Inibidores da Aromatase e Cancro da Mama:
Avaliação biológica de novas moléculas esteróides

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Toxicologia Analítica Clínica e Forense

Trabalho realizado sob a orientação de:

Professora Doutora Natércia Aurora Almeida Teixeira

Professora Doutora Georgina Correia-da-Silva

Ana Margarida Azevedo Dias

Setembro, 2009

Agradecimentos

À Prof. Doutora Natércia Teixeira, agradeço toda a atenção com que acompanhou o meu trabalho, a tolerância ao meu horário por vezes mais complicado, a disponibilidade e o contributo enorme para cumprir este objectivo.

À Prof. Doutora Georgina, muito obrigada por me acompanhar neste “regresso” ao laboratório, pelo interesse e apoio em relação a todas as experiências e resultados, pela disponibilidade e boa vontade.

A ambas agradeço todos os conhecimentos, o apoio imenso, a coordenação e o empenho demonstrado em prol do sucesso deste trabalho.

À Prof. Doutora Maria de Lurdes Bastos, com quem tive o primeiro contacto quando me propus a realizar este mestrado. Agradeço todos os conhecimentos transmitidos nas aulas, a forma agradável de comunicar e todos os avisos sobre as exigências inerentes à concretização deste trabalho.

À Doutora Margarida Borges, agradeço todos os conhecimentos transmitidos em relação à citometria de fluxo, o apoio imprescindível na realização de cada experiência, a disponibilidade e a compreensão relativa ao meu tempo mais restrito.

A todas as pessoas do laboratório de bioquímica, pela simpatia com que me receberam. Em especial ao Bruno, à Margarida Cepa, à Soraia e à Cristina por de alguma forma terem contribuído para este trabalho. Muito obrigada também à D.Casimira, à Ana Paula e ao Daniel pelo profissionalismo, disponibilidade e boa disposição.

Agradeço aos meus colegas da Farmácia Pestana, em particular à Dr.ª Ana Pestana não só, pela flexibilidade nos horários, pelas palavras de incentivo, fundamentais em momentos mais difíceis mas, e acima de tudo, pela amizade.

Aos meus pais, agradeço o apoio incondicional, a compreensão nos momentos em que não estive presente, toda a atenção e a incomensurável paciência.

À minha família, agradeço a atenção apesar da distância e da minha falta de presença, obrigada por acreditarem em mim.

Por fim, uma mensagem a todos os amigos, que sempre me disseram que era possível. A todos que acompanharam de perto os períodos mais atribulados e contribuíram para a ultrapassar cada desafio, etapa a etapa, muito obrigada. Em particular à Clara que esteve sempre disponível para ajudar com o cintilador e à Ana F. que participou directamente na etapa informática.

A todos, muito obrigada!

Resumo

Os estrogénios são necessários para o normal crescimento e desenvolvimento de vários tecidos, no entanto, também são responsáveis pela promoção de certos tumores, entre os quais, o da mama. A aromatase é a enzima que catalisa a última etapa na biossíntese de estrogénios sendo um bom alvo terapêutico. A descoberta dos inibidores da aromatase (IAs) resultou da investigação e avaliação da interacção dos substratos naturais com o local activo da enzima. Devido à maior eficácia e melhor perfil de toxicidade os IAs estão a substituir a monoterapia com tamoxifeno, que era o tratamento adjuvante endócrino "gold standard" na maioria das doentes pós-menopáusicas. No entanto, apesar da eficácia e potência também apresentam efeitos secundários e episódios de resistência "*de novo"* e adquirida, o que justifica a pesquisa de novos IAs mais eficazes e selectivos. Neste trabalho foram testadas seis novas moléculas esteróides desenhadas a partir de dois compostos com actividade anti-aromatásica comprovada, desenvolvidos com base na androstenediona, o substrato natural da aromatase. Estudos de actividade anti-aromatásica permitiram avaliar a influência das alterações introduzidas, quer no anel A, com a modificação na posição das insaturações e a estereoquímica em C-3, quer no anel D, com a substituição do grupo carbonilo em C-17 por novos grupos funcionais. Após um ensaio de "screening" em sistemas microssomais placentários, os compostos **18** e **20** mostraram também ser potentes inibidores na linha celular MCF-7aro, uma linha de cancro da mama transfectada com o gene da aromatase. Assim, e na tentativa de observar de que modo os IAs interferem no desenvolvimento do cancro da mama, foram também investigados os efeitos a nível da proliferação e morte celular. Os IAs **18** e **20** diminuem a proliferação celular e induzem morte de modo dependente da dose. O composto **20** revelou uma maior potência de inibição da actividade da aromatase, no entanto, é com o composto **18** que se verifica um efeito mais evidente a nível de morte celular por marcação com corante vital 7-AAD e com anexina-V-PE, um marcador de apoptose. Estas observações foram acompanhadas por alterações morfológicas como, "blebs" de membrana, condensação de cromatina e vacuolização citosólica sugerindo a intervenção de processos de apoptose e autofagia. Os resultados deste trabalho contribuem para o estudo das modificações estruturais mais favoráveis à inibição da aromatase e permitem elucidar sobre o tipo de morte celular induzida por compostos esteróides inibidores da aromatase.

Palavras-chave: cancro da mama, estrogénios, inibidores da aromatase, proliferação celular, morte celular.

Abstract

Estrogens are required for normal growth and development of various tissues, however, are also responsible for promoting certain tumors, like breast tumors.
As aromatase catalyzes the last step in the biosynthesis of estrogens, it is an attractive target for selective inhibition and for decreasing estrogen levels. The discovery of the aromatase inhibitors (AIs) is the result of a research and evaluation of the interaction between natural substrates and enzyme active site. Due to greater efficiency and better toxicity profile, the AIs are replacing tamoxifen adjuvant therapy, considered the "gold standard" treatment in most post-menopausal patients. Despite the efficiency and potency, these compounds have also side effects and "de novo" and acquired resistance, which justify the search for new AIs. This work enabled the evaluation of new six molecules, designed from two compounds with proven anti-aromatase activity developed based on the natural substrate of aromatase, androstendione. It was possible to verify the impact in the ability to inhibit aromatase after the modifications at A-ring, with the alteration in the double bound position, and the C-3 stereochemistry, as well as at the D-ring, with the substitution of the carbonyl group at C-17 by new functional groups. After the screening test in placental microsomes the compounds **18** and **20** showed to be effective inhibitors in MCF-7aro cell line, a breast cancer cell line transfected with the aromatase gene. These compounds were further evaluated for their effect in cell proliferation and cell death. The AIs **18** and **20** reduce cell proliferation and induce cell death in a dose dependent manner. Although compound **20** revealed to be the strongest inhibitor of aromatase, compound **18** was more effective in the induction of cell death, as shown by 7-AAD and by annexin-V-PE, an apoptotic marker. These findings were associated with morphological alterations, as membrane blebbing, chromatin condensation and cytoplasm vacuolization suggesting apoptotic and autophagic processes. The results of this work may contribute to the study of the more relevant structural modifications for the inhibition of aromatase and for the elucidation of the type of cell death induced by steroidal aromatase inhibitors.

Keywords: breast cancer, estrogens, aromatase inhibitors, cell proliferation, cell death.

Índice

Capítulo I. Introdução 1

1. Incidência e factores de risco 2

2. Síntese de Estrogénios 4

3. Receptor de Estrogénios 6

4. Vias de sinalização intracelular 8

5. Aromatase 11

6. Terapia endócrina 15

6.1. Moduladores e inactivadores dos receptores de estrogénio (SERMs e SERDs) 17

6.2. Inibidores da aromatase 21

6.2.1. Inibidores não esteróides da aromatase 23

6.2.2. Inibidores esteróides da aromatase 24

7. Efeitos da terapia endócrina na proliferação e morte celular 25

8. Compostos testados neste estudo 27

9. Objectivo 29

Capítulo II. Parte Experimental 31

Materiais e Métodos 32

1. Materiais 32

2. Preparação de microssomas de placenta 32

3. Ensaio aromatase 33

4. Culturas celulares 33

5. Preparação de soro bovino fetal tratado com carvão e sincronização das células 34

6. Ensaio aromatase em células 34

7. Estudos da morfologia celular 35

8. Estudos de proliferação 36

9. Estudo da viabilidade e morte celular 36

10. Análise Estatística 37

Capítulo III. Resultados 38

1.Avaliação da inibição da actividade da aromatase em microssomas e na linha celular MCF-7aro 39

2. Estudos morfológicos 41

3. Análise da viabilidade, proliferação e morte celular 48

Capítulo IV. Discussão e Conclusões 52

Capítulo V. Referências Bibliográficas 57

Índice de Figuras

Figura 1.
Biossíntese de estrogénios a partir do colesterol. _____5
Figura 2.
Distribuição de RE-α e RE-β no organismo humano._____7
Figura 3.
Vias de sinalização do receptor de estrogénio: NISS (sinalização esteróide iniciada no núcleo) e MISS (sinalização esteróide iniciada na membrana)._____9
Figura 4.
Integração da sinalização genómica e não genómica do RE e "cross-talk" entre os receptores dos factores de crescimento e a activação de cinases na resistência endócrina._____10
Figura 5.
Mecanismo de ligação da androstenediona à aromatase através do heme, hélice I, loop B'C e β-4 sheet._____13
Figura 6.
Estrutura da aromatase._____14
Figura 7.
Mecanismos de acção de estrogénios e principais formas de intervenção terapêutica._16
Figura 8.
Moduladores selectivos dos receptores de estrogénio._____18
Figura 9.
Diferentes estruturas dos RE e recrutamento de co-reguladores por agonistas dos RE e SERMs._____19
Figura 10.
Estrutura química do fulvestrant._____20
Figura 11.
Estruturas químicas de inibidores da aromatase._____22
Figura 12.
Compostos base para síntese de inibidores da aromatase._____28
Figura 13.
Novos compostos sintetizados e testados._____28
Figura 14.
Inibição da actividade da aromatase pelos novos compostos esteróides._____39

Figura 15.
Avaliação da inibição da aromatase em microssomas de placenta humana._____40
Figura 16.
Avaliação da inibição da actividade da aromatase em células MCF-7aro._____41
Figura 17.
Alterações morfológicas das células MCF-7aro tratadas com o composto 18._____42
Figura 18.
Efeitos do composto 18 na morfologia celular avaliados pela
coloração de Giemsa. _____43
Figura 19.
Alterações morfológicas das células MCF-7aro tratadas com o composto 20._____44
Figura 20.
Efeitos do composto 20 na morfologia celular avaliados pela
coloração de Giemsa._____45
Figura 21.
Alterações da morfologia nuclear das células MCF-7aro tratadas com o composto 18
observadas pela coloração de Hoechst. _____46
Figura 22.
Alterações da morfologia nuclear das células MCF-7aro tratadas com composto 20
observadas pela coloração de Hoechst. _____47
Figura 23.
Efeito dos inibidores 18 e 20 na síntese de DNA._____48
Figura 24.
Efeito dos compostos 18 e 20 na viabilidade celular._____49
Figura 25.
Regiões seleccionadas para análise de viabilidade celular e apoptose (R1 e R2)._50
Figura 26.
Marcação das células MCF-7aro, com Anexina V-PE._____51

Índice Tabelas

Tabela 1. Classificação cronológica e química dos inibidores da aromatase._____21

Lista de Abreviaturas e Símbolos

4-OHA	formestano
7-AAD	7-amino-actinomicina D
AF1	função de activação 1
AF2	função de activação 2
AG	aminoglutetimida
AKT	proteína cinase B
AP-1	factor de transcrição
Bcl-2	factor anti-apoptótico
BSA	albumina de soro bovina
DBD	domínio de ligação de DNA
DHEA	dihidroepiandrostenediona
DHEAS	dihidroepiandrostenediona-sulfato
DMSO	dimetilsulfóxido
DTT	ditioteitrol
E_2	17β-estradiol
EGF	factor de crescimento epidérmico E
EGFR	receptor do factor de crescimento epidérmico
ERE	elemento de resposta a estrogénio
FL	detector de fluorescência
FSC	“forward scatter”
G418	geneticina
GFR	receptor de factor de crescimento
GPCRs	receptores acoplados à proteína G
HER2	receptor 2 do factor de crescimento epidérmico humano
IAs	inibidores da aromatase
IGF1	factor de crescimento tipo insulina 1
IGFR1	receptor do factor de crescimento tipo insulina 1
KGF	factor de crescimento de queratinocitos
LBD	domínio de ligação de ligando
LDL	lipoproteinas de baixa densidade
LHRH	hormona libertadora da hormona luteinizante
MAPK	proteína cinase activada por mitogénio
MEM	meio mínimo essencial de Eagle
MISS	sinalização esteróide iniciada na membrana
MMPs	metaloproteínases
MNAR	modulador da acção não genómica do RE
MTA1	gene associado a metástase 1
NISS	sinalização esteróide iniciada no núcleo
PE	ficoeritrina
PI3K	fosfatidilinositol-3 cinase
RE	receptor de estrogénio
REA	relação estrutura actividade
RN	receptores nucleares
ROS	espécies reactivas de oxigénio
RP	receptor de progesterona
SBF	soro bovino fetal

SBFC	soro bovino fetal pré-tratado com carvão activado
SERDs	inactivadores selectivos dos receptores de estrogénio
SERMs	moduladores selectivos dos receptores de estrogénio
Shc	molécula adaptadora de sinalização
Src	co-activador de receptor nuclear
SSC	“side scatter”
TGF-α	factor de crescimento tumoral α
TGF-β	factor de crescimento tumoral β
TKRs	receptores de tirosina cinase
TNF-α	factor de necrose tumoral
TSH	terapia de substituição hormonal
VEGF	factor de crescimento vascular endotelial

Capítulo I

Introdução

I. Introdução

1. Incidência e factores de risco

O cancro da mama é a principal causa de morte relacionada com cancro em mulheres em todo o mundo (1). É a doença mais comum em mulheres na maioria das regiões desenvolvidas ou em desenvolvimento apresentando cerca de um milhão de novos casos por ano (2, 3). Afecta 10-12% da população feminina e contribui com cerca de 500 000 mortes por ano em todo o mundo (4). Estima-se que o aumento de 0.5% na incidência anual a nível mundial resulte em 1,35 milhões de novos casos em 2010 (2).

Em Portugal, entre os anos de 1990 e 2002 observou-se uma inversão na tendência crescente da mortalidade associada ao cancro da mama, havendo uma diminuição de cerca de 2% por ano para mulheres com idades compreendidas entre os 35 e os 74 anos (5). No entanto, e apesar dos avanços no diagnóstico e tratamento, alguns problemas persistem, relacionados com a prevenção, diagnóstico, progressão e recorrência do tumor, tratamento e resistência à terapia. É difícil contornar todos estes problemas visto que o cancro da mama não é uma única doença, mas, um conjunto heterogéneo de subtipos associados a diferentes manifestações clínicas. Entender esta diversidade é a chave para o desenvolvimento de intervenções alvo a nível da prevenção e do tratamento (6).

A investigação progrediu significativamente nas últimas décadas o que resultou num avanço na compreensão da doença e desenvolvimento de novas terapêuticas, mais eficazes e menos tóxicas. A difusão de informação, os avanços médicos e a crescente atenção e tomada de consciência das pessoas, conduziu a diagnósticos precoces que, geralmente, permitem uma regressão completa do tumor ou mesmo a cura. No entanto, com as novas opções de tratamento disponíveis, os clínicos deparam-se com a difícil tarefa de escolher a terapia mais adequada para cada doente [1].

O cancro da mama pode ser estrogénio-dependente ou estrogénio-independente. Os tumores sensíveis a hormonas, são definidos como aqueles em que a expressão dos receptores de estrogénio ou progesterona se encontra acima de um limite detectável pré-estabelecido (7). Doentes com expressão inferior a este valor estabelecido são considerados receptor hormonal negativo ou independente (8).

Os estrogénios são necessários para o normal crescimento e desenvolvimento de vários tecidos, no entanto, também são responsáveis pela promoção de certos tumores, na próstata, no endométrio e, especialmente, na mama. De facto, 30 a 50% dos cancros da mama são estrogénio-dependente, e a sua regressão pode ser alcançada com a diminuição dos níveis séricos e tecidulares de estrogénio. A maior incidência de cancro

da mama verifica-se em mulheres pós-menopáusicas, aquelas em que a função dos ovários e o controlo hipofisário de produção de estrogénios cessaram (9, 10).

São muitos os estudos que sugerem que a exposição a estrogénios aumenta o risco de cancro da mama, aumentando, assim, o risco com a persistência dos teores elevados de estrogénios séricos. Factores de risco associados a cancro da mama, incluem, para além da idade e género, a idade da primeira menstruação, da primeira gravidez e da menopausa, consumo de álcool, obesidade, exposição a estrogénios exógenos, como terapia de substituição hormonal e uso de contraceptivos orais (11). Os químicos, presentes no ambiente, que afectam o sistema endócrino do organismo, também são potenciais carcinogénios, por funcionarem como estrogénios ou por interromperem o metabolismo natural destes compostos (2). A etiologia precisa do cancro da mama é desconhecida, no entanto a história familiar é um factor de risco determinante, que implica factores hereditários (6).

A relação entre estrogénios e cancro da mama sugere que estratégias anti-estrogénio apresentam grande potencial como agentes terapêuticos (12). De facto, terapias hormonais revelaram-se como importantes ferramentas no tratamento de cancro da mama estrogénio-dependente (13). Assim, diminuir os níveis de estrogénio, por inibição da sua síntese, ou bloqueando a expressão genética mediada por estes, são as primeiras hipóteses de terapia em doentes com cancro da mama estrogénio-dependente (14). Em particular a inibição da enzima envolvida na síntese de estrogénios, a aromatase, é eficaz, contribui com sucesso para reduzir a mortalidade associada a cancro da mama, em doentes pós-menopáusicas, é acessível a nível monetário, é administrada por via oral e apresenta poucos efeitos secundários e menor toxicidade que outros tratamentos (12). Nos últimos anos, vários inibidores da aromatase, foram sintetizados e estudados. No entanto, as interacções específicas com o local activo da enzima ainda não são totalmente conhecidas. Actualmente, em parte devido aos efeitos secundários e ao aparecimento de resistências a outras opções de tratamento, a inibição da aromatase, é uma hipótese terapêutica de primeira linha que requer avaliação da eficácia, da potência, dos efeitos secundários e da toxicidade de novos compostos inibidores desta enzima.

2. Síntese de Estrogénios

Existe um conjunto de evidências epidemiológicas e experimentais de que os estrogénios estão envolvidos na etiologia do cancro da mama. Actualmente considera-se que a biossíntese local de estrogénios, especialmente em mulheres pós-menopáusicas, tem um papel importante na patogénese e no desenvolvimento de cancro da mama hormono-dependente e a sobre-expressão de enzimas com papel regulador parece estar associado ao desenvolvimento de patologia mais agressiva e ao aumento de recorrências a curto e médio prazo (15).

Os mecanismos através dos quais os estrogénios podem causar cancro da mama, incluem, a ligação do estradiol (E_2) ao receptor de estrogénio (RE) que estimula a transcrição de genes envolvidos na proliferação celular e o aumento de divisões celulares, o que pode conduzir a erros na replicação do DNA aumentando, assim o número de mutações. Por outro lado, o estradiol pode ser convertido em compostos genotóxicos (16), durante a metabolização, formando aductos de DNA, e que na ausência de reparação de DNA, induzem o aparecimento de mutações que podem estar na base de cancro da mama (17, 18). Por outro lado, estudos comprovam que a síntese de estrogénios através da aromatase, enzima que intervém na última etapa da síntese dos estrogénios, do tecido tumoral, estimula o crescimento do tumor quer de uma forma autócrina quer parácrina (19).

Os locais de síntese de estrogénios diferem nas mulheres pré e pós-menopáusicas. Antes da menopausa a actividade no ovário é a principal responsável pelos níveis de estrogénios circulantes, que variam de acordo com o ciclo menstrual (18, 20). A síntese periférica assume maior importância em mulheres pós-menopáusicas quando a biossíntese ovárica cessa, no entanto, nesta altura o ovário ainda produz quantidades substanciais de androgénios que podem ser usados como substrato para síntese de estrogénios em locais periféricos, como o tecido adiposo que é o local mais importante, músculo e fígado. O córtex adrenal, tal como o ovário pós-menopáusico, produz precursores androgénicos e pequenas quantidades de estrogénios (21-25). Assim, estes precursores esteróides (C19) em circulação, disponíveis para reacção de aromatização em locais extragonadais, são um factor determinante na incidência de cancro (26). Apesar da quantidade de estrogénios sintetizada perifericamente ser baixa, as concentrações locais nos tecidos são elevadas e exercem influência biológica local (27). No tecido mamário e endométrio existe outra via que controla a síntese e a inactivação dos estrogénios, a via das sulfatases, através da acção da enzima sulfatase,

que transforma o sulfato de estrona em estrona e das sulfotransferases que convertem os estrogénios em derivados sulfatados inactivos (28).

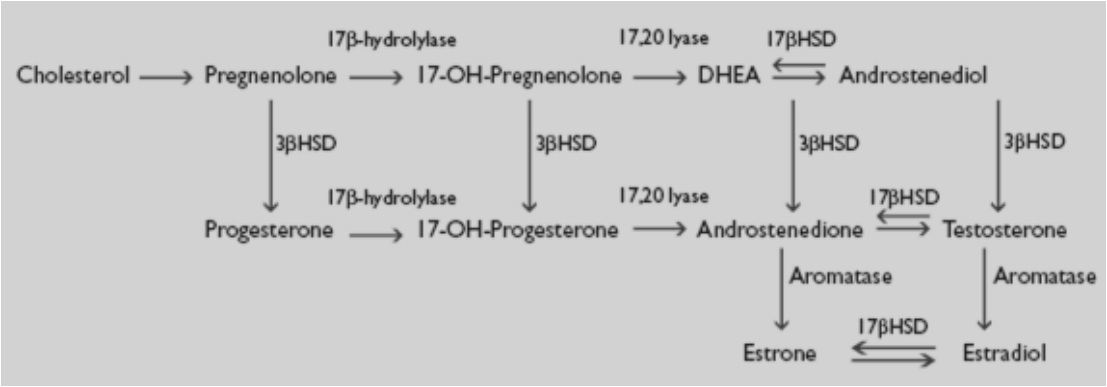


Figura 1. Biossíntese de estrogénios a partir do colesterol.
3βHSD:3β-desidrogenase hidroxiesteróide, 17βHSD:17β-desidrogenase hidroxiesteróide.

A síntese de estrogénios, tal como de outras hormonas esteróides, inicia-se a partir da molécula de colesterol e é controlada pela actividade de várias moléculas altamente selectivas como enzimas do citocromo P 450, desidrogenases esteróides e redutases (Figura 1). Os androgénios mais importantes são a androstenediona, a dihidroepiandrostenediona (DHEA) e a sulfato-dihidroepiandrostenediona (DHEAS). As hormonas DHEA e DHEAS estão presentes na circulação em concentrações superiores às encontradas para hormonas sexuais esteróides activas, constituindo um reservatório de precursores que estão disponíveis para a conversão em estrogénio em vários locais periféricos. O colesterol, esterol de 27 átomos de carbono, sofre uma sequência de conversões, na qual, parte da cadeia lateral do anel D é removida, originando esteróides de 21 átomos de carbono, progestagénios e corticóides. Posteriormente a cadeia lateral do anel D é completamente eliminada, dando origem a esteróides com 19 átomos de carbono, androgénios e, por fim, o grupo metil, entre o anel A e o anel B é removido, originando esteróides de 18 átomos de carbono, ou seja os estrogénios. Com a remoção do grupo metil, o anel A passa a aromático, o que justifica o nome da enzima que catalisa a reacção, a aromatase (18, 29, 30). Esta enzima liga-se ao C-19 dos substratos androgénicos, testosterona e androstenediona, e catalisa a sua conversão a estradiol e estrona, respectivamente (31, 32).

3. Receptor de Estrogénios

A actividade hormonal depende dos receptores de estrogénios (RE), pelo que, conhecer o seu mecanismo de acção é fundamental, para avaliar a sua influência no cancro da mama estrogénio-dependente e uma base para o desenvolvimento de novas terapias. O 17β-estradiol (E_2) regula o crescimento e diferenciação celular, e vários processos fisiológicos, na mama, no tecido ósseo, fígado, cérebro e sistema cardiovascular (33-35). Muitos genes regulados pelo estrogénio são importantes para a proliferação celular, inibição da apoptose, promoção de angiogénese, estimulação de invasão das células tumorais e respectiva metastização (36).

O RE é uma proteína maioritariamente nuclear, que apresenta organização estrutural e funcional comum a outros receptores nucleares (37). Este receptor pode também estar localizado a nível da membrana citoplasmática. Os receptores de estrogénio pertencem à classe I dos receptores nucleares (RN), tal como outros receptores esteróides, nomeadamente os receptores dos glucocorticóides, dos mineralocorticóides, de androgénio e da progesterona (38), da vitamina D e do ácido retinóico (33).

