

Correlação entre COX-2 e ciclina D-1 após administração de tamoxifeno neoadjuvante em curto prazo no tratamento de carcinoma de mama

Correlation of COX-2 and cyclin D-1 after short-time neoadjuvant tamoxifen on breast cancer

Eduardo C. Millen^{1,2}, Marcelo Madeira^{1,3}, André Mattar^{1,3}, Angela F. Logullo Waitzberg⁴, Fernando A. Soares⁵, Cyntia Osório⁵, Suely Nonogaki⁶, Luiz H. Gebrim^{1,3}

¹Disciplina de Mastologia, Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp).

²Faculdade de Medicina de Volta Redonda (UnifOA), Volta Redonda, Rio de Janeiro, RJ.

³Centro de Referência da Saúde da Mulher (CRSM), Hospital Pérola Byington, São Paulo, SP.

⁴Departamento de Patologia da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp).

⁵Departamento de Patologia da Fundação Antônio Prudente, Hospital A. C. Camargo, São Paulo, SP.

⁶Divisão Técnica de Patologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

Endereço para correspondência: Eduardo C. Millen, Rua 40, nº 14, Sala 1003, Vila Santa Cecília, 27260-200, Volta Redonda, RJ, e-mail: eduardomillen@uol.com.br

Recebido em: 1/1/2009. Aceito após modificações em: 2/3/2009

Palavras-chaves

COX-2;
Ciclina D-1;
Tamoxifeno;
Carcinoma de mama.

RESUMO

Introdução: O tamoxifeno é a droga utilizada há mais tempo na terapia hormonal do câncer de mama. A superexpressão da ciclina D-1 interfere negativamente no tratamento com tamoxifeno e pode contribuir para predição da falha terapêutica observada em algumas pacientes. COX-2 induz a oxidação de estrogênio a dietilestilbestrol e importante ação genotóxica na mama. Ciclina D-1 e COX-2 ainda não foram descritos associados em relação ao tratamento com tamoxifeno em curto período (14 dias). **Objetivo:** Avaliar os efeitos da administração neoadjuvante de tamoxifeno em curto prazo (14 dias) sobre a expressão de COX-2 e ciclina D-1 no tratamento do câncer de mama. **Métodos:** Estudo prospectivo randomizado realizado na disciplina de Mastologia da Unifesp. Vinte e cinco pacientes com carcinoma de mama nos estádios II e III, subdivididas em grupos (controle, n = 13, e tratamento, n = 12). As amostras de ciclina D-1 e COX-2 foram avaliadas antes e após o tratamento. A avaliação imuno-histoquímica foi realizada por meio de anticorpos policlonais para COX-2 (Novocastra – Clone 4H12) e ciclina D-1 (Novocastra – Clone DCS-6). Os resultados foram classificados de acordo com a fração e intensidade de coloração das células marcadas. **Resultados:** Observou-se positividade da COX-2 em 56% dos tumores, sem diferença significativa nos dois momentos da amostra (p = 0,39 – Mann Whitney test *1). A expressão da COX-2 não apresentou diferença significativa nas amostras pré e pós nos grupos controle e tratamento. Na amostra total do estudo, observou-se alteração da expressão da ciclina D-1 entre os dois momentos da amostra (teste de McNemar – Diferença = 36.00% (p = 0,06). Entre os grupos controle e tratamento, observou-se que a diferença das medianas de ciclina D-1 entre as amostras pós e pré (pós – pré) demonstrou tendência à significância estatística pelo teste de Mann-Whitney (p = 0,08). **Conclusão:** O tratamento neoadjuvante com tamoxifeno em curto prazo (14 dias) não foi capaz de modificar a positividade dos biomarcadores ciclina D-1 e COX-2. Não foi demonstrada correlação entre ciclina D-1 e COX-2.

