

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 24/02/2019.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Joyce Regina Zapaterini

**AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E MOLECULAR DA
IMUNOTERAPIA COM P-MAPA ASSOCIADA AO
TAMOXIFENO NA PROGRESSÃO DO CÂNCER DE
MAMA INDUZIDO QUIMICAMENTE EM RATAS
SPRAGUE-DAWLEY**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutora em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan

Coorientador: Prof. Dr. Wagner José Fávaro

Botucatu

2017

Joyce Regina Zapaterini

AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E MOLECULAR DA
IMUNOTERAPIA COM P-MAPA ASSOCIADA AO
TAMOXIFENO NA PROGRESSÃO DO CÂNCER DE
MAMA INDUZIDO QUIMICAMENTE EM RATAS
SPRAGUE-DAWLEY

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutora em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan

Coorientador: Prof. Dr. Wagner José Fávaro

Botucatu

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Zapaterini, Joyce Regina.

Avaliação histopatológica e molecular da imunoterapia com p-mapa associada ao tamoxifeno na progressão do câncer de mama induzido quimicamente em ratas Sprague-Dawley / Joyce Regina Zapaterini. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Luis Fernando Barbisan

Coorientador: Wagner José Fávaro

Capes: 40105008

1. Mamas - Câncer - Tratamento. 2. Receptores Toll-like. 3. Tamoxifeno. 4. Imunoterapia.

Palavras-chave: Carcinoma mamário; DMBA; P-MAPA; Receptores Toll-like; Tamoxifeno.

Dedicatória

Aos meus pais José Roberto e Fátima

*“No mundo, a fórmula para se encontrar a felicidade com esplendor é uma gota de verdade
dentro de um litro de amor...”*

Chico Xavier

Agradecimientos

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida que me foi concedida, pela família, pelos momentos que me carregou nos braços e pelos que caminhou de mãos dadas comigo me dando força e discernimento para iniciar e finalizar mais esta etapa da minha vida. Obrigado por tantas conquistas e superações que tive durante esses quatro anos.

Ao meu pai.....meu eterno exemplo de força e honestidade. Obrigado por ter despertado em mim o amor pelos estudos desde pequena. Tudo que sou hoje, pessoalmente e profissionalmente, devo ao senhor. Ao meu grande incentivador, minha eterna gratidão e saudades. E no infinito mistério desse universo, uma única certeza: nos reencontraremos novamente.

À minha mãe, mulher pequenina e tão grande ao mesmo tempo. Meu porto seguro durante todas as fases da minha vida, fonte inesgotável de força, sabedoria e dedicação. Obrigado por ser uma mãe tão amorosa e presente. À senhora, meu amor eterno.

Aos meus irmãos, Tatiana e Diego, pelo companheirismo, amor, amizade e ensinamentos. Irmãos são anjos que Deus envia para cuidar de nós. Obrigado por existirem em minha vida.

Ao meu esposo e eterno namorado André, obrigado por estar comigo desde quando eu almejava entrar na faculdade. Obrigado por ter sido um verdadeiro companheiro durante todas essas etapas, e principalmente, por segurar minhas mãos na fase mais difícil da minha vida e acreditar que eu era capaz. Obrigado pela enorme paciência nos momentos de stress durante o doutorado e por toda ajuda com a bioinformática e formatação. Meu eterno amor e gratidão.

À minha avó Josefa, minha segunda mãe, por sempre estar de braços abertos oferecendo carinho e afeto. Obrigado por sempre ter uma palavra amiga.

Às minhas primas, eternas amigas, pelos altos momentos de descontração, apoio e confidencialismo.

A todos os meus familiares, meu porto seguro.

Ao meu orientador Dr. Luis Fernando Barbisan, pela dedicação durante as etapas deste trabalho e por sempre estar de mãos estendidas. Agradeço imensamente por acreditar em minha capacidade. Obrigado pela enorme contribuição para com minha formação.

Ao meu coorientador Wagner José Fávaro e à Farmabrilis pelo fornecimento do composto P-MAPA.

A todos os meus animais de estimação, obrigado por tamanho carinho e amor incondicional que vocês sempre me deram. Vocês são verdadeiros anjos de patas.

Ao meu grande amigo e companheiro Sheik, Meu CÃOpanheiro, que passou horas e horas ao meu lado enquanto estudava, não importasse o período do dia. Obrigado por me ensinar a amar ainda mais os animais e por me dar tanto carinho, amor e alegria desde o dia em que te conheci.

I would like to thank Dr. Russo for the opportunity to learn and work at Breast Cancer Research Laboratory – Fox Chase Cancer Center. It was an incredible experience.

I would like to thank Julia Pereira, Maria Barton and Yanrong Su, who I have worked with at BCRCL. Your teachings were essential to this work and to my life.

I also want to thank Mike, Talya, Danielle, Melissa, Aishara, David, Tayler and Jesse for friendship during my internship at Fox Chase. Thank you for helping me to improve my english and for making my journey easier and happier.

I would like to thank all staff of Fox Chase Cancer Center.

À minha amiga de longa data Julia Pereira, por todos os anos de amizade sincera e companheirismo, mesmo com toda distância. Não poderia deixar de agradecer pela oportunidade de crescer profissionalmente e pessoalmente através do estágio realizado no Breast Cancer Research Laboratory. Obrigado por todo ensinamento, por acreditar em mim e por me dar a chance de me superar mais uma vez.

À professora Dra. Lucilene Delazari por me iniciar na fascinante abordagem proteômica. Obrigado por toda atenção, ensinamento, carinho e respeito

Aos meus amigos do laboratório LCQE: Nelci, Mariana Fragoso, Mariana Tablas, Murielle, Meire, Flávia, Gisele, Bruno, Tony, Renata e Guilherme. Obrigado por todo apoio profissional e pelos grandes momentos de descontração. Isso fez com que os dias de trabalho ficassem muito mais prazerosos.

À minha amiga, companheira de casa e madrinha de casamaneto Nelci. Obrigado por toda ajuda profissional e pela grande amizade de anos. Será inesquectível os grandes momentos de descontração e palhaçadas que passamos juntas.

Às meninas do CEVAP Francilene Carvalho e Nayara Cavassan por toda paciência e ajuda com a espectrometria de massas. Vocês foram essenciais.

Aos meus grandes amigos Gisele, Thiago, Eveline e Diogo. Agradeço imensamente por Deus ter colocado pessoas maravilhosas como vocês em minha vida. Quem tem amigos jamais estará sozinho. Obrigado por dividir os momentos tristes e alegres comigo, o apoio de vocês foi essencial.

A todos os funcionários do Departamento de Morfologia – IB e do Departamento de Patologia – FMB pela constante dedicação, visando proporcionar a cada dia, o melhor para nós alunos.

À D. Terezinha (Thêra) por toda sua dedicação e carinho. Obrigado pelo carinhoso café que tanto me ajudou nas manhãs e início das tardes. Salvaram tantas vezes meu dia....

Ao bioterista do Departamento de Patologia – FMB, Paulo César (PC), pelo tratamento adequado e dedicação dado aos animais no biotério.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP) pela bolsa de doutorado (processo n° 2013-15060-9).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado e pela bolsa do Programa Doutorado Sanduiche no Exterior.

A todos os animais utilizados neste experimento, pois sem eles nada teria sido possível.

É difícil mencionar todas as pessoas que me ajudaram, por isso agradeço a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

Albert Einstein

Resumo

O câncer de mama apresenta história natural diversa, histologia complexa e com incidência crescente nas últimas décadas. Atualmente, existem poucos tratamentos para o câncer de mama hormônio-dependente e as drogas comumente utilizadas estão intimamente associadas a graves efeitos colaterais que limitam sua utilização. A imunoterapia apresenta-se como uma vertente para o tratamento do câncer e cresce cada vez mais o número de pesquisas voltadas ao papel de receptores *toll-like* no processo de carcinogênese. O P-MAPA é considerado um imunomodulador e através de estudos experimentais e ensaios clínicos, este composto tem demonstrado exercer atividade antiviral e antitumoral, aumentando a expressão de citocinas, ativando linfócitos e receptores *toll-like*. Assim, os objetivos do presente estudo foram caracterizar e comparar os efeitos histopatológicos e moleculares da imunoterapia com P-MAPA associada ao Tamoxifeno no tratamento do câncer de mama induzido quimicamente em ratas Sprague-Dawley (SD). Para o desenvolvimento deste trabalho, fêmeas SD foram divididas em sete grupos experimentais: os grupos 1-4 receberam dose única do carcinógeno 7,12- dimetil-benzoantraceno (DMBA) (80 mg/kg, i.g) durante a primeira semana do experimento, enquanto os grupos 5-7 receberam dose única do veículo da DMBA. A seguir, grupos 2 e 5 receberam doses do P-MAPA (5,0 mg/kg, 3x/semana, i.p) e do veículo do Tamoxifeno (5x/semana). Os grupos 3 e 6 receberam doses do P-MAPA e do Tamoxifeno (100ug/kg, 5x/semana, s.c) e o grupo 4 recebeu as doses do Tamoxifeno e do veículo do P-MAPA. Os grupos controles (1 e 7) receberam as doses dos veículos do P-MAPA e do Tamoxifeno. Ao final da 13ª semana os animais foram eutanasiados e os tecidos mamários normal e tumoral, fígado e rins foram removidos e submetidos às análises histopatológicas, imunoistoquímicas e/ou moleculares. O período de latência para o desenvolvimento tumoral foi maior no grupo G3 do que nos demais grupos iniciados, mas não houve diferença significativa na taxa de incidência, multiplicidade e volume tumoral. Houve aumento significativo do infiltrado inflamatório nos tumores dos grupos G2, G3 e G4 quando comparado ao grupo G1. Nos tumores e no epitélio mamário normal, não houve diferença nos índices de proliferação celular e na expressão do RE- α frente aos diferentes tratamentos. O índice apoptótico no epitélio tumoral foi significativamente menor nos grupos G3 e G4 em relação ao grupo G1, não havendo diferença entre os grupos não iniciados. No epitélio tumoral houve uma diminuição na expressão do TLR2 e TLR4 em comparação ao epitélio mamário normal, porém sem alteração no padrão de expressão frente aos diferentes tratamentos (G1-G7). Através da espectrometria de massas foram identificadas 12 proteínas diferentemente expressas, sendo a maioria proteínas de transporte e relacionadas com o aumento da condição de hipóxia. Conclui-se, portanto, que a imunoterapia com o P-MAPA em associação com o tamoxifeno foi capaz apenas de retardar o aparecimento inicial de tumores mamários com possível papel no aumento da hipóxia tumoral.

Palavras-chave: carcinoma mamário, DMBA, Tamoxifeno, P-MAPA, receptores *toll-like*.

Abstract

The breast cancer has a diverse natural history, complex histology, and its incidence has been increased in the last decades. Actually, there are few treatments against hormone-dependent breast cancer and the drugs commonly used generate serious side effects. The immunotherapy represents a new perspective to cancer treatment and researches about the role of *toll-like* receptors in carcinogenesis have been increased. In this context, P-MAPA is an important immunomodulatory, which has effectively demonstrated antitumor activity by increasing cytokines expression and by stimulating lymphocytes and toll-like receptors. The aims of this study were to characterize and compare the histopathological and molecular effects of P-MAPA immunotherapy with estrogenic receptor blocker (Tamoxifen) in the treatment of breast cancer chemically-induced in rats. For this purpose, female Sprague-Dawley rats were allocated into six experimental groups: the groups 1-4 received a single dose of 7,12- dimetilbenzoantracene (DMBA) carcinogen (80 mg/kg, i.g) in the first experimental week, while the groups 5-7 received a single dose of DMBA vehicle. After, groups 2 and 5 received P-MAPA doses (5,0 mg/kg, 3x/week, i.p) and vehicle doses of Tamoxifen (5x/week, s.c). The groups 3 and 6 received P-MAPA doses and Tamoxifen doses (100µg/kg, 5x/week, s.c) and the group 4 received Tamoxifen doses and P-MAPA vehicle doses. The control groups (1 and 7) received the P-MAPA and Tamoxifen vehicles doses. Animals were euthanized at the end of the 13th week. The normal mammary and tumoral tissues, spleen, liver and kidneys were removed and subjected to histopathological, immunohistochemical and molecular analysis. The tumoral latency period was higher in the G3 group when compared to others. There was no difference in the incidence, multiplicity and tumoral volume between the groups. The inflammatory response in the mammary tumors was higher in groups G2, G3 and G4 when compared to G1. The treatments did not alter the cellular proliferation and RE-α expression in the normal and tumor mammary tissue. The apoptotic index was significantly lower in the tumors of G3 and G4 groups than in G1 group. There was a significant decrease of TLR2 and TLR4 expression in the tumor epithelium when compared to normal mammary epithelium. However, the treatments did not alter the expression of these receptors (G1-G7). The mass spectrometry identified 12 differently expressed proteins. The most of them were transporters proteins and related with hypoxia increase. These results suggest that P-MAPA immunotherapy associated with Tamoxifen decreased the tumoral latency period with possible role in the tumoral hypoxia increase.

Key-words: mammary carcinoma, DMBA, Tamoxifen, P-MAPA, toll-like receptors.

