



**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 Sheikh, Meu Cão, 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 (Singletonary, 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).

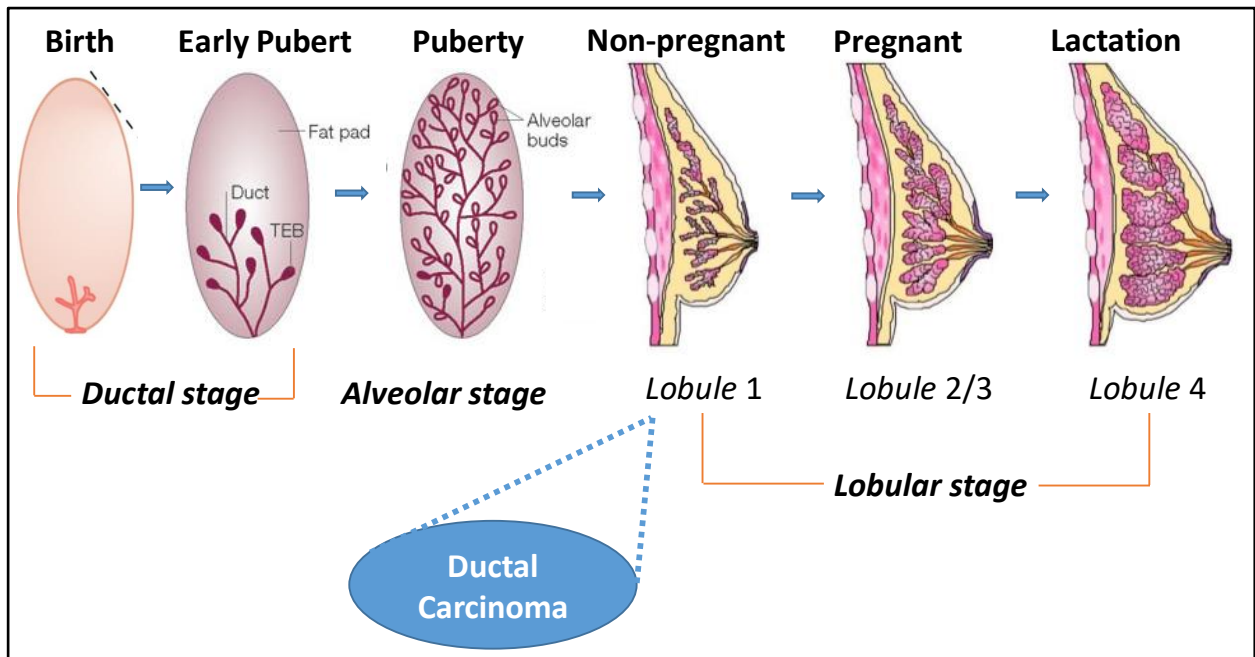


Figura 2. Desenvolvimento da glândula mamária. Sucessivas ramificações ductais dão origem aos TEBs, os quais também se ramificam formando os alvéolos (AB). Esses alvéolos sofrem progressivas ramificações originando os lóbulos tipo 1 (Lob 1) os quais originam os lóbulos tipo 2 (Lob 2) e estes os lóbulos 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).

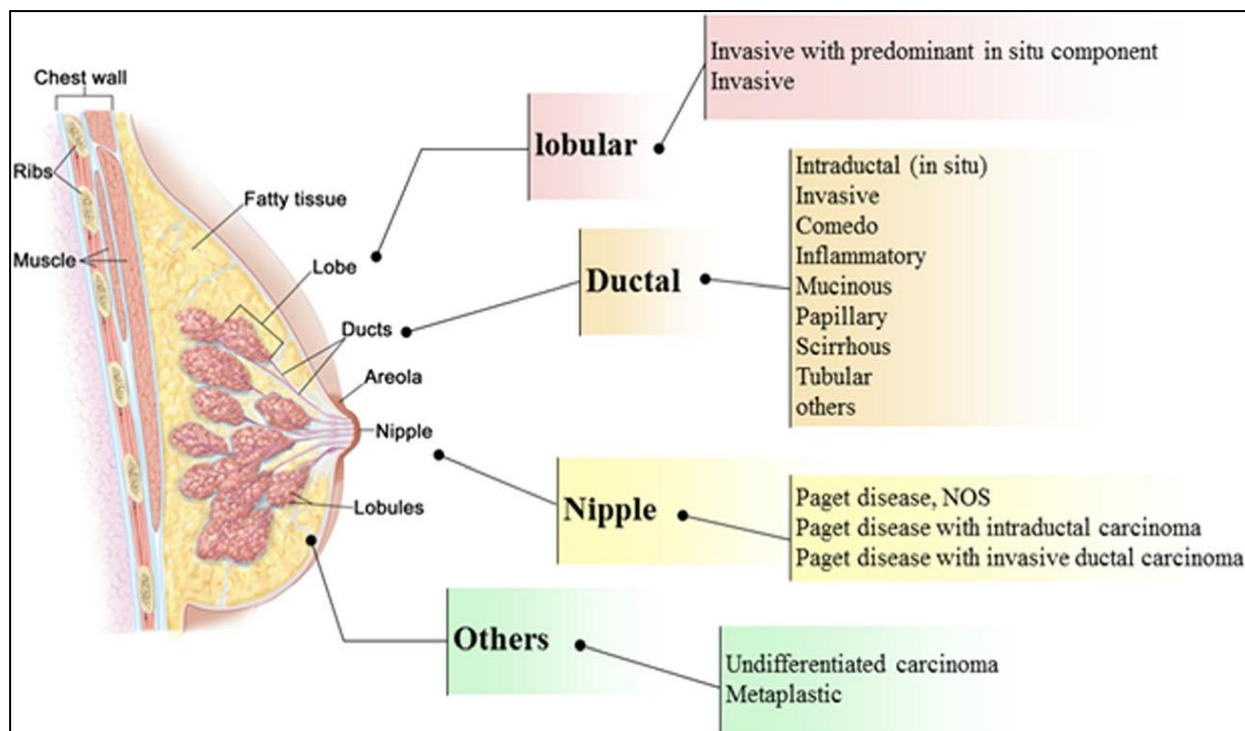


Figura 3. Classificação histológica dos tumores mamários malignos segundo o American Joint Committee on Cancer (AJCC) e o National Cancer Institute (NCI) 2015. Fonte: <http://www.cancer.gov> e <https://cancerstaging.org>.

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).

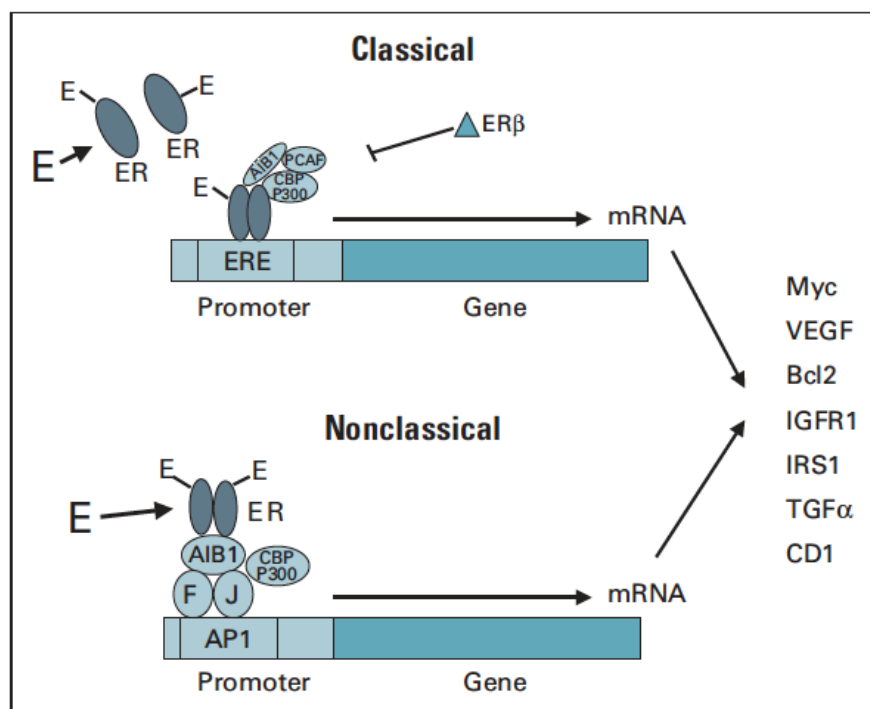


Figura 4. Vias de resposta estrógeno-receptor. Na via clássica o estrógeno (E) se liga ao receptor de estrógeno (ER) com a subsequente ligação aos elementos de resposta ao estrógeno (ERE) no promotor de genes alvos. Proteínas coativadoras (AIB1, CBP / P300, PCAF, outros) são recrutadas para esse complexo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

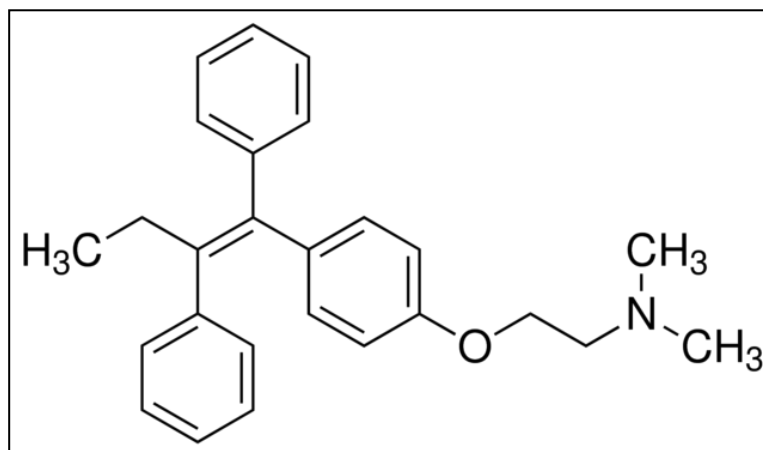


Figura 5. Estrutura molecular do Tamoxifeno. Fonte: <https://www.mpbio.com/product.php?pid=02156738>.

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).

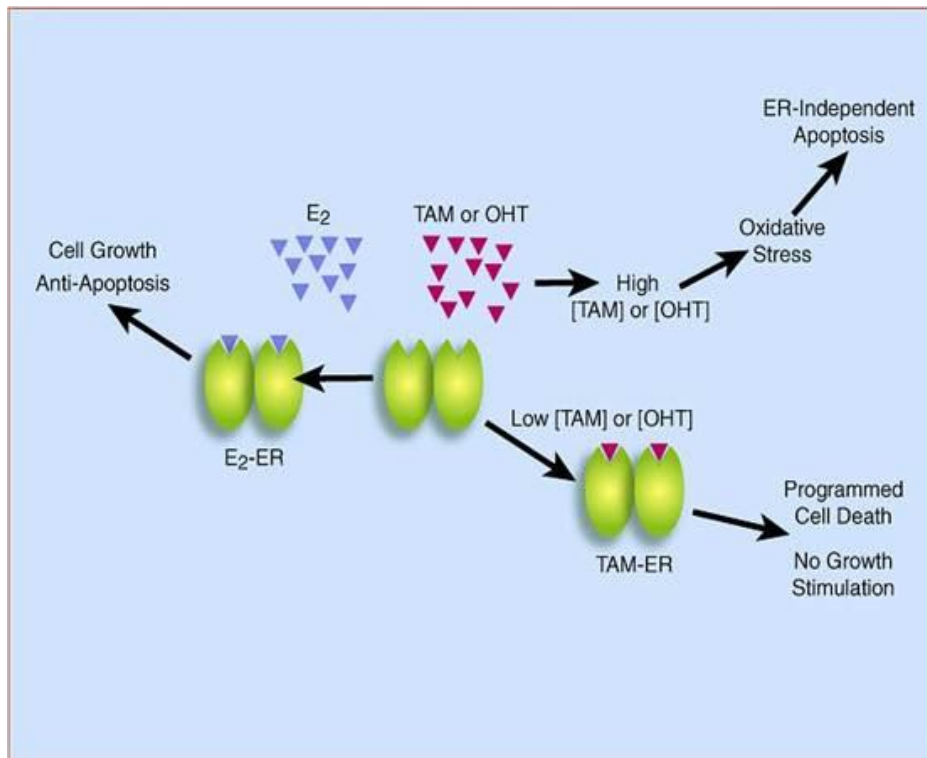


Figura 6. Mecanismos de ação do tamoxifeno (TAM) ou de seu metabólito 4-hidroxitamoxifeno (OHT), resultando na redução da proliferação celular e indução da apoptose. Fonte: <http://www.life.uiuc.edu/shapiro/TamoxifenApoptosis.html>.

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).

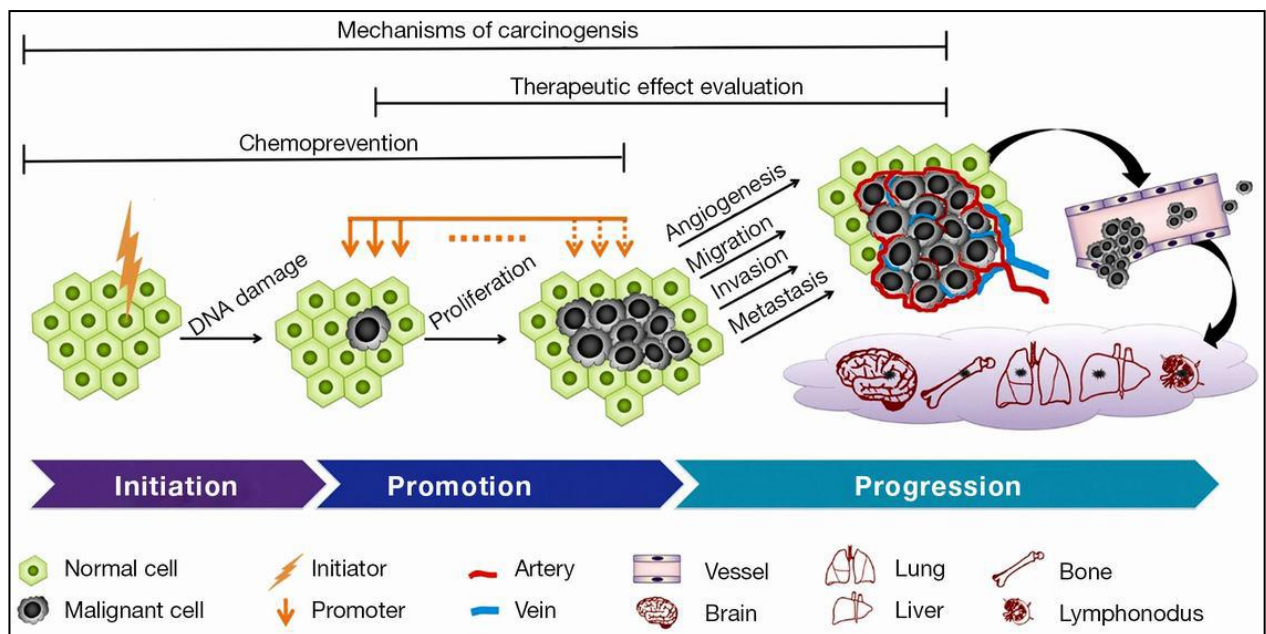


Figura 7. Ilustração das três fases da carcinogênese, com os momentos indicados para a realização de testes quimiopreventivos e avaliação terapêutica. Fonte: Liu *et al.*, Quant Imaging Med Surg, 5(5):708-729, 2015b.

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-nitrosoureia (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).

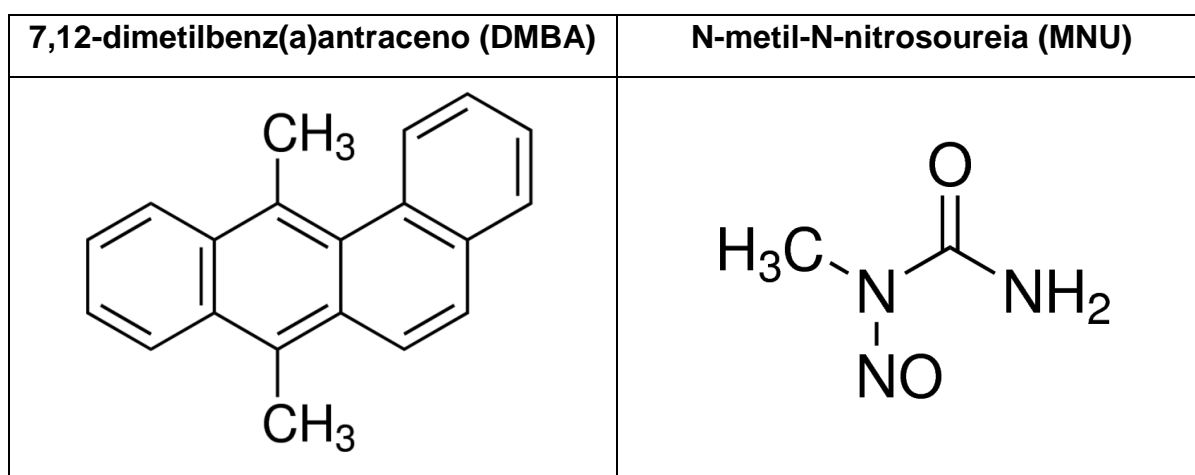


Figura 8. Estrutura química dos carcinógenos DMBA e MNU. Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com>

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).

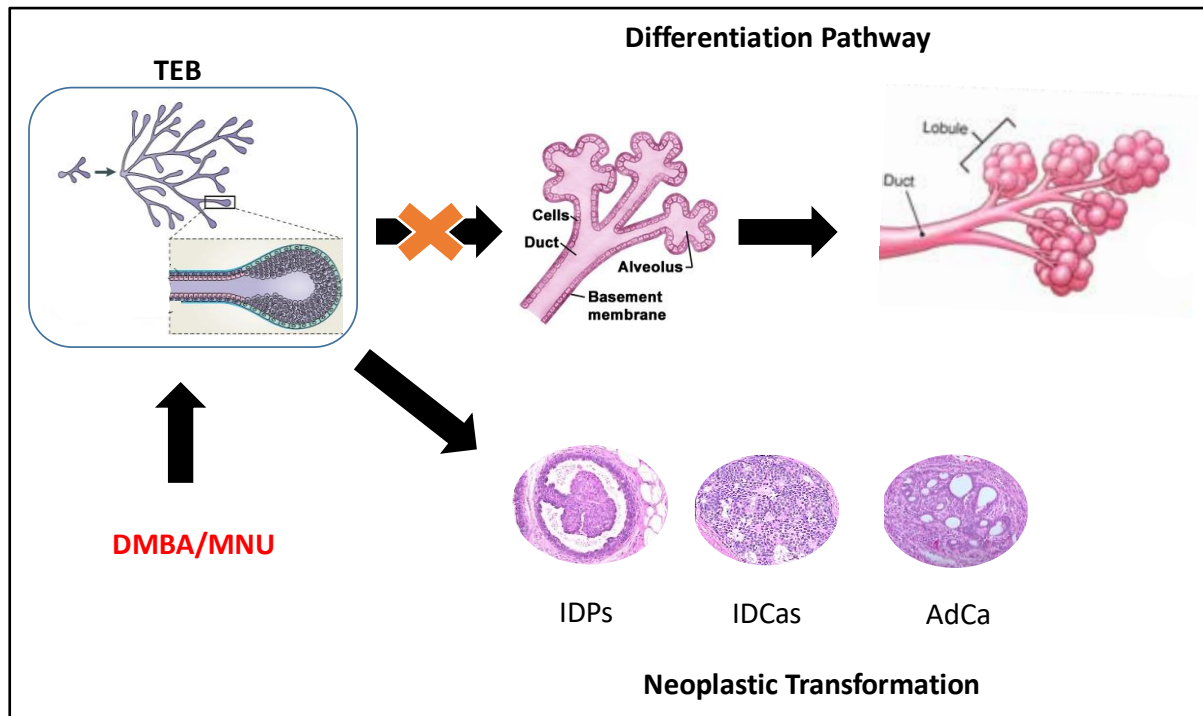


Figura 9. Desenvolvimento de tumores mamários induzidos quimicamente em roedores. Os TEBs afetados pelo carcinógeno se tornam progressivamente mais espessos formando as proliferações intraductais (IDPs). Essas projeções se confluem originando os carcinomas intraductais (IDCs) e estes os adenocarcinomas (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).

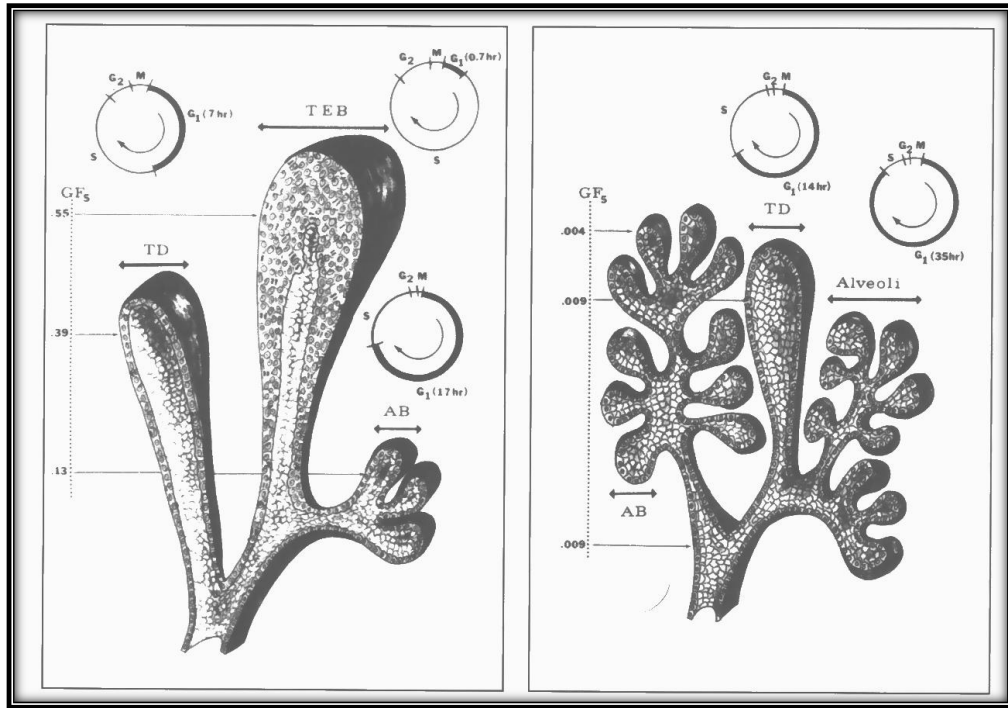


Figura 10. Representação esquemática das estruturas da glândula mamária com seus respectivos ciclos celulares. Os TEBs apresentam alta taxa proliferativa, a qual diminui progressivamente nos alvéolos e nos lóbulos. Fonte: Russo & Russo, *Cancer Res.*,(40):2677-87, 1980.

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).

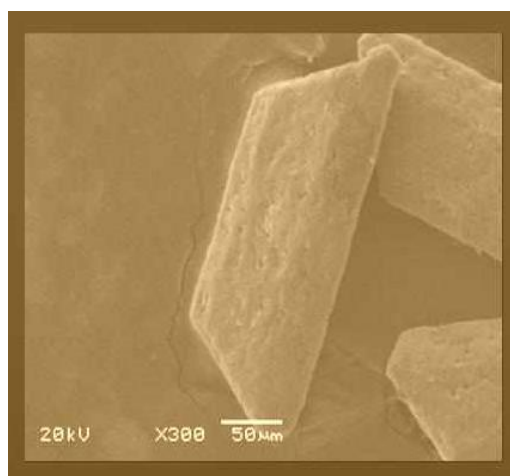


Figura 11. Microcristais do composto P-MAPA (microscopia eletrônica, aumento 300x). Fonte: farmabrasilis.org.br/todos_conteudos_interna.php?idioma=eng&id=198

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).