ABSTRACT

Introduction: Tamoxifen is the most used drug in the hormonal therapy of the breast cancer. Cyclin D-1, one CCND1 gene product's (PRADI), is essential for the normal lobule-alveolar mammary development and acts in the cellular cycle control. Cyclin D-1 superexpression act negatively in tamoxifen treatment,

Keywords

COX-2;
Cyclin D-1;
Tamoxifen;
Breast cancer.

and may contribute to predict the failure observed in some patients. COX-2 activity induces oestrogen oxidation to dietilstilbestrol and promotes genotoxic effects on the breast. Cyclin D-1 and COX-2 association had not been described yet to short time tamoxifen treatment. Objective: Evaluate short time (14 days) neoadjuvant tamoxifen effects on COX-2 and cyclin D-1 expression in breast cancer patients. Methods: Randomized prospective study in the Federal University of Sao Paulo. Twenty five patients with stage II and III breast cancer were included. The groups were control (n = 13) and treatment (n = 12). Cyclin D-1 and COX-2 samples were evaluated before and after treatment. Immunohistochemistry was performed on the tissue sections using a polyclonal antibody to COX-2 (Novocastra – Clone 4H12) and cyclin D-1 (Novocastra – Clone DCS-6). The results were classified according Alredy score, based on the intensity and fraction marked cells. Results: COX-2 was positive in 56% of tumors. No significant difference was observed between the two groups (p = 0.39 Mann Whitney test). The Difference of cyclin D-1 medium (post – pre) in the control group was 5, while in the tamoxifen group was 0.5. (p = 0.08, Mann Whitney test). Correlation between COX-2 and cyclin D-1 was expressed by Pearson index (r). In treatment group moderate linear and positive correlation was observed (r = 0.51 – Pearson's index) (p = 0.08). It wasn't observed in control group (r = 0.42) (p = 0.12). Conclusion: Tamoxifen treatment in short time period (14 days) wasn't modified significantly COX-2 and cyclin D-1 expression.

Introdução

A terapia hormonal no tratamento sistêmico do câncer de mama representa importante forma de terapia dirigida¹. O tamoxifeno foi a primeira droga empregada com essa finalidade no tratamento de tumores RE+¹. Sua prescrição, nesse grupo, melhorou o prognóstico de milhares de mulheres, aumentou a sobrevida e reduziu a mortalidade em diversos estudos realizados^{2,3}. Apesar de comprovada eficácia, até 40% dos pacientes em terapia adjuvante com tamoxifeno apresentam resistência e insucesso ao tratamento⁴. Novos esforços concentram-se na busca de fatores que possam individualizar a terapêutica sistêmica do carcinoma de mama^{4,5}. A descoberta dos genes e mecanismos associados à resistência hormonal pode nos fornecer novos alvos para a terapêutica e melhores marcadores para predição do prognóstico⁶.

A ciclina D-1 é um produto do gene CCND1 (PRAD1), localizado no cromossomo 11q13, e é essencial para o desenvolvimento lóbulo-alveolar mamário normal⁷. Sua amplificação ocorre em até 45% dos carcinomas de mama. Atua na manutenção do ciclo celular no final da fase G-1. Impede que a célula entre na fase S e prossiga a divisão⁷.

A indução da expressão do gene da ciclina D-1 pelos esteroides é um importante evento na mediação da resposta mitogênica nas células do câncer de mama⁸. A superexpressão de ciclina D-1 confere às células neoplásicas da mama menor dependência aos fatores de crescimento, perda do controle inibitório do ciclo celular e desequilíbrio a favor da proliferação⁹⁻¹².

Zwijnsen *et al.* (1997) demonstrou que a ciclina D-1 pode ativar o RE e induzir o crescimento de tecidos responsivos ao estrogênio na ausência deste¹³. Essa atividade

agonista ao RE poderia explicar seu papel oncogênico nos carcinomas de mama RE+¹⁴.

A expressão de ciclina D-1 em ratos transgênicos resulta em hiperplasia ductal e adenocarcinoma de mama^{15,16}.

Roy e Thompson (2006) demonstraram que a superexpressão da ciclina D-1 interfere negativamente no tratamento com tamoxifeno em pacientes com carcinoma de mama RE+ e contribui para a falha terapêutica observada em algumas pacientes¹⁴.

