

ANA MARIA FURTADO-VELOSO<sup>1</sup>  
IONE MARIA RIBEIRO SOARES LOPES<sup>2</sup>  
PEDRO VITOR LOPES-COSTA<sup>2</sup>  
LINA GOMES DOS SANTOS<sup>3</sup>  
BENEDITO BORGES DA SILVA<sup>4</sup>

# Expressão da proteína Bax no tecido mamário normal de mulheres no menacme tratadas com raloxifeno

*Expression of Bax protein in normal tissue of premenopausal women treated with raloxifene*

## Artigos originais

### Palavras-chave

Mama/efeito de drogas  
Neoplasias mamárias/prevenção & controle  
Fibroadenoma  
Raloxifeno/uso terapêutico  
Proteína X associada a bcl-2  
Quimioprevenção

### Keywords

Breast/drug effects  
Breast neoplasms/prevention & control  
Fibroadenoma  
Raloxifene/therapeutic use  
Bcl-2-associated X protein  
Chemoprevention

### Resumo

**OBJETIVO:** avaliar a expressão do antígeno Bax no epitélio mamário normal de mulheres na pré-menopausa tratadas com raloxifeno. **MÉTODOS:** estudo randomizado duplo-cego, envolvendo 33 mulheres pré-menopáusicas com fibroadenoma. As pacientes foram divididas em dois grupos: Placebo, (n=18) e Raloxifeno 60 mg, (n=15). A medicação foi usada durante 22 dias, começando no primeiro dia do ciclo menstrual. Uma biópsia foi realizada no 23º dia do ciclo menstrual, durante a qual uma amostra do tecido mamário normal adjacente ao fibroadenoma foi coletada e submetida a estudo imuno-histoquímico utilizando o anticorpo policlonal anti-Bax para avaliar a expressão da proteína Bax. A imunorreação para a proteína Bax foi avaliada, levando-se em consideração a intensidade e a fração de células coradas, cuja combinação resultou em um escore final de 0 a 6. Os casos com escore final  $\geq 3$  foram classificados como positivos para proteína Bax. O teste do  $\chi^2$  foi usado para análise estatística dos dados ( $p < 0,05$ ). **RESULTADOS:** a porcentagem de positividade da proteína Bax foi 66,7 e 73,3% nos Grupos A e B, respectivamente. Não houve diferença significativa na expressão do Bax entre os dois grupos ( $p = 0,678$ ). **CONCLUSÕES:** o raloxifeno administrado por 22 dias na dose de 60 mg/dia não alterou a expressão da proteína Bax no tecido mamário normal de mulheres no menacme.

### Abstract

**PURPOSE:** to evaluate the expression of Bax antigen in the normal mammary epithelium of premenopausal women treated with raloxifene. **METHODS:** a randomized double-blind study was conducted in 33 ovulatory premenopausal women with fibroadenoma. Patients were divided into two groups: Placebo, (n=18) and Raloxifene 60 mg, (n=15). The medication was used for 22 days, beginning on the first day of the menstrual cycle. An excisional biopsy was carried out on the 23<sup>rd</sup> day of the menstrual cycle and a sample of normal breast tissue adjacent to the fibroadenoma was collected and submitted to immunohistochemical study using anti-Bax polyclonal antibody to evaluate the expression of Bax protein. Immunoreaction for Bax was evaluated taking into consideration intensity and fraction of stained cells, whose combination resulted in a final score ranging from 0 to 6. Cases with a final score  $\geq 3$  were classified as positive for Bax. The  $\chi^2$  test was used for statistical analysis ( $p < 0.05$ ). **RESULTS:** the percentage of positivity of Bax protein expression was 66.7 and 73.3% in Groups A and B, respectively. There was no significant difference in Bax expression between the two groups ( $p = 0.678$ ). **CONCLUSIONS:** raloxifene, administered for 22 days in the dose of 60 mg/day, did not alter the expression of Bax protein in the breast normal tissue of premenopausal women.

### Correspondência:

Benedito Borges da Silva  
Avenida Elias João Tajra, 1.260, apto 600 – Jockey Club  
CEP 64059-300 – Teresina/PI  
Fone: (86) 3232-5063/Fax: (86) 3215-0470  
E-mail: beneditoborges@globo.com

### Recebido

6/4/2008

### Aceito com modificações

29/4/2008

Trabalho realizado no Setor de Mastologia do Hospital Getúlio Vargas da Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina (PI), Brasil.