Sumário

Ficha Catalográfica	iii
Dedicatória.....	iv
Agradecimentos	vi
Epígrafe	xi
Resumo	xii
Abstract.....	xiii
Lista de Figuras	xvi
Lista de Tabelas.....	xviii
Lista de Anexos	xix
Lista de Abreviaturas	xx
Capítulo I – Introdução.....	1
1 Revisão da Literatura.....	2
1.1 Câncer de mama	2
1.1.1 Epidemiologia e fatores de risco	2
1.1.2 Sítio de origem, tipos e tratamento do câncer de mama.....	4
1.2 Carcinogênese química mamária	13
1.2.1 Conceitos gerais	13
1.2.2 Modelos de carcinogênese química mamária experimental	15
1.3 Imunoterapia com P-MAPA	18
1.3.1 Definições, mecanismos de ação e efeitos da imunoterapia com P-MAPA ..	18
1.3.2 P-MAPA e Receptores toll-like.....	22
2 Referências.....	27
3 Objetivos	37
Capítulo II - Artigo	38
Resumo	40
Abstract.....	41
1 Introdução.....	42
2 Materiais e Métodos	44
2.1 Animais e ambiente de experimentação	44
2.2 Delineamento experimental	44
2.3 Avaliação do peso corpóreo, massas tumorais mamárias e consumo de água e ração.....	46
2.4 Eutanásia, coleta e processamento histológico	47

2.5	Análises macroscópicas	47
2.6	Processamento histológico dos tumores e tecidos mamários	48
2.7	Análises microscópicas.....	49
2.8	Processamento imunohistoquímico para Ki-67, RE- α e Toll-like 2 e Toll-like 4. .	49
2.9	Análise imunohistoquímica e apoptótica.....	50
2.10	Avaliação da expressão proteica por espectrometria de massas (LC-Ms/Ms) ...	51
2.10.1	Extração e quantificação de proteínas das amostras de tumores mamários e glândulas mamárias não alteradas.....	51
2.10.2	Padronização e digestão proteica em solução.....	51
2.10.3	Sequenciamento Peptídico por Espectrometria de Massas.....	52
2.10.4	Análise dos dados para a identificação de proteínas	53
2.11	Análise Estatística.....	53
3	Resultados	54
3.1	Observações gerais	54
3.2	Consumo de água e ração, peso corpóreo, hepático e renal	55
3.3	Análise macroscópica e microscópica dos tumores mamários.....	56
3.4	Proliferação celular, expressão dos receptores TLR4 e RE- α pela marcação imunoistoquímica e análise do índice apoptótico.	64
3.5	Expressão proteica global por meio da estratégia proteômica do tipo shotgun (LC-MS/MS).....	72
4	Discussão e Conclusões	77
5	Referências	87
6	Anexos	95

Lista de Figuras

Capítulo I

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma.....	3
Figura 2. Desenvolvimento da glândula mamária.....	6
Figura 3. Classificação histológica dos tumores mamários malignos.....	7
Figura 4. Vias de resposta estrógeno-receptor.....	9
Figura 5. Estrutura molecular do Tamoxifeno.....	11
Figura 6. Mecanismos de ação do tamoxifeno (TAM) ou de seu metabólito 4-hidroxitamoxifeno (OHT).....	12
Figura 7. Ilustração das três fases da carcinogênese.....	13
Figura 8. Estrutura química dos carcinógenos DMBA e MNU.	16
Figura 9. Desenvolvimento de tumores mamários induzidos quimicamente em roedores.	17
Figura 10. Representação esquemática das estruturas da glândula mamária com seus respectivos ciclos celulares.	18
Figura 11. Microcristais do composto P-MAPA	19
Figura 12. Mecanismos de ação do imunomodulador P-MAPA.....	21
Figura 13. Vias de sinalização dos receptores <i>toll-like</i>	23

Capítulo II

Figura 1. Delineamento Experimental.....	46
Figura 2. Taxa de sobrevivência dos animais durante o período experimental.	544
Figura 3. Desenvolvimento tumoral mamário semanal.....	588
Figura 4. Dados de volume de tumor mamário de cada grupo experimental.....	59
Figura 5. Cortes histológicos corados em HE de tumores de mama representativos dos padrões morfológicos..	611
Figura 6. Cortes histológicos de tumores de mama corados em HE representativo de cada grau de infiltrado inflamatório.....	622

Figura 7. Porcentagem do infiltrado inflamatório no estroma periférico (A) e no estroma interno (B) dos tumores mamários	633
Figura 8. Marcação imunoistoquímica para Ki-67 e índice de células em proliferação celular nos tumores mamários.....	655
Figura 9. Marcação imunoistoquímica para Ki-67 e índice de células em proliferação celular no tecido epitelial mamário normal.....	666
Figura 10. Análise de células em apoptose em coloração hematoxilina/eosina e índice de células em apoptose no epitélio tumoral	677
Figura 11. Análise de células em apoptose em coloração hematoxilina/eosina e índice de células em apoptose no epitélio mamário normal.....	688
Figura 12. Marcação imunoistoquímica para TLR2 em tumores mamários e na glândula mamária normal.....	69
Figura 13. Marcação imunoistoquímica para TLR4 e intensidade da expressão (%) do TLR4 no epitélio tumoral e epitélio mamário normal	700
Figura 14. Marcação imunoistoquímica para RE- α e intensidade da expressão (%) do RE- α no epitélio tumoral e epitélio mamário normal	711
Figura 15. Diagrama de Venn representativo do panorama geral das proteínas identificadas pela espectrometria de massas (LC-Ms/Ms)	722
Figura 16. Rede de interações entre as proteínas.....	766

Lista de Tabelas

Capítulo II

Tabela 1. Consumo de água e ração dos diferentes grupos experimentais ao longo do período experimental.	555
Tabela 2. Peso corpóreo e relativo do fígado e rim dos diferentes grupos experimentais ao longo do período experimental.	577
Tabela 3. Efeitos do tratamento com P-MAPA e Tamoxifeno sobre o desenvolvimento de tumores mamários induzidos pela DMBA em ratas Sprague-Dawley.	588
Tabela 4. Incidência dos tumores mamários segundo classificação histológica nos diferentes grupos experimentais.....	600
Tabela 5 - Identificação e categorização das proteínas diferentemente expressas em relação aos grupos controles.....	744

Lista de Anexos

Anexo A - Certificado de aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal.

Anexo B - Lista de todas as proteínas encontradas na análise proteômica entre os grupos analisados.

Lista de Abreviaturas

2-AAF	2-acetylaminofluoreno
AB	Alveolar buds
ABS	Albumina Bovina Sérica
AdCa	Adenocarcinomas
ALB	Seroalbumina
AOM	Azoximetano
CBNMI	Carcinoma de bexiga não músculo invasivo
CEMIB	Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DAMP	Moléculas endógenas originadas do dano tecidual
DMBA	7,12-dimetilbenz(a)antraceno
DSS	Dextran sulfato de sódio
EF1A	Fator de Alongamento-1- α
ERE	Elementos de resposta ao estrógeno
FC	Fold-Change
FDA	Food and drug administration
GAPDH	Glyceraldes-3-phosphate dehydrogenase
Hb	Hemoglobina
HPX	Hemopexina
HSA	Seroalbumina
HSPA5	Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 5
IDCas	Carcinomas intraductais
IDPs	Proliferações intraductais
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina-G

IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IRF-3	Interferon regulatory factor 3
LPS	Estímulo pelo lipopolissacarídeo
MMP	Metaloproteinases
MNU	N-metil-N-nitrosourea
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
NK	Natural-killer
OHT	4-hidroxitamoxifeno
OMS	Organização Mundial da Saúde
P-MAPA	Agregado polimérico anidrido fosfolinoleato-palmitoleato de amônio e magnésio
PAMP	Padrões moleculares conservados associados a patógenos
PLGS	ProteinLynx Global Server
PSK	Polissacarídeo de kerestina
RE	Receptor de Estrógeno
RP	Receptor de prolactina
SD	Sprague-Dawley
SERMs	Moduladores seletivos dos receptores de estrógenos
TAE	Tumor ascítico de Ehrlich
TAM	Tamoxifeno
TEB	Terminal end buds
TF	Serotransferrina
TLRs	Toll-like receptors
TNF	Fator de necrose tumoral
UNIPLEX	Unidade de Pesquisa Experimental

Capítulo I – Introdução

1 Revisão da Literatura

1.1 Câncer de mama

1.1.1 *Epidemiologia e fatores de risco*

Atualmente, o câncer é a segunda causa de morte mundial, sendo que as doenças cardiovasculares são a principal causa de óbitos. De acordo com dados do GLOBOCAN em 2012 ocorreram 14,1 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes por câncer comparado com 12,7 milhões de novos casos e 7,6 milhões de mortes em 2008 no mundo. Estima-se que a incidência nas próximas décadas será cada vez maior, chegando a uma taxa de 20 milhões de novos casos ao ano antes de 2025 (Ferlay et al., 2015).

De acordo com o observado na população mundial, o câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais comum, sendo o de maior incidência na população feminina. Para o ano de 2012, foram esperados 1,7 milhões de novos casos (equivalente a $\frac{1}{4}$ de todos os cânceres diagnosticados mundialmente nas mulheres) e 522 mil mortes por esta neoplasia em todo o mundo (Ferlay et al., 2015).

No Brasil, segundo dados fornecidos pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), foram estimados para o ano de 2016, 57.960 novos casos de câncer de mama com risco de 56,20 casos a cada 100 mil mulheres (Figura 1). Desconsiderando os tumores de pele não melanoma, o carcinoma mamário é o mais frequente nas mulheres das regiões Sul (74,3/100 mil), Sudeste (68,08/100 mil), Centro-Oeste (55,87/100 mil) e Nordeste (38,74/100 mil) sendo, na região Norte, a segunda neoplasia mais incidente (22,26/100 mil) (INCA, 2016).


Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%		Homens	Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma. Números arredondados para múltiplos de 10. (Inca, 2016).

Como uma doença altamente heterogênea e multifatorial, as neoplasias malignas de mama possuem história natural diversa, histologia e evolução genética complexa e de resposta variável às terapias convencionais (quimioterapia, braquioterapia e radioterapia) (Parkin et al, 2005; Jemal et al., 2010; Ferlay et al., 2015). Entre os fatores de risco para o desenvolvimento desta neoplasia, destacam-se a idade, estilo de vida, o uso de anticoncepcionais e terapia hormonal, história familiar, exposição à radiação ionizante, alterações gênicas e exposição acidental e/ou ocupacional a agentes ambientais (Cutuli et al., 2001; Snedeker, 2001; Andrieu et al., 2006; Skol et al., 2016; INCA, 2016).

Os eventos moleculares associados ao processo de carcinogênese mamária, incluindo a iniciação, promoção e progressão, não estão bem estabelecidos e muitas alterações genéticas têm sido descritas (Domchek et al., 2002; Poliak, 2007; Cuzick, 2010; Margan et al., 2016). Essas alterações compreendem mutações, ampliações e deleções gênicas, envolvendo oncogenes e genes supressores tumorais como os genes BRCA1/BRCA2, genes receptores de estrógenos (RE), receptores de prolactina (RP) e erb-B2 (HER2/neu). Alterações nos genes como os da família BRCA aumentam em 50% a 80% o risco de desenvolver essa neoplasia (Singletony, 2003; Polyak, 2007; Bouchardy et al., 2007; Cuzick, 2010; Margan et al., 2016).

A exposição prolongada aos hormônios sexuais femininos é considerada um dos principais fatores de riscos endócrinos. A taxa de incidência do câncer de mama apresenta-se alta até os 50 anos (período que corresponde ao início da menopausa), além disso, a nuliparidade e gravidez tardia (após os 30 anos) aumentam

significativamente o risco de desenvolver o câncer de mama, reforçando a participação dos hormônios femininos na etiologia da doença (Antoniou, et al., 2003; Russo & Russo, 2004; Skol et al., 2016).

A histórica familiar é responsável por aproximadamente 10% dos casos de câncer de mama e, o estilo de vida como a prática de atividade física e a alimentação saudável, estão associadas a uma diminuição de 30% do risco de desenvolver o câncer mamário (Singletary, 2003, INCA 2016).

O consumo de álcool e tabaco também está associado ao aumento do risco de desenvolver diversos tipos de câncer, entre eles o mamário. Não é bem estabelecido o mecanismo pelo qual o consumo de álcool aumenta o risco para o desenvolvimento do câncer de mama, mas, sugere-se que seu consumo altere os níveis hormonais, agindo como desregulador neuroendócrino (Satcher, 2001; Harris, 2001; Russo & Russo, 2004; Liu et al., 2015a; Wang et al., 2015). O tabaco é composto por milhares de substâncias químicas, incluindo os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, os quais são metabolicamente ativados formando adutos de DNA, com potencial mutagênico e carcinogênicos para o tecido mamário (Satcher, 2001; Harris, 2001; Russo & Russo, 2004; Gaudet et al., 2013; Reynolds, 2013; Catsburg et al., 2015).

Estudos epidemiológicos e experimentais têm demonstrado que a exposição ambiental a agentes químicos aumenta a incidência do câncer de mama. Essa classe de compostos químicos inclui, por exemplo, pesticidas, hexaclorobenzenos e bisfenóis. Acredita-se que eles aumentem o risco do carcinoma mamário por mimetizar o hormônio 17- β -estradiol e pelo fato das células do tecido mamário estarem expostas diretamente a ele e aos seus metabólitos ativos (Russo & Russo, 2004; Fernandez & Russo, 2010; Fischer et al., 2016).

1.1.2 Sítio de origem, tipos e tratamento do câncer de mama.

O desenvolvimento da glândula mamária humana inicia-se durante a fase embrionária, e no nascimento a mama consiste em uma estrutura primitiva, composta por ductos que contém uma ou duas camadas de células epiteliais e uma camada de células mioepiteliais.

Ao atingir a fase de puberdade ocorre o período de maior crescimento. Nessa fase, os ductos se ramificam dando origem aos *terminal end buds* (TEBs), os quais

também se ramificam formando estruturas alveolares chamadas de *alveolar buds* (AB). Esses alvéolos sofrem progressivas ramificações onde, finalmente, dão origem aos lóbulos tipo 1 (Lob 1). O início da formação desses lóbulos geralmente ocorre 1 ou 2 anos após a primeira menstruação e é considerado o marcador da diferenciação da glândula mamária. Os lóbulos tipo 1 sofrem então graduais ramificações dando origem aos lóbulos tipo 2 que, da mesma forma, originam os lóbulos tipo 3. Assim, o tecido mamário passa a conter três tipos de lóbulos: Lob 1; Lob 2 e Lob 3 (Russo & Russo, 1987; Russo & Russo 2004).

Entretanto, o completo desenvolvimento e a diferenciação da mama ocorrem apenas no final da primeira gravidez, pois é quando os lóbulos tipo 3 dão origem ao quarto tipo de lóbulo (Lob 4). Além disso, as porcentagens de Lob 2 e Lob 3 aumentam significativamente em relação ao Lob 1 (Russo & Russo, 1987; Cardiff et al., 2000; Russo & Russo 2004) (Figura 2).

O sítio de origem do tipo de câncer de mama mais comum, o carcinoma ductal, ocorre no Lob 1 (Wellings, 1980; Russo et al., 2004). Ele é afetado mais facilmente por processos pré-neoplásicos e neoplásicos por ele ser considerado uma estrutura indiferenciada, originando uma neoplasia mais indiferenciada e agressiva. Em mulheres nulíparas, poucos Lob 1 sofrem o processo de diferenciação, diferentemente do que ocorre em mulheres que passaram pela gestação (Russo et al., 1994; Russo & Russo, 2004). As estruturas lobulares mais diferenciadas também são afetadas por processos neoplásicos, porém, originam tumores com malignidade inversamente relacionada ao grau de diferenciação da estrutura, onde os Lob 2 originam carcinomas *in situ*, os Lob 3 originam principalmente lesões benignas (cistos, adenomas e fibroadenomas) e os Lob 4 originam adenomas lactantes (Russo & Russo, 2004).