Novas proteínas têm sido implicadas nos complexos mecanismos da carcinogênese. A ação da COX-2 no processo de promoção da carcinogênese é fortemente sustentada. Diferentes processos justificam sua atuação no desenvolvimento e crescimento de lesões neoplásicas¹⁷. Sua superexpressão associa-se a carcinomas indiferenciados e mais agressivos, com alta expressão de p53 e amplificação do HER-2¹⁸.

Na mama, demonstrou-se que a atividade da COX-2 pode induzir a oxidação de estrogênio a dietilstilbestrol, com importante ação genotóxica¹⁹. Chow *et al.* (2003) demonstraram que a superexpressão de COX-2 contribui para a resistência à terapia hormonal, possivelmente por meio do aumento da expressão da aromatase pelas células estromais no tumor mamário induzido por PgE2^{5,20}.

As alterações ocorridas na expressão de ciclina D-1 e COX-2, embora já estudadas isoladamente, com diversas formas de terapia sistêmica, ainda não foram descritas associadas. O estudo proposto objetivou avaliar as possíveis alterações induzidas pelo tratamento com tamoxifeno sobre essas proteínas em tumores mamários de pacientes nos estádios II e III.

Pacientes e métodos

Vinte e cinco pacientes, subdivididas em grupos (controle, $n = 13$, e tratamento, $n = 12$), foram admitidas no estudo. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), e as pacientes assinaram termo de consentimento para a participação.

Após a confirmação do diagnóstico por biópsia incisiva, ocorreu randomização para um dos grupos. O grupo tratamento recebeu tamoxifeno 20 mg/dia por 14 dias antes da cirurgia. Obteve-se a primeira amostra das pacientes ambulatorialmente, com anestésico local, sem vasoconstritor (lidocaína® a 2%). A segunda amostra foi obtida durante o tratamento cirúrgico definitivo por meio de incisão do espécime operatório. As amostras foram submetidas a processamento e embocamento em parafina líquida e fixadas em formalina 10% após identificação. Foram então coradas pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) para confirmar o diagnóstico de carcinoma invasivo. A recuperação antigênica foi realizada por cocção das lâminas em tampão citrato, em pH 6,0 para COX-2 e EDTA + TRIS pH 9,0 para ciclina D-1, numa panela de pressão elétrica, por 15 minutos após o início da pressão.

As lâminas foram incubadas com os respectivos anticorpos primários COX-2 (Novocastra – Clone 4H12), diluição 1:2000, e ciclina D1 (Novocastra – Clone DCS-6), diluição 1:80 em câmara úmida à temperatura ambiente, por duas horas. Essas lâminas permaneceram em câmara úmida à temperatura ambiente por duas horas e depois foram lavadas com solução tampão PBS em pH 7,4.

Para amplificação da reação, utilizou-se anticorpo secundário biotinilado *kit* LSAB – *Biotinylated Link Universal* (DakoCytomation, Carpinteria, Califórnia), com incubações de 20 minutos para o anticorpo secundário e 20 minutos para o complexo estreptoavidina-peroxidase, *kit* LSAB – Streptavidin-HRP (DakoCytomation, Carpinteria, Califórnia), à temperatura ambiente e, em seguida, lavadas com solução tampão PBS em pH 7,4.

As lâminas foram reveladas em solução substrato de diaminobenzidina (DAB), *kit* Liquid DAB + Substrate Chromogen System (DakoCytomation, Carpinteria, Califórnia), por cinco minutos à temperatura ambiente e, então, lavadas em água corrente por mais cinco minutos.

A seguir, essas lâminas foram contracoradas com hematoxilina e desidratadas em álcool, xilol, diafanizadas e montadas entre lâmina e Entellan.

Todas as reações contiveram controles positivos e negativos. Para controle positivo, foi utilizado um corte de mama previamente conhecido como reativo e, para controle negativo, utilizou-se um corte incubado com solução tampão PBS no lugar do anticorpo.