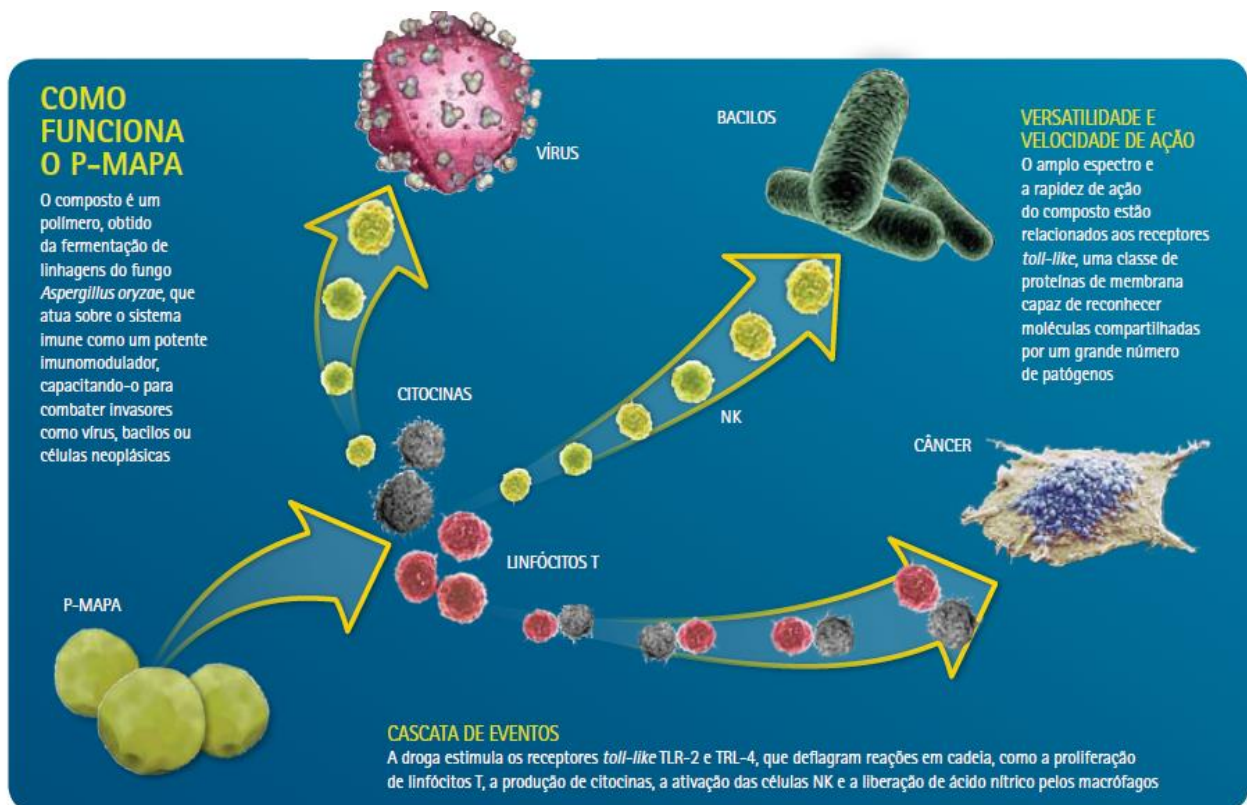


Figura 12. Mecanismos de ação do imunomodulador P-MAPA. Fonte: Cristant L. Pesquisa Médica, nº17, 2011.

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).

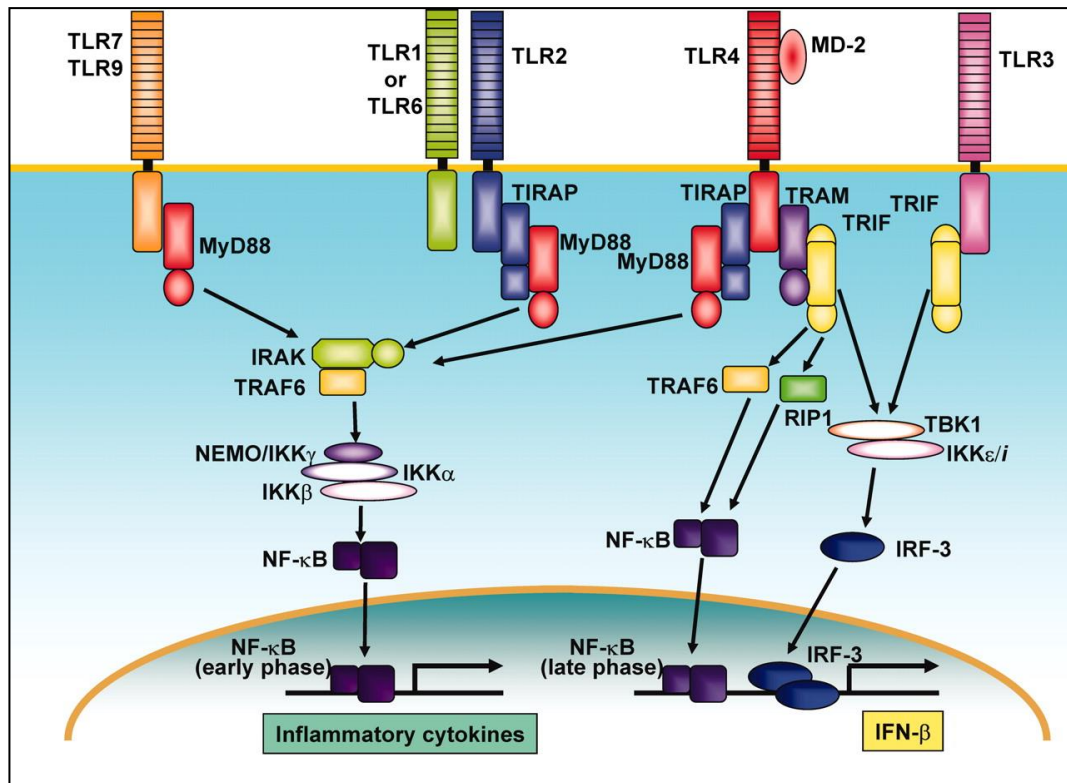


Figura 13. Vias de sinalização dos receptores *toll-like*. O adaptador MyD88 se associa ao domínio TIR citoplasmático dos TLRs recrutando IRAK, o qual ativa TRAF6. A ativação de TRAF6 leva a ativação do complexo I κ B-kinase (IKK) que por sua vez fosforila o I κ B resultando na translocação do NF- κ 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).

Gonzáles 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.

3 Objetivos

Objetivo Geral

Tendo em vista os efeitos imunomoduladores exercidos pelo composto P-MAPA durante processos infecciosos, virais e neoplásicos e, considerando a importância de novas opções terapêuticas que possam auxiliar no tratamento do câncer de mama, o objetivo geral deste estudo foi 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.

Objetivos específicos

- Avaliar a incidência, latência, volume e multiplicidade dos tumores mamários e sua histopatologia no modelo de câncer de mama induzido quimicamente em ratas frente à imunoterapia com P-MAPA associada ao tamoxifeno;
- Caracterizar e comparar os efeitos da imunoterapia com P-MAPA associada ao tamoxifeno sobre os receptores TLR2 e TLR4 e sobre o receptor de estrógeno RE- α pela técnica de imunoistoquímica.
- Caracterizar a apoptose e a proliferação celular (Ki-67) por imunoistoquímica nos tumores mamários e glândula mamária normal;
- Analisar a expressão global proteica no tecido mamário normal e tumoral por meio da estratégia proteômica *Shotgun* (LC-MS/MS)

Capítulo II - Artigo

Effects of P-MAPA immunoterapy associated with Tamoxifen on chemically-induced mammary carcinogenesis in rats

**Joyce R. Zapaterini^{1,2}, Muriele B. Varuzza^{1,2}, Nelci Antunes de Moura¹, Wagner J. Fávaro³
Luis F. Barbisan^{1,2}**

¹Department of Morphology, Institute of Bioscience, UNESP, Sao Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil; ²Department of Pathology, School of Medicine, UNESP, Sao Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil; ³Department of Structural and Functional Biology, UNICAMP, Campinas University, Campinas, SP, Brazil.

***Corresponding author:**

Luis Fernando Barbisan, PhD.

Department of Morphology, Institute of Bioscience, UNESP

Sao Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil

Phone/Fax number: +55-14 3880-0469

E-mail: barbisan@ibb.unesp.br

Resumo

Como uma doença altamente heterogênea e multifatorial, as neoplasias malignas de mama possuem histologia e evolução genética complexa e de resposta variável às terapias convencionais. Atualmente, existem poucos tratamentos para o câncer de mama hormônio-dependente e o Tamoxifeno, droga mais utilizada, está intimamente associado a graves efeitos colaterais que limitam sua utilização. Sendo assim, a utilização da imunoterapia, principalmente quando associada a outros medicamentos, vem se tornando uma opção terapêutica valiosa no tratamento de diferentes tipos de neoplasias. Além disso, o número de pesquisas voltadas ao papel dos receptores *toll-like* no processo de carcinogênese aumentou consideravelmente. Segundo estudos, o P-MAPA é considerado um imunomodulador capaz de 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 da 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 is a heterogenic and multifactorial disease with complex histology and genetic evolution and has a variable response to conventional therapies. Actually, there are few treatments against hormone-dependent breast cancer and the Tamoxifen, drug commonly used generate serious side effects. Thus, 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- dimetil-benzoantracene (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.

1 Introdução

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, braquiterapia e radioterapia) (Parkin et al, 2005; Jemal et al., 2010; Ferlay 2015). Entre os fatores de risco para o desenvolvimento desta neoplasia, destacam-se a idade, estilo de vida, o uso de anticoncepcionais, 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; Dai et al., 2016; Skol et al., 2016).

As terapias (neo) adjuvantes têm se mostrado benéficas no tratamento de câncer mamário com receptor de estrógeno positivo (RE+), como por exemplo, a supressão ovariana, os inibidores de aromatase e os bloqueadores da resposta estrogênica (Cleator et al., 2009).

O tamoxifeno, droga mais comumente utilizada, 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).

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, Zhang et al., 2016).

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).

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, Fávares et al., 2012; Garcia et al., 2015;2016; Dias et al., 2016). 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 o TLR2 e o TLR4 (Fávaro et al., 2012; Garcia et al., 2015; 2016; Dias et al., 2016). Mesmo que a estimulação dos receptores *toll-like* possa causar efeitos anti e pró-tumorais, compostos que têm como alvo os TLRs podem representar pontos de partida para o desenvolvimento de novas drogas no tratamento do câncer (Cook et al., 2004; Killeen et al., 2006).

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi 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.

2 Materiais e Métodos

2.1 Animais e ambiente de experimentação

Foram utilizadas 70 ratas da linhagem Sprague-Dawley, com quatro semanas de idade, pesando em média 100g. Todos os animais utilizados foram adquiridos no Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB/UNICAMP, SP. Brasil) e mantidos no biotério da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) – UNESP.

Durante a fase de experimentação foram mantidos cinco animais por gaiola de polipropileno de 41 x 34 x 16 cm, com tampa de aço inox na forma de grade e forradas com maravalha branca de pinho autoclavada. As gaiolas juntamente com a maravalha foram trocadas três vezes por semana seguindo protocolo pré-estabelecido pela UNIPLEX. As condições ambientais de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade relativa do ar ($55 \pm 10\%$), fotoperíodo (ciclos 12 horas claro/12 horas escuro) e exaustão contínua do ar foram rigorosamente controladas durante toda a fase experimental. Todos os animais receberam ração comercial (NUVILAB CR1 – NUVITAL, PR) e água filtrada em bebedouros de vidro com tampa de borracha e bico metálico (500 ml) *ad libitum*.

Todos os procedimentos de manuseio, administração de drogas e eutanásia foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMB/UNESP (CEUA, protocolo no.1027/2013) (Anexo A).

2.2 Delineamento experimental

Após a fase de aclimação (7 dias), os animais foram distribuídos aleatoriamente em sete grupos experimentais com 8 a 12 animais cada. O protocolo experimental está representado na e os grupos experimentais foram os seguintes:

Grupo controle positivo.

Grupo 1: Os animais receberam dose única do carcinógeno 7,12-dimetilbenzoantraceno (DMBA Sigma-Aldrich, EUA, 80 mg/kg, dissolvido em óleo de

canola) por via intragástrica (i.g) e as aplicações dos veículos do P-MAPA (solução fisiológica 0,9%) (3x/semana) por via intraperitoneal (i.p.) e do Tamoxifeno (óleo de gergelin) (5x/semana) por via subcutânea (s.c) durante as 13 semanas experimentais.

Grupos teste positivos.

Grupos 2, 3 e 4: Os animais receberam dose única i.g do carcinógeno DMBA durante a primeira semana do experimento. Após a iniciação, os grupos receberam os seguintes tratamentos:

- Grupo 2: recebeu três doses semanais do imunomodulador P-MAPA (5 mg/kg 0,9%, i.p.) e as aplicações s.c. do veículo do Tamoxifeno (5x/semana);
- Grupo 3: recebeu cinco doses semanais de Tamoxifeno (TAM 100 µg/kg, s.c.) e as três doses semanais i.p. do imunomodulador P-MAPA;
- Grupo 4: recebeu as cinco doses semanais s.c. de TAM e as aplicações i.p. do veículo do P-MAPA.

Grupos teste negativos.

Grupo 5 e 6: Durante a primeira semana, os animais receberam dose única do veículo do carcinógeno DMBA (NaCl 0,9%, i.g.). Posteriormente eles foram submetidos aos seguintes tratamentos:

- Grupo 5: recebeu as três doses semanais i.p. do imunomodulador P-MAPA e as aplicações s.c. do veículo do TAM;
- Grupo 6: recebeu as aplicações i.p. do imunomodulador P-MAPA e as cinco doses semanais s.c. do TAM.

Grupo controle negativo

Grupo 7: Os animais receberam o veículo do carcinógeno DMBA (i.g) durante a primeira semana. Posteriormente, receberam os veículos do P-MAPA (i.p.) e do TAM (s.c) durante o período experimental.

A Farmabrilis (São Paulo, Brasil), forneceu o imunomodulador P-MAPA para a realização desta pesquisa.

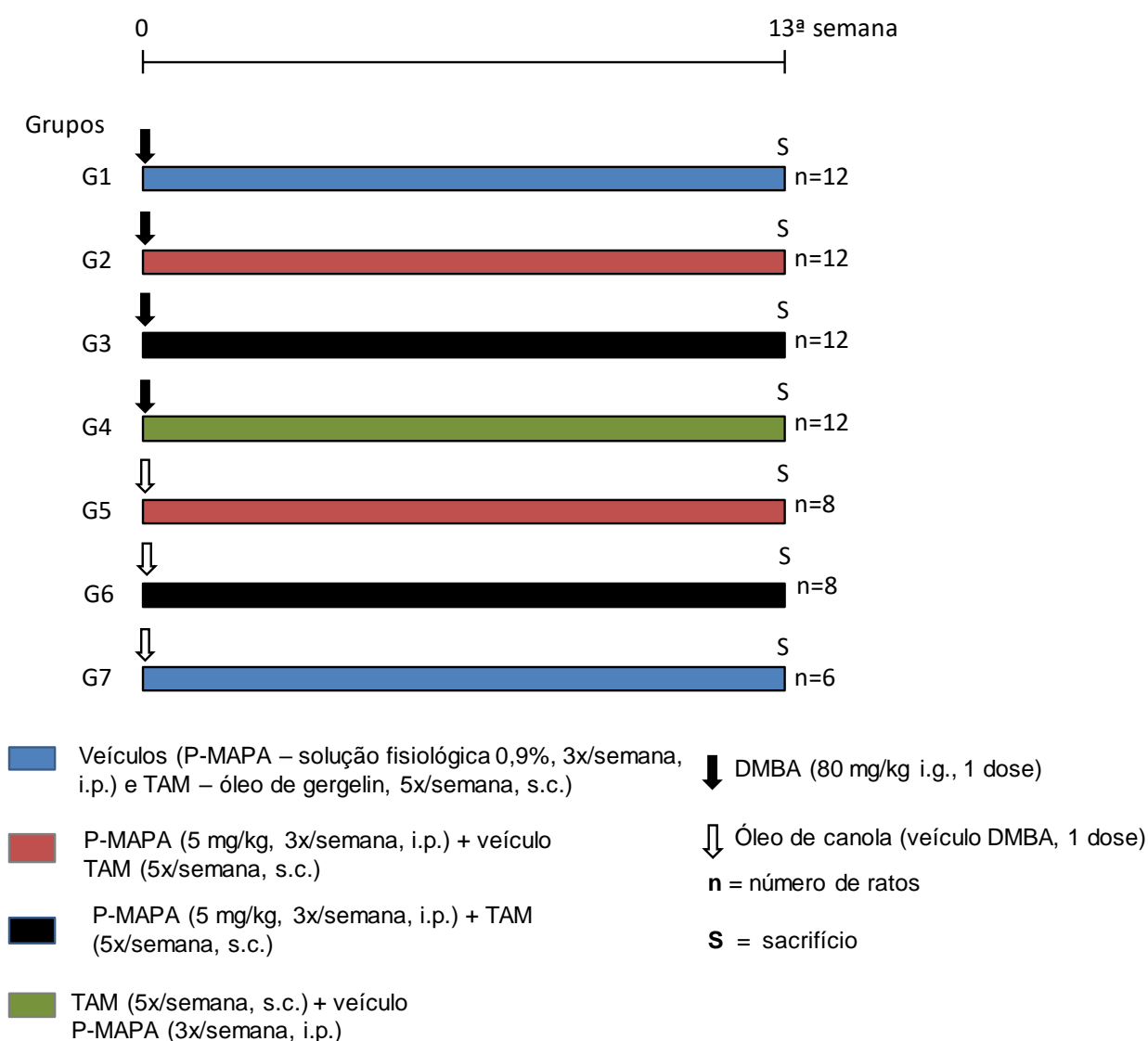


Figura 1. Delineamento experimental.

2.3 Avaliação do peso corpóreo, massas tumorais mamárias e consumo de água e ração.

O consumo de ração e água de cada caixa foi registrado duas vezes por semana. Pela média de consumo da caixa foram obtidos o consumo estimado individual e a média estimada de ingestão de ração/água de cada grupo. A avaliação do peso corpóreo foi realizada quinzenalmente. Os animais também foram examinados

semanalmente para a detecção de massas tumorais nas cadeias mamárias, sendo registrado o dia do aparecimento e sua localização anatômica.

2.4 Eutanásia, coleta e processamento histológico

Os animais foram eutanasiados ao final da 13^a semana experimental. A eutanásia dos animais foi realizada por injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (75 mg/kg de p.c.). O sangue dos animais foi coletado através de punção cardíaca (2 a 3 mL/animal), obtendo-se o soro que foi armazenado a -20°C até o momento das análises bioquímicas.

Depois da eutanásia foi feita incisão na face ventral do animal, da região púbica até a torácica, coletando-se as cadeias mamárias e massas tumorais de todos os animais.

Para as análises moleculares, foi coletado uma cadeia mamária ou um tumor por animal. Fragmentos destes tumores e das cadeias mamárias foram acondicionados em tubos criogênicos RNase/DNase para a extração de proteínas destinadas à análise de expressão proteica. Todas as amostras de tumores e tecido mamário normal foram imediatamente imersas em nitrogênio líquido até o armazenamento definitivo em freezer -80C.

Após as coletas para as análises moleculares, amostras de tecido mamário com ou sem tumores foram imersos em formalina tamponada 10% por 24 horas, lavados em água por 12 horas, colocados em cassetes plásticos identificados e então, mantidos em álcool 70% até o momento do processamento histológico.

No momento da necropsia, fígado e rins de todos os animais foram retirados e posteriormente pesados.

2.5 Análises macroscópicas

Durante a necropsia dos animais foram registrados o peso, localização anatômica e as medidas de comprimento, altura e profundidade de todos os tumores encontrados.

Posteriormente, foi calculado o volume destes tumores pelo método de determinação do volume de elipses (*largura x altura x profundidade x 0,75 x 3,141592*) (Chatterjee et al., 2010). Os tumores mamários induzidos pela DMBA foram agrupados em três categorias: pequeno (<15,18 cm³), médio (15,18 – 30,36cm³) e grande (>30,36 cm³). Os valores foram definidos de acordo com a mediana dos tumores mamários analisados.

2.6 Processamento histológico dos tumores e tecidos mamários

Fragmentos de tumores e mama foram desidratados em banhos sucessivos em álcool 85%, álcool 95% e álcool absoluto (3x) por uma hora cada. Os tecidos foram diafanizados em xilol I, II e III e banhados em parafina I, II e III por uma hora cada reagente. Após o processamento inicial, o material foi emblocado em parafina à 60°C no autoinfusor (LEICA EG 1160, Alemanha).

Cortes histológicos de espessura entre 4 a 6 µm foram obtidos em micrótomo (LEICA RM 2145, Alemanha), colocados sobre lâminas codificadas e, então, levadas para estufa (FAMEN 002 CB, Brasil) à 60°C por 24 horas, a fim de se obter maior adesão dos cortes histológicos às lâminas. Em seguida, as lâminas foram colocadas em suporte.

Para a coloração de HE, as lâminas passaram pelas seguintes etapas: bateria de hidratação (xilol I, II e III por 5 minutos em cada; álcool absoluto I, II e III por 8 segundos cada passagem; água corrente), lavagem em água corrente, hematoxilina de Harris por 5 minutos, diferenciador por 8 segundos em água amoniacal, álcool absoluto por 8 segundos e eosina por 2 minutos e bateria de desidratação (álcool I, II, III, IV e V por 8 segundos cada passagem). Todos os reagentes utilizados na coloração foram obtidos da Merck (Alemanha).

Terminada a coloração, as lâminas foram transferidas para outro suporte e levadas para montagem automática (LEICA CV 5000, Alemanha) de lamínulas (24x32mm) em meio Permount (Fisher, EUA). Após montagem, as lâminas histológicas foram rotuladas e identificadas.

2.7 Análises microscópicas

O diagnóstico e características histopatológicas das neoplasias mamárias foram analisados em cortes histológicos corados por Hematoxilina-Eosina (H.E.).

Todos os tumores foram classificados como *invasivo* ou *in situ* e dentro dos padrões histológicos papilar, cribiforme, tubular, comedo ou misto, segundo os critérios de Russo & Russo, 2000.

Posteriormente, foi calculada a incidência (% de animais com tumor) e a multiplicidade (número médio de tumores por animal). Também foi mensurado semi-qualitativamente o infiltrado inflamatório, sendo classificado como leve, moderado ou intenso tanto na região estromal periférica (parte externa ao tumor) como na estromal interna (interior do tumor).

2.8 Processamento imunohistoquímico para Ki-67, RE- α e Toll-like 2 e Toll-like 4.

A expressão do KI-67, TLR2, TLR4 e RE- α foram realizadas utilizando o sistema de polímeros Dako LSAB + System-HRP.

Cortes histológicos da glândula mamária e dos tumores mamários com 5 μ m de espessura foram colocados sobre lâminas histológicas silanizadas STARFROST® e passaram por desparafinização em banhos de xilol e hidratação por banhos sucessivos em álcool. A recuperação antigênica foi realizada em tampão Citrato pH=6,0 a 120°C por 5 min em panela de pressão Pascal (Dako Cytomation Denmark A/S). Em seguida foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ à 3% em PBS, durante 10 minutos e posteriormente o bloqueio de ligações inespecíficas em leite desnatado a 8% em PBS por 1 hora. As lâminas foram incubadas com Ki-67 (Abcam, MA, EUA) na diluição de 1:100, ou anti- RE- α , (Merck-Millipore, EUA) na diluição de 1:100, ou anti-TLR2 (Abbotec, EUA) na diluição 1:50 ou anti-TLR4 (Abbotec, EUA), na diluição de 1:50 em ABS a 1% (Albumina Bovina Sérica, Sigma Aldrich, EUA) overnight a 4°C. Na etapa seguinte as lâminas foram incubadas por 15 minutos com Biotinylated link Dako

Universal (EUA) e 15 minutos com Streptoavidin – HRP. A revelação da peroxidase foi realizada com 3'3'-diaminobenzidina tetrahidrocloro (DAB) (Sigma Chemical CO, MO, EUA) e a contra- coloração foi feita com hematoxilina de Harris. A desidratação das lâminas foi realizada em álcool e xilol e posteriormente, foi feita a montagem das lâminas em resina sintética Permount (FISHER, EUA).

2.9 Análise imunohistoquímica e apoptótica

A contagem de células Ki-67 positivas e células em apoptose foram feitas em microscópio de luz convencional (Axiostar Plus, Zeiss, Alemanha) com auxílio de um retículo e na objetiva de 40x. A análise de células em apoptose foi realizada em coloração hematoxilina/eosina (HE), segundo critérios morfológicos estabelecidos (Levin et al., 1999; Elmore et al., 2016).

Os índices de proliferação celular (IP%) e de apoptose (IA%) foram calculados dividindo-se o número de células KI-67-positivas ou células em apoptose pelo número total de células contadas, multiplicando o resultado por 100. Esta análise foi realizada tanto nos tumores mamários como no tecido mamário normal dos grupos não iniciados pela DMBA, analisando-se um total de 10 campos por animal (5 animais por grupo). Nos tumores foi contado um total de 500 células/tumor e no tecido mamário normal foi contado o total de células epiteliais de cada ducto e alvéolo observados nos 10 campos/animal.

A análise dos receptores TLR2, TLR4 e RE- α , foi realizada nas células epiteliais dos ductos e alvéolos de glândulas mamárias sem alterações proliferativas, sendo que, nos tumores, a expressão do TLR2 e TLR4 foi realizada tanto nas células do estroma como nas células do epitélio. A expressão RE- α foi analisada apenas nas células epiteliais.

Para a análise da expressão dos antígenos TLR4 e RE- α , a intensidade da imunoreatividade foi classificada em forte ou fraca.