<sup>1</sup> Pós-graduando em Ciências e Saúde pela Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina (PI), Brasil.

<sup>2</sup> Professor Adjunto de Ginecologia da Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina (PI), Brasil.

<sup>3</sup> Professor Adjunto de Anatomia Patológica da Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina (PI), Brasil.

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

## Introdução

Tamoxifeno, um modulador seletivo do receptor de estrógeno (SERM) de primeira geração, foi a primeira droga aprovada nos Estados Unidos para prevenção do câncer de mama em mulheres de alto risco, após os resultados do National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study, patrocinado pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos<sup>1-3</sup>. Contudo, o tamoxifeno, quando usado por longos períodos, pode apresentar sérios efeitos colaterais, sendo o mais preocupante a estimulação endometrial, que pode resultar no desenvolvimento de carcinoma do endométrio<sup>1</sup>. Esta preocupação aumentou o interesse pelo estudo de outros SERMs que poderiam ser uma alternativa ao tamoxifeno<sup>4,5</sup>.

A propósito, o raloxifeno, um SERM de segunda geração, aprovado nos Estados Unidos e em outros países para prevenção e tratamento da osteoporose em mulheres menopausadas, tem mostrado exercer uma ação antiestrogênica tanto na mama quanto no endométrio de animais de laboratório<sup>6,7</sup>. Além disto, estudos clínicos em que o raloxifeno foi usado por mulheres menopausadas por um período superior a dois anos mostraram redução da freqüência do câncer de mama sem estimulação endometrial<sup>8</sup>. Recentemente, estes achados foram confirmados pelo Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) trial, que mostrou que o raloxifeno foi tão efetivo quanto o tamoxifeno em reduzir o câncer invasivo de mama, com vantagem de não aumentar o risco para carcinoma endometrial<sup>9</sup>. Contudo, este foi um estudo clínico, sendo o estudo dos efeitos diretos dos SERMs na mama normal difícil de ser realizado por questões de natureza ética<sup>4</sup>.

Assim, há escassez de estudos na literatura avaliando os efeitos do raloxifeno sobre o tecido mamário normal de mulheres na pré-menopausa<sup>4</sup>. Todavia, já foi mostrado que o raloxifeno produziu uma redução significativa na proliferação do tecido mamário normal de mulheres no menacme, avaliada por meio da expressão do antígeno Ki-67, em comparação com o grupo placebo<sup>4</sup>. Os mecanismos de proliferação celular e apoptose mantêm o equilíbrio do crescimento normal do parênquima mamário<sup>10,11</sup>. Contudo, a ação do raloxifeno neste equilíbrio não está clara. Embora o efeito antiproliferativo dos SERMs no câncer de mama possa ser via atividade citostática receptor-mediada, relatos prévios têm sugerido alterações morfológicas consistentes com apoptose<sup>12</sup>.

A apoptose é regulada principalmente pelas proteínas da família Bcl-2, que consiste de duas subfamílias opostas: uma com atividade antiapoptótica (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w) e outra pró-apoptótica<sup>13</sup>. A subfamília pró-apoptótica consiste de proteínas tais como Bax, Bak, Bok, Bad, Bid, Bik e Bim<sup>13,14</sup>. A proteína Bax promove a morte celular e é uma das proteínas mais estudadas da subfamília pró-

apoptótica. A apoptose induzida pelo tamoxifeno no câncer de mama está relacionada à supressão da proteína antiapoptótica Bcl-2, mas não se observou alteração da expressão da proteína pró-apoptótica Bax<sup>12,15</sup>. Por sua vez, o raloxifeno inibe a proliferação celular no tecido mamário normal<sup>4</sup>, mas o seu efeito na expressão da proteína Bax no tecido mamário normal é desconhecido, o que levou à concepção do presente estudo.

## Métodos

Este é um estudo randomizado duplo-cego, que envolveu 33 pacientes com fibroadenoma atendidas no Setor de Mastologia do Hospital Getúlio Vargas da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Todas as pacientes eram voluntárias e deram o seu consentimento informado assinado antes do início do estudo. O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPI. Todas as pacientes tinham entre 18 e 40 anos de idade e estavam no menacme. Foram realizados os exames clínicos, ultra-sonografia, punção aspirativa com agulha fina e, posteriormente, exame histopatológico do fibroadenoma para excluir malignidade. Todas as pacientes tinham ciclos menstruais regulares há pelo menos seis meses antes de participarem do estudo. As pacientes não tinham qualquer história de doença tromboembólica, gestação, aleitamento ou uso de contraceptivo hormonal nos últimos 12 meses antes do estudo.