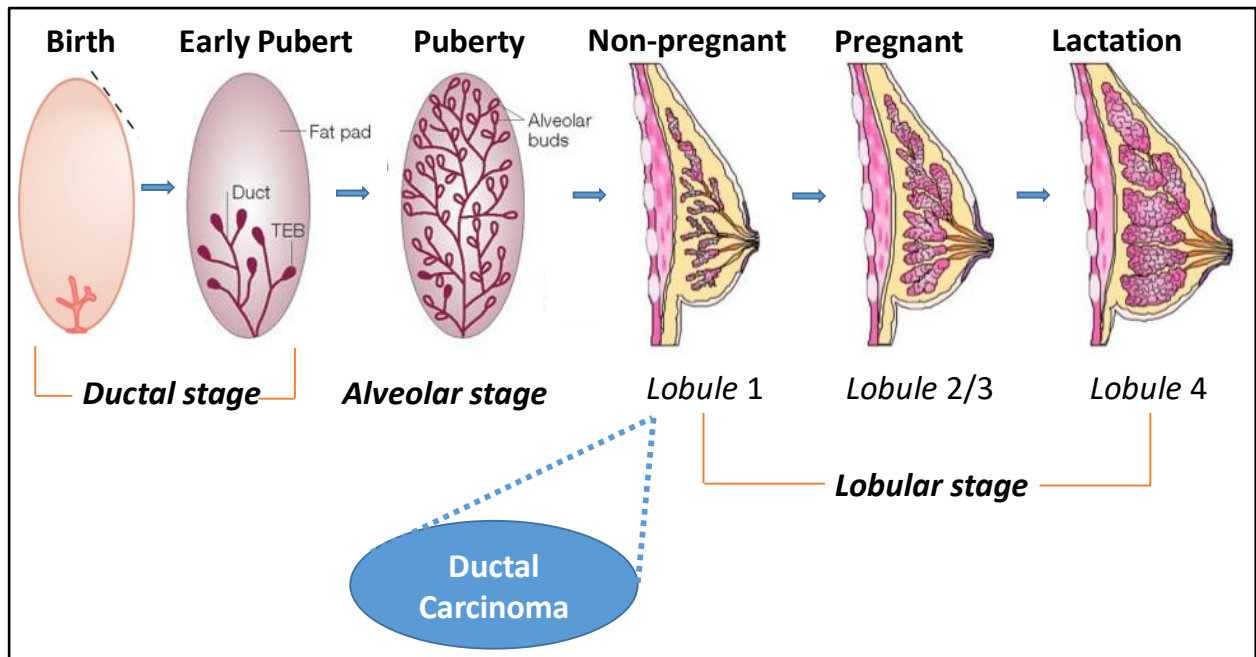


Figura 2. Desenvolvimento da glândula mamária. Sucessivas ramificações ductais dão origem aos TEBs, os quais também se ramificam formando os alvéolos (AB). Esses alvéolos sofrem progressivas ramificações originando os lóbulos tipo 1 (Lob 1) os quais originam os lóbulos tipo 2 (Lob 2) e estes os lóbulos tipo 3 (Lob 3). Apenas ao final da primeira gravidez ocorrem a diferenciação e desenvolvimento completo da glândula mamária onde os Lob 3 originam os lóbulos tipo 4 (Lob 4). Fonte: Modificado de Cardiff et al., *Oncogenesis.*, (19):968-88, 2000.

O câncer de mama é considerado uma doença altamente heterogênea, seja a nível histológico, genético, epigenético, proteico e/ou celular. Cada subtipo de carcinoma mamário apresenta diferentes fatores de risco, comportamento clínico e respostas variáveis às terapias, o que evidencia a complexidade dessa doença e a relevância clínica da estratificação dos tumores mamários. (Tang et al., 2008; Pourteimoor et al., 2016; Daí et al., 2016).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) existem aproximadamente 50 tipos histológicos de carcinoma mamário, colocando-o entre os tipos de câncer com maior variabilidade morfológica. Os três tipos histológicos mais comuns são: carcinoma ductal invasivo; carcinoma ductal *in situ* e carcinoma lobular invasivo (Figura 3) (Lakhani et al., 2012; Pourteimoor et al., 2016).

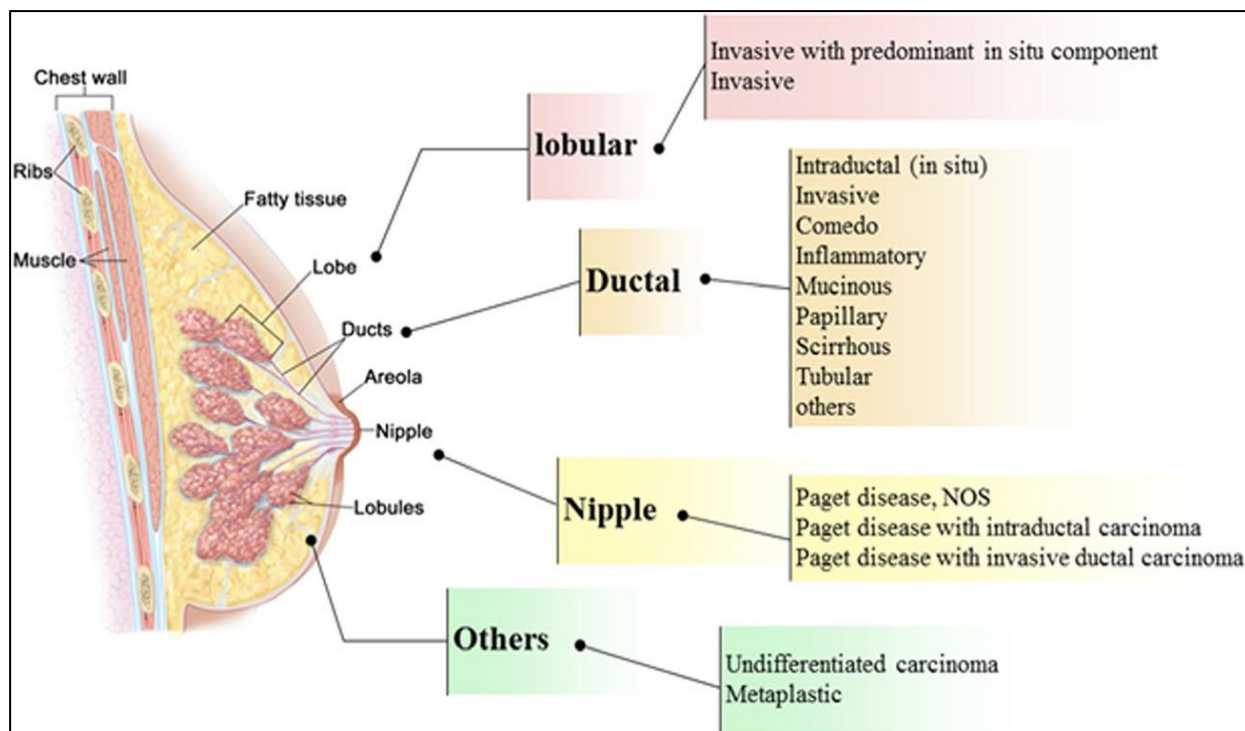


Figura 3. Classificação histológica dos tumores mamários malignos segundo o American Joint Committee on Cancer (AJCC) e o National Cancer Institute (NCI) 2015. Fonte: <http://www.cancer.gov> e <https://cancerstaging.org>.

Como a mama é por excelência um órgão hormônio-responsivo, além da classificação morfológica, as neoplasias malignas da mama são divididas seguindo uma classificação molecular, baseada em receptores hormonais, de crescimento e marcadores de proliferação (Russo & Russo, 2004; Perou et al., 2011; Pourteimoor et al., 2016; Daí et al., 2016).

Visto que os estrógenos são os principais responsáveis por promover a proliferação celular tanto no epitélio mamário normal como no tumoral, os tumores mamários são, em geral, classificados em dois tipos: *receptor de estrógeno positivo (RE+)* e *receptor de estrógeno negativo (RE-)* (Matthews & Gustafsson, 2003). Pacientes com tumores mamários RE+ têm melhor prognóstico e, geralmente, passam por terapia endócrina (Weigel & Dowsett, 2010; Baumgarten & Frasor, 2012).

Ainda seguindo a classificação molecular, os tumores mamários RE+ e RE- são agrupados em 4 subtipos:

- ❖ **Luminal (RE+): luminal A:** tumores com receptor de estrógeno positivo; receptor de progesterona positivo (RP+); receptor de fator de crescimento negativo (HER2-) e baixo índice do marcador de proliferação Ki-67.
luminal B: tumores com RE+, RP+, HER2+, alto índice de Ki-67.
- ❖ **HER2:** tumores com alta expressão de HER2, RE-, RP-
- ❖ **Triplo negativo ou basal-like:** tumores com RE-, RP-, HER2- e com imunoreatividade para citoqueratinas (CTK5, CTK6, CTK14, CTK17) e receptor do fator de crescimento epidermal positivo (EGFR+).
- ❖ **Normal breast-like:** tumores com forte expressão de genes altamente expressos no tecido adiposo e células não epiteliais, baixa expressão de genes epiteliais luminais e forte expressão de genes epiteliais basais.

Os estrogênios e estrógenos endógenos como estrona (E1), estradiol (E2) e estriol (E3) são hormônios esteróides sintetizados nos ovários e modulam o crescimento, diferenciação e funcionamento de diversos tecidos, além de exercer efeitos adversos no desenvolvimento de osteoporose, neoplasias malignas de mama, endométrio e ovário (Segars et al., 1993; Lo & Sukumar, 2008). Em tecidos normais (não-neoplásicos) a resposta biológica aos estrógenos é controlada, por exemplo, por mecanismos epigenéticos de regulação da expressão gênica (Segars et al., 1993; Lo & Sukumar, 2008).

Nos mamíferos, a maioria dos efeitos biológicos dos estrógenos é mediada por sua interação com dois subtipos de receptores de estrógenos (RE- α e RE- β) e seus respectivos co-fatores (Björnström & Sjöberg, 2005; Lo & Sukumar, 2008). Os REs pertencem a uma família de proteínas ligadas ao DNA que regulam a transcrição de diversos genes relacionados com o desenvolvimento de órgãos reprodutivos, regulação do ciclo celular, replicação do DNA, diferenciação, apoptose, angiogênese e progressão tumoral (Rondón-Lagos et al., 2016).

Ambos os subtipos de RE são encontrados no núcleo (maioria), citoplasma e membrana celular (Matthews & Gustafsson, 2003; Rondón-Lagos et al., 2016).

Enquanto o RE- α predomina no útero e glândula mamária, o RE- β é encontrado principalmente no sistema nervoso central, cardiovascular, imunológico, trato urogenital, ossos, rins e pulmão (Matthews & Gustafsson, 2003; Rondón-Lagos et al., 2016).

Os REs orquestram a resposta intracelular transcricional e não-transcricional aos estrógenos (Björnström & Sjöberg, 2005; Rondón-Lagos et al., 2016). Na via clássica de resposta estrógeno-receptor há a ligação do estrógeno com os REs no núcleo com subsequente ligação dos REs aos elementos de resposta ao estrógeno (ERE) na região promotora de genes alvos. Proteínas coativadoras (AIB1, CBP/300, PCAF) são recrutadas para se unirem a esse complexo ativando a transcrição gênica. Além dessa via, os REs também podem modular a transcrição gênica sem interagir diretamente com o DNA. Nessa via ocorre a interação do estrógeno ao RE o qual se une a proteínas coativadoras. Esse complexo liga-se com fatores de transcrição (c-Fos e c-Jun), para então se unir a regiões promotoras (AP-1, Sp-1 e GATA1) ativando a transcrição de genes (Osbourne & Schiff, 2005, Dunn et al., 2010; Rondón-Lagos et al., 2016) (Figura 4).

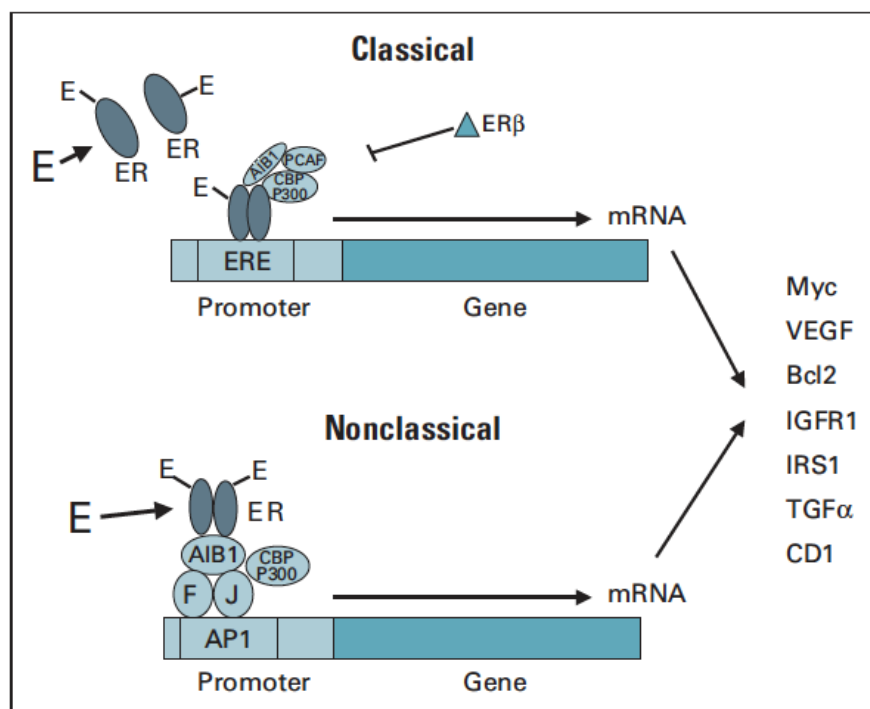


Figura 4. Vias de resposta estrógeno-receptor. Na via clássica o estrógeno (E) se liga ao receptor de estrógeno (ER) com a subsequente ligação aos elementos de resposta ao estrógeno (ERE) no promotor de genes alvos. Proteínas coativadoras (AIB1, CBP / P300, PCAF, outros) são recrutadas para esse complexo ativando a transcrição gênica. Na via não clássica a ligação do estrógeno ao receptor de estrógeno se liga a complexos coativadores e

fatores de transcrição (c-Fos e c-Jun) unindo-se finalmente a regiões promotoras para ativar a transcrição (AP-1). Fonte: Osborne & Schiff, *J Clin Oncol*, 23:1616-22, 2005.

O RE- α é um importante regulador do desenvolvimento fisiológico da glândula mamária. As células que contêm esse receptor bem expresso (15-30% das células do tecido mamário normal) produzem fatores de crescimento que induzem a proliferação de células vizinhas RE-negativas. No tecido tumoral a porcentagem de células RE- α positivas aumenta sob estimulação autóloga ao invés da parácrina (Russo & Russo, 2004; Welboren et al., 2009; Rondón-Lagos et al., 2016). O RE- β coexiste com o RE- α nas células epiteliais mamárias, porém, em maiores quantidades, e também em outras células como as mioepiteliais e as estromais do tecido mamário (Ikeda & Inoue, 2004; Matthews & Gustafsson, 2003; Rondón-Lagos et al., 2016). Apesar de não se conhecer a função exata desses receptores nos tecidos mamários normais, o RE- β parece ser essencial para a diferenciação da glândula mamária normal no rato (Nilsson et al., 2001; Russo & Russo, 2004; Rondón-Lagos et al., 2016).

Dependendo do estadiamento clínico e do tipo histológico, é recomendada a realização da cirurgia parcial ou radical das mamas comprometidas. Além disso, a radioterapia e a quimioterapia são aconselhadas para destruir as células remanescentes após a cirurgia ou para reduzir o tamanho do tumor antes da cirurgia (INCA, 2016). As terapias (neo) adjuvantes têm se mostrado benéficas no tratamento de câncer mamário com RE+, entre elas, a supressão ovariana, os inibidores de aromatase e os bloqueadores da resposta estrogênica (Cleator et al., 2009).

Os agentes antiestrogênicos (Tamoxifeno e Raloxifeno) se ligam nos REs e bloqueiam a sua interação com os estrógenos endógenos, ao passo que, os inibidores de aromatases (Letrozol e Anastrozol) bloqueiam a transformação de andrógenos em estrógenos ativos pela célula mamária tumoral ou tecidos periféricos (Park & Jordan, 2002; Bush, 2007). Esses medicamentos são utilizados no coquetel de quimioterapia em pacientes com câncer de mama agressivo ressecado cirurgicamente (mastectomia radical ou parcial) com o objetivo de reduzir a recorrência da doença (Katzenellenbogen & Katzenellenbogen, 2000; Bush, 2007).