Como a expressão do TLR2 não diferiu quanto à intensidade e sim quanto à quantidade de células positivas, foi realizada apenas uma análise descritiva do padrão de expressão deste marcador nos diferentes grupos experimentais. Entretanto, para publicação destes dados, a expressão do TLR2 será avaliada através do índice de

marcação (%) como foi realizado para a análise de Ki-67 e apoptose.

2.10 Avaliação da expressão proteica por espectrometria de massas (LC-Ms/Ms)

2.10.1 Extração e quantificação de proteínas das amostras de tumores mamários e glândulas mamárias não alteradas.

Extração das proteínas: A extração de proteínas foi realizada nas amostras congeladas de tumores e tecido mamário normal (5 amostras por grupo). Para a extração das proteínas, foi utilizado entre 90 a 120 mg de tecido. Foi adicionado em cada amostra, o tampão de extração (15mM Tris-HCl – pH 7,5; 600mM NaCl; 1mM inibidor de protease) na relação de 1:10. A seguir as amostras foram homogeneizadas em triturador elétrico e mantidas em gelo a 4°C por 2 horas.

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm, durante 20 minutos, em centrífuga refrigerada a 4°C, para a retirada do sobrenadante contendo as proteínas extraídas e do precipitado (restos celulares), o qual foi descartado. Os sobrenadantes foram transferidos para novos eppendorfs, devidamente identificados e mantidos a -80°C.

Quantificação proteica: Os extratos de proteínas totais foram mensurados de acordo com o método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando como padrão a albumina bovina sérica (BSA), leitura de absorvância a 595 nm e duas réplicas para cada amostra.

2.10.2 Padronização e digestão proteica em solução

Após quantificação proteica pelo método de Bradford as amostras foram transferidas para novos tubos plásticos LoBind (Eppendorf®) e diluídas em NaCl à 0,9% (m/v) para serem padronizadas quanto a sua concentração, estabelecendo-se a relação 50µg/40µL para cada amostra. Após esta etapa, foram realizados *pools* para cada grupo: 40µL de cada amostra (5 amostras/grupo) foram transferidas para um único eppendorf, misturadas via vórtex coletando-se o volume de 40µL, mantendo-se, portanto, concentração e volume (50µg/40µL).

Posteriormente, as amostras foram digeridas iniciando-se pelas etapas de redução e alquilação utilizando ditioneitol (DTT) 10 mM e iodoacetamida (IAA) 45 mM, respectivamente, ambos solubilizados em solução de bicarbonato de amônio 50 mM. Em seguida, as amostras foram submetidas à digestão proteolítica na presença da enzima tripsina na concentração 1:50 (enzima:substrato), solubilizada em tampão bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7.8. A hidrólise ocorreu por 18 horas, sendo interrompida com a adição de ácido fórmico 1% (v/v) em relação ao volume da amostra. Após esta etapa, as amostras foram dessalinizadas utilizando-se cartuchos Sep-Pak Vac C18 (Waters Manchester, UK), reduzidas em SpeedVac™ (Thermo Scientific, EUA) e mantidas a 4°C até o momento da análise por espectrometria de massas.

2.10.3 Sequenciamento Peptídico por Espectrometria de Massas

A análise de espectrometria de massas foi realizada no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de São Paulo (USP) em Bauru-SP. Cada grupo foi analisado em triplicata. A identificação dos peptídeos foi feita num sistema nanoACQUITY UPLC-Xevo QTof MS system (Waters, Manchester, UK). As amostras foram solubilizadas em 60 µL de solução de ácido fórmico 0,1 % (v/v) e em seguida, uma alíquota de 15 µL dos digestos tríplicos de cada amostra foram injetados individualmente em uma coluna analítica de fase reversa nanoACQUITY HSS T3 (75 µm X 150 mm, tamanho de partícula de 1,8 µm, Waters Manchester, UK). A coluna foi equilibrada com 93% da fase móvel A (ácido fórmico 0,1% em água) e 7% da fase móvel B (100% acetonitrila + 0,1% ácido fórmico). Em seguida, os peptídeos foram separados com um gradiente linear da fase móvel de 7-85 % (ácido fórmico 0,1 % em acetonitrila 100%) por 70 min num fluxo de 0,35 µL/min. A temperatura da coluna foi mantida em 35°C. O espectrômetro de massas Xevo® G2 Q-TOF foi operado em modo iônico positivo de nanoeletrospray e os dados foram coletados usando o método MSE em elevada energia (19-45 V), que permite a aquisição dos dados tanto dos íons precursores quanto fragmentos numa única injeção. As condições de fonte usadas incluíram voltagem do capilar de 2,5 kV, cone de amostra de 30 V, cone de extração de 5,0 V e temperatura da fonte de 80°C. Os dados foram adquiridos durante 70 min, com varredura na faixa de 50–2000 Da. O lockspray,

usado para garantir acurácia e reprodutibilidade, foi operado com uma solução de [Glu1]fibrinopeptídeo (1 pmol/ μ L), com fluxo de 1 μ L/min, como um íon de referência no modo positivo a m/z 785.8427.

2.10.4 Análise dos dados para a identificação de proteínas

A identificação das proteínas foi obtida utilizando o software ProteinLynx Global Server (PLGS) versão 3.0, através do algoritmo de contagem de íons MASCOT, incorporado ao software.

Os dados obtidos foram buscados no banco de dados da espécie *Rattus norvegicus* (apenas UniProtKB/Swiss-Prot) baixado em Julho de 2014 a partir do UniProtKB (<http://www.uniprot.org>). A diferença de expressão entre os grupos foi obtida usando o software PLGS e expressão como $p < 0,05$ para as proteínas sub reguladas e $p > 0,95$ para as proteínas supra reguladas.

2.11 Análise Estatística

Os dados referentes ao grau de infiltrado inflamatório, incidência tumoral, padrão histológico e volume dos tumores e à expressão dos receptores TLR4 e RE- α foram comparados pelo teste de Qui-quadrado.

Os índices de proliferação celular e apoptose nos tumores, os dados referentes ao peso relativo dos rins de todos os grupos, peso relativo do fígado nos grupos não iniciados e ganho de peso corpóreo dos grupos não iniciados apresentaram distribuição normal e foram comparados pelo teste ANOVA.

Os dados referentes ao consumo de água e ração em todos os grupos, multiplicidade tumoral, proliferação celular e apoptose no epitélio mamário normal, ganho de peso corpóreo dos grupos iniciados e peso relativo do fígado dos grupos não iniciados foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguidos de diferentes pós-testes como descritos nas respectivas legendas dos resultados. Todos os testes foram realizados no Software Sigma Stat 3.5.

A análise global da expressão proteica foi realizada utilizando o software ProteinLynx Global Server (PLGS) versão 3.0.

3 Resultados

3.1 Observações gerais

A manutenção em biotério e o tratamento com a DMBA, o TAM e o P-MAPA foram bem tolerados pelos animais durante as primeiras nove semanas experimentais, ocorrendo apenas a morte de um animal do grupo G4 (DMBA/TAM) durante a segunda semana do experimento.

Após a 7ª semana do experimento, foi necessária a realização da eutanásia de alguns animais devido à ulceração ocorrida em algumas massas tumorais, a fim de impedir o sofrimento dos mesmos. Durante a 8ª semana experimental foi eutanasiado um animal do grupo 4 e na 9ª semana dois animais do grupo G1 (DMBA); um animal do grupo G2 (DMBA/P-MAPA); um animal do grupo G3 (DMBA/P-MAPA/TAM) e um animal do grupo G4 (DMBA/TAM). Durante a 10ª e a 11ª semana do experimento, foi necessário a realização da eutanásia de um animal do grupo G1 (DMBA) e um animal do grupo G2 (DMBA/P-MAPA), respectivamente. A sobrevivência dos animais durante o experimento está registrada na Figura 2. Como a maioria dos animais foram eutanasiados próximo ao fim do período experimental, eles foram considerados nas análises estatísticas de incidência e multiplicidade de tumores.

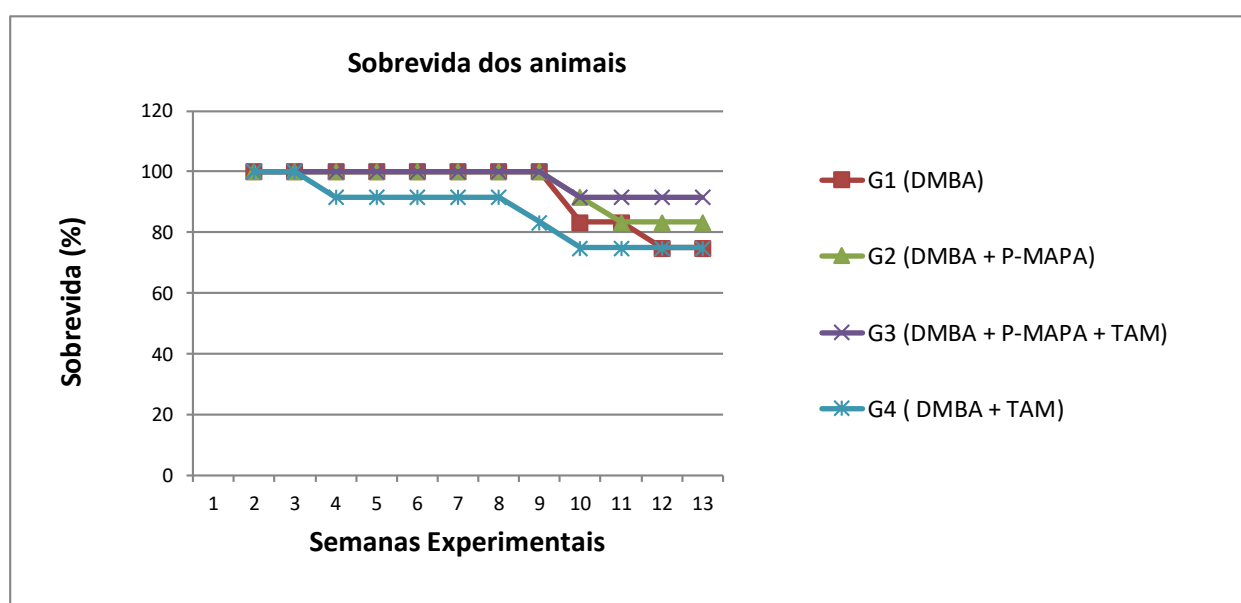


Figura 2. Taxa de sobrevivência dos animais dos diferentes grupos durante o período experimental.

3.2 Consumo de água e ração, peso corpóreo, hepático e renal

A Tabela 1 indica os valores de média e desvio-padrão do consumo de água e ração dos diferentes grupos experimentais (estimativa por caixa). Os grupos G2 (DMBA/P-MAPA) e G3 (DMBA/P-MAPA/TAM) apresentaram maior ingestão de água em relação ao grupo G1 (DMBA) ($p \leq 0,001$). Entre os grupos não iniciados, os grupos G5 (P-MAPA) e G6 (P-MAPA/TAM) apresentaram menor ingestão de água quando comparado ao grupo G7 (controle negativo) ($p \leq 0,001$).

Em relação ao consumo de ração, o grupo G4 (DMBA/TAM) apresentou maior consumo de ração em relação ao grupo controle positivo (G1) ($p \leq 0,001$). Entre os grupos não iniciados, o consumo de ração foi maior nos grupos G5 e G6 quando comparado ao grupo G7 ($p \leq 0,001$).

Tabela 1. Consumo de água e ração dos diferentes grupos experimentais ao longo do período experimental.¹

Grupo/Tratamento	Número de animais	Consumo	
		Ração (g/animal/dia)	Água (ml/animal/dia)
Iniciados			
(G1) DMBA	12	16,76 ± 4,64	26,57 ± 7,51
(G2) DMBA/P-MAPA	12	17,18 ± 5,28	29,63 ± 8,83*
(G3) DMBA/P-MAPA/TAM	12	17,40 ± 4,40	30,30 ± 6,33*
(G4) DMBA/TAM	11	14,72 ± 4,02*	25,64 ± 6,80
Não-iniciados			
(G5) P-MAPA	08	17,81 ± 4,90**	29,73 ± 9,08**
(G6) P-MAPA/TAM	08	18,78 ± 8,58**	30,86 ± 7,72**
(G7) VEÍCULOS	06	20,08 ± 4,65	35,97 ± 8,43

¹Valores representados por média ± desvio padrão. DMBA=7,12-dimetilbenzantraceno (1x 80mg/kg i.g.). P-MAPA=agregado polimérico anidrido fosfolinoleato-palmitoleato de amônio e magnésio (3x/semana 5mg/kg i.p.). TAM=Tamoxifeno (5x/semana 100mg/kg s.c.). Teste estatístico de Kruskal-Wallis seguido por Tukey, $p \leq 0,001$.

* Diferente estatisticamente do grupo G1.

** Diferente estatisticamente do grupo G7.

Os valores de média e desvio padrão de peso corpóreo inicial e final, ganho de peso corpóreo e peso relativo do fígado e dos rins dos diferentes grupos experimentais estão representados na

Tabela 2. Entre os grupos iniciados com a DMBA, o ganho de peso corpóreo foi estatisticamente menor no grupo G4 (DMBA/TAM) em comparação ao G1 (DMBA) ($p=0,012$). Entre os grupos não iniciados não houve diferença em relação ao grupo controle negativo (G7).

Não houve diferenças estatísticas para os valores médios de peso hepático relativo entre os grupos iniciados com a DMBA. Entre os grupos não iniciados, os valores médios dos pesos hepáticos relativos dos grupos G5 e G6 foram estatisticamente menores em relação ao grupo G7 ($p=0,022$). Não houve diferenças estatísticas para os valores de pesos relativos dos rins direito e esquerdo nos grupos iniciados e não iniciados.

3.3 Análise macroscópica e microscópica dos tumores mamários

Considerando apenas os tumores confirmados pela análise histológica, a Figura 3 representa os dados sobre o aparecimento semanal (acumulativo) dos tumores mamários nos diferentes grupos experimentais. O grupo G3 (DMBA/P-MAPA/TAM) teve o início do desenvolvimento tumoral mais tardiamente (6^a semana experimental após iniciação com a DMBA), enquanto que os demais grupos iniciados com a DMBA tiveram o início do desenvolvimento tumoral na 4^a semana após iniciação. Além disso, o número de tumores mamários desenvolvidos foi menor no grupo G3 (DMBA/P-MAPA/TAM) e maior no grupo G2 (DMBA/P-MAPA).

Tabela 2. Peso corpóreo e relativo do fígado e rim dos diferentes grupos experimentais ao longo do experimento¹.

Grupo/tratamento	Num.de Animais	Peso corpóreo (g)			Peso Relativo Fígado (%)	Peso Relativo do Rim (%)	
		Inicial	Final	Ganho		Direito	Esquerdo
Iniciados							
(G1) DMBA	12	175,20±11,65	248,83±17,78	73,65±10,40	3,22±0,34	0,33±0,05	0,32±0,05
(G2) DMBA/P-MAPA	12	188,15±11,87	265,5±16,43	76,75±18,72	3,39±0,61	0,34±0,05	0,32±0,05
(G3) DMBA/P-MAPA/TAM	12	203,33±10,56	262,25±21,31	59,16±19,98	3,42±0,49	0,29±0,06	0,28±0,06
(G4) DMBA/TAM	11	198,75±12,14	248,8±22,83	50,54±19,66*	3,31±1,09	0,32±0,04	0,32±0,04
Não Iniciados							
(G5) P-MAPA	8	173,78±10,33	267,3±29,87	93,55±23,02	2,81±0,24**	0,31±0,02	0,31±0,02
(G6) P-MAPA/TAM	8	204,25±10,25	272,75±14,42	68,5±11,76	2,82±0,20**	0,34±0,05	0,32±0,05
(G7) VEÍCULOS	6	215,67±19,12	304,33±35,50	88,67±18,04	3,14±0,08	0,29±0,02	0,29±0,01

¹Dados expressos na forma de média±desvio-padrão. DMBA=7,12- dimetilbenzoantraceno (1x 80mg/kg i.g); P-MAPA = agregado polimérico anidrido fosfolinoleato-palmitoleato de amônio e magnésio (3x/semana 5mg/kg i.p); TAM = tamoxifeno (5x/semana s.c). ^{a,b} Letras diferentes representam diferença estatística. Teste estatístico para ganho de peso corpóreo: Kruskal-Wallis seguido de Dun's, p=0,012. Teste estatístico para peso relativo dos rins: Anova seguido de Holm-Sidak, p= 0,022.

* Diferente estatisticamente do grupo G1.

** Diferente estatisticamente do grupo G7.

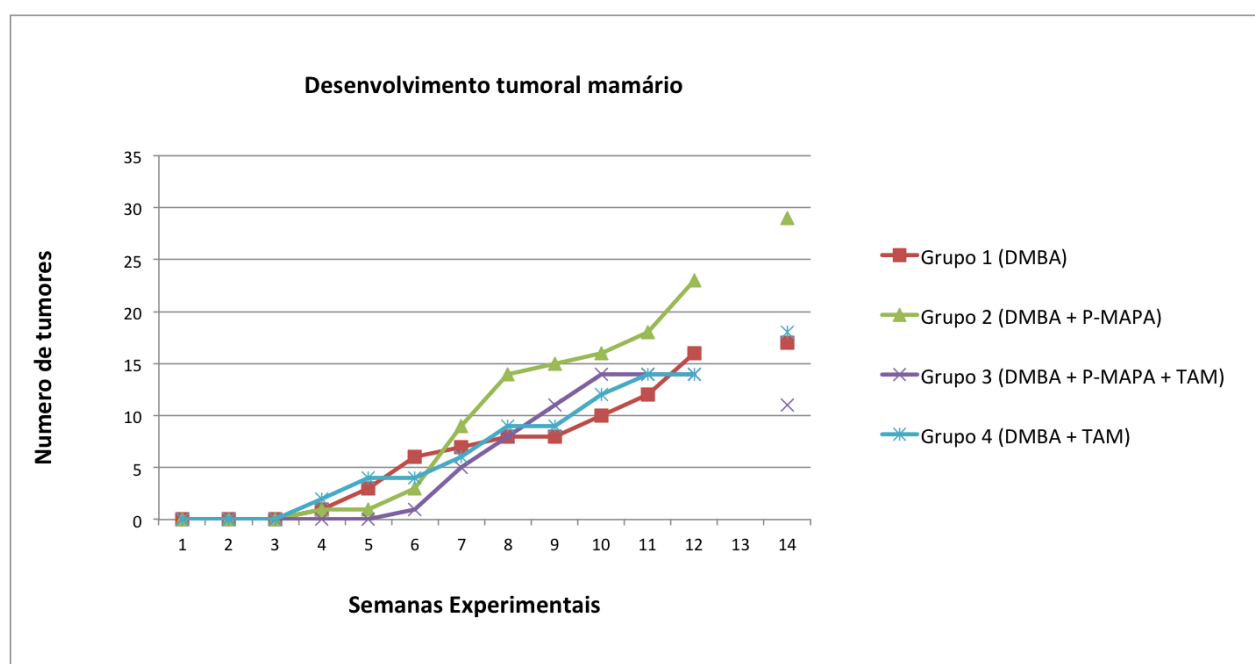


Figura 3. Desenvolvimento tumoral mamário semanal nos diferentes grupos experimentais.

A Tabela 3 apresenta os dados de incidência e multiplicidade de tumores mamários nos diferentes grupos experimentais iniciados com a DMBA. A taxa de incidência e a multiplicidade de tumores mamários foram menores no grupo G3(DMBA/P-MAPA/TAM) em relação aos demais grupos iniciados com a DMBA, porém sem diferença estatística.

Tabela 3. Efeitos do tratamento com P-MAPA e Tamoxifeno sobre o desenvolvimento de tumores mamários induzidos pela DMBA em ratas Sprague-Dawley¹.

Grupos/tratamento	Núm. de animais	Incidência %	Multiplicidade
(G1) DMBA	12/12	7 (58,3)	1,42 ± 2,02
(G2) DMBA/P-MAPA	12/12	7 (58,3)	2,42 ± 2,72
(G3) DMBA/P-MAPA/TAM	12/12	5 (41,6)	0,92 ± 1,38
(G4) DMBA/TAM	12/11	5 (45,4)	1,64 ± 2,58

¹Dados expressos na forma de média±desvio-padrão para multiplicidade e de porcentagem para incidência. DMBA=7,12- dimetilbenzoantraceno (1x 80mg/kg i.g); P-MAPA = agregado polimérico anidrido fosfolinooleato-palmitoleato de amônio e magnésio (3x/semana 5mg/kg i.p); TAM = tamoxifeno (5x/semana 100ug/kg s.c). Teste estatístico de Kruskal-Wallis e Qui-quadrado/Fisher para multiplicidade e incidência, respectivamente.

Na Figura 4 estão representadas as porcentagens dos tumores analisados macroscopicamente em cada grupo experimental dentro de cada categoria de volume. Não houve diferença de volume tumoral entre os grupos iniciados com a DMBA, sendo que a maioria dos tumores nos diferentes grupos foi de volume pequeno ($<15,18 \text{ cm}^3$).

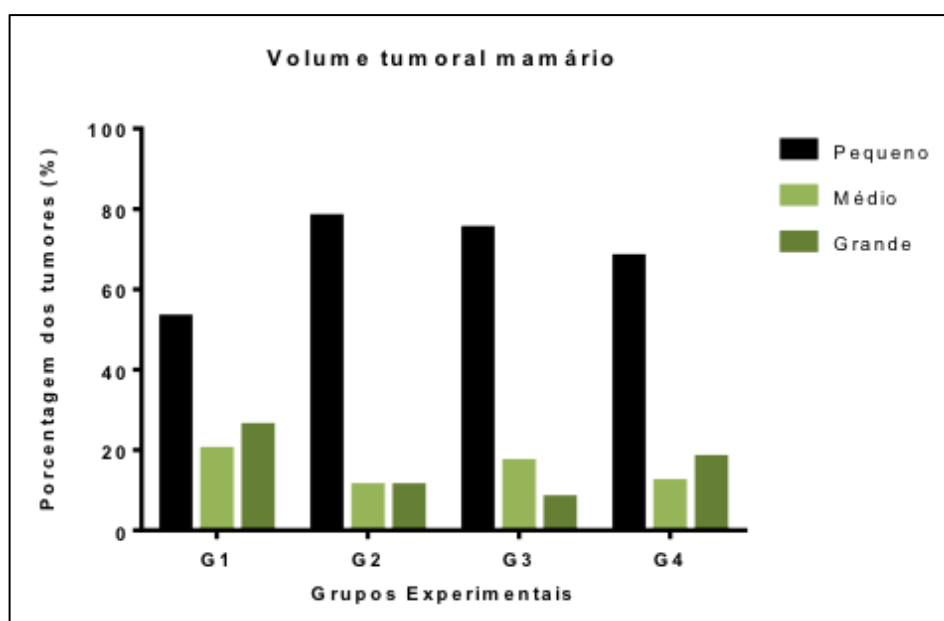


Figura 4. Dados de volume de tumor mamário de cada grupo experimental, representados em porcentagem. G1=DMBA, G2=DMBA/P-MAPA, G3=DMBA/P-MAPA/TAM, G4=DMBA/TAM. Pequeno ($<15,18 \text{ cm}^3$); Médio ($15,18 - 30,36 \text{ cm}^3$); Grande ($>30,36 \text{ cm}^3$). Teste estatístico: Qui-quadrado/Fisher.

Neste estudo os tumores mamários foram classificados dentro de cinco padrões histológicos: tubular, papilar, cribiforme, comedo e misto (quando havia mais de um padrão histológico no mesmo tumor) (Figura 5). Não houve diferença estatística na incidência dos tipos histológicos de tumores mamários entre os grupos. O padrão misto foi o mais prevalente em todos os grupos experimentais. A Tabela 4 apresenta a porcentagem de cada padrão histológico nos diferentes grupos.

Tabela 4. Incidência dos tumores mamários segundo classificação histológica nos diferentes grupos experimentais.

Grupos/ tratamentos	Núm. de tumores	Padrão histológico % ¹				
		Tubular	Papilar	Cribiforme	Comedo	Misto
(G1) DMBA	17	1 (5)	0	2 (12)	0	14(82)
(G2) DMBA/P-MAPA	29	5 (17)	1 (3)	0	0	23 (79)
(G3) DMBA/P-MAPA/TAM	11	2 (18)	0	0	0	9 (82)
(G4) DMBA/TAM	18	0	0	0	0	18 (100)

¹Porcentagem dos tumores mamários dentro de cada tipo histológico em cada grupo experimental. DMBA=7,12- dimetilbenzoantraceno (1x 80mg/kg i.g); P-MAPA = agregado polimérico anidrido fosfolinoleato-palmitoleato de amônio e (3x/semana 5mg/kg i.p); TAM = tamoxifeno (5x/semana 100ug/kg s.c). Teste estatístico: Qui-quadrado/ Fisher. Entre parêntese a porcentagem em relação ao número total de tumores.

