

PEDRO VITOR LOPES-COSTA¹

ALESSE RIBEIRO DOS SANTOS²

CLEICILENE GOMES PIRES³

JOÃO DE DEUS PEREIRA FILHO³

BENEDITO BORGES DA SILVA⁴

Efeitos do raloxifeno sobre a angiogênese do carcinoma de mama de mulheres menopausadas

Effects of raloxifene on angiogenesis of the breast carcinoma of menopausal women

Artigos originais

Palavras-chaves

Neoplasias mamárias/quimioterapia
Neoplasias mamárias/irrigação sanguínea
Raloxifeno/uso terapêutico
Tamoxifeno/uso terapêutico
Antígenos CD34
Neovascularização patológica
Pós-menopausa

Keywords

Breast neoplasms/drug therapy
Breast neoplasms/blood supply
Raloxifene/therapeutic use
Tamoxifen/therapeutic use
Antigens, CD34
Neovascularization, pathologic
Postmenopause

Resumo

OBJETIVO: avaliar o efeito do raloxifeno sobre a angiogênese do carcinoma de mama em mulheres menopausadas. **MÉTODOS:** dezesseis pacientes menopausadas com carcinoma de mama operável, estágio II (diâmetro >3 cm), positivo para receptor de estrógeno, foram incluídas no estudo. Após confirmação do diagnóstico por biópsia incisional, as pacientes receberam 60 mg de raloxifeno diariamente por 28 dias, previamente à cirurgia definitiva. Exame imunohistoquímico foi realizado nas amostras tumorais, obtidas por ocasião da biópsia para diagnóstico e avaliação do *status* do receptor de estrógeno e da cirurgia definitiva. O anticorpo monoclonal anti-CD34 foi usado como marcador das células endoteliais. A unidade vascular considerada foi qualquer célula ou grupo de células endoteliais coradas, nitidamente separadas de microvasos adjacentes, células tumorais ou tecido conjuntivo, formando ou não lúmen. A contagem de microvasos antes e após tratamento com raloxifeno foi realizada em dez campos aleatórios, usando microscópio acoplado a sistema de captura e análise de imagem (Imagelab®) com magnificação de 400X. O teste *t* de Student para duas amostras pareadas foi usado para análise estatística dos dados ($p < 0,05$). **RESULTADOS:** as médias da quantidade de microvasos antes e após o tratamento com raloxifeno foi $44,4 \pm 3,5$ e $22,6 \pm 1,6$, respectivamente. Foi observada redução significativa da quantidade de microvasos após tratamento com raloxifeno ($p < 0,001$). **CONCLUSÕES:** o tratamento primário com raloxifeno reduz significativamente a quantidade de microvasos no carcinoma de mama positivo para receptor de estrógeno em mulheres na pós-menopausa.

Abstract

PURPOSE: to evaluate the effect of raloxifene on breast cancer angiogenesis of menopausal women. **METHODS:** sixteen menopausal women with stage II (>3 cm) estrogen receptor positive operable breast cancer were enrolled in this study. Following confirmation of the diagnosis by incisional biopsy, the patients received 60 mg raloxifene daily for 28 days prior to the definitive surgery. Immunohistochemical study was performed on the sample tumors obtained during the biopsy for the diagnosis and evaluation of the *status* of estrogen receptor and during the definitive surgery. The anti-CD34 monoclonal antibody was used as a marker for endothelial cells. The vascular unit was considered as any endothelial cell or group of cells of a brownish color, clearly separated from adjacent microvessels, tumor cells or other connective tissue, forming or not lumen. Microvessel count was performed in ten fields of each slide using a 40X objective lens (400X magnification). A microscope coupled to a system of capture and analysis of image was used (Imagelab®). Statistical analysis of data was carried out using the paired Student *t* test and significance level was established at $p < 0.05$. **RESULTS:** mean numbers of anti-CD34 antibody-stained microvessels before and after raloxifene treatment were 44.4 ± 3.5 and 22.6 ± 1.6 , respectively. A significant reduction in the number of microvessels following raloxifene therapy was observed ($p < 0.001$). **CONCLUSIONS:** when administered as primary therapy for menopausal women with breast carcinoma, raloxifene significantly reduced tumoral angiogenesis.

