

Universidade Estadual Paulista – UNESP

Patrícia Pinto Saraiva

**Estudo clínico e molecular da relação entre câncer de mama e
doenças tireoidianas**

Dissertação – Mestrado

Botucatu – SP

2002

Patrícia Pinto Saraiva

**Estudo clínico e molecular da relação entre
câncer de mama e doenças tireoidianas**

Dissertação apresentada ao setor de pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista para a obtenção do título de mestre em Fisiopatologia em Clínica Médica, Área de Concentração: Metabolismo e Nutrição

Orientador: Prof.^a Dr.^a Célia Regina Nogueira

Botucatu - SP

2002

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Elza Numata

Saraiva, Patrícia Pinto.

Estudo clínico e molecular da relação entre câncer de mama e doenças
tireoidianas / Patrícia Pinto Saraiva. – 2002.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual
Paulista, Botucatu, 2002.

Orientadora: Célia Regina Nogueira

1. Tireóide - Doenças - Aspectos moleculares

CDD 616.44

Palavras-chave: Hormônio tireóideo; Estrógeno; Receptores de estrógeno

DADOS CURRICULARES

Patrícia Pinto Saraiva

NASCIMENTO 07.3.1970 – São Paulo / SP

FILIAÇÃO Roberto Pinto Saraiva

Marlene Mesaros Saraiva

1990/1993 Curso de Graduação

Faculdade de Odontologia de Bauru – USP

1994/2002 Professora auxiliar do Departamento de Odontologia,

Disciplina de Periodontia da Universidade do Sagrado

Coração-USC. Bauru

DEDICATÓRIA

A Deus, por tanto.

À minha família, em especial:
Aos meus pais, pelos princípios de honestidade e dignidade,
pela dedicação, incentivo e amor;
Aos meus irmãos pela força, carinho e amor, que unem
nossa família.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE TABELAS.....	7
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. OBJETIVOS.....	22
3. PACIENTES E MÉTODOS.....	23
3.1. Pacientes.....	23
3.1.1. Estudo clínico.....	23
3.2. Métodos.....	25
3.2.1. Técnica imunohistoquímica para a pesquisa de receptores de estrógeno.....	25
3.2.2. Ensaio dos receptores de estrógeno.....	27
3.2.3. Estudo da estrutura molecular espacial do T ₃ e ER.....	27
4. ASPECTOS ÉTICOS.....	28
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
6. RESULTADOS.....	29
7. DISCUSSÃO.....	38
8. CONCLUSÕES.....	42
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
10. ANEXOS.....	53
11. RESUMO.....	61
12. <i>ABSTRACT</i>	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura cristalográfica do ER e TR.....	10
Figura 2 - Diferenças entre os vários elementos responsivos hormonais.....	11
Figura 3 - Modelo de ação do hormônio triiodotironina (T ₃) no seu receptor....	12
Figura 4 - Modelo estrutural de uma região domínio ligante de DNA (DBD)...	13
Figura 5 - Regiões de ligação entre o DNA e o complexo formado pelo receptor de hormônio, unido ao seu elemento responsivo.....	15
Figura 6 - Análise da deleção ocorrida no domínio N-terminal do T ₃ R α	17
Figura 7 - Alteração hormonal nas pacientes com câncer de mama e menopausadas	31
Figura 8 - Ausência de células coradas, através do método de imunistoquímica, representando um tecido ER negativo (ER-).....	32
Figura 9 - Células coradas pelo método de imunistoquímica, revelando um tecido portador de receptor de estrógeno (ER+).....	33
Figura 10 - Estrutura molecular do ligante estradiol.....	35
Figura 11 - Estrutura molecular do T ₃ (não planar).....	35
Figura 12 - Estrutura molecular do raloxifeno.....	35
Figura 13 - Ligação do estrógeno ao seu receptor.....	36
Figura 14 - Ligação do raloxifeno ao ER através de um de seus braços.....	36
Figura 15 - Ligação do hormônio tireóideo ao receptor de estrógeno.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição das alterações tireoidianas em pacientes com câncer de mama e em pacientes-controle.....	30
Tabela 2 - Deslocamento da ligação do estrógeno marcado do seu receptor por T ₃ , realizado em 6 pacientes.....	34

1. INTRODUÇÃO

O hormônio tireóideo é essencial para o crescimento e desenvolvimento, exercendo efeitos específicos em vários sistemas de órgãos, incluindo o reprodutivo, cardiovascular, sistema nervoso central e periférico (Li et al., 2000).

O crescimento e o desenvolvimento das mamas requerem a ação coordenada de muitos hormônios: prolactina, estrógeno, progesterona, esteróides adrenais, insulina, hormônio de crescimento e hormônios tireóideos (Schmidt & Moerger, 1967; Nishe & Siiteri, 1981). Os hormônios tireóideos não são essenciais para o desenvolvimento dos ductos mamários, mas parecem estimular o desenvolvimento dos lóbulos destas glândulas (Topper & Freeman, 1980). Além disso, acredita-se que, em estados de excesso ou deficiência do hormônio tireóideo, o processo possa ser afetado negativamente (Meites & Kraft, 1964). Vonderhaar et al., 1986 verificaram que os hormônios tireóideos influenciam o desenvolvimento das células epiteliais das glândulas mamárias de ratos. Em termos de diferenciação celular, os hormônios tireóideos aumentam a responsividade do tecido mamário à prolactina na glândula de ratos, através da ativação dos receptores de prolactina (Borellini & Oka, 1989). No tecido mamário de coelhos, os hormônios tireóideos estimulam a síntese de caseína induzida por prolactina, agindo, portanto, na diferenciação em etapa pós-transcricional (Borellini & Oka, 1989).

Os receptores de estrógeno devem estar presentes para o estrógeno influenciar a atividade biológica e a velocidade de crescimento das células mamárias (McGuire et al., 1974; Wittliff, 1984; Habel & Stanford, 1993) tanto em tecido normal (Hayden & Forsyth, 1977), como em tecido neoplásico (Carbon et al., 1981). A presença (ER+) ou ausência (ER-) do receptor de estrógeno e sua concentração no tecido mamário maligno correlaciona-se com a terapêutica a ser instituída e pode ser utilizada como prognóstico clínico do câncer de mama (Edwards et al., 1979; Bernstein & Ross, 1993; Habel & Stanford, 1993).

Receptores hormonais (HR) são proteínas que se ligam a hormônios circulantes, mediando seus efeitos celulares (Rosen, 1997). Os receptores hormonais nucleares são proteínas regulatórias que interagem com o DNA em regiões específicas, modulando a transcrição gênica nas células-alvo (Amero et al., 1992) (Figura 1). Possuem regiões de domínios ligantes de DNA altamente conservadas (DBDs) e domínios ligantes moderadamente conservados (LBDs). Além disso, são divergentes em seu domínio N-terminal (NTD) (Beato et al., 1995; Mangelsdorf et al., 1995). Os domínios N-terminais e domínios ligantes são caracterizados por variação na seqüência de bases entre os diferentes receptores e contêm subdomínios de ativação (Tan et al., 2000).

Com o avanço da biologia molecular, a análise dos receptores esteróides possibilitou entender detalhes moleculares do controle transcricional. Esses estudos levaram à identificação dos receptores do hormônio tireóideo (TRs)

como membros da “superfamília de receptores” intracelulares que incluem os receptores dos hormônios esteróidicos (glicocorticóides, estrógenos, progesterona, andrógenos e mineralocorticóides) e receptores da vitamina D e do ácido retinóico (Evans, 1988). (FIGURA 1).