O tamoxifeno (1-[4-(2-dimethylamino-ethoxy)phenyl]-1,2-diphenylbut-1(Z)-eno) (Figura 5) aprovado em 1977 pela US-Food and Drug Administration (FDA), é a droga mais comumente utilizada para o tratamento do carcinoma mamário RE+ (Osborne, 1998; Howell et al., 2003). O tratamento com tamoxifeno aumenta a sobrevida das

pacientes, o tempo de latência das neoplasias mamárias e também age como quimiopreventivo em mulheres com alto risco de desenvolvimento dessa neoplasia (Osborne, 1998; Howell et al., 2003; Moerkens et al., 2014).

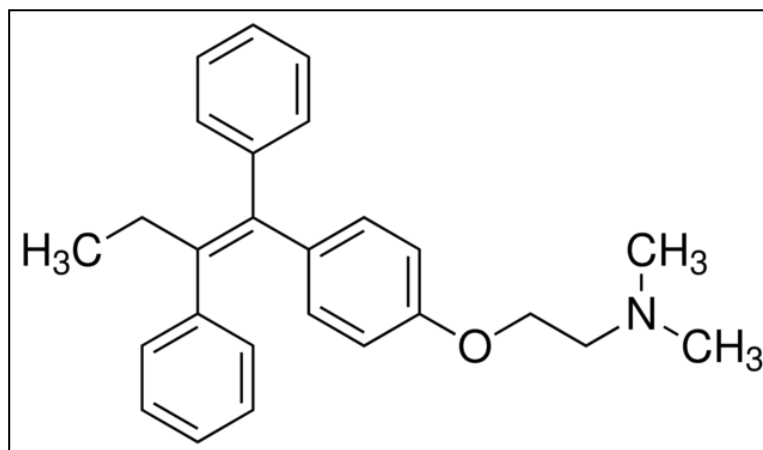


Figura 5. Estrutura molecular do Tamoxifeno. Fonte: <https://www.mpbio.com/product.php?pid=02156738>.

O tamoxifeno é uma droga antagonista de estrógenos da família dos Moduladores Seletivos dos Receptores de Estrógenos (SERMs), os quais se ligam com alta afinidade ao domínio de ligação do receptor de estrógeno impedindo sua ativação ao bloquear a interação desse receptor com os estrógenos (Kojetin et al., 2008). Esse efeito antiestrogênico é conhecido como antagonização por competição pelos receptores de estrógeno. Como os tumores RE-positivos são dependentes do estímulo estrogênico para proliferação de suas células, a ligação do tamoxifeno aos REs impede a propagação do estímulo proliferativo (Howell et al., 2003; Cleator et al., 2009).

Além do efeito antiproliferativo, o tamoxifeno também estimula a apoptose através da via mitocondrial por aumentar a concentração de Ca⁺² ionizado intramitocondrial e a atividade da enzima óxido nítrico sintase mitocondrial (mtNOS). Portanto, a combinação dos efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos resulta na regressão do número de células tumorais mamárias estrógeno-dependentes (Mandlekar et al., 2000; Nazarawicz et al., 2007) (Figura 6).

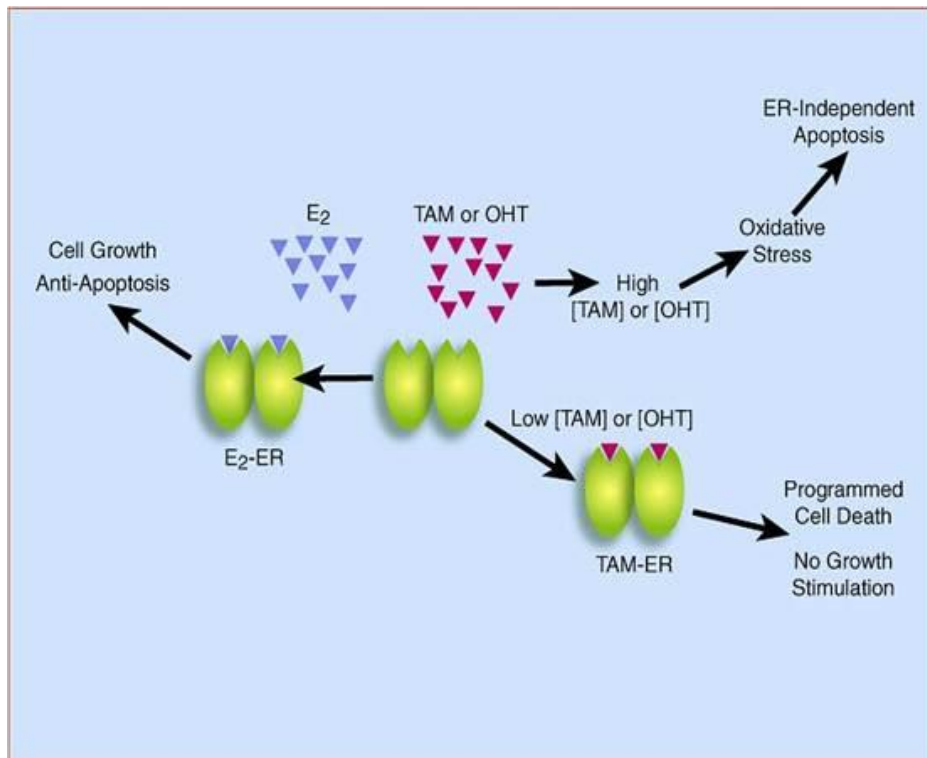


Figura 6. Mecanismos de ação do tamoxifeno (TAM) ou de seu metabólito 4-hidroxitamoxifeno (OHT), resultando na redução da proliferação celular e indução da apoptose. Fonte: <http://www.life.uiuc.edu/shapiro/TamoxifenApoptosis.html>.

Embora o tamoxifeno seja a droga mais comumente utilizada, ele está intimamente associado a graves efeitos colaterais que limitam sua utilização, como por exemplo, um aumento significativo no risco de câncer de endométrio e de fígado (White, 1999; Kim et al., 2005; Conti et al., 2014; Zhang et al., 2016). Esse aumento no risco é devido a um bloqueio múltiplo de REs que resulta em danos mutagênicos/genotóxicos nesses órgãos-alvo sendo que a extensão desses danos depende da dose e do tempo de exposição ao tamoxifeno (White, 1999; Kim et al., 2005; Brown, 2009).

Outros efeitos colaterais frequentemente relatados por pacientes em tratamento com tamoxifeno são a anorexia, plaquetopenia, leucopenia, neutropenia, anemias, hemorragias, endometriose, distúrbios gastrintestinais, pancreatite, hepatite esteatorréica, hipercalcemia, depressão e alterações no sono (López et al., 2006; El-Ashmawy et al., 2014; Suddek, 2014; Pan et al., 2016). Portanto, opções terapêuticas que possam auxiliar no tratamento do carcinoma mamário, são de extrema importância.

1.2 Carcinogênese química mamária

1.2.1 Conceitos gerais

O desenvolvimento de uma neoplasia é um processo longo e em múltiplas etapas, nas quais modificações genéticas (mutações pontuais, ampliações e deleções gênicas) e epigenéticas (metilação do DNA e metilação e acetilação de histonas) são progressivamente acumuladas no genoma das células (Hanahan, 2011). Os tumores malignos induzidos pela administração de carcinógenos químicos específicos, constitui uma ferramenta importante para o entendimento das múltiplas etapas da carcinogênese (iniciação, promoção e progressão), assim como para estudos preventivos e terapêuticos (Thompson & Singh, 2000; Medina, 2007) (Figura 7).

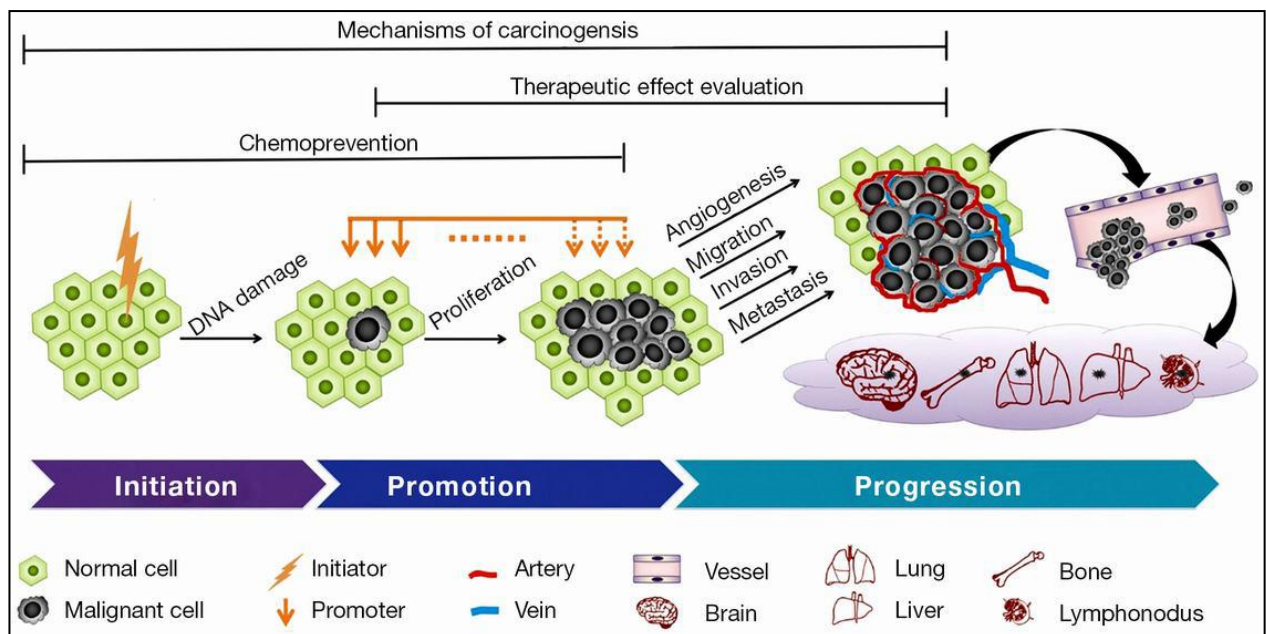


Figura 7. Ilustração das três fases da carcinogênese, com os momentos indicados para a realização de testes quimiopreventivos e avaliação terapêutica. Fonte: Liu *et al.*, Quant Imaging Med Surg, 5(5):708-729, 2015b.

A *iniciação* é caracterizada pela exposição de células normais a uma dose mínima de um ou mais agentes cancerígenos, resultando em alterações na sequência de bases nitrogenadas do DNA dessas células. Os carcinógenos químicos (diretos ou indiretos) possuem átomos altamente reativos que, ao interagir com o DNA, RNA,

proteínas e/ou lipídios, causam alterações profundas nessas moléculas. Essas alterações podem causar a morte celular pela destruição drástica de proteínas e lipídios, fabricação de proteínas anômalas ou pela aquisição de mutações no material genético (Baird et al., 2005). Sendo assim, para as células-alvos se tornarem células iniciadas elas precisam sobreviver ao estímulo mutagênico em seu DNA (Schulte-Hermann et al., 1999).

No transcorrer da vida, as células sofrem diversas mutações pontuais causadas pelas espécies reativas de oxigênio durante o processo de respiração oxidativa. Geralmente essas mutações são corrigidas rapidamente pelo o complexo sistema de reparo de danos embutido na DNA-polimerase, tornando-as inócuas às células. Porém, quando a célula é exposta a quantidades excessivas de danos ao DNA, a capacidade de correção de erros de pareamento da DNA-polimerase se torna saturada (Fruehauf & Meyskens et al., 2007). Por isso, os agentes carcinógenos devem induzir múltiplas mutações simultâneas que ultrapassam a capacidade do sistema de reparo da célula (Kerr et al., 2013). Nesse momento, essas mutações se fixam ao DNA, ocorre a duplicação de todo o material genético e a célula passa a transcrever a nova sequência como se fosse o DNA original da célula. Com o passar do tempo e ainda na presença do insulto mutagênico ou genotóxico, a célula acumula progressivamente numerosas mutações no seu genoma, sendo então denominada célula iniciada (Vincent & Gatenby, 2008).

As células iniciadas necessitam sofrer um processo de expansão clonal para originar as lesões pré-neoplásicas. Essa fase é então denominada de *promoção*. A presença de agentes promotores é essencial para o desenvolvimento de lesões proliferativas, anaplásicas e displásicas, porém, eles não apresentam mecanismos de ação mutagênicos. Esses agentes ativam proteínas-quinases envolvidas na fosforilação de substratos das vias de transdução de sinais de resposta a fatores de crescimento (Herman, 2005), resultando na expansão celular clonal apenas das células iniciadas. A multiplicação seletiva dos clones de células iniciadas resulta no acúmulo progressivo de mais mutações e aumento na instabilidade genética que culminam com o desenvolvimento de células anaplásicas e malignas (Vincent & Gatenby, 2008; Liu et al., 2015b).

Com a presença de numerosas células neoplásicas com elevado grau de anaplasia, o agente promotor se torna dispensável, pois as células nesse estágio se

tornam autossuficientes a estímulos de crescimento e multiplicação celular, além de serem resistentes aos mecanismos apoptóticos intrínsecos das células normais. As células sofrem mais mutações, adquirindo características mais agressivas e passam a expressar o fenótipo maligno atingindo o terceiro estágio da carcinogênese, a *progressão* (Hanahan, 2011; Liu et al., 2015b). Nesse estágio, também ocorre o acúmulo de novas mutações em genes específicos que controlam a capacidade invasiva das células, processo facilitado devido ao elevado número de mitose. O próximo passo das células malignas é a infiltração vascular e linfática e a colonização de tecidos distantes do hospedeiro (focos secundários de tumores), processo este, denominado de metástase (Hanahan, 2011; Liu et al., 2015b).

1.2.2 Modelos de carcinogênese química mamária experimental

O modelo animal ideal para se estudar a carcinogênese deve mimetizar a carcinogênese humana (Russo et al., 1996). Os roedores são amplamente utilizados para o estudo da carcinogênese mamária, visto que suas glândulas mamárias são altamente susceptíveis a desenvolver neoplasias pela ação de carcinógenos químicos. Russo et al. (1996) consideram o rato como modelo animal mais adequado para o estudo da carcinogênese da mama, pois o desenvolvimento de tumores mamários em camundongos leva um período de tempo maior e requer múltiplas aplicações dos carcinógenos além, de não ser tão amplamente estudado como é em ratos (Russo & Russo, 2004).

Entre as linhagens de ratos existentes, as que são mais comumente utilizadas para o estudo da carcinogênese química mamária são as Sprague-Dawley, Wistar-Furth e Fisher-344, pois são as mais susceptíveis a ação dos carcinógenos (Russo & Russo, 2004).

As substâncias químicas mais utilizadas nos modelos experimentais de indução da carcinogênese mamária em fêmeas de ratos e camundongos são a 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) e a N-metil-N-nitrosourea (MNU), sendo administradas pela via intragástrica e subcutânea, respectivamente. A maioria dos carcinomas mamários induzidos pela DMBA e MNU são carcinomas hormônio-dependente (Russo et al., 1994; Russo & Russo, 1996) (Figura 8).