Correspondência:

Benedito Borges da Silva
Avenida Elias João Tajra, 1260, apto. 600 – Jockey Club
CEP 64059-300 – Teresina (PI)
Fone: (86) 3232-5063 – Fax: (86) 3215-0470
E-mail: beneditoborges@ globo.com

Recebido

15/05/2007

Aceito com modificações

20/07/2007

Setor de Mastologia da Clínica Ginecológica do Hospital Getúlio Vargas – Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina (PI), Brasil.

¹ Professor Assistente de Ginecologia da Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina (PI), Brasil.

² Pós-graduando em Ciências e Saúde pela Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina (PI), Brasil.

³ Residente de Mastologia da Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina (PI), Brasil.

⁴ Professor Titular de Ginecologia, Chefe da Clínica Ginecológica e Coordenador da Residência Médica em Mastologia da Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina (PI), Brasil.

Introdução

O desenvolvimento de novos capilares a partir de vasos pré-existentes é essencial para o crescimento tumoral e ocorrência de metástases^{1,2}. O câncer de mama é uma neoplasia angiogênio-dependente e a intensidade da angiogênese é inversamente proporcional ao tempo de sobrevida das pacientes portadoras de câncer de mama³. Estudos indicam que a densidade de microvasos, parâmetro representativo da angiogênese, seria fator prognóstico significativo e independente para as pacientes com câncer de mama, embora menos preditivo que o estado linfonodal e o tamanho clínico do tumor⁴. A inibição da angiogênese tumoral é uma estratégia terapêutica importante para o tratamento do câncer de mama e, a propósito, diversas drogas vêm sendo estudadas com este intuito, dentre elas, os moduladores seletivos dos receptores de estrógenos (SERMs)^{2,5,6}.

O tamoxifeno, SERM de primeira geração, única droga aprovada até o momento pelo Food and Drugs Administration (FDA) para quimioprofilaxia e tratamento do câncer de mama⁷, tem se mostrado eficaz para reduzir a quantidade de microvasos e, conseqüentemente, a angiogênese, em mulheres menopausadas tratadas com esta droga^{2,6}. Contudo, o tamoxifeno apresenta ação estrogênica agonista no endométrio e, quando usado por longos períodos, aumenta o risco para hiperplasia e, até mesmo, carcinoma endometrial em até 3-4 vezes em mulheres menopausadas⁷. Este fato despertou o interesse pela busca de SERMs alternativos para quimioprevenção e tratamento do câncer de mama⁸. Por sua vez, o raloxifeno, SERM de segunda geração, inicialmente aprovado pelo FDA para prevenção e tratamento da osteoporose, mostrou efeitos antiestrogênicos na mama e nenhum efeito estimulador no endométrio em trials clínicos^{8,9}. Isto foi comprovado

pelo recém-publicado Study of Tamoxifen and Raloxifene trial, que mostrou ser o raloxifeno tão efetivo quanto o tamoxifeno em reduzir o risco de carcinoma invasivo de mama, além de ter reduzido o risco para o carcinoma de endométrio em relação ao tamoxifeno¹⁰.

Estudos sobre os efeitos do raloxifeno na mama, tanto clínicos observacionais como experimentais, têm sido realizados na mama normal, objetivando seu emprego na quimioprevenção do câncer de mama^{8,9,11}. Contudo, até onde investigamos, não encontramos na literatura estudos avaliando os efeitos do raloxifeno na angiogênese do câncer de mama de mulheres menopausadas, o que levou à concepção do presente estudo.

