

## **AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO ANTÍGENO KI-67 NO ENDOMÉTRIO DE RATAS EM ESTRO PERMANENTE TRATADAS COM RALOXIFENO**

*Lyson Azevedo Aguiar (Bolsista PIBIC/CNPq), Rafael Luz Sousa (Colaborador – UFPI), Camila Mascarenhas Teixeira de Carvalho (Colaborador – UFPI), Benedito Borges da Silva (Orientador – Departamento de Ginecologia UFPI)*

### **Introdução**

Entre os medicamentos mais utilizados no câncer de mama se destacam os moduladores seletivos de receptor de estrogênio (SERMs), que atuam na prevenção de tumores mamários receptor de estrogênio (RE) positivo (PRICHARD, 2003). Os SERMs são compostos que exercem simultaneamente atividades estrogênicas e antiestrogênicas, na dependência do órgão alvo (MORAES et al., 2006). Dentre eles, destacam-se o tamoxifeno e o raloxifeno. Ratas fêmeas que recebem androgênios ao nascimento desenvolvem uma condição denominada estro permanente, em que o endométrio está em constante estimulação estrogênica, sem ação antagonista da progesterona, criando um interessante modelo para estudo do efeito de drogas que atuam por meio dos receptores estrogênicos, como os SERMs, em marcadores biomoleculares, como os de proliferação celular (BARRACLOUGH, 1961). Portanto, tentando corroborar o uso do raloxifeno como uma melhor alternativa na quimioprevenção em pacientes com risco de câncer de mama, sem os efeitos colaterais adversos sobre o endométrio ocasionados pelo tamoxifeno, é que nos propusemos a realizar o presente estudo.

### **Metodologia**

No estudo, foram utilizadas 60 ratas (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia, Mammalia), da linhagem Wistar-Hannover. Todas as ratas foram androgenizadas por meio de uma injeção contendo propionato de testosterona na concentração de 1,25 mg/0,1ml de óleo de milho até o terceiro dia após o nascimento (BARRACLOUGH E GORSKI, 1961; DA SILVA *et al.*, 2002; DA SILVA *et al.*, 2007). Somente os animais em estado de estro permanente, avaliado pela oclusão da porção do terço distal da vagina, foram utilizados. Aos noventa dias de vida, os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos de 20 animais: Grupo I (controle ou placebo) que receberam 0,5 ml de água destilada e o Grupo II (Experimental) que receberam 750µcg de raloxifeno diluídos em 0,5 ml de água destilada, diariamente, por 30 dias consecutivos. Após os 30 dias, 10 ratas de cada grupo foram eutanasiadas e o útero foi retirado para a avaliação endometrial. A avaliação imunohistoquímica com o marcador Ki-67 foi realizada usando o sistema de detecção Envision (Dako, USA), em combinação com um método de recuperação antigênica. Para a contagem das células em proliferação, utilizou-se o software Imagelab® 2.3 para captura e análise de imagem, desenvolvido pela Softium Informática Ltda., e um microscópio óptico Nikon Eclipse E400 acoplado a uma vídeo-câmera digital Samsung colorida modelo SCC-131, ambos pertencentes ao Setor de Mastologia da Clínica Ginecológica do Hospital Getúlio Vargas da UFPI. As áreas de maior concentração de células foram selecionadas com aumento de 40X, então se procedeu à captura da imagem e contagem manual de células coradas em aumento de 200X, em dez campos aleatórios por lâmina, utilizando o sistema de análise de imagens Imagelab®.

### **Resultados e discussão**

À microscopia ótica, as células endometriais coletadas dos animais do grupo I (controle) tiveram uma forte expressão do Ki-67, com uma maior concentração de núcleos fortemente corados em marrom com o anticorpo MIB-5, em comparação às células endometriais dos animais do grupo II (raloxifeno). O estudo quantitativo mostrou que os valores da porcentagem média dos núcleos corados com o MIB-5 no grupo I (controle) foi de  $12.03 \pm 1.09$  e estatisticamente diferente em comparação ao grupo II ( $p < 0,0001$ ), no qual a porcentagem foi de  $3.72 \pm 0.34$ .