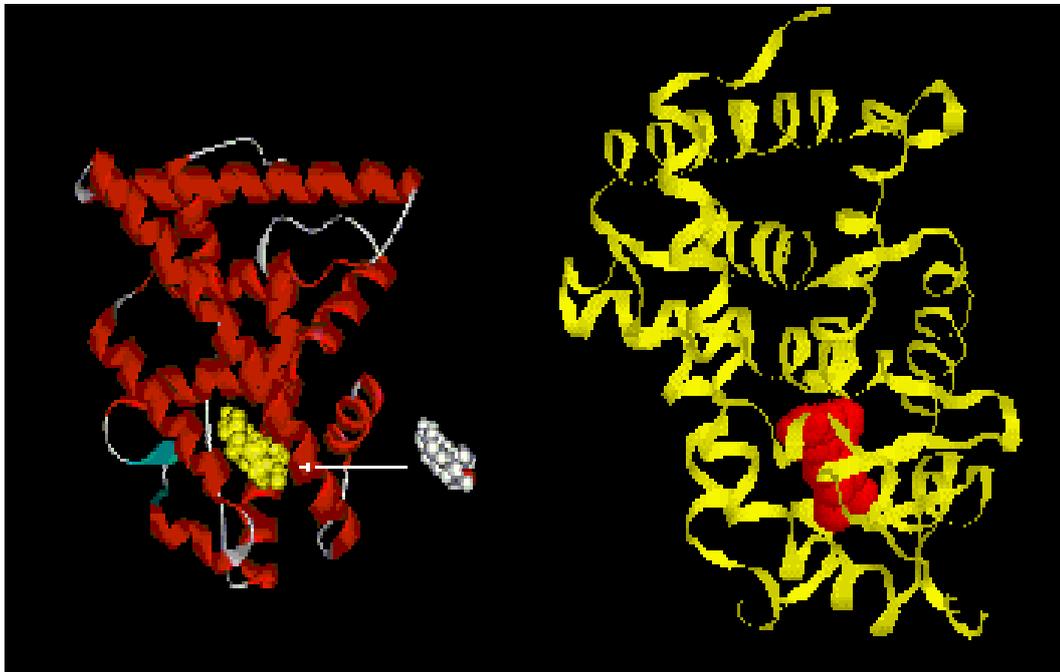


FIGURA 1 - Estrutura cristalográfica do ER (Division of Chem. Bio Informatics National Institute of Health Science). Disponível em:<<http://www.nihs.go.jp/hse/encrine-e/index.html>>. Acesso em: 20 abr. 2002. e TR . Disponível em:<<http://itsa.ucsf.edu/~jima/tr-helix.html>>. Acesso em: 20 abr. 2002.

Os elementos responsivos hormonais diferem entre si somente pelo número de pares de bases neutros separando as repetições hexaméricas diretas (Rastinejad et al., 1995). (FIGURA 2).

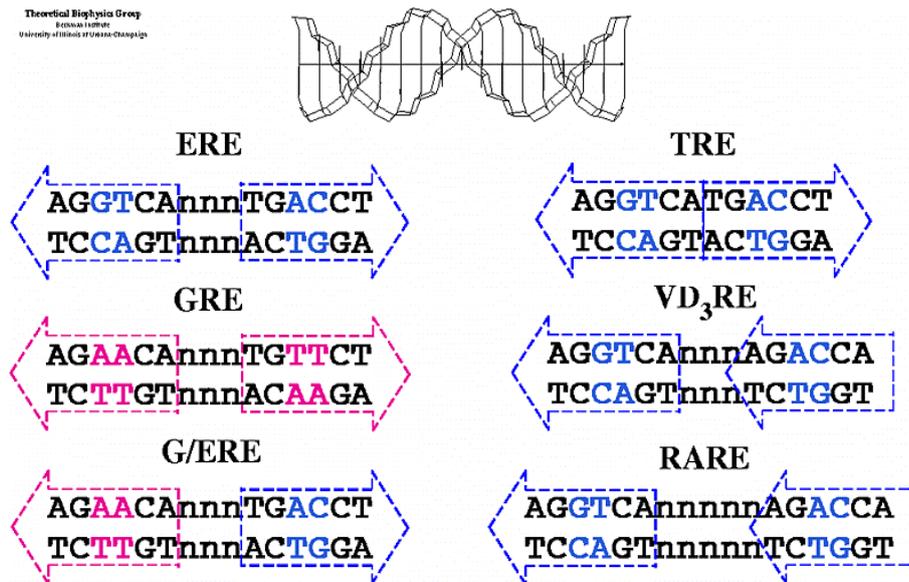


FIGURA 2 - Diferenças entre os vários elementos responsivos hormonais. NIH Resource for macromolecular Modeling and Bioinformatics. Disponível em: <http://www.ks.uiuc.edu/Research/pro_DNA/ster_horm_rec/response.gif>.

Acesso em: 10 mar. 2002.

O TR e os receptores de hormônios esteróides possuem três propriedades: área de ação nuclear, reconhecimento de uma seqüência específica do DNA e habilidade para regular a transcrição gênica. TRs regulam a transcrição de genes-alvo na presença de concentrações fisiológicas de T₃. Para isso, os

receptores dos hormônios tireóideos devem translocar o núcleo após serem sintetizados no citoplasma, e interagirem, no núcleo, com T_3 , genes-alvo, e outras proteínas necessárias para a transcrição gênica T_3 -dependente. (Lazar, 1993).

Os hormônios tireóideos são transportados pela corrente sanguínea associados a proteínas transportadoras e realizam sua entrada na célula através de transporte passivo. Ocorre a formação de um complexo composto por T_3 , TR e TER, iniciando a transcrição gênica (Lazar & Chin, 1990). (FIGURA 3).

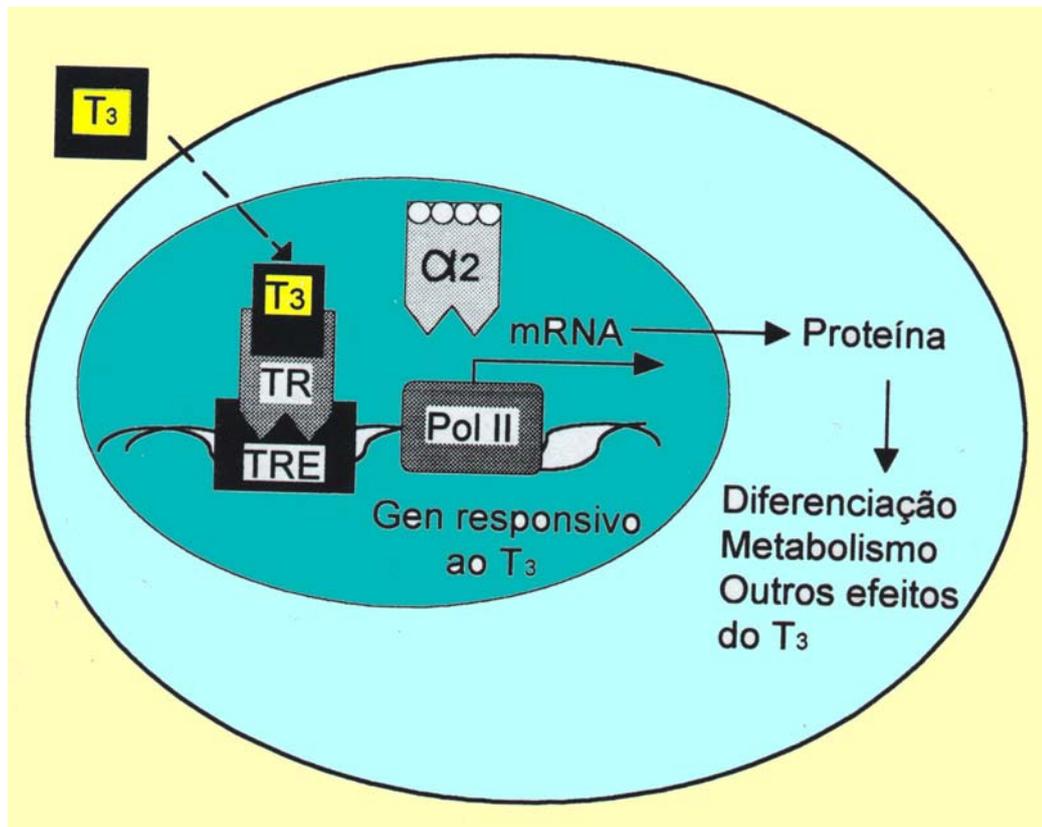


FIGURA 3 - Modelo de ação do hormônio triiodotironina (T₃) no seu receptor.