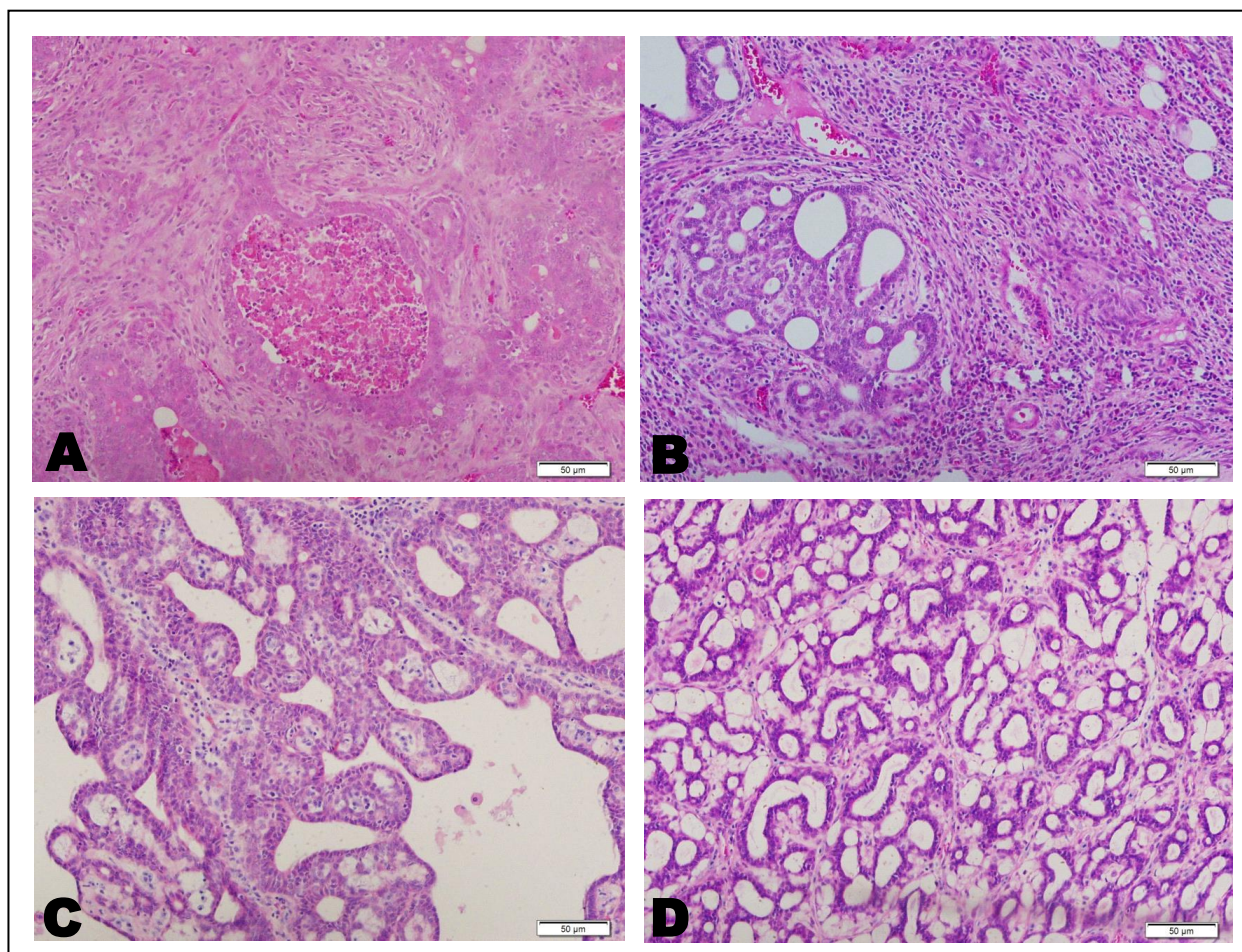


Figura 5. Cortes histológicos corados em HE de tumores de mama representativos dos padrões morfológicos: (A) comedo, (B) cribiforme, (C) papilar e (D) tubular. Objetiva de 20x.

Durante as análises microscópicas dos tumores mamários, observou-se que o grau do infiltrado inflamatório diferia entre os grupos experimentais. Sendo assim, o infiltrado inflamatório foi analisado em todos os tumores de todos os grupos, classificando-o como leve, moderado ou intenso tanto no estroma periférico quanto no estroma interno da lesão (Figura 6 A-D). Houve aumento significativo do infiltrado inflamatório de grau intenso nos grupos G2 (DMBA/P-MAPA), G3 (DMBA/P-MAPA/TAM) e G4 (DMBA/TAM) quando comparado ao grupo G1 (DMBA) ($0,001 \leq p \leq 0,003$) que teve a maioria dos tumores com infiltrado inflamatório de grau baixo. Essas diferenças foram observadas tanto no estroma periférico (ao redor do tumor) quanto no estroma interno da lesão (Figura 7 A e B).

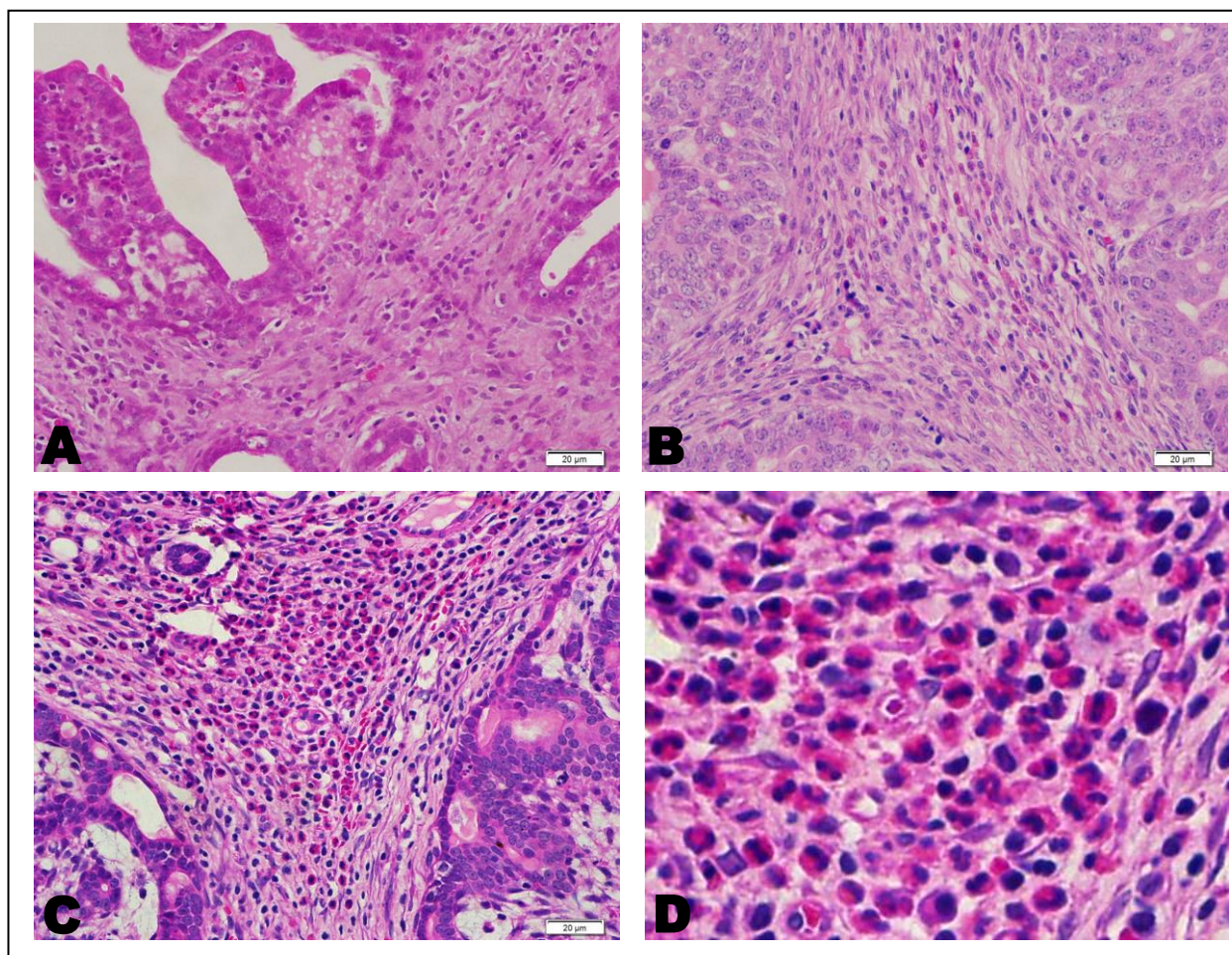


Figura 6. Cortes histológicos de tumores de mama corados em HE representativo de cada grau de infiltrado inflamatório. (A) leve, (B) moderado, (C) intenso. (D) infiltrado inflamatório intenso em evidência. Objetiva de 40x.

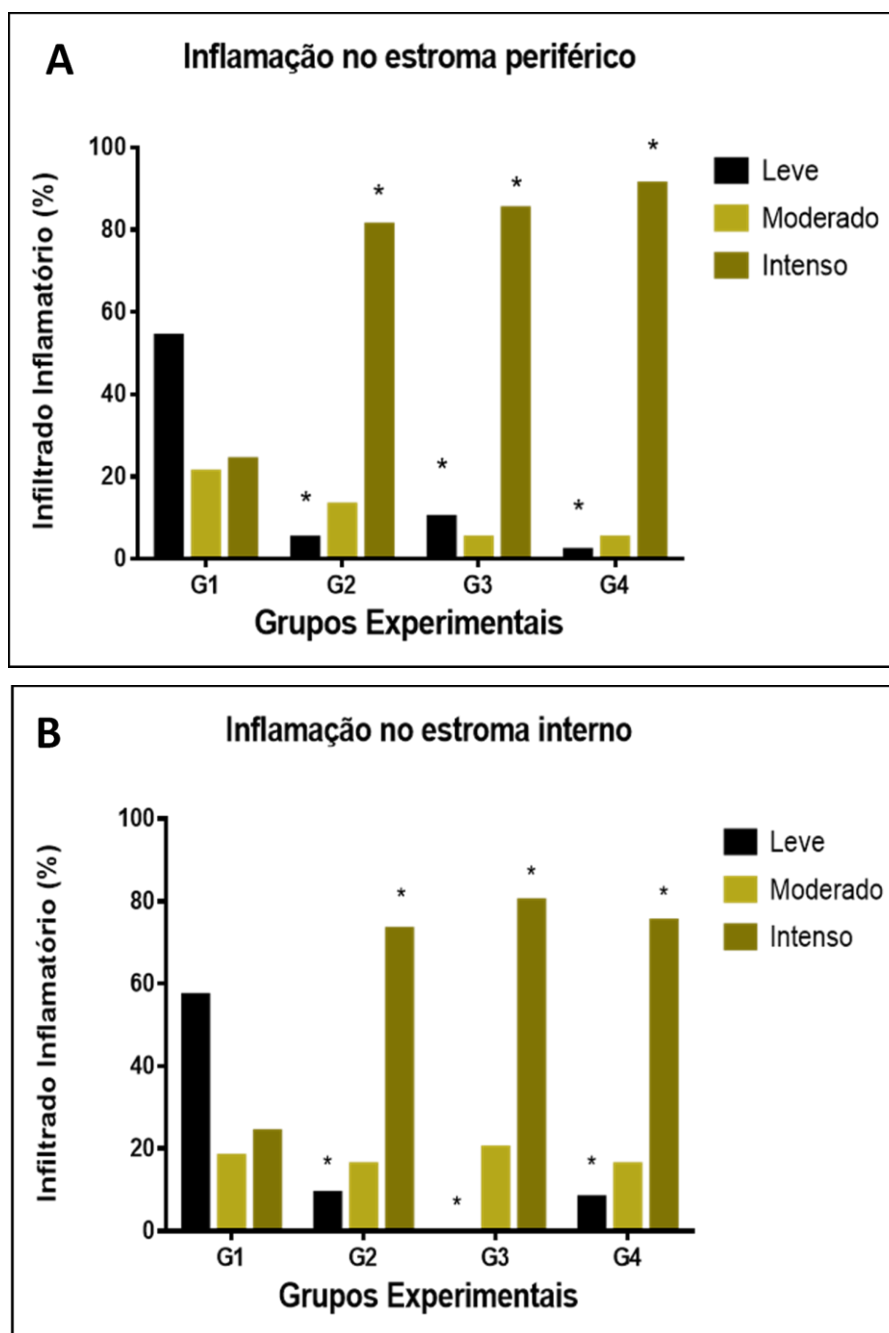


Figura 7. Porcentagem do infiltrado inflamatório no estroma periférico (A) e no estroma interno (B) dos tumores mamários nos diferentes grupos experimentais. G1=DMBA; G2=DMBA/P-MAPA; G3=DMBA/P-MAPA/TAM; G4=DMBA/TAM. Teste estatístico: Qui-quadrado. *Diferente estatisticamente em relação ao grupo G1 $0,001 \leq p \leq 0,003$.

3.4 Proliferação celular, expressão dos receptores TLR4 e RE- α pela marcação imunoistoquímica e análise do índice apoptótico.

A análise de proliferação celular pelo marcador Ki-67, expressão do TLR2, TLR4 e expressão do RE- α foram realizadas pela marcação imunoistoquímica e a análise de apoptose foi realizada em coloração hematoxilina/eosina. Todas as análises foram feitas nos tumores mamários dos grupos iniciados pela DMBA e no epitélio mamário normal (ductos e alvéolos) dos grupos não iniciados.

Nos tumores, o grupo P-MAPA/TAM (G3) e TAM (G4) apresentaram aumento no índice de proliferação celular quando comparado ao grupo controle positivo (G1), ao passo que o grupo tratado com P-MAPA (G2) teve menor índice de proliferação celular em relação a G1. Entretanto, essas diferenças não foram significativas (Figura 8A e Figura 8B).

O tratamento com P-MAPA/TAM (G6) também aumentou a taxa proliferativa no epitélio mamário normal quando comparado ao grupo controle negativo (G7), mas sem diferença significativa (Figura 9A e Figura 9B).

Em relação aos índices de apoptose no epitélio tumoral, os grupos G3 (DMBA/P-MAPA/TAM) e G4 (DMBA/TAM) apresentaram índice apoptótico estatisticamente menor quando comparado ao grupo controle positivo (G1) ($p \leq 0,001$) (Figura 10A e Figura 10B). No epitélio mamário normal, não houve diferença estatística nos índices de apoptose entre os grupos não iniciados (Figura 11A e Figura 11B).

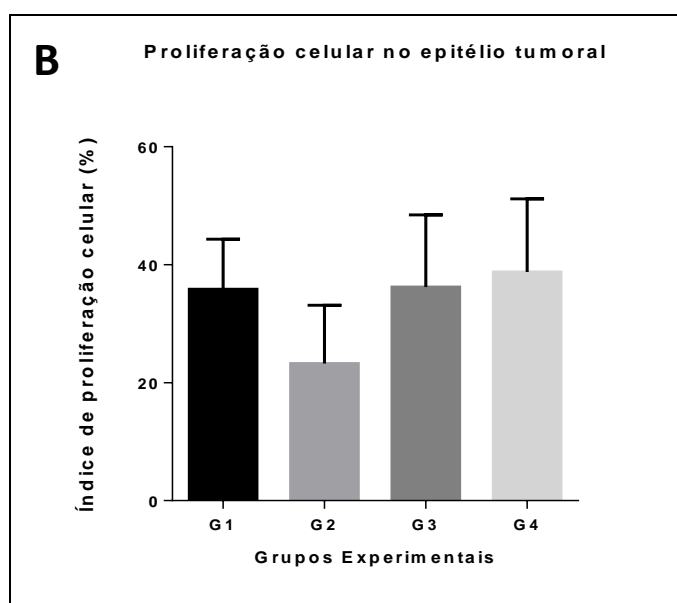
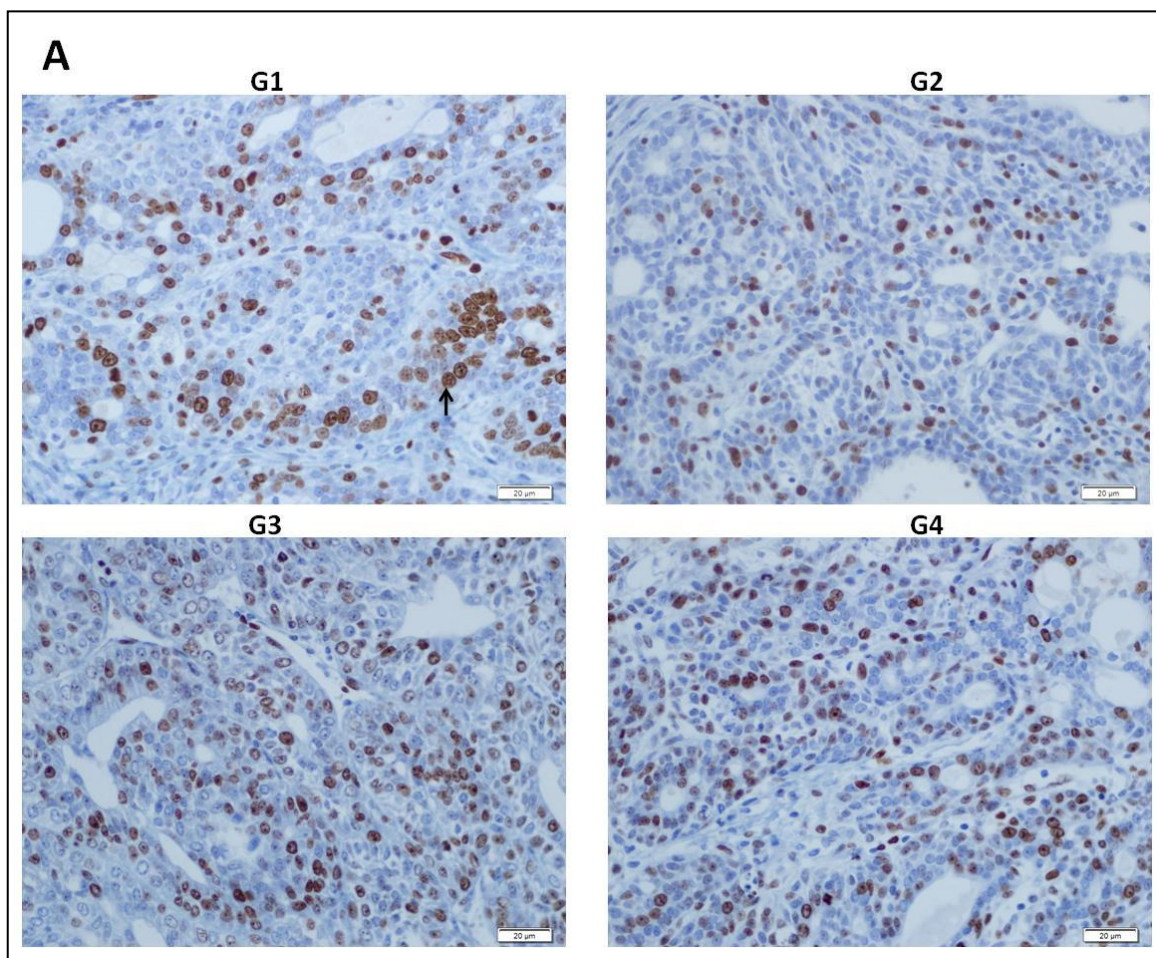


Figura 8. (A) Marcação imunoistoquímica para Ki-67 em tumores mamários. Objetiva de 40x. A seta (→) indica células Ki-67 positivas. (B) Índices de células em proliferação celular nos tumores mamários. G1: DMBA; G2: DMBA+P-MAPA; G3: DMBA+TAM+P-MAPA; G4: DMBA+TAM. Teste estatístico: ANOVA/Holm-Sidak.

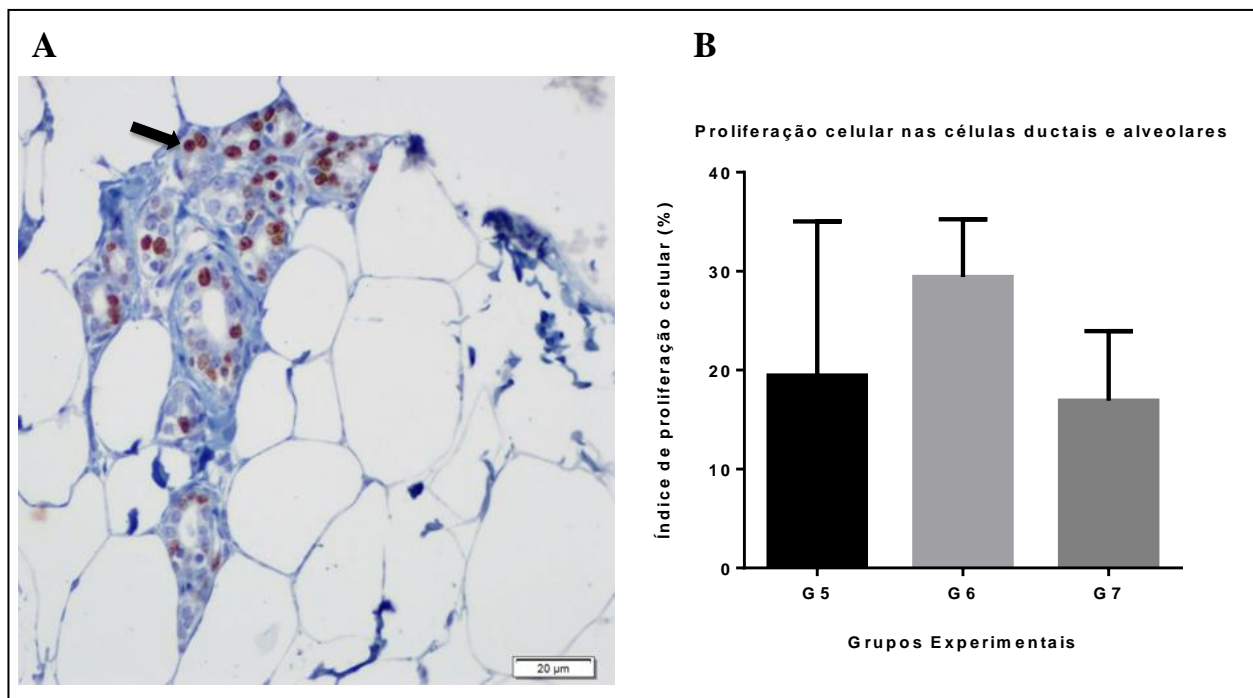


Figura 9. (A) Marcação imunoistoquímica para Ki-67 no tecido epitelial mamário normal. Objetiva de 40x. A seta (→) indica células Ki-67 positivas. (B) Índice de células em proliferação celular no tecido epitelial mamário normal (células ductais e alveolares). G5= P-MAPA; G6= P-MAPA/TAM; G7=VEÍCULOS. Teste estatístico: Kruskal-Wallis.

