do tumor para além dos RE, no que respeita à escolha de uma terapia endócrina para pacientes com cancro da mama.

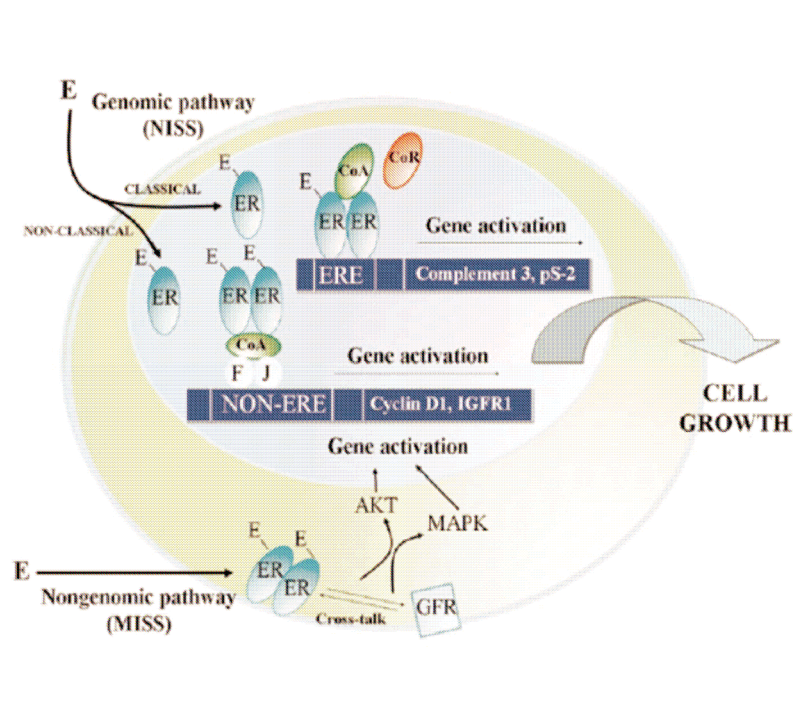


Figura 2. Vias de sinalização genómica e não genómica mediadas pelos receptores de estrogénio (retirado de Zilli *et al*, 2008).

1.4. - Importância da enzima aromatase no cancro da mama

A aromatase humana, produto do gene *CYP19A1* localizado no cromossoma 15q21.1, apresenta uma cadeia polipeptídica de 503 aminoácidos, e é constituída por um complexo de duas proteínas, a citocromo P450 aromatase e a NADPH citocromo P450 reductase.

Esta enzima torna-se uma peça chave na regulação do cancro da mama, pois encontra-se envolvida no último passo da biossíntese do estrogénio. A aromatização da androstenediona, o substrato preferencial da aromatase, processa-se em três passos de oxidações sucessivas, requerendo três moles de NADPH e três moles de oxigénio na conversão de uma mole de substrato numa mole de estrogénio (Thompson *et al*, 1974).

Este último passo na biossíntese do estrogénio ocorre nos ovários de mulheres pré-menopáusicas. Em mulheres pós-menopáusicas, a síntese de estrogénio ocorre principalmente em tecidos periféricos como o fígado, a pele, o músculo e tecido adiposo (Hemsell *et al*, 1974; Ackerman *et al*, 1981; Miller *et al*, 1990), uma vez que a função do ovário e o controlo hipofisário de produção de estrogénio já cessaram. Assim, esta expressão da aromatase é activada por uma região promotora similar, embora os mecanismos celulares e transcripcionais que a envolve sejam bastante complexos, específicos (Bulun *et al*, 2005; Simpson, 2003) e controlados por vários agentes como citoquinas, AMPc, gonadotrofinas, glucocorticóides e factores de crescimento. Os promotores específicos de diferentes tecidos distribuem-se assim numa região reguladora de 93 Kb que controla a expressão da aromatase (Bulun *et al*, 2005). A nível do tecido do cancro da mama, a sobre-expressão da aromatase encontra-se associada ao uso alternativo de promotores.

Devido ao papel que desempenha em todo o cenário do cancro da mama, a enzima aromatase tem sido extensivamente estudada há mais de 35 anos, de forma a esclarecer o mecanismo molecular responsável pela sua acção. Contudo, e apesar de três décadas de investigação, a sua estrutura permanecia desconhecida, não permitindo a elucidação dos mecanismos bioquímicos responsáveis pela ligação de diferentes classes de inibidores. Vários estudos, através do isolamento de citocromos P450 bacterianos e de outros P450 presentes em outras espécies, tentaram determinar o modelo estrutural da aromatase tendo sido propostas várias hipóteses. Estes estudos de caracterização da aromatase também permitiram a identificação de resíduos catalíticos importantes bem

como a descoberta de possíveis modos de ligação do substrato. Recentemente, Ghosh et al (2009), revelou à comunidade científica a estrutura tridimensional da aromatase humana. Esta descoberta irá permitir um conhecimento mais aprofundado dos mecanismos envolvidos no reconhecimento do substrato natural androstenediona e dos compostos inibidores da aromatase.

1.5. - Estratégias terapêuticas na terapia endócrina para o cancro da mama

Entre os vários factores envolvidos na carcinogénese do cancro da mama, destacam-se os estrogénios e os receptores de estrogénio como os factores mais importantes de prognóstico e factores preditivos de resposta ao tratamento endócrino (Winer *et al*, 2005).

Cerca de 50% das mulheres que possuem cancro da mama, apresentam um diagnóstico positivo para os receptores de estrogénio (RE+). Nestes casos, a implementação de uma terapia hormonal envolvendo os efeitos fisiológicos do estrogénio, torna-se numa mais valia para os pacientes.

A primeira manipulação hormonal para o tratamento do cancro da mama teve início no século XX, e assim que receptores hormonais específicos foram identificados nos anos 60, deu-se início à procura de novos fármacos que pudessem inibir ou bloquear o efeito estrogénico, evitando-se assim a cirurgia.

Várias abordagens terapêuticas, correntemente em uso, foram desenvolvidas para reduzir os efeitos proliferativos do estrogénio no cancro da mama (Figura 3). Estas estratégias abarcam diferentes mecanismos de actuação, e em adição à ablação do ovário, em mulheres que se encontrem num período pré-menopausa a supressão das funções do ovário pode ser temporariamente alcançada com a utilização de um agonista da hormona gonadotrofina (Gn-RH). Outras opções, disponíveis quer para mulheres pré-menopáusicas quer para mulheres pós-menopáusicas, interferem com a capacidade do estrogénio se ligar ao seu receptor. Esta metodologia envolve a utilização de fármacos antiestrogénicos *selective estrogen receptor modulators* (SERMs) e *selective estrogen downregulators* (SERDs) (Adamo *et al*, 2007). A outra abordagem terapêutica disponível para mulheres pós-menopáusicas interfere com a actividade da enzima

aromatase, reduzindo, assim, os níveis de estrogénio através do uso de inibidores da aromatase (IAs) (Winer *et al*, 2005).

Contudo, e apesar de as terapias para o cancro da mama demonstrarem ser bastante efectivas, nem sempre resultam, mesmo em pacientes RE+ (Osborne & Fuqua, 1994), surgindo resistências. Alguns tumores parecem desenvolver resistências à terapia endócrina com o prolongar do tratamento – resistência adquirida; outros são *de novo* resistentes, não respondendo à exposição inicial da terapia. Experiências clínicas indicam ainda que tumores que se apresentem resistentes a uma forma de terapia poderão ser sensíveis a outros tratamentos hormonais (Carlson, 2002), indicando que a resistência poderá ser específica do tratamento. Um caso bastante estudado é o do TAM, em que se verifica uma acção agonista do fármaco em determinados sub-grupos de células do cancro da mama estrogénio-dependentes. Assim, Ellis *et al*, 2003, demonstraram que o letrozole inibe mais eficientemente a proliferação do cancro da mama do que o TAM, isto porque a actividade agonista do estrogénio não é possível com um IA, provando que a privação em estrogénio é uma estratégia terapêutica eficaz neste subtipo de tumor (Ellis *et al*, 2003).

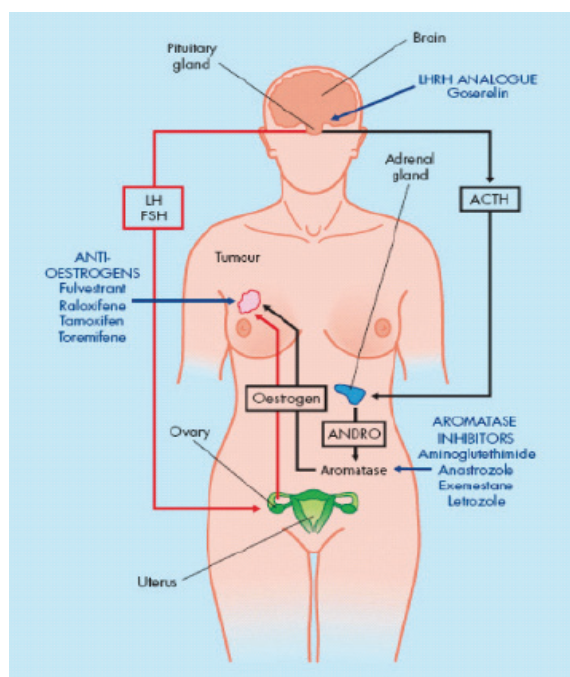


Figura 3. Principais estratégias terapêuticas no bloqueio da acção do estrogénio. Por bloqueio dos RE com antiestrogénicos, por compostos inibidores da síntese de estrogénio, através da inibição da reacção de aromatização ou pela utilização de agonistas de LHRH (http://www.abpi.org.uk/publications/pdfs/target_breast.pdf).

1.5.1. - Moduladores e inactivadores selectivos dos RE (SERMs e SERDs)

A utilização de compostos que competem pela ligação ao receptor de estrogénio, bloqueando a acção do estrogénio, revelou ser uma estratégia eficaz no tratamento anticancerígeno conduzindo ao desenvolvimento de antiestrogénios eficazes. Existem duas classes de compostos com actividade antiestrogénica. A primeira, os moduladores selectivos dos receptores de estrogénio – SERMs – envolve compostos com dupla acção, por um lado apresentam uma actividade antagonista, mas também possuem propriedades agonistas parciais (Harper *et al*, 1967). O fármaco clássico desta terapia é o tamoxifeno. Este composto liga-se ao RE alterando a sua conformação molecular, resultando no bloqueio da transcrição mediada pelo RE, devido ao recrutamento de proteínas co-repressoras em vez de proteínas co-activadoras (Figura 4). A outra classe de compostos, os inactivadores selectivos – SERDs – são os denominados antiestrogénicos puros como o fulvestran. Eles bloqueiam a função dos receptores de estrogénio através da degradação das suas proteínas.

Durante as últimas duas décadas, o tamoxifeno tem sido considerado a estratégia de “ouro” no tratamento do cancro da mama. Contudo, a avaliação da estratégia terapêutica com o tamoxifeno revelou que apesar de ser uma terapia bem tolerada, apresenta alguns efeitos adversos, incluindo o aumento de eventos tromboembólicos (Fisher *et al*, 1996) e o aparecimento de cancro endometrial (Wysowski *et al*, 2002; Group, 2005). Para aumentar estes dados controversos, surge o facto de muitos pacientes RE+ não responderem a esta terapia desenvolvendo resistências. Estudos laboratoriais indicam que esta resistência pode surgir de uma redução nas propriedades antagonistas do tamoxifeno devido a uma alteração na regulação dos receptores de tirosina cinase, especialmente HER2 e EGFR (Shou *et al*, 2004).

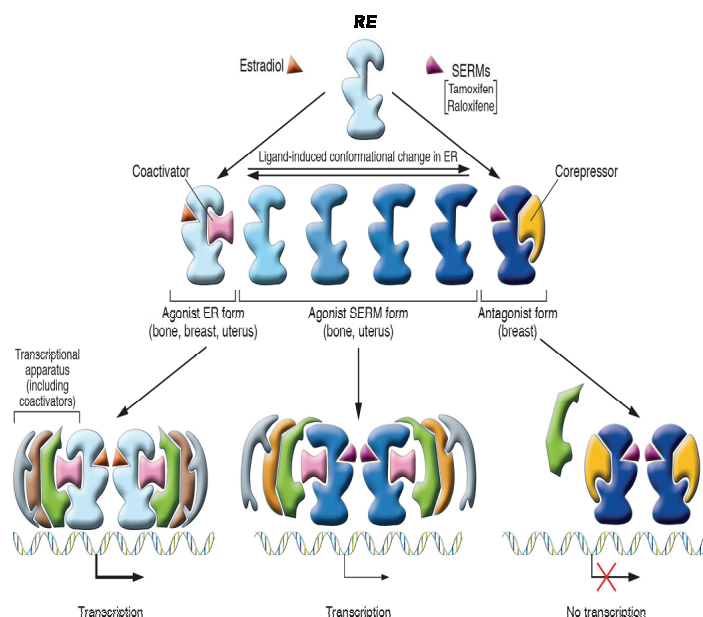


Figura 4. Mecanismo de actuação do Tamoxifeno (TAM). O recrutamento de proteínas co-ativadoras para o RE induz o modo de actuação agonista do TAM, permitindo a transcrição de proteínas envolvidas na sobrevivência e manutenção celular, como no caso do útero e ossos. Contrariamente, a presença de proteínas co-repressoras impede a transcrição promovendo um efeito antagonista nas células cancerígenas da mama (retirado de Deroo & Korach, 2006).

1.5.2. - Inibidores da Aromatase (IAs)

De forma a ultrapassar os inconvenientes apresentados pela terapia antiestrogénica, iniciou-se a procura de novos compostos interferentes com a actividade estrogénica no cancro da mama. Neste campo, a aromatase tornava-se um alvo bastante atractivo como estratégia terapêutica, uma vez que cataliza a reacção final na síntese de estrogénio. Desta forma, inibir a sua acção na produção de estrogénio, sem afectar a biossíntese de outras hormonas esteróides providencia a base para o desenvolvimento de novas terapias selectivas. Assim, surgem os IAs, que de facto têm suplantado o tamoxifeno como agente hormonal mais usado no tratamento do cancro da mama estrogénio dependente, demonstrando níveis de sobrevivência superiores (Gradishar, 2004; Goss *et al.*, 2005) com uma eficácia e perfis toxicológicos melhorados (Nabholtz, 2008).

Os IAs categoricamente são subdivididos em 3 gerações, cada uma delas representando várias fases da evolução dos compostos. Como representantes dos IAs de primeira e segunda geração, incluem-se a aminoglutetimida e o formestano, respectivamente. A aminoglutetimida inicialmente foi desenvolvida como um agente anticonvulsivo no tratamento da epilepsia, descobrindo-se posteriormente o seu potencial como IA. No entanto, após casos de insuficiência adrenal em crianças, este composto foi retirado. Os IAs de terceira geração incluem inibidores não-esteróides – anastrozol e letrozol – e inibidores esteróides como o exemestano. Estes compostos apresentam uma maior selectividade pela enzima aromatase sendo fármacos bastante mais potentes que os seus congéneres. Os IAs de terceira geração fazem parte da terapia hormonal para pacientes pós-menopausa. Contudo, a melhor estratégia terapêutica para os IAs ainda permanece por definir (Cuzick, 2008; Nabholz, 2008).

Em relação ao mecanismo de inibição da aromatase, os IAs foram classificados em dois tipos, os inibidores esteróides (tipo I) e os inibidores não-esteróides (tipo II). Os agentes não-esteróides como a aminoglutetimida, o anastrozol e o letrozol interagem reversivelmente com o local activo da enzima aromatase (Njar & Brodie, 1999) por interacção de um grupo funcional azólico com o grupo heme (Fe) do citocromo P450. Esta alteração na biossíntese do estrogénio é dependente da presença contínua do inibidor não-esteróide (Miller, 1987). Por outro lado, os agentes esteróides como o formestano e o exemestano mimetizam o substrato natural da aromatase, a androstenediona (Barone *et al*, 1982), ligando-se irreversivelmente à enzima através de ligações covalentes entre o inibidor e a enzima. Vários inibidores deste tipo são inicialmente reconhecidos pela aromatase como substratos alternativos que são depois convertidos em intermediários reactivos, através de um mecanismo dependente de NADPH. Estes agentes têm efeitos *in vivo* bastante duradouros e por este motivo, a presença contínua do composto não é necessária para manter a inibição, diminuindo assim o risco de efeitos secundários tóxicos.