Fonte: Lazar & Chin, 1990.

O domínio ligante de DNA (DBD) contém aminoácidos básicos organizados em duas estruturas de alças por dois grupos de quatro resíduos cisteína, ligados por um átomo de Zn (Lazar, 1993). (FIGURA 4).

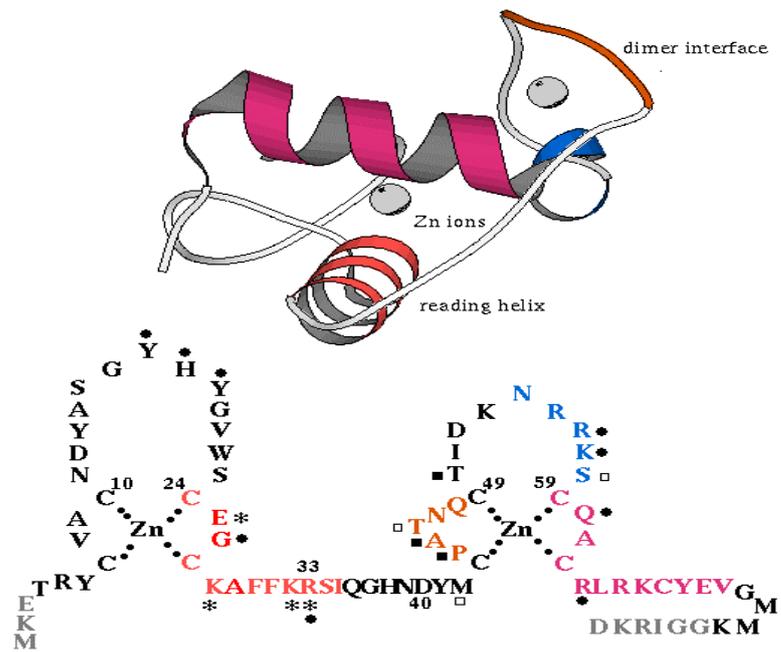


FIGURA 4 - Modelo estrutural de uma região domínio ligante de DNA (DBD). Theoretical Biophysics Group. Disponível em: <http://www.ks.uiuc.edu/Research/pro_DNA/ster_horm_rec?pictures/page1-big.gif>. Acesso em: 20 abr. 2002.

A habilidade para reconhecer genes-alvo é um aspecto importante da função do TR. A superfamília de receptores nucleares é dividida em dois grupos com base no “P box”, um domínio que é importante para a especificidade da ligação ao DNA, presente no primeiro anel de zinco do DBD (Lazar, 1993).

O hormônio tireóideo (T_3) e o estrógeno (E_2) exercem suas ações no desenvolvimento e na homeostase dos vertebrados, como consequência da ligação desses hormônios aos seus respectivos receptores (Yamamoto, 1985; Evans, 1988; Beato, 1989; Glass & Holoway, 1990). (FIGURA 5).

Vários mutantes do ER foram criados por mutagênese química. Esses mutantes inibiriam a estimulação do ER, provavelmente por competição para união ao ERE (elemento responsivo ao estrógeno), ou pela formação de dímeros inativos (Chien et al., 1999). Receptores nucleares do hormônio tireóideo (TRs) são fatores transcricionais ligantes-dependentes que regulam o crescimento, a diferenciação e o desenvolvimento. No caso do hormônio tireóideo (T_3), há três isoformas de receptores ligantes- T_3 : $TR\alpha_1$, $TR\beta_1$ e $TR\beta_2$, produzidos por dois genes localizados no cromossomo 17 ($TR\alpha$) e 3 ($TR\beta$), também chamados c-erb $A\alpha$ e c-erb $A\beta$ (Barrera-Hernandez et al., 1998). Foi demonstrado que o subtipo

TR β 1 interage com o gene supressor p53, que tem função na regulação do ciclo celular e tumorigênese. Essa interação inibe a ativação transcricional do TR β 1 e leva ao prejuízo da função do TR (Barrera-Hernandez et al., 1998). TR α 1 é mais potente como um ativador ligante-dependente em tecidos TREs (elemento responsivo ao hormônio tireoidiano) positivos e o TR β 1 é duas vezes mais potente que o TR α 1 na subunidade gênica TSH α como um silenciador ligante-dependente (Nishiyama et al., 2000).

TRs podem unir-se aos TREs como monômeros, homodímeros ou heterodímeros com o receptor de ácido retinóico e positiva ou negativamente regulam a expressão gênica dependendo da natureza do TER e da presença do hormônio tireóideo (Olson, et al., 1998).

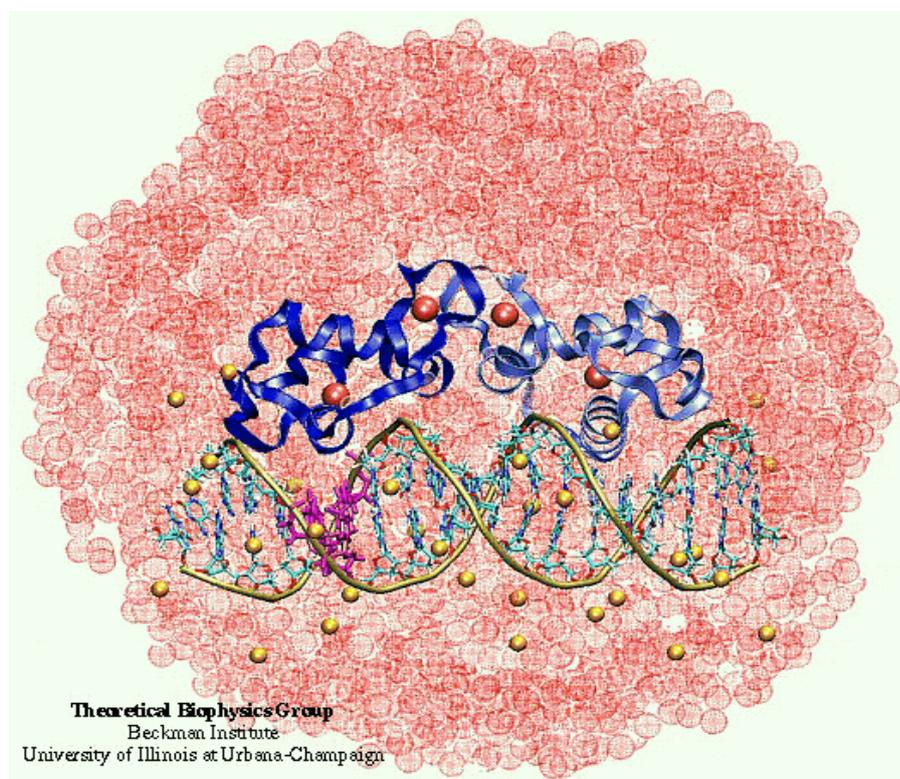


FIGURA 5 - Regiões de ligação entre o DNA e o complexo formado pelo receptor de hormônio, unido ao seu elemento responsivo. Theoretical Biophysics Group. Disponível

em:<http://www.ks.uiuc.edu/Research/pro_DNA/ster_horm_rec/pictures/pag3-big.gif>. Acesso em: 20 mar. 2002.