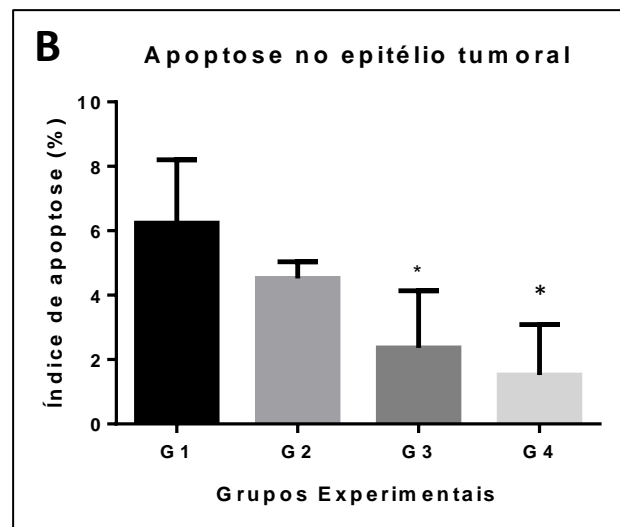
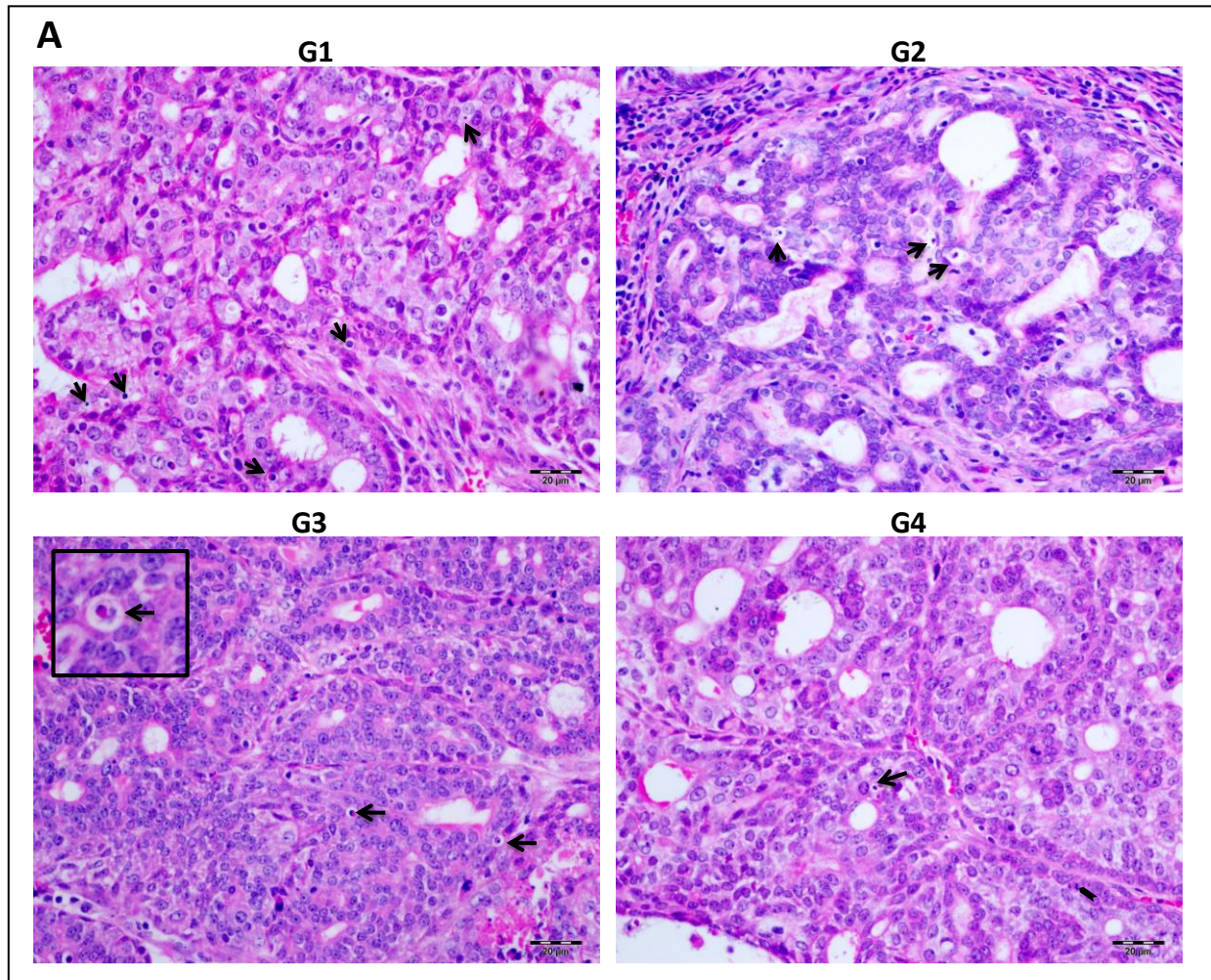


Figura 10. A) Análise de células em apoptose em coloração hematoxilina/eosina em tumores. Objetiva de 40x. As setas vazadas (\rightarrow) indicam células em apoptose e a seta cheia (\blackrightarrow) indica célula em anáfase. (B) Índice de células em apoptose no epitélio tumoral G1:DMBA; G2:DMBA+P-MAPA; G3:DMBA+TAM+P-MAPA; G4:DMBA+TAM. Teste estatístico: ANOVA/Holm-Sidak ($p \leq 0,001$).

*Diferente estatisticamente do grupo G1.

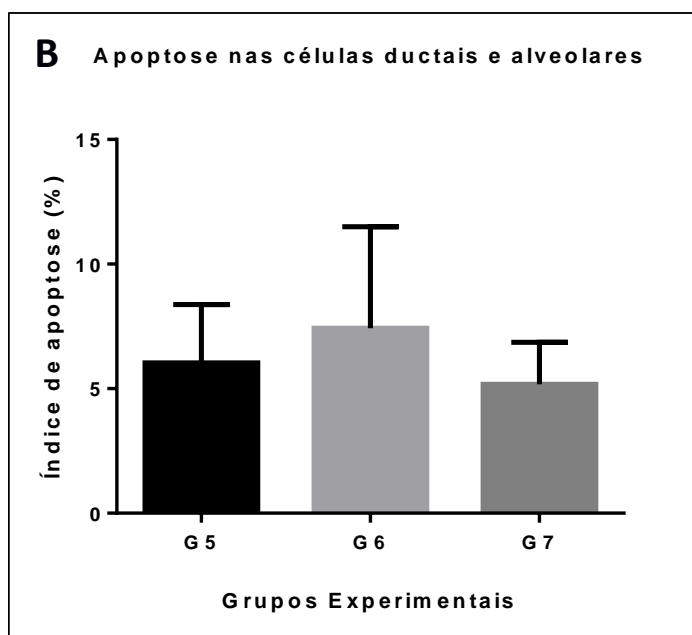
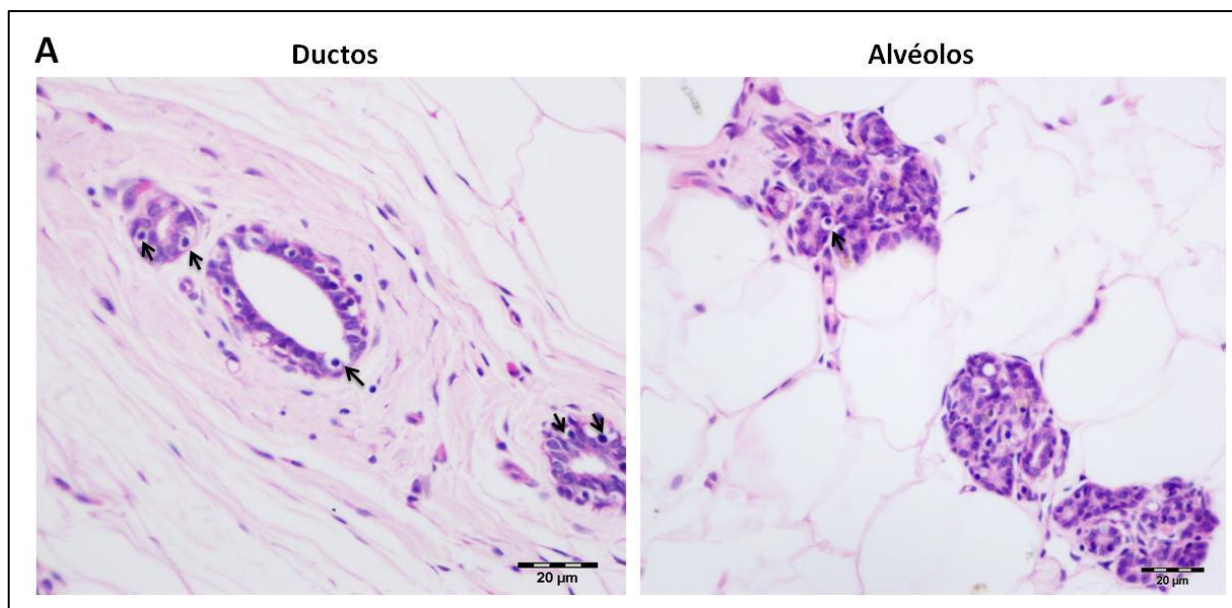


Figura 11. A) Análise de células em apoptose em coloração hematoxilina/eosina no tecido epitelial mamário normal. Objetiva de 40x. As setas (→) indicam células em apoptose. (B) Índice de células em apoptose no epitélio mamário normal (células ductais e alveolares). G5=P-MAPA; G6=P-MAPA/TAM; G7=VEÍCULOS. Teste estatístico: Kruskal-Wallis.

Através da marcação imunoistoquímica, observou-se que no epitélio dos tumores mamários há uma diminuição na expressão do TLR2 e do TLR4 em comparação ao epitélio mamário normal. A diferença de expressão do TLR2 entre epitélio tumoral e epitélio normal dá-se pela diferença de células positivas, sendo que, para o TLR4, a diferença dá-se pela intensidade de marcação (Figura 12A e Figura 13A). Entretanto, não foi observado alteração de expressão desses receptores no epitélio normal e tumoral frente aos diferentes tratamentos (G1-G4) (G5-G7) (Figura 13B).

O padrão de expressão do receptor RE- α foi forte tanto no epitélio tumoral quanto no epitélio mamário normal, não havendo diferença de expressão frente aos diferentes tratamentos (Figura 14A e Figura 14B).

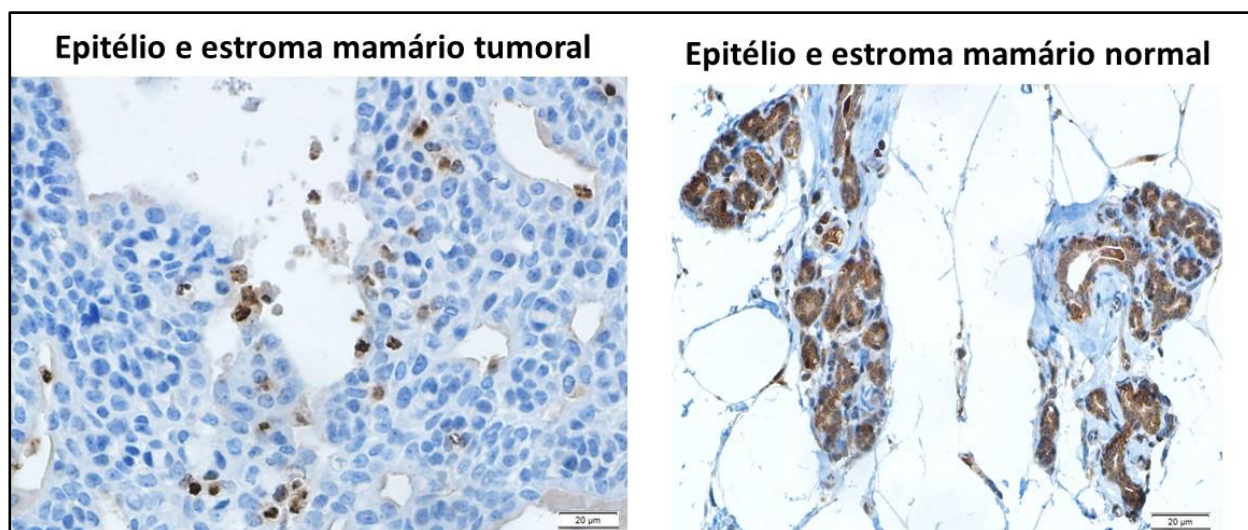


Figura 12 (A) Marcação imunoistoquímica para TLR2 em tumores mamários e na glândula mamária normal. Objetiva de 40x.

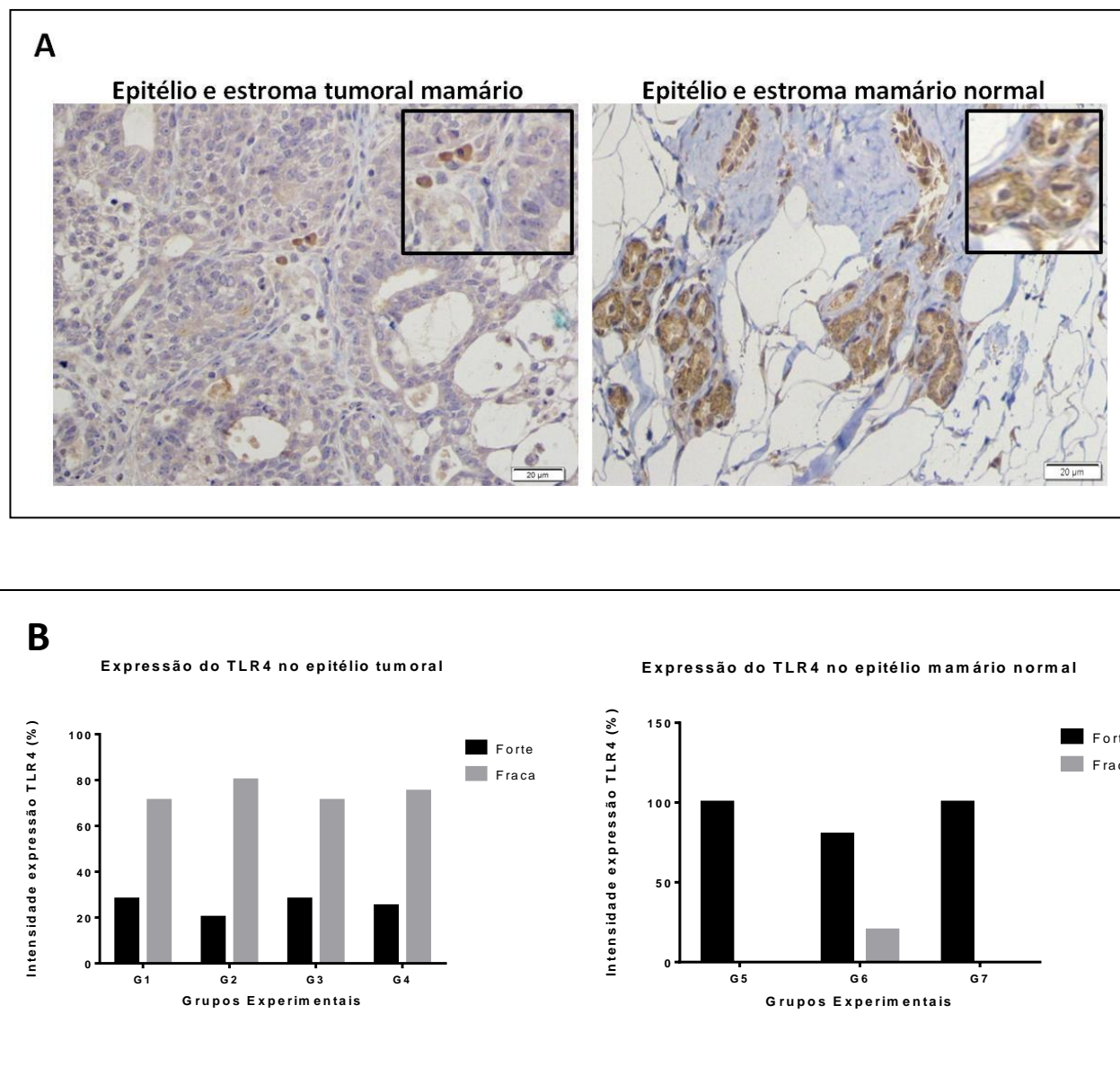


Figura 13. (A) Marcação imunoistoquímica para TLR4 em tumores mamários e na glândula mamária normal. Objetiva de 40x. (B) Intensidade da expressão (%) do TLR4 no epitélio tumoral e epitélio mamário normal. G1:DMBA; G2:DMBA+P-MAPA; G3:DMBA+TAM+P-MAPA; G4:DMBA+TAM; G5:P-MAPA; G6:P-MAPA+TAM; G7:VEÍCULOS. Teste estatístico: Qui-quadrado.

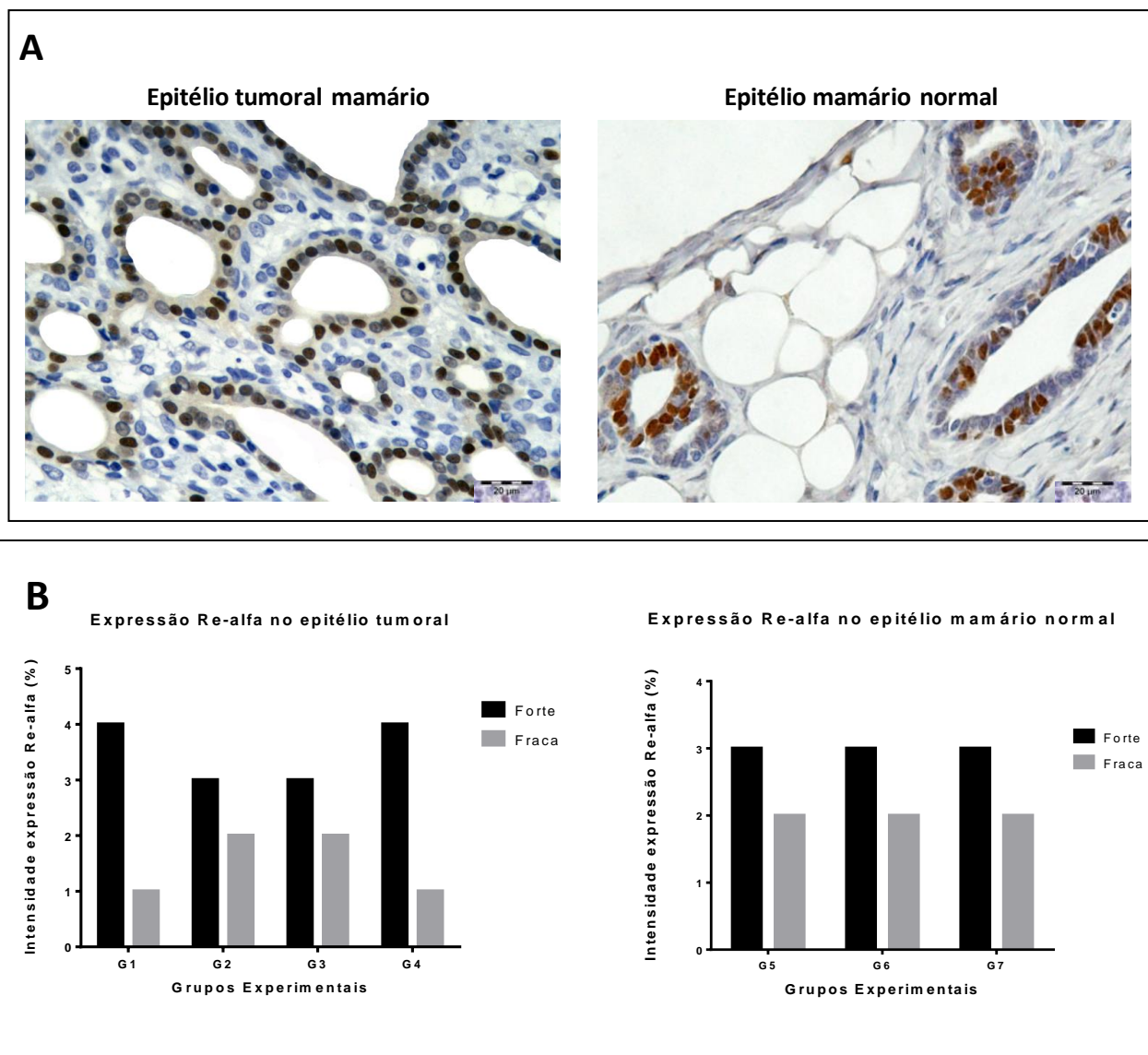


Figura 14. A) Marcação imunoistoquímica para RE- α em tumores mamários e na glândula mamária normal. Objetiva de 40x. (B) Intensidade da expressão (%) do RE- α no epitélio tumoral e epitélio mamário normal. G1:DMBA; G2:DMBA+P-MAPA; G3:DMBA+TAM+P-MAPA; G4:DMBA+TAM; G5:P-MAPA; G6:P-MAPA+TAM; G7:VEÍCULOS. Teste estatístico: Qui-quadrado.

3.5 Expressão proteica global por meio da estratégia proteômica do tipo *shotgun* (LC-MS/MS)

A análise da expressão proteica global foi realizada por espectrometria de massas (LC-MS/MS) nas amostras de tumores mamários e tecido mamário normal. Para apresentar um panorama geral das proteínas identificadas na análise proteômica (Anexo B), na Figura 15 é apresentado o diagrama de Venn para os grupos iniciados, perfazendo um total de 222 proteínas. O número de proteínas encontradas exclusivamente nos grupos G1 (DMBA), G2 (DMBA/P-MAPA), G3 (DMBA/P-MAPA/TAM) e G4 (DMBA/TAM) foram 11, 14, 21 e 31, respectivamente, enquanto que todos os grupos compartilham de 102 proteínas. Nenhuma proteína foi encontrada exclusivamente entre G1 e G2 e entre G1 e G4, tendo apenas uma proteína exclusivamente comum entre G1 e G3.

A mesma análise foi realizada para os grupos não-iniciados. Na Figura 15 é apresentado o diagrama de Venn para esses grupos, totalizando 108 proteínas identificadas. Desse total, 20, 42 e 8 proteínas foram encontradas exclusivamente nos grupos G5 (P-MAPA), G6 (P-MAPA/TAM) e G7 (veículos), respectivamente, enquanto que 22 são comuns a todos os grupos. Foram encontradas 2 proteínas exclusivamente comuns entre os grupos G5 e G7 e nenhuma entre G6 e G7.

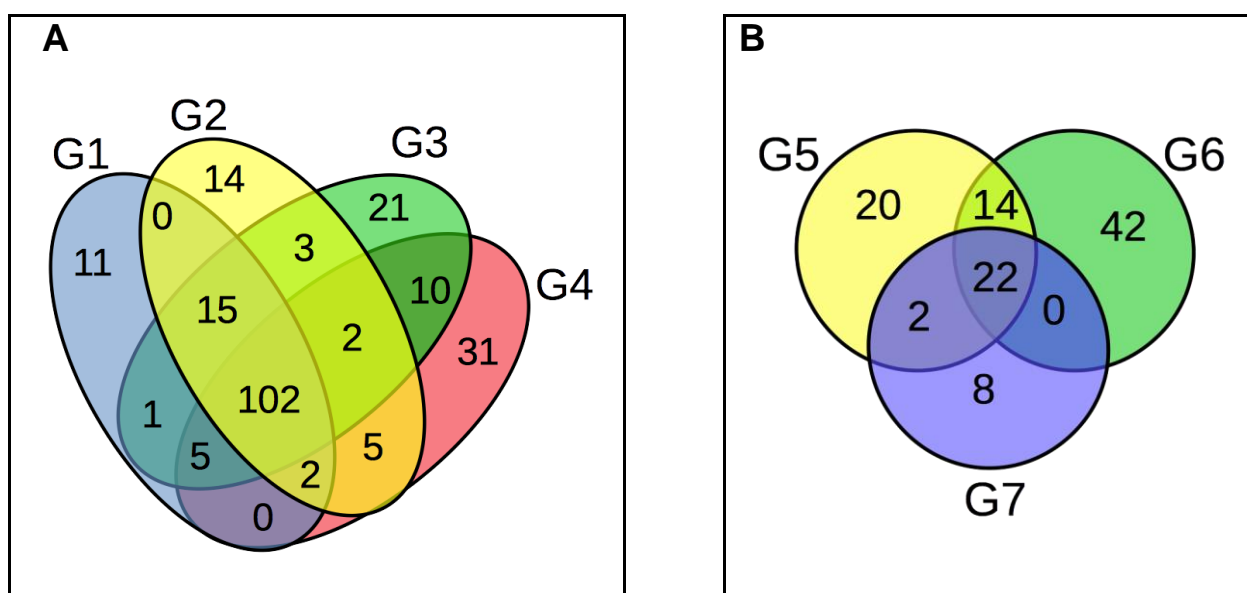


Figura 15 - Diagrama de Venn representativo do panorama geral das proteínas identificadas pela espectrometria de massas (LC-MS/MS) nos grupos iniciados (A) e não iniciados pela DMBA (B). G1:DMBA; G2:DMBA/P-MAPA; G3:DMBA/P-MAPA/TAM; G4:DMBA/TAM; G5: P-MAPA; G6: P-MAPA/TAM; G7: Veículos.

Para determinar se uma proteína estava com baixa ou alta expressão quando comparada entre dois grupos, considerou-se as medidas de Fold Change (FC) e p-valor obtidas pela análise proteômica. O valor de corte considerado para o FC foi de 1,3 e 0,77, ou seja, quando a razão da quantidade de proteínas entre o grupo teste e o grupo controle é maior ou igual a 1,3 (*upregulated*) ou é menor ou igual a 0,77 (*downregulated*). Além do FC, para que uma proteína seja considerada *up* ou *downregulated*, o p-valor precisa ser menor ou igual a um nível de significância $\alpha=0,05$.

As proteínas com expressões significativamente diferentes entre, pelo menos um grupo teste e um grupo controle, são apresentadas na Tabela 5. Dentre as 330 proteínas identificadas, 13 proteínas foram consideradas *upregulated* ou *downregulated* conforme os valores de corte determinados.

Entre os grupos iniciados, G2 (DMBA/P-MAPA, G3 (DMBA/P-MAPA/TAM) e G4 (DMBA/TAM) apresentaram, respectivamente, 4, 6 e 4 proteínas diferentemente expressas em relação a G1 (DMBA). Nos grupos não-iniciados foram encontradas 10 proteínas diferentemente expressas em G5 (P-MAPA) e 5 proteínas em G6 (P-MAPA/TAM) quando comparados a G7 (veículos).

Em relação a rede de interação entre as proteínas diferentemente expressas para cada comparação (Grupo teste vs. Grupo controle), apenas algumas proteínas do grupo G3 (DMBA/P-MAPA/TAM); G5 (P-MAPA) e G6 (P-MAPA/TAM) apresentaram interações entre si (Figura 16).

Tabela 5 - Identificação e categorização das proteínas diferentemente expressas em relação aos grupos controles.