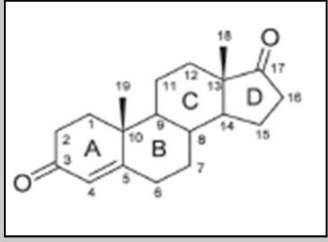
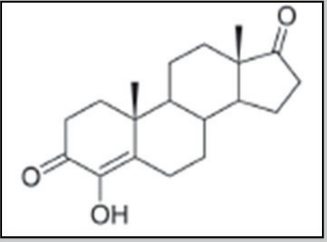
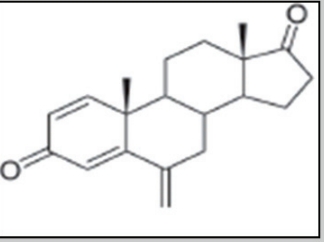
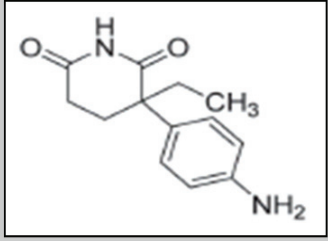
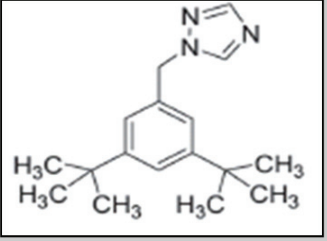
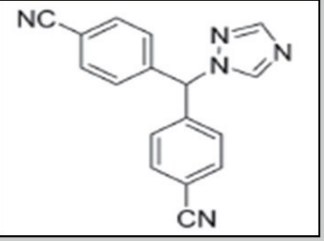
		
Androstenediona (substrato natural da aromatase)	Formestano (2ª geração_inibidor tipo I)	Exemestano (3ª geração_inibidor tipo I)
		
Aminoglutetimidina (1ª geração_inibidor tipo II)	Anastrozol (3ª geração_inibidor tipo II)	Letrozol (3ª geração_inibidor tipo II)

Tabela II. Estrutura química de diferentes inibidores da aromatase.

1.5.3. - O inibidor exemestano na clínica

O exemestano (6-metilenandrosta-1,4-diene-3,17-diona), como fármaco de biodisponibilidade oral, foi aprovado a 10 de Dezembro de 1999 pelo INFARMED (Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.). Clinicamente, este composto, designado AROMASIN (25 mg), está indicado no tratamento do cancro da mama precoce dependente de hormonas com receptores de estrogénio positivos, em mulheres na pós-menopausa, após terem completado 2-3 ou 5 anos de terapêutica adjuvante inicial com tamoxifeno.

Aromasin também está indicado para tratamento do cancro da mama avançado dependente de hormonas, em mulheres na pós-menopausa natural ou induzida, cuja doença tenha evoluído após terapêutica com antiestrogénios ou quando o tratamento com um fármaco hormonal diferente não tenha resultado. O exemestano não demonstrou eficácia em doentes com receptores de estrogénio negativo (RE-).

O exemestano é um inibidor esteróide irreversível da aromatase, relacionado estruturalmente com o substrato natural androstenediona e que actua como um falso substrato para a aromatase. Quando o composto é reconhecido pela enzima é convertido num intermediário que se liga irreversivelmente inactivando-a. Para que ocorra a síntese de estrogénios, nova enzima aromatase tem de ser produzida. Assim os níveis de estrogénios podem manter-se muito baixos durante cerca de quatro dias apesar do tempo de semi-vida plasmática ser de 27 horas.

Nas mulheres na pós-menopausa, os estrogénios são produzidos em primeiro lugar a partir da conversão dos androgénios em estrogénios, através da acção da enzima aromatase, nos tecidos periféricos. Assim, a privação dos estrogénios através da inibição da aromatase é um tratamento eficaz e selectivo do cancro da mama dependente de hormonas, em mulheres na pós-menopausa. Nas doentes tratadas com doses diárias de 25 mg, o processo de aromatização em todo o organismo diminuiu cerca de 98%.

O uso de exemestano tem sido objecto de vários ensaios clínicos que ou já terminaram ou estão ainda em curso (Robinson, 2009). O ensaio *International Exemestane Study* (IES) investigou o uso de exemestano por 2-3 anos após 2 a 3 de tamoxifeno. O estudo TEAM (Tamoxifen or Exemestane Adjuvant Multicentre study) estudou a opção 5 anos de exemestano versus 5 anos de tamoxifeno seguido de exemestano, e no Canadá está ainda a decorrer o estudo MA-27 que envolve a comparação directa do uso de exemestano versus anastrozol. De um modo geral os estudos sugerem que a estratégia de *switch* pós-tamoxifeno parece ser benéfica estando associada a uma melhoria clínica e estatisticamente significativa do intervalo livre de doença (ILD) das doentes que utilizaram exemestano após 2-3 anos de tamoxifeno comparativamente com as que continuaram com tamoxifeno.

De um modo geral o Aromasin é bem tolerado tendo como efeitos indesejáveis o rubor, náuseas, fadiga e artralgias. Foram relatadas reacções adversas como anorexia, insónia e depressão. A principal complicação no uso de exemestano e dos IAs em geral é a redução da densidade mineral óssea e um aumento da taxa de fracturas que está associada a alta mortalidade sobretudo nas mulheres de idades mais avançadas.

1.6. - Efeitos da terapia hormonal endócrina na proliferação e morte celular

O desenvolvimento e regulação do crescimento de tecidos normais e neoplásicos surge do balanço altamente regulado de mecanismos celulares, cuja desregulação pode conduzir à carcinogénese. Desta forma, a base biológica para a eficácia do tratamento endócrino em cancro da mama estrogénio dependente torna-se complexa, incluindo, entre outros factores, a indução do processo apoptótico e/ou autofágico, retenção do ciclo celular e indução na fase G_0/G_1 , bem como alterações na expressão de genes relacionados com a inactivação da transcrição mediada por RE.

A morte de células cancerígenas pode realizar-se por várias abordagens terapêuticas citotóxicas, nomeadamente pela indução de apoptose (Debatin, 1997, 1999; Herr & Debatin, 2001; Kaufmann & Earnshaw, 2000; Solary *et al*, 2000; Lowe & Lin, 2000; Kaufmann & Gores, 2000).

A apoptose é um processo de morte celular programada do tipo I, que pode ser iniciado por uma grande variedade de estímulos, incluindo sinais de desenvolvimento, stress celular e alterações do ciclo celular (Komatsu, 2007). Contudo, a execução da apoptose é marcada por alterações morfológicas específicas como a condensação da cromatina, aparecimento de *blebs* e a produção de corpos apoptóticos onde são incluídos fragmentos nucleares e citoplasmáticos (Earnshaw, 1995).

A regulação da apoptose encontra-se sob a influência de uma grande variedade de genes. Neste contexto, quer a família de genes Bcl-2, actuando como moléculas pró-apoptóticas (Bax, Bak e Bad) e moléculas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-x_L e Mcl-1) (Antonsson & Martinou, 2002), quer as caspases revelam-se de uma importância crítica.

As caspases envolvidas no mecanismo de sinalização da apoptose são denominadas iniciadoras e efectoras (Thornberry & Lazebnik, 1998; Los *et al*, 1999; Degen *et al*, 2000; Slee *et al*, 1999; Utz & Anderson, 2000; Earnshaw *et al*, 1999). As caspases iniciadoras, caspase-8 e caspase-10, interagem com proteínas adaptadoras, permitindo a agregação e activação de receptores de morte. Após o recrutamento, a caspase-8 torna-se activa dando início à via extrínseca da apoptose, clivando directamente caspases efectoras (Schulze-Osthoff *et al*, 1998). A caspase-9 encontra-se envolvida na iniciação da apoptose por intermédio da via mitocondrial. As caspases efectoras, caspase-3 e caspase-7, clivam vários substratos citoplasmáticos ou nucleares, que irão determinar muitas das características morfológicas que se verificam durante o

processo de apoptose (Thornberry & Lazebnik, 1998; Los, *et al*, 1999; Degen, *et al*, 2000; Slee, *et al*, 1999; Utz & Anderson, 2000; Earnshaw, 1999). Contudo, observações de Jänicke *et al* (1998) e os seus colaboradores em células MCF-7, demonstraram que a caspase-3 pode não ser essencial para todos os cenários de morte celular, uma vez que sendo uma linha celular que não apresenta níveis detectáveis de pró-caspase-3 (Li *et al*, 1997) responde aos estímulos factor de necrose tumoral (TNF) e staurosporina.

A mitocôndria tem um papel integral na apoptose, sendo que um dos passos principais da via mitocondrial é a translocação do citocromo *c* do espaço intermembranar da mitocôndria para o citosol (Goldstein *et al*, 2000). Esta translocação é facilitada pela oligomerização de proteínas pró-apoptóticas na membrana externa mitocondrial, formando-se uma estrutura semelhante a um poro (Cheng *et al*, 2001). Este passo é bloqueado pelas proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas que impedem a formação de homodímeros de Bax ou Bad (Cheng *et al*, 2001). A libertação do citocromo *c* promove a activação da caspase efectora 3 através da formação do apoptossoma (citocromo *c*/Apaf-1/caspase-9) (Bratton *et al*, 2000; Adrain & Martin, 2001). A activação da cascata de caspases resulta assim, na clivagem proteolítica de vários substratos e ultimamente em morte celular.

A contribuição relativa da via dos receptores de morte e da via mitocondrial na indução de apoptose através de terapias para o cancro da mama ainda permanece em discussão, no entanto, pensa-se que a via mitocondrial possua um papel de maior destaque. Um exemplo deste comportamento é observado com o tamoxifeno (TAM), que induz uma diminuição na permeabilidade transitória mitocondrial, a libertação rápida do citocromo *c*, bem como um aumento na produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS), sugerindo uma alteração na função mitocondrial. No entanto, o comprometimento final da apoptose parece ser independente da activação de caspases (Kallio *et al*, 2005). Neste contexto, as alterações de alvos genéticos envolvidos em pontos específicos da via mitocondrial, tornam-se de uma importância indispensável na resposta ao tratamento anticancerígeno.

O outro processo de morte celular, hoje em grande debate, é o da morte celular autofágica. A autofagia é uma via de degradação onde componentes citoplasmáticos e organelos celulares são englobados formando-se o autofagossoma. Após maturação, o autofagossoma funde-se com lisossomas sendo o seu conteúdo degradado por hidrolases lisossomais. Este processo é também ele regulado por uma grande variedade de genes,

sendo de destacar os genes *atg* (*autophagy-related-genes*) que promovem e induzem a formação do autofagossoma.

A autofagia torna-se assim num processo catabólico conservado que promove a viabilidade e sobrevivência celular em baixas condições de nutrientes através da produção de ATP, uma fonte principal de energia para vários processos celulares. A autofagia também está envolvida na remoção de organelos danificados e sobre-activados bem como na remoção de agregados proteicos (Rodriguez-Enriquez *et al*, 2004; Bernales *et al*, 2006; Ravikumar *et al*, 2002; Ostefeld *et al*, 2008; Høyer-Hansen *et al*, 2007).

Paradoxalmente, a autofagia também tem vindo a ser implicada na morte celular (morte celular programada, tipo II), originalmente descrita com base no aparecimento de vacúolos autofágicos. Pode-se presumir que esta discrepância na função do processo autofágico surja como uma activação extensiva da autofagia, conduzindo à desintegração irreversível dos sistemas celulares e, conseqüentemente, à morte celular.

A ligação entre autofagia e o cancro parece ser multifacetada. O ambiente tumoral é caracterizado por níveis reduzidos de oxigénio e necessidades energéticas bastante elevadas, sugerindo que a autofagia é um mecanismo essencial para fornecer nutrientes ao tecido tumoral, funcionando assim como um mecanismo citoprotector (Boya *et al*, 2005; Lum *et al*, 2005). No entanto, sob determinadas condições, a autofagia actua como um processo de morte celular independente de caspases, uma vez que genes que regulam o processo autofágico actuaem como genes supressores tumorais (p53, PTEN, DAPk, LKB1, TSC^{1/2}, p27^{KIP} e beclina-1) ou oncogenes (Bcl-2, classe I PI3-K, mTOR e Akt) (Gozuacik & Kimchi, 2004; Høyer-Hansen *et al*, 2007; Pattingre *et al*, 2005; Liang *et al*, 2007).

Evidências têm surgido no sentido de um estímulo comum de morte, primariamente atribuído à apoptose mas que também inclui a autofagia, sugerindo a existência de um “cross-talk” entre as duas vias de sinalização. Vários estudos apontam para a existência desta interligação em alguns pontos, podendo esta interacção manifestar-se de várias formas (Bauvy *et al*, 2001; Xue *et al*, 1999). Um desses trabalhos, realizado por Cui *et al*, 2007, demonstra que a autofagia, em células MCF-7 tratadas com oridonina, surge como um processo facilitador da apoptose. Os mecanismos moleculares que determinam a resposta das células cancerígenas quer aos moduladores selectivos do estrogénio quer aos IAs não são conhecidos, sendo objecto de intensa investigação. Estes mecanismos podem incluir mensageiros secundários, a

modulação dos RE e proteínas co-activadoras e co-repressoras (Katzenellenbogen *et al*, 1997).

Para além do seu efeito já bem conhecido na indução da proliferação celular em células do cancro da mama estrogénio-dependentes, sabe-se que os estrogénios previnem a apoptose, em parte, pela alteração da expressão de proteínas da família Bcl-2. A este nível, o ICI182780 (fulvestran), que bloqueia a acção do estrogénio, modulando a actividade do seu receptor, induz quer *in vitro* quer *in vivo* a apoptose e inibição do crescimento (Lim *et al*, 2001). Resultados bastante semelhantes aos mencionados anteriormente para o TAM e o letrozol publicados por Thiantanawat *et al*, 2003, indicam que os IAs têm uma eficácia mais elevada na indução da apoptose do que os antiestrogénios, sendo esta indução mediada pela sobre-expressão da proteína Bax acompanhada com a sub-expressão da proteína Bcl-2. O tratamento com os mesmos compostos demonstrou também a existência de retenção do crescimento de células MCF-7aro, bloqueando a transição da fase G₁ para S. Uma proteína estabelecida como supressora tumoral, a p53, encontra-se envolvida no processo apoptótico assim como na progressão do ciclo celular (Sionov & Haupt, 1999). Ou seja, esta proteína controla a retenção do ciclo celular e a reparação do DNA, mas também induz a apoptose em conexão com a Bcl-2 e Bax, sendo que a perda da sua função por mutação encontra-se associada a cerca de 30% dos casos de cancro de mama (Prives & Hall, 1999).

O *cross-talk* entre as vias de sinalização de RE e receptor I de factor de crescimento tipo insulina (IGF-IR) é crítico para o desenvolvimento normal da mama, mas também para a iniciação, manutenção e progressão do cancro da mama (Thorne & Lee, 2003). E de facto, aplicar ensaios que combinem o bloqueio da acção do estrogénio com a sub-regulação das vias de sinalização mediadas por IGF-IR, tais como a via de PI3-K, Akt e PKB, parece em tudo prometedora como factor preditivo de eficácia. Num estudo apresentado por Lisztwan, *et al* (2008), surge a combinação de um IA, o letrozole, com o AEW541, um inibidor selectivo da via IGF-IR, em duas linhas celulares de cancro da mama, as MCF-7aro e T47D/Aro. Este trabalho revelou a inibição sinérgica da proliferação, pela supressão dos sinais de sobrevivência bem como a indução de apoptose.

Todos estes estudos demonstram que é necessário um conhecimento bastante mais aprofundado dos mecanismos moleculares envolvidos na morte celular em resposta às diferentes terapias endócrinas, podendo assim, ajudar na descoberta de novas estratégias terapêuticas.

Capítulo 2.

Objetivo

Os compostos inibidores da aromatase (IAs) foram implementados na clinica para o tratamento do cancro da mama estrogénio – dependente há já alguns anos. Contudo, como compostos muito eficazes na terapia endócrina, o modo como actuam nas células cancerígenas ainda não está esclarecido, apesar da intensa investigação nesta área.

Desta forma, perceber os mecanismos celulares envolvidos na regressão do cancro da mama induzida pelo uso de IAs é de extrema importância para explicar o aparecimento de resistências e direccionar a pesquisa de novas moléculas inibidoras da aromatase, ainda mais específicas e eficazes.

Assim, neste estudo pretende-se investigar os efeitos de um potente IA, o exemestano, na proliferação celular, ciclo celular e indução de morte utilizando um modelo *in vitro* de cancro da mama, a linha celular MCF-7aro. Esta é transfectada com o gene da aromatase, mimetizando a abundância e dependência de estrogénios das células cancerígenas.

Capítulo 3.

Materiais e Métodos

3.1. - Materiais e reagentes

3.1.1. - Materiais

Os materiais para culturas de células foram adquiridos às firmas TPP (Trasandingen, Switzerland) e Nunc (Rochester, USA), sendo estéreis e descartáveis: pipetas de Pasteur, pipetas volumétricas graduadas de várias capacidades, frascos e placas de cultura celular de diversos tamanhos, tubos de centrifuga e lâminas de cultura.