Os efeitos do E_2 são mediados pelos RE que existem em duas isoformas, RE-α e RE-β. A expressão destes dois tipos de RE não é igual em todos os tecidos (Figura 2). O gene humano do RE-α encontra-se no cromossoma 6 e o gene do RE-β no cromossoma 14, o que demonstra que são codificados por genes diferentes, que são distintos e apresentam várias isoformas (39). O ambiente celular em que o cancro da mama se desenvolve apresenta, geralmente, elevados níveis de RE-α e baixos de RE-β. A função do RE-β permanece um tema controverso (40) pois, alguns estudos referem que antagoniza a acção do RE-α (41), ou revelam vários mecanismos que fundamentam um efeito anti-proliferativo, enquanto outros relacionam os seus baixos níveis com resistência ao tamoxifeno (42). Por outro lado, tem ainda sido descrito um aumento na relação entre RE-α/RE-β no cancro da mama quando comparado com tecidos normais ou tumores benignos (43, 44), o que sugere que o RE-α está mais associado à carcinogénese, enquanto o RE-β parece ter um efeito protector contra a actividade mitogénica dos estrogénios em lesões pré-malignas (45). Assim, o uso de um agonista deste tipo pode resultar em benefícios posteriores, quando combinado com antagonistas dos RE-α (33).

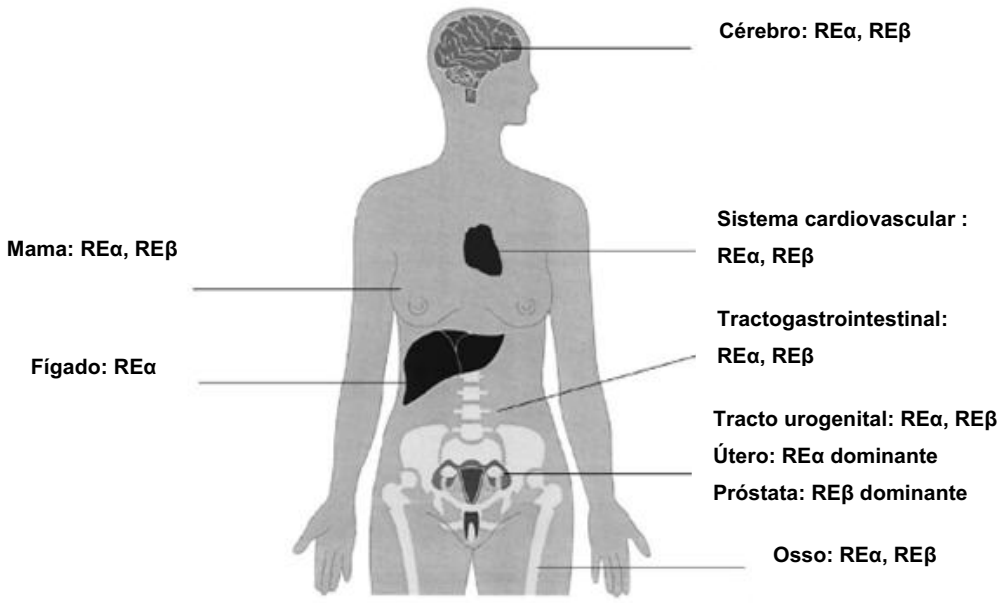


Figura 2. Distribuição de RE-α e RE-β no organismo humano.
Adaptado de Pearce e Jordan (33).

Os RE apresentam uma expressão específica de tecido, com sobreposição na distribuição em alguns tecidos. O RE-β é mais expresso na próstata, tecido ósseo, ovários (células da granulosa), pulmões, e em várias zonas do sistema nervoso central e periférico, enquanto o RE-α tem expressão predominante na hipófise, ovários (células da teca e intersticiais), útero, fígado, rins, glândulas adrenais e mamárias (46-48).

Os receptores partilham domínios estruturais comuns, classificados de A a F. O domínio A/B contém a função de activação 1 (AF1), uma função de activação constitutiva localizada no terminal amina e está envolvido na activação da transcrição de genes. Este é um dos domínios menos conservado entre RE-α e RE-β, apenas com 30% de identidade (41). O domínio C, ou de ligação ao DNA (DBD), é a região mais conservada entre as isoformas dos RE, apresentando 96% de homologia, e que permite aos receptores dimerizarem e ligarem-se a zonas de DNA ou seja aos elementos de resposta ao estrogénio (ERE). O domínio D desempenha um papel na dimerização e ligação a chaperões, tem apenas 30% de homologia entre receptores e contem o sinal de localização nuclear. A região E ou domínio de ligação ao ligando (LBD), contem a função de activação 2 (AF2) enquanto o domínio F regula o processo de transcrição. Ao contrário da AF1, a AF2 é uma função cuja activação depende do ligando. Os domínios

E/F dos RE-α e RE-β exibem uma sequência de homologia de 53%, apresentando diferenças na especificidade de ligação a ligandos (33). O elevado grau de divergência na sequência sugere que os RE podem ter funções distintas, no que concerne à regulação genética e à resposta biológica e podem contribuir para a actividade selectiva dos estrogénios em diferentes tecidos alvo (49).

4. Vias de sinalização intracelular

O RE funciona como um factor de transcrição ligando-dependente promovendo a expressão de vários genes (36) associados à proliferação e sobrevivência de células do cancro da mama e à progressão do tumor, como por exemplo, o factor de crescimento tipo insulina 1 (IGF1) e respectivo receptor (IGFR1), o regulador do ciclo celular ciclina D1, o factor anti-apoptótico Bcl-2 (38, 50, 51), e o factor pró-angiogénico de crescimento vascular endotelial (VEGF) (52, 53).

O RE actua através de dois mecanismos distintos: genómico e não genómico (Figura 3). A via genómica ou NISS (sinalização esteróide iniciada no núcleo) pode ocorrer segundo duas formas, clássica e não-clássica. Na ausência de estrogénio, o RE mantém-se inactivo na forma de molécula monomérica ligado a chaperões. Na via clássica, o estrogénio liga ao LBD do receptor e induz várias modificações, como, alterações conformacionais, fosforilações, dissociação de proteínas chaperões e homo ou heterodimerização (48). O dímero RE liga a zonas de DNA localizadas na região do promotor, os elementos de resposta ao estrogénio (ERE), induzindo o recrutamento de co-activadores e respectiva transcrição de genes envolvidos na proliferação celular e sobrevivência, simultaneamente, diminui a activação de genes com efeitos pró-apoptóticos ou anti-proliferativos e o efeito final é a estimulação do crescimento (54, 55). Ao contrário da via clássica, na via não-clássica o RE pode influenciar genes de transcrição sem a sequência ERE, regulados por outros factores de transcrição que ligam a sequências de DNA alternativas (56, 57). O RE interactua com estes factores de transcrição, estabiliza a ligação directa ao DNA e, assim, promove a transcrição de genes.

Estas vias induzem transcrição apenas se as AF1 e/ou AF2 se encontrarem activadas. A AF2 é activada apenas na presença de ligando, ao invés da AF1 que na ausência de estrogénio é activada através da fosforilação de resíduos específicos de serina, seguida da activação de vias de cinases, como, p42/p44 (MAPK), fosfatidilinositol 3 cinase (PI3K), proteína cinase B (AKT) e p38 (MAPK) (58, 59). Estas vias cinásicas são

activadas por factores dos receptores de crescimento (GFR), como IGFR1. A fosforilação do RE por cinases dependentes de GFR é um componente essencial da regulação e função do RE (60).

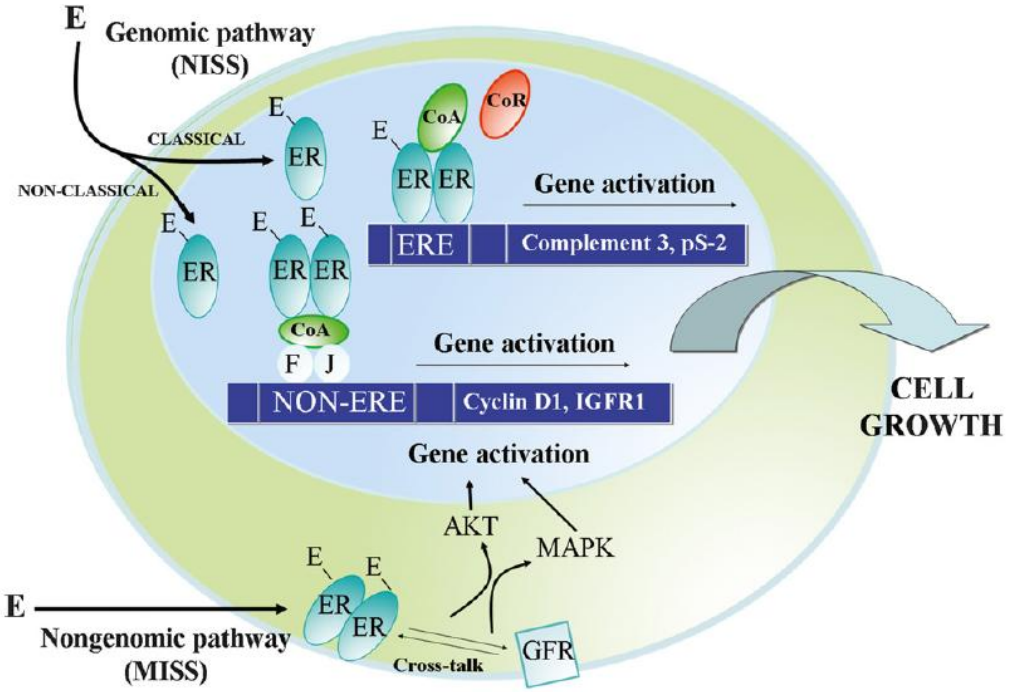


Figura 3. Vias de sinalização do receptor de estrogénio: NISS (sinalização esteróide iniciada no núcleo) e MISS (sinalização esteróide iniciada na membrana). Via clássica: O estrogénio, devido à sua natureza esteróide, tem capacidade de difundir passivamente através da membrana citoplasmática e ligar ao RE. O RE activado liga, na forma de dímero e na presença de co-activadores, a uma sequência especifica de DNA, elemento de resposta ao estrogénio, ERE, localizado no promotor de genes regulados por estrogénio, tais como complemento 3 e pS-2. Via não-clássica: o RE activado liga a outros factores de transcrição como, Fos (F) e JUN (J), que se ligam a diferentes sequências de DNA, como AP-1, e activam outros genes de resposta a estrogénios, como ciclina D1 e receptor do factor de crescimento tipo insulina (IGFR1). O estrogénio pode também ligar a um receptor de membrana que na forma de dímero, coopera com receptores de factores de crescimento (GFR) e activa vias de transdução de sinal AKT e MAPK, conduzindo a activação genética. Adaptado de Zilli e col. (61).

A via não genómica, é um mecanismo muito mais rápido que o genómico. Inicialmente independente da transcrição genética, é mediado pelo RE de membrana pelo que é também denominado de MISS (sinalização esteróide iniciada na membrana) (62). O RE de membrana encontra-se ligado à face interna da membrana plasmática através de moléculas lipídicas como a caveolina-1, flotilina-2, associado a receptores de membrana (IGFR, EGFR, HER2) ou a moléculas adaptadoras de sinalização como Shc (37). Com a ligação do estrogénio ao RE, este liga-se na forma de dímero a proteínas adaptadoras (63, 64), o que induz activação de receptores de factores de crescimento,

cinases citoplasmáticas e moléculas de sinalização (53, 65). As cinases fosforilam o RE e seus co-reguladores o que resulta na activação da transcrição nuclear conduzida pelo RE (66). Assim, pode concluir-se que as vias genómica e não genómica do RE são complementares e podem até actuar de forma sinergética. A via não genómica é dependente e regulada por proteínas co-reguladoras e é influenciada pelas vias de transdução de sinal que actuam no ambiente específico de cada célula ou tumor (61).

Os mecanismos de acção genómicos e não genómicos parecem ser complementares, existindo várias interacções entre estas formas de sinalização. Estudos recentes sobre os RE abrem novas perspectivas para a acção destes no cancro da mama. Realçam, ainda, o papel do "cross-talk" entre RE e as vias de sinalização do receptor do factor de crescimento epidérmico EGFR (HER1) /HER2 como um possível responsável pelo desenvolvimento de resistência a terapias endócrinas (Figura 4).

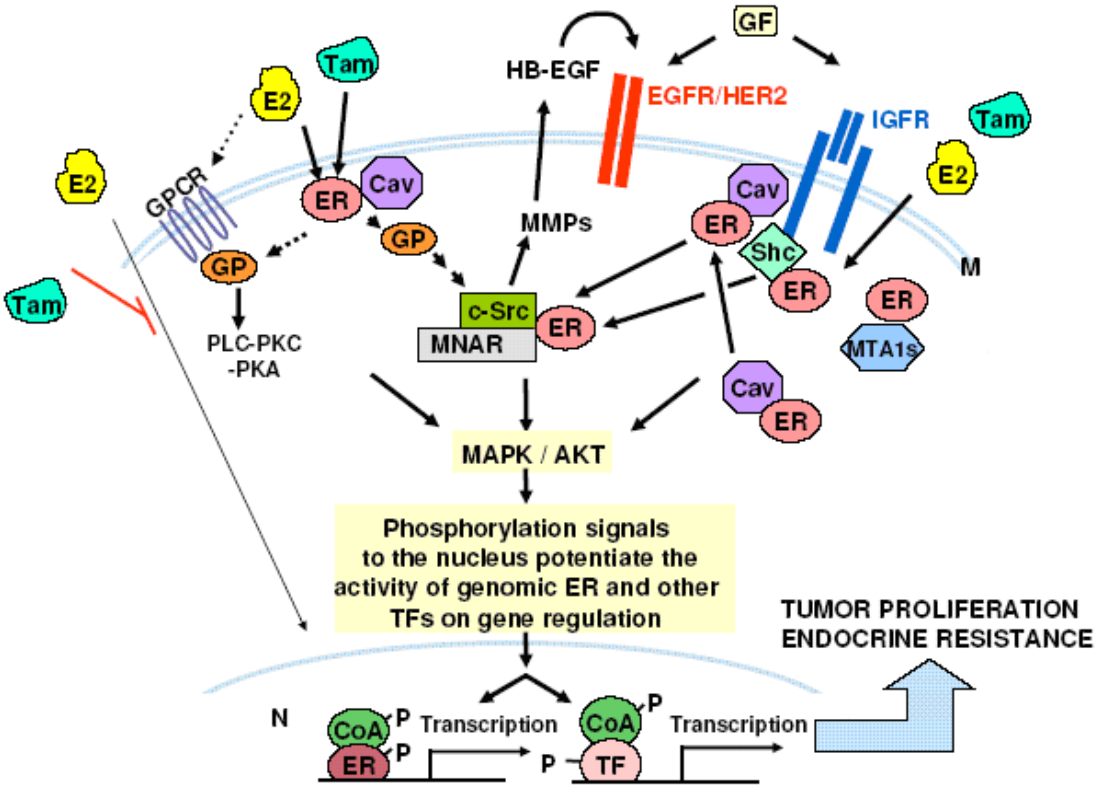


Figura 4. Integração da sinalização genómica e não genómica do RE e "cross-talk" entre os receptores dos factores de crescimento e a activação de cinases na resistência endócrina. E2-estrogénio, N-núcleo, Tam-tamoxifeno, ER-receptor de estrogénio, M-membrana, Shc-molécula de sinalização intermediária, MNAR-modulador da acção não genómica do receptor de estrogénio, TKRs-receptor tirosina cinase, GF-factor crescimento, EGFR-receptor do factor de crescimento epidérmico (HER2), IGFR-receptor do factor de crescimento tipo insulina, MTA1-gene associado a metastase1, GP-proteína G, MMPs-metaloproteinases, HB-EGF-heparina ligada ao factor de crescimento epidérmico, CoA-co-activadores, TF-factor transcrição, ERP-receptor de estrogénio fosforilado. Adaptado de Arpino e col. (37).

De um modo geral o mecanismo proposto para “cross-talk” entre sinalização genómica/não genómica, o receptor do factor de crescimento epidérmico e a via de activação das cinases, pode ser descrito em três etapas. Activação da via genómica com a ligação do estrogénio (E2) ao RE do núcleo que resulta no aumento da transcrição genética, incluindo genes importantes na via do receptor de factor de crescimento. O estrogénio pode ainda induzir activação do RE através da via de sinalização não genómica, actuando no receptor da membrana e/ou no citoplasma (MISS). O RE activado, através de interacções com moléculas sinalizadoras intermediárias, pode activar receptores tirosina cinase (TKRs), tais como EGFR e HER2 e o IGFR, cinases como c-Src e ainda receptores acoplados à proteína G (GPCRs). O que pode resultar na indução da actividade da via de sinalização EGFR/2. Por outro lado, as cinases activadas por TKR fosforilam o RE nuclear e os seus co-activadores, bem como outros factores de transcrição, potenciando, assim, a actividade genómica de RE, o que causa o aumento da expressão genética. Estes produtos genéticos aumentam a sinalização GF-TKR, completando assim o ciclo cooperativo entre as duas actividades do RE e o seu “cross-talk” com os receptores dos factores de crescimento e activação das cinases. Na presença de sinalização TKR excessiva como nos tumores que sobre-expressam HER2, a activação da via não genómica do RE pode tornar-se mais proeminente, podendo conduzir a resistência endócrina através da modificação dos efeitos inibitórios do tamoxifeno no RE nuclear (37). Estudos que descrevem os mecanismos de resistência adquirida em cancro da mama focam principalmente o “cross-talk” entre RE e vias de sinalização por factores de crescimento que medeiam a sobrevivência e proliferação celulares (67).

5. Aromatase

A aromatase, um membro da família dos citocromos P450, é um complexo enzimático constituído pelo citocromo $P450_{arom}$ e pelo NADPH-citocromo P450 redutase e é expressa pelo gene *CYP19A1* presente no cromossoma *15q21.1* (68). É uma enzima da membrana do retículo endoplasmático presente em vários tecidos (69).

Em mulheres pré-menopáusicas a aromatase é expressa principalmente pelo ovário (70). Durante a gravidez, existe uma fonte extra de aromatase, pois a placenta expressa elevados níveis da enzima (71). Em mulheres pós-menopáusicas, a síntese de estrogénio ocorre maioritariamente em tecidos periféricos como pele, músculo, fígado e tecido adiposo, uma vez que a função do ovário e o controlo hipofisário já cessaram (72). No

homem verifica-se actividade da aromatase no músculo, tecido adiposo e testículos (73). Alguns estudos revelaram que a aromatase está também presente no tecido mamário normal e cancerígeno (74), tendo-se observado em doentes com cancro da mama, um nível de estrogénio nos tumores bastante superior ao sérico (75).

A expressão do gene da aromatase é mediada por promotores específicos de tecido. Na placenta o promotor principal é PI.1, enquanto no ovário o promotor é o PII. Na mama, em tecido normal o promotor é o PI.4 e no tecido cancerígeno os promotores são o PI.3, PII e PI.7 (76), o que indica que ocorre uma mudança no mecanismo de regulação da expressão quando se passa de tecido da mama normal para tecido cancerígeno (19). Os promotores PI.3, PI.4, PI.6 e PI.7 também estão associados à expressão em tecidos não glandulares. Para além da especificidade dos promotores que estão associados à regulação da expressão da aromatase, outros factores estimulam a expressão desta enzima, como, a cinase A, cinase C, esteróides, factores de crescimento incluindo factor de crescimento epidérmico (EGF), factor transformador de crescimento (TGF-α e TGF-β), factor de crescimento de queratinócitos (KGF), interleucinas e factor de necrose tumoral (TNF-α) (69).

A flavoproteína NADPH-P-450 redutase, é uma enzima ubiquitária que transfere electrões de NADPH para o grupo heme da citocromo $P450_{arom}$ (77). Esta é uma hemoproteína que converte androgénios esteróides com 19 átomos de carbono em estrogénios com 18 átomos de carbono, o passo crítico na biossíntese de estrogénios. A aromatização da androstenediona, o substrato de eleição da aromatase, ocorre através de três reacções de oxidação sucessivas (29) resultando na formação da estrona que contem um anel aromático. Assim, esta enzima tem funções muito importantes no desenvolvimento e reprodução feminina (12). A aromatização central é necessária para várias manifestações de comportamento sexual, respostas neuroendócrinas e de desenvolvimento em várias espécies (78). Substâncias que atingem directamente a aromatase demonstraram ser eficazes no tratamento do cancro da mama, apresentam, no entanto, como efeitos adversos mais importantes a perda de massa óssea e alterações no metabolismo lipídico (79) devido à redução de actividade da aromatase em todos os locais do organismo. Uma estratégia que iniba a expressão da aromatase através dos promotores do gene da aromatase associados ao cancro da mama parece ser uma forma eficaz de induzir a inibição selectiva da produção local de aromatase e consequentemente da síntese de estrogénios no cancro da mama (80).

A estrutura da aromatase manteve-se desconhecida durante décadas. A investigação teórica teve como base a premissa de que a estrutura desta enzima é semelhante à do citocromo $P450_{cam}$, isolado da bactéria *Pseudomonas putida*, cuja

estrutura foi proposta por Poulos e colaboradores (81). Mais tarde, outros autores isolaram enzimas P450 de outras estirpes de bactérias o que conduziu a uma melhor compreensão da sequência da estrutura da aromatase (82, 83).

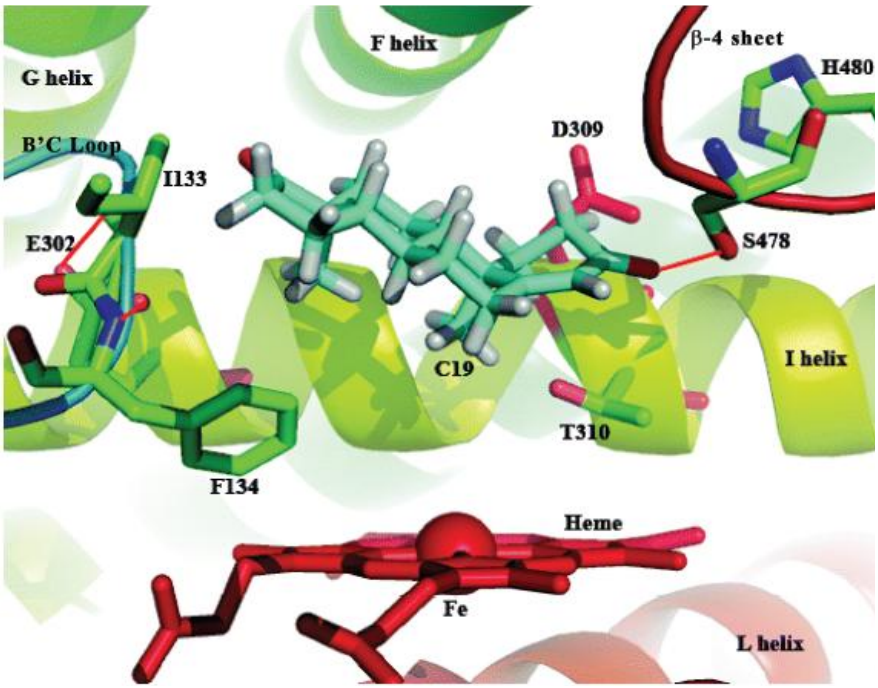


Figura 5. Mecanismo de ligação da androstenediona à aromatase através do heme, hélice I, loop B'C e β-4 sheet. O grupo ligado ao carbono 19 está centrado sobre o átomo de ferro sofre 3 hidroxilações. I133 e F134, localizados no loop B'-C, interactuam com o substrato através de forças de van der Waals, a estrutura do loop B'-C é estabilizada por pontes de hidrogénio entre E 302 e o átomo de azoto destes dois resíduos. D309, T310 e H480 situados ao lado do anel A do substrato estão envolvidos na reacção de aromatização. O substrato também é estabilizado por pontes de hidrogénio entre S 478 e o grupo cetona do C3. Adaptado de Hong e col. (84).

De acordo com estes estudos, existe uma parte da estrutura das P450, a região central em que a homologia é mais acentuada, e que é composta por um feixe de quatro hélices, duas β *sheets* e uma região de ligação heme. Os vários modelos teóricos da estrutura da aromatase que foram propostos, tendo por base a estrutura das enzimas P450 solúveis de bactérias, apresentam só uma homologia de 13 e 18% entre estas moléculas e aromatase humana (85).

Hong e colaboradores propuseram uma estrutura tridimensional da aromatase (Figura 5), que reforçava o modelo computacional reportado anteriormente por Favia e colaboradores (84, 86). As caracteristicas moleculares da interacção do substrato, androstenediona, e do inibidor esteróide, exemestano, com a aromatase humana recombinada, purificada e funcionalmente activa, permitiram estabelecer uma nova teoria, que explica a maioria dos resultados dos ensaios de mutagénese nos locais activos e ajuda a entender a reacção molecular de reconhecimento substrato/droga pela aromatase. Este modelo mostra que o grupo C-19, que sofre três reacções de

hidroxilação, se encontra centrado sobre o átomo de ferro (Figura 5). Os resíduos I133 e F134, localizados no *loop* B'-C, interactuam com o substrato através de forças de van der Waals, e a estrutura do *loop* B'-C é estabilizada por pontes de hidrogénio entre E302 e o átomo de azoto destes dois resíduos. Os resíduos D309, T310, S478 e H480, laterais ao anel A estão envolvidos na reacção de aromatização. O substrato também é estabilizado por pontes de hidrogénio entre S478 e o grupo ceto do C-3. Este modelo sugere um mecanismo para a ligação substrato/exemestano ao local activo da aromatase, que envolve a interacção com o grupo heme, o *loop* B'-C da aromatase e a β-4 *sheet* (84).