Métodos

Pacientes

O estudo foi um ensaio clínico prospectivo. Participaram deste estudo 16 pacientes menopausadas que buscaram cuidados médicos no Setor de Mastologia da Clínica Ginecológica do Hospital Getúlio Vargas da Universidade Federal do Piauí (UFPI), entre maio de 2006 e janeiro de 2007. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPI e todas as pacientes eram voluntárias e deram seu consentimento informado e assinado prévio ao início do estudo. As pacientes eram menopausadas há, no mínimo, um ano, e tinham carcinoma ductal invasivo, estágio II, com tumores positivos para o receptor de estrógeno e sem qualquer tratamento prévio. Foram excluídas do estudo pacientes portadoras de endocrinopatias ou em uso de medicação hormonal. O tamanho do tumor variou de 3 a 5 cm, e a idade das pacientes variou de 49 a 72 anos (média 61,8 anos), conforme Tabela 1.

As pacientes receberam 60 mg de raloxifeno/dia por um período de 28 dias previamente à cirurgia definitiva, iniciado após confirmação diagnóstica por biópsia. Foram retiradas duas amostras tumorais por meio de biópsias incisionais, uma por ocasião da confirmação diagnóstica de câncer de mama, previamente ao uso de raloxifeno, e outra, no 29º dia, por ocasião do tratamento cirúrgico definitivo, após 28 dias de tratamento.

Procedimentos experimentais

Os fragmentos tumorais foram fixados em formol tamponado por um período de 12-24 horas. Após a fixação, as amostras foram processadas e coradas usando hematoxilina-eosina para confirmação diagnóstica de carcinoma ductal infiltrante. Para identificação das células endoteliais, utilizou-se um anticorpo monoclonal para o antígeno CD34 (Clone QBend 10, DAKO Corporation, Carpinteria, USA) na diluição de 1:25 com

Tabela 1 - Idade das pacientes e estádios; características dos tumores.

| Característica | n | % |
|------------------------------|----|----|
| Idade (anos) | | |
| 40-49 | 1 | 6 |
| 50-59 | 4 | 25 |
| 60-69 | 9 | 56 |
| ≥70 | 2 | 13 |
| Estadiamento | | |
| Ia | 9 | 56 |
| Ib | 7 | 44 |
| Tamanho do tumor (cm) | | |
| 3,0-3,9 | 11 | 68 |
| 4,0-5,0 | 5 | 32 |
| Grav histológico | | |
| 1 | 8 | 50 |
| 2 | 6 | 37 |
| 3 | 2 | 12 |

soroalbumina bovina. Para recuperação antigênica, foi utilizada panela a vapor T-Fal® contendo tampão citrato de sódio (pH=6) a 90°C por 30 minutos. A seguir, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário específico “overnight” a 4°C. Após a incubação, as lâminas foram incubadas com “Em Vision Polymer Component (Dako)”, sendo coloridas com 3-3’ diaminobenzidina (Sigma), um substrato cromógeno. Foram utilizados tecidos de hemangioma hepático como controle positivo. Os receptores de estrógenos foram identificados por meio do anticorpo monoclonal anti-receptor de estrógeno humano (SP1) (Dako). Os tumores foram considerados receptor de estrógeno positivos quando 10% ou mais das células neoplásicas apresentavam núcleos corados para o anticorpo monoclonal anti-receptor de estrógeno¹².

Para a contagem de microvasos, utilizou-se o software Imagelab® 2.3 para captura e análise de imagem, desenvolvido pela Softium Informática Ltda., e um microscópio óptico Nikon Eclipse E400 acoplado a uma vídeo-câmera digital Samsung colorida modelo SCC-131, ambos pertencentes ao Setor de Mastologia da Clínica Ginecológica do Hospital Getúlio Vargas da UFPI. Áreas de maior concentração de microvasos (hotspots) foram selecionadas com aumento de 40X, após o que se procedeu à captura da imagem e contagem manual de microvasos em aumento de 400X, em dez campos aleatórios por lâmina, utilizando o sistema de análise de imagens Imagelab®. A unidade vascular considerada foi a de qualquer célula ou grupo de células endoteliais coradas que estavam nitidamente separadas entre si e de microvasos adjacentes, formando ou não lúmen¹³ (Figuras 1 e 2). As médias de microvasos foram obtidas pela relação entre o somatório do número de vasos contados, pré e pós-tratamento com raloxifeno, e o número de pacientes que participaram do estudo.