3.1.2. - Reagentes

- Meio mínimo essencial de Eagle (MEM), soro bovino fetal (SBF), L-glutamina, antibiótico-antimicótico 100 x (penicilina G, streptomycina e anfotericina B), Geneticina (G418), tripsina, o corante de Giemsa e o meio de montagem (DPX) foram providenciados pela Gibco Invitrogen Co. (Paisley, Scotland, UK).
- Azul tripano, testosterona, EDTA, dimetilsulfóxido (DMSO), piruvato de sódio, Hoechst 33258, iodeto de propídio, triton X-100, Dnase-free Rnase A e staurosporina foram fornecidos pela Sigma-Aldrich Co. (Saint Louis, U.S.A.).
- Timidina-[H]³ foi cedido pela Amersham (Amersham International, Amersham, UK).
- O Kit de LDH bem como o Kit de detecção de apoptose (Anexina V-PE) são da BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA, USA).
- Os filtros do Cell harvester foram fornecidos por Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA).
- O líquido de cintilação (cocktail) foi comprado ao ICN Radiochemicals (Irvine, CA, USA).
- O meio de montagem (vectashield) é providenciado pela Vector (Burlingame, CA, USA).
- O composto Formestano foi gentilmente cedido pela Novartis Farma – Produtos farmacêuticos S.A., e o Exemestano foi fornecido pela Sequoia Research Products Ltd, Pangbourne, UK.

3.2. - Culturas celulares

Neste trabalho de investigação, recorreu-se à linha celular MCF-7aro, que gentilmente foi cedida pelo Dr. Shiuan Chen (Beckman Research Institute, City of Hope, Duarte, CA, U.S.A.). Esta é uma linha celular de cancro da mama RE (+), que sobre-expressa elevados níveis de aromatase, apresentando-se como um bom modelo (*in vitro*) de estudo para avaliação de terapias contra o cancro da mama. A obtenção desta linha celular resulta da transfecção estável do gene da aromatase humana placentário, na linha de cancro da mama MCF-7, como descrito por Zhou *et al*, 1990.

De forma a que haja uma proliferação celular significativa e que os níveis nutritivos sejam estáveis, as células MCF-7aro são mantidas a 37° C com 5 % de CO₂ em meio de cultura com vermelho de fenol (MEM – Meio mínimo essencial de Eagle) contendo sais de Earle, piruvato de sódio 1 mmol/L, glutamina 2 mmol/L, penicilina-estreptomicina-anfotericina B 1%, geneticina (G418) 700 ng/ml e 10% de soro bovino fetal (SBF) inactivado pelo calor, em 5% CO₂ a 37°C sendo o meio mudado a cada três dias. Esta mudança do meio é feita através da recolha do meio de cultura de forma a que possam ser removidas todas as células que eventualmente se tenham destacado, e à adição de novo meio de cultura.

3.2.1. - Subculturas

Quando as células atingem uma confluência entre os 80-90% necessitam de ser tripsinizadas de forma a que possam ser cultivadas em novas caixas de cultura (25 e/ou 75 cm²) e dar continuação ao seu crescimento.

Após observação da confluência das células ao microscópio, na câmara de fluxo, e com a ajuda de um sistema de vácuo e pipetas de pasteur, recolhe-se o meio dos frascos de cultura, procede-se à lavagem com PBS (pH 7,4) e à adição e recolha da solução Tripsina 2,5%/ EDTA 1 mM. Seguidamente as caixas são mantidas a 37°C durante um período de dois minutos de forma a permitir o destacamento eficaz das células. Após os 2 minutos a 37°C, adiciona-se SBF para inactivar a solução tripsina/EDTA. Faz-se nova

lavagem com PBS e recolhe-se todo o conteúdo existente na caixa de cultura (fracção celular/SBF/PBS) para tubos de centrifugação (15 ml) e procede-se à sua centrifugação (a 1200 rotações por minuto; durante 6 minutos a 4°C - 1200 rpm, 6 min a 4°C). Após este último passo, rejeita-se o sobrenadante e homogeniza-se o conteúdo celular. Para finalizar este procedimento, consoante a quantidade de células obtidas e o número de caixas de cultura que pretendemos obter, ressuspende-se as células com a quantidade necessária de MEM com vermelho de fenol completo, e após nova homogenização auxiliada por uma pipeta volumétrica, distribui-se o conteúdo pelas novas caixas de cultura.

De forma a evitar a interferência de esteróides presentes no SBF e o efeito esteróide do vermelho de fenol (Berthois *et al*, 1986), 3 dias antes do início de qualquer experiência, as células MCF-7aro são cultivadas em MEM sem vermelho de fenol completo. Este meio é constituído por piruvato de sódio 1 mmol/L, glutamina 2 mmol/L, penicilina-estreptomicina-anfotericina B e 5% de soro bovino fetal pré-tratado com carvão activado (SBF-CT) de forma a adsorver os esteróides presentes no soro.

Após estes 3 dias de permanência em MEM sem vermelho de fenol as células atingem uma confluência perto dos 80-90%, sendo necessário proceder à sua tripsinização (procedimento descrito anteriormente). Procede-se à contagem das células e obtenção da concentração celular desejada. Assim, após a tripsinização, centrifugação e rejeição do sobrenadante, adiciona-se MEM sem vermelho de fenol numa quantidade específica para as contagens (cerca de 2 ml para os frascos de 25 cm² e 5 ml para os frascos de 75 cm²). Homogenizam-se e contam-se as células com o auxílio do azul de tripiano na câmara de Neubauer. O azul de tripiano é um corante que se integra nas células após a ruptura das suas membranas, corando assim de azul todas as células que já se apresentam mortas, permitindo determinar a viabilidade celular.

As células são cultivadas durante 12-16h na concentração requerida. Após este período adiciona-se o composto nas concentrações pretendidas e testosterona (T) (1nM) em MEM sem vermelho de fenol completo. A testosterona é o agente indutor de proliferação e substrato da aromatase.

As células são então mantidas a 37°C e 5% CO₂ durante os períodos de incubação pretendidos, sendo o meio de cultura com a testosterona e o composto substituído de 3 em 3 dias.

3.3. - Ensaio da avaliação da actividade da aromatase em microsomas

A actividade da enzima aromatase foi determinada segundo o método de Thompson & Siiteri (1974), com algumas modificações. Este ensaio baseia-se na utilização de [1β - ^3H] andro-4-ene-3,17-diona como substrato, num sistema bastante simples, os microsomas de origem placentária, onde está disponível a enzima aromatase.

A preparação dos lisados de microsomas foi feita segundo o método descrito por Kadohama *et al* (1992) com algumas alterações.

Em cada experiência foi incluído um controlo negativo, que não é sujeito a qualquer tipo de inibidor, e um controlo positivo, o formestano (0,5 μM), um potente inibidor da aromatase. Por cada ensaio utiliza-se 20 μg de proteína (lisado microsomal), 40 nM de androstenediona tritiada, 2 μM de cada um dos compostos que pretendemos analisar e 150 μM de NADPH em 67 mM de tampão KH_2PO_4 (pH 7,4) num volume final de 1 ml.

Após homogenização colocam-se as amostras no banho a 37° C durante 15 min. Terminado este período, adiciona-se 250 μl de ácido tricloroacético a 20% de forma a parar a reacção de aromatização. De seguida transfere-se o conteúdo para tubos de microcentrifuga, que previamente foram preparados com um sedimento de carvão activado/dextrano, homogeniza-se novamente o seu conteúdo com o auxílio do vortéx, seguindo-se um período de incubação de 1h à temperatura ambiente. Procede-se depois a duas centrifugações a 1400 rotações por minuto durante 10 min, e por fim, retira-se o sobrenadante resultante da última centrifugação, e adiciona-se 3 ml do cocktail de cintilação. Realiza-se as contagens num contador de cintilação (LS 6500, Beckman Instruments, CA, U.S.A.).

3.4. - Análise da Morfologia

3.4.1. - Coloração de Giemsa

Para se observar as alterações morfológicas que possam ocorrer a nível das células MCF-7aro, após a exposição a diferentes períodos de incubação e diferentes concentrações do composto exemestano, recorreu-se à coloração de Giemsa. Este tipo de coloração permite-nos observar algumas alterações morfológicas a nível dos núcleos e citoplasma.

Para iniciarmos esta metodologia, recorre-se a lâminas de cultura de 8 poços, aplicando-se em cada poço uma densidade celular de 6×10^4 . Após 24h de incubação as células são sujeitas a diferentes tratamentos, cada um deles em duplicado (períodos de incubação – 3 a 9 dias; concentrações do exemestano – 0 - 15 μM). Após o tratamento, as células são lavadas uma vez com PBS, fixadas com metanol durante 20 min, e novamente lavadas com PBS. Posteriormente à fase de fixação e lavagem, aplica-se o corante de Giemsa diluído em PBS (diluição 1:2), durante 30 min. Posteriormente, as lâminas são lavadas com água corrente procedendo-se à montagem das lâminas em meio de montagem DPX, após secagem e desidratação.

As células coradas foram observadas ao microscópio Eclipse E400, Nikon, Japan equipado com o software de análise de imagem LeicaQwin.

3.4.2. - Coloração de Hoechst

Este tipo de coloração permite-nos avaliar alterações na morfologia nuclear, nomeadamente alterações a nível da condensação da cromatina, através de microscopia de fluorescência.

O procedimento que envolve toda esta metodologia é bastante semelhante ao descrito para a coloração de Giemsa. Nomeadamente no que respeita ao tratamento das células, com períodos de incubação e concentrações do exemestano idênticas, o material utilizado, bem como os passos da fixação, no entanto, o agente fixador é paraformaldeído (4% em PBS) durante 20 min, uma vez que a fixação com o metanol

pode interferir com a emissão de fluorescência. Neste caso, colocam-se nos diferentes poços 400 µl da solução de Hoechst 33258 a 0,5 mg/ml em PBS durante 30 min. Após este período de incubação, as lâminas são lavadas em PBS, e montadas em meio de montagem Vectashield sendo imediatamente observadas ao microscópio de fluorescência (Eclipse E400, Nikon, Japan), equipado com um filtro de excitação com o máximo de transmissão aos 360/400 nm, e processadas pelo software de imagem Nikon ACT-2U.

3.5. - Análise da viabilidade e proliferação celular

3.5.1. - Ensaio de MTT e LDH

De forma a avaliar a viabilidade celular, as células MCF-7aro foram cultivadas em placas de 96 poços, sendo aplicada uma densidade celular de $2,5 \times 10^4$ para o período de incubação de 3 dias e 1×10^4 para o período de incubação correspondente aos 6 e 9 dias. Neste tipo de ensaio usam-se triplicados para cada tratamento (0 µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM de exemestano).

A viabilidade celular é avaliada pela medida de actividade mitocondrial recorrendo ao uso de um sal de tetrazólio, o 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT), que por redução metabólica por acção de redutases mitocôndriais forma um precipitado azul de formazano que é solubilizado e analisado por espectrofotometria.

Por outro lado, o teste do LDH mede, quantitativamente, a libertação da enzima lactato desidrogenase (LDH) após a lise celular, ou seja, é uma técnica que avalia os níveis de citotoxicidade do composto em estudo, já que a LDH é uma enzima citosólica que é libertada para o meio extracelular quando a integridade membranar é afectada.

Os ensaios de MTT – LDH podem ser feitos como experiências individuais, no entanto, e como cada um destes testes mede parâmetros distintos que podem ser diferenciados no mesmo poço, pode-se recorrer a uma experiência única para a realização de ambos os ensaios. Ou seja, após o período de incubação com os compostos estar concluído, com o auxílio de uma pipeta multicanal retiram-se 50 µl dos

200 µl de volume total correspondente a cada poço, para uma nova placa de 96 poços. Utiliza-se o Kit de LDH (Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega Corporation), adicionando-se 50 µl de substrato de mistura anteriormente ressuspendido em tampão de ensaio, e de seguida reveste-se a placa com papel de alumínio e aguarda-se 30 minutos de forma a que a enzima lactato desidrogenase possa reagir com o substrato e a sua actividade detectada. Ao fim deste tempo, adicionam-se novamente 50 µl de solução stop para que a reacção cesse. Para finalizar este ensaio, removem-se as bolhas de ar que possam interferir com a leitura, e utiliza-se o espectrofotómetro (Power Wave™ XS, Bio Tek, Vermont, U.S.A.) para fazer a leitura dos diferentes tratamentos a 540 nm.

O ensaio do MTT é realizado com os restantes 150 µl existentes em cada poço. E de forma a se obter uma diluição de 1:10, adiciona-se 15 µl da solução de MTT (0,5 µg/ml concentração final) previamente preparada. Nestas condições, deixa-se a incubar a 37°C e 5% de CO₂ por um período de 2h e 30min. Terminado este tempo recolhe-se todo o conteúdo existente em cada poço para de seguida se adicionar 200 µl da solução DMSO: isopropanol (3:1). Coloca-se a placa num agitador cerca de 15 minutos, e por último faz-se a leitura no espectrofotómetro a 540 nm.

3.5.2. - Ensaio de incorporação de Timidina tritiada

O ensaio de incorporação de [H³]-timidina permite-nos avaliar a proliferação das células MCF-7aro. Uma vez que a timidina se incorpora no DNA durante o processo de replicação, então a quantidade de [H³]-timidina incorporado é um indicador da síntese de DNA e consequentemente de proliferação celular.

Para a realização desta técnica, os passos iniciais são semelhantes aos indicados anteriormente para o ensaio de MTT – LDH, quer no que diz respeito às densidades celulares, tempos de incubação e concentrações dos compostos a usar, quer no uso do controlo onde o composto está ausente e que corresponde ao máximo de proliferação celular.

A [H³]-timidina (0,5 µCi) é adicionada a cada poço, 8 horas antes do final do período de incubação correspondente a cada tratamento. Durante este tempo a placa

permanece a 37°C e 5% de CO₂, para que a timidina seja intercalada no DNA durante a sua síntese, num ciclo de replicação das células MCF-7aro. Após este período, a placa é sujeita a um ciclo de congelação/descongelação e as células são recolhidas recorrendo ao cell harvester (Skatron Instruments, Norway). Para obtermos as leituras da timidia tritiada, recolhe-se o conteúdo retido num filtro do cell harvester (Molecular Devices Sunnyvale, CA, USA), correspondente a cada tratamento, para os tubos de cintilação aos quais foi adicionado 1 ml de cocktail de cintilação. A leitura destes tubos é feita num contador de cintilação (LS 6500, Beckman Instruments, CA, U.S.A.).

3.6. - Análise do ciclo celular

Através deste tipo de metodologia conseguimos avaliar os efeitos/forma de actuação do composto exemestano a nível do ciclo celular em células MCF-7aro.

Neste tipo de experiência, as células são cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² a uma densidade de 7×10^5 , para um volume total de 10 ml de MEM sem vermelho de fenol. Após 24 horas, as células são incubadas durante 3 dias com as diferentes concentrações do composto (2,5 - 10 µM de exemestano) num volume total de 5 ml. Este ensaio é realizado em duplicado, e inclui dois controlos onde as células são mantidas em MEM sem vermelho de fenol com ou sem a testosterona. Após este ciclo de incubação, o meio é recolhido para que as células não aderentes sejam recuperadas, e procede-se à tripsinização das diferentes caixas envolvidas no tratamento.

Procede-se então à centrifugação, rejeitando-se o meio. Ressuspende-se muito bem o sedimento e adiciona-se 200 µl de PBS. Após homogenização da suspensão presente nos tubos, inicia-se as contagens na câmara de Neubauer.

Ultrapassada esta etapa, perfaz-se o volume para 0,5 ml com PBS) (diluição 1:10) e 4,5 ml de etanol 70%, perfazendo um volume total de 5 ml, que são mantidos a 4°C por um período de 2 h. As células fixadas são então centrifugadas (1200 rpm, 6 min, 4°C) e o sedimento resultante lavado em PBS. Rejeita-se o PBS adicionado e, finalmente, as células são ressuspendidas em 0,5 ml de uma solução de PBS contendo 5 µg/ml iodeto de propídio (IP), 0,1% triton X- 100 e 200 µg/ml Dnase-free Rnase A, e mantidas 30 min à temperatura ambiente. Esta solução permite assim marcar as células

com IP, a permeabilização das membranas através do Triton X-100, e a degradação do RNA presente nas amostras, garantindo deste modo que a análise feita refere-se apenas ao conteúdo de DNA. Esta análise é efectuada por citometria de fluxo e baseada na aquisição de 20.000 células num citómetro, Becton Dickinson FACSCalibur (San Jose, CA, U.S.A.) equipado com o software CELLQuest Pró. Os restos celulares, dupletos e agregados celulares são excluídos fazendo uma região R1 no “dot-plot” FL-2-Area versus FL-2-Width da fluorescência emitida pelo IP. Os detectores *forward scatter* (FSC) e *side scatter* (SSC) foram colocados em escala linear, enquanto os detectores de fluorescência FL-1, FL-2 e FL-3 foram colocados em escala logarítmica. Após a aquisição, foi efectuada a análise dos resultados obtidos usando o programa CELLQuest Pró.