Acesso	Descrição	Função	Grupos	Fold change	P-valor	Up / Down
P06761	78 kDa glucose-regulated protein (Hspa5)	- Enovelamento proteico	G5xG7	0.37	0.00	down
P62630	Elongation factor 1-alpha 1	- Resposta ao estímulo do EGFR	G4xG1	0.75	0.00	down
			G2xG1	1.80	0.00	up
			G3xG1	2.01	0.00	up
O88752	Epsilon 1 globin	- Transportadora	G4xG1	1.82	0.00	up
			G5xG7	0.57	0.00	down
			G6xG7	1.70	0.00	up
P04797	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	- Metabolismo (glicólise)	G3xG1	1.31	0.02	up
P01946	Hemoglobin subunit alpha-1/2	- Transportadora	G5xG7	0.63	0.00	down
			G6xG7	1.54	0.00	up
			G2xG1	1.77	0.00	up
P02091	Hemoglobin subunit beta-1	- Transportadora	G3xG1	2.05	0.00	up
			G4xG1	1.84	0.00	up
			G5xG7	0.61	0.00	down
			G6xG7	1.65	0.00	up

						(continuação)
			G2xG1	1.84	0.00	up
			G3xG1	2.03	0.00	up
P11517	Hemoglobin subunit beta-2	- Transportadora	G4xG1	1.82	0.00	up
			G5xG7	0.58	0.00	down
			G6xG7	1.73	0.00	up
P20059	Hemopexin	-Transportadora (antioxidante)	G5xG7	1.75	0.00	up
			G6xG7	0.74	0.00	down
P20760	Ig gamma-2A chain C region	- Imunomoduladora	G5xG7	2.01	0.00	up
D4A543	RCG41622 (Sox 2)	- Transcrição	G5xG7	12.30	0.00	up
P12346	Serotransferrin	- Transportadora	G5xG7	0.73	0.00	down
P02770	Serum albumin	- Transportadora	G3xG1	1.60	0.00	up
			G5xG7	1.52	0.00	up
Q6P9T8	Tubulin beta-4B chain	- Constituição do citoesqueleto/microtúbulos	G2xG1	8.17	0.01	up
			G3xG1	8.76	0.01	up

Grupos experimentais: G1:DMBA; G2:DMBA+P-MAPA; G3:DMBA+TAM+P-MAPA; G4:DMBA+TAM
G5:P-MAPA; G6:P-MAPA+TAM; G7:VEÍCULOS

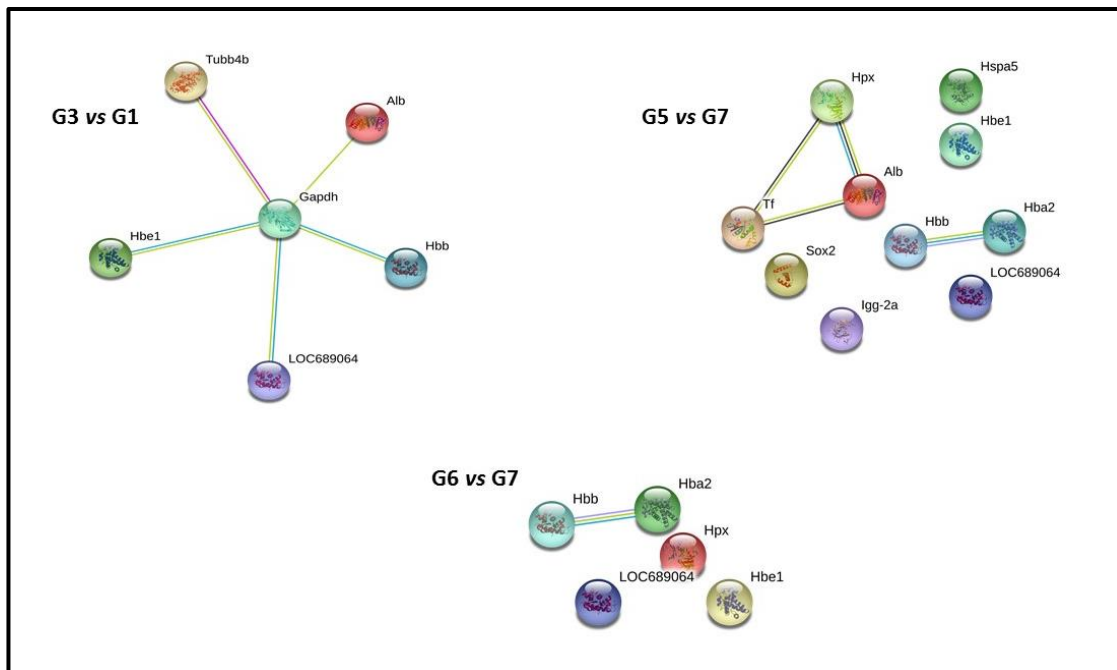


Figura 16 - Rede de interações entre as proteínas tubulina; Gapdh; seroalbumina; hemoglobina beta-1; hemoglobina beta-2 (LOC689064) e Epsilon 1-globin (Hbe1) na comparação G3 vs G1, entre as proteínas hemopexina, serotransferrina e seroalbumina na comparação G5 vs G7 e entre as proteínas hemoglobina beta-1 e e hemoglobina alfa-1/2 na comparação G6 vs G7.

G1: DMBA; G3: DMBA/P-MAPA/TAM; G5: P-MAPA; G6: P-MAPA/TAM; G7: Veículos.

4 Discussão e Conclusões

O câncer de mama é o de maior incidência na população feminina, apresenta história natural diversa, histologia complexa e de resposta variável às terapias convencionais (Parkin et al, 2005; Jemal et al., 2010; Torre et al., 2015). Atualmente, existem poucos tratamentos para o câncer de mama hormônio-dependente e os fármacos comumente utilizados estão intimamente associados a graves efeitos colaterais que limitam sua utilização. Sendo assim, a imunoterapia abre uma nova perspectiva para o tratamento do câncer.

De acordo com alguns pesquisadores, o P-MAPA apresenta-se como forte candidato para a terapia adjuvante do câncer, visto que apresenta atividade antitumoral demonstrada em estudos *in vitro* e *in vivo* (Durán et al., 1997; Fávaro et al., 2012; Garcia et al., 2015, 2016; Dias et al., 2016). Em modelos de estudo utilizando células tumorais transplantáveis, como por exemplo, sarcoma-180; carcinoma de Erlich; plasmacitoma SP-2Ag14; tumor de Walker 256 e carcinoma mamário espontâneo SP-1, o tratamento com P-MAPA foi capaz de inibir o crescimento tumoral e aumentar a sobrevivência dos animais (Durán et al., 1993; 1997). Entretanto, os resultados do presente estudo indicam que o tratamento com o P-MAPA não foi capaz de exercer efeito protetor contra o desenvolvimento dos adenocarcinomas mamários induzidos pela DMBA. Mesmo sem diferença significativa, a incidência de animais com tumores mamários no grupo de animais iniciados com a DMBA e que receberam apenas o P-MAPA (G2) foi semelhante a do grupo controle positivo e maior que a dos demais grupos experimentais iniciados. Além disso, o tratamento isolado com o P-MAPA tendeu a aumentar a multiplicidade dos tumores mamários. Por outro lado, mesmo sem diferença estatística, o tratamento do P-MAPA em associação com o tamoxifeno diminuiu a incidência e a multiplicidade dos tumores. Em relação ao volume tumoral não houve diferença entre os grupos iniciados com a DMBA, sendo que a maioria dos tumores foi de volume pequeno ($<15,18 \text{ cm}^3$).

Especialmente em estudos de curto prazo, a latência é um dos parâmetros mais sensível para analisar fatores que modulam a resposta tumorigênica da glândula mamária (Russo & Russo, 2004). Em nosso estudo, o início do desenvolvimento tumoral ocorreu mais tardiamente no grupo tratado com o P-MAPA e tamoxifeno, sendo de duas semanas a diferença de tempo em relação aos demais grupos experimentais iniciados com a DMBA. Sugere-se, portanto, que a associação P-MAPA/Tamoxifeno

possa ser capaz de retardar o início da carcinogênese mamária. Esta hipótese poderia ser investigada em um novo estudo usando um protocolo experimental com doses menores de DMBA.

O Tamoxifeno é a droga mais comumente utilizada em pacientes com câncer de mama receptor de estrógeno positivo (RE+), após a remoção cirúrgica por mastectomia radical ou parcial com o objetivo de reduzir a recorrência da doença (Katzenellenbogen & Katzenellenbogen, 2000; Bush, 2007, Traboulsi et al., 2016). No entanto, o Tamoxifeno está intimamente associado a graves efeitos colaterais como, por exemplo, aumento significativo no risco de câncer de endométrio e de fígado (White, 1999; Kim et al., 2005, Rondón-Lagos et al., 2016). Por outro lado, estudos experimentais de toxicologia aguda, subcrônica e crônica, demonstraram que o P-MAPA é um composto seguro, sem efeitos citotóxicos e teratogênicos verificados em estudos *in vitro* e *in vivo* (Durán et al. 1993, Fávoro et al., 2012). Considerando as doses de tamoxifeno e P-MAPA utilizadas no presente estudo, não foi observado nenhum efeito carcinogênico per se dos tratamentos empregados (isolados e/ou em associação). Entretanto, o ganho do peso corpóreo foi significativamente menor nos animais que receberam DMBA/Tamoxifeno. Por outro lado, o grupo que recebeu o P-MAPA (isolado) apresentou ganho de peso estatisticamente maior que os demais grupos não iniciados. Nenhuma diferença significativa foi observada em relação aos pesos dos rins dos animais frente aos diferentes tratamentos, entretanto, os pesos hepáticos relativos foram menores nos grupos tratados isoladamente com P-MAPA e P-MAPA/TAM em relação ao grupo controle negativo.

Sob certas condições, a inflamação promove a carcinogênese, enquanto em outras ela exerce efeitos antitumorais. Este fato pode ser explicado pela diferença de intensidade e da natureza da resposta inflamatória. Se a resposta inflamatória se desenvolve em um ambiente de inflamação aguda, um mecanismo efetor imunológico é ativado com consequente regressão do tumor (Mantovani et al., 2008; Galli et al., 2010). Estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* demonstraram que o P-MAPA é capaz de induzir respostas imunomoduladoras por estimular a proliferação de linfócitos e induzir 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, Fávoro et al., 2012; Garcia et al., 2015;2016; Dias et al., 2016). No presente estudo, também observamos aumento significativo do infiltrado inflamatório (linfócitos, plasmócitos,

macrófagos e mastócitos) no estroma tumoral dos grupos tratados com o P-MAPA e com o tamoxifeno (isolados e em associação) quando comparados ao grupo somente iniciado (G1). Como as taxas de multiplicidade e tamanho tumoral nesses grupos não diferiram estatisticamente do grupo controle positivo, não se pode afirmar que o processo inflamatório observado atuou como reguladora positiva ou negativa da carcinogênese mamária. Mais dados como a fenotipagem das células inflamatórias e o estudo da produção local de citocinas são necessárias.

A proliferação celular exacerbada, resistência e/ou redução da apoptose e a migração das células tumorais são consideradas marcadores da patologia tumoral, facilitando o entendimento do comportamento biológico dos tumores (Sun et al., 2015). O índice de proliferação celular pode ser mensurado através do antígeno nuclear Ki-67 (Kim et al., 2008). Os índices de proliferação celular pelo Ki-67 podem ser associados com o crescimento e diferenciação tumoral e, positivamente, correlacionados com grau de invasão, tamanho do tumor e metástase (Cuzick et al., 2011; Kruger et al., 2013). A apoptose é um processo celular ordenado e orquestrado que ocorre tanto em condições fisiológicas quanto patológicas. A redução ou resistência na indução de apoptose desempenha papel fundamental na carcinogênese, contribuindo para a progressão tumoral (Kerr et al., 1972, Wong, 2011). De acordo com Garcia et al., (2016), o tratamento com P-MAPA reduziu significativamente a proliferação celular e aumentou o índice apoptótico no epitélio da bexiga de ratos Fisher-344 iniciados com a MNU em comparação ao grupo controle positivo (MNU) e ao grupo tratado com BCG (MNU/BCG). Nossos resultados de imunistoquímica para o marcador Ki-67, demonstraram que a administração de P-MAPA não alterou as taxas de proliferação nos tumores mamários e na glândula mamária normal em relação aos grupos controles (G1, G7). Em relação à análise apoptótica, o tratamento com P-MAPA isolado (G2 e G5) e em associação com o tamoxifeno (G6) também não alterou os índices apoptóticos quando comparado aos respectivos grupos controles (G1 e G7). Porém, o tratamento com o P-MAPA em associação ao Tamoxifeno (G3) e o tratamento com o Tamoxifeno sozinho (G4) diminuiu estatisticamente os índices de apoptose nos tumores mamários quando comparado ao grupo controle positivo (G1). Conforme será discutido adiante, a interação das tubulinas com a GAPDH ocasiona efeito anti-apoptótico e estas proteínas apresentaram-se superexpressas no grupo G3 (P-MAPA/TAM). Sendo assim, a diminuição do índice apoptótico do grupo G3 pode estar associado a este

fator. Em relação a diminuição do índice apoptótico do grupo G4, não foi possível determinar os fatores que possam ter ocasionado tal evento.

Como o objetivo desse projeto era avaliar os efeitos da associação do P-MAPA com o tamoxifeno sobre a carcinogênese mamária, fez-se necessário a utilização de uma dose menor do tamoxifeno (Gottardis & Jordan, 1987), a fim de não mascarar os possíveis efeitos protetores do P-MAPA quando em associação ao Tamoxifeno. Por esse motivo, os resultados do tratamento com Tamoxifeno observados em nosso estudo (proliferação celular, apoptose, redução do volume tumoral, incidência e multiplicidade dos tumores) não se mostram tão eficientes em comparação a capacidade do tamoxifeno em inibir a carcinogênese mamária e promover a regressão do tumor como demonstrado em estudos prévios. (Bernardes et al., 1999; Bush et al., 2007; Dias et al., 2013).

O desenvolvimento da mama é influenciado por vários hormônios e fatores de crescimento os quais estimulam a proliferação celular, diferenciação ou apoptose. Dentre os diversos hormônios, destacam-se os estrógenos, cujo principal papel é promover a proliferação tanto em células normais como em células neoplásicas. Nos mamíferos, a maioria dos efeitos biológicos dos estrógenos é mediada por sua interação com dois subtipos de receptores (RE- α e RE- β) e seus respectivos co-fatores (Björnström e Sjöberg, 2005; Lo e Sukumar, 2008). Os REs 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). A administração de tamoxifeno e de P-MAPA, isolados ou em associação, não alterou expressão do RE- α nos tumores mamários e glândula mamária normal.

Segundo estudos, o amplo espectro de ação do imunomodulador P-MAPA ocorre através da estimulação dos receptores *toll-like 2* e *toll-like 4*. Fávoro et al. (2012) e Garcia et al. (2015) demonstraram que o P-MAPA foi capaz de aumentar os níveis proteicos de TLR2 e TLR4 em animais com carcinoma de bexiga não-músculo invasivo induzido quimicamente pela MNU. Resultados similares foram observados em experimento *in vitro* com células HEK293 onde o P-MAPA ativou o NF- κ B com consequente estimulação dos TLRs 2 e 4 (Fávoro et al., 2012).

A hipótese do nosso estudo era de que o P-MAPA estimularia a expressão dos receptores TLR2 e TLR4 no tecido mamário, exercendo possíveis efeitos antitumorais

como observado nos estudos prévios. Entretanto, o tratamento com o P-MAPA não aumentou a expressão *in situ* do TLR2 e do TLR4 nos tumores mamários e no tecido mamário normal quando comparado aos seus respectivos grupos controles.

O envolvimento dos receptores *toll-like* na carcinogênese é controverso, pois estudos apontam os TLRs como reguladores negativos ou positivos para a carcinogênese. Além de sua expressão nas células do sistema imune e nas células epiteliais normais, os TLRs também são expressos nas células tumorais, podendo influenciar o crescimento tumoral, a resposta imunológica, resistência à apoptose e aumento do potencial invasivo (Jego et al., 2006; Bhattacharya & Yusuf, 2012). De acordo com alguns estudos a deficiência do TLR4 contribuiu para a progressão tumoral mamária e de pele em camundongos C3H/HeJ-TLR4^{-/-} e tratados com DMBA (Yusuff et al., 2008; Naseemuddin et al., 2012). Segundo Lu et al. (2011), o crescimento tumoral mamário de camundongos transgênicos (MMTVneu) também foi reduzido significativamente através da estimulação do receptor TLR2. No modelo de carcinoma mamário utilizado em nosso estudo, também observamos relação inversa da expressão *in situ* dos receptores TLR2 e TLR4 com a carcinogênese mamária, pois houve diminuição significativa da expressão desses receptores nas células epiteliais tumorais em relação ao epitélio da glândula mamária normal. Sendo assim, se o tratamento com P-MAPA tivesse estimulado a expressão dos receptores TLR2 e TLR4, poderia, talvez, ocorrer menor crescimento dos tumores mamários.

Através da análise da expressão global proteica por meio da estratégia proteômica *Shotgun*, foi possível detectar 13 proteínas diferentemente expressas entre os grupos experimentais.

A enzima *glyceraldes-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) é o regulador chave da glicólise, estando também envolvida em diversos processos biológicos, como endocitose, controle da expressão genica, replicação e reparo do DNA (Yamaji et al., 2005; Harada et al., 2007). Estudos têm demonstrado que sua expressão aumenta em vários tipos de câncer, como o de pulmão, pâncreas, cervix e mama (Correa et al., 2010; Bouchra et al., 2012). Na linhagem celular LNCaP de câncer de próstata e na linhagem Hep3B de câncer de fígado, a expressão da GAPDH parece ser induzida pela condição de hipóxia (Lu & Gu, 2002; Graven et al., 2003). Entretanto, esses dados são conflitantes, supondo-se que o aumento de GAPDH pela hipóxia pode ser tumor específico (Said et al., 2007,2009; Higashimura et al., 2011.). O grupo tratado com P-

MAPA/TAM apresentou aumento significativo da expressão da GAPDH nos tumores mamários (G3) quando comparado ao grupo controle positivo (G1- DMBA). A condição de hipóxia é comum em tumores sólidos como o de câncer de mama pois a vascularização é disfuncional e insuficiente devido ao rápido crescimento tumoral. Sendo assim, processos como angiogênese e glicólise são ativados para que as células tumorais possam se adaptar a esse microambiente (Knowles & Harris 2001; Coleman & Ratcliffe, 2007). Segundo Bouchra et al. (2012) o aumento da expressão de GAPDH no tumor mamário pode ser tanto devido a um ambiente de hipóxia como para exercer outras funções independente de seu papel glicolítico clássico. Visto que, no grupo não iniciado com a DMBA e tratado com P-MAPA/TAM (G6) não ocorreu o aumento da GAPDH, sugere-se que o aumento da GAPDH observado nos tumores mamários pode ter sido uma resposta das células tumorais frente ao aumento da condição de hipóxia e/ou dano celular causada pelo tratamento P-MAPA/TAM. Como através da espectrometria de massas não foram detectados os fatores regulatórios da resposta intracelular à hipóxia (HIF-1 e HIF-2), não é possível afirmar se houve diminuição significativa de oxigênio no ambiente tumoral, o que justificaria o aumento da GAPDH.

Entretanto, a adaptação das células tumorais à hipóxia também pode ser regulada pela expressão das tubulinas e de proteínas relacionadas ao transporte de oxigênio (Raspaglio et al., 2008; Emara et al., 2014). No presente estudo também foi observada expressão aumentada tanto de tubulina- β como de proteínas transportadoras de oxigênio (hemoglobina alfa e beta) frente ao tratamento de P-MAPA/TAM.

Os microtúbulos são formados pela mistura de tubulina- α e tubulina- β , sendo considerados estruturas altamente dinâmicas com papel crucial na divisão celular (Kumar & Flavin, 1981; Gan et al., 2008; Gan et al., 2011). Alterações nas mudanças pós-translacionais e na expressão das tubulinas têm sido relatadas em diversos tipos de cânceres (Giarnieri et al., 2005; Ferrandina et al., 2006; McCarrol et al., 2010; Kavallaris, 2010). O aumento na expressão das tubulinas é associado ao maior desenvolvimento tumoral e agressividade da doença. Segundo estudo conduzido por Giarnieri et al. (2005), há maior expressão das tubulinas nos pólipos e no câncer de reto invasivo em humanos, indicando um possível papel das tubulinas no processo de invasão. Além de seu papel na mitose, ciclo celular e apoptose, as tubulinas também podem alterar a resposta ao stress oxidativo por agir como redutores (Joe et al., 2008).

O stress metabólico nas células tumorais devido ao crescimento celular excessivo, faz com que as tubulinas modulem o processo metabólico para manter o nível energético celular, garantindo conseqüentemente a integridade dos microtubulos e a sobrevivência das células (Saks et al., 1995; Altman & Rathmell, 2012). Estudos in vitro demonstram que as tubulinas interagem com diversas enzimas glicolíticas, entre elas a GAPDH. Essa interação altera a atividade da GAPDH causando efeito anti-apoptótico nas células tumorais (Vertessy et al., 1999; Orosz et al., 1999; Parker et al., 2014). Tanto o grupo G2 (P-MAPA) como o grupo G3 (P-MAPA/TAM) apresentaram aumento significativo da proteína beta-tubulina em relação ao grupo G1 (DMBA). Isso suporta a hipótese de que esses tratamentos, em especial o P-MAPA/TAM, possam ter aumentado a hipóxia nos tumores mamários, ocasionando o aumento da β -tubulina e da GPADH, a qual também pode ter sido regulada pelo próprio aumento das tubulinas. A rede de interação observada entre as proteínas GAPDH, hemoglobina- β , Tub- β e seroalbumina, diferentemente expressas na comparação G3 (DMBA/P-MAPA/TAM) vs G1 (DMBA), corroboram com tal hipótese.

A Hemoglobina (Hb) é produzida principalmente pelos eritrócitos, entretanto, diversos estudos têm demonstrado que outras células como macrófagos e células epiteliais também expressam essa proteína (Tommila et al., 2010; Saha et al., 2014). Sua principal função é o transporte de oxigênio dos pulmões para os diversos tecidos, sendo que, o aumento de sua expressão é relacionado, principalmente, a uma condição de hipóxia (Dunst, 2004; Tommila et al., 2010; Jeney et al., 2014). Em nosso estudo houve aumento significativo de hemoglobina- β nos tumores mamários dos grupos G2-G4 (DMBA/P-MAPA, DMBA/P-MAPA/TAM, DMBA/TAM) em relação ao grupo controle positivo (G1), ao passo que, a diferença de expressão da Hb- β e Hb- α na glândula mamaria normal dos grupos G5 (P-MAPA) e G6 (P-MAPA/TAM) foi estatisticamente menor em relação ao grupo controle negativo (G7). Sugere-se, portanto, que o aumento da Hb- β nos tumores pode ter ocorrido devido ao aumento da hipóxia.

Além disso, como citado anteriormente, macrófagos e células epiteliais alveolares também expressam hemoglobina, ocorrendo, principalmente, em resposta a uma condição de stress oxidativo ou hipóxia (Liu et al., 1999; Nishi et al., 2008). Esse aumento de Hb facilitaria o transporte de O₂ e/ou a eliminação de oxigênio/nitrogênio para reduzir o stress oxido-nítrico. Por fim, estudos também demonstram que o

aumento das hemoglobinas é comum em tecido de granulação, pois há aumento da vascularização afim de nutrir as células inflamatórias que estão atuando no processo de reparo (Tommila et al., 2010). Visto que o tratamento com P-MAPA, Tamoxifeno e associação de ambos aumentou significativamente o infiltrado inflamatório nos tumores mamários, o aumento de Hb nessas amostras tumorais, pode ter ocorrido devido ao aumento de macrófagos que, por sua vez, também pode ter expressado a proteína Hb frente a uma possível condição de hipóxia, injúria, e/ou stress oxidativo/nítrico favorecido pelos tratamentos.

Além da Hb, a proteína Hemopexina (HPX) e a Seroalbumina (HSA) também foram expressas diferentemente em alguns grupos experimentais. A hemopexina é uma proteína de plasma com alta afinidade de ligação com o heme, o qual é altamente tóxico por se intercalar com os lipídeos da membrana plasmática e produzir radicais hidroxila (Balla et al., 2000). Sendo assim, a hemopexina é considerada o principal veículo de transporte de heme no plasma prevenindo o stress oxidativo causado pelo heme (Tolosano & Altruda 2002). A proteína HSA é a proteína mais abundante do plasma sanguíneo, sendo considerada como o principal antioxidante do fluido extracelular (Quinlan et al., 2004; Setoyama et al., 2016). No presente estudo, o tratamento com P-MAPA e com P-MAPA/TAM (G5-G6) aumentou significativamente a expressão da HPX na glândula mamária normal em relação ao grupo controle negativo (G7). Porém, essa diferença não foi observada entre os grupos iniciados com a DMBA. Em relação à HSA, os tumores mamários do grupo tratado com P-MAPA/TAM (G3) e as glândulas mamárias normais do grupo tratado apenas com P-MAPA (G5) apresentaram aumento significativo de expressão da proteína HSA quando comparados aos seus respectivos grupos controles (G1 e G7). Sugere-se, portanto, que o P-MAPA sozinho ou em associação ao Tamoxifeno, pode exercer uma atividade antioxidante por estimular a expressão da hemopexina e da seroalbumina.