A comparação das médias da quantidade de microvasos contados antes e 28 dias após o uso de raloxifeno foi realizada por meio do teste *t* de Student para duas amostras pareadas. Os valores foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

Resultado

Observou-se maior concentração de microvasos corados com anticorpo anti-CD34 nas amostras tumorais obtidas previamente ao tratamento com raloxifeno comparadas com as obtidas após o tratamento (Figura 3). O estudo quantitativo mostrou que os valores máximo e mínimo da quantidade de microvasos previamente ao uso do raloxifeno foram 68 e 14 respectivamente e, após o uso do raloxifeno foram 38 e 24, respectivamente. O maior e o menor percentual de redução na quantidade

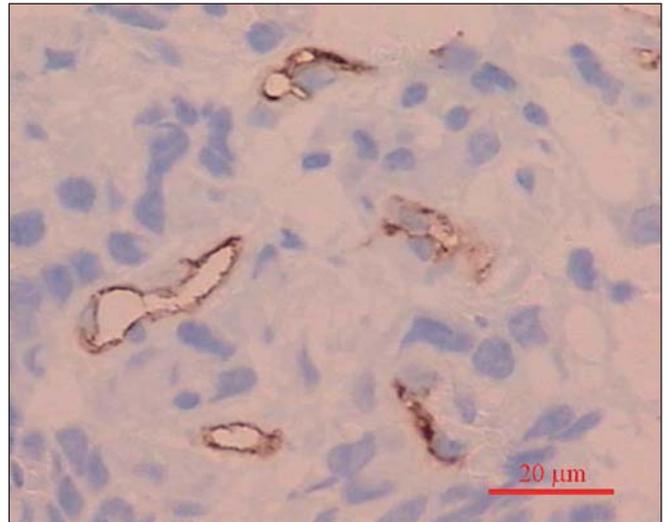


Figura 1 - Fotomicrografia de corte histológico de carcinoma invasivo de mama antes do tratamento com raloxifeno mostrando inúmeros microvasos corados em castanho (magnificação original 400X).

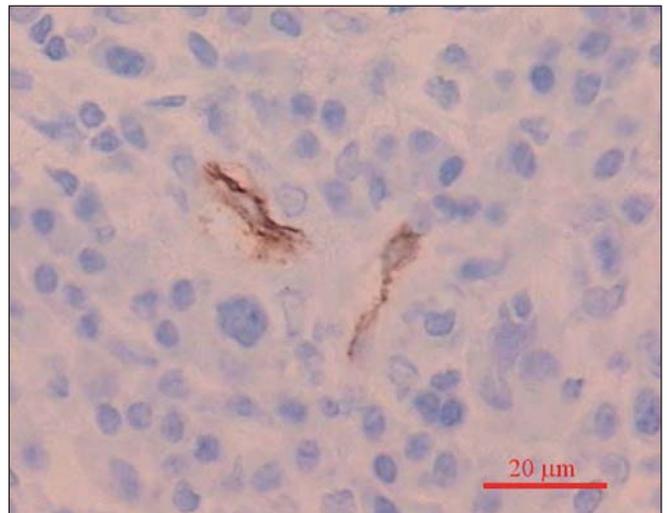


Figura 2 - Fotomicrografia de corte histológico de carcinoma invasivo de mama após tratamento com raloxifeno mostrando escassez de microvasos corados em castanho (magnificação original 400X).