3.7. - Análise da morte celular

Este ensaio baseou-se na utilização do Kit Anexina V (Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). Esta técnica baseia-se na grande afinidade da Anexina V-PE para a fosfatidilserina (PS), sendo esta translocada para o folheto externo da membrana celular quando a célula inicia o processo apoptótico.

A dupla marcação Anexina V-PE e 7-amino-actinomicina D (7-AAD) permite-nos distinguir as células viáveis (Anexina V⁻/7-AAD⁻) das apoptóticas (Anexina V⁺/7-AAD⁻) e das necróticas (Anexina V⁺/7-AAD⁺ e Anexina V/7-AAD⁺).

Nesta metodologia, tal como a descrita anteriormente para o ciclo celular, os passos iniciais são em tudo semelhantes, ou seja, quer a densidade à qual as células são semeadas (7×10^5), os tratamentos com as diferentes concentrações do composto, bem como o processo de tripsinização e recolha do conteúdo das caixas é idêntico. Contudo, e uma vez que se pretende avaliar quer a viabilidade quer a apoptose em células MCF-7aro, utilizou-se um controlo positivo para a apoptose, ou seja, células MCF-7aro tratadas com staurosporina a uma concentração de 1 μ M por um período de incubação de 12-16 h.

Após a tripsinização das caixas com os diferentes tratamentos, recolha e centrifugação, o sobrenadante é rejeitado, e o sedimento ressuspendido em 200 μ l de PBS/3% SBF-CT. Procede-se de seguida à contagem das células de forma idêntica à

mencionada anteriormente para o ensaio do ciclo celular. Posteriormente centrifuga-se (1200 rpm, 4 min a 4°C) a suspensão celular, de forma a se obter novamente o sedimento e rejeitar assim o sobrenadante, adicionando-se depois a solução de marcação por um período de 15 min à temperatura ambiente. Esta solução de marcação contém Anexina V-PE (5 µl) e 7-AAD (5 µl) diluídos em tampão de ligação da Anexina V (10 mM HEPES/NaOH pH 7.4; 140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl₂). Uma vez terminado este período de 15 min, adicionam-se mais 400 µl de Tampão de ligação Anexina V.

A análise da viabilidade celular e apoptose por citometria de fluxo é baseada na aquisição de 10 000 células num citómetro Becton Dickinson FACSCalibur (San Jose, CA, U.S.A.) equipado com o programa CELLQuestPró com o qual os resultados foram analisados.

3.8. - Análise Estatística

Os dados apresentados são expressos em média ± erro padrão da média (SEM). A análise estatística dos resultados foi feita utilizando a análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Bonferroni para permitir múltiplas comparações no software GraphPad Prism 5. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente diferentes.

Capítulo 4.

Resultados

4.1. - Avaliação da inibição da actividade da aromatase

A inibição da actividade da aromatase pelo exemestano foi avaliada em microsomas da placenta humana por um ensaio radiométrico em que se determina a água tritiada libertada no meio de incubação após degradação do substrato [1β - ^3H] androstenediona pela aromatase durante o processo de aromatização e produção de estrogénio.

Os resultados obtidos estão representados como percentagem de inibição para as concentrações de 2 e 5 μM , relativas ao ensaio na ausência do inibidor (Tabela III). O formestano (4-hidroxiandrostenediona), um dos mais potentes esteróides inibidores da aromatase foi utilizado como composto de referência demonstrando uma capacidade de inibição de cerca de $98,7 \pm 0,25$ %. Neste sistema o exemestano na concentração de 2 μM demonstra uma capacidade de inibição de cerca de 77% e inibe fortemente a enzima aromatase numa concentração de 5 μM para valores próximos do formestano ($99 \pm 0,22$ %). Este estudo permite a escolha de concentrações favoráveis para investigação posterior da acção do exemestano a nível de culturas celulares da linha MCF-7aro.

Composto	Concentração (μM)	Inibição (%)
Formestano	0,5	$98,7 \pm 0,25$
Exemestano	2	$77,2 \pm 1,5$
Exemestano	5	$99 \pm 0,22$

Tabela III. Inibição da actividade da aromatase a nível dos compostos exemestano e formestano. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de três experiências realizadas em triplicado.

4.2. - Estudos morfológicos

De forma a avaliar possíveis alterações morfológicas induzidas pelo exemestano em células MCF-7aro, as células foram cultivadas na presença de 1 nM de testosterona e com ou sem o fármaco durante 3, 6 e 9 dias. As células foram examinadas através de três metodologias: microscopia de contraste de fase, coloração de Giemsa e coloração de Hoechst. As células controlo, tratadas apenas com meio e testosterona (1 nM), não revelaram qualquer alteração morfológica durante os diferentes períodos de incubação (figura 5, 7 e 9-A e E; figura 6,8 e 10-A), bem como as células tratadas com exemestano a 2,5 μ M (dados não apresentados). Após 3 dias de incubação com diferentes concentrações de exemestano, apenas para a concentração de 15 μ M as alterações morfológicas começaram a ser evidentes (figura 5, 7 e 9-D e H; figura 6, 8 e 10-D). Contudo, após 6 e 9 dias de tratamento com o exemestano, as células MCF-7aro demonstraram alterações morfológicas mais acentuadas à medida que ocorre um aumento das concentrações (10-15 μ M, figura 5, 7 e 9-C, D, G e H; figura 6, 8 e 10-C e D). A não adesão das células à superfície de crescimento começou a ser visível aos 3 dias na concentração de 15 μ M (figura 5-D). Foi ainda observada a formação de projecções membranares *blebs*. Com o aumento do tempo de exposição estes efeitos começaram a ser visíveis também a menores concentrações (10 e 15 μ M) (figura 7-C e D; 9-C e D). Para as mesmas condições, a coloração de Giemsa revelou para além de uma redução do número de células, condensação da cromatina e o aparecimento de pequenos vacúolos (figura 5-H; 7-G e H; 9-G e H). Para a coloração de Hoechst, verificou-se uma gradual condensação de cromatina nuclear (identificada pela marcação mais intensa na microscopia de fluorescência) mais evidente a concentrações elevadas de exemestano (figura 6-D; 8-C e D; 10-C e D). Em algumas células foi ainda visível a fragmentação da cromatina. Assim as principais alterações morfológicas como o destacamento de células, a condensação e fragmentação da cromatina, sugerem um efeito dependente da concentração e do tempo de exposição.

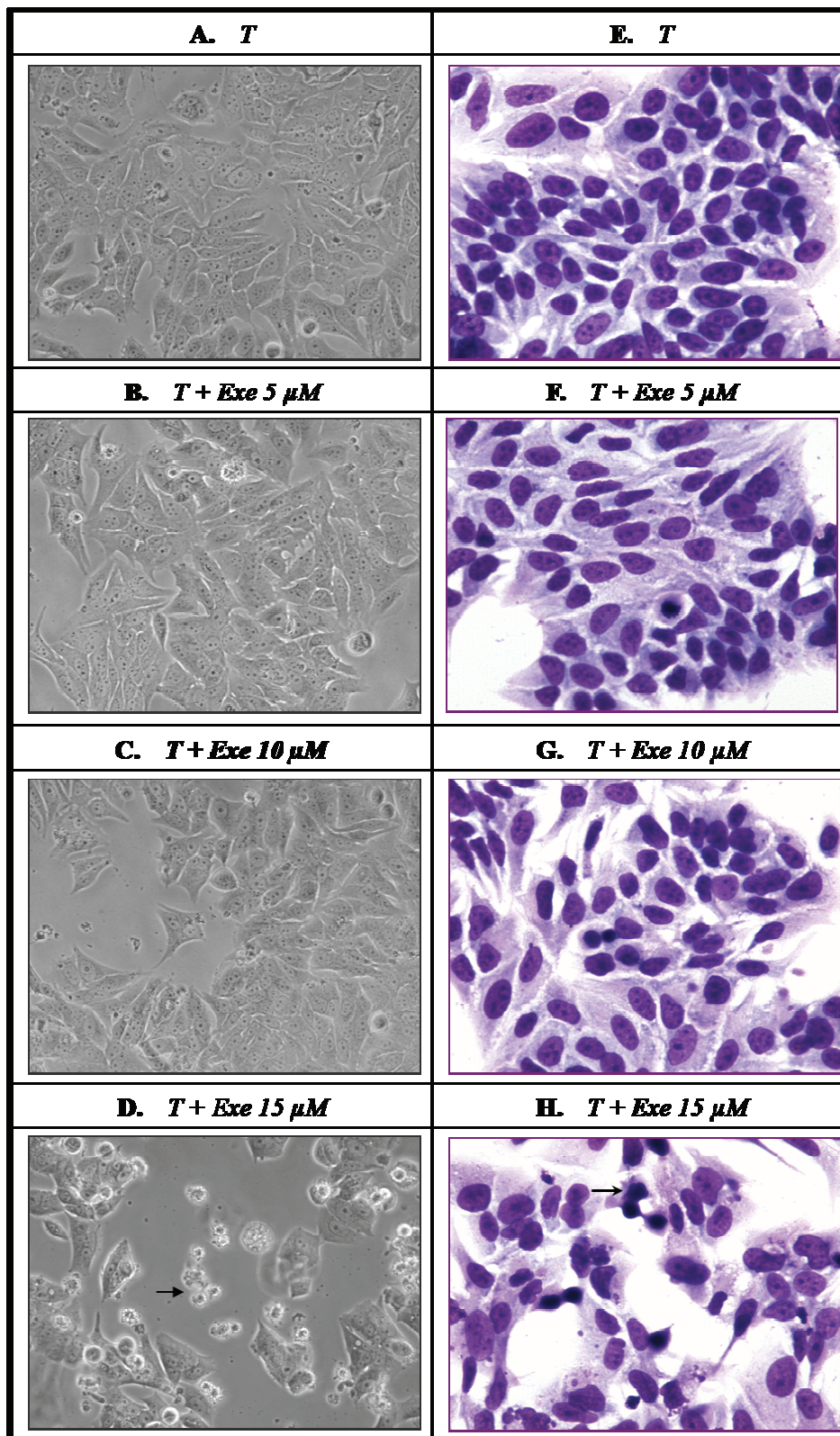


Figura 5. Alterações morfológicas observadas por microscopia de contraste de fase (A, B, C e D, 200x) e coloração de Giemsa (E, F, G e H, 400x) nas células MCF-7aro tratadas durante 3 dias com diferentes concentrações do exemestano relativamente ao controlo com testosterona (T) (A e E). Células não aderentes indicadas por (→) e condensação da cromatina por (➤).

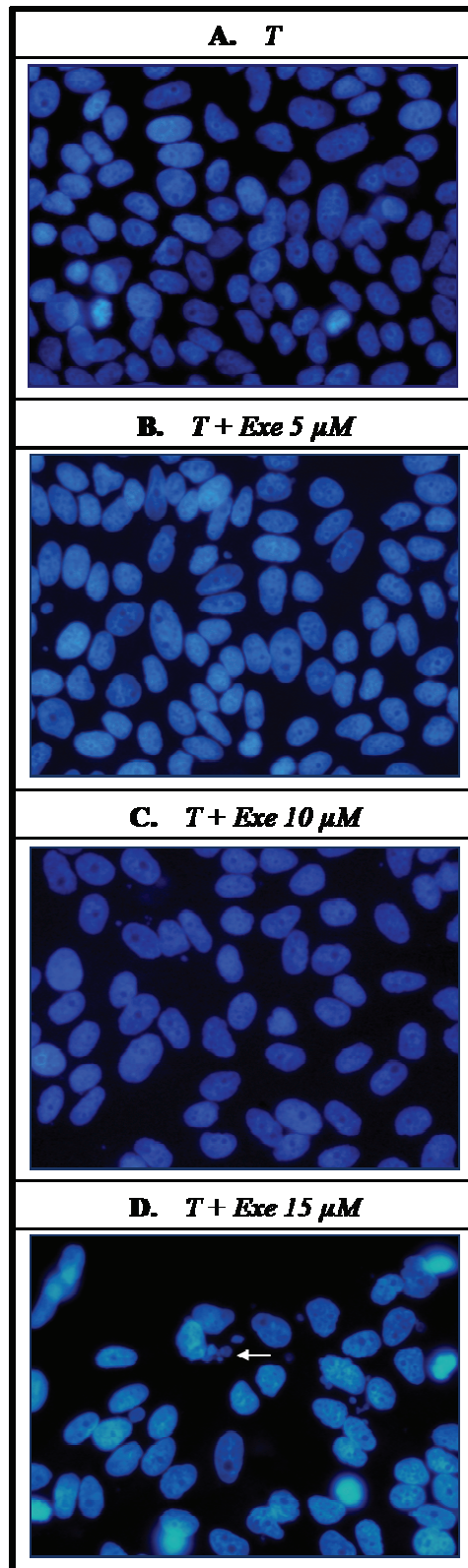


Figura 6. Alterações morfológicas observadas por coloração de Hoechst (A, B, C e D, 400x) nas células MCF-7aro tratadas durante 3 dias com diferentes concentrações de exemestano relativamente ao controlo com testosterona (T) (A). A fragmentação da cromatina é indicada por (►).

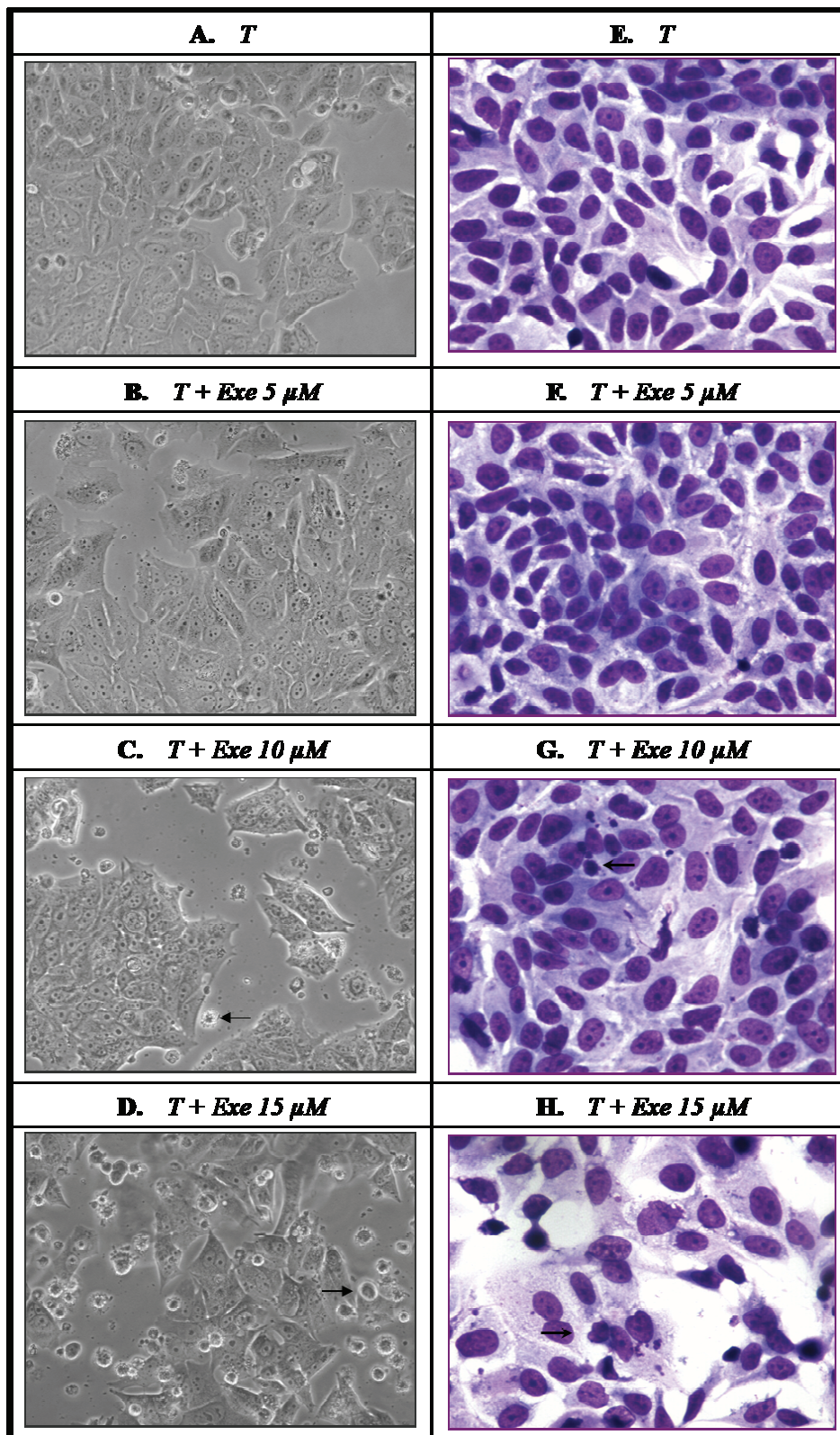


Figura 7. Alterações morfológicas observadas por microscopia de contraste de fase (A, B, C e D, 200x) e coloração de Giemsa (E, F, G e H, 400x) nas células MCF-7aro tratadas durante 6 dias com diferentes concentrações de exemestano relativamente ao controlo com testosterona (T) (A e E). Células não aderentes indicadas por (➡), e condensação de cromatina por (➡).