Em nosso estudo também observamos que o tratamento com o P-MAPA foi capaz de diminuir a expressão da proteína Heat-shock 5 (HSPA5) na glândula mamária normal. A proteína HSPA5, também chamada de GRP78/BiP é uma chaperona do retículo endoplasmático envolvida no enovelamento adequado das proteínas (Ni & Lee, 2007; Wang et al., 2005). O aumento de expressão da HSPA5 tem sido reportado em diversos tipos de câncer, como o de pulmão, próstata, cólon, estômago, fígado e mama (Xing et al., 2006; Zhang et al., 2006; Chang et al., 2014). Segundo estudos, a proteína

HSPA5 exibe atividade oncogênica, pois promove a proliferação celular, migração/invasão, resistência a drogas e previne a apoptose (Fu et al., 2006; Dong et al., 2008; Chen et al., 2015). Mesmo não havendo diferença de expressão da HSPA5 nos tumores mamários, o P-MAPA (G5) reduziu significativamente sua expressão na glândula mamária normal quando comparado ao grupo controle negativo (G7). Talvez, a administração de doses maiores do imunomodulador P-MAPA também possa reduzir a expressão da HSPA5 nos tumores mamários, podendo assim, favorecer o aumento da apoptose e redução da proliferação das células tumorais.

Por outro lado, o mesmo grupo tratado com P-MAPA (G5) apresentou aumento significativo da proteína Sox2 na glândula mamária normal em comparação ao grupo controle negativo. Chen et al. (2008), através de estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o aumento da expressão da SOX2 é comum nos carcinomas mamários, promovendo a proliferação celular e favorecendo a tumorigênese por facilitar a transição G1/S do ciclo celular e por aumentar a expressão da ciclina D1. Além disso, a expressão da SOX2 parece estar fortemente relacionada com a expressão das citoqueratinas 5/6, EGFR e vimentina no câncer de mama do tipo basal-like (Rodriguez et al., 2007). Outros estudos também demonstram que a SOX2 está envolvida no câncer gástrico e prostático, assim como no processo de metástase e invasão no câncer pancreático (Sattler et al., 2000; Li et al., 2004; Sanada et al., 2006). Portanto, frente ao aumento da SOX2 e diminuição da HSPA5 na glândula mamária normal, as quais podem favorecer positivamente e negativamente a carcinogênese, faz-se necessário outras análises e estudos adicionais para estabelecer os efeitos que o P-MAPA pode exercer tanto no epitélio mamário normal como no processo da carcinogênese mamária.

O tratamento com o P-MAPA também foi capaz de diminuir expressão da proteína Serotransferrina (TF) na glândula mamária normal, porém, resultado similar não foi observado nos tumores mamários. A TF é considerada como um fator de crescimento essencial para proliferação e diferenciação celular (Vyhlidal & Safe, 2002) e o aumento de sua expressão tem sido detectado em alguns tipos de tumores, entre eles, o de mama (Agarwal et al., 2001; Park et al., 2009). Mesmo com a diminuição da TF, não foi observado alteração nos índices de proliferação celular pelo marcador Ki-67 no grupo G5 conforme discutido anteriormente.

O composto P-MAPA é considerado um imunomodulador por ser capaz de estimular o sistema imune frente a processos infecciosos e neoplásicos, ocasionando, por exemplo, o aumento de interleucinas, interferon e receptores *toll-like* (Fávaro et al., 2012; Garcia et al., 2015;2016; Dias et al., 2016). No presente estudo não foi detectado diferença de expressão destes marcadores pela espectrometria de massas e/ou imunistoquímica. Entretanto, o grupo tratado apenas com P-MAPA (G5), apresentou aumento significativo da imunoglobulina IgG no tecido mamário normal em relação ao grupo controle negativo. As imunoglobulinas mediam uma variedade de funções do sistema imune, ligando-se a antígenos, células fagocitárias, linfócitos e ativando o sistema complemento (Schroeder & Cavacini, 2010; Gertz, 2013). Verifica-se, portanto, que através do aumento da imunoglobulina IgG o P-MAPA estimulou, de certa forma, o sistema imune no epitélio mamário normal, porém, o mesmo não ocorreu no epitélio tumoral.

No presente estudo, também foi observado diminuição de expressão do Fator de Alongamento-1- α (EF1A) no grupo tratado com tamoxifeno (G4). O EF1A parece estar superexpresso em diversos tipos de câncer, promovendo a transformação carcinogênica de células epiteliais e fibroblastos (Joseph et al., 2002; Chen & Madura, 2005; Kah et al., 2010; Lin et al., 2010). Nos tumores mamários, sua expressão é de moderada a intensa, sendo correlacionada com o aumento do potencial metastático (Tomlinson et al., 2005; Lin et al., 2010). Portanto, a diminuição do EF1A nos tumores mamários do grupo G4 demonstra um potencial anticarcinogênico exercido pela terapia com tamoxifeno. Entretanto, quando administrado junto com P-MAPA, não se observou o mesmo resultado.

De acordo com os dados observados, pode-se concluir que a imunoterapia com o P-MAPA em associação com o tamoxifeno foi capaz apenas de retardar o aparecimento inicial de tumores mamários. A análise proteômica indica alguns caminhos a serem investigados, como o papel do P-MAPA no aumento da hipóxia nos tumores, mas, os resultados com este imunomodulador não foram promissores na progressão da carcinogênese química mamária induzida pela DMBA.

5 Referências

- Agarwal PK, Mehrotra A, Chandra T et al. Immunohistochemical localization of transferrin in human breast cancer tissue. *Indian J Pathol Microbiol*, v. 44, p.107–11, 2001.
- Altman BJ, Rathmell JC. Metabolic Stress in Autophagy and Cell Death Pathways. *Cold Spring Harbor Perspect Biol*, v. 4(9), p.1-16, 2012.
- Andrieu N, Easton DF, Chang-Claude J 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. *J Clin Oncol*, v.24, p.3361-6, 2006.
- Balla J, Balla G, Jeney V et al. Ferriporphyrins and endothelium: A 2- edged sword- promotion of oxidation and induction of cytoprotectants. *Blood* , v.95, p.3442–50, 2000.
- Bernardes JR, Nonogaki S, Seixas MT et al. Effect of a half dose of tamoxifen on proliferative activity in normal breast tissue. *Int J Gynecol Obstet* v.67, p.33–8, 1999.
- Bhattacharya D, Yusuff N. Expression of Toll-Like Receptors on Breast Tumors: Taking a Toll on Tumor Microenvironment. *Int J Breast Cancer*, p.1-6, 2012.
- 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.
- Bouchra E, Nezha S, Hakima B et al. Study of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression in the tumor process of: Breast, cervix and prostate cancers. *Advances in Biological Chemistry*, v. 2, p. 335-40, 2012.
- Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72 (1) p. 248–254, 1976.
- Bush NJ. Advances in hormonal therapy for breast cancer. *Semin Oncol Nurs*.v.23, p.46–54, 2007.
- Chang YW, Hung MC, Su JL. The anti-tumor activity of E1A and its implications in cancer therapy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, v.62(3), p.195–04, 2014.
- Chatterjee M, Janarthan M, Manivannan R et al. Combinatorial effect of fish oil (Maxepa) and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3) in the chemoprevention of DMBA-induced mammary carcinogenesis in rats. *Chem Biol Interact*, v.188, p.102-10, 2010.
- Chen HA, Chang YW, Tseng CF, et al. E1A-Mediated Inhibition of HSPA5 Suppresses Cell Migration and Invasion in Triple-Negative Breast Cancer. *Annals of Surg Oncol*,

- v. 22 (3), p.889–98, 2015.
- Chen L and Madura K. Increased proteasome activity, ubiquitin-conjugating enzymes, and eEF1A translation factor detected in breast cancer tissue. *Cancer Res*, v. 65, p.5599–06, 2005.
- Chen Y, Shi L, Zhang L et al. The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer. *J Biol Chem*, v.283(26), p.17969-78, 2008.
- Cleator SJ, Ahamed E, Coombes RC et al. A 2009 update on the treatment of patients with hormone receptor-positive breast cancer. *Clin Breast Cancer*, v.9(1), p.6-17, 2009.
- Coleman ML, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing and hypoxia-induced responses. *Essays In Biochem*, v. 43, p. 1, 2007.
- Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol*, v. 5, p.975–95, 2004.
- Correa CR, Bertollo CM, Zouain CS et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a surface associated antigen on human breast cancer cell lines MACL-1 and MGSO-3. *Oncol Rep*, v. 24, p. 677-85, 2010.
- Cutuli B, Borel C, Dhermain F et al. Breast cancer occurred after treatment for Hodgkin's disease: analysis of 133 cases. *Radiother Oncol*, v.59, p.247-55, 2001.
- Cuzick J, Dowsett M, Pineda S et al. Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67, and human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the Genomic Health recurrence score in early breast cancer. *J Clin Oncol*, v.29, p.4273-78, 2011.
- Dai X, Xiang L, Li T et al. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *J Cancer*, v. 7(10), p.1281-94, 2016.
- Dias MC; Furtado KS, Rodrigues MA et al. Effects of Ginkgo biloba on chemically-induced mammary tumors in rats receiving tamoxifen. *B M C*, v.1, p.13-93, 2013.
- Dias QC, Nunes IS, Garcia PV et al. 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. *Int Braz J Urol*, v.42(5), p. 942-54, 2016.
- Dong D, Ni M, Li J, et al. Critical role of the stress chaperone GRP78/BiP in tumor proliferation, survival, and tumor angiogenesis in transgene-induced mammary tumor development. *Cancer Res*, v.68(2):498-05, 2008.
- Dunst J. Low hemoglobin levels: influence on tumor biology and radiotherapy treatment outcome. *European J Cancer Suppl*, v.2,p.3-10, 2004.
- Durán N, Haun M, Souza ARM. SB-73. Immuno-modulating Agent. *Drugs of the Future*, v. 18 (4), p. 327–334, 1993.

- Durán N, Gowen BB, Costa FT. A biotechnological product and its potential as a new immunomodulator for treatment of animal phlebovirus infection: Punta Toro virus. *Antiviral Res* v.83, p.143–7, 2009.
- Durán N, Justo GZ, Souza-Brito ARM et al. SB-73rMAPA: protein magnesium ammonium phospholinate-palmitoleate anhydride. *Drug Fut*, v.22, p.454, 1997.
- Elmore SA, Dixon D, Hailey JR et al. Recommendations from the INHAND Apoptosis/Necrosis Working Group. *Toxicol Pathol*, v. 44 (2), p. 173-188, 2016.
- Emara M, Turner AR, Allalunis JT. Hypoxia differentially upregulates the expression of embryonic, fetal and adult hemoglobin in human glioblastoma cells". *Int J Oncol*, v.44 (3), p.950- 58, 2014.
- Fávaro W J, Nunes O S, Seiva, F R F, et al. Effects of P-MAPA Immunomodulator on Toll-Like Receptors and p53: Potential Therapeutic Strategies for Infectious Diseases and Cancer. *Infect Agents Cancer*, v.7, p.14. 2012.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 .*Int J Cancer*136(5):E359-86, 2015.
- Ferrandina G, Zannoni GF, Martinelli E et al. Class III beta-tubulin overexpression is a marker of poor clinical outcome in advanced ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res*, v.12(9), p.2774–9, 2006.
- Fu Y, Lee AS. Glucose regulated proteins in cancer progression, drug resistance and immunotherapy. *Cancer Biol Ther*, v.5(7), p.741-4, 2006.
- Galli R, Starace D, Busa R et al. TLR stimulation of prostate tumor cells induces chemokine-mediated recruitment of specific immune cell types. *J Immunol*, v.184, p.6658-69, 2010.
- Gan PP, Kavallaris M. Tubulin-targeted drug action: functional significance of class II and class IVb beta-tubulin in vinca alkaloid sensitivity. *Cancer Res*, v. 68(23), p.9817–24, 2008.
- Gan PP, McCarroll JA, Byrne FL et al. Specific b-tubulin isotypes can functionally enhance or diminish epothilone B sensitivity in non- small cell lung cancer cells. *PLoS One*, v. 6(6), p. 21717, 2011.
- Garcia PV, Apolinário LM, Bockelmann PK et al. 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. *Int J Clin Exp Pathol*, v.8(5), p.4427-43, 2015.
- Garcia PV, Seiva FRF, Carniatol AP 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*, v.16(422), p. 2-18, 2016.

- Gertz MA. Immunoglobulin light chain amyloidosis: 2013 update on diagnosis, prognosis, and treatment. *Am. J. Hematol*, v. 88 (5), p. 416–25, 2013.
- Giarnieri E, De Francesco GP, Carico E et al. α - and β -tubulin Expression in Rectal Cancer Development. *Anticancer Research*, v. 25, n. 5, p. 3237–41, 2005.
- Gottardis MM & Jordan VC. Antitumor actions of Keoxifene and Tamoxifen in NNitrosomethylurea- induced Rat Mammary Carcinoma Model. *Cancer Res*, v.47, p.4020-27, 1987.
- Graven KK, Bellur D, Klahn BD et al. HIF-2alpha regulates glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression in endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*, v.1626(1-3), p.10-8, 2003.
- Harada N, Yasunaga R, Higashimura Y et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase enhances transcriptional activity of androgen receptor in prostate cancer cells. *J Biol Chem*. V.282, p.22651–661, 2007.
- Higashimura Y, Nakajima Y, Yamaji R et al. Up-regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression by HIF-1 activity depending on Sp1 in hypoxic breast cancer cells. *Arch Biochem Biophys*, v. 509(1), p.1-8, 2011.
- Jego G, Bataille R, Geffroy LA et al. Pathogen-associated molecular patterns are growth and survival factors for human myeloma cells through Toll-like receptors. *Leukemia*, v.20, p.1130–37, 2006.
- Jemal A, Center MM, De Santis C, Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v.19, p.1893-907, 2010.
- Jeney V, Balla G, Balla J. Red blood cell, hemoglobin and heme in the progression of atherosclerosis. *Frontiers in Physiol*, v. 5, p. 379, 2014.
- Joe PA, Banerjee A, Luduena RF. The roles of cys124 and ser239 in the functional properties of human beta III tubulin. *Cell Motil Cytoskeleton*, v.65(6), p.476–86, 2008.
- Joseph P, Lei YX, Whong WZ et al. Oncogenic potential of mouse translation elongation factor-1 delta, a novel cadmium-responsive proto-oncogene. *J Biol Chem*, v. 277, p. 6131–36, 2002.
- Justo GZ, Durán N, Queiroz MLS. Natural killer cell activity, lymphocyte proliferation and cytokines profile in tupour-bearing mice treated with MAPA, a magnesium aggregated polymer from *Aspergillus orizae*. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, v.25, p.305–19, 2003.
- Kah WL, Ihor Y, Min J et al. Phosphorylation of eEF1A1 at Ser300 by T β R-I Results in Inhibition of mRNA Translation. *Curr Biol*, v.20, p.1615-25, 2010.
- 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 Res*, v.2, p.335-44, 2000.
- Kavallaris M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat Rev Cancer*, v.10(3), p.194–204, 2010.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, v.26, p.239–57, 1972.
- Killeen SD, Wang JH, Andrews EJ et al. Exploitation of the Toll-like receptor system in cancer: a doubled-edged sword? *Br J Cancer*, v. 95, p.247–52, 2006.
- Kim SY, Laxmi YR, Suzuki N et al. Formation of tamoxifen-DNA adducts via O-sulfonation, not Oacetylation, of alpha-hydroxytamoxifen in rat and human livers. *Drug Metab Dispos*, v.33, p.1673-8, 2005.
- Kim DK, Kim DW, Kim SW et al. Ki67 Antigen as a Predictive Factor for Prognosis of Sinonasal Mucosal Melanoma. *Clinical and Experimental Otorhinolaryngology*, v 1(4), p. 206–10 2008.
- Knowles HJ, Harris AL. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Hypoxia and tumourigenesis. *Breast Cancer Res*, v.3, p.318–22, 2001.
- Kojetin DJ, Burris TP, Jensen EV et al. Implications of the binding of tamoxifen to the coactivator recognition site of the estrogen receptor. *Endocr Relat Cancer*, v.15, p.851-70, 2008.
- Krüger K, Stefansson IM, Collett K et al. Microvessel proliferation by co-expression of endothelial nestin and Ki-67 is associated with a basal-like phenotype and aggressive features in breast cancer. *Breast*, v.22, p.282-88, 2013.
- Kumar N, Flavin M. Preferential action of a brain detyrosinolytic carboxypeptidase on polymerized tubulin. *J Biol Chem*, v.256(14), p.7678–86, 1981.
- Rondón-Lagos M, Villegas EV, Rangel N et al. Tamoxifen Resistance: Emerging Molecular Targets. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17 (8), 2016.
- Levin S, Bucci TJ, Cohen SM et al. The nomenclature of cell death: recommendations of an ad hoc Committee of the Society of Toxicologic Pathologists. *Toxicol Pathol*, v.27(4), p.484-90, 1999.
- Li XL, Eishi Y, Bai YQ et al. Expression of the SRY-related HMG box protein SOX2 in human gastric carcinoma. *Int J Oncol*, v. 24, p. 257–63, 2004.
- Liu L, Zeng M, Stamler JS. “Hemoglobin induction in mouse macrophages,” *Proc National Acad Sci USA*, v. 96(12), p. 6643– 47, 1999.
- Lo PK, Sukumar S. Epigenomics and breast cancer. *Pharmacogenomics*, v.9, p.1879-902, 2008.
- Lu S , Gu X , Hoestje S et al. Identification of an additional hypoxia responsive element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter. *Biochim Biophys*

- Acta, v.1574(2), p.152-6, 2002.
- Lu H, Yang Y, Gad E, 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*, 17(1), p. 67–76, 2011.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A et al. Cancer-related inflammation. *Nature*, v.454(7203), p.436-44, 2008.
- McCarroll JA, Gan PP, Liu M et al. Beta III-tubulin is a multifunctional protein involved in drug sensitivity and tumorigenesis in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, v.70(12), p.4995–03, 2010.
- Melo A, Justo GZ, Queiroz MLS. Stimulation of myelopoiesis in *Listeria monocytogenes*-infected mice by an aggregated polymer isolated from *Aspergillus oryzae*. *Human Exp Toxicol*, v.20, p.38–45, 2001.
- 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*, v. 130 (4), p. 765-74, 2012.
- Ni M, Lee AS. ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett*. 581(19), p.3641-51, 2007.
- Nishi H, Inagi R, Kato H et al. “Hemoglobin is expressed by mesangial cells and reduces oxidant stress,” *J Am Soc Neph*, v.19 (8), p. 1500–08, 2008.
- Orosz F, Santamaria B, Ovadi J et al. Phosphofructokinase from *Dic- tyostelium discoideum* is a potent inhibitor of tubulin polymerization. *Biochemistry*, v. 38(6), p.1857–65, 1999.
- Park S, Yoon SY, Kim K-E, Lee HR, Hur DY, Song H, et al. Interleukin-18 induces transferrin expression in breast cancer cell line MCF-7. *Cancer Letters*. V. 286(2), p. 189–95. 2009.
- Parker AL, Kavallaris M, McCarroll JA. Microtubules and Their Role in Cellular Stress in Cancer. *Frontiers in Oncology*, v.4, p.153, 2014.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J et al. Global cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin*, v.55, p.74-108, 2005.
- Quinlan GJ, Mumby S, Martin GS, et al. Albumin influences total plasma antioxidant capacity favorably in patients with acute lung injury. *Crit Care Med*, v.32, p.755–9, 2004.
- Raspaglio G, Filippetti F, Prislei S et al. Hypoxia induces class III beta-tubulin gene expression by HIF-1 alpha binding to its 3' flanking region. *Gene*, v. 409(1–2), p.100–8, 2008.
- Rodriguez SMP, Sarrio D, Moreno-Bueno G et al. Sox2: a possible driver of the basal-like phenotype in sporadic breast cancer. *Mod Pathol*, v.20, p. 474–81, 2007.

- Russo J, Russo IH. Atlas and histologic classification of tumors of the rat mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, v.5, p.187-200, 2000.
- Russo J, Russo IH. *Molecular Basis of Breast Cancer: Prevention and Treatment*. Ed. Springer, p.1-439, 2004.
- Saha D, Patgaonkar M, Shroff A et al. Hemoglobin Expression in Nonerythroid Cells: Novel or Ubiquitous?, *Intern J Inflammation*, p. 1-8, 2014.
- Said HM, Staab A, Hagemann C et al. Distinct patterns of hypoxic expression of carbonic anhydrase IX (CA IX) in human malignant glioma cell lines. *J Neurooncol*, v. 81, p. 27–38, 2007.
- Said HM, Polat B, Hagemann C et al. Absence of GAPDH regulation in tumor-cells of different origin under hypoxic conditions in - vitro. *BMC Res Notes*, p. 2-8, 2009.
- Saks VA, Kuznetsov AV, Khuchua ZA et al. Control of cellular respiration in-vivo by mitochondrial outer-membrane and by creatine-kinase – a new speculative hypothesis – possible involvement of mitochondrial-cytoskeleton interactions. *J Mol Cell Cardiol*, v.27(1), p.625–45, 1995.
- Sanada Y, Yoshida K, Ohara M et al. Histopathologic evaluation of stepwise progression of pancreatic carcinoma with immunohistochemical analysis of gastric epithelial transcription factor SOX2: comparison of expression patterns between invasive components and cancerous or nonneoplastic intraductal components. *Pancreas*, v.32, p.164–70, 2006.
- Sattler HP, Lensch R, Rohde V et al. Novel amplification unit at chromosome 3q25-q27 in human prostate cancer. *Prostate*, v. 45, p. 207–15, 2000.
- Schroeder HW Jr, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 125 (2), p. 41–52, 2010.
- Setoyama H, Tanaka, M, Nagumo K et al. Oral branched-chain amino acid granules improve structure and function of human serum albumin in cirrhotic patients. *J Gastroenterol*, p. 1–12, 2016.
- 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 Res*, p.18:99, 2016.
- Snedeker SM. Pesticides and breast cancer risk: a review of DDT, DDE, and dieldrin. *Environ Health Perspect*, v.109, p.35-47. 2001.
- Tolosano E, Altruda F. Hemopexin: Structure, Function, and Regulation. *DNA and Cell Biol*, v. 21(4), p.297–06, 2002.
- Tomlinson VA, Newbery HJ, Wray NR et al. Translation elongation factor eEF1A2 is a potential oncoprotein that is overexpressed in two-thirds of breast tumours. *BMC Cancer*, v.5, p.113, 2005.
- Tommila M, Stark C, Jokilammi A et al. Hemoglobin expression in rat experimental

- granulation tissue. *J Mol Cell Biol*, v.3(3), p.190-6, 2010.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL et al. Global cancer statistics, 2012, *CA Cancer J Clin*, v.65(2), p.87-108, 2015.
- Traboulsi T, El Ezzy M, Gleason JL, Mader S. Antiestrogens: structure-activity relationships and use in breast cancer treatment. *J Mol Endocrinol*, v. 58(1), p. 15-31, 2016
- Vertessy BG, Bankfalvi D, Kovacs J et al. Pyruvate kinase as a microtubule destabilizing factor in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, v.254(2), p.430–5, 1999.
- Vyhlidal C, Li X, Safe S. Estrogen regulation of transferrin gene expression in MCF-7 human breast cancer cells, *J. Mol. Endocrinol*, v. 29, p.305–17, 2002.
- Wang Q, He Z, Zhang J, et al. Overexpression of endoplasmic reticulum molecular chaperone GRP94 and GRP78 in human lung cancer tissues and its significance. *Cancer Detect Prev*, v.29(6), p.544-51, 2005.
- White INH. The tamoxifen dilemma. *Carcinogenesis*, v.20, p.1153-60, 1999.
- Wong, RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, v. 30 (1), p. 87, 2011.
- Xing X, Lai M, Wang Y, Xu E, Huang Q. Overexpression of glucose-regulated protein 78 in colon cancer. *Clin Chim Acta*, v.364(1-2), p.308-15, 2006.
- Yamaji R, Chatani E, Harada N et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the extracellular space inhibits cell spreading. *Biochim Biophys Acta*, v. 1726, p. 261–71, 2005.
- Yusuff N, Nasti TH, Long JA et al. Protective role of Toll-like receptor 4 during the initiation stage of cutaneous chemical carcinogenesis. *Cancer Res*, v.68, p.615–22, 2008.
- Zhang J, Jiang Y, Jia Z, et al. Association of elevated GRP78 expression with increased lymph node metastasis and poor prognosis in patients with gastric cancer. *Clin Exp Metastasis*, v.23(7-8), p.401-10, 2006.
- Zhang L, Li Y, Lan L 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. *Mol cell Endocrinol*, v.437, p. 51-61, 2016.