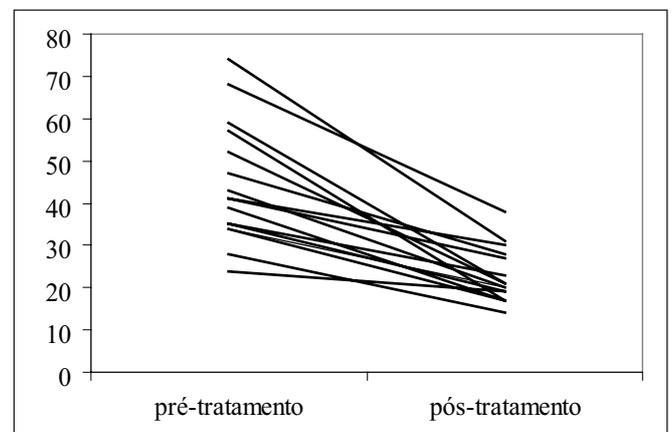


Figura 3 - Quantidade de microvasos corados com anti-CD34 pré e pós-tratamento com raloxifeno.

de microvasos foram 70,2 e 20,8%, respectivamente. As médias mais erro padrão de microvasos corados com anticorpo anti-CD34 pré e pós-tratamento com raloxifeno foram $44,4 \pm 3,5$ e $22,6 \pm 1,6$, respectivamente ($p < 0,001$), conforme Tabela 2.

Discussão

Atualmente, os SERMs vêm despertando grande interesse em estratégias terapêuticas antiangiogênicas. O tamoxifeno, SERM de primeira geração, tem se mostrado capaz de reduzir a quantidade de microvasos, tanto em modelos animais quanto em humanos^{2,5,6}. Contudo, os efeitos adversos do tamoxifeno, principalmente estimulando o endométrio, têm despertado o interesse pelo estudo de outros SERMs. Em particular, o raloxifeno tem mostrado ação antiestrogênica na mama e nenhum efeito agonista no endométrio⁸.

No presente estudo, o raloxifeno na dose de 60 mg ao dia, por 28 dias, reduziu significativamente a quantidade de microvasos no carcinoma de mama receptor de estrogênio positivo de mulheres pós-menopáusicas. A dose de 60 mg de raloxifeno ao dia foi escolhida por ser a dose normalmente usada na prevenção e tratamento da osteoporose e em trials clínicos visando à quimioprevenção do câncer de mama⁸⁻¹⁰. Não foi realizada a avaliação clínica da resposta ao tratamento com raloxifeno, tendo em vista o uso da droga por um período relativamente curto, com o intuito de não postergar o tratamento definitivo; todavia, em estudo em que o tamoxifeno foi empregado por um período de três a seis meses, em mulheres menopausadas com câncer de mama, foi observada uma redução significativa das dimensões da neoplasia².

As células endoteliais podem ser coradas por vários marcadores endoteliais. Entre os principais, está o fator VIII, que tem a desvantagem de corar principalmente vasos maduros e também o endotélio de linfáticos. Outro marcador atualmente muito utilizado é o CD31, que tem a vantagem sobre o fator VIII de estar presente em vasos sanguíneos imaturos, gerando contagens até 30% maiores em relação ao fator VIII, porém com a desvantagem de reagir com fibroblastos e algumas células plasmáticas. Além disso, sua expressão é geralmente fraca em células endoteliais de vasos tumorais, podendo ocorrer falha na coloração em até 20% das amostras de

câncer fixadas rotineiramente^{14,15}. O marcador imunohistoquímico utilizado neste estudo foi o CD34, por ser um marcador sensível das células endoteliais, corando mais fortemente o endotélio de vasos tumorais do que o de tecidos normais, sem o nível de falha de coloração associada ao marcador CD31^{14,15}.

Neste estudo, o raloxifeno reduziu o número de microvasos em pacientes com câncer de mama ductal infiltrante receptor de estrogênio positivo após uso do raloxifeno. A maioria das pacientes estava na faixa etária de 60-69 anos, possuía tumor entre 3 e 3,9 cm, grau histológico 1 e estágio clínico IIa. Não foi observada diferença entre o número de microvasos e a idade das pacientes, tamanho do tumor, estado linfonodal, grau histológico e estadiamento, embora estudos com um número maior de pacientes e uso de SERMs como o tamoxifeno por um período de tempo mais prolongado tenham mostrado uma associação entre a contagem de microvasos e alguns destes parâmetros^{2,16,17}.