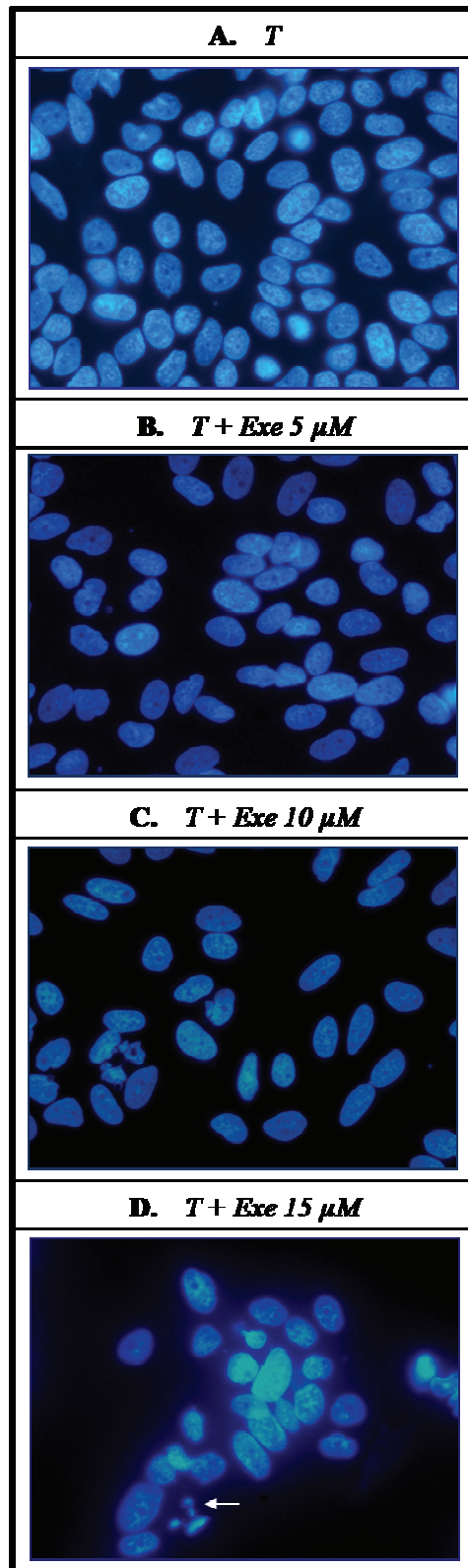


Figura 8. Alterações morfológicas observadas por coloração de Hoechst (A, B, C e D, 400x) nas células MCF-7aro tratadas durante 6 dias com diferentes concentrações de exemestano relativamente ao controlo com testosterona (T) (A). A fragmentação da cromatina é indicada por (►).

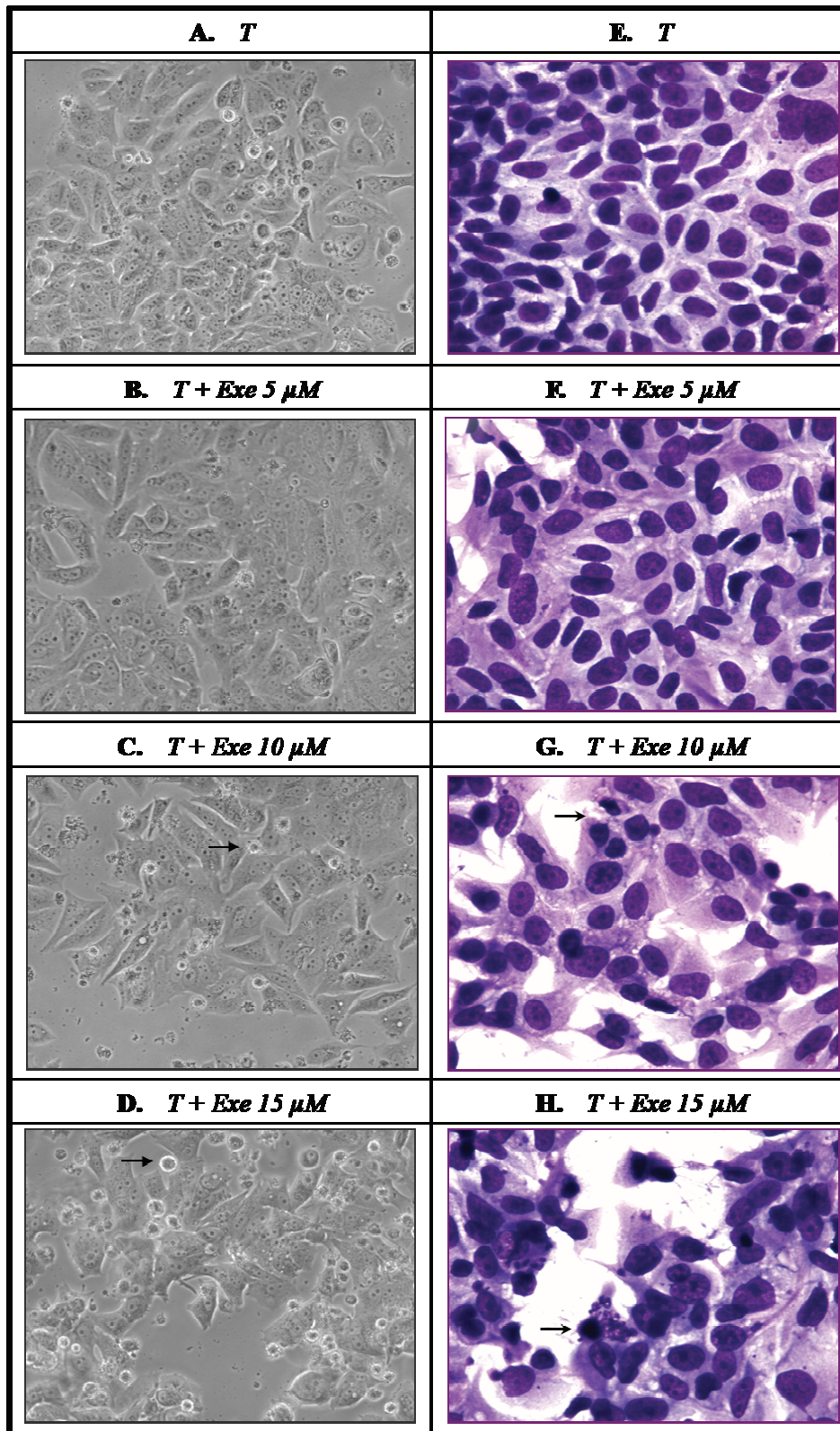


Figura 9. Alterações morfológicas observadas por microscopia de contraste de fase (A, B, C e D, 200x) e coloração de Giemsa (E, F, G e H, 400x) nas células MCF-7aro tratadas durante 9 dias com diferentes concentrações do exemestano relativamente ao controlo com testosterona (T) (A e E). Células não aderentes indicadas por (➔), e condensação da cromatina por (⊣).

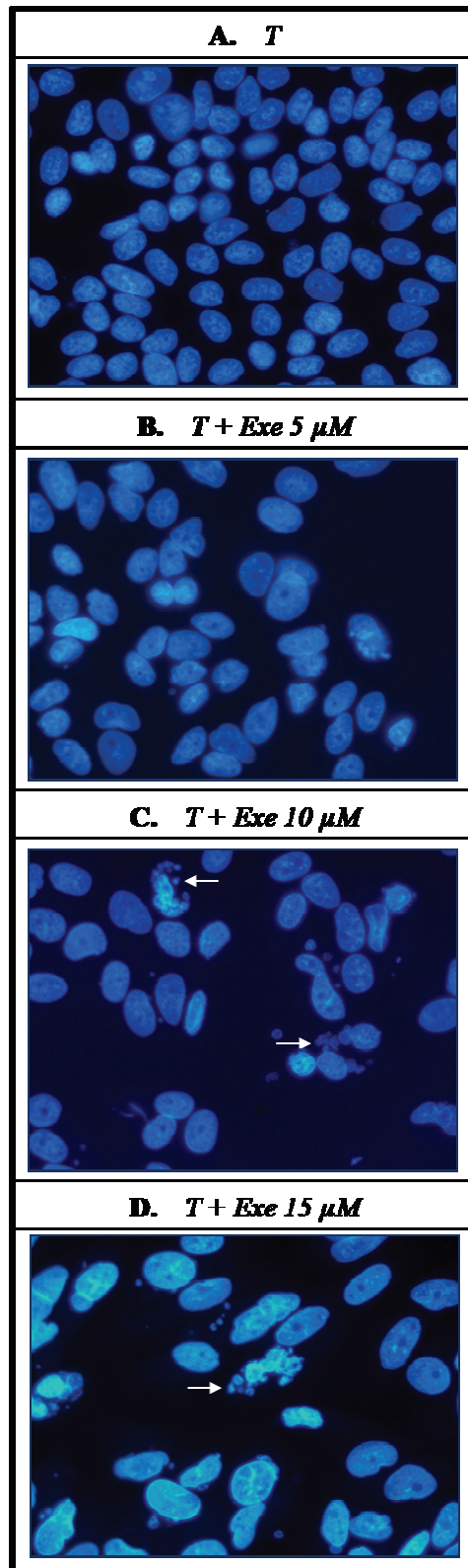


Figura 10. Alterações morfológicas observadas por coloração de Hoechst (A, B, C e D, 400x) nas células MCF-7aro tratadas durante 9 dias com diferentes concentrações de exemestano relativamente ao controlo com testosterona (T) (A). A fragmentação da cromatina é indicada por (►).

4.3. - Análise da viabilidade e proliferação celular

O efeito do exemestano na viabilidade celular foi avaliado pelos testes do MTT e de libertação da enzima lactato desidrogenase LDH. Pela observação da figura 11 relativa ao ensaio de MTT verifica-se um decréscimo na viabilidade celular, com o aumento do período de incubação, bem como com o aumento da concentração de exemestano utilizada, tornando-se significativa a partir da concentração de 15 μM e de 10 e 15 μM após 3, 6 e 9 dias de exposição respectivamente. Demonstra-se assim, uma dependência do tempo e da dose.

Uma outra informação que pode ser retirada dos gráficos apresentados, diz respeito à integridade da membrana celular das MCF-7aro expostas aos diferentes tratamentos, que é avaliada pelos níveis de actividade da LDH libertada após lise da membrana celular e conseqüentemente torna-se um dado indicativo da citotoxicidade do composto exemestano (figura 12). O teste do LDH não revelou para o tratamento com exemestano qualquer efeito significativo na libertação da enzima LDH em relação às células tratadas só com testosterona..

Para avaliar de uma forma mais directa o efeito do exemestano na proliferação celular, realizou-se o ensaio de incorporação de $[\text{H}^3]$ -timidina. Como é demonstrado pela figura 13, as células MCF-7aro tratadas com diferentes concentrações de exemestano, revelam um perfil de inibição da proliferação celular dependente do tempo e da concentração utilizada, em relação ao controlo, células tratadas com testosterona. Assim, aos 3 dias de incubação com o exemestano, obtem-se $109,76 \pm 13,28 \%$, $85,26 \pm 11,81 \%$, $33,23 \pm 17,31 \%$ e $11,26 \pm 0,71 \%$, e aos 6 dias de tratamento $87,75 \pm 8,62 \%$, $54,90 \pm 10,90 \%$, $16,84 \pm 12,26 \%$ e $3,69 \pm 0,01 \%$ de síntese de DNA para as concentrações de 2,5, 5, 10 e 15 μM de exemestano, respectivamente. Aos 9 dias de incubação apenas se realizaram ensaios com as concentrações de 2,5, 5 e 10 μM , uma vez que já aos 6 dias de tratamento a concentração mais elevada (15 μM) apresentava uma percentagem muito baixa de proliferação. Assim, as percentagens obtidas para os 9 dias com as concentrações de 2,5, 5 e 10 μM são, respectivamente, $70,54 \pm 6,84 \%$, $23,03 \pm 2,06 \%$ e $0,75 \pm 0,26 \%$.

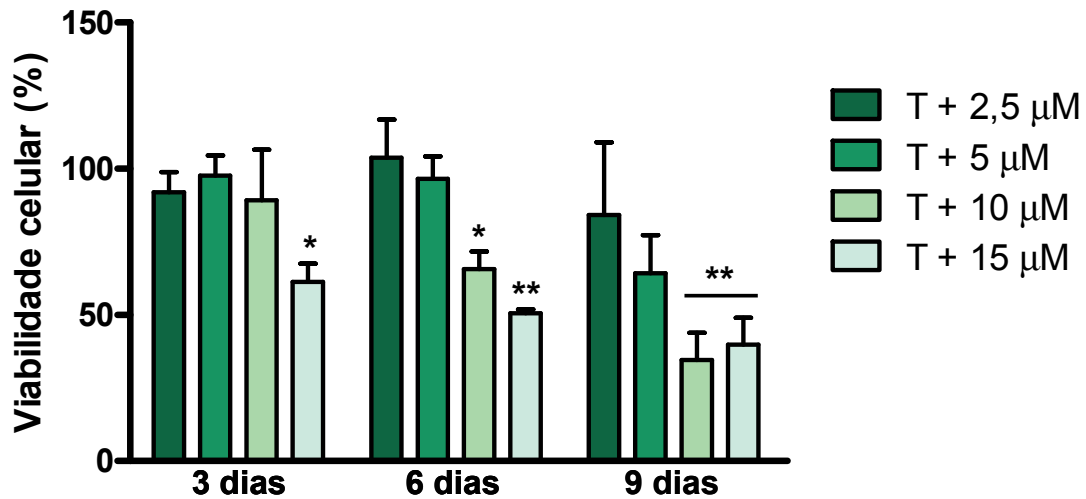


Figura 11. Alterações na viabilidade celular – MTT – na linha celular MCF-7aro, com 3 a 9 dias de incubação com exemestano (2,5 – 15 μM). As células tratadas com testosterona (T) são consideradas como o máximo da viabilidade celular (100 %), representando o controle. Os resultados são expressos em média ± SEM. As diferenças significativas, relativas ao controle, são conotadas como * ($p < 0,05$) e **($p < 0,01$).

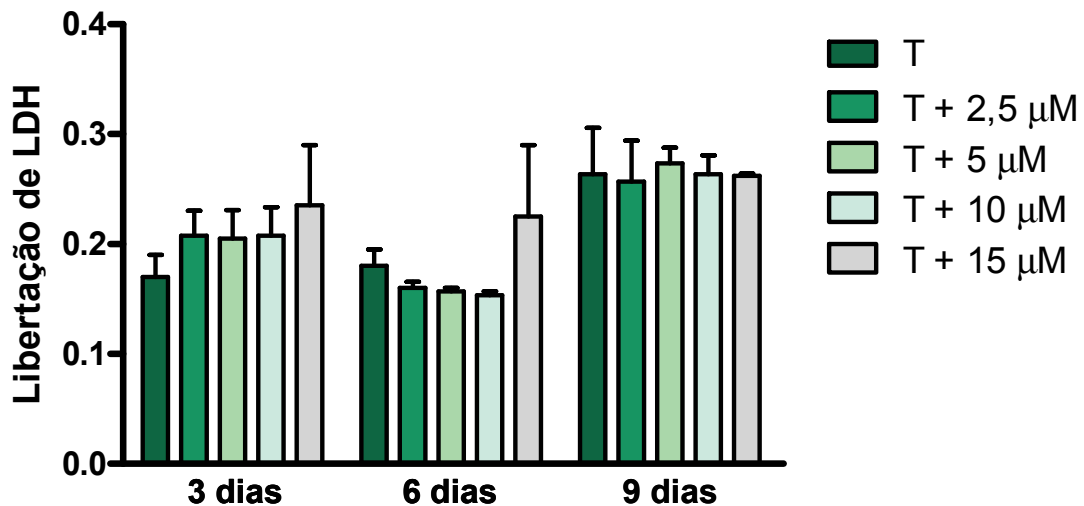


Figura 12. Alterações na liberação da enzima lactato desidrogenase na linha celular MCF-7aro, com 3 a 9 dias de incubação com exemestano (2,5 – 15 μM). As células tratadas com testosterona (T) representam o controle. Os resultados são expressos em média ± SEM das leituras ópticas, não apresentando diferenças estatisticamente significativas em relação à testosterona (controle).