Em 2009 Ghosh e colaboradores (Figura 6) obtiveram a estrutura cristalina da aromatase purificada a partir da placenta humana na forma de complexo com o seu substrato natural, a androstenediona (68). Estes autores estudaram ainda a especificidade da enzima para androgénios e concluiram que, ao contrário dos locais activos de várias enzimas P450 microssomais que metabolizam drogas e xenobioticos, a aromatase tem uma cavidade específica para androgénios, encaixando de forma ideal a molécula de androstenediona. De facto, a androstenediona liga-se pela sua superfície-β, orientada no sentido do grupo heme, com a cadeia de 19 carbonos a uma distância específica do átomo de ferro. Os resíduos hidrofóbicos e os anéis de porfirina do grupo heme ligam à estrutura base da molécula esteróide e formam uma cavidade com uma forma que é complementar à do esteróide (68).

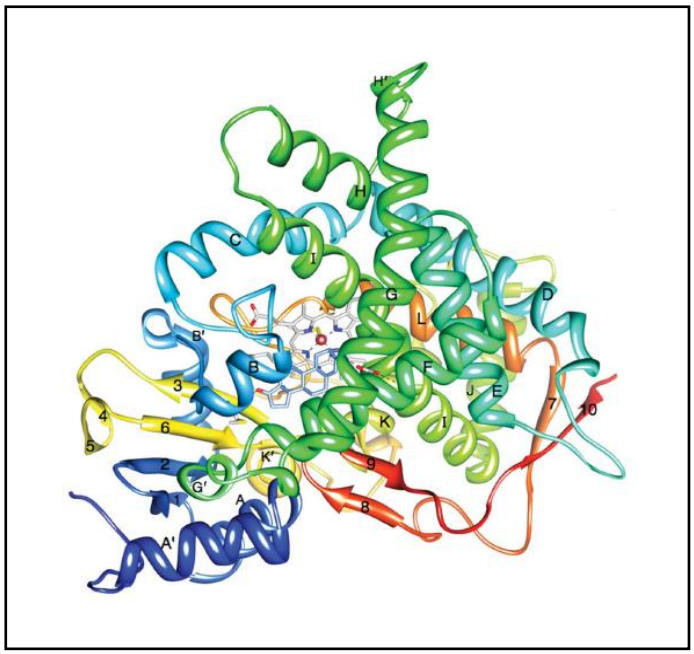


Figura 6. Estrutura da aromatase. A azul-escuro está representado o terminal N, que começa no resíduo 45 e a vermelho o terminal C que termina no resíduo 496. As hélices α estão marcadas de A a L e as cadeias β estão numeradas de 1 a 10. O grupo heme, grupo de ligação da androstenediona no local activo da enzima e as suas interacções polares também estão representadas. Adaptado de Ghosh e col. (68).

A obtenção da estrutura cristalina da aromatase pode contribuir para elucidar a base molecular da ligação específica entre androgénios e enzima e o mecanismo catalítico único, os quais podem permitir o desenvolvimento de inibidores da aromatase da próxima geração (68).

6. Terapia endócrina

O cancro da mama tem múltiplas apresentações clínicas e, com o objectivo de aumentar a sobrevivência sem comprometer a qualidade de vida, a terapia deve ser escolhida de acordo com as características do tumor de cada paciente, com o tratamento prévio e com a "performance". O plano de tratamento deve integrar terapias sistémicas, como, quimioterapia, terapia hormonal e agentes biológicos, com tratamentos locais como, cirurgia e radioterapia, de forma a obter uma combinação que permita o máximo benefício e menor risco de efeitos tóxicos a curto e a longo termo.

O conhecimento mais profundo do papel dos estrogénios levou ao desenvolvimento de terapias endócrinas de cancro da mama (Figura 7) que visam a diminuição dos efeitos estrogénicos através de duas vias, a redução dos níveis de estrogénio ou o bloqueio da acção dos estrogénios ao nível dos RE (11). De um modo geral, a terapia endócrina inclui: i) moduladores selectivos dos receptores de estrogénio (SERMs), com actividade antagonista parcial ou total; ii) inactivadores selectivos dos receptores de estrogénio (SERDs) ou antagonistas puros, ligam ao RE e causam a sua degradação; iii) Ablação dos ovários e agonistas da hormona libertadora da hormona luteinizante (LHRH); iv) inibidores da aromatase; v) terapia farmacológica hormonal, com doses elevadas de estrogénios e progestinas (87). As formulações endócrinas encontram-se entre as menos tóxicas e mais eficazes no tratamento de cancro da mama estrogénio-dependente. Factores como receptor de estrogénio (RE), receptor de progesterona (RP) e estado nodal fazem antever a resposta à terapia endócrina. Doentes RE positivos (RE+), apresentam uma taxa de resposta à terapia endócrina de cerca de 53% (88).

Em mulheres pré-menopáusicas, a biossíntese de esteróides pode ser bloqueada por ablação dos ovários por cirurgia ou radioterapia e pela administração de análogos da hormona libertadora da hormona luteinizante (LHRH), que controla a aromatase no ovário. Mais duas opções são válidas, como administração de anti-estrogénios ou SERMs, que atingem directamente o RE e impedem a ligação de hormonas e

consequente activação do RE, ou anti-estrogénios puros SERDs, que ligam ao RE, bloqueando a sua função e induzindo a destruição do receptor (89, 90).

Em mulheres pós-menopáusicas para além dos SERMs e SERDs são também propostos os inibidores da aromatase de terceira geração, que reduzem a quantidade de estrogénios disponível para ligação ao RE (89, 91, 92).

Um factor que condiciona a resposta à terapia endócrina é o largo espectro de tumores que devido aos diferentes padrões de mutação influenciam a actividade dos RE e reduzem a eficácia de agentes endócrinos (93). De facto, existe uma evidência crescente de que a complexidade do micro-ambiente do tumor, constituído por vários tipos de células e proteínas, tem um papel importante no desenvolvimento, progressão e resposta à terapia.

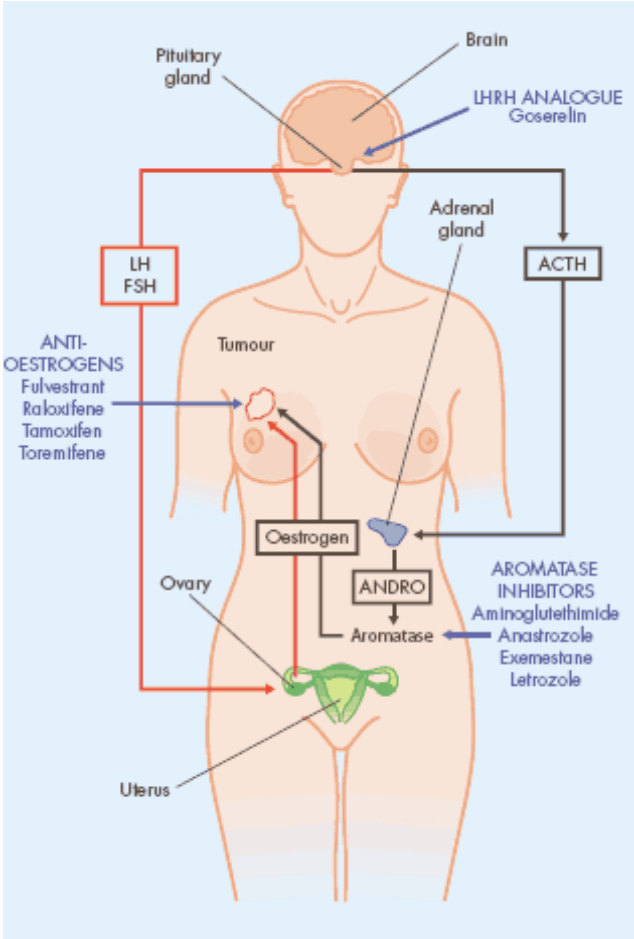


Figura 7. Mecanismos de acção de estrogénios e principais estratégias de intervenção terapêutica. Vias que bloqueiam a acção dos estrogénios: uma com antiestrogénicos que ligam ao RE, outra com inibição da síntese de estrogénios, com inibidores da aromatase ou com agonistas de LHRH. Adaptado de [2].

Apesar de toda a informação sobre as melhores estratégias terapêuticas, nem sempre o resultado é o ideal, pois, podem ocorrer situações de resistência à terapia endócrina. A resistência pode ser de dois tipos, *de novo* ou intrínseca, que acontece

quando não há resposta inicial à terapia, e resistência adquirida, em que ocorre uma resposta inicial ao tratamento, com aparecimento de resistências durante o tratamento (94). A adaptação à diminuição de estrogénios é a hipótese mais provável para resistência ao tamoxifeno e aos inibidores da aromatase.

Um dos motivos para a falha na eficácia de várias terapias endócrinas, pode ser o facto de que em condições específicas, as vias de sinalização por factores de crescimento conseguem activar directamente os RE e os genes de transcrição regulados pelos RE na ausência de estrogénio (95). Outro motivo pode ser a sobre-expressão de co-activadores e redução na expressão de co-repressores. O conhecimento dos mecanismos através dos quais as células de cancro da mama se tornam resistentes à terapia endócrina, associado à disponibilidade de novos compostos que interferem com as vias de sinalização por factores de crescimento envolvidas na resistência à terapia endócrina, pode conduzir ao desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento de cancro da mama estrogénio-dependente (96). Assim, a compreensão do mecanismo de resistência ao tamoxifeno pode ser útil para o estudo dos ainda pouco conhecidos mecanismos de resistência aos inibidores da aromatase (67).

A escolha de um plano terapêutico deve ser baseada no conhecimento dos benefícios e eficácia, mas também de eventuais efeitos tóxicos agudos e a longo prazo (97).

6.1. Moduladores e inactivadores dos receptores de estrogénio (SERMs e SERDs)

Durante as últimas três décadas, duas estratégias terapêuticas diferentes têm sido escolhidas para bloquear os efeitos dos estrogénios a nível dos RE, usando dois tipos de compostos, os moduladores selectivos dos receptores de estrogénios (SERMs) que são tipo-tamoxifeno ou anel-fixo, e os anti-estrogénicos puros (SERDs) (98). Os SERMs ligam aos RE interferindo com os processos de transcrição mediados pelo receptor, dado que permitem a ligação de co-repressores em vez de co-activadores (99). Os SERDs são antagonistas puros dos RE, pois após ligação ao receptor induzem a sua destruição. Os SERMs são exemplos de compostos que exibem actividade estrogénica tecido-específica (100). Um SERM ideal seria aquele que não teria qualquer efeito estimulador na mama e útero, e que bloqueasse a acção dos estrogénios nesses tecidos, mas que actuasse como agonista de estrogénios no osso, fígado, sistema cardiovascular e sistema nervoso central (101).

O citrato de clomifeno, foi aprovado pela “Food and Drug Administration” (FDA) em 1967 e a meio da década de 70, é aprovado o tamoxifeno, seguido do toremifeno e raloxifeno (Figura 8). Ao contrário do que se verifica com os estrogénios, os antagonistas de estrogénios induzem uma alteração na conformação do receptor que leva a uma associação com complexos co-repressores o que resulta na diminuição da transcrição de genes (102). Os SERMs, como tamoxifeno e raloxifeno, apresentam actividade agonista/antagonista e podem estimular ou inibir a função do RE dependendo do tecido, célula ou gene em questão (57), pelo que se classificam como SERMs.

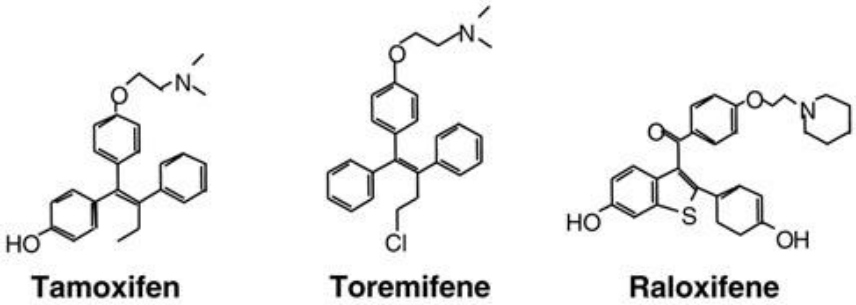


Figura 8. Moduladores selectivos dos receptores de estrogénio.

O raloxifeno apresenta perfil agonista/antagonista tecido-específico semelhante ao tamoxifeno, mas revela maior actividade agonista no osso e menos no útero, o que justifica a sua administração em quadros de osteoporose e osteopenia (100). Está ainda em avaliação a sua capacidade de prevenção a nível de cancro da mama. O tamoxifeno classificado inicialmente, apenas, como um anti-estrogénico não esteróide (Figura 8) demonstrou um efeito parcialmente agonista tipo-estrogénio (12). Este fármaco tem sido usado como a principal terapia hormonal em cancros da mama em estado inicial ou avançado (103). Recentemente o seu uso foi também alargado à terapia preventiva em doentes com elevado risco de contrair a doença (104).

O perfil agonista/antagonista do tamoxifeno depende do tecido em que actua (Figura 9), assim, na mama o tamoxifeno liga ao RE, induz uma alteração conformacional e consequente recrutamento de co-repressores, o que bloqueia a transcrição. No útero e tecido ósseo a ligação ao RE activa o recrutamento de co-activadores e induz transcrição de genes. A terapia prolongada com tamoxifeno está associada a um aumento do risco de cancro do endométrio, eventos isquémicos cerebrovasculares, eventos tromboembólicos venosos profundos, afrontamentos e hemorragia vaginal (105). O efeito tóxico mais importante é o desenvolvimento de cancro do endométrio, o que pode estar relacionado com a indução de hiperplasia endometrial, efeito semelhante ao estrogénio e que pode ser considerada uma alteração pré-maligna. Os outros efeitos incluem o

aumento do risco de malignidade a nível gastrointestinal, alterações nos factores de coagulação e quistos benignos no ovário (106-108). A nível oftalmológico também existem alguns relatos de toxicidade em doentes tratadas com tamoxifeno, independentemente da dose administrada, pelo que, doentes com queixas visuais devem ser observadas atentamente (109, 110).

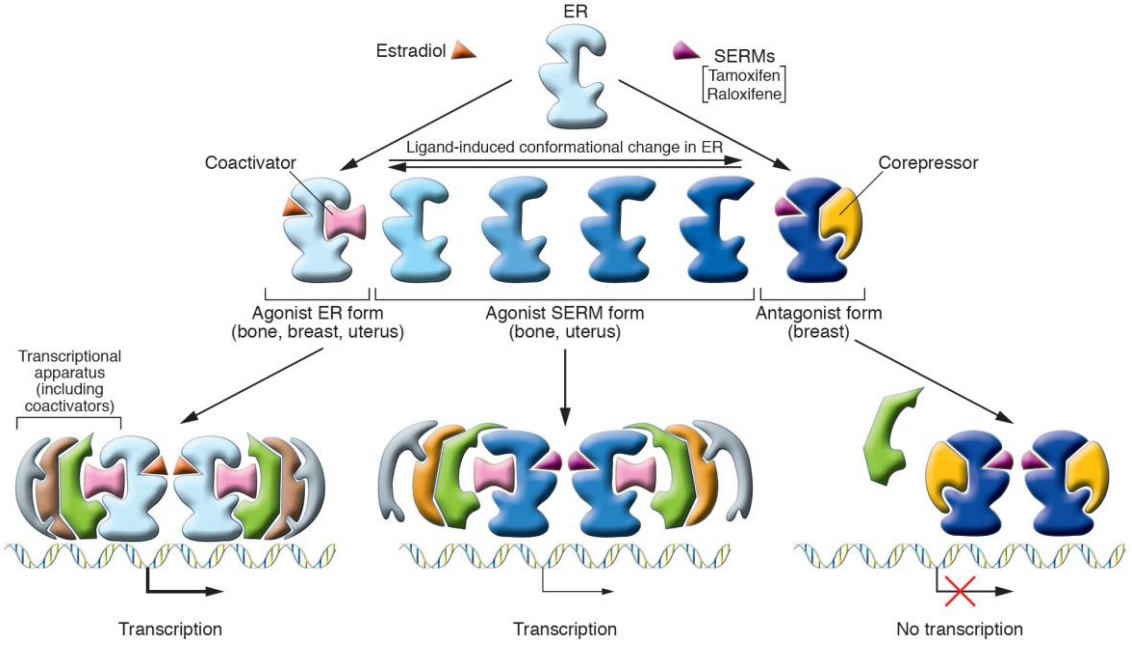


Figura 9. Diferentes estruturas dos RE e recrutamento de co-reguladores por agonistas dos RE e SERMs. Com a ligação de estradiol ou SERM, o receptor sofre alteração conformacional, que condiciona a actividade de acordo com a natureza do ligando. A conformação do RE regula o recrutamento de proteínas co-reguladoras específicas de transcrição. Alguns co-activadores ligam-se à forma activa do RE (ligação-agonista) e activam a transcrição, ao passo que co-repressores interagem com a ligação-antagonista do RE e inibem a transcrição. Adaptado de Deroo e Korach (111).

Até ao momento não foram descritos efeitos teratogénicos, no entanto, doentes em pré-menopausa ou em idade fértil, devem ter especial atenção a nível de contracepção, caso iniciem tratamento com tamoxifeno. Raramente acontecem casos de vasculite e colestase associadas a terapia com tamoxifeno, reversíveis após suspensão do fármaco (112). A terapia superior a cinco anos não é recomendada porque não aumenta os benefícios, mas aumenta o risco de efeitos adversos, e os doentes podem desenvolver resistência ao fármaco pois este começa a exercer efeito agonista no tumor, piorando o prognóstico (113, 114).

A terapia com tamoxifeno também aparece relacionada com efeitos estrogénicos benéficos, como diminuição das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e diminuição de doenças cardíacas em mulheres pós-menopáusicas (115, 116). O seu uso prolongado preserva a densidade mineral óssea da coluna lombar em mulheres pós-menopáusicas

(117, 118). O tamoxifeno usado como terapia adjuvante reduz em cerca de 50% a incidência de cancro da mama contralateral (17), reduz recorrências e o número de mortes em mulheres com cancro da mama estrogénio-dependente. No entanto, o uso a longo prazo revela resistências e toxicidade que ameaçam a vida (119). Uma percentagem considerável (23-40%) de pacientes suspende a terapia com tamoxifeno devido a problemas de tolerância e cerca de 63% relatam episódios de reacções adversas (120, 121). A resistência *de novo* ou adquirida ao tamoxifeno ocorre muito frequentemente o que limita a eficácia e o uso deste composto. A via de sinalização por factores de crescimento, que activa as vias genómica e não genómica do RE, tem um papel chave no mecanismo de resistência adquirida ao tamoxifeno (37).

Mais recentemente têm sido desenvolvidos anti-estrogénicos puros, que não apresentam propriedades agonistas (122). O fulvestrant (Figura 10) é o primeiro de um novo grupo de antagonistas dos RE, que, devido ao seu modo de acção, pode ser efectivo em sequência com outros agentes endócrinos (123). Este fármaco inibe competitivamente a ligação de estradiol ao RE, conduzindo à diminuição da dimerização do receptor, baixa os níveis celulares de RE e bloqueia a transcrição de genes regulados pelos RE, incluindo o receptor de progesterona (124, 125).

Enquanto o tamoxifeno bloqueia apenas uma das funções de activação de transcrição do RE, a AF1, o fulvestrant bloqueia a AF1 e a AF2, pelo que não tem actividade agonista estrogénica (126). O fulvestrant além de bloquear todos os domínios de activação da transcrição induzida pelo RE também induz a destruição do RE (90). Estudos comprovaram que 41% das mulheres em que os inibidores da aromatase e o tamoxifeno não foram eficazes respondem ao fulvestrant (17).

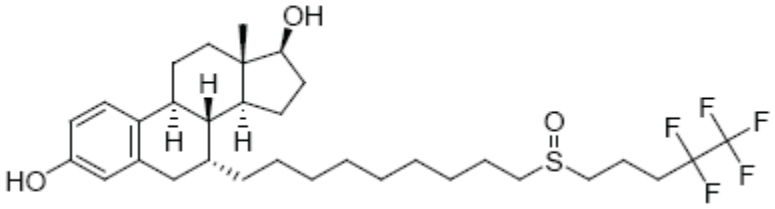


Figura 10. Estrutura química do fulvestrant (SERD).

O fulvestrant demonstrou eficácia em casos de resistência a tamoxifeno e é pelo menos tão activo como o inibidor da aromatase de terceira geração, anastrozol (123). A diminuição dos níveis celulares de RE pelo fulvestrant parece reduzir a probabilidade de resistência-cruzada com outras terapias endócrinas que ocorrem via “cross-talk” entre as vias de sinalização do EGF e o RE (127). Esta redução na resistência faz com que o fulvestrant possa permanecer eficaz após a sequência de outros agentes endócrinos, e

também outros agentes possam permanecer eficazes depois do fulvestrant, caso este seja usado no tratamento sequencial inicial (128-130).
Relativamente a efeitos adversos, os dados disponíveis e de acordo com o "National Cancer Institute", relatam casos de fadiga, afrontamentos, náuseas, anorexia, artralgias, mialgias, diarreia, dificuldades neurosensoriais, dispeneia, angioedema e tromboembolismo venoso (131).

6.2. Inibidores da aromatase

Os efeitos secundários associados ao tratamento com tamoxifeno estiveram na base do desenvolvimento de novas substâncias, direccionadas especificamente para a aromatase, inibindo a conversão de androstenediona a estrona e consequentemente a estradiol (12).

Os inibidores da aromatase (IAs) baixam os níveis de estradiol no plasma e nos tecidos e reduzem a quantidade de estrogénio disponível para estimular o processo de transcrição mediada por RE (132), baixando também os níveis séricos de estrona e sulfato de estrona (133). A investigação com o formestano, um inibidor suicida, foi pioneira no desenvolvimento de um leque de inibidores da aromatase que podem ser inibidores suicidas, como o exemestano, ou competitivos, como o letrozol e anastrozol (12). Como apresentam boa biodisponibilidade, os IAs usados actualmente em clínica, são administrados por via oral numa toma única diária e o tempo necessário para atingir o máximo de supressão de estrogénios varia entre 2 e 7 dias. Os tempos de semi-vida, são bastante diferentes, sendo para o anastrozol, exemestano e letrozol, respectivamente, 41 horas, 27 horas e 96 horas (134).

Tabela 1. Classificação cronológica e química dos inibidores da aromatase.

	GERAÇÃO		
	PRIMEIRA	SEGUNDA	TERCEIRA
TIPO I (Esteróide)	Testolactona	Formestano	Exemestano
TIPO II (Não Esteróide)	Aminoglutetimida	Fadrozol	Anastrozol, Letrozol

Devido às reduções significativas no risco de recaída e ao perfil de segurança aceitável, os IAs estão a substituir a monoterapia com tamoxifeno, nas mulheres pós-menopáusicas, o tratamento adjuvante endócrino considerado "gold standard" para a maioria das doentes (119). Estudos demonstraram que os IAs melhoram a eficácia e o perfil de toxicidade da terapia endócrina (133). Estes compostos apresentam menor toxicidade que o tamoxifeno em termos de eventos tromboembólicos, complicações ginecológicas, afrontamentos e cancro endometrial. Pelo contrário, as doenças cardiovasculares são mais frequentes na terapia com IAs (79, 133, 135, 136). A perda de densidade mineral óssea que conduz a osteoporose e aumenta o risco de fracturas, é uma complicação associada à diminuição de estrogénios inerente ao tratamento com IAs. Do mesmo modo, mulheres com osteopenia associada à menopausa apresentam um risco maior para futura perda de massa óssea causada pela terapia hormonal (137). Com estes fármacos ocorre um aumento do risco de fractura osteoporótica, assim, a terapia concomitante com bifosfonatos deve ser considerada (138, 139). Ensaios clínicos em curso avaliam a viabilidade de utilizar os IAs como agentes quimiopreventivos em mulheres pós-menopáusicas (12).

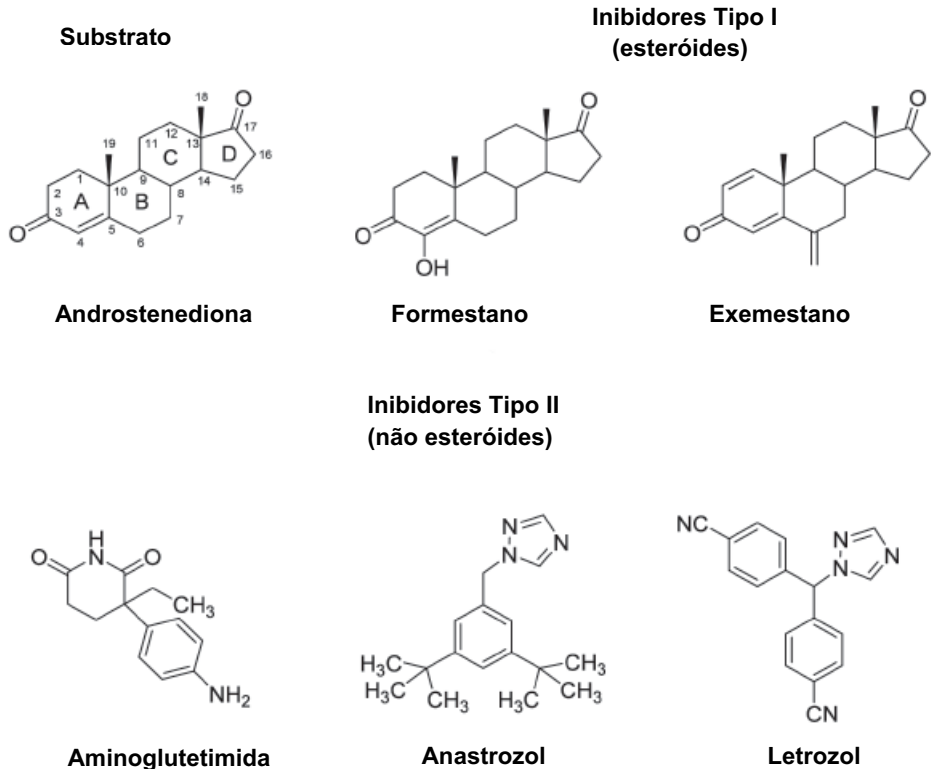


Figura 11. Estruturas químicas de inibidores da aromatase.