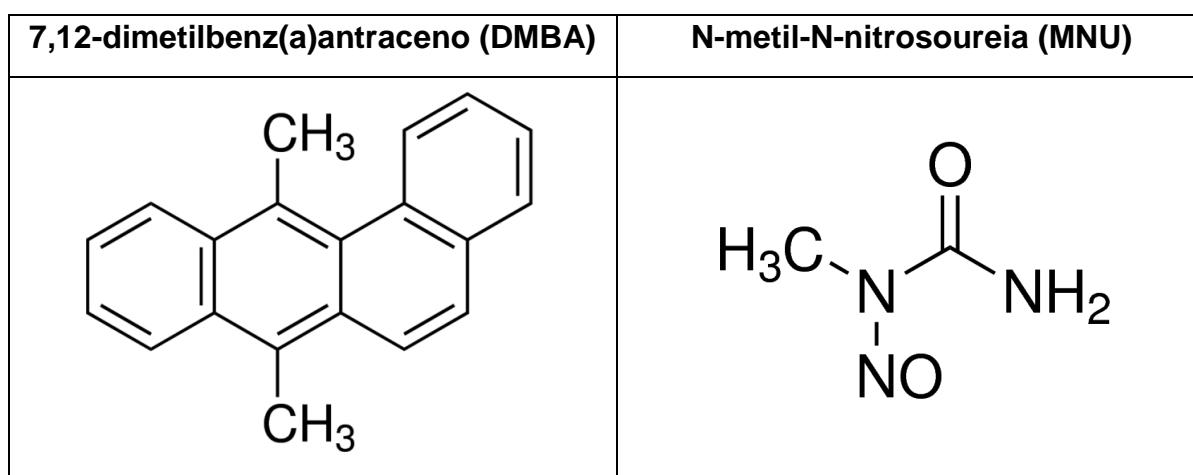


Figura 8. Estrutura química dos carcinógenos DMBA e MNU. Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com>

Para a indução dos carcinomas mamários em roedores, o carcinógeno deve agir em um compartimento específico da glândula mamária, os chamados *terminal end buds* (TEBs). Ao se administrar o carcinógeno, a maioria dos TEBs ao invés de se diferenciar em ABs se torna progressivamente mais espesso, devido à proliferação epitelial, exibindo múltiplas camadas, formação de um lúmen secundário e as primeiras projeções papilares. Nesse estágio os TEBs passam a ser chamados de proliferações intraductais (IDPS). A confluência dessas projeções leva a formação de microtumores chamados de carcinomas intraductais (IDCas), os quais continuam sofrendo confluências sendo classificados histologicamente como adenocarcinomas (AdCa) (Figura 9). Os adenocarcinomas desenvolvem diversos padrões histológicos, como cribiforme, comedo, tubular e papilar, sendo inicialmente intraductais progredindo para invasivos (Russo et al., 1989; Russo & Russo, 2000; Russo & Russo, 2004).

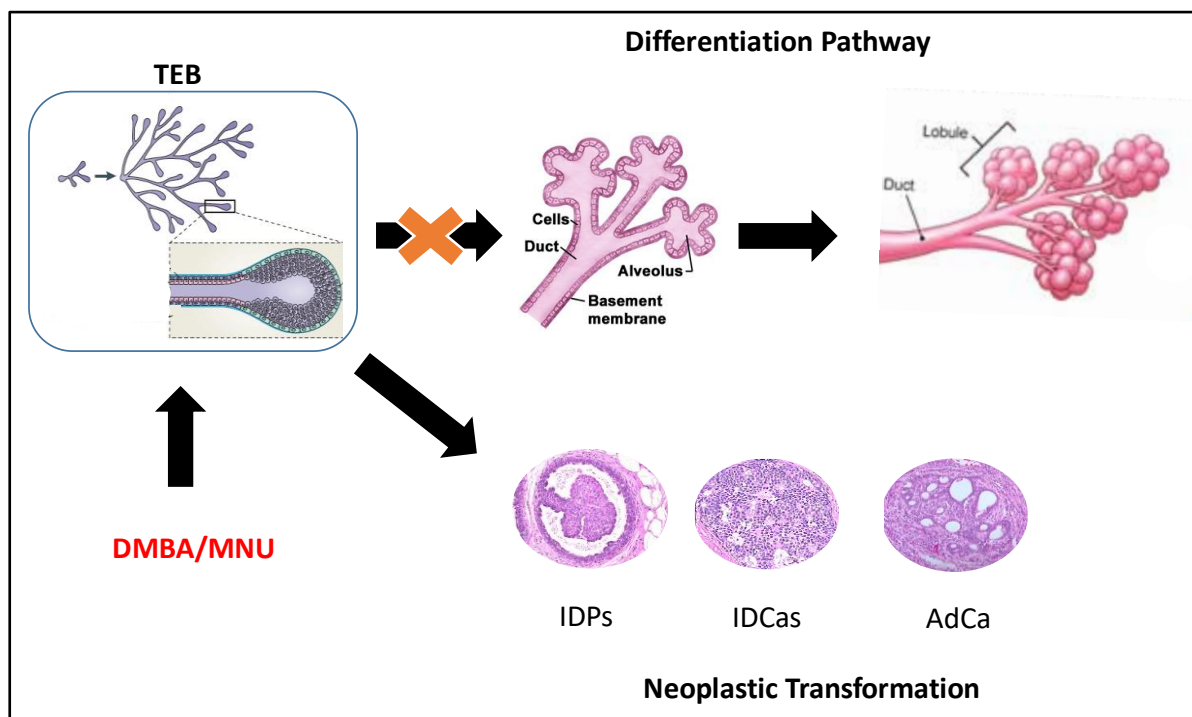


Figura 9. Desenvolvimento de tumores mamários induzidos quimicamente em roedores. Os TEBs afetados pelo carcinógeno se tornam progressivamente mais espessos formando as proliferações intraductais (IDPs). Essas projeções se confluem originando os carcinomas intraductais (IDCas) e estes os adenocarcinomas (AdCa). Fonte: Modificado de Russo & Russo, *Cancer Ep Biom Prev.*, (3): 353-64, 1994.

A incidência, multiplicidade e tipos de tumores mamários são influenciados pela idade, tempo de exposição ao cancerígeno, história reprodutiva, desregulação endócrina, dieta e outros fatores que alteram o desenvolvimento e o grau de diferenciação da glândula mamária (Russo et al., 1994; Russo & Russo, 1996). Na carcinogênese química experimental, a suscetibilidade é extremamente dependente da idade. O carcinógeno deve ser administrado às fêmeas de ratas virgens com 40-60 dias de idade. Essa idade coincide com o período em que a glândula mamária exibe alta densidade de TEBs, os quais se encontram altamente proliferativos (Russo et al., 1996; Macejová & Brtko, 2001) (Figura 10).

Um dos motivos que fazem com que os TEBs sejam os alvos para ação dos carcinógenos é devido a sua alta taxa proliferativa, que diminuiu progressivamente nos alvéolos e lóbulos, e à sua baixa porcentagem de morte celular. Além disso, ao metabolizar o DMBA/MNU as células epiteliais mamárias geram metabólitos polares que causam danos ao DNA. As células dos TEBs produzem muito mais metabólitos polares do que as lobulares e removem os addutos de DNA menos eficientemente.

Portanto, esses quatro parâmetros fazem com que os TEBs sejam as estruturas mais susceptíveis à transformação neoplásica (Macejová & Brtko, 2001; Russo & Russo, 2004).

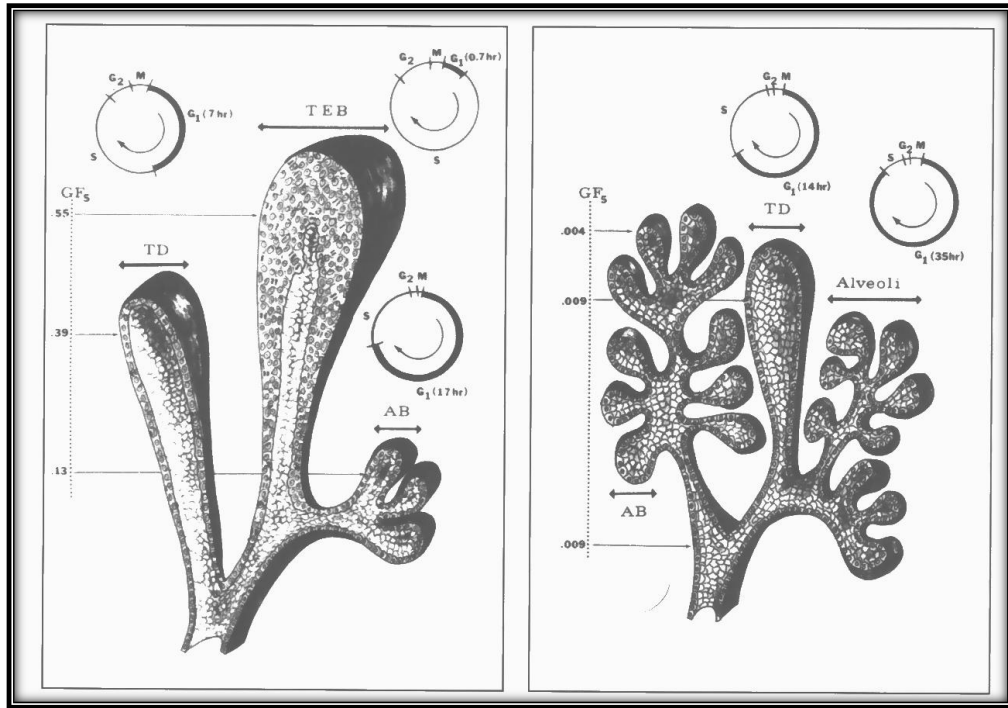


Figura 10. Representação esquemática das estruturas da glândula mamária com seus respectivos ciclos celulares. Os TEBs apresentam alta taxa proliferativa, a qual diminui progressivamente nos alvéolos e nos lóbulos. Fonte: Russo & Russo, *Cancer Res.*,(40):2677-87, 1980.

1.3 Imunoterapia com P-MAPA

1.3.1 Definições, mecanismos de ação e efeitos da imunoterapia com P-MAPA

A utilização da imunoterapia, principalmente quando associada a outros medicamentos, vem se tornando uma opção terapêutica valiosa no tratamento de diferentes tipos de neoplasias, como por exemplo, o carcinoma mamário hormônio-dependente (Cook et al., 2004; Killeen et al., 2006).

As abordagens da imunoterapia do câncer variam desde a ativação da resposta imune inata e adaptativa até a neutralização de mecanismos supressores imunológicos

através dos chamados imunomoduladores (Di Lorenzo et al., 2011; Mellman et al., 2011; Muenst et al., 2016).

Segundo estudos, o composto de nome P-MAPA (agregado polimérico anidrido fosfolinoleato-palmitoleato de amônio e magnésio) é capaz de induzir respostas imunomoduladoras frente a processos infecciosos e neoplásicos sendo, portanto, considerado um imunomodulador promissor (Justo et al., 2003; Durán et al., 2009, Fávaro et al., 2012; Garcia et al., 2015,2016; Dias et al., 2016)

O P-MAPA é um biopolímero não linear, com massa molecular de 320 kDa, isolado do fungo *Aspergillus orizaceae* (Durán & Nunes, 1990; Durán et al., 1997). Os principais componentes da molécula são: Mg^{2+} , NH_4^+ , fosfato, ácidos linoleico e palmitoleico e proteína. O conteúdo percentual de proteína está ao redor de 0,5%, com massa molecular de 10 kDa. Os aminoácidos encontram-se distribuídos em porcentagem da seguinte maneira: Asp 7,19%; Thr 3,56%; Ser 7,56%; Glu 8,53%; Pro 0,5%; Gly 9,69%; Ala 7,46%; Vai 1,0%; Met 4,38%, Isoleu 2,54%, Leu 3,03%, Tyr 0,5%, Phe 1,0%, His 2,83%; Lys 3,56%, Trp 1,3% e Arg 35,2% (Durán & Nunes, 1990; Durán et al., 1997) (Figura 11).

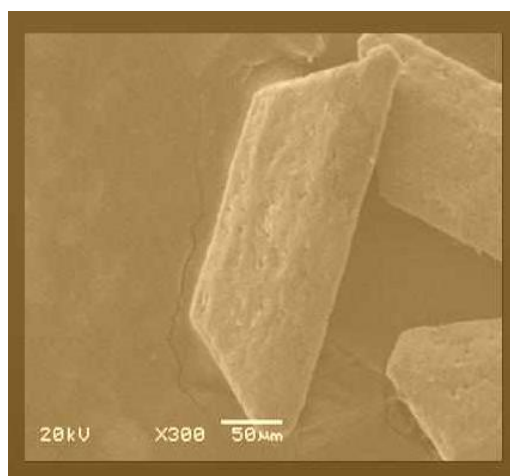


Figura 11. Microcristais do composto P-MAPA (microscopia eletrônica, aumento 300x). Fonte: farmabrasilis.org.br/todos_conteudos_interna.php?idioma=eng&id=198

Estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* demonstraram o P-MAPA foi capaz de estimular a proliferação de linfócitos T e a produção de vários tipos de citocinas durante processos infecciosos, virais e neoplásicos (Melo et al., 2001, Justo et al., 2003; Durán et al., 2009, Fávaro et al., 2012; Garcia et al., 2015,2016; Dias et al., 2016).

Em estudo conduzido por Durán *et al.* (2009), fêmeas de camundongos da linhagem C57BL/6 que receberam dose de 5mg/kg do imunomodulador após infecção pelo Punta Toro Vírus, tiveram sobrevida de 70%, enquanto o tratamento com a Ribavarina conferiu sobrevida de 80%. Além disso, o tratamento com o P-MAPA demonstrou evidente redução da carga viral sistêmica e de danos hepáticos nos animais (Durán *et al.*, 2009).

A administração do P-MAPA (2.0 mg/kg) também induziu resposta imune durante o tratamento de Leishmaniose visceral canina. Após 45 dias de tratamento, os animais apresentaram diminuição da carga parasitária na pele, aumento dos níveis de interleucina 2 (IL-2) e de interferon (IFN), assim como diminuição dos níveis de interleucina 10 (IL-10). Também foi observado aumento de células TCD8+ no sangue periférico que é comumente observado durante o tratamento dessa doença com outros imunomoduladores (Santiago *et al.*, 2013).

Em modelos animais para o estudo do câncer, o P-MAPA demonstrou capacidade de reverter o estado de imunossupressão causado pelo processo tumoral. Em diversos modelos de células tumorais transplantáveis, como por exemplo, sarcoma-180; carcinoma de Erlich; plasmacitoma SP-2Ag14; tumor de Walker 256 e carcinoma mamário espontâneo SP-1, foi observado inibição do crescimento tumoral e aumento da sobrevida de animais após tratamento com o P-MAPA (Durán *et al.*, 1993, 1997). Além disso, os animais transplantados com o tumor de Walker apresentaram, em grande parte, resistência a implantação das células tumorais (Durán *et al.*, 1997; Durán *et al.*, 1999). Segundo alguns autores, os efeitos antitumorais observados nestes estudos, podem ser atribuídos à capacidade do imunomodulador em aumentar a defesa do hospedeiro sem afetar diretamente as células tumorais (Durán *et al.*, 1993,1999).