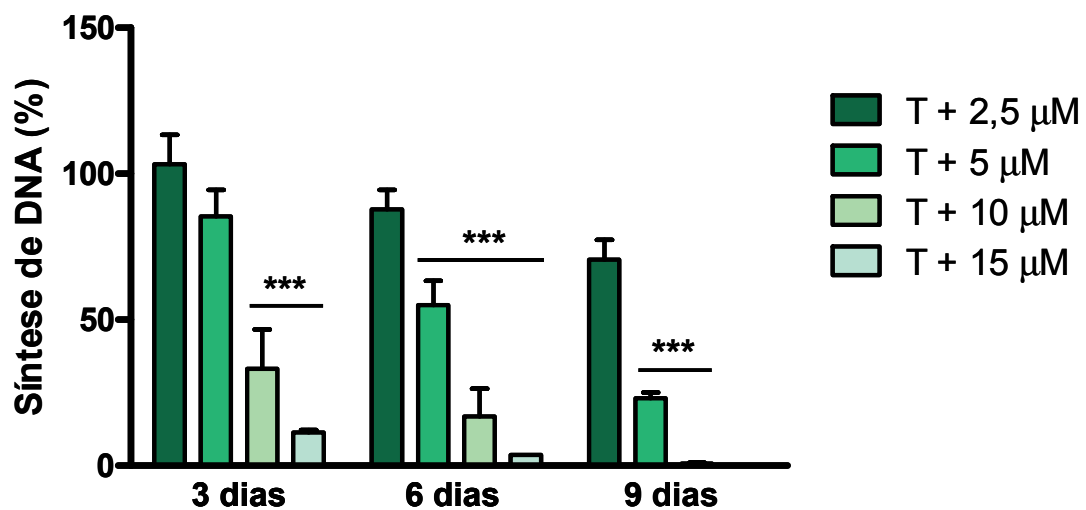


Figura 13. Alterações a nível da proliferação celular (nível de síntese de DNA) na linha celular MCF-7aro, com 3 a 9 dias de incubação com exemestano (2,5 – 15 μM). As células tratadas com testosterona (T) são consideradas como o máximo da viabilidade celular (100 %), representando o controlo. Os resultados são expressos em média ± SEM. As diferenças significativas, relativas ao controlo, são conotadas como *** ($p < 0,001$).

4.4. - Análise do ciclo celular

Para analisar se o efeito antiproliferativo do exemestano se deve a uma influência a nível do ciclo celular, foi avaliado o conteúdo de DNA por marcação com IP por citometria de fluxo. Esta análise foi realizada a partir da aquisição de 20 000 células dentro das regiões R1 e R2, como apresentado na figura 14.

As células MCF-7aro que não foram sujeitas a qualquer tipo de tratamento apresentam $88,77 \pm 1,74$ % de células na fase G_0/G_1 , enquanto que nas MCF-7aro tratadas com testosterona a percentagem de células retidas em G_0/G_1 é de $70,49 \pm 0,72$ %, indicando que a aromatase presente está a converter a testosterona a estradiol e, conseqüentemente a promover a proliferação celular. As células MCF-7aro tratadas com exemestano a 2,5, 5 e 10 μM apresentam um aumento da percentagem de células na fase G_0/G_1 comparativamente às células com testosterona. Este aumento é acompanhado por uma diminuição da percentagem de células na fase S e G_2/M (figura 15; tabela IV) e está relacionado com concentrações crescentes de exemestano.

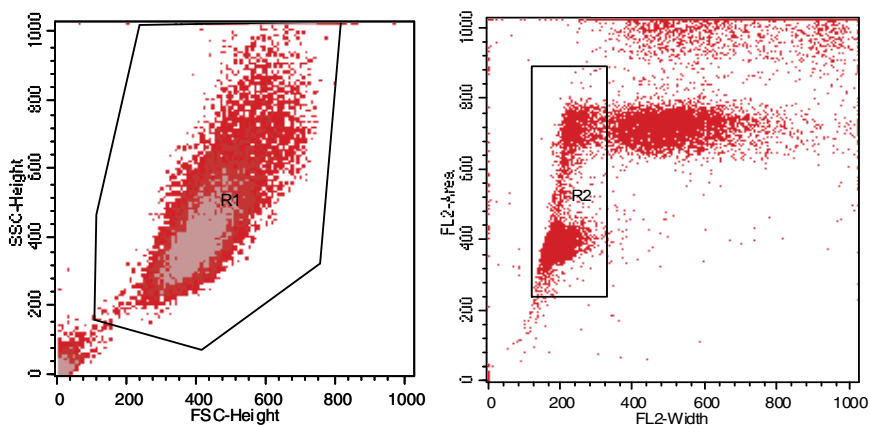


Figura 14. Regiões delineadas para a análise do ciclo celular (R1 e R2).

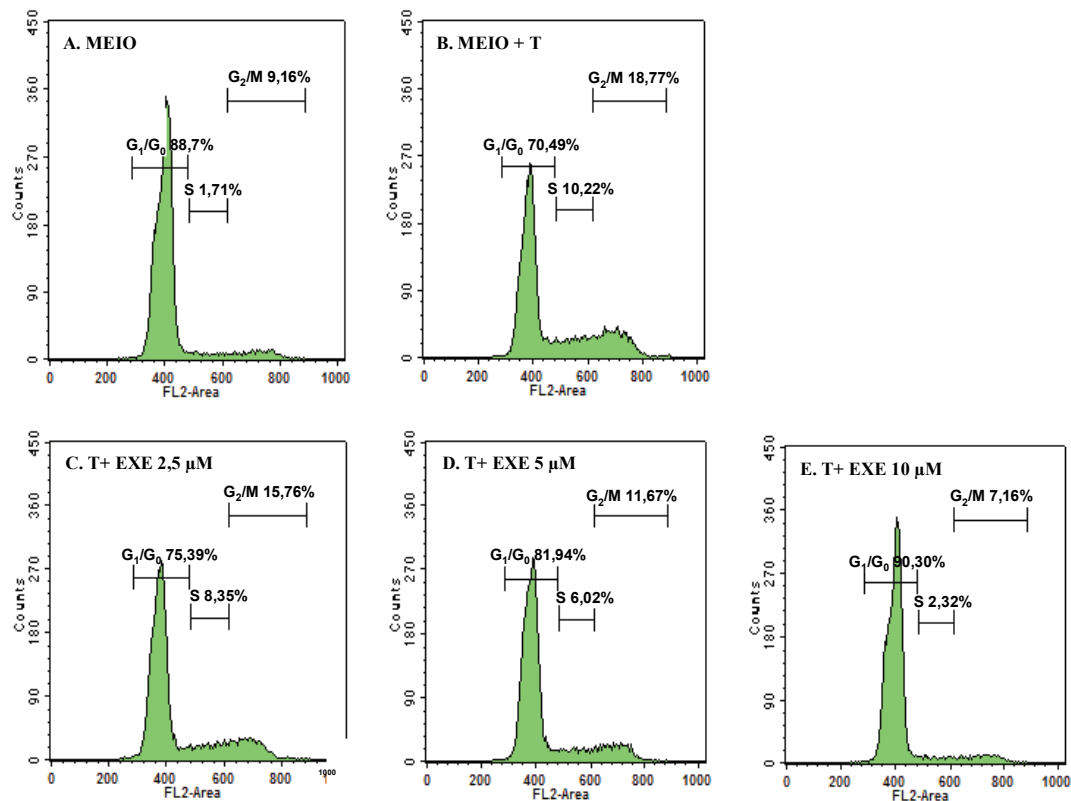


Figura 15. Efeito do exemestano no ciclo celular. As células MCF-7aro foram tratadas com exemestano 2,5-10 μM (C-E) durante 3 dias, e sujeitas a citometria de fluxo após a marcação com iodeto de propídeo (IP). Observa-se que o exemestano induz uma retenção do ciclo celular na fase G_0/G_1 com o aumento da concentração, comparativamente à testosterona. Os resultados são representativos de duas experiências independentes.

	Meio	Testosterona (T)	T + Exe 2,5 μM	T + Exe 5 μM	T + Exe 10 μM
G_0/G_1	88,77 \pm 1,74	70,49 \pm 0,79	75,39 \pm 0,72	81,94 \pm 0,14	90,30 \pm 0,97
S	1,71 \pm 0,35	10,22 \pm 1,22	8,35 \pm 0,77	6,02 \pm 0,54	2,32 \pm 0,16
G_2/M	9,16 \pm 1,35	18,77 \pm 0,44	15,76 \pm 1,47	11,67 \pm 0,67	7,16 \pm 1,09

Tabela IV. Efeito do composto exemestano (2,5-10 μM) no ciclo celular. Os resultados são expressos em média \pm SE das percentagens obtidas em cada uma das fases do ciclo celular na linha celular MCF-7aro. Os resultados são representativos de duas experiências independentes.

4.5. - Análise da morte celular

Como demonstrado pelos estudos morfológicos, o composto exemestano induz alterações a nível da morfologia das MCF-7aro, nomeadamente a condensação e fragmentação da cromatina. Assim, e de forma a investigar o processo pelo qual o composto exemestano induz morte celular, avaliou-se uma das alterações que ocorrem no início do processo apoptótico, a exposição de fosfatidilserina (PS) no folheto externo da membrana citoplasmática, através do kit Anexina V-PE por citometria de fluxo. Esta análise foi realizada a partir da aquisição de 10 000 células dentro da região R1, como apresentado pela figura 16.

As células foram duplamente marcadas com Anexina V-PE (liga-se à fosfatidilserina) e com 7-AAD (marcador da viabilidade celular). Assim, através da análise dos dados apresentados na tabela V, verifica-se um aumento progressivo na percentagem de células apoptóticas, quer para os 3, quer para os 6 dias, com o aumento da concentração de exemestano. Este facto, torna-se mais evidente na concentração de 10 μ M, na qual aos 3 e 6 dias de incubação se verifica um aumento de 2 e 3 vezes na percentagem de células apoptóticas em relação ao controlo com testosterona, respectivamente. Estes dados também são demonstrados pelos histogramas da figura 17, onde se verifica um aumento de marcação para a Anexina V-PE, indicando um aumento de fosfatidilserina exposta nas células tratadas com exemestano a 10 μ M, comparativamente às células tratadas com testosterona aos 6 dias de incubação.

Estes dados são assim indicativos de um possível processo de morte celular programada mediado pelo exemestano, dependente do tempo e das concentrações utilizadas. No entanto, os dados apresentados para esta metodologia são apresentados como dados preliminares. É por isso necessário a realização de mais experiências para a confirmação destes resultados.

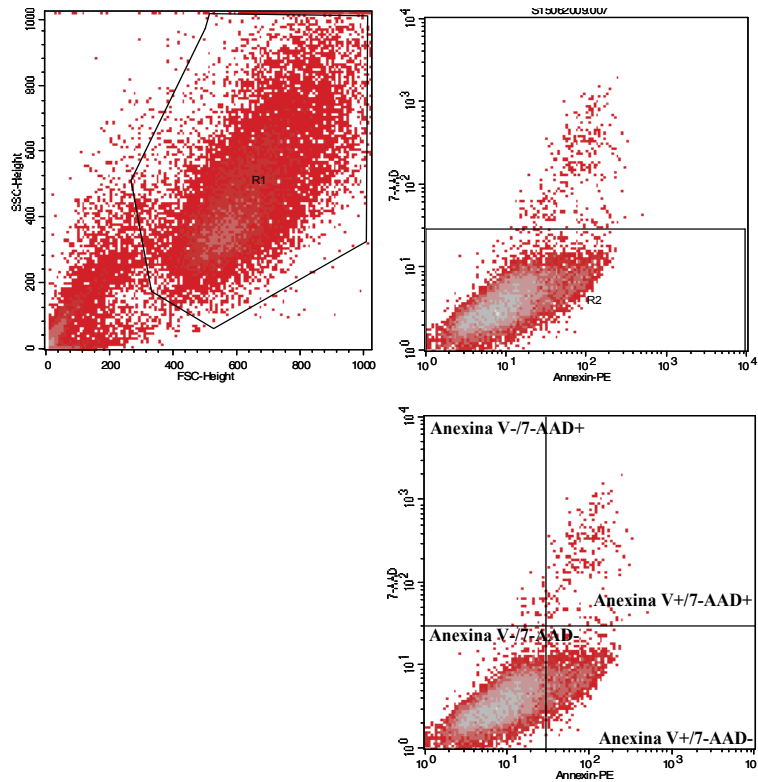


Figura 16. Regiões delimitadas para a análise da viabilidade celular e apoptose (R1 e R2).

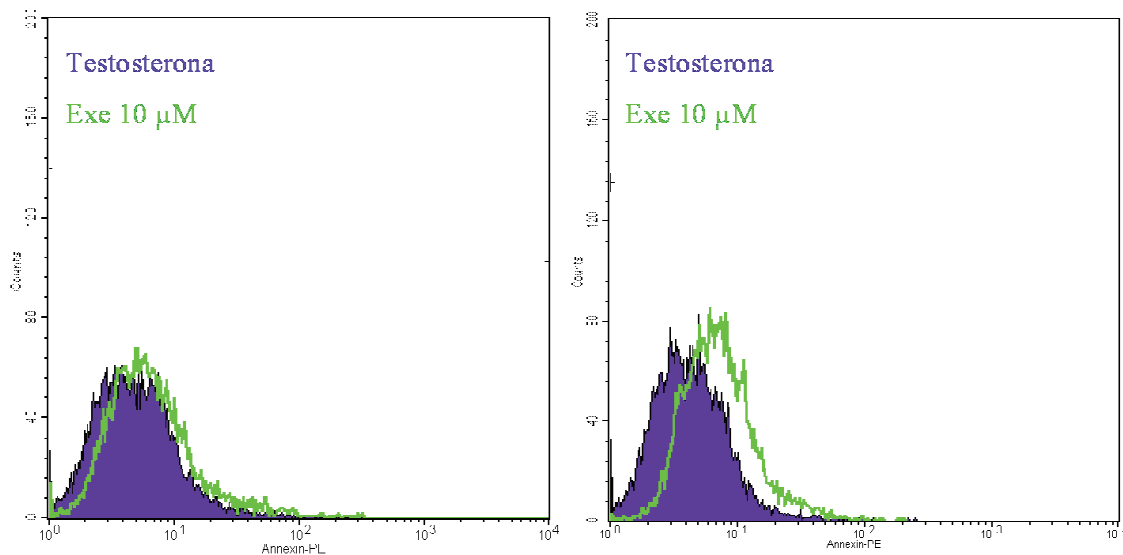


Figura 17. Efeito do exemestano na morte celular por apoptose. As células MCF-7aro foram expostas durante 3 (A) e 6 dias (B), e sujeitas a citometria de fluxo após a marcação Anexina V/7-AAD. Os dados apresentados são referentes à concentração de 10 μM . Observa-se que o composto induz um aumento do número de células apoptóticas (Anexina V⁺/7-AAD⁺). Os histogramas são representativas das janelas R1 e R2 referidos na figura 16.

A	Meio	Testosterona (T)	T + Exemestano 2,5 μM	T + Exemestano 5 μM	T + Exemestano 10 μM
<i>Anexina V⁻/7-AAD⁻</i>	85,42 \pm 0,22	88,82 \pm 0,13	88,68 \pm 0,56	87,71 \pm 0,79	84,86 \pm 0,77
<i>Anexina V⁺/7-AAD⁻</i>	8,79 \pm 0,69	4,92 \pm 0,19	7,38 \pm 0,94	7,77 \pm 1,10	9,79 \pm 0,34
<i>Anexina V⁺/7-AAD⁺</i>	5,08 \pm 0,66	5,07 \pm 0,14	3,46 \pm 0,36	3,96 \pm 0,23	4,85 \pm 0,41
B	Meio	Testosterona (T)	T + Exemestano 2,5 μM	T + Exemestano 5 μM	T + Exemestano 10 μM
<i>Anexina V⁻/7-AAD⁻</i>	86,42 \pm 1,68	93,02 \pm 0,35	91,62 \pm 0,22	88,85 \pm 1,58	85,74 \pm 0,00
<i>Anexina V⁺/7-AAD⁻</i>	8,00 \pm 0,55	3,37 \pm 0,84	3,18 \pm 0,13	5,51 \pm 1,09	9,00 \pm 0,00
<i>Anexina V⁺/7-AAD⁺</i>	5,27 \pm 1,04	3,22 \pm 0,36	4,36 \pm 0,27	4,92 \pm 0,42	4,67 \pm 0,00

Tabela V. Efeito do composto exemestano a nível da morte celular em MCF-7aro. Observa-se um aumento na percentagem de células Anexina V⁺/7-AAD⁻, em relação ao controlo de testosterona, enquanto as percentagens de células Anexina V⁻/7-AAD⁻ e Anexina V⁺/7-AAD⁺ mantêm-se estáveis para as diferentes concentrações de exemestano. Os resultados são expressos em média \pm SE das percentagens obtidas em cada um dos quadrantes dos *dot-plots* apresentados na figura 16.