Os IAs podem ser divididos, de acordo com o mecanismo de acção em dois tipos, tipo I compostos esteróides e tipo II compostos não esteróides. Estão ainda agrupados

em três gerações que representam diferentes estádios de evolução, associados a uma restrição do espectro de acção, maior especificidade e potência (Tabela 1).
Todos os inibidores não esteróides são tipo II e apresentam um núcleo azol. Estes interactuam com o grupo heme da aromatase através da função azol, ligam de forma reversível ao local activo da enzima e inibem competitivamente a ligação dos substratos androgénicos. Os compostos tipo I, são esteróides e podem ligar reversível ou irreversivelmente ao local activo da enzima (Figura 11).

Apesar de os IAs serem uma terapia bastante eficaz, a resistência "*de novo*" e adquirida permanece um problema. Estudos laboratoriais em modelos pré-clínicos e algumas observações clínicas sugerem vários mecanismos para resistência aos IAs (53, 66, 140, 141). Existem várias vias através das quais os tumores podem apresentar fenótipo de resistência selectiva a inibidores da aromatase, como: i) elevada expressão de aromatase; ii) alteração da estrutura da aromatase, devido a mutações genéticas; iii) estimulação de crescimento do tumor por via não clássica e/ou estrogénios exógenos, já que os IAs bloqueiam a síntese de estrogénios por via clássica mas não afectam outras fontes de actividade estrogénica como androgénios, produzidos em grande quantidade a nível do córtex adrenal e que induzem o crescimento de cancros da mama hormono-dependentes; iv) derivados exógenos de estrogénios que incluem estrogénios sintéticos, poluentes industriais e fitoestrogénios (142).

6.2.1. Inibidores não esteróides da aromatase

O primeiro composto inibidor da aromatase, foi a aminoglutetimida, um fármaco anti-convulsivante, desenvolvido para o tratamento da epilepsia, introduzido na clínica em 1960, que inibe múltiplas enzimas do citocromo P450 (143). Embora a aminoglutetimida tenha sido usada com sucesso no tratamento do cancro da mama, apresentava várias desvantagens, pois como não era muito potente era administrada em elevadas concentrações. Por outro lado, como inibia as enzimas envolvidas na produção de cortisol, era necessária a administração simultânea de corticosteróides.

A aminoglutetimida foi assim, a base para o desenvolvimento e síntese de inibidores da aromatase não esteróides de segunda e terceira geração, mais específicos, eficazes e menos tóxicos (142). Os fármacos de segunda geração (Tabela 1) incluem o fadrozol e o imidazol, mais potentes que a aminoglutetimida mas menos específicos (144, 145). Relativamente ao tamoxifeno o fadrozol é menos eficaz (135, 146). Estudos de relação estrutura-actividade foram realizados para o desenvolvimento de inibidores mais

potentes a partir de derivados benzil-azol do fadrozol (147). A molécula letrozol foi o resultado deste estudo e permitiu encontrar um inibidor de aromatase bastante potente e totalmente selectivo (11).

Os compostos tipo II mais usados são os de terceira geração, anastrozol e letrozol (148, 149). Ao contrário do exemestano, inibidor tipo I, estes ligam de forma reversível à aromatase. Modelos moleculares mostram que estes compostos apresentam uma estrutura que permite uma ligação ao local activo da enzima e impedem, assim, a formação de estradiol (17, 18). Os inibidores não esteróides, em comparação com os esteróides, parecem ser menos específicos para a aromatase e podem inibir outras hidroxilações mediadas pelo P450 como acontecia com a aminoglutetimida (143). No entanto, os mais recentes inibidores não esteróides são bastante potentes, mais específicos e como não interactuam tão significativamente com outras enzimas apresentam poucos efeitos secundários e baixa toxicidade (12). O letrozol tem sido referido como o IA ideal para uma combinação terapêutica com agentes que inibem as vias de sinalização por factores de crescimento envolvidas na resistência hormonal. A eficácia do letrozol tem vindo a ser estudada com vários inibidores de transdução de sinal, com diferentes mecanismos de acção, incluindo anticorpos monoclonais contra a família de receptores HER, inibidores do receptor tirosina cinase e de inibidores de vias de sinalização (150, 151).

6.2.2. Inibidores esteróides da aromatase

A estratégia do uso de compostos que competem directamente com o substrato natural, a androstenediona, para o local activo da enzima, resultou no desenvolvimento de esteróides, tal como a testolactona, que são análogos de androgénios e que ligam competitivamente ao local activo da enzima (152). Modificações estruturais posteriores na molécula esteróide resultaram nas gerações futuras de IAs esteróides (Figura 11) que apresentam as características básicas da androstenediona com vários tipos de substituições em diferentes posições dos carbonos que constituem o suporte principal da molécula (153).

Estudos experimentais, em 1977, demonstraram que o 4-hidroxiandrostenediona (4-OHA) ou formestano é um potente inibidor da aromatase, sendo o primeiro inibidor selectivo da aromatase disponível, apresentando benefícios em doentes que apresentaram uma recidiva com tamoxifeno (12, 154). Este composto actua não só por inibição rápida competitiva mas, também, por inactivação da enzima, efeito este que é de

longa duração ou irreversível (155). Estudos em ratos revelaram que é eficaz na supressão dos níveis de estrogénio nos ovários e na regressão dos tumores mamários (154). Ao contrário do tamoxifeno, o 4-OHA não tem efeito estrogénico noutros tecidos, tais como no útero de rato, e mostrou inibir ainda a síntese estrogénica em tecidos periféricos em primatas não humanos (156). O formestano é bem tolerado (157), é administrado por via intramuscular devido ao intenso metabolismo hepático (158). O composto esteróide de terceira geração introduzido na clínica foi o exemestano, um inactivador da aromatase (159). Este fármaco causa um decréscimo acentuado nos níveis estrogénicos no plasma e urina (160, 161).

Estes compostos, análogos de androgénios, devem muitos dos seus efeitos secundários à natureza esteróide (161). Estes compostos são convertidos pela aromatase em intermediários reactivos, com uma ligação forte ou irreversível à enzima, sendo estes fármacos considerados "inibidores suicidas" (142, 162). Quando ligam ao local activo são alterados pelos efeitos catalíticos da enzima e convertidos em compostos reactivos que se ligam covalentemente e alteram irreversivelmente a acção enzimática (17). Como se ligam ao local activo, estes inibidores são bastante específicos e têm efeitos prolongados como resultado da inactivação da enzima. Assim, a presença contínua do fármaco não é necessária e a probabilidade de efeitos tóxicos é menor (12). A acção destes compostos é limitada pelo tempo e se a terapia se mostrar ineficaz os níveis de estrogénio voltam ao normal com a suspensão do tratamento. Estes inibidores da aromatase reduzem os níveis de estrogénio sem afectar outras hormonas esteróides, e devido à sua especificidade estão associados a um menor número de efeitos secundários e menor morbilidade.

7. Efeitos da terapia endócrina na proliferação e morte celular

O estrogénio funciona como um promotor crítico do tumor, pelo que bloquear os seus efeitos é uma estratégia importante. Este efeito pode ser reduzido por bloqueio do RE ou por inibição da aromatase (87). Os mecanismos através dos quais os estrogénios podem causar cancro da mama, incluem, a ligação do estradiol (E_2) ao receptor de estrogénio (RE) que induz a activação e transcrição de genes envolvidos na proliferação celular e o aumento de divisões celulares, podendo, assim, induzir um aumento no número de mutações (16). Existem duas formas de reduzir a proliferação celular, ou através da retenção do ciclo celular e/ou por indução de morte celular. Esta pode ser induzida por apoptose, necrose e morte por autofagia.

A apoptose é um processo de morte celular altamente organizado. Trata-se de um processo, de indução da própria morte, que ocorre em processos fisiológicos como, na morfogénese e renovação de células durante o tempo de vida e em processos patológicos. A apoptose ocorre segundo duas vias, a extrínseca ou dos receptores de morte e a intrínseca ou mitocondrial (163). A apoptose pode ser iniciada por vários estímulos, como, sinais de desenvolvimento, stress celular e interrupção do ciclo celular. Vários factores chave envolvidos na regulação, coordenação e desenvolvimento da apoptose estão identificados. Entre eles, a família de proteínas Bcl-2, que apresenta um papel decisivo na regulação, como inibidores ou promotores da apoptose. Muitas das alterações morfológicas que ocorrem durante a apoptose, como, condensação de cromatina, fragmentação nuclear e "blebbing" da membrana, são resultado da actividade de um conjunto de cisteíno-proteases, chamadas caspases (164).

Um outro tipo de morte celular, caracterizado por modificações morfológicas que podem ser comuns e/ou diferentes das observadas na morte por via apoptótica e que resultam de uma forma alternativa de morte celular, é a morte por autofagia. Este tipo de morte é induzida por via lisossomal a partir da qual as células reciclam macromoléculas e organelos celulares. Formam um autofagossoma, que após maturação se funde com lisossoma e o seu conteúdo é degradado por hidrolases lisossomais. De um modo geral, estas células apresentam as mesmas alterações morfológicas observadas na apoptose, como condensação e marginalização de cromatina (165) e apresentam, ainda, vacuolização generalizada no citoplasma. A apoptose pode ser precedida ou até depender do processo de autofagia.

Parece existir um "cross-talk" entre estes dois tipos de morte celular programada, com envolvimento das proteínas da família Bcl-2 e caspases. No entanto, os mecanismos envolvidos não estão perfeitamente esclarecidos (164). Alguns SERMs, como, o tamoxifeno, e SERDs, como o fulvestrant, induzem morte celular por apoptose em células de cancro da mama estrogénio-dependente (166). Existem também relatos, de que o fulvestrant e raloxifeno, promovem a formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS), que estão associadas à libertação do citocromo *c* mitocondrial, que induz a apotose dependente das caspases (166). Apesar de estes estudos indicarem que este tipo de fármacos induzem apoptose, foi também demonstrado que o tamoxifeno induz morte celular por autofagia em células MCF-7 (167). Em relação aos IAs ainda poucos estudos estão publicados relativamente aos efeitos destes compostos no ciclo celular e nos mecanismos de morte celular. Mas, relativamente ao letrozol, anastrozol e formestano, foi demonstrado que estes causam o bloqueio do ciclo celular na transição G_0/G_1 e morte por apoptose numa linha celular dependente de estrogénio (164). Estudos recentes do

nosso laboratório demonstraram que inibidores da aromatase derivados da androstenediona induziam também retenção do ciclo celular na fase G_0/G_1, mas, ao contrário dos anteriores induziam morte por autofagia na linha celular MCF-7aro (13).

O "cross-talk" entre as vias de sinalização de RE e do receptor 1 do factor de crescimento tipo insulina (IGFR1) apresenta uma função crucial no desenvolvimento normal da mama, e também na iniciação, manutenção e progressão do cancro da mama (168). A combinação do bloqueio de acção de estrogénio e a regulação das vias de sinalização pelo IGFR1, aparece como uma forma de evitar a progressão de cancro da mama. De facto, um estudo que combina um IA com um inibidor selectivo da via de sinalização pelo IGFR1, em duas linhas celulares de cancro da mama, MCF-7aro e T47D/Aro, demonstrou uma inibição sinergética da proliferação e indução de apoptose (169).

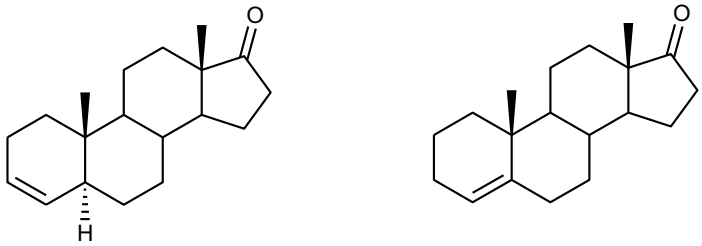
De acordo com tudo o que foi referido, é natural concluir que uma melhor e mais aprofundada compreensão, dos diferentes mecanismos de morte celular inerentes à terapia endócrina, pode conduzir à descoberta de novas estratégias para promover a morte de células cancerígenas.

8. Compostos testados neste estudo

Nos últimos anos foram sintetizados vários IAs com base na estrutura do substrato natural da aromatase, a androstenediona. De acordo com estudos de Relação Estrutura-Actividade (REA) a presença de determinadas características químicas no anel A e D da estrutura esteróide parece ser determinante para a actividade anti-aromatásica dos compostos. De facto, a planaridade no anel A e na zona de fusão entre os aneis A e B, bem como a presença de um grupo carbonilo na posição 3 e de insaturações no núcleo esteróide, são referidos como requisitos para actividade destas substâncias. Por outro lado tem sido referido que no anel A poucas modificações são permitidas (154). Foi, ainda, demonstrado que a existência de um grupo 17β-hidroxilo ou 17-carbonilo, era importante para assegurar a actividade anti-aromatásica.

Assim, com base no composto 5α-androst-3-eno-17-ona (**3a**) (Figura 12), desenhado, sintetizado e testado anteriormente pelo nosso grupo de investigação, foi estudado também o seu análogo 5α-androst-2-eno-17-ona (**18**) contendo a dupla ligação

entre os carbonos C-2 e C-3 em vez da dupla ligação existente entre os carbonos C-3 e C-4 de **3a** (Figura 13).

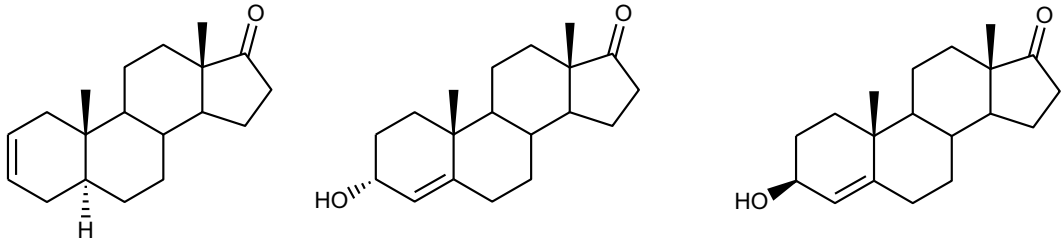


3a
5α-androsta-3-eno-17-ona

3b
androsta-4-eno-17-ona

Figura 12. Compostos base para síntese de inibidores da aromatase.

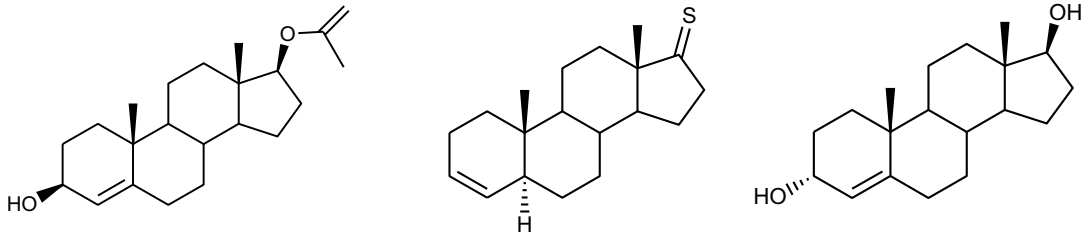
A nível do anel A e tendo por base a estrutura de um outro potente inibidor da aromatase, o composto androst-4-eno-17-ona (**3b**) (Figura 12), descrito por Numazawa e colaboradores (170), foram feitas outras modificações na posição C-3. Para além de ser introduzido um grupo hidroxilo nesta posição, foi também estudado o efeito que a estereoquímica 3α e 3β deste grupo causava na capacidade de inibição dos compostos. Neste sentido, foram preparados os epímeros, 3α-hidroxiandrosta-4-eno-17-ona (**19**) e 3β-hidroxiandrosta-4-eno-17-ona (**20**), exibindo, respectivamente, estereoquímica 3α ou 3β (Figura 13).



18
5α-androsta-2-eno-17-ona

19
3α-hidroxiandrosta-4-eno-17-ona

20
3β-hidroxiandrosta-4-eno-17-ona



21
3β-hidroxiandrosta-4-eno-17β-yl acetato

24
5α-androsta-3-eno-17-tiona

25
3α,17β-dihidroxi-4-androsteno

Figura 13. Novos compostos sintetizados e testados.

Por outro lado, Numazawa e colaboradores demonstraram que o grupo carbonilo em C-17 seria necessário para o estabelecimento de uma ligação forte entre a enzima aromatase e os análogos esteróides da androstenediona (171). No entanto, outros autores referem que a sua modificação apenas induz uma ligeira redução da actividade anti-aromatásica (171, 172).

Assim, e de forma a investigar os efeitos da substituição deste grupo e tendo como base os mesmos compostos ou seja, a 5α-androsta-3-eno-17-ona (**3a**) e a androsta-4-eno-17-ona (**3b**), foram sintetizados novos esteróides com substituições do grupo carbonilo em C-17, por um grupo acetato, um grupo tiona, ou um grupo hidroxilo dando origem respectivamente aos compostos, 3β-hidroxiandrosta-4-eno-17β-yl acetato (**21**), 5α-androsta-3-eno-17-tiona (**24**) e 3α,17β-dihidroxi-4-androsteno (**25**) (Figura 13).

9. Objectivo

O cancro da mama é a principal causa de morte relacionada com cancro em mulheres. Entre todas as opções de terapia endócrina o tamoxifeno tem sido considerado o "gold standard" nos últimos trinta anos, no entanto, é frequente o aparecimento de efeitos adversos e resistência ao longo do tratamento, o que conduziu ao avanço na investigação e desenvolvimento de novos compostos. Entre estes, os IAs de terceira geração, merecem destaque visto que, são a terapia mais indicada segundo as linhas orientadoras clínicas, em mulheres pós-menopáusicas com cancro da mama estrogénio-dependente. No entanto, o uso de IAs está associado a alguns efeitos secundários, como, dislipidemias, artralgias, dores musculoesqueléticas, eventos cardiovasculares e redução da densidade mineral óssea. Apesar de os IAs serem uma terapia bastante eficaz, a resistência "*de novo"* e adquirida permanece um problema, pelo que a pesquisa de novas moléculas continua com o intuito de alcançar substâncias mais especificas, eficazes e com menor espectro de efeitos colaterais.

Assim, e tendo como base dois compostos com capacidade anti-aromatásica, que resultaram de modificações na estrutura do substrato natural da aromatase, a androstenediona, foram sintetizados seis novos compostos esteróides com modificações nos aneis A e D. Com este trabalho pretende-se avaliar a que nível as substituições introduzidas alteram a "performance" dos compostos e comprometem a sua capacidade de inibição da aromatase, quer em microssomas de placenta quer numa linha celular de cancro da mama transfectada com o gene da aromatase (MCF-7aro).

Por outro lado, o modo como os IAs actuam a nível das células cancerígenas não está perfeitamente esclarecido. Pretende-se, ainda, avaliar os efeitos biológicos dos novos inibidores mais potentes, a nível da proliferação celular e indução de morte celular, usando a linha celular MCF-7aro. Pois, o conhecimento do mecanismo através do qual os IAs induzem morte e diminuição da proliferação celular, pode conduzir à compreensão das vias envolvidas na regressão de tumores da mama.

Capítulo II

Parte Experimental

Materiais e Métodos

1. Materiais

Meio de cultura Eagles's (MEM), soro bovino fetal (SBF), L-glutamina, antibiótico-antimicótico 100x (10 000 unidades/ml penicilina G sódica, 10 000mg/ml sulfato de estreptomicina e 25mg/ml anfotericina B), geneticina (G418) e tripsina foram fornecidos por Gibco Invitrogen Co. (Paisley, Scotland, UK). Azul de Tripano, testosterona, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), fosfato dinucleotido nicotinamida adenina (forma reduzida) (NADPH), dimetilsulfóxido (DMSO), carvão, piruvato de sódio, dextrano, formestano (4-OHA) e Hoechst 33258 foram comprados à Sigma-Aldrich Co. (St.Louis, MO, USA). Androstenediona e timidina tritiadas foram fornecidas pela Perkin-Elmer (Boston, MA, USA). O corante Giemsa foi adquirido à Merck (Damnstadt, Germany). O meio de montagem Vectashield foi fornecido por Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA 94010, USA). A mistura de líquido de cintilação Universol foi comprada à ICN Radiochemicals (Irvine, CA, USA). O reagente Bradford foi adquirido à Bio-Rad (Bio-Rad Labs, Munich, Germany), os filtros do *cell harvester* foram comprados à Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA) e o Kit da Anexina V foi à Bioiosciences Pharmingen (San Diego, CA, USA).

2. Preparação de microssomas de placenta

Os microssomas da placenta foram obtidos como descrito por Yoshida e Osawa (173) com algumas modificações. Após colheita, a placenta humana, obtida com consentimento, foi colocada em tampão KH_2PO_4 a 67 mM (pH 7.4) contendo 1% cloreto de potássio. O tecido do cotiledone foi separado e homogeneizado com o Polytron com o tampão KH_2PO_4 contendo 0.25 M de sacarose e 0.5 mM de ditioteitrol (DTT, 1:1, w/v). O homogeneizado foi centrifugado a 5000 *g* durante 30 min. O sobrenadante foi centrifugado duas vezes a 20000 *g* durante 30 min e a 148000 *g* durante 45 min, formando um pellet com microssomas. Estes foram lavados e ressuspendidos em tampão KH_2PO_4 com 0.25 M de sacarose, 20% de glicerol, 0.5 mM DTT e armazenados a -80ºC. Todos os procedimentos foram realizados entre 0-5ºC. O teor proteico foi avaliado pelo método de Bradford, usando a albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

3. Ensaio aromatase

A actividade da aromatase foi medida com base nos estudos de Thompson e Siiteri e Heidrich e colaboradores, com modificações (29, 174). A actividade da aromatase foi avaliada medindo a ^3H_2O libertada da [1β-^{3}H]androstenediona durante o processo de aromatização. Todos os compostos testados foram dissolvidos em DMSO e diluídos em tampão KH_2PO_4 a 67 mM (pH 7.4). Para o ensaio de "screening", foram usados 20 µg de proteína dos microssomas, 40 nM [1β-^{3}H] androstenediona (1 µCi), e 2 µM dos novos esteróides, num volume final de 1 ml. A reacção catalisada pela aromatase teve início com a adição da forma reduzida de NADP (NADPH 150 µM). Para a determinação do IC_{50}, a mistura de reacção continha 20 µg de proteína, 40 nM (1 µCi) de [1β-^{3}H] androstenediona e diferentes concentrações dos compostos (0,0625 - 2 µM). As incubações foram realizadas a 37°C com agitação durante 15 minutos. Para terminar a reacção adicionou-se 250 µl de ácido tricloroacético a 20%. A mistura foi transferida para tubos de microcentrifuga contendo um pellet de carvão/dextrano, e após agitação foi incubada durante uma hora, à temperatura ambiente. Após centrifugação a 14000 *g* durante 10 min, 1 ml de sobrenadante foi transferido para novos tubos com carvão/dextrano, agitados e incubados 10 min, à temperatura ambiente. Após nova centrifugação a 14000 *g* durante 10 min retiraram-se 700 µl de sobrenadante de cada amostra, contendo a água tritiada, e adicionaram-se 3 ml de líquido de cintilação. A contagem foi realizada num contador de cintilação Beckman (LS6500 Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA). Todas as experiências foram realizadas em triplicado e os resultados representam pelo menos três experiências independentes.

Para a preparação de pellets de carvão activado, colocou-se em tubos de microcentrifuga 1 ml de solução de carvão activado a 5% e dextrano a 0.5% em tampão KH_2PO_4 a 67 mM pH 7,4, centrifugou-se a 14000 *g* durante 10 min e, após a remoção do sobrenadante, o pellet foi seco à temperatura ambiente.

4. Culturas celulares

A linha celular de cancro da mama, MCF-7, receptor de estrogénio positivo (RE+), transfectada com o gene da aromatase placentária humana (MCF-7aro) foi cedida pelo Prof. Shiuan Chen (Beckman Research Institute, City of Hope, Duarte, CA, USA). As células foram mantidas com meio de cultura Eagle's (MEM) com sais de Earl, 1 mM de

piruvato de sódio, 2 mM de glutamina, 1% de penicilina-estreptomicina-anfotericina B, 700 ng/ml de G418 e 10% de SBF inactivado, em 5% CO_2 a 37°C. O meio de cultura foi mudado a cada três dias. Após atingir 80 a 90% de confluência, as células foram destacadas com 0,25% tripsina/1 mM EDTA durante 1 min à temperatura ambiente, lavadas com PBS e meio de cultura com 10% de SBF, para inactivar a tripsina. Centrifugou-se a 1200 *g* durante 10 min e as células foram ressuspendidas em meio de cultura.

5. Preparação de soro bovino fetal tratado com carvão e sincronização das células

Para remoção dos esteróides, o SBF (500 ml), foi incubado com carvão activado (8 g) durante 24 h à temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 4000 *g*, durante 15 min para separar o carvão do soro. O sobrenadante foi esterilizado através de um filtro de acetato de celulose com um tamanho de poro de 0.22 µm.