Proteínas repressoras específicas da transcrição gênica, denominadas co-repressores foram caracterizadas em 1995 (Chen & Evans, 1995; Horlein et al., 1995; Kurokawa et al., 1995). Dois co-repressores, N-CoR e SMRT, formam complexos co-repressores em associação com diacetilases (Andersson & Vennström, 2000). Estudos recentes de mutantes do TR revelam um papel importante para CoRs (receptores co-repressores) na atividade inibitória (Chien et al., 1999). A ligação do T₃ a TRs resulta na mudança de um complexo co-repressor para um complexo coativador. Todavia, em certos genes, a presença de T₃ induz à repressão transcricional na ausência do ligante. Algumas hipóteses tentam explicar a repressão transcricional ligante dependente:

- A) TRE específico na região promotora do gene-alvo;
- B) TR específico para cada célula ou uma combinação de TRs;
- C) Proteínas co-repressoras ou coativadoras na célula as quais estariam expressando o gene negativamente regulado. (Guissouma et al., 2000).

Para a trans-ativação dependente de T₃, um NTD (domínio N terminal) intacto é necessário. Um mutante do T₃Rα (T₃Rα-ΔN1), deletado na porção N-terminal, une-se a coativadores e co-repressores, mas não se parece na região

ligante de DNA. T₃R α - Δ N1 tem sensibilidade alterada à digestão de protease, sugerindo que mudanças na conformação do receptor podem alterar sua função, mostrando a importância do NTD na modulação de atividade de outros domínios do T₃R α para suas atividades biológicas conhecidas (Thuestad et al., 2000). (FIGURA 6).

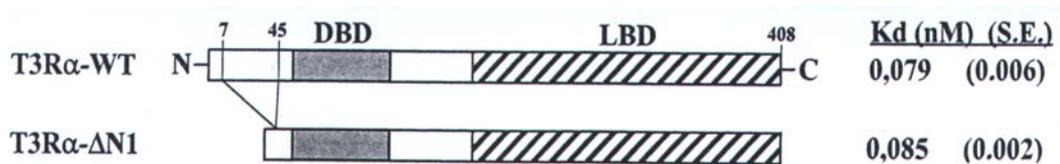


FIGURA 6 - Análise da deleção ocorrida no domínio N-terminal do T₃R α .

Fonte: Thuestad et al., 2000.

Proteínas co-repressoras como os mediadores silenciadores para receptores do hormônio tireóideo e retinóico estão envolvidos na repressão transcricional não ligante mediada pelo TR em TREs positivos. Portanto, tais proteínas estariam envolvidas na regulação de genes que são regulados negativamente pelo T₃ (Nishiyama et al., 2000).

A presença de ER α em tecido de câncer de mama atua como uma indicação da dependência hormonal desses tumores, mostrando que a resposta benéfica à terapia endócrina está relacionada à presença deste receptor (ER α) para estrógeno (Jensen et al., 2001).

A atividade proliferativa do câncer de mama foi estudada por Uporov et al., (2000), demonstrando que a proliferação tecidual é cinco vezes maior em carcinomas de mama que em tumores benignos e aumenta significativamente em tumores recorrentes (Jensen et al., 2001).

A expressão da proteína nuclear Ki-67 está correlacionada com a proliferação celular, extensivamente usada em histopatologia e pesquisa do câncer (Endl et al., 2001). É uma proteína nuclear não-histona parcialmente caracterizada, presente em todas as fases do ciclo celular, exceto na fase G₀ (Keshgegian & Cnaan, 1995). Para isso, anticorpos anti-Ki-67 podem ser usados como marcadores operacionais para estimar o crescimento de neoplasia humana (Scholzen et al., 2002).

No que se refere a tumores mamários, foi demonstrado que os hormônios tireóideos são necessários para o desenvolvimento de alguns tumores de ratos estrógeno-dependentes (Sorrentino et al., 1976; Natoli et al., 1983). A controvérsia sobre o papel desses hormônios, tanto na etiologia quanto no tratamento do câncer de mama é bastante grande. Kapdy & Wolfe, (1976); Mustacchi & Greenspan (1977) encontraram uma associação entre ingestão de hormônios tireóideos e aumento do risco de câncer mamário. Por outro lado, Vorherr (1987) descreve um aumento na sobrevida em pacientes hipertireóideas com câncer de mama e sugere que o hipertireoidismo parece proteger contra o desenvolvimento de câncer de mama por aumentar a globulina ligadora de hormônios esteróides e por diminuir a atividade estrogênica sobre o tecido mamário.

Há relatos de desenvolvimento de câncer de mama, em estudos experimentais, quando realizada a tireoidectomia (Smithcors & Leonard, 1942; Muhlbock & Boot, 1959) e maior incidência de câncer de mama em pacientes portadores de bócio (Spencer, 1954; Bogardus & Finley, 1961).

Observou-se, também, aumento no risco e incidência de câncer mamário em pacientes hipertireóideas (Rose & Davis, 1978; Thomas et al., 1983; Takatani et al., 1989). Supostamente o epitélio mamário torna-se sensível ao estrógeno, prolactina e carcinogênicos. Além disso, em pacientes hipertireóideas, os ovários tornam-se mais sensíveis à estimulação gonadotrófica resultando em secreção estrogênica aumentada (Vorherr, 1987).

Embora esses estudos epidemiológicos sejam contraditórios, de maneira geral, houve uma correlação positiva entre os níveis estrogênicos e os níveis do hormônio tireóideo elevados com o aumento da incidência tumoral.

O achado de títulos de auto-anticorpos antitireóideos em pacientes eutireóideos com câncer de mama, independentemente do estágio da doença, também sugere uma possível associação com as doenças auto-imunes da tireóide (Rasmusson et al., 1987; Giani et al., 1996).

Se, por um lado, observações clínicas (Adamopoulos et al., 1986; Rasmusson et al., 1987; Vorherr, 1987) e epidemiológicas (Thomas et al., 1986) reforçam uma relação entre disfunção da glândula tireóide com aumento do risco de câncer mamário, os estudos são contraditórios no que se refere ao tipo de patologia tireoidiana que influencia o câncer de mama.

Fatores prognósticos e predictivos são ferramentas indispensáveis no tratamento de doenças neoplásicas (West et al., 2001). Sem contar que o estatus do receptor de estrógeno é um importante parâmetro no prognóstico do câncer de mama (Lacroix et al., 2001). A determinação da presença ou ausência de receptores de estrógeno (ER) pode, também, funcionar como um importante tratamento do câncer de mama através da utilização de antiestrógenos (Sommer & Fuqua, 2001). Portanto, o estatus do receptor fornece dados sobre quais tumores seriam responsivos à intervenção hormonal (Fuqua et al., 1993).

A perda da dependência hormonal em tumores de mama pode se dar pela presença de receptores mutados ou ativação da transcrição truncada. Foram identificadas seqüências variantes de vários ERs, em linhagens de células de câncer humano, sendo que essas mutações possuem um papel fundamental na disfunção do receptor (Fuqua et al., 1993). Numerosas variantes de receptores de estrógeno foram detectadas com a presença de inserções de pares de base, deleções, *splicings* alternativos, resultando em perda da função desses receptores (Iwase & Kobayashi, 1997).

No que se refere ao câncer de mama, pouco se sabe sobre a maneira como o T₃ modula o seu receptor no seu tecido tumoral. Foi demonstrada por Burke & McGuire (1978) a presença de receptores para T₃ no núcleo de uma linhagem de células derivadas de câncer de mama humano (MCF-7). Cerbon et al., (1981) comprovaram a presença de receptores nucleares para T₃ em câncer de mama, embora não tenha sido observada nenhuma correlação com a concentração

de outros receptores hormonais (estrógeno e progesterona) ou estadiamento do tumor. Shao et al. (1995) demonstraram que o T₃ potencializa a ação do estrógeno nas linhagens de câncer de mama ER+.