### Delineamento do estudo

As pacientes foram randomizadas em dois grupos: Grupo Placebo, (n=18) e Grupo Raloxifeno, (n=15). A droga foi administrada na dose de 60 mg ao dia, por 22 dias, começando no primeiro dia do ciclo menstrual. Os Grupos Placebo e Raloxifeno foram considerados homogêneos com respeito à idade (média: 24,5 e 25,5, respectivamente; p=0,6), idade da menarca (média: 12,6 e 13,1, respectivamente; p=0,17) e tamanho do fibroadenoma (média: 3,5 e 4,5 cm, respectivamente; p=0,2). No 23º dia do ciclo menstrual, após confirmação da fase lútea pelo nível sérico de progesterona igual ou superior a 6,5 ng/mL, as pacientes foram submetidas à exérese do fibroadenoma com extração de um fragmento milimétrico de parênquima mamário adjacente ao fibroadenoma, sem inclusão de tecido adiposo ou com alterações morfológicas.

### Imuno-histoquímica

As amostras de tecido mamário foram fixadas em formol tamponado a 10%, por 24 horas, e, em seguida, embebidas em parafina. Cortes histológicos medindo 4 µm dos blocos parafinizados foram usados para estudo imuno-histoquímico. A imuno-histoquímica realizada para identificar a expressão do Bax utilizou anticorpo

policlonal de coelho anti-Bax humano da Dako, código A3533, na diluição 1:150. Os cortes foram lavados com solução neutra e o polímero marcado com peroxidase foi incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. A seguir, após lavagem dos cortes com solução neutra, a reação de peroxidase foi desenvolvida com tetrahidrocloridrato de diaminobenzidina. As células foram consideradas positivas para o antígeno Bax quando o seu citoplasma apresentou coloração marrom.

A expressão da proteína Bax foi avaliada à microscopia de luz por dois observadores que desconheciam a identificação das pacientes. Não houve discordância entre as duas contagens. Estes observadores realizaram uma contagem semi-quantitativa das células com citoplasma corado positivamente usando microscópio óptico Nikon, modelo Eclipse E400, conectado a um sistema de captura de imagem, e usando objetiva de 40X (magnificação 400X).

A imunorreação do Bax foi avaliada segundo os critérios estabelecidos por van Slooten et al.<sup>16</sup>, levando em consideração os seguintes parâmetros: intensidade de coloração da célula (I) e fração de células coradas (F). A intensidade de coloração das células foi classificada como: 0 (negativo), 1 (fracamente corada), 2 (moderadamente corada) e 3 (fortemente corada). A fração de células coradas foi classificada como: I (0-25%), II (25-75%) ou III (75-100%). O escore final foi o resultado da combinação dos dois parâmetros (I e F) e variou de 0 a 6. Os casos com escore final  $\geq 3$  foram classificados como positivos para a proteína Bax. Em todos os casos, coloração marrom no citoplasma foi adotada como padrão para positividade. A avaliação começou no local com a maior quantidade de células coradas, após a qual os outros campos microscópicos foram selecionados aleatoriamente, e a intensidade de coloração e a percentagem de células coradas foram avaliadas, resultando em um escore final<sup>16</sup>.

O teste *t* de Student foi usado para verificar a homogeneidade entre os dois grupos com respeito à idade das pacientes, idade da menarca e volume do tumor ( $p < 0,05$ ). Foi utilizado o teste do  $\chi^2$  para a análise dos dados relativos ao Bax e a significância estatística foi estabelecida em  $p < 0,05$ .

## Resultados

À microscopia de luz, as células do epitélio lobular mamário das pacientes do Grupo Placebo mostraram reação imuno-histoquímica para o antígeno Bax, expressa por numerosas células, contendo citoplasma com intensa coloração marrom, similar ao Grupo Raloxifeno (Figuras 1 e 2). A análise da expressão da proteína Bax mostrou uma positividade em 12 (66,7%) dos casos do Grupo

Placebo comparado com 11 (73,3%) dos casos do Grupo Raloxifeno, conforme a Tabela 1. Esta diferença não foi estatisticamente significativa ( $p = 0,678$ ). A mediana dos escores nos Grupos Placebo e Raloxifeno foi 5 e 3, respectivamente.