Em outro estudo com camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich (TAE), foi observado redução de 35% da esplenomegalia e do crescimento tumoral, estimulação da mielopoiese e aumento da produção de IL-2 e interferon-gama (IFN- γ), com conseqüente aumento da atividade de células *natural-killer* (NK) após 7 dias de tratamento subcutâneo com P-MAPA (Justo *et al.*, 2003). De acordo com estes autores, o efeito modulador do P-MAPA na resposta mielopoética está relacionado à sua atividade antitumoral, com um possível mecanismo de regulação na produção de CFU-

GM (unidades formadoras de colônias granulocíticas e monocíticas) e expressão de suas atividades funcionais.

Melo et al. (2001) também avaliaram os efeitos do P-MAPA no número de CFU-GM na medula óssea de camundongos infectados com *Listeria monocytogenes* e concluíram que este imunomodulador potencializou os mecanismos imunológicos reguladores das células precursoras da medula óssea, as quais estão envolvidas no controle das alterações provocadas pelo tumor no sistema hematolinfopoiético do hospedeiro.

Recentemente, estudos concluíram que, o amplo espectro de ação deste imunomodulador, bem como a velocidade com que ele mobiliza a resposta terapêutica, é devido à capacidade do P-MAPA em ligar-se a receptores *toll-like*, especialmente os receptores *toll-like 2* e *toll-like 4* (Fávaro et al., 2012; Garcia et al., 2015; 2016; Dias et al., 2016) (Figura 12).

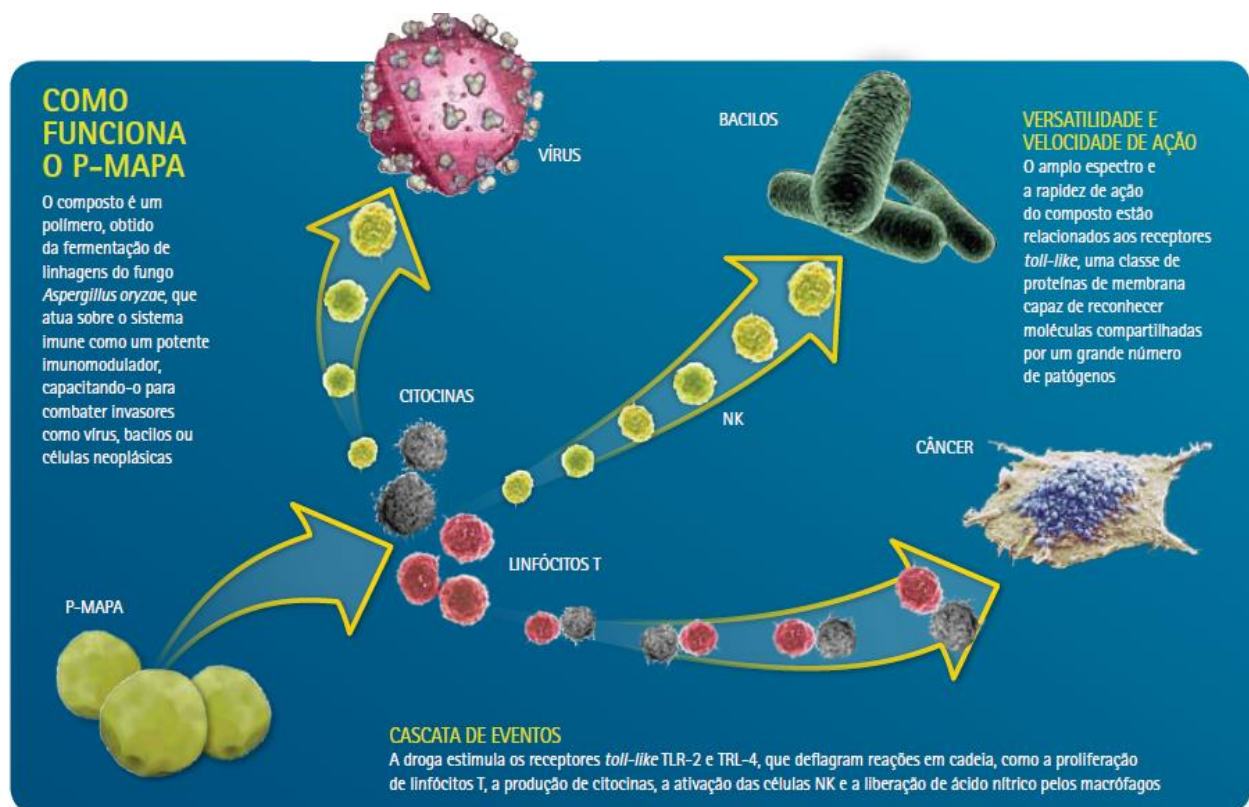


Figura 12. Mecanismos de ação do imunomodulador P-MAPA. Fonte: Cristant L. Pesquisa Médica, nº17, 2011.

1.3.2 P-MAPA e Receptores toll-like

Os receptores do tipo Toll (*toll-like receptors* -TLRs) são glicoproteínas transmembrânicas do tipo I que reconhecem padrões moleculares conservados associados a patógenos (*PAMP*) ou moléculas endógenas originadas do dano tecidual (*DAMP*) iniciando a sinalização de resposta intracelular (Srikrishna & Freeze, 2009; Galli et al., 2010; Kumar et al., 2011).

Os TLRs são expressos por diversas células do sistema imune, como macrófagos, células dendríticas e células B, assim como por outros tipos celulares incluindo células endoteliais e epiteliais. Além disso, os TLRs também são frequentemente expressos por células tumorais, conferindo-lhes um papel na fisiopatologia dessa doença (Beg, 2002; Hopkins and Srisakandan, 2005; Dajon et al., 2016).

A sinalização dos TLRs pode ocorrer pela via dependente de MyD88 (*myeloid differentiation primary response 88*), que é comum a todos os TLRs, ou pela via dependente de TRIF sendo exclusiva para os TLR3 e TLR4. Na via dependente de MyD88 é ativado o fator nuclear kappa-beta (NF- κ B) resultando na indução de citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e a IL-6, enquanto que na via dependente de TRIF, ocorre a ativação do IFN e do IRF-3 (*interferon regulatory factor 3*) (Takeda & Akira, 2005; Dajon et al., 2016) (Figura 13).

Durante o processo da carcinogênese, o envolvimento dos TLRs é controverso, pois dados conflitantes apontam os TLRs como reguladores negativos ou positivos da carcinogênese (Ma et al., 2014; Scheeren et al., 2014; Chen et al., 2015; Ho et al., 2015; Maruyama et al., 2015). Acredita-se que os efeitos anti/pró-tumoral dos TLRs sobre a carcinogênese ou sobre a progressão tumoral dependam do tipo de receptor *toll-like*, do tipo de câncer e das células imunes que infiltram o tumor (Dajon et al., 2016).

Os efeitos antitumorais oriundos da estimulação dos TLRs ocorrem tanto pela expressão dos TLRs pelas células do sistema imune (melhorando a resposta imune) quanto pelas células tumorais (ocasionando a apoptose celular) (Yusuff et al., 2008; Lu et al., 2011; Li et al., 2015; Dajon et al., 2016). Por outro lado, a maioria dos estudos que investigam os efeitos pró-tumorais dos TLRs, observa que eles são devido à expressão desses receptores pelas células tumorais, promovendo, principalmente,

angiogênese, metástase e proliferação, e menos frequente, devido à sua expressão pelas células imunes (Huang et al., 2005; Allavena et al., 2008; Gonzáles et al., 2010; Yang et al., 2010; Dajon et al., 2016).

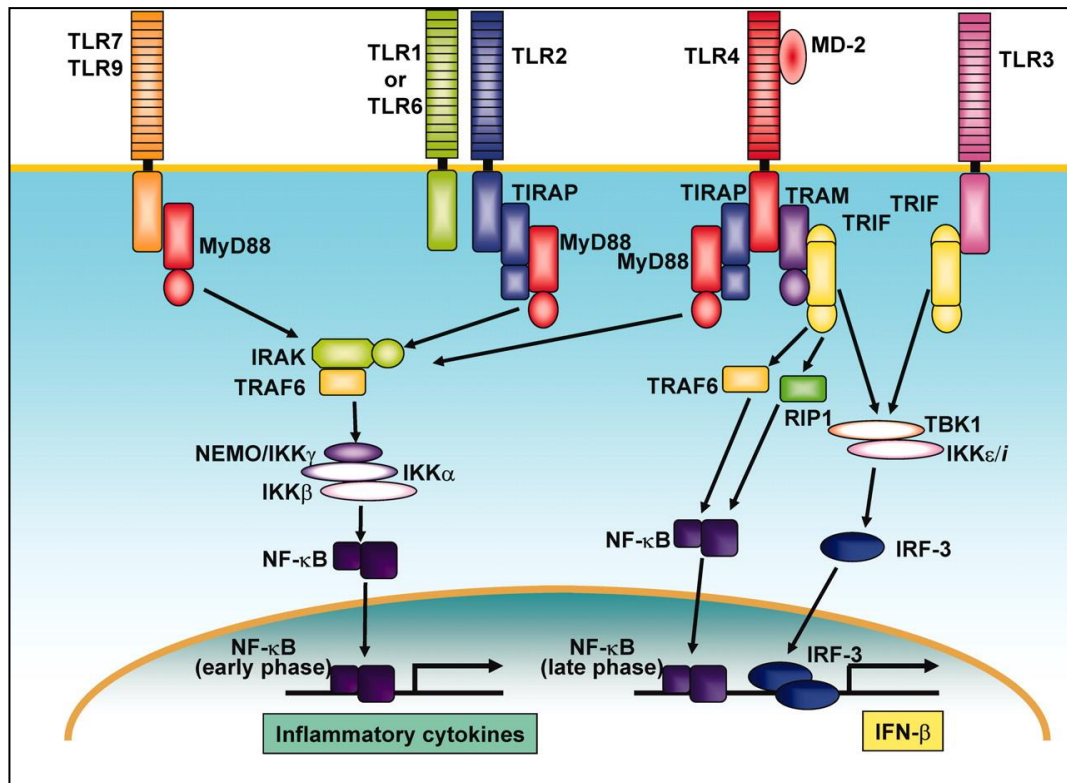


Figura 13. Vias de sinalização dos receptores *toll-like*. O adaptador MyD88 se associa ao domínio TIR citoplasmático dos TLRs recrutando IRAK, o qual ativa TRAF6. A ativação de TRAF6 leva a ativação do complexo I κ B-quinase (IKK) que por sua vez fosforila o I κ B resultando na translocação do NF- κ B. Essa translocação induz a expressão de citocinas inflamatórias. Um segundo adaptador que contém o domínio TIR (TIRAP) está envolvido na ativação do TLR2 e TLR4. Nas vias de sinalização mediadas por TLR3 e TLR4, a ativação de IRF-3 e a indução de IFN- β são independentes de MyD88, sendo necessário um terceiro adaptador (TRIF). Para a via mediada pelo TLR4 dependente de TRIF é necessário um quarto adaptador (TRAM). Fonte: Takeda & Akira, *Int Immunol* 17(1): 1-14, 2005.

Segundo estudo conduzido por Scheeren et al. (2014), camundongos APC^{min/+}TLR2^{-/-} apresentaram menor número de tumores espontâneos e tiveram redução na mortalidade e na formação de pólipos. Em quatro linhagens celulares de carcinoma hepatocelular (SCC4, UM-SCC-6, UPCI:SCC103 e PCI-13) o bloqueio da sinalização do TLR2 pelo anticorpo mAb- α -TLR2, reduziu significativamente o tamanho das células, indicando que a ativação desse receptor promove o crescimento tumoral (Farnebo et al., 2015).

González et al. (2010) observou que os receptores TLR3, TLR4 e TLR9 são altamente expressos em tumores mamários humano, sendo que o índice de metástase é maior quando as células tumorais expressam TLR3 e quando as células inflamatórias expressam TLR4. Resultados observados por Yang et al (2014), sugerem que os TLR4 podem participar da progressão e metástase do carcinoma mamário humano. Neste estudo, a ativação do TLR4 nas linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231, através do estímulo pelo lipopolissacarídeo (LPS), aumentou a expressão do VEGF e das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9. Além disso, essa ativação aumentou o poder de invasão das células MDA-MB-231, assim como aumentou a expressão das IL-6 e IL-10.

Além do envolvimento do TLR4 na progressão tumoral mamária, estudos confirmam alta expressão de TLR4 em tumores de cólon e em adenocarcinomas ductais pancreáticos humano (Camarota et al., 2010; Zhang et al., 2010). Os pacientes que apresentaram alta expressão desse receptor tiveram um aumento significativo na progressão dessas neoplasias em comparação aos que exibiram baixa expressão do TLR4.

Por outro lado, diversos estudos demonstram os efeitos antitumorais dos TLRs (Zhang et al., 2011; Lin et al., 2013; Li et al., 2015; Dajon et al., 2016).

A administração oral de um agonista de TLR2 (polissacarídeo de kerestina – PSK) a camundongos transgênicos (MMTVneu) foi capaz de inibir significativamente o crescimento tumoral mamário através da estimulação de TCD8 (+) e células (Lu et al, 2011).

Em modelo de carcinogênese experimental de cólon, camundongos C57BL/6-TLR2^{-/-} que receberam azoximetano (AOM) e *dextran sulfato de sódio* (DSS) apresentaram aumento na taxa de proliferação celular, diminuição do índice apoptótico, aumento na produção de IL-17A e redução de IFN- γ . Além disso, o número de tumores de cólon foi maior nos camundongos C57BL/6-TLR2^{-/-} do que nos C57BL/6-TLR2^{+/+} (Lowe et al., 2010). Resultados similares também foram observados na carcinogênese experimental de fígado. Camundongos C57BL/6-TLR2^{-/-} iniciados com a diethilnitrosamina (DEN) apresentaram menor taxa de sobrevida, aumento do volume dos tumores de fígado, diminuição da expressão do IFN- γ , TNF α , IL-1 e IL-6 (Lin et al., 2013).

Em estudo recente conduzido por Li et al. (2015), os hepatócitos de camundongos C57BL/6 iniciados com a DEN apresentaram diminuição na expressão do TLR2. Além

disso, o tratamento com a lipoproteína tripalmitolada (Pam3CSK4 – agonista de TLR2) atenuou o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular através da redução do número e do tamanho dos tumores.

A estimulação do receptor TLR3 também diminuiu a taxa de proliferação e aumentou o índice apoptótico em tumores de fígado induzido pela 2-acetylaminofluoreno (2-AAF) em ratos Sprague-Dawley. Esses resultados foram associados ao aumento de células positivas para caspase-8 e caspase-3 e diminuição da expressão de survivina e Bcl-2 (Xu et al., 2013a, 2013b). Os efeitos antitumorais da estimulação de TLR3 também foram observados em linhagens celulares de câncer de próstata (RWPE-1, LNCaP e PC3). Nesse estudo, a estimulação pelo polímero sintético poly(I:C) ocasionou a ativação de caspase 3, caspase-8 e caspase-9 através da via de ativação do IRF3 (Paone et al., 2008; Gambarà et al., 2015).

Diversos estudos têm demonstrado que os receptores TLR4 também estão envolvidos em respostas antitumorais. Fêmeas de camundongos C3H/HeJ-TLR4^{-/-} que receberam aplicações tópicas de DMBA, foram mais susceptíveis a desenvolver tumores de pele do que os camundongos C3H/HeJ-TLR4^{+/+}. Além dos animais deficientes de TLR4 desenvolveram mais tumores, eles apresentaram período de latência menor e maior volume tumoral do que os animais TLR4^{+/+} (Yusuf et al., 2008).