Com o objectivo de eliminar a interferência de esteróides presentes no SBF bem como os efeitos estrogénicos do vermelho de fenol (175), quatro dias antes de iniciar as experiências, as células MCF-7aro foram transferidas para meio livre de E_2, constituído por meio MEM sem vermelho de fenol, com 5% de soro bovino fetal inactivado, previamente tratado com carvão (SBFC), 1 mmol/L de piruvato de sódio, 2 mmol/L de glutamina, 1% de penicilina-estreptomicina-anfotericina B.

6. Ensaio aromatase em células

A actividade da aromatase foi determinada através da quantificação de água tritiada libertada, de acordo com o método de Thompson e Siiteri, usando [1β-^{3}H] androstenediona como substrato (actividade especifica 24.7 Ci/mmol) (29). A avaliação de actividade da aromatase por este método foi previamente validada por um ensaio com produto isolado descrito por Zhou e colaboradores (176). As células após confluência são tripsinizadas, lavadas com PBS e cultivadas, na densidade de $1x10^6$/poço em placas de 24 poços, em meio sem soro contendo os inibidores em diferentes concentrações (10, 25, 50 µM), 50 nM de [1β-^{3}H] androstenediona e 500 nM de progesterona (usada para inibir a 5α-redutase que também consome o substrato androgénio) e incubadas durante uma

hora, em atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C. A reacção enzimática foi terminada após adição de 300 µl de ácido tricloroacético a 20%. A mistura foi transferida para tubos de microcentrifuga com pellet de carvão/dextrano, incubada à temperatura ambiente durante uma hora, e centrifugada a 15000 *g* durante 10 min. Retirou-se o sobrenadante para outro tubo de microcentrifuga com pellet de carvão/dextrano, para absorver qualquer vestígio de substrato marcado não reactivo. Incubou-se durante 30 min à temperatura ambiente e centrifugou-se a 15000 g durante 10 min. Retirou-se 200 µl do sobrenadante, adicionou-se 3 ml de líquido de cintilação e procedeu-se às contagens num contador de cintilação (LS6500 Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA).

Para extracção das proteínas, as células foram incubadas com 500 µl de NaOH 0.5 N, durante a noite, à temperatura ambiente, com agitação. O teor proteico foi avaliado pelo método de quantificação de proteínas da Bio-Rad, de forma a normalizar a radioactividade determinada. O formestano a 0,5 µM foi utilizado como um inibidor de referência. Todos os ensaios foram realizados em triplicado e os resultados representam pelo menos três experiências independentes.

7. Estudos da morfologia celular

As alterações morfológicas foram analisadas por microscopia de contraste de fase e pela coloração de Giemsa. As células foram cultivadas em lâminas de 8 poços, numa densidade de $6x10^4$ células/poço, os compostos (10-50 µM) foram adicionados após 24 h e incubadas durante 2, 3 e 6 dias. Para a coloração de Giemsa e após lavagem com PBS a 37ºC, as células foram fixadas com metanol à temperatura ambiente, durante 20 min. Após fixação, as células foram incubadas com o corante de Giemsa, diluído em PBS (1:2) durante 30 min, lavadas com água corrente e, após secagem, as lâminas foram montadas com DPX. As células foram observadas ao microscópio Eclipse E400 (Nikon, Japan) equipado com o software de análise de imagem Leica Qwin.

Para avaliar a morfologia nuclear utilizou-se a coloração com Hoechst 33258. As células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído a 4% (diluído em PBS) durante 20 min. Após lavagem as células foram incubadas com 0,5 mg/ml de Hoechst 33258 em PBS durante 20 min à temperatura ambiente, lavadas com PBS e montadas em Vectashield. A morfologia nuclear foi analisada no microscópio de fluorescência (Eclipse E400, Nikon, Japan), equipado com um filtro de excitação com um máximo de transmissão a 360/400 nm, e processada no software de imagem da Nikon ACT-2U.

8. Estudos de proliferação

Para o estudo da proliferação foi utilizado o ensaio da incorporação da [^{3}H]-timidina. Três dias antes de se iniciar a experiência, as células MCF-7aro cultivadas em meio standard MEM foram transferidas para meio MEM sem vermelho de fenol com SBF a 5% pré-tratado com carvão para, como referido anteriormente, evitar a interferência de esteróides presentes no SBF, e os efeitos estrogénicos do vermelho de fenol (175). As células MCF-7aro foram cultivadas na densidade de 2.5×10^4 células/poço, em placas de 96 poços, em meio suplementado com 1 nM de testosterona, que foi usada como substrato da aromatase. Ao fim de 24 h, as células foram incubadas com diferentes concentrações dos compostos (10, 25, 50 μM). As incubações foram mantidas durante 2-6 dias. O meio e as soluções dos compostos foram mudados a cada três dias. A [^{3}H]-timidina (0.5 μCi) foi adicionada a cada poço 8 horas antes de terminar o respectivo tempo de incubação. Depois de ciclos de congelação/descongelação, as células foram recolhidas, com um aparelho semi-automático de colheita de células, *Cell harvester* (Skatron Instruments, Norway). Os filtros contendo o DNA foram colocados em tubos de cintilação e adicionados de 1 mL de líquido de cintilação. A [^{3}H]-timidina incorporada foi determinada num contador de cintilação (LS6500 Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA). Os ensaios foram realizados em triplicado e os resultados representam pelo menos três experiências independentes.

9. Estudo da viabilidade e morte celular

Para este ensaio foi utilizado o Kit Anexina V. Esta molécula apresenta grande afinidade para a fosfatidilserina, um fosfolípido que se localiza no folheto externo da membrana citoplasmática das células em apoptose. A dupla marcação com Anexina V-PE e 7-amino-actinomicina D (7-AAD) permite identificar e quantificar as células viáveis (anexina V^-/7-ADD^-), as células apoptóticas (anexina V^+/7-ADD^-) e as células necróticas (anexina V^+/7-ADD^+).

As células da linha celular MCF-7aro foram cultivadas numa densidade celular de 7×10^5 em frascos de 25 cm^3 em meio de cultura contendo 1 nM de testosterona com ou sem inibidores a diferentes concentrações (10-50 μM) durante 3 e 6 dias para o estudo de viabilidade e 3 dias para a análise da morte celular. As células não aderentes foram recolhidas e as aderentes foram tripsinizadas e lavadas. A contagem de células viáveis

foi efectuada em câmara de Neubauer usando o azul de tripano, como corante vital. Para cada situação todas as células recolhidas (não aderentes e aderentes) foram ressuspendidas e marcadas com 7-AAD diluído em PBS ou com tampão de ligação de Anexina V contendo 5 µl de 7-AAD e 5 µl de Anexina V-PE durante 15 min à temperatura ambiente. A morte celular foi avaliada num FACS Calibur (San José, CA, USA) baseado na aquisição de 20000 eventos. Os detectores *forward scatter* (FSC) e *side scatter* (SSC) foram colocados em escala linear, enquanto os detectores de fluorescência FL-1, FL-2 e FL-3 foram colocados em escala logarítmica. Para cada experiência foram efectuados os ajustes nas compensações respectivas. Após a aquisição, foi efectuada a análise dos resultados obtidos usando o programa CellQuest Pró.

10. Análise Estatística

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

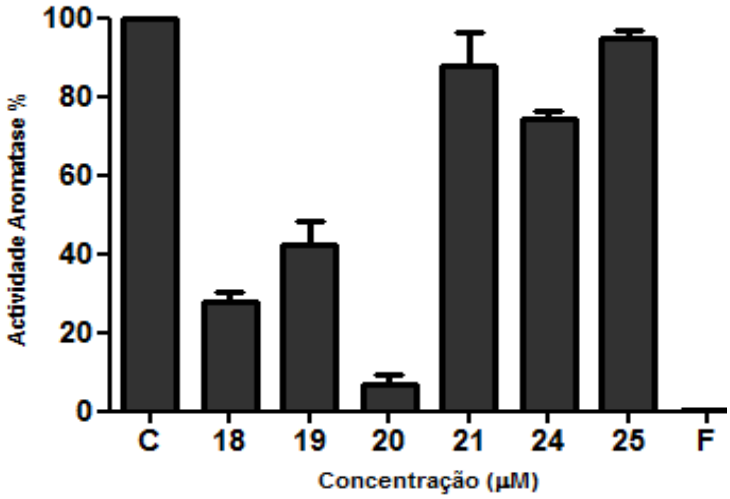
Capítulo III

Resultados

Resultados

1. Avaliação da inibição da actividade da aromatase em microssomas e na linha celular MCF-7aro

A inibição da actividade da aromatase pelos compostos esteróides, sintetizados com modificações nos anéis A e D foi avaliada em microssomas de placenta humana, por um método radiométrico, no qual a água titriada libertada do substrato, [1β-^{3}H] androstenediona, pela acção da aromatase foi usada como um índice de formação de estrogénio. Os resultados do ensaio de "screening" são apresentados como a percentagem de inibição de todos os compostos na concentração de 2 μM, relativamente ao ensaio na ausência do inibidor (Figura 14). O inibidor da aromatase 4-hidroxiandrostenediona (formestano), um potente inibidor da aromatase usado clinicamente, com uma capacidade de inibição de cerca de 99%, foi utilizado como composto de referência.



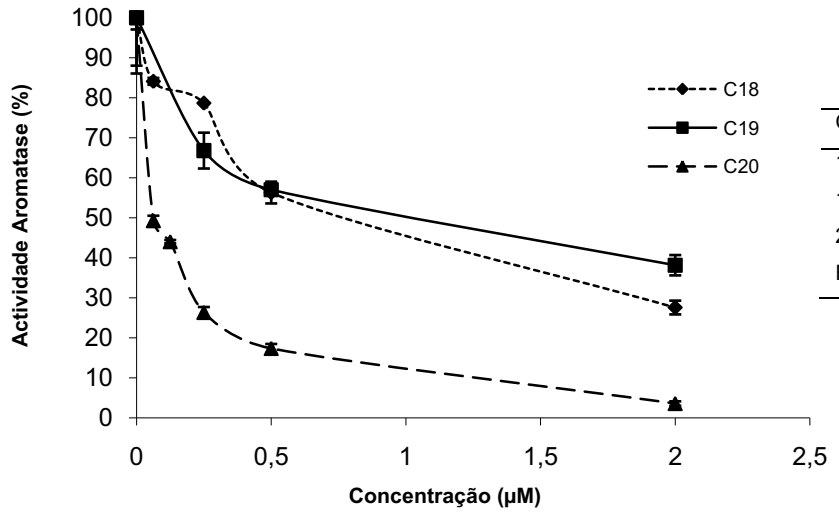
Compostos	Inibição % 2 μM
18	72,05 ±4,00
19	63,08±2,16
20	93,14±3,5
21	11,96±8,12
24	24,67±2,83
25	5,05±2,37
F	99,65±0,16

Figura 14. Inibição da actividade da aromatase pelos novos compostos esteróides. Para este ensaio foram usadas as concentrações de 40 nM [1β-^{3}H] androstenediona, 20 μg de proteína de microssomas de placenta humana, 2 μM de inibidor, com tempo de incubação de 15 min. Os resultados foram comparados com um controlo na ausência de inibidor. Os ensaios foram realizados em triplicado e os resultados representam a média±SEM de pelo menos três experiências independentes realizadas em triplicado. O formestano foi usado como composto inibidor de referência.

Na concentração de 2 μM, os compostos **18** e **20** demonstraram ser os mais potentes, com uma capacidade de inibição de cerca de 72,05%, e de 93,14% respectivamente. O composto **19**, com um hidroxilo com estereoquímica α, ou seja um epímero em C-3 do composto **20**, apresenta uma redução na actividade anti-aromatásica (63,08%). Do mesmo modo, a substituição do átomo de oxigénio do grupo carbonilo no anel D, no composto **3a**, por um átomo de enxofre, no composto **24**, induziu uma

diminuição acentuada da inibição da actividade (24,67%). A substituição do grupo carbonilo nos aneís D nos compostos **19** e **20** por um grupo hidroxilo (composto **25**) ou por um grupo acetato (composto **21**) resultou na diminuição drástica da actividade anti-aromatásica, apresentando uma actividade muito reduzida de cerca de 5,05% e de 11,96 %, respectivamente.

Para os compostos com uma capacidade de inibição superior a 60%, foram determinados os IC_{50}. Os valores de IC_{50} dos compostos encontram-se apresentados na Figura 15. O composto **20** mostra ser o composto mais potente entre os compostos analisados nestes ensaios, com um IC_{50} de 0,06 μM. O composto **18**, que em relação aos inibidores base **3a** e **3b**, tem a dupla ligação em C-2 em vez de C-3 e C4, apresenta uma redução acentuada na actividade anti-aromatásica, comparativamente a estes, com um IC_{50} de 0,743 μM. Refira-se que **3a** e **3b** apresentam IC_{50} da ordem de 0,225 μM e 0,06 μM (10, 170). O composto **19**, um epímero do composto **20** em C3, apresenta um valor de 0,9 μM para o IC_{50}, revelando a preferência pela estereoquímica 3β do grupo hidroxilo para uma melhor ligação à enzima.

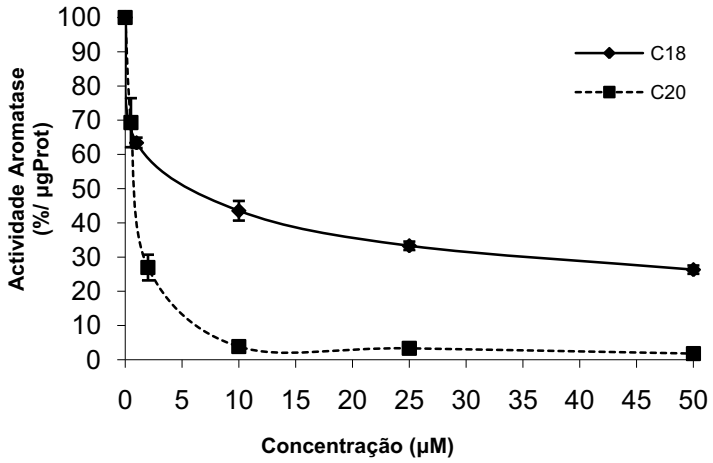


Compostos	IC_{50} (μM)
18	0,743
19	0,9
20	0,06
F	0,042

Figura 15. Avaliação da inibição da aromatase em microssomas de placenta humana. Para o ensaio de determinação do IC_{50}, foram usados, 20 μg de proteína dos microssomas, 40 nM [1β-^{3}H] androstenediona (1μCi), e concentrações entre 0,0625 e 2 μM dos compostos esteróides. O formestano a 0,5 μM foi utilizado como composto referência. Os resultados foram comparados com um controlo. Os ensaios foram realizados em triplicado e os resultados representam pelo menos três experiências independentes.

A actividade dos compostos esteróides **18** e **20** foi, ainda avaliada nas células MCF-7aro (Figura 16). Esta linha celular é considerada um bom modelo para análise de inibidores da aromatase, em cancro da mama, pois expressa elevados níveis de aromatase. Ambos os compostos apresentam uma actividade anti-aromatásica dependente da concentração. Tal como observado a nível dos microssomas, os

resultados obtidos para esta linha celular indicam que o composto **20** é o composto mais potente. No entanto, mostraram também, como seria de esperar, uma actividade superior nos microssomas de placenta relativamente à linha celular de cancro de mama. Obtiveram-se os valores de 5,15 e de 0,8 μM para o IC_{50} dos compostos **18** e **20**, respectivamente.



Compostos	IC_{50} (μM)
18	5,15
20	0,8
F	0,112

Figura 16. Avaliação da inibição da actividade da aromatase em células MCF-7aro.
O gráfico representa a inibição da actividade da aromatase pelos novos compostos esteróides modificados no anel A, C18 e C20. A actividade da aromatase foi medida pelo ensaio radiométrico e os resultados são representados relativamente à percentagem de água tritiada libertada em relação ao controlo. O formestano foi utilizado como inibidor de referência. Os resultados representam a média de pelo menos três experiências independentes realizadas em triplicado.

2. Estudos morfológicos

De forma a avaliar as possíveis alterações morfológicas induzidas, pelos compostos **18** e **20** as células MCF-7aro foram cultivadas com e sem compostos na presença de 1 nM de testosterona durante 2, 3 e 6 dias. As células foram analisadas por microscopia de contraste de fase e coradas pela coloração de Giemsa e de Hoechst. Nas células controlo, tratadas só com testosterona, não se observaram alterações durante os vários períodos de incubação (Figura 17,18,19, 20), tendo o mesmo acontecido para as células sujeitas ao tratamento com as várias concentrações ao fim de 48h.

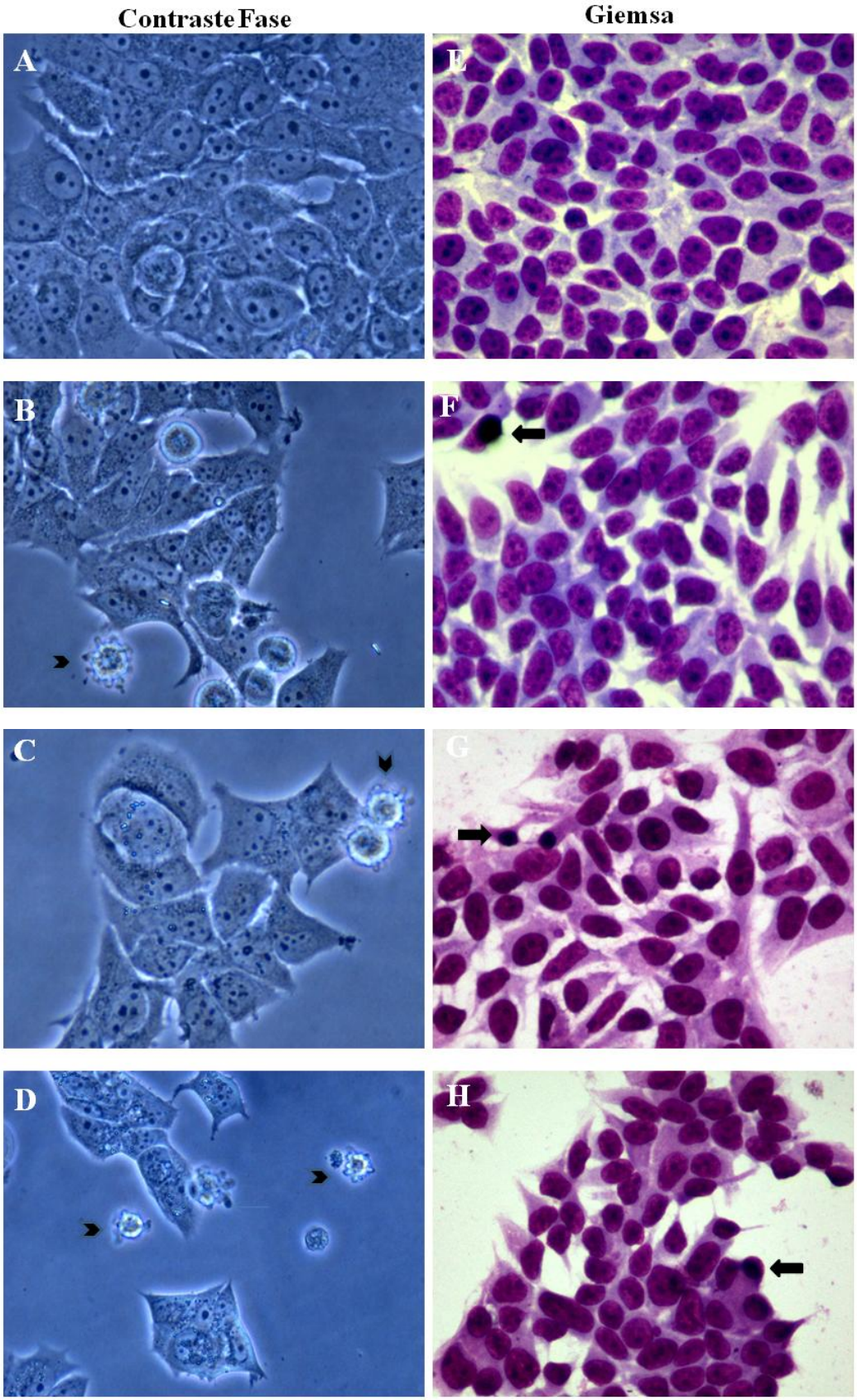


Figura 17. Alterações morfológicas das células MCF-7aro tratadas com o composto 18. Células controlo tratadas com 1 nM de testosterona (A, E); células tratadas com 10 μM (B, F), 25 μM (C, G) e 50 μM (D, H) durante três dias. Condensação de cromatina indicada por (⬅) e "blebbings" membranares por (➢). Ampliação original (x400).

As alterações observadas ao fim de três e seis dias mostraram, para o composto **18,** a presença de condensação de cromatina e formação de "blebbings" membranares em algumas células a 10, 25 e 50 μM (Figura 17). Observou-se ainda, alguma vacuolização do citoplasma, ao fim de seis dias de incubação para as doses de 25 e de 50 μM (Figura 18).

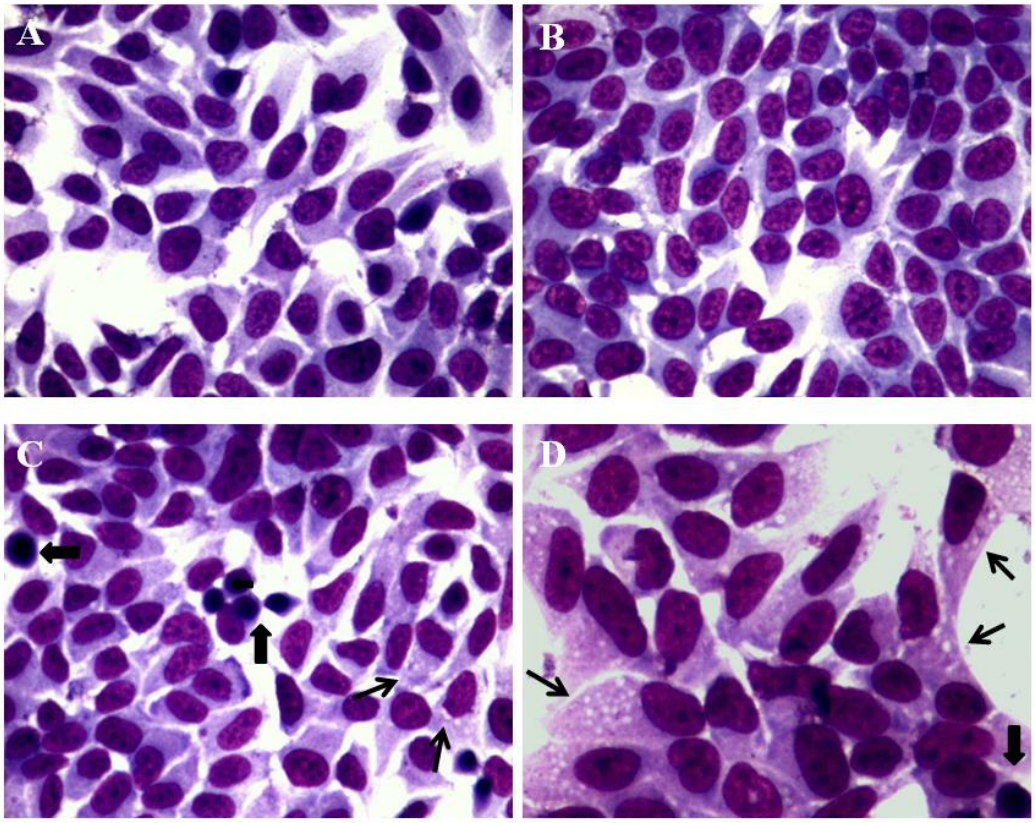


Figura 18. Efeitos do composto 18 na morfologia celular avaliados pela coloração de Giemsa. As células MCF-7aro foram incubadas na ausência (A) ou na presença de 10 μM (B), 25 μM (C) e 50 μM (D) em meio com 1 nM de T durante seis dias. A coloração de Giemsa mostra que algumas células tratadas com 25 μM apresentam condensação de cromatina (⬅). A 25 e 50 μM observa-se vacuolização do citoplasma (→)**.** Ampliação original (x400).

Para o composto **20**, as alterações morfológicas induzidas não são tão evidentes, tendo-se observado também condensação de cromatina e formação de "blebbings" de membrana, essencialmente para as concentrações de 25 e 50 μM ao fim de três e seis dias (Figura 19 e 20). Para o composto **20** observou-se, ainda, uma ligeira vacuolização do citoplasma para as concentrações de 25 e 50 μM ao fim de seis dias.