Método semiquantitativo para avaliação da expressão das proteínas COX-2 e ciclina D-1

As expressões de COX-2 e ciclina D-1 foram avaliadas por observador único de forma semiquantitativa, seguindo-se os critérios descritos por Allred *et al.* (1998) e Harvey *et al.* (1999)^{21,22}. Adotou-se um sistema de contagem para os casos positivos, considerando-se a intensidade da coloração das células e a fração de células neoplásicas coradas.

Método estatístico

As variáveis categóricas foram apresentadas, de forma descritiva, em tabelas com frequências absolutas e relativas. As variáveis quantitativas foram descritas utilizando-se mediana e valores máximo e mínimo. Teste dos postos assinalados de Wilcoxon foi aplicado na comparação de variável quantitativa entre dois grupos dependentes. O teste de Mann-Whitney foi aplicado na comparação de variável quantitativa entre dois grupos independentes. Comparações de proporções entre dois grupos independentes foram efetuadas com o teste exato de Fisher. Quando amostras pareadas, proporções foram comparadas utilizando-se o teste de McNemar. Utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson na análise de correlação linear entre duas variáveis quantitativas. Todas as probabilidades de significância (valores de p) apresentadas são do tipo bilateral e valores menores que 0,05, considerados estatisticamente significantes. O *software* SAS 9.1.3 foi utilizado na análise estatística de dados (*Statistical Analysis System, Cary, NC, USA*).

Resultados

O estudo constituiu-se de 25 pacientes, distribuídas em 2 grupos: grupo controle (C) ($n = 13$) e grupo tratamento (T) ($n = 12$). Duas amostras pareadas (pré e pós) foram obtidas de cada paciente.

A expressão de COX-2 foi positiva em 56%. Não houve alteração da expressão nas amostras pós. Para ciclina D-1, houve expressão em 32% da amostra pré e em 68% da amostra pós. A diferença absoluta de reações positivas entre as amostras foi de 36% (McNemar – $p = 0,06$).

A análise da diferença das medianas de ciclina D-1 entre as amostras pós e pré (pós – pré), nos grupos C e T, demonstrou tendência à significância estatística pelo teste de Mann-Whitney ($p = 0,08$).

No grupo C, a análise da correlação entre a diferença das medianas de COX-2 (pós – pré) e a diferença das medianas de ciclina D-1 demonstrou haver correlação linear positiva ($r = 0,42$) (r = índice de Pearson) ($p = 0,12$). Essa análise no grupo T evidenciou correlação linear moderada

e positiva, marginalmente significativa ($r = 0,51$) (índice de Pearson) ($p = 0,08$).

Discussão

A associação entre ciclina D-1 e resistência ao tratamento com tamoxifeno já foi demonstrada anteriormente. Stendahl *et al.* (2004) demonstraram correlação entre intensidade da coloração nuclear da ciclina D-1 e resistência ao tratamento com tamoxifeno²³. Jisröm *et al.* (2005) demonstraram que a expressão de ciclina D-1 e amplificação do gene CCND1 em amostras de carcinomas de mamas tratadas com tamoxifeno associam-se a menores intervalos livres de doença ($p < 0,001$) e sobrevida global ($p = 0,002$)²⁴. Roy e Thompson (2006) sugerem que a superexpressão da ciclina D-1 interfira negativamente no efeito do tamoxifeno em carcinomas de mama RE+, portanto contribui para a falha terapêutica observada em algumas pacientes¹⁴.

Denkert *et al.* (2003) observaram a expressão de COX-2 em 36% dos 221 espécimes de carcinoma de mama. Esta se associou a diversos parâmetros clínico-patológicos, como menor diferenciação tumoral ($p < 0,0005$), maior diâmetro do tumor ($p < 0,0005$), incidência maior de comprometimento linfonodal ($p < 0,0005$), invasão vascular ($p = 0,03$) e receptor de estrogênio negativo ($p = 0,04$). Associou-se ainda a menor intervalo livre de doença ($p = 0,0007$) e sobrevida global ($p = 0,02$)¹⁸.