6 Anexos

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



UNESP

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA





CEUA
Comissão de Ética no Uso de Animais



Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012

Certificado

CERTIFICAMOS que o (Protocolo CEUA 1027-2013) "Avaliação histopatológica e molecular da Imunoterapia com P-MAPA associada ao Tamoxifeno na progressão do câncer de mama induzido quimicamente em ratos Sprague-Dawley", a ser conduzido por Joyce Regina Zapaterini, orientada pelo Prof. Dr. Luis Fernando Barbison, Co-orientada pelo Prof. Dr. Wagner José Fávero, está de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, com a ressalva de que os "ratos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.



Prof. Dr. Katashi Okoshi
Presidente da CEUA



Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEUA

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 25/07/2013

Distrito Rubião Júnior, s/nº - Botucatu - S. P. CEP: 18.618-970 Fone: (14) 3880-1608/3880-1609 e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

P68035	Actin, alpha cardiac muscle 1	0.96 1	0.120	0.98 0	0.240	0.93 2	0.020	0.970	0.140	0.91 4	0.000
P68136	Actin, alpha skeletal muscle	0.96 1	0.090	0.98 0	0.300	0.93 2	0.000	0.970	0.170	0.91 4	0.000
P62738	Actin, aortic smooth muscle	0.95 1	0.050	0.98 0	0.280	0.93 2	0.010	0.961	0.160	0.92 3	0.020
P60711	Actin, cytoplasmic 1	0.95 1	0.010	1.04 1	0.910	0.99 0	0.300	1.041	0.890	0.92 3	0.020
P63259	Actin, cytoplasmic 2	0.93 2	0.000	1.03 0	0.820	0.97 0	0.080	1.030	0.860	0.92 3	0.000
V9GZ85	Actin, cytoplasmic 2 (Fragment)	0.94 2	0.010	1.03 0	0.910	0.99 0	0.350	1.041	0.860	0.91 4	0.010
P63269	Actin, gamma-enteric smooth muscle	0.96 1	0.100	0.99 0	0.340	0.94 2	0.020	0.970	0.160	0.91 4	0.000
P61212	ADP-ribosylation factor-like protein 1					G4	G4				
P14046	Alpha-1-inhibitor 3			G3	G3			G5	G5	G6	G6
F1LM19	Alpha-2-HS-glycoprotein					G4	G4			G6	G6
P24090	Alpha-2-HS-glycoprotein					G4	G4	G5	G5	G6	G6
P04764	Alpha-enolase	1.16 2	0.870	1.11 6	0.740	G1	G1	G5	G5		
P07150	Annexin A1	G1	G1	G1	G1	G1	G1				
P02650	Apolipoprotein E			G3	G3			G5	G5		
P29419	ATP synthase subunit e, mitochondrial									G6	G6
B0K019	BAG family molecular chaperone regulator 1									G6	G6
F1LRM5	BAG family molecular chaperone regulator 1 (Fragment)									G6	G6
D4A7E1	Basic leucine zipper transcriptional factor ATF-like							G5	G5		
Q32ZH5	Beta-defensin 17							G7	G7	G7	G7

F1M907	Disks large homolog 2 (Fragment)	G2	G2								
Q8CJB9	E3 ubiquitin-protein ligase BRE1B							G5	G5		
D3ZXS6	Elongation factor 1-alpha	1.16 2	0.960	1.20 9	0.970	1.32 3	1.000				
M0R757	Elongation factor 1-alpha	1.16 2	0.940	1.20 9	0.990	1.32 3	1.000				
M0RAS8	Elongation factor 1-alpha (Fragment)	1.16 2	0.920	1.22 1	0.970	1.35 0	1.000				
F1M6C2	Elongation factor 1-alpha (Fragment)	1.17 4	0.920	1.23 4	1.000	1.32 3	0.990				
P62630	Elongation factor 1-alpha 1	1.17 4	0.960	1.20 9	0.980	1.33 6	1.000				
P62632	Elongation factor 1-alpha 2	1.15 0	0.900	1.19 7	0.960	1.29 7	0.990				
A0A0A0MY 09	Endoplasmin					G4	G4				
Q66HD0	Endoplasmin					G4	G4				
D3ZYU0	Enolase			G3	G3						
P54757	Ephrin type-A receptor 5							G5	G5		
O88752	Epsilon 1 globin	0.55 4	0.000	0.49 7	0.000	0.54 9	0.000	0.571	0.000	1.69 9	1.000
Q8K3M6	ERC protein 2					G4	G4				
Q9JMA8	Exostoses (Multiple)-like 3, isoform CRA_a							G5	G5	G6	G6
Q5XFV4	Fabp4 protein							G5	G5	G6	G6
P70623	Fatty acid-binding protein, adipocyte							G5	G5	G6	G6
P36364	Fibroblast growth factor 9	G2	G2								
P51145	Fos-related antigen 2			G3	G3						
P19112	Fructose-1,6-bisphosphatase 1							G5	G5		
Q6AY07	Fructose-bisphosphate aldolase			G3	G3						

P05065	Fructose-bisphosphate aldolase A			G3	G3						
G3V871	Gastrin releasing peptide, isoform CRA_a			G3	G3						
P24393	Gastrin-releasing peptide			G3	G3						
D3ZT90	Glutaryl-Coenzyme A dehydrogenase (Predicted)	G1	G1	G1	G1	G1	G1				
P04906	Glutathione S-transferase P					G4	G4				
B1WBQ8	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.05 1	0.650	0.74 1	0.010	0.91 4	0.260				
MOR660	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.03 0	0.580	0.77 9	0.010	0.96 1	0.410			G6	G6
E9PTV9	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase			G3	G3						
MOR590	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.03 0	0.610	0.77 1	0.010	0.96 1	0.350			G6	G6
D3ZGY4	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.04 1	0.630	0.77 1	0.050	0.97 0	0.430			G6	G6
E9PTN6	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.05 1	0.640	0.79 5	0.020	0.99 0	0.480			G6	G6
D4A3W5	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G2	G2	G3	G3						
P04797	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.02 0	0.580	0.76 3	0.020	0.97 0	0.460			G6	G6
MOR451	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.06 2	0.620	0.88 7	0.300					G6	G6
D3ZKR3	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.17 4	0.710	0.86 9	0.330	G1	G1				
F1M4D1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.09 4	0.660	0.78 7	0.270	G1	G1			G6	G6
F1LTU2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Fragment)	1.18 5	0.700	0.86 9	0.310	G1	G1			G6	G6
F1LUI2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.16	0.690	0.82	0.220	G1	G1				

	(Fragment)	2		7							
D3ZDX2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Fragment)			G3	G3						
F1M1E8	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Fragment)	G2	G2	G3	G3	G4	G4				
Q9ESV6	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, testis-specific	1.07 3	0.670	0.76 3	0.070	0.97 0	0.390				
O35077	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic							G5	G5		
P97567	Growth hormone releasing hormone, isoform CRA_a	G2	G2								
P55063	Heat shock 70 kDa protein 1-like	G1	G1	0.92 3	0.300	0.99 0	0.480	G7	G7	G7	G7
Q07439	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	G1	G1	0.93 2	0.280	0.99 0	0.490	G7	G7	G7	G7
P63018	Heat shock cognate 71 kDa protein	1.02 0	0.540	0.90 5	0.130	1.06 2	0.780	5.755	1.000	1.12 7	0.850
M0R8M9	Heat shock cognate 71 kDa protein	1.02 0	0.630	0.90 5	0.110	1.06 2	0.730	5.755	1.000	1.07 3	0.680
Q5XHZ0	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial			G3	G3						
P82995	Heat shock protein HSP 90-alpha	1.20 9	0.870	2.01 4	1.000	1.08 3	0.630				
P34058	Heat shock protein HSP 90-beta	1.17 4	0.920	0.91 4	0.270	1.06 2	0.730				
P14659	Heat shock-related 70 kDa protein 2	G1	G1	0.97 0	0.400	1.03 0	0.580	1.127	0.630	0.99 0	0.500
P01946	Hemoglobin subunit alpha-1/2	G2	G2	G3	G3	G4	G4	0.631	0.000	1.53 7	1.000
P02091	Hemoglobin subunit beta-1	0.56	0.000	0.48	0.000	0.54	0.000	0.607	0.000	1.64	1.000

		6		7		3				9	
P11517	Hemoglobin subunit beta-2	0.54 3	0.000	0.49 2	0.000	0.54 9	0.000	0.577	0.000	1.73 3	1.000
P20059	Hemopexin	G1	G1	1.20 9	0.930	1.05 1	0.660	1.751	1.000	0.74 1	0.000
B2GV65	HIG1 domain family, member 2A									G6	G6
Q6I8Q6	Histone H2A									G6	G6
D3ZWE0	Histone H2A									G6	G6
D3ZVK7	Histone H2A									G6	G6
D3ZXP3	Histone H2A									G6	G6
D4ACV3	Histone H2A									G6	G6
MORDM4	Histone H2A									G6	G6
D4AEC0	Histone H2A									G6	G6
G3V9C0	Histone H2A									G6	G6
MORCL5	Histone H2A									G6	G6
P02262	Histone H2A type 1									G6	G6
P0C169	Histone H2A type 1-C									G6	G6
P0C170	Histone H2A type 1-E									G6	G6
Q64598	Histone H2A type 1-F									G6	G6
P0CC09	Histone H2A type 2-A									G6	G6
Q4FZT6	Histone H2A type 3									G6	G6
Q00728	Histone H2A type 4									G6	G6
A9UMV8	Histone H2A.J									G6	G6
P0C0S7	Histone H2A.Z									G6	G6
A0A0A0MX W3	Histone H2A.Z (Fragment)									G6	G6
D4A426	Homeo box B2 (Predicted)							G5	G5		
P20759	Ig gamma-1 chain C region									G6	G6
P20760	Ig gamma-2A chain C region			G3	G3	G4	G4	2.014	1.000	0.86	0.110

											1	
P20767	Ig lambda-2 chain C region			G3	G3							
Q9QXN4	Inositol oxygenase					G4	G4					
P01322	Insulin-1			G3	G3							
G3V8K9	Interleukin 17B, isoform CRA_a							G5	G5			
Q2PS20	Junctophilin-2					G4	G4					
P04468	Kappa-casein					G4	G4					
Q6IFW5	Keratin, type I cytoskeletal 12			G3	G3							
D4A931	Keratin, type I cytoskeletal 12			G3	G3							
Q6IFV4	Keratin, type I cytoskeletal 13					G4	G4					
Q5BJY9	Keratin, type I cytoskeletal 18					G4	G4					
Q63279	Keratin, type I cytoskeletal 19			G3	G3	G4	G4					
Q10758	Keratin, type II cytoskeletal 8					G4	G4					
P85411	Keratinocyte differentiation-associated protein	G2	G2									
P04642	L-lactate dehydrogenase A chain	1.17 4	0.850	1.07 3	0.640	1.01 0	0.520					
P42123	L-lactate dehydrogenase B chain	1.16 2	0.800	1.05 1	0.670	G1	G1					
Q3MID2	Leukotriene-B(4) omega-hydroxylase 2	G2	G2									
F1M7K8	Leukotriene-B(4) omega-hydroxylase 2	G2	G2									
Q6TXG4	LRRGT00035			G3	G3							
Q6TXE8	LRRGT00051			G3	G3							
Q6QI82	LRRGT00126					3.97 5	0.980					
Q6QI43	LRRGT00165					G4	G4					
P51886	Lumican							1.259	1.000	0.93 2	0.100	
P51672	Lymphotactin	G1	G1	G1	G1	G1	G1					

P30904	Macrophage migration inhibitory factor							G5	G5		
B2RZ56	Mediator complex subunit 27					G4	G4				
D3ZHV3	Metallothionein							G7	G7	G7	G7
P04355	Metallothionein-2							G7	G7	G7	G7
Q5XIG9	Mitochondrial protein 18 kDa							G7	G7	G7	G7
O70540	Mucosal addressin cell adhesion molecule 1					G4	G4				
Q03626	Murinoglobulin-1							G5	G5	G6	G6
Q6IE52	Murinoglobulin-2			G3	G3			G5	G5		
M0R5V7	Murinoglobulin-2 (Fragment)							G5	G5	G6	G6
Q68FX9	NAD-dependent protein deacylase sirtuin-5, mitochondrial	G1	G1	G1	G1	G1	G1				
Q63374	Neurexin-2							G5	G5		
B0BN27	Neuromedin B (Predicted), isoform CRA_d							G7	G7	G7	G7
Q5H8A2	Neuromedin-S									G6	G6
D3ZG29	Olfactory receptor	G2	G2								
D4AAR1	Olfactory receptor							G5	G5		
P63014	Paired mesoderm homeobox protein 1			G3	G3						
Q5PR01	Pancreatic progenitor cell differentiation and proliferation factor	G1	G1	G1	G1	G1	G1				
F1M9X2	Pancreatic secretory granule membrane major glycoprotein GP2			G3	G3	G4	G4				
P19218	Pancreatic secretory granule membrane major glycoprotein GP2			G3	G3	G4	G4				
P10111	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	1.15 0	0.900	0.93 2	0.150	1.09 4	0.830	G5	G5	G6	G6
D3ZKJ9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D							G5	G5		
D4AEG3	Peptidylprolyl isomerase (Cyclophilin)-like 4 (Predicted)					G4	G4				
Q63716	Peroxiredoxin-1			G3	G3			G5	G5		

P35704	Peroxiredoxin-2			G3	G3	G4	G4					
D4A2Y9	Peroxisomal biogenesis factor 13 (Predicted)							G5	G5			
Q5XIV1	Phosphoglycerate kinase	G1	G1	G1	G1	G1	G1					
M0R6Y8	Phosphoglycerate kinase	G1	G1	G1	G1	G1	G1					
P16617	Phosphoglycerate kinase 1	G1	G1	G1	G1	G1	G1					
Q5BJP9	Phytanoyl-CoA dioxygenase domain-containing protein 1	G1	G1	G1	G1	G1	G1					
P56223	POU domain, class 6, transcription factor 1			G3	G3							
Q5U317	Pre-mRNA 3'-end-processing factor FIP1	G1	G1	G1	G1	1.13 9	0.800					
Q9JKL9	Prolactin-2B1									G6	G6	
G3V873	Prolactin-2B1									G6	G6	
P81278	Prolactin-releasing peptide						G4	G4				
Q9EQP5	Prolargin									G6	G6	
Q68FZ8	Propionyl coenzyme A carboxylase, beta polypeptide						G4	G4				
P07633	Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial						G4	G4				
D3ZCR8	Protein Aadacl3						G4	G4				
D3ZZQ4	Protein Aamdc	G2	G2									
D3ZRN3	Protein Actbl2	0.97 0	0.320	0.98 0	0.340	0.98 0	0.270	0.980	0.430	0.93 2	0.100	
Q64240	Protein AMBP							G5	G5			
D4A5T6	Protein Arhgap6 (Fragment)						G4	G4				
D3ZC72	Protein Arhgap6 (Fragment)						G4	G4				
A0A096MK A5	Protein Atad2b (Fragment)						G4	G4				
E9PTV4	Protein Bms1	G2	G2									
F1LWY0	Protein Btbd11 (Fragment)						G4	G4				

F1LTT8	Protein C2cd4a					G4	G4				
MORA41	Protein Cc2d2b	G2	G2								
D3ZQU8	Protein Cc2d2b (Fragment)	G2	G2								
D3ZCA4	Protein Cep350					G4	G4				
F1LPD3	Protein Cep350					G4	G4				
Q8K4I6	Protein chibby homolog 1					G4	G4				
D4AAE9	Protein Cisd2			G3	G3						
D3ZYR8	Protein Clca1			G3	G3	G4	G4				
F1M748	Protein Col24a1	G2	G2								
D3Z8B0	Protein Cox16					G4	G4				
D4AA52	Protein Cpamd8			G3	G3			G5	G5	G6	G6
D3ZGC5	Protein Cyp4f37 (Fragment)	G2	G2								
P11598	Protein disulfide-isomerase A3	G1	G1	G1	G1	G1	G1				
D3ZBF1	Protein disulfide-isomerase A4	G2	G2								
MOR793	Protein disulfide-isomerase A4	G2	G2								
D3ZD12	Protein disulfide-isomerase A4	G2	G2								
O88767	Protein DJ-1	G1	G1	0.88 7	0.380	G1	G1				
D4A599	Protein Dnah17 (Fragment)							G5	G5		
F1LRU2	Protein Dnah17 (Fragment)							G5	G5	G6	G6
D4A037	Protein Fam204a									G6	G6
D3ZVI2	Protein Fam208b			G3	G3						
E9PTP5	Protein Fam208b			G3	G3						
D3ZS59	Protein Fbxl22									G6	G6
F1MAM1	Protein Fbxw9									G6	G6
MOR4D1	Protein Fosb			G3	G3						
MOR8R1	Protein Fosb			G3	G3						
D3ZUX2	Protein Glt1d1	G2	G2								
MOR8F9	Protein Gm17555 (Fragment)					G4	G4				

F1M4A7	Protein Gse1 (Fragment)	G2	G2	G3	G3						
F1M019	Protein Gse1 (Fragment)	G2	G2	G3	G3						
Q62669	Protein Hbb-b1	G2	G2					1.174	0.990	1.18 5	0.980
F1LVL2	Protein Icoslg			G3	G3						
D3ZZY7	Protein Kans1l	G2	G2								
M0RCJ8	Protein Krt78			G3	G3						
F1MAC2	Protein Krt78			G3	G3						
F6WET6	Protein LOC100302465 (Fragment)					G4	G4				
F1M3H2	Protein LOC100360367 (Fragment)									G6	G6
D4A7B4	Protein LOC100360611							G7	G7	G7	G7
D4AAQ0	Protein LOC100365061							G7	G7	G7	G7
F1LTA7	Protein LOC100909504 (Fragment)	1.16 2	0.860	0.87 8	0.280	1.05 1	0.630			G6	G6
M0RCV8	Protein LOC100910078							G7	G7	G7	G7
M3ZCQ3	Protein LOC100910765	G2	G2					1.139	0.910	1.19 7	0.970
Q5J3M8	Protein LOC100911688									G6	G6
Q6MGB1	Protein LOC100911800							G5	G5	G6	G6
D4A6E3	Protein LOC100911833							G5	G5	G6	G6
Q6PDV6	Protein LOC100911847							G5	G5		
M0R4X7	Protein LOC100912272			G3	G3						
M0R818	Protein LOC100912736 (Fragment)							G5	G5		
D3ZLZ9	Protein LOC100912795	G2	G2								
M0RCB1	Protein LOC102549957	0.99 0	0.470	0.86 9	0.150	1.05 1	0.690	5.989	1.000	1.09 4	0.740
D3Z9T8	Protein LOC102551265	G1	G1	G1	G1	G1	G1				
F1LZI1	Protein LOC680121	0.98 0	0.480	0.85 2	0.070	1.05 1	0.700	5.697	1.000	1.13 9	0.740

M0R5W1	Protein LOC686660 (Fragment)					G4	G4				
D4A5F3	Protein LOC690276							G7	G7	G7	G7
D3ZFB2	Protein Luc7l3									G6	G6
A0A096MJ2 7	Protein Mdn1 (Fragment)					G4	G4				
D3ZMQ0	Protein Mga	G2	G2			G4	G4				
D4A6F9	Protein Mga	G2	G2								
D4A3X2	Protein Mga	G2	G2								
D3ZJB5	Protein Mga	G2	G2			G4	G4				
D3ZP58	Protein Mga	G2	G2			G4	G4				
F1M051	Protein Mlxip									G6	G6
M0R9L0	Protein Naca	G2	G2								
Q6MG75	Protein Nelfe			0.55 4	0.210	0.91 4	0.510			G6	G6
F1LQR1	Protein NMS									G6	G6
E9PTF3	Protein Noc2l					G4	G4				
D3Z9K8	Protein Nsmce4a			G3	G3						
F1M583	Protein Nwd2			G3	G3						
D3ZY83	Protein Nwd2			G3	G3						
Q4V8A9	Protein O-mannose kinase	G2	G2								
F1M7B5	Protein Oaz2	G1	G1	G1	G1	G1	G1				
D3ZT52	Protein Pbrm1	G1	G1	G1	G1	G1	G1				
D3ZT38	Protein Pbrm1	G1	G1	G1	G1	G1	G1				
D3Z833	Protein Pbrm1	G1	G1	G1	G1	G1	G1				
Q9JKS6	Protein piccolo							G5	G5		
Q5FAQ9	Protein Rassf1							G7	G7	G7	G7
D3Z8R4	Protein Rbm25l1	7.46 3	1.000	1.76 8	0.960	G1	G1				
D4A823	Protein Rdm1	G1	G1	G1	G1	G1	G1				

F1MA78	Protein Reps2								G5	G5		
F1M0T5	Protein Reps2 (Fragment)								G5	G5		
D3ZCN9	Protein RGD1560073										G6	G6
D3ZAP6	Protein RGD1563056								G7	G7	G7	G7
MORBK6	Protein Sall4						G4	G4				
MORDM1	Protein Sall4						G4	G4				
MOR9L3	Protein Snx9 (Fragment)								G5	G5		
D3ZCZ0	Protein Spns3								G5	G5		
D3ZTR4	Protein Sumf2			G3	G3							
D3ZQS5	Protein Svl						G4	G4				
F1M155	Protein Svl						G4	G4				
D3ZEZ9	Protein Svl						G4	G4				
F1M9K1	Protein Tp53bp1								G5	G5		
D3ZKQ9	Protein Tp53bp1								G5	G5		
F1M842	Protein Tp53bp1 (Fragment)								G5	G5		
MOR8B6	Protein Tubb1	G2	G2									
B4F7C2	Protein Tubb4a	1.07 3	0.650	1.02 0	0.520		G1	G1				
Q4QQV0	Protein Tubb6	1.04 1	0.590	1.07 3	0.620							
MOR685	Protein Ulk4						G4	G4				
D4ADQ0	Protein Ulk4						G4	G4				
D4ABC3	Protein Ulk4						G4	G4				
D3Z875	Protein Ulk4						G4	G4				
D3ZSS4	Protein Ulk4						G4	G4				
E9PT57	Protein Vom2r31								G5	G5		
F1MAT0	Protein Vom2r52						G4	G4				
Q6AYA2	Protein Vrk1								G5	G5		
D4A3Q0	Protein Vstm2b	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1				

P02770	Serum albumin	1.18 5	1.000	0.62 5	0.000	1.11 6	1.000	1.522	1.000	0.87 8	0.000
O35412	Signal-induced proliferation-associated 1-like protein 1							G5	G5		
Q9QZM6	Sodium/potassium/calcium exchanger 1			G3	G3						
P09916	Somatoliberein	G2	G2								
P34978	Thromboxane A2 receptor					G4	G4				
P51514	Transcription factor 12			G3	G3						
Q5XFX0	Transgelin-2			G3	G3						
P50137	Transketolase					G4	G4				
G3V826	Transketolase					G4	G4				
D4A601	Translational activator of cytochrome c oxidase 1							G7	G7	G7	G7
D3ZTX0	Transmembrane emp24 domain-containing protein 7									G6	G6
Q2TA63	Transmembrane protein 147	G1	G1	G1	G1	G1	G1				
P48500	Triosephosphate isomerase					G4	G4				
Q5EB66	Triple QxxK/R motif-containing protein							G5	G5		
P68370	Tubulin alpha-1A chain			G3	G3	G4	G4				
Q6P9V9	Tubulin alpha-1B chain			G3	G3	G4	G4				
Q6AYZ1	Tubulin alpha-1C chain			G3	G3	G4	G4				
P85108	Tubulin beta-2A chain	1.13 9	0.860	1.11 6	0.730	G1	G1				
Q3KRE8	Tubulin beta-2B chain	1.17 4	0.810	1.12 7	0.760	G1	G1				
Q4QRB4	Tubulin beta-3 chain	1.12 7	0.840	1.08 3	0.740	G1	G1				
Q6P9T8	Tubulin beta-4B chain	0.12 2	0.010	0.11 4	0.010	G1	G1				

P69897	Tubulin beta-5 chain	1.17 4	0.840	1.12 7	0.830	G1	G1				
F1M825	Tubulin-specific chaperone A (Fragment)									G6	G6
P31000	Vimentin	0.81 1	0.090	G1	G1	0.89 6	0.170				
G3V8C3	Vimentin	0.79 5	0.010	G1	G1	0.87 8	0.130				
Q7TMD5	Zinc finger CCCH domain-containing protein 14									G6	G6
Q6TQE1	Zinc finger CCCH domain-containing protein 18					G4	G4				
G3V893	Zinc finger protein 335									G6	G6

G1:DMBA; G2:DMBA+P-MAPA; G3:DMBA+TAM+P-MAPA; G4:DMBA+TAM; G5:P-MAPA; G6:P-MAPA+TAM; G7:VEÍCULOS