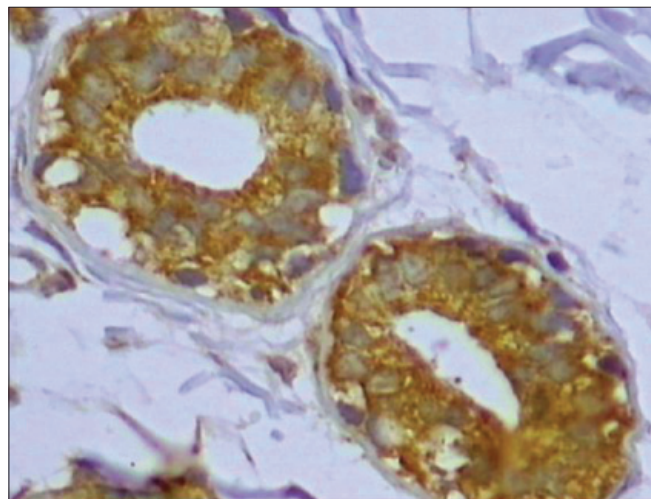


Figura 1 - Fotomicrografia de corte histológico de uma porção do lóbulo mamário de uma paciente do Grupo Placebo, mostrando numerosas células contendo citoplasmas com intensa coloração marrom (magnificação original, 400X).

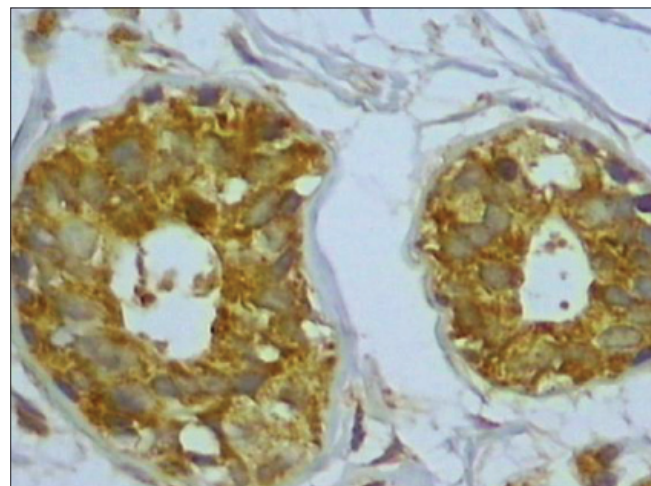


Figura 2 - Fotomicrografia de corte histológico de uma porção do lóbulo mamário de uma paciente do Grupo Raloxifeno, mostrando numerosas células contendo citoplasmas corados em marrom, similar ao Grupo Placebo (magnificação original, 400X).

**Tabela 1** - Percentagem de células com expressão do antígeno Bax nos Grupos Placebo e Raloxifeno

Grupo	Negativo n (%)	Positivo n (%)	Total n (%)
Placebo	6 (33,3)	12 (66,7)	18 (100,0)
Raloxifeno	4 (26,7)	11 (73,3)	15 (100,0)
Total	10 (30,3)	23 (69,7)	33 (100,0)

Não houve diferença significativa entre a percentagem de células com expressão positiva do antígeno Bax nos Grupos Placebo e Raloxifeno (teste do  $\chi^2$ :  $p = 0,678$ ; teste exato de Fisher:  $p = 0,722$ ).

## Discussão

O tamoxifeno é comumente usado na terapia adjuvante do câncer de mama e é a droga chave para a quimioprevenção do câncer de mama em mulheres de alto risco<sup>1</sup>. Contudo, um aumento na incidência do carcinoma endometrial foi previamente relatado com uso da droga por longos períodos<sup>1</sup>. O STAR trial, estudo recentemente publicado, mostrou que o raloxifeno é tão efetivo quanto o tamoxifeno na redução do carcinoma invasivo de mama, com vantagem de estar associado a menor risco para carcinoma endometrial<sup>9</sup>. Apesar disto, o raloxifeno ainda não foi aprovado para quimioprevenção do câncer de mama em mulheres de alto risco. O mecanismo de ação do raloxifeno não está claro. A droga inibe a proliferação celular no tecido mamário normal<sup>4</sup>, mas não sabemos se altera a expressão de proteínas, como o Bax, que promovem a apoptose.