Capítulo 5.

Discussão e Conclusão

Sabe-se que o estrogénio estimula o crescimento de células cancerígenas que expressam receptores de estrogénio por estimulação da progressão do ciclo celular. Este estudo explora os efeitos *in vitro* do composto exemestano no crescimento celular de MCF-7aro, na progressão do ciclo celular e na indução da morte celular. O modelo utilizado, a linha celular de cancro da mama MCF-7aro, possui elevadas quantidades de aromatase permitindo assim, o crescimento celular via a aromatização da testosterona a estradiol. De facto, o androgénio utilizado estimula significativamente o crescimento das células MCF-7aro em concentrações tão baixas como 1 nM, a qual se encontra dentro dos parâmetros fisiológicos. No presente trabalho, demonstra-se que o exemestano inibe eficientemente a enzima aromatase a nível dos microsomas placentários, um sistema onde a aromatase está directamente disponível para a acção do inibidor, podendo assim, explicar o facto do exemestano já apresentar uma elevada taxa de inibição mesmo para a concentração de 2 µM. Recorrendo ao uso de um sistema celular mais complexo, a linha celular MCF-7aro, o exemestano também demonstrou inibir eficientemente a acção proliferativa da testosterona, indicando que a aromatização de androgénios com a produção de E₂ é responsável pelo crescimento celular mediado pela testosterona.

As concentrações de exemestano utilizadas neste estudo, que provocam alterações a nível morfológico e celular, são superiores quando comparadas com as utilizadas no sistema microsomal. Este facto pode ser, no entanto, explicado pela sobre-expressão da enzima aromatase nas células MCF-7aro. Parece assim, ser necessário concentrações mais elevadas de exemestano, para que possa ser produzido um efeito observável a nível das células tumorais. Cepa *et al* (2008-a,b) também comprovou que os compostos 3a e 4a (novos IAs com alterações a nível do anel A e D, em relação ao substrato natural, a androstenediona) demonstravam ser menos eficientes na inibição da aromatase em células MCF-7aro, provavelmente devido à sobre-expressão dos níveis de aromatase.

O efeito *in vitro* do composto exemestano revelou o aparecimento de alterações morfológicas a nível das células MCF-7aro, como *blebs* de membrana e condensação e fragmentação da cromatina, nas células expostas a concentrações de 10 e 15 µM. Verificou-se ainda um decréscimo da viabilidade celular dependente do tempo e da concentração de exemestano utilizada. A capacidade de inibição da proliferação celular induzida pelo exemestano é muito marcada desde logo aos três dias de incubação verificando-se ainda um aumento com a progressão do tratamento. Esta inibição da proliferação celular, foi também acompanhada por uma retenção do ciclo celular na fase

G₀/G₁, sendo bloqueada a transição da fase G₁/S, aos 3 dias de tratamento. Este efeito torna-se ainda mais acentuado para a concentração de exemestano 10 µM, onde a acção da testosterona está completamente comprometida. No entanto, e uma vez que ainda existe uma fracção percentual de células em fase S, e também de acordo com os resultados do ensaio de incorporação de [H³]-timidina, pode-se concluir que a proliferação celular continua, numa escala inferior comparativamente às células tratadas com testosterona.

A prevenção da entrada na fase S e G₂/M, foi também observada em células MCF-7aro, quando sujeitas a tratamento hormonal com outros IAs, como o letrozol, anastrozol e formestano, por outros investigadores (Truchet *et al.*, 2000; Thiantanawat *et al.*, 2003). A acção do letrozol estava associada com a maior expressão de p53 e p21 e diminuição da expressão de *ciclina D1* e *c-myc*.

Contudo, pensa-se que os mecanismos envolvidos na redução da proliferação e crescimento celular em MCF-7aro, induzidos pelo tratamento com o exemestano, não sejam apenas mediados por uma retenção do ciclo celular, mas que também possam estar envolvidos processos de morte celular. Alguns estudos indicam que tratamentos anti-estrogénicos com o TAM (Mandlekar *et al.*, 2001; Obrero *et al.*, 2002; Siamak *et al.*, 2003), o fulvestrant (Lim *et al.*, 2001), o letrozol e o anastrozol (Thiantanawat *et al.*, 2003) induzem morte celular por apoptose em células de cancro da mama estrogénio-dependentes. Assim, torna-se importante perceber os mecanismos associados à morte celular como resultado do tratamento de células RE+ com IAs.

Quando os danos a nível celular são acumulados de uma forma irreversível, então as células mitóticas entram num dos processos celulares, de forma a evitar a proliferação celular. Elas podem assim, reter permanentemente o ciclo celular, ou alcançar programas de morte celular. A apoptose é o programa de morte celular mais bem descrito (Derectic *et al.*, 2008; Vicencio *et al.*, 2008).

Os resultados apresentam para além de alterações morfológicas típicas de células que em apoptose, um aumento da ligação da Anexina V, para os 3 e 6 dias de incubação com o exemestano, direccionando as nossas conclusões para um possível processo de morte celular apoptótico, pois a exposição de fosfatidilserina tem um papel chave na distinção de células apoptóticas. No entanto, apresentam-se apenas como dados preliminares, sendo necessário um maior número de experiências de ligação da Anexina V-PE, de forma a confirmar o efeito observado.

Evidenciando a apoptose como o possível processo de morte celular pelo qual o exemestano actua, torna-se então pertinente discutir os mecanismos celulares envolvidos. Sabe-se que a linha celular MCF-7aro não possui caspase 3, como resultado da deleção genómica do gene *casp-3* (Jänicke *et al.*, 1998). Neste caso, sendo as caspases efectoras as de maior relevância na execução da apoptose, o exemestano provavelmente induzirá a activação de outras caspases, já que as caspases iniciadoras como a caspase-8 ou a caspase-9 podem activar as vias apoptóticas não só através da activação da caspase-3 mas também através da activação da caspase-7. De facto o tamoxifeno e o letrozol induzem a activação de caspase-9 e caspase-7 em MCF-Ca (Thiantanawat *et al.*, 2003) e uma diminuição da expressão de Bcl-2. Para se poder avaliar a importância da via mitocondrial neste processo, bem como a actuação das caspases, ter-se-ia que avaliar a expressão de proteínas pró-apoptóticas, alterações do potencial de membrana (MMP), detecção da libertação de citocromo *c* da mitocôndria e a avaliação da actividade da caspase-9, a caspase iniciadora da via mitocondrial. Assim, estudos a nível da regulação da sinalização da apoptose mediada por terapias anticancerígenas, providenciam novos mecanismos de regulação da resposta das células tumorais, podendo, inclusive, conduzir à identificação de novos alvos de intervenção terapêutica e à resolução dos processos celulares que levam ao aparecimento de resistências.

Em suma, todos os resultados aqui apresentados bem como a avaliação de outros IAs por este laboratório (Cepa *et al.*, 2005;2008-a,b), permitem-nos sugerir a linha celular de cancro da mama MCF-7aro como um modelo *in vitro* para a avaliação dos efeitos de crescimento-inibição dos compostos utilizados na terapia, bem como para elucidar mecanismos de morte e proliferação celular induzidos pelo tratamento hormonal de células do cancro da mama, pois até ao momento, poucos foram os trabalhos de investigação que se realizaram neste sentido, sobretudo no que respeita ao inibidor exemestano, que presentemente é utilizado na clínica.

Referências bibliográficas

- Ackerman G. E., Smith M. E., Mendelson C. R., MacDonald P. C. & E. R. Simpson (1981). Aromatization of androstenedione by human adipose tissue stromal cells in monolayer culture. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 53: 412-417.
- Adamo V., Iorfida M., Montalto E., Festa V., Garipoli C., Scimone A., Zanghì M. & N. Caristi (2007). Overview and new strategies in metastatic breast cancer (MBC) for treatment of tamoxifen-resistant patients. *Annals of Oncology* 18 Suppl 6:vi53-7.
- Adrain C. & S. J. Martin (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends in Biochemical Sciences* 26(6):390-7.
- Arpino G., Wiechmann L., Osborne C., Schiff R. & S. Lester (2008). Crosstalk between the estrogen receptor and the HER tyrosine kinase receptor family: molecular mechanism for endocrine therapy resistance. *Endocrine Reviews* 29: 217-233.
- Bai Z. & Gust R. (2009). Breast cancer, estrogen receptor and ligands. *Archives of Pharmacology* 342(3): 133-49.
- Barnadas A., Gil M., González S., Tusquets I., Muñoz M., Arcusa A., Prieto L., Margelí-Vila M. & A. Moreno (2009). Exemestane as primary treatment of oestrogen receptor-positive breast cancer in postmenopausal women: a phase II trial. *British Journal of Cancer* 10;100(3):442-9.
- Barone R. M., Shamonki I. M., Siiteri P. K. & H. L. Judd (1982). Inhibition of peripheral aromatization of androstenedione to estrone in post-menopausal women with breast cancer using Δ^1 -testoslactone. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 49: 672-676.
- Bastos J., Barros H. & N. Lunet (2007). Evolução da mortalidade por cancro da mama em Portugal(1955-2002). *Acta Medica Portuguesa* 20: 139-144.

- Bauvy C., Gane P., Arico S., Codogno P. & E. Ogier-Denis (2001). Autophagy delays sulindac sulfide-induced apoptosis in the human intestinal colon cancer cell line HT-29. *Experimental Cell Research* 268(2): 139-49.
- Bey E., Marchais-Oberwinkler S., Kruchten P., Frotscher M., Werth R., Oster A., Algül O., Neugebauer A. & R. W. Hartmann (2008). Design, synthesis and biological evaluation of bis(hydroxyphenyl) azoles as potent and selective non-steroidal inhibitors of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17beta-HSD1) for the treatment of estrogen-dependent diseases. *Bioorganic Medicinal Chemistry* 16(12): 6423-35.
- Bernales S., McDonald K. L. & P. Walter (2006). Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biology* 4(12): e423.
- Bocchinfuso W. & K. Korach (1997). Mammary gland development and tumorigenesis in estrogen receptor knockout mice. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2: 323-334.
- Boya P., González-Polo R. A., Casares N., Perfettini J. L., Dessen P., Larochette N., Métivier D., Meley D., Souquere S., Yoshimori T., Pierron G., Codogno P. & G. Kroemer (2005). Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Molecular Cell Biology* 25(3): 1025-40.
- Boyle P. & J. Ferlay (2005). Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Annals of Oncology* 16(3): 481-8.
- Bratton S. B., MacFarlane M., Cain K. & G. M. Cohen (2000). Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. *Experimental Cell Research* 10;256(1): 27-33.
- Brueggemeier R. W., Hackett J. C. & E. S. Diaz-Cruz (2005). Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. *Endocrine Reviews* 26(3): 331-45.

- Bulun S. E., Lin Z., Zhao H., Lu M., Amin S., Reierstad S. & D. Chen (2009). Regulation of aromatase expression in breast cancer tissue. *Annals New York Academy of Sciences* 1155: 121-31.
- Bulun S. E., Lin Z., Imir G., Amin S., Demura M., Yilmaz B., Martin R., Utsunomiya H., Thung S., Gurates B., Tamura M., Langoi D. & S. Deb (2005). Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment. *Pharmacological Reviews* 57(3): 359-83.
- Campos S. M. (2004). Aromatase inhibitors for breast cancer in postmenopausal women. *Oncologist* 9(2): 126-36.
- Carlson R. W. (2002). Sequencing of endocrine therapies in breast cancer--integration of recent data. *Breast Cancer Research Treatment* 75 Suppl 1: S27-32.
- Cepa M, Correia-da-Silva G, da Silva EJ, Roleira FM, Borges M & N. A. Teixeira (2008-a). New steroidal aromatase inhibitors: suppression of estrogen-dependent breast cancer cell proliferation and induction of cell death. *BMC Cell Biology* 24;9: 41.
- Cepa M., Correia-da-Silva G., Tavares da Silva E. J., Roleira F. M., Hong Y., Chen S. & N. A. Teixeira (2008-b). Molecular mechanisms of aromatase inhibition by new A, D-ring modified steroids. *Biological Chemistry* 389(9): 1183-91.
- Cepa M., Tavares da Silva E. J., Correia-da-Silva G., Roleira F. M. & N. A. Teixeira (2005). Structure-activity relationships of new A,D-ring modified steroids as aromatase inhibitors: design, synthesis, and biological activity evaluation. *Journal of Medicinal Chemistry* 6;48(20): 6379-85.
- Chen L., Qiu J., Yang C., Yang X., Chen X., Jiang J. & X. Luo (2009). Identification of a novel estrogen receptor beta1 binding partner, inhibitor of differentiation-1, and role of ERbeta1 in human breast cancer cells. *Cancer Letters*. 18;278(2): 210-9.

- Chen S. (1998). Aromatase and breast cancer. *Frontiers in Bioscience* 6;3: d922-33.
- Chen S., Zhou D., Okubo T., Kao Y. C. & C. Yang (1999). Breast tumor aromatase: functional role and transcriptional regulation. *Endocrine Related Cancer* 6(2): 149-56.
- Cheng E. H., Wei M. C., Weiler S., Flavell R. A., Mak T. W., Lindsten T. & S. J. Korsmeyer (2001). BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Molecular Cell* 8(3): 705-11.
- Christov K., Grubbs C. J., Shilkaitis A., Juliana M. M. & R. A. Lubet (2007). Short-term modulation of cell proliferation and apoptosis and preventive/therapeutic efficacy of various agents in a mammary cancer model. *Clinical Cancer Research* 13(18 Pt 1): 5488-96.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (2002). Breast cancer and breast feeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50,302 women with breast cancer and 96,973 women without the disease. *Lancet* 360: 187-195.
- Cui Q., Tashiro S., Onodera S., Minami M. & T. Ikejima (2007). Autophagy preceded apoptosis in oridonin-treated human breast cancer MCF-7 cells. *Biological Pharmacology Bulletin* 30(5): 859-64.
- Cuzick J. (2008). Aromatase inhibitors in early breast cancer treatment: the story so far. *The Breast* 17: S2-S8.
- Debatin K. M. (2004). Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunology and Immunotherapy* 53(3): 153-9.
- Debatin K. M. (1999). The role of CD95 system in chemotherapy. *Drug Resistance Update* 2(2): 85-90.

- Debatin K. M. (1997). Anticancer drugs, programmed cell death and the immune system: defining new roles in an old play. *Journal of the National Cancer Institute* 89: 750-753.
- Degen W. G., Pruijn G. J., Raats J. M. & W. J. van Venrooij (2000). Caspase-dependent cleavage of nucleic acids. *Cell Death and Differentiation* 7(7): 616-27.
- Deretic V. & D. Klionsky (2008). How cells clean house. *Scientific American* 298:74-81.
- Earnshaw W. C., Martins L. M. & S. H. Kaufmann (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual Reviews of Biochemistry* 68: 383-424.
- Earnshaw W. C. (1995). Nuclear changes in apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology* 7(3): 337-43.
- Eisenberg-Lerner A. & A. Kimchi (2009). The paradox of autophagy and its implication in cancer etiology and therapy. *Apoptosis* 14(4): 376-91.
- Ellis M. J., Coop A., Singh B., Tao Y., Llombart-Cussac A., Jänicke F., Mauriac L., Quebe-Fehling E., Chaudri-Ross H. A., Evans D. B. & W. R. Miller (2003). Letrozole inhibits tumor proliferation more effectively than tamoxifen independent of HER1/2 expression status. *Cancer Research* 63(19): 6523-31.
- Fisher B., Dignam J., Bryant J., DeCillis A., Wickerham D., Wolmark N., Costantino J., Redmond C., Fisher E., Bowman D., *et al.* (1996). Five versus more than five years of tamoxifen therapy for breast cancer patients with negative lymph nodes and estrogen receptor-positive tumors. *Journal of the National Cancer Institute* 88: 1529-1542.
- Ghosh D., Griswold J., Erman M. & W. Pangborn (2009). Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase. *Nature*. 457(7226): 219-23.