Barkhem et al. (1991) clonaram o TR na linhagem celular T47D e verificaram que essa isoforma de TR é funcional nessas células. Da mesma forma, Zhang et al. (1996) demonstraram a presença de TR e ER nessa linhagem celular. Essas diferenças entre as isoformas do T₃, à primeira vista, poderiam explicar os achados epidemiológicos e clínicos contraditórios sobre a ação desse hormônio no câncer de mama.

Em estudos *in vitro*, foi demonstrado que o hormônio triiodotironina (T₃), em concentrações suprafisiológicas, induz à proliferação celular, possivelmente através do receptor de estrógeno, em linhagem de câncer de mama (MCF-7) que expressa receptor para estrógeno e para o hormônio tireoidiano (Nogueira & Brentani, 1996). Através de observações clínicas, iremos comprovar os dados obtidos em estudos laboratoriais realizados através da observação comportamental de linhagens celulares.

2. OBJETIVOS

Os objetivos do trabalho são:

1. Comprovar clinicamente a inter-relação entre patologias tireoidianas e o câncer de mama através de:

- a) dosagens dos hormônios tireóideos nas pacientes com câncer de mama, comparando com o grupo controle;
- b) expressão dos receptores de estrógeno e do estatus hormonal das pacientes portadoras de câncer de mama.

2. Comprovar através de um estudo da estrutura molecular espacial, a ligação do T_3 ao ER.

3. PACIENTES E MÉTODOS

3.1. Pacientes

3.1.1. Estudo Clínico

Foram estudadas pacientes com câncer de mama do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, (n=26) com idade variando de 30 a 85 anos, com câncer de mama grau II, que seriam submetidas à cirurgia para a retirada do tumor. Após obtermos a assinatura do termo de consentimento informado realizamos a anamnese para distribuição das pacientes quanto à faixa etária e ao estatus hormonal. Foram realizadas dosagens séricas de tiroxina livre (T₄L), hormônio tireoestimulante (TSH) e anticorpo antiperoxidase (anti-TPO) antes da cirurgia, da radio e da quimioterapia. Além disso, foram selecionadas pacientes controle (n=22) com mamografia recente e normal, pertencentes à mesma faixa etária das pacientes com câncer de mama para dosagens hormonais. As dosagens séricas hormonais foram realizadas através de kits comerciais, através de quimioluminescência (DPC-Medlab).

Critérios de inclusão de pacientes à pesquisa:

- 1- Mulheres com idade maior ou igual a 30 anos;
- 2- Câncer de mama estadio I ou II.

Critérios de exclusão - as pacientes foram excluídas deste estudo por qualquer destas razões:

- 1- Ter sido submetida à radioterapia ou quimioterapia;
- 2- Ter feito uso de terapia de reposição hormonal;
- 3- Doença de tireóide de qualquer natureza, previamente diagnosticada;
- 4- Falência renal crônica ou elevação recente da creatinina sérica para valores maiores do que duas vezes o limite superior da normalidade esperada para aquela idade;
- 5- Função hepática anormal evidenciada por valores de TGO, TGP, bilirrubina e/ou fosfatase alcalina maiores do que duas vezes o limite superior de normalidade;
- 6- Ter usado beta-bloqueadores, aspirina, heparina, fenitoína, esteróides ou dopamina, utilizados um mês antes do início e durante o estudo;
- 7- Ter usado contrastes iodados por um período de seis meses antes do início e durante o estudo.

Após a cirurgia, foram realizadas novas dosagens desses hormônios séricos a fim de se confirmar os dados anteriormente obtidos.

3.2. Métodos

3.2.1. Técnica imunohistoquímica para a pesquisa de receptores de estrógeno e para Ki-67 (Jensen et al., 2001).

Foi utilizado o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) com o auxílio do método de recuperação antigênica pelo forno de microondas, descrito a seguir:

Os tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina foram cortados com 4 micra (μm) de espessura e montados em lâminas de vidro previamente preparadas com o adesivo poli-D-lisina (Sigma Chemical Corporation, P-7886, Saint Louis, MO, EUA) para evitar o deslocamento dos cortes durante a imunocoloração. Em seguida, os cortes foram desparafinizados em xileno e hidratados através de uma graduação de etanol a água. Posteriormente, os cortes foram tratados com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 1% para bloqueio da peroxidase endógena. Utilizamos o método de recuperação de epítomos pelo calor (SST de citrato 0,01M, pH 6,0 por 20 minutos em forno de microondas caseiro SHARP, modelo Interactive Touch On a 800 W) para a pesquisa de receptores hormonais.

Imunocoloração: os cortes foram incubados por uma hora a 4°C com soro normal diluído 1/10 em PBS. Os anticorpos foram diluídos individualmente em PBS contendo 3% BSA. A diluição foi de 1:100 para ER β , Ki-67 e anticorpos

ciclina A e 1:500 para anticorpos ER α . Os cortes teciduais foram incubados com anticorpos *overnight* a 4° C. Antes da adição dos anticorpos secundários, os cortes foram rinsados em PBS contendo 0,05% de Tween 20. O método ABC foi usado para visualizar o sinal, de acordo com o manual fornecido pelo fabricante (Vector Laboratories). Os cortes foram incubados com anticorpos anticoelho biotilado ou IgG anticamundongo (diluição 1:200) por duas horas em temperatura ambiente, seguido de lavagem com PBS e incubação em avidina-biotina-peroxidase por uma hora. Após lavagem completa em PBS, os cortes foram tratados com 3,3'-diaminobenzina tetrahidrocloreto, lentamente contracorados com hematoxilina e desidratado completamente em séries de etanol, seguidos de exposição ao xileno.

A porcentagem de células coradas positivamente é uma média realizada após a contagem de células coradas e o número total de células contadas em uma magnificação de 4 vezes com o software IMAGE-PRO PLUS 4.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

Foi utilizado como controle positivo um tumor sabidamente positivo para os receptores estudados.

Anticorpos: anticorpos monoclonais para ER α de camundongo (6F11) NovoCastra; anticorpos policlonais de coelho anti-ER β humano (06-629) *Upstate Biotechnology*; anticorpos monoclonais Ki-67 (Mib-1, M7240) *Dako*; anticorpos policlonais de coelhos ciclina A (H432) Santa Cruz *Biotechnology*; anticorpos secundários biotilados (IgG anticamundongo ou IgG anticoelho) *Vector Laboratories*.

3.2.2. Ensaio dos receptores de estrógeno (Lippman & Barr, 1977, modificado por Brentani et al., 1986), utilizando o E₂ e o T₃ como hormônio frio.

Os tumores foram homogeneizados com Polytron e incubados com concentrações crescentes de [³H] Estradiol (0,5 a 5,0 nM) em presença ou ausência de um excesso de 500 vezes de T₃ não marcado, para verificar o deslocamento do estrógeno marcado ao ER. Um conjunto de tubo-controle (tumor + tampão) foi ensaiado em paralelo.

A concentração do hormônio marcado ligado ao receptor foi obtida pela multiplicação das médias das contagens por minuto (cpm) por um fator dependente do volume da amostra contada, da atividade específica do esteróide radioativo e da eficiência do aparelho cintilador.

A ligação específica foi obtida pela subtração da ligação inespecífica (dada pela adição apenas do esteróide radioativo mais 500 vezes o T₃ radioinerte).

3.2.3. Estudo da estrutura molecular espacial do T₃ e do ER.

Foi realizado um estudo da estrutura molecular espacial do hormônio triiodotironina e do receptor de estrógeno para verificarmos se seria possível ocorrer a ligação da molécula do T₃ ao receptor de estrógeno.