Naseemuddin et al. (2012) demonstraram que os TLR4 também desempenham respostas antitumorais na carcinogênese mamária induzida pela DMBA. As fêmeas de camundongos C3H/HeJ-TLR4^{-/-} desenvolveram mais tumores mamários, expressaram maior nível de IL-17 e menor nível de IFN- γ em comparação com as fêmeas C3H/HeJ-TLR4^{+/+}. Além disso, o VEGF e as metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 foram altamente expressos nos tumores dos animais TLR4^{-/-}.

Mesmo que a estimulação dos TLRs possa levar a efeitos pró-tumorais, uma das abordagens terapêuticas mais utilizadas para melhorar a resposta imune antitumoral é a estimulação dos TLRs, principalmente a expressão que ocorre pelas células do sistema imune (Vacchelli et al., 2013).

Segundo Cook et al (2004) e Killeen et al (2006), compostos que tem como alvo os TLRs podem representar pontos de partida para o desenvolvimento de novas drogas no tratamento de algumas doenças, entre elas, o câncer. Estudos preliminares vêm demonstrando que o P-MAPA é capaz de estimular os receptores TLR2 e TLR4,

descoberta esta, que permitiu explicar a incrível velocidade com que ele desencadeia a resposta imunológica.

Em cultura de células tumorais de bexiga, Ayari et al. (2011) observaram que houve diminuição da expressão de receptores TLR2 e TLR4 em relação às células uroteliais normais. A administração de P-MAPA à fêmeas de ratos Fisher 344 com carcinoma de bexiga não músculo invasivo (CBNMI) induzido pela MNU, foi capaz de aumentar os níveis proteicos dos receptores TLR2, TLR4 e da proteína p53, melhorando o estado imunológico dos animais (Fávaro et al, 2012). Resultado similar foi observado em células HEK293, onde a estimulação dos TLR2 e TLR4 ocorreu via ativação do fator NF- κ B (Fávaro et al, 2012).

Em estudo recente utilizando o mesmo modelo de indução de CBNMI o tratamento combinado de flutamina com P-MAPA em fêmeas Fisher-344 iniciadas com MNU, resultou em aumento dos níveis proteicos dos receptores RE- α /RE- β , TLR4, TRIF, IRF3 e IFN- γ , diferentemente do observado no tratamento com BCG e BCG/flutamina. Nesse mesmo estudo, o tratamento com P-MAPA independente de flutamina aumentou os níveis da proteína CYP450 (Garcia et al., 2015). O mesmo grupo de pesquisa, também observou que o P-MAPA apresentou efeito antitumoral por aumentar os níveis de interferon e diminuir os de VEGF no mesmo modelo de CBNMI (Garcia et al., 2016).

Adicionalmente, Dias et al. (2016) demonstrou que o tratamento de cisplatina com o P-MAPA, assim como o tratamento do P-MAPA sozinho, diminuíram os níveis das proteínas Akt, PI3K, NF- κ B e VEGF e aumentou os níveis da proteína PTEN em fêmeas Fisher-344 com CBNMI.

Quanto a toxicidade do imunomodulador, estudos experimentais de toxicologia aguda, subcrônica e crônica, demonstraram que o P-MAPA é uma droga segura, sem efeitos teratogênicos verificados *in vitro* e *in vivo*. Durán et al. (1993) comprovaram que o imunomodulador não causou citotoxicidade ou genotoxicidade em culturas de linfócitos humanos, sendo também não citotóxico em camundongos, cães e macacos. Em ensaios clínicos de fase I, o P-MAPA também não apresentou sinais relevantes de toxicidade (Farmabrilis 2008).

Sendo assim, o P-MAPA apresenta-se como possível candidato para auxiliar na terapia adjuvante do câncer e de doenças infecciosas.

2 Referências

- Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages. *Critical Reviews in Oncology / Hematology*. 2008. 66(1):1–9.
- Andrieu N, Easton DF, Chang-Claude J, Rookus MA, Brohet R, Cardis E, et al. Effect of Chest X-Rays on the Risk of Breast Cancer Among BRCA1/2 Mutation Carriers in the International BRCA1/2 Carrier Cohort Study: A Report from the EMBRACE, GENEPSO, GEO-HEBON, and IBCCS Collaborators' Group. *JCO*. 20 de julho de 2006;24(21):3361–6.
- Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, et al. Average Risks of Breast and Ovarian Cancer Associated with BRCA1 or BRCA2 Mutations Detected in Case Series Unselected for Family History: A Combined Analysis of 22 Studies. *American Journal of Human Genetics*. maio de 2003;72(5):1117–30.
- Ayari C, Bergeron A, LaRue H, Ménard C, Fradet Y. Toll-Like Receptors in Normal and Malignant Human Bladders. *The Journal of Urology*. 2011; 185(5):1915–21.
- Baumgarten SC, Frasor J. Minireview: Inflammation: An Instigator of More Aggressive Estrogen Receptor (ER) Positive Breast Cancers. *Molecular Endocrinology*. março de 2012;26(3):360–71.
- Beg AA. Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trends in Immunology*. 2002; 23(11):509–12.
- Björnström L, Sjöberg M. Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes. *Molecular Endocrinology*. 2005;19(4):833–42.
- Bouchardy C, Fioretta G, Verkooijen HM, Vlastos G, Schaefer P, Delaloye J-F, et al. Recent increase of breast cancer incidence among women under the age of forty. *British Journal of Cancer*. 4 de junho de 2007;96(11):1743–6.
- Brown K. Is tamoxifen a genotoxic carcinogen in women? *Mutagenesis*. 1 de setembro de 2009;24(5):391–404.
- Bush NJ. Advances in Hormonal Therapy for Breast Cancer. *Seminars in Oncology Nursing*. 2007; 23(1):46–54.
- Cammarota R, Bertolini V, Pennesi G, Bucci EO, Gottardi O, Garlanda C, et al. The tumor microenvironment of colorectal cancer: stromal TLR-4 expression as a potential prognostic marker. *Journal of Translational Medicine*. 2010;8:112–112.
- Cardiff RD, Anver MR, Gusterson BA, Hennighausen L, Jensen RA, Merino MJ, et al. The mammary pathology of genetically engineered mice: the consensus report and recommendations from the Annapolis meeting. *Oncogene*. 2000;19(8):968–88.
- Catsburg C, Miller AB, Rohan TE. Active cigarette smoking and risk of breast cancer.

- Int. J. Cancer. 1 de maio de 2015;136(9):2204–9.
- Chen X, Zhao F, Zhang H, Zhu Y, Wu K, Tan G. Significance of TLR4/MyD88 expression in breast cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2015;8(6):7034–9.
- Christante L. A história incomum do P-MAPA. *Revista Médica*. 2011;(17):27–30.
- Cleator SJ, Ahamed E, Coombes RC, Palmieri C. A 2009 Update on the Treatment of Patients with Hormone Receptor—Positive Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*. 2009. 9:S6–17.
- de Conti A, Tryndyak V, Churchwell MI, Melnyk S, Latendresse JR, Muskhelishvili L, et al. Genotoxic, epigenetic, and transcriptomic effects of tamoxifen in mouse liver. *Toxicology*. 2014;325:12–20.
- Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol*. outubro de 2004;5(10):975–9.
- Cutuli B, Borel C, Dhermain F, Magrini SM, Wasserman TH, Bogart JA, et al. Breast cancer occurred after treatment for Hodgkin's disease: analysis of 133 cases. *Radiotherapy and Oncology*. 2001; 59(3):247–55.
- Cuzick J. Breast cancer prevention in the developing world. *Breast Cancer Research : BCR*. 2010;12(Suppl 4):S9–S9.
- Dai X, Xiang L, Li T, Bai Z. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *Journal of Cancer*. 2016;7(10):1281–94.
- Dajon M, Iribarren K, Cremer I. Toll-like receptor stimulation in cancer: A pro- and anti-tumor double-edged sword. *Immunobiology*. janeiro de 2017;222(1):89–100.
- Dias QC, Nunes I da S, Garcia PV, Fávoro WJ. Potential therapeutic strategies for non-muscle invasive bladder cancer based on association of intravesical immunotherapy with P-MAPA and systemic administration of cisplatin and doxorubicin. *International Brazilian Journal of Urology: official journal of the Brazilian Society of Urology*. 2016;42(5):942–54.
- Di Lorenzo G, Buonerba C, Kantoff PW. Immunotherapy for the treatment of prostate cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. setembro de 2011;8(9):551–61.
- Domchek SM, Weber BL. Recent advances in breast cancer biology. *Curr Opin Oncol*. novembro de 2002;14(6):589–93.
- Dunn BK, Greene MH, Kelley JM, Costantino JP, Clifford RJ, Hu Y, et al. Novel pathway analysis of genomic polymorphism-cancer risk interaction in the Breast Cancer Prevention Trial. *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*. 2010;1(4):332–49.
- Durán N, Gowen BB, Costa FTM, Justo GZ, Brocchi M, Nunes OS, et al. A biotechnological product and its potential as a new immunomodulator for treatment of animal phlebovirus infection: Punta Toro virus. *Antiviral Research*. agosto de

- 2009;83(2):143–7.
- Durán N, Haun M, Souza-Brito ARM, Vargas L, Justo GZ, de Oliveira A, et al. SB-73. Immuno-modulating Agent. *Drugs of the Future*. 1993;18(4):327–34.
- Durán N, Justo GZ, Queiroz MLS, Vieiramatos AN, Rettori O. New perspective on immunomodulatory therapy of tumor induced by an extracellular aggregated polymer isolated from *Aspergillus oryzae*. *International Journal of Molecular Medicine*. 1999;4(1):S49–S49.
- Durán N, Justo GZ, Souza-Brito ARM, Rettori O, Vieiramatos AN. SB-73 / MAPA. *Drugs of the Future*. 1997;18(4):454.
- Durán N, Nunes ODS. New Polymer of Proteic Magnesium Ammonium Phospholinoleate Anhydride from *Penicillium* sp (PB-73 Strain). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1990;23:1289.
- El-Ashmawy NE, Khalil RM. A review on the role of l-carnitine in the management of tamoxifen side effects in treated women with breast cancer. *Tumor Biology*. 2014;35(4):2845–55.
- Farmabrasilis. Estudos Clínicos – Fase I. 2008. Disponível em: http://www.farmabrasilis.org.br/interna_relatorios_clinicos.php?id=118.
- Farnebo L, Shahangian A, Lee Y, Shin JH, Scheeren FA, Sunwoo JB. Targeting Toll-like receptor 2 inhibits growth of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 30 de abril de 2015;6(12):9897–907.
- Fávaro WJ, Nunes OS, Seiva FR, Nunes IS, Woolhiser LK, Durán N, et al. Effects of P-MAPA Immunomodulator on Toll-Like Receptors and p53: Potential Therapeutic Strategies for Infectious Diseases and Cancer. *Infectious Agents and Cancer*. 2012;7:14–14.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer*. 1 de março de 2015;136(5):E359–86.
- Fernandez S, Russo J. Estrogen and Xenoestrogens in Breast Cancer. *Toxicologic pathology*. 2010;38(1):110–22.
- Fischer C, Mamillapalli R, Goetz LG, Jorgenson E, Ilagan Y, Taylor HS. Bisphenol A (BPA) Exposure In Utero Leads to Immunoregulatory Cytokine Dysregulation in the Mouse Mammary Gland: A Potential Mechanism Programming Breast Cancer Risk. *Hormones and Cancer*. 2016;7(4):241–51.
- Fruehauf JP, Meyskens FL. Reactive Oxygen Species: A Breath of Life or Death? *Clin Cancer Res*. 8 de fevereiro de 2007;13(3):789.
- Galli R, Starace D, Busà R, Angelini DF, Paone A, De Cesaris P, et al. TLR Stimulation of Prostate Tumor Cells Induces Chemokine-Mediated Recruitment of Specific Immune Cell Types. *J. Immunol*. 3 de junho de 2010;184(12):6658.

- Gambara G, Desideri M, Stoppacciaro A, Padula F, De Cesaris P, Starace D, et al. TLR3 engagement induces IRF-3-dependent apoptosis in androgen-sensitive prostate cancer cells and inhibits tumour growth in vivo. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. fevereiro de 2015;19(2):327–39.
- Garcia PV, Apolinário LM, Böckelmann PK, Nunes I da S, Duran N, Fávaro WJ. Alterations in ubiquitin ligase Siah-2 and its corepressor N-CoR after P-MAPA immunotherapy and anti-androgen therapy: new therapeutic opportunities for non-muscle invasive bladder cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2015;8(5):4427–43.
- Garcia PV, Seiva FRF, Carniato AP, de Mello Júnior W, Duran N, Macedo AM, et al. Increased toll-like receptors and p53 levels regulate apoptosis and angiogenesis in non-muscle invasive bladder cancer: mechanism of action of P-MAPA biological response modifier. *BMC Cancer*. 2016;16:422.
- Gaudet MM, Gapstur SM, Sun J, Diver WR, Hannan LM, Thun MJ. Active Smoking and Breast Cancer Risk: Original Cohort Data and Meta-Analysis. *Journal of the National Cancer Institute*. 17 de abril de 2013;105(8):515–25.
- González-Reyes S, Marín L, González L, González LO, del Casar JM, Lamelas ML, et al. Study of TLR3, TLR4 and TLR9 in breast carcinomas and their association with metastasis. *BMC Cancer*. 2010;10:665–665.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011. 144(5):646–74.
- Harris CC. Tobacco Smoking and Cancer Risk in Women. *Journal of women's cancer*. 2001;3(1):1–4.
- Herman JG. Epigenetic Changes in Cancer and Preneoplasia. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 2005;70:329–33.
- Hopkins PA, Sriskandan S. Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clinical and Experimental Immunology*. junho de 2005;140(3):395–407.
- Ho V, Lim TS, Lee J, Steinberg J, Szmyd R, Tham M, et al. TLR3 agonist and Sorafenib combinatorial therapy promotes immune activation and controls hepatocellular carcinoma progression. *Oncotarget*. 29 de setembro de 2015;6(29):27252–66.
- Howell A, Howell SJ, Evans DG. New approaches to the endocrine prevention and treatment of breast cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2003;52(1):39–44.
- Huang B, Zhao J, Li H, He K-L, Chen Y, Mayer L, et al. Toll-Like Receptors on Tumor Cells Facilitate Evasion of Immune Surveillance. *Cancer Res*. 15 de junho de 2005;65(12):5009.
- Ikeda K, Inoue S. Estrogen receptors and their downstream targets in cancer. *Archives of Histology and Cytology*. 2004;67(5):435–42.