No presente estudo, o raloxifeno foi usado na dose de 60 mg ao dia, por 22 dias, e não se mostrou capaz de alterar a expressão do Bax nas células do tecido mamário de mulheres no menacme comparado ao grupo tratado com placebo. A dose de 60 mg/dia foi escolhida por ser a dose comumente usada na quimioprevenção e tratamento da osteoporose de mulheres menopausadas e também em trials clínicos desta droga na quimioprevenção do câncer de mama. O esquema de 22 dias de uso da medicação por mulheres pré-menopáusicas, começando no primeiro dia do ciclo menstrual, foi escolhido baseado em relatos que a mama apresenta maior atividade proliferativa e apoptótica durante a fase lútea do ciclo<sup>10,17</sup> e, por esta razão, é a fase mais importante para o estudo do efeito antiproliferativo<sup>4,18</sup> e, possivelmente, antiapoptótico da droga. A avaliação do efeito do raloxifeno no tecido mamário adjacente ao fibroadenoma de mulheres pré-menopáusicas pode beneficiar as pacientes, pois estudos prévios com outro SERM – mais precisamente o tamoxifeno – mostraram redução nas dimensões do tumor avaliado pela ultra-sonografia e, em alguns casos, ocorreu desaparecimento da lesão, evitando-se cirurgia previamente programada<sup>19</sup>.

O raloxifeno é um SERM benzotiofeno quimicamente distinto do tamoxifeno, que, de maneira similar ao tamoxifeno, interage com o receptor de estrogênio. Contudo, o seu real mecanismo de ação permanece incerto<sup>20,21</sup>. O tamoxifeno estimula a função de ativação da transcrição gênica 1 (AF-1) do receptor de estrogênio presente nas células do endométrio e bloqueia a função de ativação 2 (AF-2), predominantemente nas células da mama responsáveis pela ligação a moléculas coativadoras necessárias para a transcrição gênica no tecido alvo. Por outro lado, o raloxifeno inativa tanto AF-1 quanto AF-2, resultando em uma ação antiestrogênica tanto na mama quanto no endométrio<sup>20,21</sup>.

Os efeitos dos SERMs sobre a expressão das proteínas anti- e pró-apoptóticas são intrigantes. A propósito, o efeito do raloxifeno na linhagem de célula TSU-PR1 mostrou indução de apoptose caspase-dependente por meio da clivagem da proteína Bad sem alteração significativa na expressão da proteína Bax<sup>22</sup>. Alguns autores têm mostrado que SERMs, como o tamoxifeno, induziram apoptose nas células do câncer de mama por meio da supressão da proteína Bcl-2, sem, contudo, afetar a expressão da proteína Bax<sup>15</sup>. A expressão da proteína pró-apoptótica Bax não foi correlacionada com a expressão do Bcl-2 nem com a frequência de células apoptóticas<sup>16</sup>. Assim, não estão claros os efeitos dos SERMs nas proteínas relacionadas à apoptose. De acordo com o que foi investigado, não há relatos na literatura a respeito dos efeitos do raloxifeno sobre a expressão da proteína Bax no tecido mamário humano normal. No presente estudo, a porcentagem de células expressando o antígeno Bax foi maior no grupo tratado com raloxifeno, mas esta diferença não foi significativa. Assim, pela importância que o raloxifeno poderia ter na quimioprevenção do câncer de mama, estes resultados abrem perspectivas para novas pesquisas, incluindo estudos com maior número de pacientes e, provavelmente, usando a droga por um período de tempo maior, com o objetivo de avaliar os efeitos do raloxifeno em promotores de apoptose no tecido mamário humano normal, como a proteína Bax.

## Referências

1. Fisher B, Constantino JP, Wickerham DL, Redmon 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;90(18):1371-88.
2. Osborne MP. Breast cancer prevention by antiestrogens. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;889:146-51.
3. Jordan VC. Progress in the prevention of breast cancer: concept to reality. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000;74(5):269-77.
4. 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.
5. da Silva BB, Moita DS, Pires CG, Sousa-Junior EC, dos Santos AR, Lopes-Costa PV. Evaluation of insulin-like growth factor-I in postmenopausal women with breast cancer treated with raloxifene. *Int Semin Surg Oncol.* 2007;4:18.
6. Stygar D, Muravitskaya N, Eriksson B, Eriksson H, Sahlin L. Effects of SERM (selective estrogen receptor modulator) treatment on growth and proliferation in the rat uterus. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003;1:40.
7. Actis AM, Cocca CM, Gutierrez A, Croci M, Rivera ES, Bergoc RM. Estrogen receptor profiles: changes in mouse and rat mammary tumors by treatment with selective estrogen receptor modifiers. *Med Princ Pract.* 2004;13(4):220-6.