3.2.2. Ensaio dos receptores de estrógeno (Lippman & Barr, 1977, modificado por Brentani et al., 1986), utilizando o E₂ e o T₃ como hormônio frio.

Os tumores foram homogeneizados com Polytron e incubados com concentrações crescentes de [³H] Estradiol (0,5 a 5,0 nM) em presença ou ausência de um excesso de 500 vezes de T₃ não marcado, para verificar o deslocamento do estrógeno marcado ao ER. Um conjunto de tubo-controle (tumor + tampão) foi ensaiado em paralelo.

A concentração do hormônio marcado ligado ao receptor foi obtida pela multiplicação das médias das contagens por minuto (cpm) por um fator dependente do volume da amostra contada, da atividade específica do esteróide radioativo e da eficiência do aparelho cintilador.

A ligação específica foi obtida pela subtração da ligação inespecífica (dada pela adição apenas do esteróide radioativo mais 500 vezes o T₃ radioinerte).

3.2.4. Estudo da estrutura molecular espacial do T₃ e do ER.

Foi realizado um estudo da estrutura molecular espacial do hormônio triiodotironina e do receptor de estrógeno para verificarmos se seria possível ocorrer a ligação da molécula do T₃ ao receptor de estrógeno.

4. ASPECTOS ÉTICOS

Obedecendo à Resolução número 196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos, o consentimento, após esclarecimentos sobre a natureza do projeto, será obtido com o paciente por escrito, antes de qualquer outro procedimento do estudo. (Anexo A).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados serão expressos em média aritmética e desvio-padrão, juntamente com o número total de experimentos.

Para o estudo clínico, aplicaremos o teste “Qui-quadrado” para verificarmos a significância entre duas amostras, sendo o nível de significância fixado em 5% ($X^2 = 6,21$; $p < 0,05$). Para verificarmos se a frequência obtida de doenças tireoidianas na amostra será significativa, será realizado o teste exato de “Fisher”, com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Esses testes serão aplicados através do programa EPI-INFO, versão 6.8.

Para os experimentos *in vitro*, será aplicado o teste t de Student a fim de verificar a significância entre dois resultados, sendo o nível de significância fixado em 5%.

6. RESULTADOS

Foram estudadas 26 pacientes com câncer de mama do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, que foram submetidas à cirurgia para retirada do tumor. A idade das pacientes variou entre 35 e 84 anos e todas foram classificadas com câncer de mama de estadiamento grau II. (Anexo B)

Para a realização do grupo controle, foram estudadas 22 mulheres entre 35 e 84 anos, cujas mamografias recentes apresentaram-se negativas para câncer de mama. Essas mamografias foram realizadas na mesma semana em que foi feita a anamnese e a coleta de sangue da paciente.

Foram realizadas duas séries de dosagens hormonais em cada paciente com câncer de mama e nas pacientes do grupo controle, não tendo sido possível realizar a segunda série de dosagens em apenas 5 pacientes da amostra.

Através da análise da Tabela 1, notamos que 58% das pacientes com câncer de mama estudadas (15 pacientes) apresentavam algum tipo de alteração tireoidiana, sendo que o hipertireoidismo foi o distúrbio tireoidiano mais freqüente, presente em 31% dessas pacientes (8 pacientes), valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

Observamos, no Anexo C, que 50% das pacientes portadoras de câncer de mama apresentaram na relação T_3/E_2 , um valor maior que 20 e no grupo

controle (Anexo D), todas as pacientes apresentaram valores abaixo de 20. Os valores mais altos (obtidos pela relação T_3/E_2), apresentados pelas pacientes com câncer de mama tiveram como causa a dosagem diminuída do estrógeno, uma vez que os níveis do T_3L mantiveram-se dentro do padrão de normalidade.

Tabela 1 - Distribuição das alterações tireoidianas em pacientes com câncer de mama e em pacientes-controle

Patologia Tireoidiana	Câncer de mama	Controle
Hipertireoidismo	8 (31%)	0
Hipotireoidismo	2 (8%)	4 (18%)
Anti TPO-positivo	5 (19%)	0
Ausente	11 (42%)	18 (82%)
Total	26 (100%)	22 (100%)

*p<0,05

Verificamos que 76,9% das pacientes (20 pacientes) com câncer de mama eram menopausadas (amenorréia por pelo menos 1 ano). Destas, 50%

apresentavam algum tipo de alteração dos hormônios tireoidianos, sendo que 35% (7 pacientes) eram hipertireóideas, 10% (2 pacientes) eram hipotireóideas e 5% (1 paciente) apresentavam apenas anti-TPO positivo. No grupo controle, observamos que apenas 18% (4 pacientes) apresentam algum tipo de patologia tireoidiana e sempre a patologia apresentada foi o hipotireoideismo. (Anexo E). (FIGURA 7).

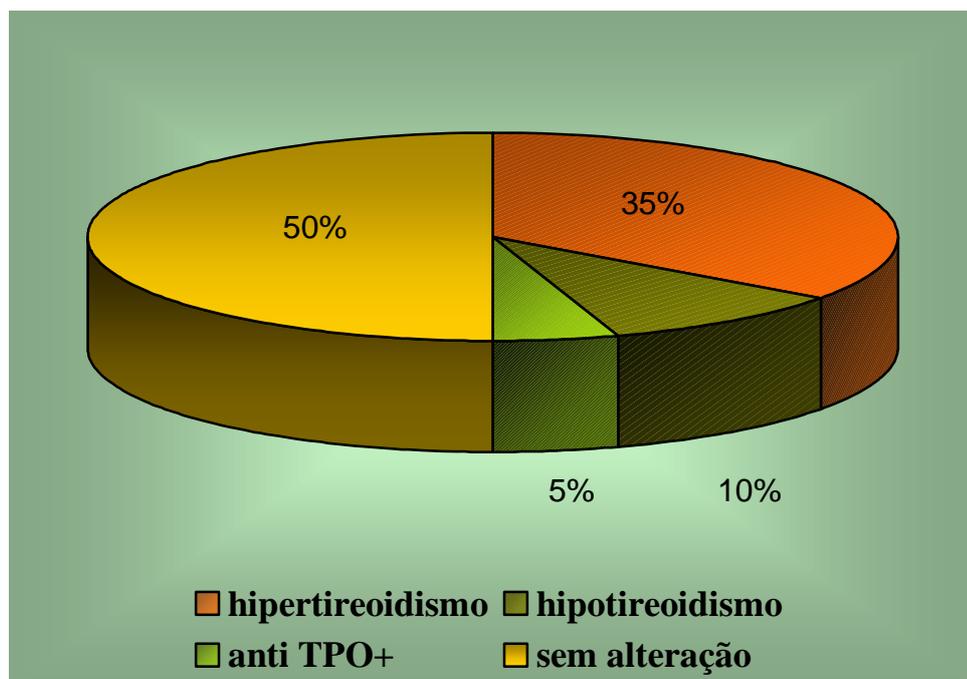


FIGURA 7 - Alteração hormonal nas pacientes com câncer de mama e menopausadas. Fica evidenciado que 50% das pacientes com câncer de mama e menopausadas apresentam alteração hormonal.

Foi possível realizar o método de imunohistoquímica para verificar a presença do ER em quinze amostras tumorais (figuras 8 e 9) e, assim, evidenciamos que 66,7% dessas pacientes (10 pacientes) apresentavam tecido tumoral ER+ (FIGURA 9). Das pacientes com tumores ER+, 60% (6 pacientes) apresentavam alterações tireoidianas, sendo que todas (100%) evidenciavam hipertireoidismo. Também através da imunohistoquímica, verificamos marcador de proliferação celular Ki-67 positivo (a expressão da proteína nuclear Ki-67 está estritamente correlacionada com a proliferação celular).