Sabe-se que esses tumores são menos responsivos ou não respondem à terapia hormonal.

Este estudo analisou a expressão das proteínas ciclina D-1 e COX-2 antes e após a exposição ao tamoxifeno, por 14 dias, com o objetivo de correlacionar possíveis modificações em relação ao grupo controle, assim como possíveis interações entre essas proteínas. O estudo foi do tipo randômico, em duplo-cego, tendo-se acesso à identificação das lâminas apenas após o término da leitura de todos os casos.

A expressão de COX-2 em carcinomas de mama apresenta diferentes resultados em diversos estudos. Half *et al.* (2002) descrevem ocorrência de moderada a forte expressão da COX-2 em 43% dos 57 carcinomas de mama²⁵. McCarthy *et al.* (2006) observaram que a expressão de RNAm de COX-2 foi maior nos carcinomas de mama RE- ($p < 0,02$) e RP- ($p < 0,0001$)²⁶.

Em nosso estudo, 56% dos tumores demonstraram expressão de COX-2 (14/25). Não houve diferença entre as amostras pré e pós tampouco entre os grupos controle e tratamento.

A associação entre expressão da COX-2 e resistência à terapia endócrina foi anteriormente descrita^{20,27-28}. Superexpressão de COX-2 aumenta a concentração de aromatase no tumor mamário e promove aumento da vascu-

larização peritumoral, por meio da regulação de PgE2 e VEGF (*vascular endothelial growth factor*)²⁷. Gierach *et al.* (2008), em estudo prospectivo, demonstraram redução de 16% do risco de carcinoma de mama RE+ em usuárias de AAS diariamente²⁸.

Este é o primeiro estudo que avalia *in vivo* os efeitos do tamoxifeno sobre a expressão da COX-2 em carcinomas invasivos da mama. A ausência de alterações significativas induzidas pelo tratamento poderia ser atribuída à representação da amostra exclusivamente por carcinomas invasivos RE+, em que se espera menor variação e importância dessa proteína, ou ainda pelas condições desfavoráveis à hormonoterapia estabelecidas pela expressão da COX-2²⁵⁻²⁸.

Houve expressão da ciclina D-1 em 32% dos tumores inicialmente avaliados (pré) e 68% da amostra pós, com diferença entre as amostras de 36%. Esta apresentou tendência à significância estatística (Tabela 1) ($p = 0,06$, teste de McNemar).

A diferença das medianas (mediana pós – pré) nos grupos controle e tratamento possibilita avaliar se houve diferença de expressão após a realização da biópsia e se o tratamento com tamoxifeno induziu alterações quando comparado ao grupo controle. Neste, a mediana da diferença foi de 5,0, enquanto no grupo tratamento essa diferença foi de 0,5 ($p = 0,08$, teste de Mann-Whitney).

A avaliação simplesmente quantitativa da presença ou ausência de expressão da ciclina D-1 poderia induzir a erros consideráveis de interpretação quando comparadas com o escore proposto por Allred *et al.* (1998)²¹. Ao analisar o escore, que considera a intensidade da coloração e a fração de distribuição das células coradas, observa-se que existe intensa heterogeneidade no comportamento dos tumores e que a variação da intensidade da expressão não ocorreu de forma uniforme.

Em nosso estudo, a diferença das medianas da ciclina D-1, pós – pré, foi menor no grupo tratado com tamoxifeno, com tendência à significância estatística ($p = 0,08$), o que pode ser traduzido em atividade inibitória do tamoxifeno sobre a expressão de ciclina D-1. Se for comparada apenas a presença ou não da expressão (positivo/negativo), não seria possível demonstrar a ação do tamoxifeno sobre essa proteína.