8. Cummings SR, Eckert S, Krueger KA, Grady D, Powles TJ, Cauley JA, et al. The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation. *JAMA*. 1999;281(23):2189-97.
9. Vogel VG, Costantino JP, Wickerham DL, Cronin WM, Cecchini RS, Atkins JN, Bevers TB, Fehrenbacher L, Pajon ER Jr, Wade JL 3rd, Robidoux A, Margolese RG, James J, Lippman SM, Runowicz CD, Ganz PA, Reis SE, McCaskill-Stevens W, Ford LG, Jordan VC, Wolmark N; National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP). 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.
10. Anderson TJ, Ferguson DJ, Raab GM. Cell turnover in the "resting" human breast: influence of parity, contraceptive pill, age and laterality. *Br J Cancer*. 1982;46(3):376-82.
11. Parton M, Dowsett M, Smith I. Studies of apoptosis in breast cancer. *BMJ*. 2001;322(7301):1528-32.
12. Zhang GJ, Kimijima I, Onda M, Kanno M, Sato H, Watanabe T, et al. Tamoxifen-induced apoptosis in breast cancer cells relates to down-regulation of bcl-2, but not bax and bcl-X(L), without alteration of p53 protein levels. *Clin Cancer Res*. 1999;5(10):2971-7.
13. Nechushtan A, Smith CL, Lamensdorf I, Yoon SH, Youle RJ. Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J Cell Biol*. 2001;153(6):1265-76.
14. Sjöström J, Blomqvist C, von Boguslawski K, Bengtsson NO, Mjaaland I, Malmström P, et al. The predictive value of bcl-2, bax, bcl-xL, bag-1, fas, and fasL for chemotherapy response in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2002;8(3):811-6.
15. Kumar R, Vadlamudi RK, Adam L. Apoptosis in mammary gland and cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2000;7(4):257-69.
16. van Slooten HJ, Clahsen PC, van Dierendonck JH, Duval C, Pallud C, Mandard AM, et al. Expression of Bcl-2 in node-negative breast cancer is associated with various prognostic factors, but does not predict response to one course of perioperative chemotherapy. *Br J Cancer*. 1996;74(1):78-85.
17. Navarrete MA, Maier CM, Falzoni R, Quadros LG, Lima GR, Baracat EC, et al. Assessment of the proliferative, apoptotic and cellular renovation indices of the human mammary epithelium during the follicular and luteal phases of the menstrual cycle. *Breast Cancer Res*. 2005;7(3):R306-13.
18. de Lima GR, Facina G, Shida JY, Chein MB, Tanaka P, Dardes RC, et al. Effects of low dose tamoxifen on normal breast tissue from premenopausal women. *Eur J Cancer*. 2003;39(7):891-8.
19. Facina G, de Lima GR, Simões MJ, Novo NF, Gebrim LH. Estrogenic activity of tamoxifen on normal mammary parenchyma in the luteal phase of the menstrual cycle. *Int J Gynaecol Obstet*. 1997;56(1):19-24.
20. MacGregor Schafer J, Liu H, Bentrem DJ, Zapf JW, Jordan VC. Allosteric silencing of activating function 1 in the 4-hydroxytamoxifen estrogen receptor complex is induced by substituting glycine for aspartate at amino acid 351. *Cancer Res*. 2000;60(18): 5097-105.
21. Liu H, Park WC, Bentrem DJ, McKian KP, Reyes Ade L, Loweth JA, et al. Structure-function relationships of the raloxifene-estrogen receptor-alpha complex for regulating transforming growth factor-alpha expression in breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2002;277(11):9189-98.
22. Kim HT, Kim BC, Kim IY, Mamura M, Seong DH, Jang JJ, et al. Raloxifene, a mixed estrogen agonist/antagonist, induces apoptosis through cleavage of BAD in TSU-PR1 human cancer cells. *J Biol Chem*. 2002;277(36):32510-5.