- Goldstein J. C., Waterhouse N. J., Juin P., Evan G. I. & D. R. Green (2000). The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nature Cell Biology* 2(3): 156-62.
- Gompel A., Somaï S., Chaouat M., Kazem A., Kloosterboer H. J., Beusman I., Forgez P., Mimoun M. & W. (2000). Hormonal regulation of apoptosis in breast cells and tissues. *Steroids* 65(10-11): 593-8.
- Goss P. E., Ingle J., Martino S., Robert N., Muss H., Piccart M., Castiglione M., Tu D., Shepherd L., Pritchard K., *et al.* (2005). Randomized trial of letrozole following tamoxifen as extended adjuvant therapy in receptor-positive breast cancer: updated findings from NCIC CTG MA.17. *Journal of the National Cancer Institute* 97: 1267-1271.
- Goss P. E., Qi S., Cheung A. M., Hu H., Mendes M. & K. P. Pritzker (2004). Effects of the steroidal aromatase inhibitor exemestane and the nonsteroidal aromatase inhibitor letrozole on bone and lipid metabolism in ovariectomized rats. *Clinical Cancer Research* 10(17): 5717-23.
- Gozuacik D. & A. Kimchi (2004). Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 23(16): 2891-906.
- Gradishar W. (2004). Tamoxifen - what next? *Oncologist* 9, 378-384. Graham-Lorence, S., Amarneh, B., White, R. E., Peterson, J. A. and Simpson, E. R. (1995). A three-dimensional model of aromatase cytochrome P450. *Protein Science* 4: 1065-1080.
- Green S. (1990). Steroidal receptors and new (anti-)steroidal agents: modulation of oestrogen receptor activity by oestrogens and anti-oestrogens. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 37: 747-751.
- Guarneri V. & P. F. Conte (2004). The curability of breast cancer and the treatment of advanced disease. *European Journal Nuclear Medicine and Molecular Imaging* Suppl 1:S149-61.

- Han M., Kim J. Y., Park J. E., Kim J. M. & K. S Lee. (2007). Effects of letrozole on proliferation and apoptosis in cultured leiomyoma cells treated with prostaglandin E(2). *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology* 138(1): 83-8.
- Hall J. M., Lee M. K., Newman B., Morrow J. E., Anderson L. A., Huey B. & M. C. King (1990). Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 250(4988): 1684-9.
- Harper M. J. & A. L. Walpole (1967). A new derivative of triphenylethylene: effect on implantation and mode of action in rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 13: 101-119.
- Hemsell D. L., Grodin J. & P. F. Breuner (1974). Plasma precursors of estrogen. II. Correlation of the extent of conversion of plasma androstenedione to estrone with age. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 38: 476-479.
- Herr I. & K. M. Debatin (2001). Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 98(9): 2603-14.
- Hill J. & H. Moore (2002). Aromatase inhibitors in breast cancer: current and evolving roles. *Cleve Clin Journal Medicine* 69(7): 561-7.
- Hong Y., Li H., Yuan Y. C. & S. Chen (2009). Molecular characterization of aromatase. *Annals New York Academy of Sciences* 1155: 112-20.
- Høyer-Hansen M. & M. Jäättelä (2008). Autophagy: an emerging target for cancer therapy. *Autophagy* 4(5): 574-80.
- Høyer-Hansen M. & M. Jäättelä (2007). Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death and Differentiation* 14(9): 1576-82.

- Jänicke R. U., Sprengart M. L., Wati M. R. & A. G. Porter (1998). Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 273(16): 9357-60.
- Kadohama N., Yarborough C., Zhou D., Chen S. & Y. Osawa (1992). Kinetic properties of aromatase mutants Pro308Phe, Asp309Asn, and Asp309Ala and their interactions with aromatase inhibitors. *J Steroid Biochem Molecular Biology* 43(7):693-701.
- Kahlert S., Nueding S., van Eickels M., Vetter H., Meyer R. & C. Grohe (2000). Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *Journal of Biological Chemistry* 275: 18447-18453.
- Kallio A., Zheng A., Dahllund J., Heiskanen K. M. & P. Härkönen (2005). Role of mitochondria in tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells. *Apoptosis* 10(6):1395-410.
- Karuppu D., Kalus A., Simpson E. R. & C. Clyne (2002). Aromatase and prostaglandin inter-relationships in breast adipose tissue: significance for breast cancer development. *Breast Cancer Research Treatment* 76(2): 103-9.
- Katzenellenbogen B. S., Montano M. M., Ekena K., Herman M. E. & E. M. McInerney (1997) William L. McGuire Memorial Lecture. Antiestrogens: mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Breast Cancer Research Treatment* 44(1): 23-38.
- Kaufmann S. H. & W. C. Earnshaw (2000). Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experimental Cell Research* 256(1):42-9.
- Kaufmann S. H. & G. J. Gores (200). Apoptosis in cancer: cause and cure. *Bioessays* 22(11):1007-17.

- Komatsu M., Ueno T., Waguri S., Uchiyama Y., Kominami E. & K. Tanaka (2007). Constitutive autophagy: vital role in clearance of unfavorable proteins in neurons. *Cell Death Differentiation* 14(5): 887-94.
- Labrie F., Belanger A., Cusan L., Gomez J. L. & B. Candas (1997). Marked decline in serum concentration of adrenal C19 sex steroid precursor. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82, 2396-2402.
- Li F., Srinivasan A., Wang Y., Armstrong R. C., Tomaselli K. J. & L. C. Fritz (1997). Cell-specific induction of apoptosis by microinjection of cytochrome c. Bcl-xL has activity independent of cytochrome c release. *Journal of Biological Chemistry* 272(48): 30299-305.
- Liang J., Shao S. H., Xu Z. X., Hennessy B., Ding Z., Larrea M., Kondo S., Dumont D. J., Gutterman J. U., Walker C. L., Slingerland J. M. & G. B. Mills (2007). The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nature Cell Biology* 9(2):218-24.
- Lim K. B., Ng C. Y., Ong C. K., Ong C. S., Tran E., Nguyen T. T., Chan G. M. & H. Huynh (2001). Induction of apoptosis in mammary gland by a pure anti-estrogen ICI 182780. *Breast Cancer Research Treatment* 68(2): 127-38.
- Lisztwan J., Pornon A., Chen B., Chen S. & D. B. Evans (2008). The aromatase inhibitor letrozole and inhibitors of insulin-like growth factor I receptor synergistically induce apoptosis in in vitro models of estrogen-dependent breast cancer. *Breast Cancer Research* 10(4): R56.
- Litwiniuk M. M., Roznowski K., Filas V., Godlewski D. D., Stawicka M., Kaleta R. & J. Breborowicz (2008). Expression of estrogen receptor beta in the breast carcinoma of BRCA1 mutation carriers. *BMC Cancer* 8:100.

- Los M., Wesselborg S. & K. Schulze-Osthoff (1999). The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity* 10(6):629-39.
- Lowe S. W. & A. W. Lin (2000). Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21(3): 485-95.
- McKenna N. J., Nawaz Z., Tsai S. Y., Tsai M. J. & B. W. O'Malley (1998). Distinct steady-state nuclear receptor coregulator complexes exist in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 95(20): 11697-702.
- Lum J. J., Bauer D. E., Kong M., Harris M. H., Li C., Lindsten T. & C. B. Thompson (2005). Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 120(2):237-48.
- Mandlekar S. & A. N. T. Kong (2001). Mechanisms of tamoxifen-induced apoptosis. *Apoptosis* 6, 469-477.
- Meresman G. F., Bilotas M., Abello V., Buquet R., Tesone M. & C. Sueldo (2005). Effects of aromatase inhibitors on proliferation and apoptosis in eutopic endometrial cell cultures from patients with endometriosis. *Fertility and Sterility* 84(2): 459-63.
- Miller W. R. & J. M. Dixon (2002). Endocrine and clinical endpoints of exemestane as neoadjuvant therapy. *Cancer Control* 9(2 Suppl): 9-15.
- Miller W. R., Anderson T. J. & W. J. L. Jack (1990). Relationship Between Tumor Aromatase Activity, Tumor Characteristics and Response to Therapy. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 37: 537-548.
- Miller W. R. & S. J. O'Neill (1987). The importance of local synthesis of estrogen within the breast. *Steroids* 50: 537-547.
- Mosselman S., Polma J. & R. Dijkema (1996). ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Letters* 392: 49-53.

- Nabholtz J. M. (2008). Aromatase inhibitors in the management of early breast cancer. *European Journal of Surgical Oncology* 34(11): 1199-207.
- Narashimamurthy J., Rao A. R. & G. N. Sastry (2004). Aromatase inhibitors: a new paradigm in breast cancer treatment. *Current Medicinal Chemistry Anticancer Agents* 4(6): 523-34.
- Nemere I., Pietras R. J. & P. F. Blackmore (2003). Membrane receptors for steroid hormones: signal transduction and physiological significance. *Journal of Cell Biochemistry* 15;88(3): 438-45.
- Njar V. C. & A. M. Brodie (1999). Comprehensive pharmacology and clinical efficacy of aromatase inhibitors. *Drugs* 58(2): 233-55.
- Noruzinia M., Coupier I. & P. Pujol (2005). Is BRCA1/BRCA2-related breast carcinogenesis estrogen dependent? *Cancer* 104(8): 1567-74.
- Obrero M., Yu D. V. & D. J. Shapiro (2002). Estrogen receptor-dependent and estrogen receptor-independent pathways for tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen-induced programmed cell death. *Journal of Biological Chemistry* 277(47): 45695-703.
- Osborne C. K. & R. Schiff (2005). Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *Journal of Clinical Oncology* 23(8): 1616-22.
- Osborne C. K., Schiff R., Fuqua S. & J. Shou (2001). Estrogen receptor: current understanding of its activation and modulation. *Clinical Breast Cancer* 7: 4338s-4342s.
- Osborne C. K. & S. A. Fuqua (1994). Mechanisms of tamoxifen resistance. *Breast Cancer Research Treatment* 32(1): 49-55.
- Ostenfeld M. S., Høyer-Hansen M., Bastholm L., Fehrenbacher N., Olsen O. D., Groth-Pedersen L., Puustinen P., Kirkegaard-Sørensen T., Nylandsted J., Farkas T. & M. Jäättelä (2008). Anti-cancer agent siramesine is a lysosomotropic detergent

that induces cytoprotective autophagosome accumulation. *Autophagy* 4(4): 487-99.

Pattingre S., Tassa A., Qu X., Garuti R., Liang X. H., Mizushima N., Packer M., Schneider M. D. & B. Levine (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122(6): 927-39.

Petrovski G., Zahuczky G., Katona K., Vereb G., Martinet W., Nemes Z., Bursch W. & L. Fésüs (2007). Clearance of dying autophagic cells of different origin by professional and non-professional phagocytes. *Cell Death and Differentiation* 14(6): 1117-28.

Ponzone R., Mininanni P., Cassina E., Pastorino F. & P. Sismondi (2008). Aromatase inhibitors for breast cancer: different structures, same effects? *Endocrine Related Cancer* 15(1): 27-36.

Prives C. & P. A. Hall (1999). The p53 pathway. *Journal of Pathology* 187(1): 112-26.

Ravikumar B., Duden R. & D. C. Rubinsztein (2002). Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Human Molecular Genetics* 11(9): 1107-17.

Razandi M., Pedram A., Park S. & E. R. Levin (2003). Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. *Journal of Biological Chemistry* 278: 2701-2712.

Rice S. & S. A. Whitehead (2008). Phytoestrogens oestrogen synthesis and breast cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 108(3-5): 186-95.

Robinson A. (2009). A review of the use of exemestane in early breast cancer. *Therapeutic Clinics and Risk Management* 5(1): 91-8

- Rodriguez-Enriquez S., He L. & J. J. Lemasters (2004). Role of mitochondrial permeability transition pores in mitochondrial autophagy. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 36(12): 2463-72.
- Salami S. & F. Karami-Tehrani (2003). Biochemical studies of apoptosis induced by tamoxifen in estrogen receptor positive and negative breast cancer cell lines. *Clinical Biochemistry* 36(4): 247-53.
- Schiff R. & C. K. Osborne (2005). Endocrinology and hormone therapy in breast cancer: new insight into estrogen receptor-alpha function and its implication for endocrine therapy resistance in breast cancer. *Breast Cancer Research* 7(5): 205-11.
- Schulze-Osthoff K., Ferrari D., Los M., Wesselborg S. & M. E. Peter (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *European Journal of Biochemistry* 254(3): 439-59.
- Shou J., Massarweh S., Osborne C.K., Wakeling A.E., Ali S., Weiss H. & R. Schiff (2004). Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor HER2/ neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer, *Journal of the National Cancer Institute* 96: 926–935.
- Siamak S. & K. Fatemeh (2003). Biochemical studies of apoptosis induced by tamoxifen in estrogen receptor positive and negative breast cancer cell lines. *Clinical Biochemistry* 36, 247-253.
- Simpson, E. R. (2003). Sources of estrogen and their importance. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 86: 225-230.
- Sionov R. V. & Y. Haupt (1999). The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* 18(45): 6145-57.
- Skliris G. P., Munot K., Bell S. M., Carder P. J., Lane S., Horgan K., Lansdown M. R., Parkes A. T., Hanby A. M., Markham A. F. & V. Speirs (2003). Reduced expression of oestrogen receptor beta in invasive breast cancer and its re-

- expression using DNA methyl transferase inhibitors in a cell line model. *Journal of Pathology* 201(2): 213-20.
- Slee E. A., Adrain C. & S. J. Martin (1999). Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 6(11): 1067-74.
- Solary E., Droin N., Bettaieb A., Corcos L., Dimanche-Boitrel M. T. & C. Garrido (2000). Positive and negative regulation of apoptotic pathways by cytotoxic agents in hematological malignancies. *Leukemia* 14(10): 1833-49.
- Thiantanawat A., Long B. J. & A. M. Brodie (2003). Signaling pathways of apoptosis activated by aromatase inhibitors and antiestrogens. *Cancer Research* 63(22): 8037-50.
- Thompson, E. A. & P. K. Siiteri, (1974). Utilization of oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstenedione. *Biological Chemistry* 249: 53-64.
- Thornberry N. A. & Y. Lazebnik (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281(5381): 1312-6.
- Thorne C. & A. V. Lee (2003). Cross talk between estrogen receptor and IGF signaling in normal mammary gland development and breast cancer. *Breast Disease* 17: 105-14.
- Thürlimann B. (2007). Reducing the risk of early recurrence in hormone-responsive breast cancer. *Annals of Oncology* 18 Suppl 8: viii8-17.
- Treck O., Juhasz-Boess I., Latruch C., Horn F., Goerse R. & O. Ortmann (2008). Effects of exon-deleted estrogen receptor beta transcript variants on growth, apoptosis and gene expression of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research Treatment* 110(3): 507-20.
- Truchet I., Jozan S., Guerrin M., Mazzolini L., Vidal S. & A. Valette (2000). Interconnections between E2-dependent regulation of cell cycle progression

and apoptosis in MCF-7 tumors growing on nude mice. *Exp Cell Res* 254, 241-248.

Tsuchihara K., Fujii S. & H. Esumi (2008). Autophagy and cancer: dynamism of the metabolism of tumor cells and tissues. *Cancer Letters* 278(2): 130-8.

Untch M. & C. Jackisch (2008). Exemestane in early breast cancer: a review. *Therapeutics Clinical and Risk Management* 4(6): 1295-304.

Utz P. J. & P. Anderson (2000). Life and death decisions: regulation of apoptosis by proteolysis of signaling molecules. *Cell Death and Differentiation* 7(7): 589-602.

Veronesi U., Boyle P., Goldhirsch A., Orecchia R. & G. Viale (2005). Breast cancer. *Lancet* 365(9472): 1727-41.

Viale P. H. (2005). Aromatase inhibitor agents in breast cancer: evolving practices in hormonal therapy treatment. *Oncology Nursing Forum* 32(2): 343-53.

Vicencio J., Galluzzi L., Tajeddine N., Ortiz C., Criollo A., Tasdemir E., Morselli E., Ben Younes A., Maiuri M., Lavandro S., et al. (2008). Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path - a mini-review. *Gerontology* 54, 92-99.

Wang X & S. Chen (2006). Aromatase destabilizer: novel action of exemestane, a food and drug administration-approved aromatase inhibitor. *Cancer Research* 66(21): 10281-6.

Weigel N. L. & B. G. Rowan (2001). Estrogen and progesterone action. DeGroot LJ, Jameson JL, Burger HG et al, eds. *Endocrinology*. Philadelphia:WB Saunders 2053-2060.

Winer E. P., Hudis C., Burstein H. J., Wolff A. C., Pritchard K. I., Ingle J. N., Chlebowski R. T., Gelber R., Edge S. B., Gralow J., et al. (2005). American

Society of Clinical Oncology technology assessment on the use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer: status report 2004. *Journal of Clinical Oncology* 23: 619-629.

Xue L., Fletcher G.C. & A.M. Tolkovsky (1999). Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution. *Molecular Cell Neurosciences* 14(3): 180-98.

Wysowski, D., Honig, S. & J. Beitz (2002). Uterin sarcoma associated with tamoxifen use. *New England Journal of Medicine* 346: 1832-1833.

Zhou C., Zhou D., Esteban J., Murai J., Siiteri P.K., Wilczynski S. & S. Chen (1996). Aromatase gene expression and its exon I usage in human breast tumors. Detection of aromatase messenger RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 59(2): 163-71.