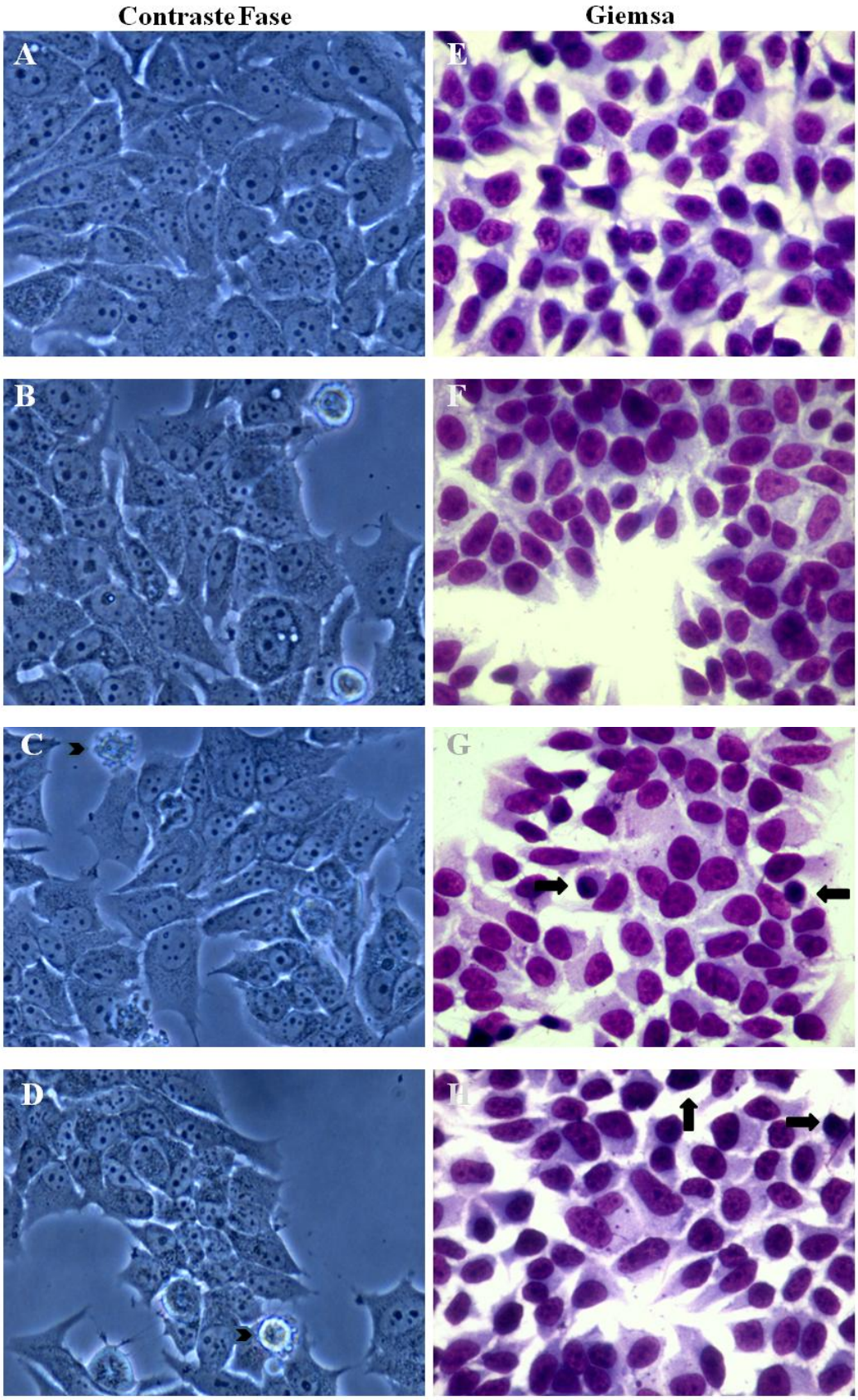


Figura 19. Alterações morfológicas das células MCF-7aro tratadas com o composto 20. Células controlo tratadas com 1 nM de testosterona (A, E); celulas tratadas com 10 μM (B, F), 25 μM (C, G) e 50 μM (D, H) durante três dias. Condensação de cromatina indicada por (⬅) e "blebbing" membranar por (➡). Ampliação original (x400).

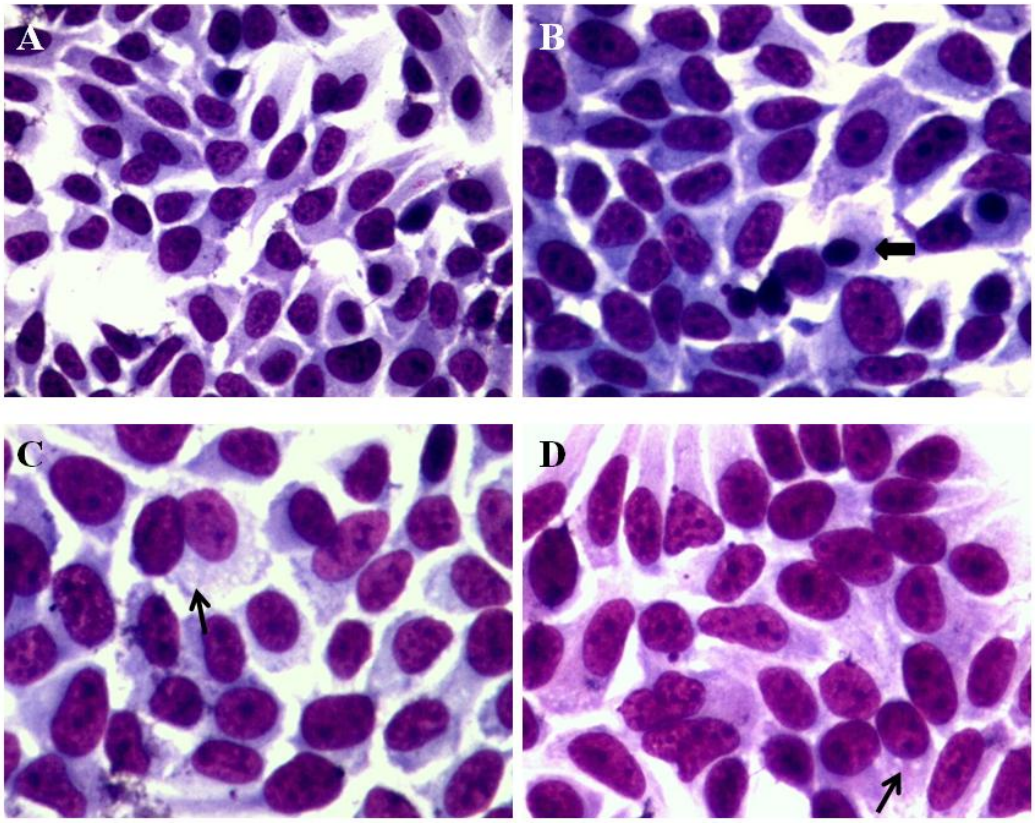


Figura 20. Efeitos do composto 20 na morfologia celular avaliados pela coloração de Giemsa. As células MCF-7aro foram observadas na ausência (A) ou na presença de 10 μM (B), 25 μM (C), 50 μM (D) em meio com 1 nM de testosterona, durante seis dias. A 25 e 50 μM observa-se uma ligeira vacuolização do citoplasma (→). Condensação de cromatina indicada por (⬅). Ampliação original (x400).

As alterações morfológicas, como condensação de cromatina, sugerem um efeito dependente da concentração e também do tempo de exposição. A alteração da membrana denominada por "blebbing" é visível aos três dias para os compostos **18** e **20** em todas as concentrações, enquanto a vacuolização do citoplasma só é observada para as concentrações mais elevadas e ao fim de seis dias.

A coloração de Hoechst foi usada para confirmar as alterações nucleares observadas nas concentrações mais elevadas na coloração de Giemsa aos três e seis dias. Observou-se um ligeiro aumento do número de células com condensação de cromatina para o composto **18** (Figura 21) para as concentrações de 25 e 50 μM. Para o composto **20** (Figura 22) observou-se, em comparação com o composto **18** um menor número de células com estas alterações.

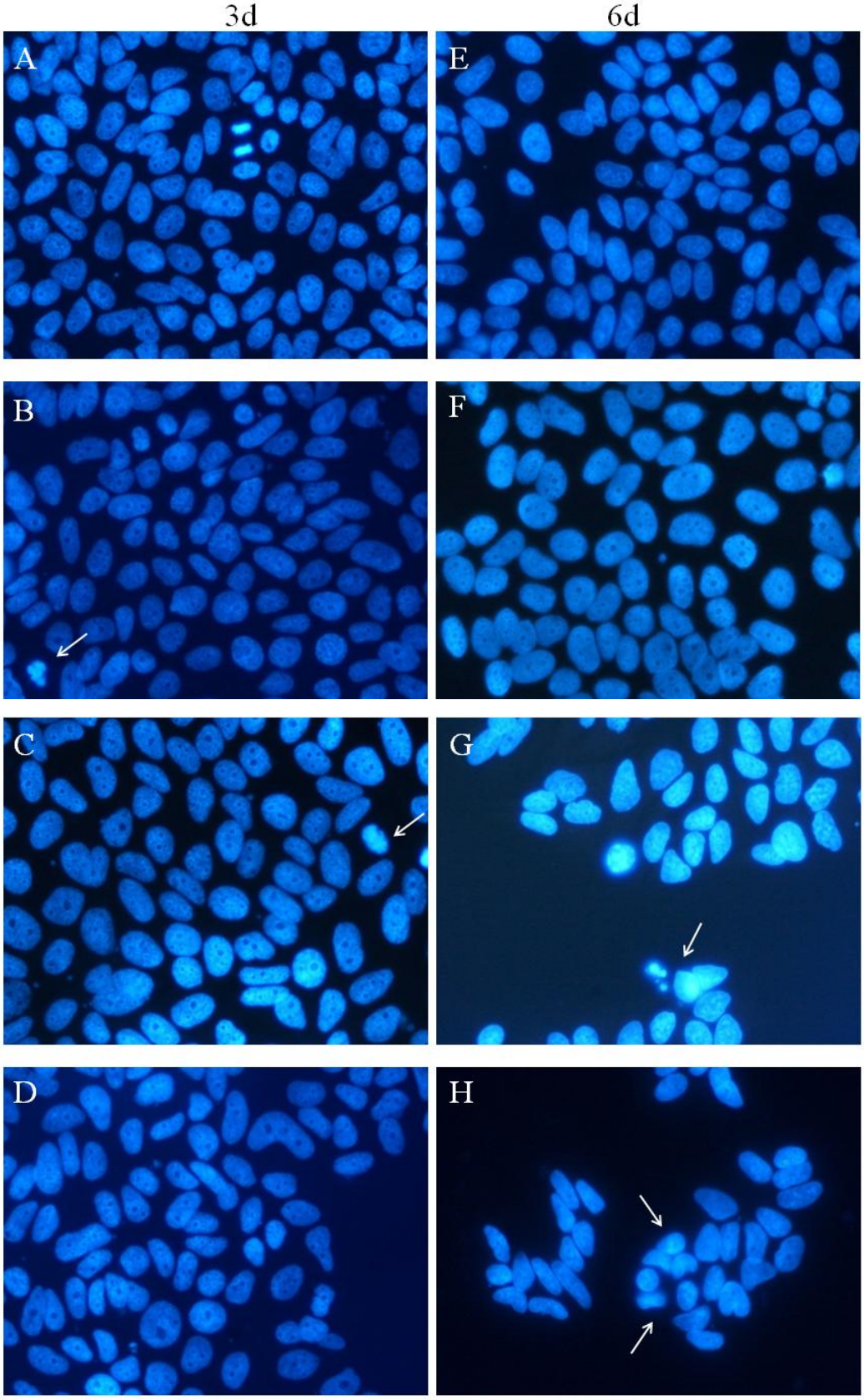


Figura 21. Alterações da morfologia nuclear das células MCF-7aro tratadas com o composto 18 observadas pela coloração de Hoechst. Ausência (A, E) ou na presença de 10 μM (B, F), 25 μM (C, G) e 50 μM (D, H) em meio com 1 nM de testosterona durante três e seis dias. A condensação de cromatina é indicada por (→). Ampliação original (x400).

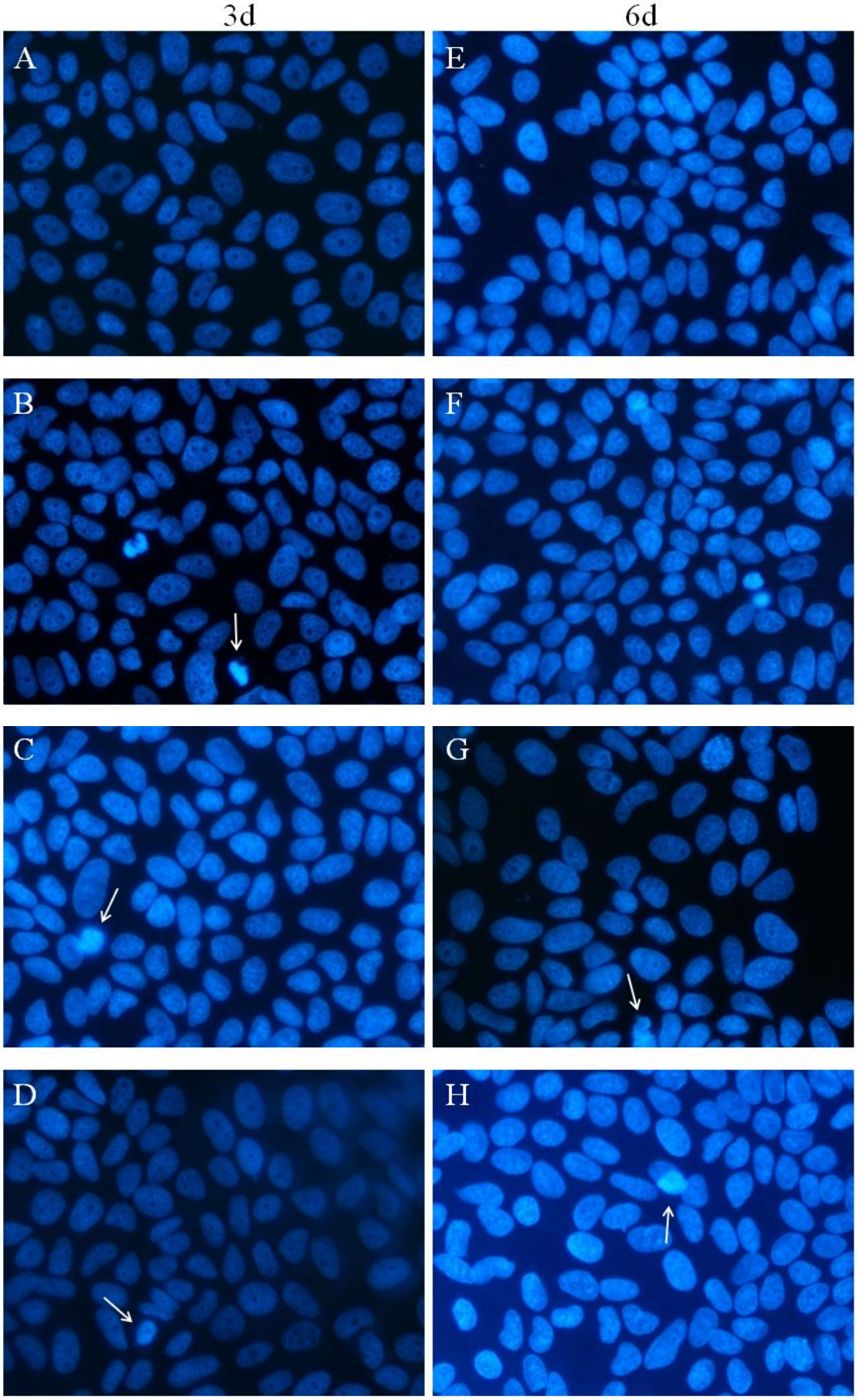


Figura 22. Alterações da morfologia nuclear das células MCF-7aro tratadas com o composto 20 observadas pela coloração de Hoechst. Ausência (A, E) ou na presença de 10 μM (B, F), 25 μM (C, G) e 50 μM (D, H) em meio com 1 nM de testosterona durante três e seis dias. A condensação de cromatina é indicada por (→). Ampliação original (x400).

3. Análise da viabilidade, proliferação e morte celular

Para analisar o efeito dos compostos na proliferação das células MCF-7aro, foi realizado o ensaio de incorporação de [^{3}H]-timidina. De acordo com os resultados apresentados na Figura 23, estes compostos induzem uma diminuição da proliferação celular que é só dependente da concentração, obtendo-se um perfil de inibição semelhante para os diferentes tempos de incubação (2, 3 e 6 dias). De notar que o composto **18** parece ser mais eficaz que o composto **20**, embora só para as doses de 50μM.

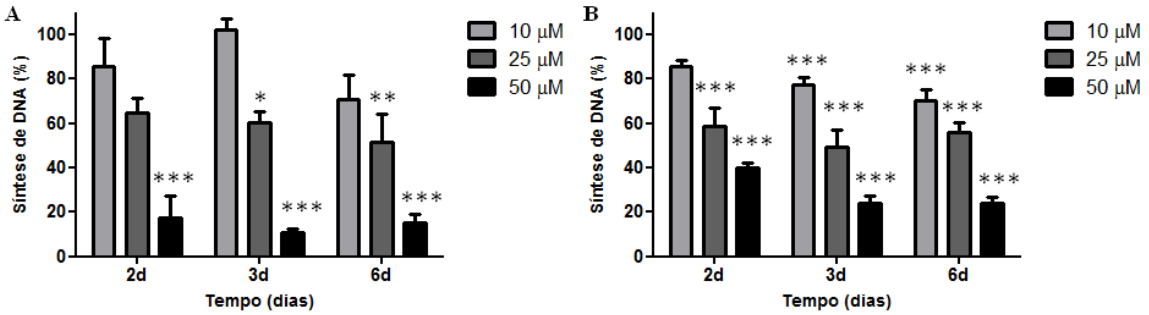


Figura 23. Efeito dos inibidores 18 e 20 na síntese de DNA. As células MCF-7aro foram cultivadas durante 2, 3 e 6 dias, em meio com 1 nM de testosterona na ausência ou na presença do composto 18 (A) e do composto 20 (B). Células cultivadas em meio apenas com testosterona representam o máximo de proliferação celular e foram consideradas como controlo. Os compostos induzem um decréscimo na proliferação celular, avaliado pela incorporação de timidina tritiada, dependente da dose. Os resultados representam pelo menos três experiências independentes e todos relativos a ensaios em triplicado. Os resultados são expressos em média±SEM. As diferenças significativas em relação ao controlo são conotadas como ***(p<0,001), **(p<0,01),*(p<0,05).

Dado que ocorria uma diminuição da proliferação foram analisados os efeitos dos compostos a nível da viabilidade celular por citometria de fluxo usando o corante vital, 7-amino-actinomicina (7-AAD), para permitir a identificação de células viáveis/apoptóticas (7-ADD$^-$) e de células necróticas (7-ADD$^+$). Para este ensaio foram usadas as mesmas concentrações dos compostos e os mesmos tempos de incubação utilizados para a avaliação do efeito na proliferação celular. O tratamento das células com os inibidores, para 3 e 6 dias, resultou num aumento do número de células 7-ADD$^+$ a partir da concentração de 25 μM (p<0,001) para o composto **18**, enquanto, para o composto **20**, este aumento só se verificou aos 50 μM (para os 3 dias p<0,001 e para os 6 dias p<0,05) (Figura 24).

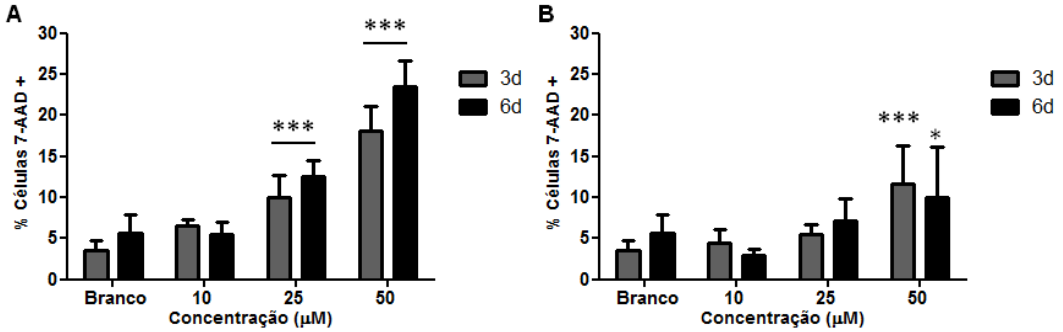


Figura 24. Efeito dos compostos 18 e 20 na viabilidade celular. As células MCF-7aro tratadas com os compostos 18 (A) e 20 (B) apresentam um aumento na marcação com 7-AAD para as doses mais elevadas em comparação com as células controlo. Os resultados estão expressos em percentagem de células 7-AAD^{+}, e são representativos de três experiências independentes realizadas em duplicado.Os resultados são expressos em média±SEM. As diferenças significativas, relativas ao controlo, são conotadas como ***(*p<0,001),* **(*p* <0,01), *(*p*<0,05).

O tipo de morte celular induzida por estes compostos foi avaliado por citometria de fluxo através da marcação da anexina V-PE, que permite analisar a translocação dos resíduos de fosfatidilserina para a camada externa da membrana celular, que ocorre quando as células iniciam um procesoo apoptótico. A marcação com a anexina foi realizada em associação com o corante 7-ADD, para identificar as células viáveis (Anexina V-PE^{-}/7-AAD^{-}), apoptóticas (Anexina V-PE^{+}/7-AAD^{+}) ou necróticas (Anexina V-PE^{-}/7-AAD^{+}). Esta análise foi realizada a partir da aquisição de 20 000 células dentro da região R1 (Figura 25).

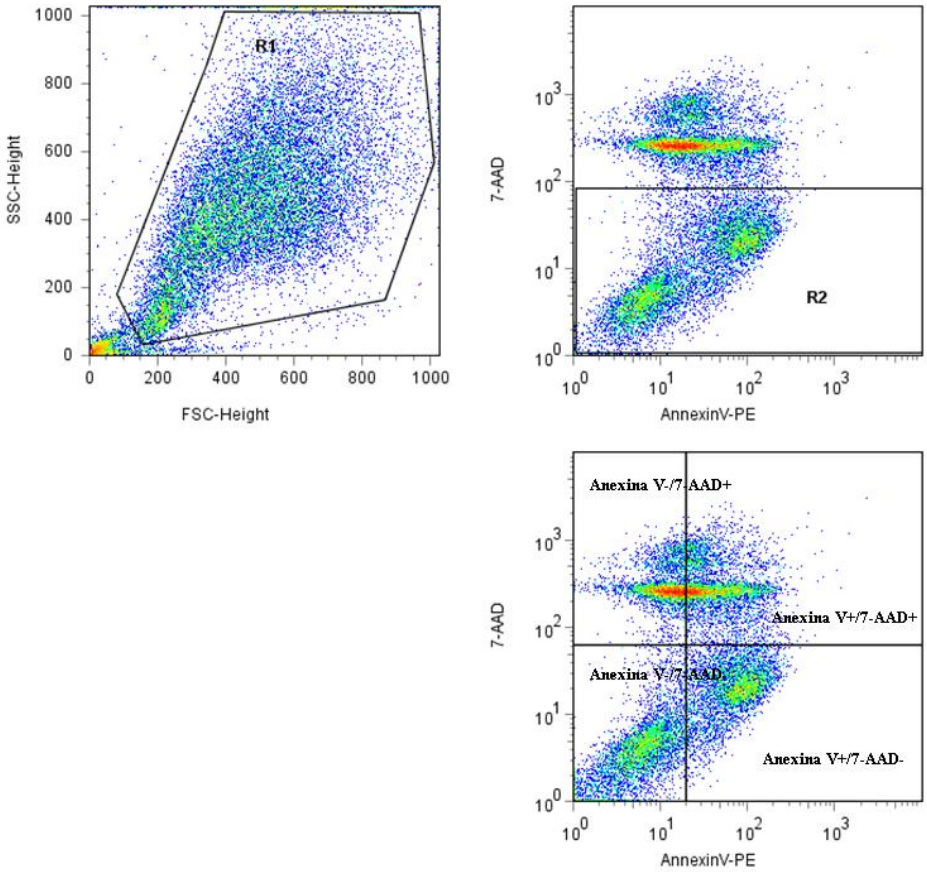


Figura 25. Regiões seleccionadas para análise de viabilidade celular e apoptose (R1 e R2).

Enquanto as células MCF-7aro não tratadas (controlo) apresentavam uma percentagem de 5,6% de ligação à anexina (Figura 26), nas células tratadas com o inibidor **18** a 10 e 25 μM observou-se só um ligeiro aumento (6,4 e 6,6%, respectivamente). No entanto, a concentração de 50 μM induziu um aumento acentuado, de cerca de 5 vezes (27,9%). O composto **20**, apresentou um comportamento idêntico, observando-se um aumento de ligação à anexina V-PE, para a concentração de 50 μM (16,9%) em comparação com o controlo (4,9%) não tão significativas como para o composto **18**. Para as concentrações inferiores o número de células anexinaV-PE positivas era idêntico ao controlo.