Até onde pesquisamos, não encontramos outros estudos na literatura que tenham avaliado a quantidade de microvasos em tumores de mama receptor de estrogênio positivos de mulheres menopausadas tratadas primariamente com raloxifeno. Os estudos têm se concentrado no uso do raloxifeno na quimioprevenção desta neoplasia⁸⁻¹¹. Alguns estudos publicados na literatura poderiam colaborar na explicação dos efeitos antiangiogênicos do raloxifeno. O raloxifeno reduziu os níveis séricos do fator de crescimento insulina-símile 1 (IGF-1) comparado ao placebo¹⁸. O sistema IGF e os altos níveis séricos de IGF-1 são reconhecidos como fatores de risco para o desenvolvimento de cânceres epiteliais, com o IGF-1 interferindo em diferentes estágios da carcinogênese mamária desde a indução da proliferação, inibição da apoptose e estímulo angiogênico^{18,19}. O raloxifeno também promoveu redução significativa nos níveis séricos do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em mulheres menopausadas que utilizaram o raloxifeno na dose de 60 mg, 12 e 36 meses após iniciada a medicação, em relação ao placebo²⁰. O VEGF representa uma das mais importantes citocinas angiogênicas no câncer de mama, atuando em várias etapas do processo angiogênico, como a mitogênese de células endoteliais, mediação da atividade e secreção de enzimas proteolíticas, inibição da apoptose e modulação da migração de células en-

Tabela 2 - Média da contagem de microvasos com CD34 pré e pós-tratamento com raloxifeno.

| Contagem de microvasos por 10 campos | n | Média | Erro padrão | Máximo | Mínimo |
|--------------------------------------|----|-------|-------------|--------|--------|
| Pré-tratamento | 16 | 44,4 | 3,5 | 68 | 14 |
| Pós-tratamento | 16 | 22,6 | 1,6 | 24 | 38 |

*A diferença foi estatisticamente significante ($p < 0,001$).

doteliais, entre outras²¹. Além disso, o raloxifeno tem mostrado reduzir os níveis séricos do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) pela metade após 24 meses de tratamento em mulheres menopausadas²². O TNF- α é um peptídeo secretado por macrófagos ativos, cuja secreção é estimulada pela hipóxia tecidual e que tem se mostrado um potente estimulador da angiogênese em ensaios *in vivo*²³. O raloxifeno também se mostrou eficaz em inibir a proliferação celular no tecido mamário normal¹¹.

A angiogênese tumoral é um fenômeno essencial para o crescimento e disseminação tumoral^{1,2} e, em vários estudos, é citada como fator prognóstico independente e de grande importância na sobrevida global e tempo livre de doença^{2,13,16,17}, de forma que a inibição deste fenômeno, utilizando drogas com menos efeitos colaterais em relação aos quimioterápicos, como os SERMs, seria importante estratégia que poderia ser considerada no tratamento e, possivelmente, na quimioprevenção do câncer de mama.