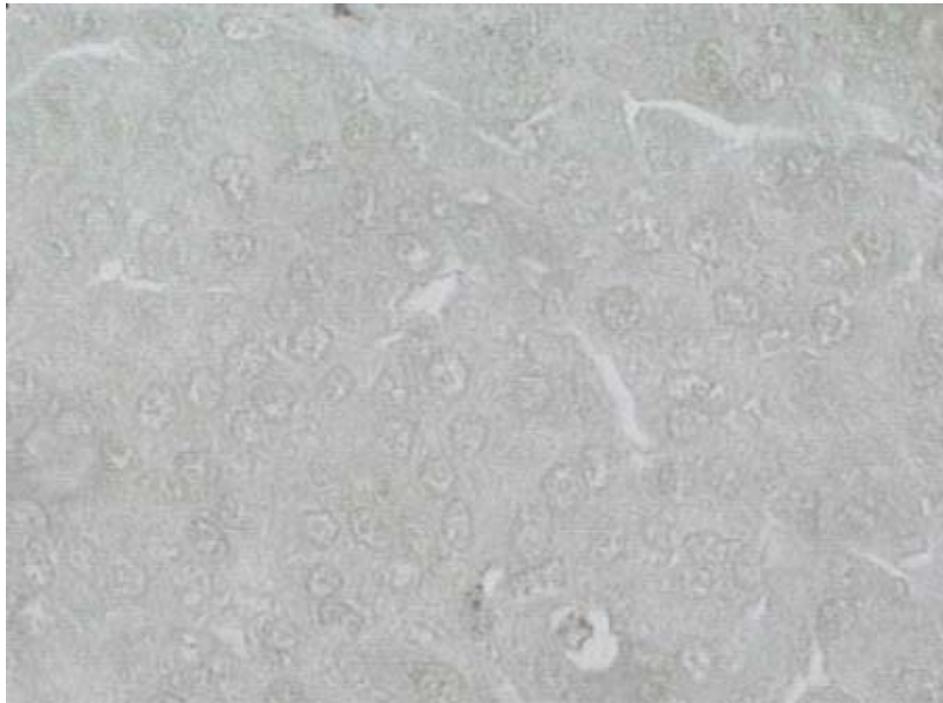


FIGURA 8 - Ausência de células coradas, através do método de imunohistoquímica, representando um tecido ER negativo (ER-).

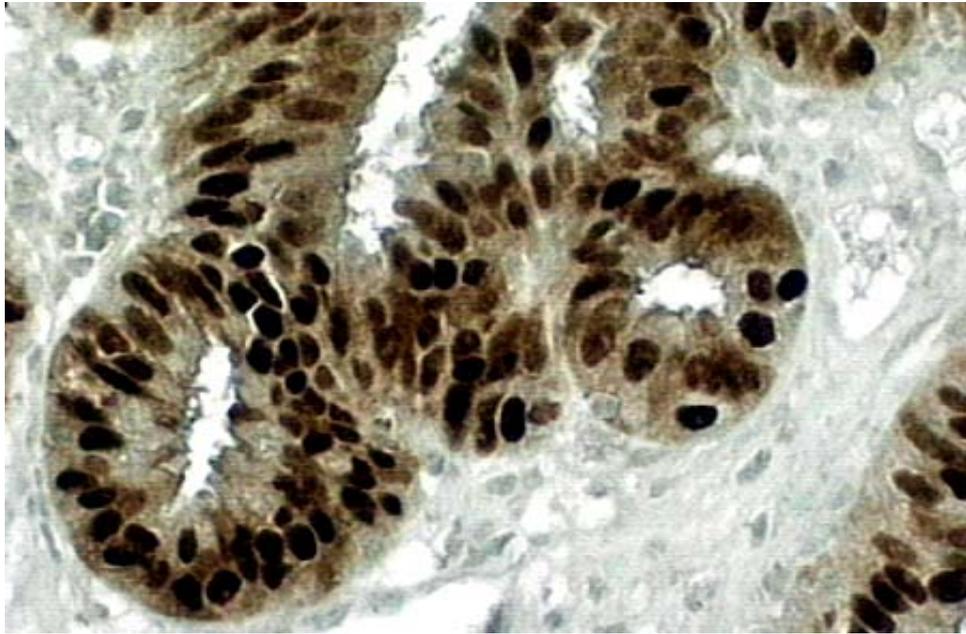


FIGURA 9 - Células coradas pelo método de imunohistoquímica, revelando um tecido portador de receptor de estrógeno ER positivo.

A técnica de *binding* usando excesso de E_2 e T_3 foi realizada nas amostras de tumores de seis pacientes para evidenciar que o T_3 foi capaz de inibir a ligação do E_2 ao receptor de estrógeno em 66,7% dos tumores ER+, porém, em pequena magnitude. (Tabela 2) . Alíquotas de extrato nuclear foram incubadas com uma concentração de 5nM de [3 H] Estradiol (E_2) na presença ou ausência de E_2 não marcado. O T_3 também foi usado como competidor. Observamos que o T_3 em concentrações 500 vezes maiores que às de E_2 foi capaz de inibir significativamente a ligação do E_2 ao ER ($p < 0,005$).

Tabela 2 - Deslocamento da ligação do estrógeno marcado do seu receptor por T₃, realizado em 6 pacientes

Paciente	Presença de ER	Inibição por T ₃ (%)*
DR	+	11,7
MAO	+	19,0
ASC	-	00,0
MJOP	-	00,0
MAR	+	05,0
NB	+	05,0

*T₃ em concentração 500 vezes maior que a de E₂.

Evidenciamos através de um estudo da estrutura molecular espacial que realmente a ligação do T₃ ao ER é possível. Na FIGURA 10, está representado o ligante estradiol; na FIGURA 11, o ligante T₃ e na FIGURA 12, o ligante raloxifeno (antiestrógeno que produz potente inibição da união do estradiol ao receptor estrogênico por competir com o estrógeno nessa ligação) (Kauffman & Bryant, 2001). Utilizamos o raloxifeno neste estudo pelo fato de ele apresentar uma estrutura espacial muito semelhante à estrutura do T₃. (FIGURAS 11 e 12).

FIGURA 10 - Estrutura molecular do ligante
estradiol

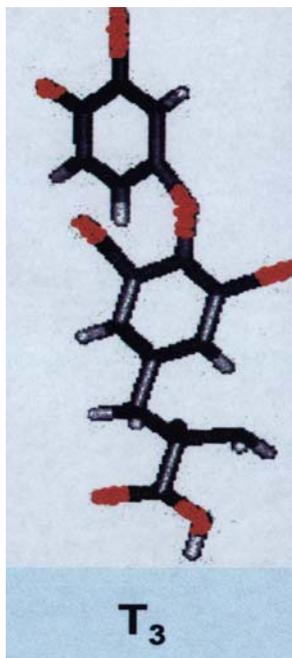
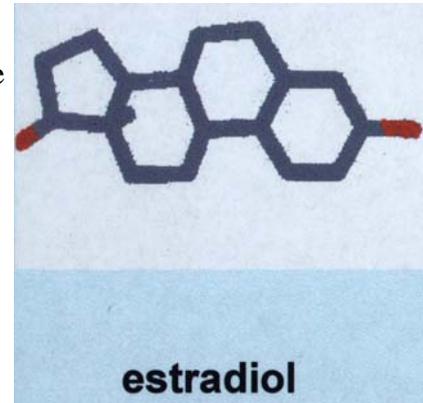
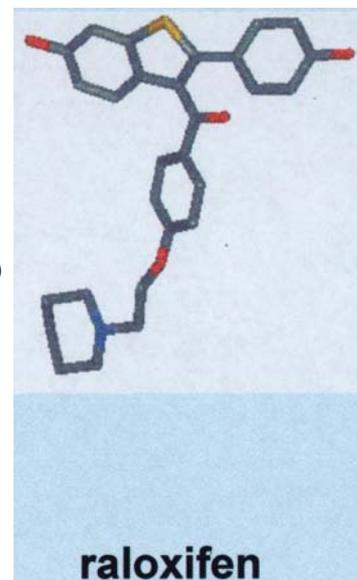


FIGURA 11 - Estrutura molecular do
T₃ (não planar)

FIGURA 12 - Estrutura molecular
do raloxifeno (em T)



A ligação do estrógeno ao seu receptor pode ser observada esquematicamente na FIGURA 13. A orientação proposta está representada graficamente nas FIGURAS 14 e 15. Na FIGURA 14, vê-se que T_3 pode assumir a mesma orientação de um dos braços do raloxifeno. A FIGURA 15 mostra que T_3 deve estar internalizado no bolso de ER.