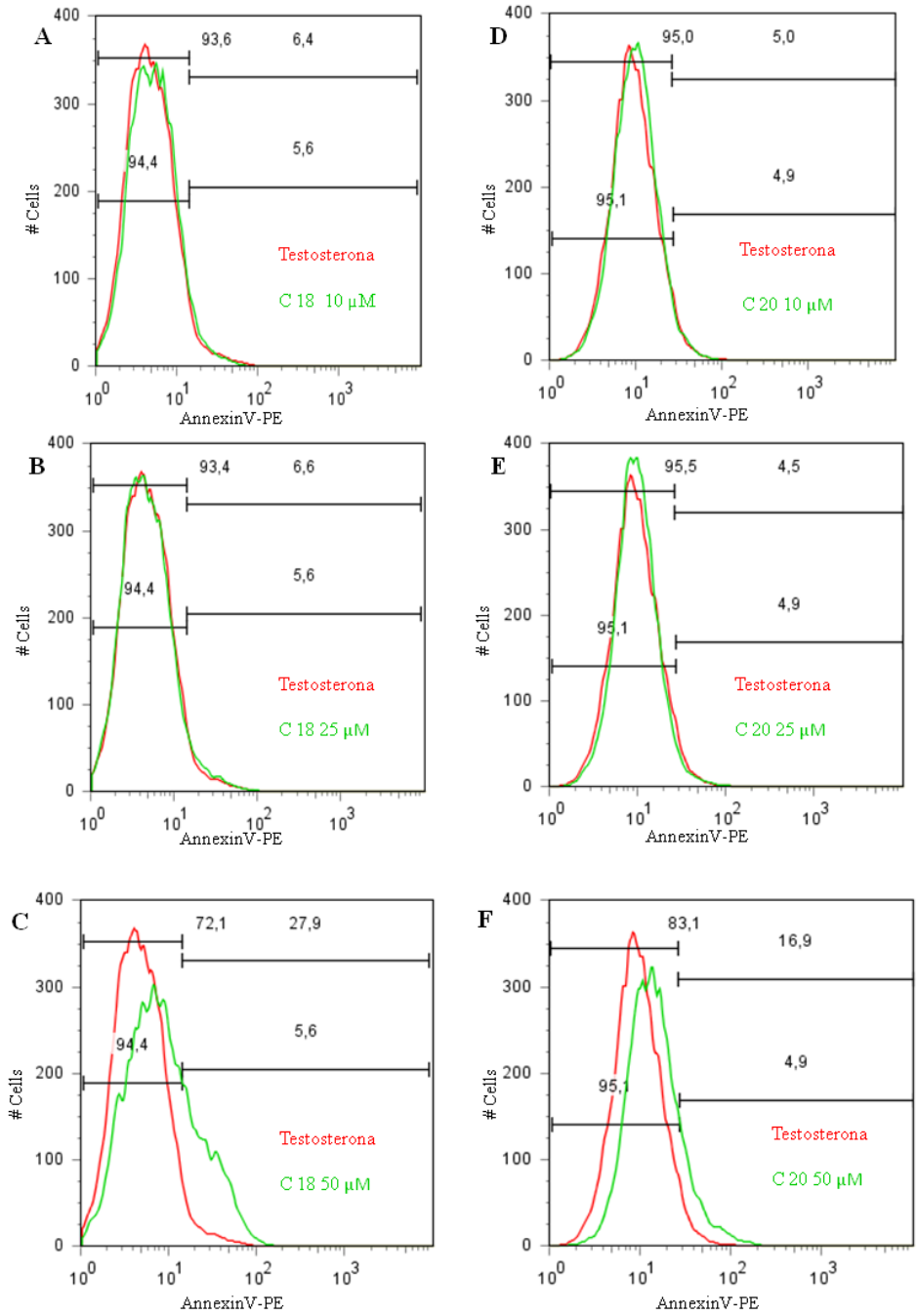


Figura 26. Marcação das células MCF-7aro, com Anexina V-PE. As células MCF-7aro foram tratadas com o composto 18 (A, B, C) e 20 (D, E, F) nas concentrações de 10, 25 e 50 µM, respectivamente e após três dias de cultura, foram marcadas com Anexina V-PE e 7-AAD e analisadas por citometria de fluxo. Nos histogramas estão referidas as percentagens de células AnexinaV-negativas e positivas sem ou com tratamento com os compostos. Os histogramas representados a vermelho correspondem aos resultados obtidos para o ensaio controlo. Os ensaios foram realizados em duplicado e os resultados representam pelo menos duas experiências independentes.

Capítulo IV

Discussão e Conclusões

Discussão e Conclusões

O cancro da mama é a forma mais comum de cancro em mulheres, em todas as idades e em todo o mundo. Os estrogénios apresentam um papel importante no crescimento e desenvolvimento do cancro da mama hormono-dependente. Assim, estratégias que inibam os efeitos destas hormonas são uma boa opção terapêutica. Em mulheres pós-menopáusicas são propostas várias hipóteses de tratamento, tais como o uso de SERMs, SERDs e IAs. Recentemente os IAs de terceira geração surgem como uma opção cada vez mais instituída em mulheres pós-menopáusicas. Estes IAs têm demonstrado ser mais eficazes e apresentado menos efeitos secundários que o tamoxifeno, considerado nestes últimos 30 anos como o "gold standard" para o tratamento do cancro da mama estrogénio-dependente. No entanto, a terapêutica com IAs apresenta complicações graves tais como, a redução da densidade mineral óssea e um aumento do risco de fracturas. A pesquisa de novas moléculas como potenciais IAs pode contribuir para aprofundar o conhecimento das interacções dos inibidores com a enzima, originando dados importantes para a relação estrutura-actividade e para a síntese de novos IAs mais potentes e específicos. Por outro lado, ainda não de conhece totalmente o modo como os IAs actuam nas células cancerígenas nem os mecanismos celulares que levam ao aparecimento de resistências.

Assim, este trabalho pretende investigar os efeitos biológicos de seis novas moléculas esteróides como potenciais inibidores da aromatase. Estes foram desenhados com modificações no anel A e D, tendo por base dois compostos, o composto 5α-androst-3-eno-17-ona (**3a**) e o composto androst-4eno-17ona (**3b**), derivados da androstenediona. O primeiro composto foi, como já referido, sintetizado e testado pelo nosso grupo de investigação (10) enquanto o segundo foi estudado por Numazawa e col. (170). Ambos mostraram ser potentes inibidores da aromatase em microssomas de placenta, com IC_{50} de 0,225 e 0,06 μM, respectivamente.

Os estudos de relação estrutura-actividade descritos, demonstram a existência de algumas características químicas, nos aneis A e D da estrutura esteróide, determinantes para a actividade anti-aromatásica dos compostos. De facto, a planaridade do anel A e, especialmente, da fusão entre o anel A e B e a esteroquímica 5α são fundamentais para se observar inibição (10, 171, 177-179). A existência de um grupo hidroxilo ou carbonilo em C-17 (86) é também importante para assegurar a actividade anti-aromatásica.

A capacidade de inibição da aromatase dos seis compostos foi testada em microssomas de placenta humana. Os resultados obtidos demonstraram que os compostos **18** e **20** eram os mais potentes. O composto **18** contem uma dupla ligação C-

2/3 em vez da C-3/4 do composto **3a.** A troca de posição da dupla ligação não se mostrou favorável, uma vez que a capacidade de inibição reduziu de 95,9% (10), para 72,05%.

Os compostos **19** e **20**, resultam de alterações no composto **3b**, que mostrou ser um potente inibidor (170). Os compostos **19** e **20** são epímeros exibindo respectivamente estereoquímica 3α e 3β. O composto **20** mostra ser mais potente com cerca de 93,14% de inibição da actividade da aromatase, enquanto o composto **19** apresenta uma inibição de cerca de 63,08%. Este resultado revela que o grupo hidroxilo em posição β favorecerá a actividade inibitória da aromatase devido, provavelmente, a uma melhor interacção da enzima com o grupo com esta estereoquímica do que com o mesmo grupo posicionado em 3α.

Os compostos **21** e **25**, resultam de substituições em C-17 nos compostos **20** e **19** respectivamente. Para o composto **21** o grupo carbonilo em C-17 foi substituído por um grupo acetato o que resultou numa redução drástica da capacidade de inibição, visto que, de 93,14% de inibição do composto **20**, se obteve apenas 11,96%. Para o composto **25** o grupo carbonilo foi substituído por um grupo hidroxilo o que também resultou na diminuição radical da capacidade de inibição da enzima (5,05%). O composto **24** ao contrário do composto **21** e **25** resultou de uma modificação no composto **3a**, a substituição do grupo carbonilo em C-17 por um grupo tiona, demonstra uma redução muito acentuada da capacidade de inibição deste composto (24,67%) que é bastante inferior ao composto de origem. No entanto, esta baixa actividade pode ser devida a alguma instabilidade química do composto.

De facto, a substituição do grupo carbonilo em C-17, no anel D, por outros grupos, entre os quais o grupo acetato, hidroxilo e tiona, como os agora estudados, altera drásticamente a capacidade de inibição da aromatase. Estes resultados estão de acordo com estudos prévios desenvolvidos pelo nosso grupo (180) em que mostraram a importância do grupo carbonilo em C-17.

A partir deste estudo inicial, determinou-se o IC_{50} dos compostos mais potentes, **18**, **19** e **20**, em microssomas de placenta. O composto **20** demonstrou maior capacidade de inibição, com um IC_{50} de 0,06 μM, seguido do composto **18** (0,743 μM). A capacidade de inibição destes compostos foi posteriormente estudada num sistema de células em cultura, ou seja, na linha celular de cancro da mama MCF-7 transfectada com o gene da aromatase (MCF-7aro). Os compostos **18** e **20** demonstraram uma diminuição da capacidade de inibição da aromatase neste sistema, tendo como valores de IC_{50} 5,15 e 0,8 μM, respectivamente. A linha celular MCF-7aro possui elevadas quantidades de aromatase podendo assim explicar os valores superiores aos obtidos a nível dos

microssomas de placenta, um sistema onde a aromatase se encontra mais disponível para a acção do inibidor. Outros estudos também comprovaram estas observações com outros compostos esteróides neste sistema (13, 180, 181).

Os efeitos dos compostos **18** e **20** foram ainda avaliados a nível da proliferação e morte celular. A linha celular de cancro da mama MCF-7aro expressa a aromatase em quantidade suficiente para estimular a proliferação celular através da aromatização da testosterona a estradiol. A testosterona estimula o crescimento celular das células MCF-7aro em concentrações que chegam a um valor mínimo de 1 nM, e que se encontram dentro da concentração fisiológica média para esta hormona. Os compostos **18** e **20** provaram que para além de serem potentes inibidores da aromatase, também inibem a acção proliferativa da testosterona em células MCF-7aro de uma forma dependente da dose e independente do tempo, já que o perfil de inibição, aos 3 e 6 dias, é semelhante com o aumento das concentrações.

A diminuição da proliferação observada pode estar associada à retenção do ciclo celular ou à indução de morte celular. Esta foi demonstrada pela redução na percentagem de células viáveis que se observa com marcação 7-AAD. Com este estudo também se observou um aumento da morte celular, dependente da dose, induzindo o composto **18** maior percentagem de células 7-AAD-positivas, principalmente na concentração de 50 μM, logo após 3 dias de tratamento. De forma a esclarecer o mecanismo de morte celular induzido por estes compostos foi também efectuada a marcação com anexina-V, a qual reflecte a morte por apoptose, dado que marca os resíduos de fosfatidilserina expostos na camada externa da membrana, uma das características de apoptose. No entanto, só na concentração de 50 μM ocorre um aumento significativo na percentagem de células ligadas à anexina-V, especialmente para o composto **18**. Para concentrações inferiores a 50 μM a ligação é similar à verificada para o controlo. Estes estudos são preliminares pelo que carecem de mais experiências, sobretudo com outros tempos de incubação. De qualquer modo, estes resultados sugerem que o composto **18** apesar de menos potente a nível de actividade anti-aromatásica é mais eficaz na indução de apoptose e provoca um aumento do número de células 7-AAD-positivas o que sugere também uma maior toxicidade a nível celular. Embora não se tenha estudado o efeito a nível do ciclo celular, sabe-se que alguns IAs induzem retenção de fase G_0/G_1 do ciclo celular (13), o que poderá também explicar em parte os nossos resultados ao nível da diminução da proliferação.

Os compostos **18** e **20** induzem, para além da inibição da proliferação e indução de morte celular, alterações morfológicas típicas de apoptose, como, condensação de cromatina, “blebbings” membranares, e, ainda, vacuolização, característica da morte por

autofagia. Recentemente, no nosso labotratorio foram também obtidas alterações semelhantes para outros compostos esteróides (13). Em vários estudos *in vivo* e *in vitro* (182) verifica-se que a diminuição de estrogénicos e tratamento com tamoxifeno (166) fulvestrant e alguns inibidores da aromatase (164) induzem apoptose em células de cancro da mama. No entanto, outros autores referem ainda que o tamoxifeno induz morte por autofagia na linha celular MCF-7 (167). Assim, parece que diferentes vias de morte celular programada podem ser induzidas por inibidores da aromatase, podendo ocorrer interacções entre estes dois tipos de morte. Contudo, a base molecular que promove a troca entre estas, ainda não se encontra definida. Vários autores, apontam para um eventual "cross-talk" entre a morte por apoptose e autofagia, sugerindo que a apoptose pode ser precedida e pode mesmo depender da autofagia (183) ou a autofagia pode antagonizar e atrasar o processo apoptótico (165). Na verdade, para além de características comuns, existem factores que parecem intervir nestes dois tipos de morte, como é o caso das proteínas da família Bcl-2 e a caspase-9 (184).

Em síntese, para compreender o mecanismo de acção dos IAs a nível molecular é essencial ter em consideração as modificações estruturais e o modo como condicionam a ligação ao local activo da aromatase. Os resultados obtidos poderão contribuir para o desenvolvimento de novas moléculas com diferentes modificações estruturais, que apresentem forte capacidade de inibição e menos efeitos secundários. Por outro lado, poderão, ainda, elucidar o modo de acção dos IAs tipo esteróide a nível da indução da morte celular programada por apoptose e/ou autofagia, permitindo desta forma uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na regressão de tumores de mama estrogénio-dependentes.

Capítulo V

Referências Bibliográficas

1. Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. J Clin Oncol. 2006 May 10;24(14):2137-50.

2. Dey S, Soliman AS, Merajver SD. Xenoestrogens may be the cause of high and increasing rates of hormone receptor positive breast cancer in the world. Med Hypotheses. 2009 Jun;72(6):652-6.

3. Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Erratum: Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. Int. J. Cancer, 83, 18-29 (1999). Int J Cancer. 1999 Dec 10;83(6):870-3.

4. Benson JR, Jatoi I, Keisch M, Esteva FJ, Makris A, Jordan VC. Early breast cancer. Lancet. 2009 Apr 25;373(9673):1463-79.

5. Bastos J, Barros H, Lunet N. Evolução da mortalidade por cancro da mama em Portugal (1955-2002). Acta Med Port. 2007;20:139-44.

6. Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. J Clin Invest. 2007 Nov;117(11):3155-63.

7. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. Ann Oncol. 2005 Oct;16(10):1569-83.

8. Huang WY, Newman B, Millikan RC, Schell MJ, Hulka BS, Moorman PG. Hormone-related factors and risk of breast cancer in relation to estrogen receptor and progesterone receptor status. Am J Epidemiol. 2000 Apr 1;151(7):703-14.

9. Sedlacek SM, Horwitz KB. The role of progestins and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. Steroids. 1984 Dec;44(6):467-84.

10. Cepa MM, Tavares da Silva EJ, Correia-da-Silva G, Roleira FM, Teixeira NA. Structure-activity relationships of new A,D-ring modified steroids as aromatase inhibitors: design, synthesis, and biological activity evaluation. J Med Chem. 2005 Oct 6;48(20):6379-85.

11. Bhatnagar AS. The discovery and mechanism of action of letrozole. Breast Cancer Res Treat. 2007;105 Suppl 1:7-17.

12. Jordan VC, Brodie AM. Development and evolution of therapies targeted to the estrogen receptor for the treatment and prevention of breast cancer. Steroids. 2007 Jan;72(1):7-25.

13. Cepa M, Correia-da-Silva G, da Silva EJ, Roleira FM, Borges M, Teixeira NA. New steroidal aromatase inhibitors: suppression of estrogen-dependent breast cancer cell proliferation and induction of cell death. BMC Cell Biol. 2008;9:41.

14. Poola I, Yue Q. Estrogen receptor alpha (ER alpha) mRNA copy numbers in immunohistochemically ER alpha-positive-, and negative breast cancer tissues. BMC Cancer. 2007;7:56.

15. Subramanian A, Salhab M, Mokbel K. Oestrogen producing enzymes and mammary carcinogenesis: a review. Breast Cancer Res Treat. 2008 Sep;111(2):191-202.

16. Yager JD, Liehr JG. Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1996;36:203-32.

17. Santen RJ. Inhibition of aromatase: insights from recent studies. Steroids. 2003 Sep;68(7-8):559-67.

18. Miller WR. Biological rationale for endocrine therapy in breast cancer. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2004 Mar;18(1):1-32.

19. Chen S, Zhou D, Okubo T, Kao YC, Yang C. Breast tumor aromatase: functional role and transcriptional regulation. Endocr Relat Cancer. 1999 Jun;6(2):149-56.

20. Kirschner MA, Schneider G, Ertel NH, Worton E. Obesity, androgens, estrogens, and cancer risk. Cancer Res. 1982 Aug;42(8 Suppl):3281s-5s.

21. Perel E, Killinger DW. The interconversion and aromatization of androgens by human adipose tissue. J Steroid Biochem. 1979 Jun;10(6):623-7.

22. Schweikert HU, Milewich L, Wilson JD. Aromatization of androstenedione by cultured human fibroblasts. J Clin Endocrinol Metab. 1976 Oct;43(4):785-95.

23. Longcope C. Methods and results of aromatization studies in vivo. Cancer Res. 1982 Aug;42(8 Suppl):3307s-11s.

24. Smuk M, Schwers J. Aromatization of androstenedione by human adult liver in vitro. J Clin Endocrinol Metab. 1977 Nov;45(5):1009-12.

25. Miller WR, Mullen P, Sourdaine P, Watson C, Dixon JM, Telford J. Regulation of aromatase activity within the breast. J Steroid Biochem Mol Biol. 1997 Apr;61(3-6):193-202.

26. Labrie F, Belanger A, Cusan L, Gomez JL, Candas B. Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging. J Clin Endocrinol Metab. 1997 Aug;82(8):2396-402.

27. Simpson ER. Sources of estrogen and their importance. J Steroid Biochem Mol Biol. 2003 Sep;86(3-5):225-30.

28. Pasqualini JR. Estrogen sulfotransferases in breast and endometrial cancers. Ann N Y Acad Sci. 2009 Feb;1155:88-98.

29. Thompson EA, Jr., Siiteri PK. Utilization of oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstenedione. J Biol Chem. 1974 Sep 10;249(17):5364-72.

30. Bulun SE, Simpson ER. Regulation of aromatase expression in human tissues. Breast Cancer Res Treat. 1994;30(1):19-29.

31. Blankenstein MA, Szymczak J, Daroszewski J, Milewicz A, Thijssen JH. Estrogens in plasma and fatty tissue from breast cancer patients and women undergoing surgery for non-oncological reasons. Gynecol Endocrinol. 1992 Mar;6(1):13-7.

32. Hackett JC, Brueggemeier RW, Hadad CM. The final catalytic step of cytochrome p450 aromatase: a density functional theory study. J Am Chem Soc. 2005 Apr 13;127(14):5224-37.

33. Pearce ST, Jordan VC. The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. Crit Rev Oncol Hematol. 2004 Apr;50(1):3-22.

34. Jordan VC. Antiestrogens and selective estrogen receptor modulators as multifunctional medicines. 1. Receptor interactions. J Med Chem. 2003 Mar 13;46(6):883-908.

35. Jordan VC. Antiestrogens and selective estrogen receptor modulators as multifunctional medicines. 2. Clinical considerations and new agents. J Med Chem. 2003 Mar 27;46(7):1081-111.

36. Osborne CK, Schiff R. Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. J Clin Oncol. 2005 Mar 10;23(8):1616-22.

37. Arpino G, Wiechmann L, Osborne CK, Schiff R. Crosstalk between the estrogen receptor and the HER tyrosine kinase receptor family: molecular mechanism and clinical implications for endocrine therapy resistance. Endocr Rev. 2008 Apr;29(2):217-33.

38. Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. Nucleic Acids Res. 2001 Jul 15;29(14):2905-19.

39. Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, et al. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. J Clin Endocrinol Metab. 1997 Dec;82(12):4258-65.

40. Speirs V, Carder PJ, Lansdown MR. Oestrogen receptor beta: how should we measure this? Br J Cancer. 2002 Sep 9;87(6):687; author reply 8-9.

41. Hall JM, McDonnell DP. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. Endocrinology. 1999 Dec;140(12):5566-78.

42. Hopp TA, Weiss HL, Parra IS, Cui Y, Osborne CK, Fuqua SA. Low levels of estrogen receptor beta protein predict resistance to tamoxifen therapy in breast cancer. Clin Cancer Res. 2004 Nov 15;10(22):7490-9.

43. Roger P, Sahla ME, Makela S, Gustafsson JA, Baldet P, Rochefort H. Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. Cancer Res. 2001 Mar 15;61(6):2537-41.

44. Shaw JA, Udokang K, Mosquera JM, Chauhan H, Jones JL, Walker RA. Oestrogen receptors alpha and beta differ in normal human breast and breast carcinomas. J Pathol. 2002 Dec;198(4):450-7.

45. Williams C, Edvardsson K, Lewandowski SA, Strom A, Gustafsson JA. A genome-wide study of the repressive effects of estrogen receptor beta on estrogen receptor alpha signaling in breast cancer cells. Oncogene. 2008 Feb 7;27(7):1019-32.

46. Emmen JM, Couse JF, Elmore SA, Yates MM, Kissling GE, Korach KS. In vitro growth and ovulation of follicles from ovaries of estrogen receptor (ER){alpha} and ER{beta} null mice indicate a role for ER{beta} in follicular maturation. Endocrinology. 2005 Jun;146(6):2817-26.

47. Harris HA. Estrogen receptor-beta: recent lessons from in vivo studies. Mol Endocrinol. 2007 Jan;21(1):1-13.

48. Osborne CK, Schiff R, Fuqua SA, Shou J. Estrogen receptor: current understanding of its activation and modulation. Clin Cancer Res. 2001 Dec;7(12 Suppl):4338s-42s; discussion 411s-412s.

49. Gustafsson JA, Warner M. Estrogen receptor beta in the breast: role in estrogen responsiveness and development of breast cancer. J Steroid Biochem Mol Biol. 2000 Nov 30;74(5):245-8.

50. Lee AV, Cui X, Oesterreich S. Cross-talk among estrogen receptor, epidermal growth factor, and insulin-like growth factor signaling in breast cancer. Clin Cancer Res. 2001 Dec;7(12 Suppl):4429s-35s; discussion 11s-12s.

51. Sanchez R, Nguyen D, Rocha W, White JH, Mader S. Diversity in the mechanisms of gene regulation by estrogen receptors. Bioessays. 2002 Mar;24(3):244-54.

52. Klinge CM, Jernigan SC, Smith SL, Tyulmenkov VV, Kulakosky PC. Estrogen response element sequence impacts the conformation and transcriptional activity of estrogen receptor alpha. Mol Cell Endocrinol. 2001 Mar 28;174(1-2):151-66.

53. Schiff R, Massarweh SA, Shou J, Bharwani L, Mohsin SK, Osborne CK. Cross-talk between estrogen receptor and growth factor pathways as a molecular target for overcoming endocrine resistance. Clin Cancer Res. 2004 Jan 1;10(1 Pt 2):331S-6S.

54. Dobrzycka KM, Townson SM, Jiang S, Oesterreich S. Estrogen receptor corepressors -- a role in human breast cancer? Endocr Relat Cancer. 2003 Dec;10(4):517-36.

55. Frasor J, Danes JM, Komm B, Chang KC, Lyttle CR, Katzenellenbogen BS. Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. Endocrinology. 2003 Oct;144(10):4562-74.

56. Wood JR, Likhite VS, Loven MA, Nardulli AM. Allosteric modulation of estrogen receptor conformation by different estrogen response elements. Mol Endocrinol. 2001 Jul;15(7):1114-26.

57. Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiau AK, Uht RM, et al. Estrogen receptor pathways to AP-1. J Steroid Biochem Mol Biol. 2000 Nov 30;74(5):311-7.

58. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, et al. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. Science. 1995 Dec 1;270(5241):1491-4.

59. Thomas RS, Sarwar N, Phoenix F, Coombes RC, Ali S. Phosphorylation at serines 104 and 106 by Erk1/2 MAPK is important for estrogen receptor-alpha activity. J Mol Endocrinol. 2008 Apr;40(4):173-84.

60. Lannigan DA. Estrogen receptor phosphorylation. Steroids. 2003 Jan;68(1):1-9.

61. Zilli M, Grassadonia A, Tinari N, Di Giacobbe A, Gildetti S, Giampietro J, et al. Molecular mechanisms of endocrine resistance and their implication in the therapy of breast cancer. Biochim Biophys Acta. 2009 Jan;1795(1):62-81.

62. Razandi M, Pedram A, Park ST, Levin ER. Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. J Biol Chem. 2003 Jan 24;278(4):2701-12.

63. Marino M, Ascenzi P. Membrane association of estrogen receptor alpha and beta influences 17beta-estradiol-mediated cancer cell proliferation. Steroids. 2008 Oct;73(9-10):853-8.

64. Evinger AJ, 3rd, Levin ER. Requirements for estrogen receptor alpha membrane localization and function. Steroids. 2005 May-Jun;70(5-7):361-3.

65. Wong CW, McNally C, Nickbarg E, Komm BS, Cheskis BJ. Estrogen receptor-interacting protein that modulates its nongenomic activity-crosstalk with Src/Erk phosphorylation cascade. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Nov 12;99(23):14783-8.

66. Shou J, Massarweh S, Osborne CK, Wakeling AE, Ali S, Weiss H, et al. Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. J Natl Cancer Inst. 2004 Jun 16;96(12):926-35.

67. Chen S, Masri S, Wang X, Phung S, Yuan YC, Wu X. What do we know about the mechanisms of aromatase inhibitor resistance? J Steroid Biochem Mol Biol. 2006 Dec;102(1-5):232-40.

68. Ghosh D, Griswold J, Erman M, Pangborn W. Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase. Nature. 2009 Jan 8;457(7226):219-23.