- Instituto Nacional do Cancer - INCA. Câncer de Mama. 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/cancer/mama>
- Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM. Global Patterns of Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 8 de agosto de 2010;19(8):1893.
- Justo GZ, Duran N, Queiroz MLS. Natural killer cell activity, lymphocyte proliferation, and cytokine profile in tumor-bearing mice treated with MAPA, a magnesium aggregated polymer from *Aspergillus oryzae*. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* agosto de 2003;25(3):305–19.
- Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta - regulation by selective estrogen receptor modulators and importance in breast cancer. *Breast Cancer Research : BCR.* 2000;2(5):335–44.
- Kerr CA, Hines BM, Shaw JM, Dunne R, Bragg LM, Clarke J, et al. Genomic homeostasis is dysregulated in favour of apoptosis in the colonic epithelium of the azoxymethane treated rat. *BMC Physiology.* 2013;13(1):2.
- Killeen SD, Wang JH, Andrews EJ, Redmond HP. Exploitation of the Toll-like receptor system in cancer: a doubled-edged sword? *British Journal of Cancer.* 7 de agosto de 2006;95(3):247–52.
- Kim SY, Laxmi YRS, Suzuki N, Ogura K, Watabe T, Duffel MW, et al. Formation of tamoxifen-DNA adducts via O-sulfonation, not Oacetylation, of alpha-hydroxytamoxifen in rat and human livers. *Drug Metab Dispos.* 26 de outubro de 2005;33(11):1673.
- Kojetin DJ, Burris TP, Jensen EV, Khan SA. Implications of the binding of tamoxifen to the coactivator recognition site of the estrogen receptor. *Endocrine-Related Cancer.* 1 de dezembro de 2008;15(4):851–70.
- Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *International Reviews of Immunology.* 1 de janeiro de 2011;30(1):16–34.
- Lakhani S, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. WHO classification of tumours of the breast. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2012.
- Lin H, Yan J, Wang Z, Hua F, Yu J, Sun W, et al. Loss of immunity-supported senescence enhances susceptibility to hepatocellular carcinogenesis and progression in Toll-like receptor 2-deficient mice. *Hepatology.* 1 de janeiro de 2013;57(1):171–82.
- Li S, Sun R, Chen Y, Wei H, Tian Z. TLR2 Limits Development of Hepatocellular Carcinoma by Reducing IL18-Mediated Immunosuppression. *Cancer Res.* 12 de março de 2015;75(6):986.
- Liu Y, Nguyen N, Colditz GA. Links between alcohol consumption and breast cancer: a look at the evidence. *Women's health (London, England).* janeiro de 2015a;11(1):65–

77.

- Liu Y, Yin T, Feng Y, Cona MM, Huang G, Liu J, et al. Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*. outubro de 2015b;5(5):708–29.
- López M, Lelliott CJ, Tovar S, Kimber W, Gallego R, Virtue S, et al. Tamoxifen-Induced Anorexia Is Associated With Fatty Acid Synthase Inhibition in the Ventromedial Nucleus of the Hypothalamus and Accumulation of Malonyl-CoA. *Diabetes*. 26 de abril de 2006;55(5):1327.
- Lo PK, Sukumar S. Epigenomics and breast cancer. *Pharmacogenomics*. dezembro de 2008;9(12):1879–902.
- Lowe EL, Crother TR, Rabizadeh S, Hu B, Wang H, Chen S, et al. Toll-Like Receptor 2 Signaling Protects Mice from Tumor Development in a Mouse Model of Colitis-Induced Cancer. *PLOS ONE*. 27 de setembro de 2010;5(9):e13027.
- Lu H, Yang Y, Gad E, Wenner CA, Chang A, Larson ER, et al. Polysaccharide Krestin is a novel TLR2 agonist that mediates inhibition of tumor growth via stimulation of CD8 T cells and NK cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 1 de janeiro de 2011;17(1):67–76.
- Macejova D, Brtko J. Chemically induced carcinogenesis: a comparison of 1-methyl-1-nitrosourea, 7,12-dimethylbenzanthracene, diethylnitroso-amine and azoxymethan models (minireview). *Endocr Regul*. 2001;35(1):53–9.
- Ma FJ, Liu Z-B, Hu X, Ling H, Li S, Wu J, et al. Prognostic Value of Myeloid Differentiation Primary Response 88 and Toll-Like Receptor 4 in Breast Cancer Patients. *PLOS ONE*. 2014; 9(10):1-10.
- Mandlekar S, Hebbar V, Christov K, Kong A-NT. Pharmacodynamics of tamoxifen and its 4-hydroxy and N-desmethyl metabolites: activation of caspases and induction of apoptosis in rat mammary tumors and in human breast cancer cell lines. *Cancer Res*. 2000;60(23):6601.
- Margan MM, Jitariu AA, Cimpean AM, Nica C, Raica M. Molecular Portrait of the Normal Human Breast Tissue and Its Influence on Breast Carcinogenesis. *J Breast Cancer*. 2016;19(2):99–111.
- Maruyama A, Shime H, Takeda Y, Azuma M, Matsumoto M, Seya T. Pam2 lipopeptides systemically increase myeloid-derived suppressor cells through TLR2 signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015;457(3):445–50.
- Matthews J, Gustafsson J-A. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv*. 2003;3(5):281–92.
- Medina D. Chemical carcinogenesis of rat and mouse mammary glands. *Breast Dis*. 2007;28:63–8.

- Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*. 22 de dezembro de 2011;480(7378):480–9.
- de Melo A, Justo GZ, de Souza Queiroz ML. Stimulation of myelopoiesis in *Listeria monocytogenes*-infected mice by an aggregated polymer isolated from *Aspergillus oryzae*. *Hum Exp Toxicol*. janeiro de 2001;20(1):38–45.
- Moerkens M, Zhang Y, Wester L, van de Water B, Meerman JH. Epidermal growth factor receptor signalling in human breast cancer cells operates parallel to estrogen receptor α signalling and results in tamoxifen insensitive proliferation. *BMC Cancer*. 2014;14(1):283.
- Muenst S, Läubli H, Soysal SD, Zippelius A, Tzankov A, Hoeller S. The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts. *J Intern Med*. 1 de junho de 2016;279(6):541–62.
- Naseemuddin M, Iqbal A, Nasti TH, Ghandhi JL, Kapadia AD, Yusuf N. Cell mediated immune responses through TLR4 prevents DMBA-induced mammary carcinogenesis in mice. *Int. J. Cancer*. 15 de fevereiro de 2012;130(4):765–74.
- Nazarewicz RR, Zenebe WJ, Parihar A, Larson SK, Alidema E, Choi J, et al. Tamoxifen Induces Oxidative Stress and Mitochondrial Apoptosis via Stimulating Mitochondrial Nitric Oxide Synthase. *Cancer Res*. 5 de fevereiro de 2007;67(3):1282.
- Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, et al. Mechanisms of Estrogen Action. *Physiol Rev*. 1 de outubro de 2001;81(4):1535.
- Osborne CK. Tamoxifen in the Treatment of Breast Cancer. *N Engl J Med*. 26 de novembro de 1998;339(22):1609–18.
- Osborne CK, Schiff R. Estrogen-Receptor Biology: Continuing Progress and Therapeutic Implications. *JCO*. 10 de março de 2005;23(8):1616–22.
- Pan H-J, Chang H-T, Lee C-H. Association between tamoxifen treatment and the development of different stages of nonalcoholic fatty liver disease among breast cancer patients. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2016; 115(6):411–7.
- Paone A, Starace D, Galli R, Padula F, De Cesaris P, Filippini A, et al. Toll-like receptor 3 triggers apoptosis of human prostate cancer cells through a PKC- α -dependent mechanism. *Carcinogenesis*. 1 de julho de 2008;29(7):1334–42.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global Cancer Statistics, 2002. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 1 de março de 2005;55(2):74–108.
- Park W-C, Jordan VC. Selective estrogen receptor modulators (SERMS) and their roles in breast cancer prevention. *Trends in Molecular Medicine*. 2002; 8(2):82–8.
- Perou CM. Molecular Stratification of Triple-Negative Breast Cancers. *The Oncologist*. 1 de janeiro de 2011;16(suppl 1):61–70.
- Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest*. 1 de novembro de 2007;117(11):3155–63.

- Pourteimoor V, Mohammadi-Yeganeh S, Paryan M. Breast cancer classification and prognostication through diverse systems along with recent emerging findings in this respect; the dawn of new perspectives in the clinical applications. *Tumor Biology*. 2016;37(11):14479–99.
- Reynolds P. Smoking and Breast Cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2013;18(1):15–23.
- Rondón-Lagos M, Villegas EV, Rangel N, Sánchez CM, Zaphiropoulos GP. Tamoxifen Resistance: Emerging Molecular Targets. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(8).
- Russo IH, Russo J. Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environmental Health Perspectives*. setembro de 1996;104(9):938–67.
- Russo J, Gusterson BA, Rogers AE, Russo IH, Wellings SR, van Zwieten MJ. Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab Invest*. março de 1990;62(3):244–78.
- Russo J, Russo IH. Influence of Differentiation and Cell Kinetics on the Susceptibility of the Rat Mammary Gland to Carcinogenesis. *Cancer Res*. 1 de agosto de 1980;40(8 Part 1):2677.
- Russo J, Russo IH. Development of the human mammary gland. In: Neville M, Daniel C, organizadores. *The Mammary Gland, Development, Regulation and Function*. New York-London: Plenum Publishing Corp; 1987. p. 67–93.
- Russo J, Russo IH. Toward a physiological approach to breast cancer prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1 de junho de 1994;3(4):353.
- Russo J, Russo IH. Atlas and histologic classification of tumors of the rat mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. abril de 2000;5(2):187–200.
- Russo J, Russo IH. *The molecular basis of breast cancer: prevention and treatment*. Springer; 2004.
- Russo J, Russo IH, van Zwieten MJ, Rogers AE, Gusterson BA. Classification of Neoplastic and Nonneoplastic Lesions of the Rat Mammary Gland. In: Jones TC, Mohr U, Hunt RD, organizadores. *Integument and Mammary Glands*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1989. p. 275–304.
- Santiago MEB, Neto LS, Alexandre EC, Munari DP, Andrade MMC, Somenzari MA, et al. Improvement in clinical signs and cellular immunity of dogs with visceral leishmaniasis using the immunomodulator P-MAPA. *Acta Tropica*. setembro de 2013;127(3):174–80.
- Satcher D. *Women and Health: a report of the Surgeon General*. US Dep Health and Human Serv, PHS Office of the Surgeon General; 2001 p. 1–4.
- Scheeren FA, Kuo AH, van Weele LJ, Cai S, Glykofridis I, Sikandar SS, et al. A cell-intrinsic role for TLR2–MYD88 in intestinal and breast epithelia and oncogenesis. *Nat*

- Cell Biol. dezembro de 2014;16(12):1238–48.
- Schulte-Hermann R, Bursch W, Marian B, Grasl-Kraupp B. Active cell death (apoptosis) and cellular proliferation as indicators of exposure to carcinogens. *IARC Sci Publ.* 1999;(146):273–85.
- Segars JH, Marks MS, Hirschfeld S, Driggers PH, Martinez E, Grippo JF, et al. Inhibition of estrogen-responsive gene activation by the retinoid X receptor beta: evidence for multiple inhibitory pathways. *Molecular and Cellular Biology.* abril de 1993;13(4):2258–68.
- Singletary SE. Rating the Risk Factors for Breast Cancer. *Annals of Surgery.* abril de 2003;237(4):474–82.
- Skol AD, Sasaki MM, Onel K. The genetics of breast cancer risk in the post-genome era: thoughts on study design to move past BRCA and towards clinical relevance. *Breast Cancer Research.* 2016;18(1):99.
- Snedeker SM. Pesticides and breast cancer risk: a review of DDT, DDE, and dieldrin. *Environmental Health Perspectives.* março de 2001;109(Suppl 1):35–47.
- Srikrishna G, Freeze HH. Endogenous Damage-Associated Molecular Pattern Molecules at the Crossroads of Inflammation and Cancer. *Neoplasia (New York, N.Y.).* julho de 2009;11(7):615–28.
- Suddek GM. Protective role of thymoquinone against liver damage induced by tamoxifen in female rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 26 de maio de 2014;92(8):640–4.
- Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology.* 1 de janeiro de 2005;17(1):1–14.
- Tang P, Wang J, Bourne P. Molecular classifications of breast carcinoma with similar terminology and different definitions: are they the same? *Human Pathology.* 2008; 39(4):506–13.
- Thompson HJ, Singh M. Rat Models of Premalignant Breast Disease. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia.* 2000;5(4):409–20.
- Vacchelli E, Eggermont A, Sautès-Fridman C, Galon J, Zitvogel L, Kroemer G, et al. Trial Watch. *Oncolimmunology.* 1 de agosto de 2013;2(8):e25238.
- Vincent TL, Gatenby RA. An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. *Int J Oncol.* abril de 2008;32(4):729–37.
- Wang J, Zhang X, Beck AH, Collins LC, Chen WY, Tamimi RM, et al. Alcohol Consumption and Risk of Breast Cancer by Tumor Receptor Expression. *Hormones & cancer.* dezembro de 2015;6(0):237–46.
- Weigel MT, Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocrine-Related Cancer.* 1 de dezembro de 2010;17(4):R245–62.

- Welboren W-J, Sweep FCGJ, Span PN, Stunnenberg HG. Genomic actions of estrogen receptor α : what are the targets and how are they regulated? *Endocrine-Related Cancer*. 1 de dezembro de 2009;16(4):1073–89.
- Wellings SR. Development of human breast cancer. *Adv Cancer Res*. 1980;31:287–314.
- White INH. The tamoxifen dilemma. *Carcinogenesis*. 1 de julho de 1999;20(7):1153–60.
- Xu Y-Y, Chen L, Wang G-L, Zhou J-M, Zhang Y-X, Wei Y-Z, et al. A synthetic dsRNA, as a TLR3 pathway synergist, combined with sorafenib suppresses HCC in vitro and in vivo. *BMC Cancer*. 2013a;13:527–527.
- Xu Y-Y, Chen L, Zhou J-M, Wu Y-Y, Zhu Y-Y. Inhibitory effect of dsRNA TLR3 agonist in a rat hepatocellular carcinoma model. *Mol Med Rep*. outubro de 2013b;8(4):1037–42.
- Yang H, Wang B, Wang T, Xu L, He C, Wen H, et al. Toll-Like Receptor 4 Prompts Human Breast Cancer Cells Invasiveness via Lipopolysaccharide Stimulation and Is Overexpressed in Patients with Lymph Node Metastasis. *PLOS ONE*. 9 de outubro de 2014;9(10):e109980.
- Yang X-B, Huang Y, Zhang J-S, Yuan S-K, Zeng R-Q. Synthesis, characterization and DNA interaction of copper (II) complexes with Schiff base ligands derived from 2-pyridinecarboxaldehyde and polyamines. *Inorganic Chemistry Communications*. dezembro de 2010;13(12):1421–4.
- Yusuf N, Nasti TH, Long JA, Naseemuddin M, Lucas AP, Xu H, et al. Protective role of TLR4 during the initiation stage of cutaneous chemical carcinogenesis. *Cancer research*. 15 de janeiro de 2008;68(2):615–22.
- Zhang J-J, Wu H-S, Wang L, Tian Y, Zhang J-H, Wu H-L. Expression and significance of TLR4 and HIF-1 α in pancreatic ductal adenocarcinoma. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 21 de junho de 2010;16(23):2881–8.
- Zhang L, Li Y, Lan L, Liu R, Wu Y, Qu Q, et al. Tamoxifen has a proliferative effect in endometrial carcinoma mediated via the GPER/EGFR/ERK/cyclin D1 pathway: A retrospective study and an in vitro study. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 5 de dezembro de 2016;437:51–61.
- Zhang Y, Luo F, Cai Y, Liu N, Wang L, Xu D, et al. TLR1/TLR2 Agonist Induces Tumor Regression by Reciprocal Modulation of Effector and Regulatory T Cells. *J. Immunol*. 2 de fevereiro de 2011;186(4):1963.