**Tabela 1.** Porcentagem média e erro padrão dos núcleos corados com Ki-67 no endométrio de ratas em estro permanente tratadas com placebo (I) e raloxifeno (II).

GRUPO	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
I	12.03	1.09	10.51	11.82	14.26
II	3.72*	0.34	3.33	3,65	4.58

\*Modelo de regressão Beta ( $p < 0,0001$ ).

O tamoxifeno é um SERM de primeira geração já bem estudado e com efeito antiestrogênico comprovado na mama, sendo aprovado pela Food and Drugs Administration (FDA) para uso na prevenção e no tratamento do câncer de mama receptor de estrogênio (RE) positivo. No entanto, demonstrou efeito proliferativo no endométrio, aumentando o risco de desenvolvimento de adenocarcinoma. Desta forma, surgiu o interesse em novas drogas que possam atuar na quimioprevenção do câncer de mama, como o raloxifeno. Os locais de atividade do raloxifeno mais estudados são o tecido ósseo, a mama e o endométrio. No tecido ósseo, o raloxifeno possui ação agonista estrogênica, diminuindo a reabsorção óssea. Por este efeito, foi aprovado pela FDA para uso de mulheres na pós-menopausa prevenindo fraturas vertebrais e perda da densidade mineral óssea. Na mama, o raloxifeno demonstrou ter o mesmo efeito do tamoxifeno, segundo o Study of Raloxifen and Tamoxifen (STAR), no qual foram comparados os efeitos e a segurança do raloxifeno (60 mg/dia) e do tamoxifeno (20 mg/dia) sobre o risco de câncer invasivo de mama. Ambos promoveram redução de 50%. O mesmo estudo mostrou que a incidência de hiperplasia e câncer de endométrio foi maior nas usuárias de tamoxifeno. Assim, nossos dados foram consistentes com os de outros estudos, indicando que o raloxifeno é capaz de inibir parcialmente a proliferação celular no endométrio e conseqüentemente o risco de desenvolvimento de câncer endometrial. (NELSON et al, 2009; VALIATI et al, 2009).

### Conclusão

O uso de 750µg de raloxifeno reduziu de maneira significativa a proliferação endometrial de ratas fêmeas em estro permanente, conforme indicado na análise imunohistoquímica da expressão do Ki-67, sugerindo que o raloxifeno tem efeito anti-proliferativo em endométrios submetidos à hiperestrogenismo. Desta forma, acreditamos que estes resultados podem proporcionar uma perspectiva mais ampla em estudos que visam considerar o uso do raloxifeno na quimioprevenção do câncer de mama em mulheres pós-menopausa, apesar das limitações relativas à extrapolação dos resultados de estudos em animais para seres humanos.

### Apoio

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão de bolsa de estudos.

Área:

CV ( X )

CHSA ( )

ECET ( )

**Palavras-chave:** raloxifeno, endométrio, estro permanente

#### **Referências Bibliográficas**

BARRACLOUGH CA. **Production of anovulatory, sterile rats by single injections of testosterone propionate.** Endocrinology 1961; 68:62-7.

MORAES, Alexandre Vieira Santos et al. **Effects of combined estrogen and raloxifene therapy on rat endometrium.** Rev. Bras. Ginecol. Obstet. [online]. 2006, vol.28, n.2, pp. 101-106.

NELSON HD, FU R, HUMPHREY L, SMITH ME, GRIFFIN JC, NYGREN P. **Comparative Effectiveness of Medications To Reduce Risk of Primary Breast Cancer in Women.** Comparative Effectiveness Review 2009.

PRICHARD RS; HILL ADK; DIJKA STRA B; MCDERMOTT EW; O'HIGGINS NJ. **The chemoprevention of breast cancer.** British J Surg. 2003; 90:772-83.

VALIATI, B., CAPP, E., EDELWEISS, M.I., DE FREITAS, F.M., WENDER, M.C.O. **Effect of raloxifene and low-dose percutaneous 17 beta-estradiol on menopause symptoms and endometrium - A randomized controlled trial.** Maturitas 2009;62, 81-84.