Referências

- Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol.* 2002;29(6 Suppl 16):15-8.
- Marson LP, Kurian KM, Miller WR, Dixon JM. The effect of tamoxifen on breast tumour vascularity. *Breast Cancer Res Treat.* 2001;66(1):9-15.
- Bottini A, Berruti A, Bersiga A, Brizzi MP, Allevi G, Bolsi G, et al. Changes in microvessel density as assessed by CD34 antibodies after primary chemotherapy in human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2002;8(6):1816-21.
- Kato T, Kameoka S, Kimura T, Nishikawa T, Kobayashi M. The combination of angiogenesis and blood vessel invasion as a prognostic indicator in primary breast cancer. *Br J Cancer.* 2003;88(12):1900-8.
- da Silva BB, da Silva Junior RG, Borges US, da Silveira Filho MA, Pimentel IC, Gebrim LH, et al. Quantification of angiogenesis induced in rabbit cornea by breast carcinoma of women treated with tamoxifen. *J Surg Oncol.* 2005;90(2):77-80.
- da Silva BB, de Carvalho Gonçalves Nunes Galvão ER, Dos Santos LG. Evaluation of CD34 antigen expression following tamoxifen as primary treatment for breast cancer. *Int J Gynaecol Obstet.* 2006;93(1):70-1.
- Fisher B, Constantino JP, Wickerham DL, Cecchini RS, Cronin WM, Robidoux A, et al. Tamoxifen for the prevention of breast cancer: current status of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(22):1652-62.
- Cauley JA, Norton L, Lippman ME, Eckert S, Krueger KA, Purdie DW, et al. Continued breast cancer risk reduction in postmenopausal women treated with raloxifene: 4-year results from the MORE trial. Multiple outcomes of raloxifene evaluation. *Breast Cancer Res Treat.* 2001;65(2):125-34.
- Siris ES, Harris ST, Eastell R, Zanchetta JR, Goemaere S, Diez-Perez A, et al. Skeletal effects of raloxifene after 8 years: results from the continuing outcomes relevant to Evista (CORE) study. *J Bone Miner Res.* 2005;20(9):1514-24.
- Vogel VG, Constantino JP, Wickerham DL, Cronin WM, Cecchini RS, Atkins JN, et al. Effects of tamoxifen vs raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes: the NSABP Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 trial. *JAMA.* 2006;295(23):2727-41.
- da Silva BB, Lopes IM, Gebrim LH. Effects of raloxifene on normal breast tissue from premenopausal women. *Breast Cancer Res Treat.* 2006;95(2):99-103.
- Sannino P, Shousha S. Demonstration of oestrogen receptors in paraffin wax sections of breast carcinoma using the monoclonal antibody 1D5 and microwave oven processing. *J Clin Pathol.* 1994;47(1):90-2.
- Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast cancer. *N Engl J Med.* 1991;324(1):1-8.
- Wang JM, Kumar S, Pye D, Haboubi N, al-Nakib L. Breast carcinoma: comparative study of tumor vasculature using two endothelial cell markers. *J Natl Cancer Inst.* 1994;86(5):386-8.
- Leek RD. The prognostic role of angiogenesis in breast cancer. *Anticancer Res.* 2001;21(6B):4325-31.
- Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1992;84(24):1875-87.
- Heimann R, Ferguson D, Powers C, Recant WM, Weichselbaum RR, Hellman S. Angiogenesis as a predictor of long-term survival for patients with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88(23):1764-9.
- Torrisi R, Baglietto L, Johansson H, Veronesi G, Bonanni B, Guerrieri-Gonzaga A, et al. Effect of raloxifene on IGF-I and IGFBP-3 in postmenopausal women with breast cancer. *Br J Cancer.* 2001;85(12):1838-41.
- Laban C, Bustin SA, Jenkins PJ. The GH-IGF-I axis and breast cancer. *Trends Endocrinol Metab.* 2003;14(1):28-34.
- Lam PM, Yim SF, Britton-Jones C, Chung TK, Haines C. Raloxifene therapy in postmenopausal women is associated with a significant reduction in the concentration of serum vascular endothelial growth factor. *Fertil Steril.* 2004;81(2):393-7.
- Ferrara N. VEGF as a therapeutic target in cancer. *Oncology.* 2005;69 Suppl 3:11-6.
- Gianni W, Ricci A, Gazzaniga P, Brama M, Pietropaolo M, Votano S, et al. Raloxifene modulates interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha synthesis in vivo: results from a pilot clinical study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(12):6097-9.
- Schott RJ, Morrow LA. Growth factors and angiogenesis. *Cardiovasc Res.* 1993;27(7):1155-61.