Nos grupos controle e tratamento, as diferenças das medianas de COX-2 e ciclina D-1 apresentaram correlação linear positiva. Essa correlação é avaliada pelo índice de Pearson (r). No grupo controle, apesar da correlação linear positiva ($r = 0,42$), não houve significância estatística. No grupo tratamento, o índice de Pearson (r) foi de 0,51, demonstrando correlação linear positiva entre as diferenças das medianas de COX-2 e ciclina D-1, marginalmente significativa ($p = 0,08$). O papel da ciclina D-1 e COX-2 nos mecanismo da carcinogênese, assim como possíveis

interferências com a terapia endócrina, já foi demonstrado separadamente em diversas publicações. Em nosso estudo, ocorreu correlação positiva entre esses marcadores, de forma não significativa no grupo controle e com tendência à significância no grupo tratado com tamoxifeno. Análises individuais desses biomarcadores em estudos anteriores sugerem que esses se correlacionam negativamente com a terapia hormonal. Os mecanismos pelos quais eles se correlacionam não foram até então evidenciados.

Muitos esforços têm sido dirigidos para melhor seleção de esquemas terapêuticos e encontro de marcadores preditivos às diversas modalidades de terapias. Novas propostas de classificação dos carcinomas de mama têm sido realizadas de acordo com a expressão de diversos biomarcadores e perfil gênico^{29,30}. Por meio do estudo de expressão do perfil gênico e de diversos biomarcadores, pode-se observar a heterogeneidade existente entre os tumores RE+, e com isso tentar identificar as “assinaturas biológicas” existentes em cada tumor. Isso certamente acarretará maior possibilidade de seleção do melhor esquema terapêutico e menor chance de resistência à terapia endócrina⁵.

Estudos prospectivos estão em andamento com o objetivo de elucidar os mecanismos envolvidos na resistência ao tratamento hormonal. A associação de terapia endócrina com bloqueio simultâneo das diferentes vias e sinais de transdução para EGF-1 e seus receptores, via inibidores da tirosina quinase, tem sido proposta. Da mesma forma, os inibidores de COX-2 em associação à terapia hormonal estão sendo testados prospectivamente em diversos centros⁵.

A definição exata dos mecanismos pelos quais os biomarcadores acima estudados interferem nos complexos mecanismos da terapia hormonal poderá contribuir para decisões terapêuticas futuras. A associação entre pesquisa clínica e biologia molecular poderá oferecer as respostas aos mecanismos suscitados por meio da realização de estudos multicêntricos, randomizados, duplos-cegos, controlados, com inclusão de grande número de pacientes e seguimento adequado. Até que esses dados estejam disponíveis, os achados ora disponíveis servirão para nortear possíveis aplicações em pesquisas clínicas.

Referências

1. Pritchard KI. The best use of endocrine treatments. *The Breast*. 2003;12:497-508.
2. Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15 year survival: an overview of the randomized trials. *Lancet*. 2005;365:1687-717.
3. Cuzick J, Powles T, Veronesi U, Forbes J, Edwards R, Ashley S, et al. Overview of the main outcomes in breast cancer prevention. *Lancet*. 2003;361:296-300.