69. Yanase T, Mu YM, Nishi Y, Goto K, Nomura M, Okabe T, et al. Regulation of aromatase by nuclear receptors. J Steroid Biochem Mol Biol. 2001 Dec;79(1-5):187-92.

70. Inkster SE, Brodie AM. Expression of aromatase cytochrome P-450 in premenopausal and postmenopausal human ovaries: an immunocytochemical study. J Clin Endocrinol Metab. 1991 Oct;73(4):717-26.

71. Inkster SE, Brodie AM. Immunocytochemical studies of aromatase in early and full-term human placental tissues: comparison with biochemical assays. Biol Reprod. 1989 Nov;41(5):889-98.

72. Miller WR, Anderson TJ, Jack WJ. Relationship between tumour aromatase activity, tumour characteristics and response to therapy. J Steroid Biochem Mol Biol. 1990 Dec 20;37(6):1055-9.

73. Brodie A, Inkster S. Aromatase in the human testis. J Steroid Biochem Mol Biol. 1993 Mar;44(4-6):549-55.

74. Lu Q, Nakmura J, Savinov A, Yue W, Weisz J, Dabbs DJ, et al. Expression of aromatase protein and messenger ribonucleic acid in tumor epithelial cells and evidence of functional significance of locally produced estrogen in human breast cancers. Endocrinology. 1996 Jul;137(7):3061-8.

75. Miller WR, O'Neill J. The importance of local synthesis of estrogen within the breast. Steroids. 1987 Oct-Dec;50(4-6):537-48.

76. Bulun SE, Sebastian S, Takayama K, Suzuki T, Sasano H, Shozu M. The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters. J Steroid Biochem Mol Biol. 2003 Sep;86(3-5):219-24.

77. Zhao Y, Agarwal VR, Mendelson CR, Simpson ER. Transcriptional regulation of CYP19 gene (aromatase) expression in adipose stromal cells in primary culture. J Steroid Biochem Mol Biol. 1997 Apr;61(3-6):203-10.

78. MacLusky NJ, Naftolin F. Sexual differentiation of the central nervous system. Science. 1981 Mar 20;211(4488):1294-302.

79. Howell A, Cuzick J, Baum M, Buzdar A, Dowsett M, Forbes JF, et al. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. Lancet. 2005 Jan 1-7;365(9453):60-2.

80. Chen D, Reierstad S, Lu M, Lin Z, Ishikawa H, Bulun SE. Regulation of breast cancer-associated aromatase promoters. Cancer Lett. 2009 Jan 8;273(1):15-27.

81. Poulos TL, Finzel BC, Howard AJ. High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam. J Mol Biol. 1987 Jun 5;195(3):687-700.

82. Hasemann CA, Ravichandran KG, Peterson JA, Deisenhofer J. Crystal structure and refinement of cytochrome P450terp at 2.3 A resolution. J Mol Biol. 1994 Mar 4;236(4):1169-85.

83. Ravichandran KG, Boddupalli SS, Hasermann CA, Peterson JA, Deisenhofer J. Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450's. Science. 1993 Aug 6;261(5122):731-6.

84. Hong Y, Yu B, Sherman M, Yuan YC, Zhou D, Chen S. Molecular basis for the aromatization reaction and exemestane-mediated irreversible inhibition of human aromatase. Mol Endocrinol. 2007 Feb;21(2):401-14.

85. Chen S, Zhang F, Sherman MA, Kijima I, Cho M, Yuan YC, et al. Structure-function studies of aromatase and its inhibitors: a progress report. J Steroid Biochem Mol Biol. 2003 Sep;86(3-5):231-7.

86. Favia AD, Cavalli A, Masetti M, Carotti A, Recanatini M. Three-dimensional model of the human aromatase enzyme and density functional parameterization of the iron-containing protoporphyrin IX for a molecular dynamics study of heme-cysteinato cytochromes. Proteins. 2006 Mar 1;62(4):1074-87.

87. Osborne CK, Schiff R. Aromatase inhibitors: future directions. J Steroid Biochem Mol Biol. 2005 May;95(1-5):183-7.

88. Horwitz KB. The central role of progesterone receptors and progestational agents in the management and treatment of breast cancer. Semin Oncol. 1988 Apr;15(2 Suppl 1):14-9.

89. Osborne CK, Zhao H, Fuqua SA. Selective estrogen receptor modulators: structure, function, and clinical use. J Clin Oncol. 2000 Sep;18(17):3172-86.

90. Howell A, Osborne CK, Morris C, Wakeling AE. ICI 182,780 (Faslodex): development of a novel, "pure" antiestrogen. Cancer. 2000 Aug 15;89(4):817-25.

91. Howell A, Buzdar A. Are aromatase inhibitors superior to antiestrogens? J Steroid Biochem Mol Biol. 2005 Feb;93(2-5):237-47.

92. Winer EP, Hudis C, Burstein HJ, Wolff AC, Pritchard KI, Ingle JN, et al. American Society of Clinical Oncology technology assessment on the use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer: status report 2004. J Clin Oncol. 2005 Jan 20;23(3):619-29.

93. Ellis MJ, Dixon M, Dowsett M, Nagarajan R, Mardis E. A luminal breast cancer genome atlas: progress and barriers. J Steroid Biochem Mol Biol. 2007 Aug-Sep;106(1-5):125-9.

94. Fuqua SA, Wiltschke C, Zhang QX, Borg A, Castles CG, Friedrichs WE, et al. A hypersensitive estrogen receptor-alpha mutation in premalignant breast lesions. Cancer Res. 2000 Aug 1;60(15):4026-9.

95. Weigel NL, Zhang Y. Ligand-independent activation of steroid hormone receptors. J Mol Med. 1998 Jun;76(7):469-79.

96. Johnston SR, Head J, Pancholi S, Detre S, Martin LA, Smith IE, et al. Integration of signal transduction inhibitors with endocrine therapy: an approach to overcoming hormone resistance in breast cancer. Clin Cancer Res. 2003 Jan;9(1 Pt 2):524S-32S.

97. Gonzalez-Angulo AM, Morales-Vasquez F, Hortobagyi GN. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. Adv Exp Med Biol. 2007;608:1-22.

98. Howell SJ, Johnston SR, Howell A. The use of selective estrogen receptor modulators and selective estrogen receptor down-regulators in breast cancer. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2004 Mar;18(1):47-66.

99. Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. Biomedicine. Defining the "S" in SERMs. Science. 2002 Mar 29;295(5564):2380-1.

100. Fabian CJ, Kimler BF. Selective estrogen-receptor modulators for primary prevention of breast cancer. J Clin Oncol. 2005 Mar 10;23(8):1644-55.

101. 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. 2000;2(5):335-44.

102. Chen JD, Evans RM. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. Nature. 1995 Oct 5;377(6548):454-7.

103. Gradishar WJ. Tamoxifen--what next? Oncologist. 2004;9(4):378-84.

104. Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM, et al. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. J Natl Cancer Inst. 1998 Sep 16;90(18):1371-88.

105. Perez EA. Appraising Adjuvant Aromatase Inhibitor Therapy. The Oncologist. 2006;11(Breast Cancer):1058-69.

106. Rutqvist LE, Johansson H, Signomklao T, Johansson U, Fornander T, Wilking N. Adjuvant tamoxifen therapy for early stage breast cancer and second primary malignancies. Stockholm Breast Cancer Study Group. J Natl Cancer Inst. 1995 May 3;87(9):645-51.

107. Saphner T, Tormey DC, Gray R. Venous and arterial thrombosis in patients who received adjuvant therapy for breast cancer. J Clin Oncol. 1991 Feb;9(2):286-94.

108. Love RR, Surawicz TS, Williams EC. Antithrombin III level, fibrinogen level, and platelet count changes with adjuvant tamoxifen therapy. Arch Intern Med. 1992 Feb;152(2):317-20.

109. Bentley CR, Davies G, Aclimandos WA. Tamoxifen retinopathy: a rare but serious complication. BMJ. 1992 Feb 22;304(6825):495-6.

110. Nayfield SG, Gorin MB. Tamoxifen-associated eye disease. A review. J Clin Oncol. 1996 Mar;14(3):1018-26.

111. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. J Clin Invest. 2006 Mar;116(3):561-70.

112. Candelaria M, Hurtado-Monroy R, Vargas-Viveros P, Carrillo-Munnoz S, Duenas-Gonzalez A. Tamoxifen-associated vasculitis in a breast cancer patient. World J Surg Oncol. 2007;5:9.

113. Goss PE. Preliminary data from ongoing adjuvant aromatase inhibitor trials. Clin Cancer Res. 2001 Dec;7(12 Suppl):4397s-401s; discussion 411s-412s.

114. Strasser-Weippl K, Goss PE. Advances in adjuvant hormonal therapy for postmenopausal women. J Clin Oncol. 2005 Mar 10;23(8):1751-9.

115. Love RR, Wiebe DA, Newcomb PA, Cameron L, Leventhal H, Jordan VC, et al. Effects of tamoxifen on cardiovascular risk factors in postmenopausal women. Ann Intern Med. 1991 Dec 1;115(11):860-4.

116. McDonald CC, Stewart HJ. Fatal myocardial infarction in the Scottish adjuvant tamoxifen trial. The Scottish Breast Cancer Committee. BMJ. 1991 Aug 24;303(6800):435-7.

117. Love RR, Mazess RB, Barden HS, Epstein S, Newcomb PA, Jordan VC, et al. Effects of tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women with breast cancer. N Engl J Med. 1992 Mar 26;326(13):852-6.

118. Love RR, Barden HS, Mazess RB, Epstein S, Chappell RJ. Effect of tamoxifen on lumbar spine bone mineral density in postmenopausal women after 5 years. Arch Intern Med. 1994 Nov 28;154(22):2585-8.

119. Thurlimann B. Reducing the risk of early recurrence in hormone-responsive breast cancer. Ann Oncol. 2007 Sep;18 Suppl 8:viii8-17.

120. Demissie S, Silliman RA, Lash TL. Adjuvant tamoxifen: predictors of use, side effects, and discontinuation in older women. J Clin Oncol. 2001 Jan 15;19(2):322-8.

121. Fisher B, Dignam J, Bryant J, DeCillis A, Wickerham DL, Wolmark N, et al. Five versus more than five years of tamoxifen therapy for breast cancer patients with negative lymph nodes and estrogen receptor-positive tumors. J Natl Cancer Inst. 1996 Nov 6;88(21):1529-42.

122. Robertson JF, Nicholson RI, Bundred NJ, Anderson E, Rayter Z, Dowsett M, et al. Comparison of the short-term biological effects of 7alpha-[9-(4,4,5,5,5-pentafluoropentylsulfinyl)-nonyl]estra-1,3,5, (10)-triene-3,17beta-diol (Faslodex) versus tamoxifen in postmenopausal women with primary breast cancer. Cancer Res. 2001 Sep 15;61(18):6739-46.

123. Howell A. New developments in the treatment of postmenopausal breast cancer. Trends Endocrinol Metab. 2005 Nov;16(9):420-8.

124. Wakeling AE. Use of pure antioestrogens to elucidate the mode of action of oestrogens. Biochem Pharmacol. 1995 May 26;49(11):1545-9.

125. Wakeling AE. Similarities and distinctions in the mode of action of different classes of antioestrogens. Endocr Relat Cancer. 2000 Mar;7(1):17-28.

126. Addo S, Yates RA, Laight A. A phase I trial to assess the pharmacology of the new oestrogen receptor antagonist fulvestrant on the endometrium in healthy postmenopausal volunteers. Br J Cancer. 2002 Dec 2;87(12):1354-9.

127. Osborne CK, Schiff R. Growth factor receptor cross-talk with estrogen receptor as a mechanism for tamoxifen resistance in breast cancer. Breast. 2003 Dec;12(6):362-7.

128. Robertson JF, Osborne CK, Howell A, Jones SE, Mauriac L, Ellis M, et al. Fulvestrant versus anastrozole for the treatment of advanced breast carcinoma in postmenopausal women: a prospective combined analysis of two multicenter trials. Cancer. 2003 Jul 15;98(2):229-38.

129. Robertson JF, Howell A, Gorbunova VA, Watanabe T, Pienkowski T, Lichinitser MR. Sensitivity to further endocrine therapy is retained following progression on first-line fulvestrant. Breast Cancer Res Treat. 2005 Jul;92(2):169-74.

130. Vergote I, Robertson JF, Kleeberg U, Burton G, Osborne CK, Mauriac L. Postmenopausal women who progress on fulvestrant ('Faslodex') remain sensitive to further endocrine therapy. Breast Cancer Res Treat. 2003 May;79(2):207-11.

131. Ingle JN, Suman VJ, Rowland KM, Mirchandani D, Bernath AM, Camoriano JK, et al. Fulvestrant in women with advanced breast cancer after progression on prior aromatase inhibitor therapy: North Central Cancer Treatment Group Trial N0032. J Clin Oncol. 2006 Mar 1;24(7):1052-6.

132. Geisler J, Haynes B, Anker G, Dowsett M, Lonning PE. Influence of letrozole and anastrozole on total body aromatization and plasma estrogen levels in postmenopausal breast

cancer patients evaluated in a randomized, cross-over study. J Clin Oncol. 2002 Feb 1;20(3):751-7.

133. Nabholtz JM. Long-term safety of aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. Ther Clin Risk Manag. 2008 Feb;4(1):189-204.

134. Buzdar AU, Robertson JF, Eiermann W, Nabholtz JM. An overview of the pharmacology and pharmacokinetics of the newer generation aromatase inhibitors anastrozole, letrozole, and exemestane. Cancer. 2002 Nov 1;95(9):2006-16.

135. Thurlimann B, Keshaviah A, Coates AS, Mouridsen H, Mauriac L, Forbes JF, et al. A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer. N Engl J Med. 2005 Dec 29;353(26):2747-57.

136. Coombes RC, Hall E, Gibson LJ, Paridaens R, Jassem J, Delozier T, et al. A randomized trial of exemestane after two to three years of tamoxifen therapy in postmenopausal women with primary breast cancer. N Engl J Med. 2004 Mar 11;350(11):1081-92.

137. Rugo HS. Strategies for the prevention of treatment-related bone loss in women receiving adjuvant hormonal therapy. Clin Breast Cancer. 2007 Jul;7 Suppl 1:S21-8.

138. Rozenberg S, Antoine C, Carly B, Pastijn A, Liebens F. Improving quality of life after breast cancer: prevention of other diseases. Menopause Int. 2007 Jun;13(2):71-4.

139. Conte P, Frassoldati A. Aromatase inhibitors in the adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: Putting safety issues into perspective. Breast J. 2007 Jan-Feb;13(1):28-35.

140. Song RX, McPherson RA, Adam L, Bao Y, Shupnik M, Kumar R, et al. Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ERalpha-Shc association and Shc pathway activation. Mol Endocrinol. 2002 Jan;16(1):116-27.

141. Nicholson RI, McClelland RA, Robertson JF, Gee JM. Involvement of steroid hormone and growth factor cross-talk in endocrine response in breast cancer. Endocr Relat Cancer. 1999 Sep;6(3):373-87.

142. Miller WR. Biological rationale for endocrine therapy in breast cancer. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. 2004;18(Breast cancer):1-32.

143. Samojlik E, Santen RJ, Wells SA. Adrenal suppression with aminoglutethimide. II. Differential effects of aminoglutethimide on plasma androstenedione and estrogen levels. J Clin Endocrinol Metab. 1977 Sep;45(3):480-7.

144. Dowsett M, Stein RC, Mehta A, Coombes RC. Potency and selectivity of the non-steroidal aromatase inhibitor CGS 16949A in postmenopausal breast cancer patients. Clin Endocrinol (Oxf). 1990 May;32(5):623-34.

145. Dowsett M, Smithers D, Moore J, Trunet PF, Coombes RC, Powles TJ, et al. Endocrine changes with the aromatase inhibitor fadrozole hydrochloride in breast cancer. Eur J Cancer. 1994;30A(10):1453-8.

146. Falkson CI, Falkson HC. A randomised study of CGS 16949A (fadrozole) versus tamoxifen in previously untreated postmenopausal patients with metastatic breast cancer. Ann Oncol. 1996 Jul;7(5):465-9.

147. Lang M, Batzl C, Furet P, Bowman R, Hausler A, Bhatnagar AS. Structure-activity relationships and binding model of novel aromatase inhibitors. J Steroid Biochem Mol Biol. 1993 Mar;44(4-6):421-8.

148. Plourde PV, Dyroff M, Dukes M. Arimidex: a potent and selective fourth-generation aromatase inhibitor. Breast Cancer Res Treat. 1994;30(1):103-11.

149. Iveson TJ, Smith IE, Ahern J, Smithers DA, Trunet PF, Dowsett M. Phase I study of the oral nonsteroidal aromatase inhibitor CGS 20267 in postmenopausal patients with advanced breast cancer. Cancer Res. 1993 Jan 15;53(2):266-70.

150. Ellis M, Ma C. Femara and the future: tailoring treatment and combination therapies with Femara. Breast Cancer Res Treat. 2007;105 Suppl 1:105-15.

151. Mouridsen H, Gershanovich M, Sun Y, Perez-Carrion R, Boni C, Monnier A, et al. Phase III study of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy of advanced breast cancer in postmenopausal women: analysis of survival and update of efficacy from the International Letrozole Breast Cancer Group. J Clin Oncol. 2003 Jun 1;21(11):2101-9.

152. Judd HL, Barone RM, Laufer LR, Gambone JC, Monfort SL, Lasley BL. In vivo effects of delta 1-testololactone on peripheral aromatization. Cancer Res. 1982 Aug;42(8 Suppl):3345s-8s.

153. Brueggemeier RW, Li PK, Snider CE, Darby MV, Katlic NE. 7 alpha-substituted androstenediones as effective in vitro and in vivo inhibitors of aromatase. Steroids. 1987 Jul-Sep;50(1-3):163-78.

154. Brodie AM, Schwarzel WC, Shaikh AA, Brodie HJ. The effect of an aromatase inhibitor, 4-hydroxy-4-androstene-3,17-dione, on estrogen-dependent processes in reproduction and breast cancer. Endocrinology. 1977 Jun;100(6):1684-95.

155. Brodie AM, Garrett WM, Hendrickson JR, Tsai-Morris CH, Marcotte PA, Robinson CH. Inactivation of aromatase in vitro by 4-hydroxy-4-androstene-3,17-dione and 4-acetoxy-4-androstene-3,17-dione and sustained effects in vivo. Steroids. 1981 Dec;38(6):693-702.

156. Brodie AM, Longcope C. Inhibition of peripheral aromatization by aromatase inhibitors, 4-hydroxy- and 4-acetoxy-androstene-3,17-dione. Endocrinology. 1980 Jan;106(1):19-21.

157. Coombes RC, Goss P, Dowsett M, Gazet JC, Brodie A. 4-Hydroxyandrostenedione in treatment of postmenopausal patients with advanced breast cancer. Lancet. 1984 Dec 1;2(8414):1237-9.

158. Wiseman LR, Goa KL. Formestane. A review of its pharmacological properties and clinical efficacy in the treatment of postmenopausal breast cancer. Drugs Aging. 1996 Oct;9(4):292-306.

159. di Salle E, Giudici D, Briatico G, Ornati G. Novel irreversible aromatase inhibitors. Ann N Y Acad Sci. 1990;595:357-67.

160. Bajetta E, Zilembo N, Noberasco C, Martinetti A, Mariani L, Ferrari L, et al. The minimal effective exemestane dose for endocrine activity in advanced breast cancer. Eur J Cancer. 1997 Apr;33(4):587-91.

161. Lonning PE, Bajetta E, Murray R, Tubiana-Hulin M, Eisenberg PD, Mickiewicz E, et al. Activity of exemestane in metastatic breast cancer after failure of nonsteroidal aromatase inhibitors: a phase II trial. J Clin Oncol. 2000 Jun;18(11):2234-44.

162. Sjoerdsma A. Suicide enzyme inhibitors as potential drugs. Clin Pharmacol Ther. 1981 Jul;30(1):3-22.

163. Foster FM, Owens TW, Tanianis-Hughes J, Clarke RB, Brennan K, Bundred NJ, et al. Targeting inhibitor of apoptosis proteins in combination with ErbB antagonists in breast cancer. Breast Cancer Res. 2009;11(3):R41.

164. Thiantanawat A, Long BJ, Brodie AM. Signaling pathways of apoptosis activated by aromatase inhibitors and antiestrogens. Cancer Res. 2003 Nov 15;63(22):8037-50.

165. Vicencio JM, Galluzzi L, Tajeddine N, Ortiz C, Criollo A, Tasdemir E, et al. Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path--a mini-review. Gerontology. 2008;54(2):92-9.

166. Obrero M, Yu DV, Shapiro DJ. Estrogen receptor-dependent and estrogen receptor-independent pathways for tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen-induced programmed cell death. J Biol Chem. 2002 Nov 22;277(47):45695-703.

167. Bursch W, Karwan A, Mayer M, Dornetshuber J, Frohwein U, Schulte-Hermann R, et al. Cell death and autophagy: cytokines, drugs, and nutritional factors. Toxicology. 2008 Dec 30;254(3):147-57.

168. Thorne C, Lee AV. Cross talk between estrogen receptor and IGF signaling in normal mammary gland development and breast cancer. Breast Dis. 2003;17:105-14.

169. Lisztwan J, Pornon A, Chen B, Chen S, Evans DB. The aromatase inhibitor letrozole and inhibitors of insulin-like growth factor I receptor synergistically induce apoptosis in in vitro models of estrogen-dependent breast cancer. Breast Cancer Res. 2008;10(4):R56.

170. Numazawa M, Kamiyama T, Tachibana M, Oshibe M. Synthesis and structure-activity relationships of 6-substituted androst-4-ene analogs as aromatase inhibitors. J Med Chem. 1996 May 24;39(11):2245-52.

171. Numazawa M, Yoshimura A, Watari Y, Matsuzaki H. Aromatase inhibition by 4 beta,5 beta-epoxides of 16 alpha-hydroxyandrostenedione and its 19-oxygenated analogs, potential precursors of estriol production in the feto-placental unit. Biol Pharm Bull. 2002 Dec;25(12):1566-9.

172. Sherwin PF, McMullan PC, Covey DF. Effects of steroid D-ring modification on suicide inactivation and competitive inhibition of aromatase by analogues of androsta-1,4-diene-3,17-dione. J Med Chem. 1989 Mar;32(3):651-8.

173. Yoshida N, Osawa Y. Purification of human placental aromatase cytochrome P-450 with monoclonal antibody and its characterization. Biochemistry. 1991 Mar 26;30(12):3003-10.

174. Heidrich DD, Steckelbroeck S, Klingmuller D. Inhibition of human cytochrome P450 aromatase activity by butyltins. Steroids. 2001 Oct;66(10):763-9.

175. Berthois Y, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Apr;83(8):2496-500.

176. Zhou DJ, Pompon D, Chen SA. Stable expression of human aromatase complementary DNA in mammalian cells: a useful system for aromatase inhibitor screening. Cancer Res. 1990 Nov 1;50(21):6949-54.

177. Numazawa M, Yamaguchi S. Synthesis and structure-activity relationships of 6-phenylaliphatic-substituted C19 steroids having a 1,4-diene, 4,6-diene, or 1,4,6-triene structure as aromatase inhibitors. Steroids. 1999 Mar;64(3):187-96.

178. Numazawa M, Yamada K, Nitta S, Sasaki C, Kidokoro K. Role of hydrophilic interaction in binding of hydroxylated 3-deoxy C(19) steroids to the active site of aromatase. J Med Chem. 2001 Nov 22;44(24):4277-83.

179. Nagaoka M, Watari Y, Yajima H, Tsukioka K, Muroi Y, Yamada K, et al. Structure-activity relationships of 3-deoxy androgens as aromatase inhibitors. Synthesis and biochemical studies of 4-substituted 4-ene and 5-ene steroids. Steroids. 2003 Aug;68(6):533-42.

180. Cepa MM, Tavares da Silva EJ, Correia-da-Silva G, Roleira FM, Teixeira NA. Synthesis and biochemical studies of 17-substituted androst-3-enes and 3,4-epoxyandrostanes as aromatase inhibitors. Steroids. 2008 Dec 22;73(14):1409-15.

181. Cepa M, Correia-da-Silva G, Tavares da Silva EJ, Roleira FM, Hong Y, Chen S, et al. Molecular mechanisms of aromatase inhibition by new A, D-ring modified steroids. Biol Chem. 2008 Sep;389(9):1183-91.

182. Detre S, Salter J, Barnes DM, Riddler S, Hills M, Johnston SR, et al. Time-related effects of estrogen withdrawal on proliferation- and cell death-related events in MCF-7 xenografts. Int J Cancer. 1999 Apr 12;81(2):309-13.

183. Cui Q, Tashiro S, Onodera S, Minami M, Ikejima T. Autophagy preceded apoptosis in oridonin-treated human breast cancer MCF-7 cells. Biol Pharm Bull. 2007 May;30(5):859-64.

184. Levin ER. Cellular Functions of the Plasma Membrane Estrogen Receptor. Trends Endocrinol Metab. 1999 Nov;10(9):374-7.

185. Mandlekar S, Kong AN. Mechanisms of tamoxifen-induced apoptosis. Apoptosis. 2001 Dec;6(6):469-77.

[1]. Cancro da mama. Disponível em http://www.emedicine.com/med/topic2808.htm

[2]. Cancro da mama. Disponível em

http://www.abpi.org.uk/publications/publication_details/targetBreastCancer/images/