4. Ring A, Dowsett M. Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocr Relat Cancer*. 2004;11:643-58.
5. Milano A, Dal Lago L, Sotiriou C, Piccart M, Cardoso F. What clinicians need to know about antiestrogen resistance in breast cancer therapy. *Eur J Cancer*. 2006;42:2692-705.
6. Ormandy CJ, Musgrove EA, Hui R, Daly RJ, Sutherland RL. Cyclin D1, EMS1 and 11q13 amplification in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2003;78:323-35.
7. Hui R, Finney GL, Carrol JS, Lee CSL, Musgrove EA, Sutherland RL. Constitutive overexpression of cyclin D-1 but not cyclin E confers acute resistance to antiestrogens in T-47D breast cancer cells. *Cancer Res*. 2002;62:6916-23.
8. Musgrove EA, Hamilton JA, Lee CS, Sweeney KJ, Watts CK, Sutherland RL. Growth factor, steroid, and steroid antagonist regulation of cyclin gene expression associated with changes in T-47D human breast cancer cell Cycle progression. *Mol Cell Biol*. 1993;13:3577-87.
9. Musgrove EA, Lee CS, Buckley ML, Sutherland RL. Cyclin D1 induction in breast cancer cells shortens G1 and is sufficient for cells arrested in G1 to complete the cell Cycle. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:8022-6.
10. Gillet C, Fantl V, Fisher C, Bartek J, Dickson C, Barnes D, et al. Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. *Cancer Res*. 1994;54:1812-7.
11. Bartkova J, Lukas J, Muller H, Lützhof D, Strauss M, Bartek J. Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer. *Int J Cancer*. 1994;57:353-61.
12. Alle K, Henshall S, Field A, Sutherland RL. Cyclin D1 protein is overexpressed in hyperplasia and intraductal carcinoma of the breast. *Clin Cancer Res*. 1998;54:1812-7.
13. Zwijnen RML, Wientjens E, Klompmaaker R. CDK independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell*. 1997;88:405-15.
14. Roy PG, Thompson AM. Cyclin D1 and breast cancer. *The Breast*. 2006;15:718-27.
15. Wang TC, Cardiff RD, Zukerberg L, Lees E, Arnold A, Schmidt EV. Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV – cyclin D1 transgenic mice. *Nature*. 1994;69:669-71.
16. Barnes DM, Gillet C. Cyclin D-1 and breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1998;52:1-15.
17. Méric JB, Rottey S, Olaussen K, Soria JC, Khayat D, Rixe O, et al. Cyclooxygenase as a target for anticancer drug development. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2006;59:51-64.
18. Denkert C, Winzer KJ, Muller BM, Weichert W, Pest S, Kobel M, et al. Elevated Expression of Cyclooxygenase-2 is Negative prognostic factor for disease free survival and overall survival in patients with breast carcinoma. *Cancer*. 2003;97:2978-87.
19. Tsutsui T, Tamara Y, Yagi E, et al. Involvement of genotoxic effects in the initiation of estrogen-induced cellular transformation studies using Syrian hamster embryo cells treated with 17 beta-estradiol and eight of its metabolites. *Int J Cancer*. 2000;86:8-14.
20. Chow LWC, Wong JL, Toi M. Celecoxib anti-aromatase neoadjuvant (CAAN) trial for locally advanced breast cancer: preliminary report. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003;86:443-7.
21. Allred DC, Harvey JM, Berardo MD. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*. 1998;11:155-68.
22. Harvey J, Clark GM, Osborne KC, Allred CD. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 1999;17:1474-81.

23. Stendahl M. Cyclin D1 overexpression is a negative predictive factor for tamoxifen response in postmenopausal breast cancer. *Br J Cancer*. 2004;90:1942-8.
24. Jirsöm K, Stendhal M, Ryden L, Kronblad A, Bendahl PO, Stal O, et al. Adverse effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer with cyclin D1 gene amplification. *Cancer Res*. 2005;65:8009-16.
25. Half E, Tang XM, Gwyn K, Sahin A, Wathen K, Sinicrope FA. Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. *Cancer Res*. 2002;62:1676-81.
26. McCarthy K, Bustin SA, Ogunkolade B, Khalaf S, Laban CA, McVitie CJ, et al. Cyclo-oxygenase-2 (COX-2) mRNA expression and hormone receptor status in breast cancer. *EJSO*. 2006;32:707-9.
27. Chow LWC, Loo WTY, Toi M. Current directions for COX-2 inhibition in breast cancer. *Biomed Pharmacot*. 2005;59:S281-4.
28. Gierach GL, Lacey JV, Schatzkin A, Leitzmann MF, Richesson D, Hollenbeck AR, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and breast cancer risk in the national institute of health. AARP Diet and Health Study. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;10:R38. (doi.10.1186/bcr2089)
29. Sorlie T, Perou C, Tibshirani R, Aas T, Gesler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinoma distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAS*. 2001;98: 10869-74.
30. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. Multi-gene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351:2817-26.