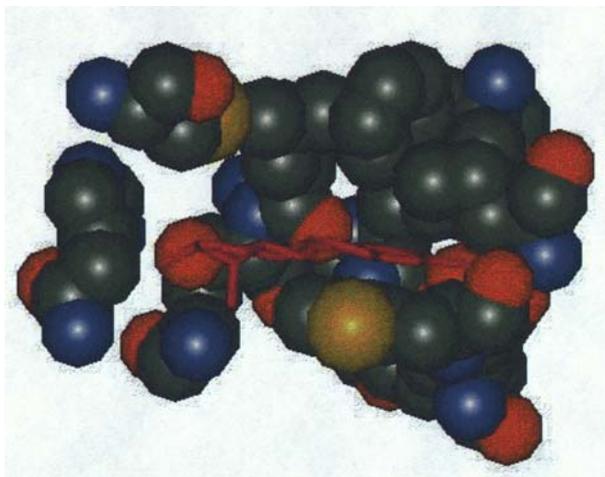
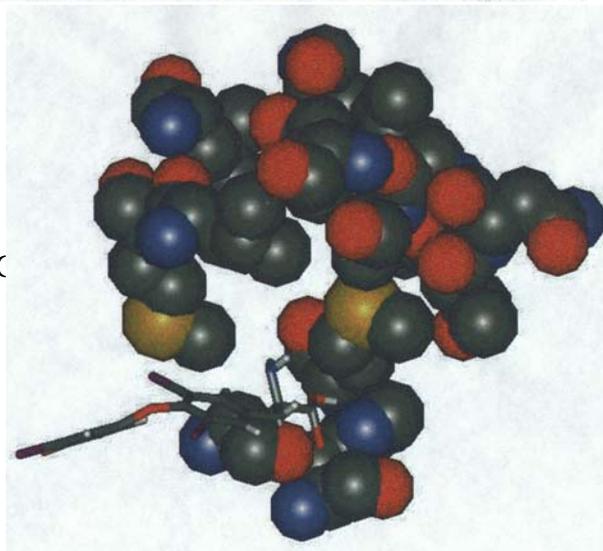


FIGURA 13 – Ligação do



FIG

és de um de seus braços.

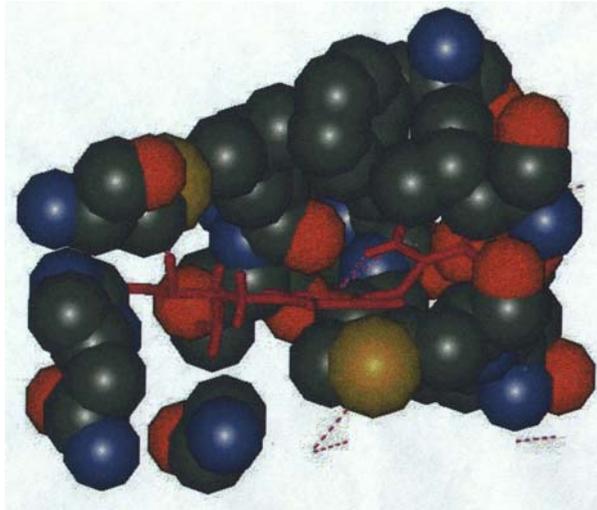


FIGURA 15 - Ligação do T₃ ao receptor de estrógeno

Existem diferenças entre o estradiol e o T₃ :

- o estradiol tem uma extensa superfície hidrofóbica, ao passo que o T₃ tem uma extensa superfície hidrofílica;
- o estradiol é uma molécula quase planar enquanto o T₃ é não planar;
- a distância entre os extremos em estradiol é de 11 Å e em T₃ é de 17 Å, ou seja, T₃ é uma molécula bem mais longa que o estradiol.

7. DISCUSSÃO

Observações clínicas, epidemiológicas e experimentais sugerem a existência de uma relação positiva entre disfunção tireoidiana e câncer de mama (Sorrentino et al., 1976; Rose & Davis, 1978; Natoli et al., 1983; Thomas et al., 1983; Adamopoulos, 1986; Rasmusson et al., 1987; Vorherr, 1987; Takatani et al., 1989; Giani et al., 1996).

Estudos anteriores (Nogueira et al., 1996) demonstraram que concentrações suprafisiológicas de T_3 , nas células MCF-7, induzem o crescimento celular e as células são inibidas pelo Tamoxifen e que o T_3 é capaz de inibir a ligação do E_2 ao receptor de estrógeno nesta linhagem celular. Surgiu, então, o interesse de selecionarmos um grupo de pacientes com câncer de mama, sem doenças tireoidianas prévias e sem radio ou quimioterapias anteriores, a fim de verificarmos a influência do câncer de mama na incidência de doenças tireoidianas. Optamos por selecionar pacientes com câncer de mama sem radio ou quimioterapia prévias à cirurgia para evitar que estes procedimentos influenciasssem nas dosagens hormonais destas pacientes.

O hipotireoidismo é uma alteração hormonal comum, principalmente em pacientes acima de 50 anos de idade (Bonar et al., 2000). Estudos populacionais (Rivolta et al., 1999) mostram uma ocorrência de 4,7% de hipotireoidismo subclínico e 58,3% das pacientes apresentaram sintomas de hipotireodismo.

Quando consideramos todas as pacientes incluídas em nosso estudo, tanto do grupo controle, como do grupo de trabalho, constatamos que 12,5% destas pacientes apresentam hipotireoidismo subclínico. Na análise das pacientes com câncer de mama e menopausadas, a incidência de hipotireoidismo subclínico é de 10%. Poderíamos especular que a maior incidência de hipotireoidismo na nossa população em estudo, deva-se ao fato de todas as nossas pacientes serem provenientes da região de Botucatu (SP), uma região sabidamente endêmica para a ingesta de iodo.

Ainda observando o grupo constituído por pacientes com câncer de mama e menopausadas, 35% destas pacientes eram portadoras de hipertireoidismo.

Verificamos que entre as doenças tireoidianas apresentadas pelas nossas pacientes, o hipertireoidismo foi a que ocorreu de forma estatisticamente significativa e essa correlação está em concordância com experimentos anteriores (Nogueira et al., 1996). Além disso, observamos que a maioria das pacientes com câncer de mama era menopausada, o que demonstra que a concentração sérica de T_3 nestas pacientes deve ser maior do que a concentração sérica de E_2 , que pode estar favorecendo a ligação do T_3 ao ER. Podemos pressupor que está ocorrendo nessas pacientes o mesmo que foi evidenciado anteriormente em experimentos de *binding*, onde uma alta concentração de T_3 em relação à concentração de E_2 facilitaria a ligação do T_3 ao receptor de estrógeno (Nogueira et al., 1996). Podemos ainda considerar a hipótese de que o T_3 ligando-se ao ER, estimula a proliferação de células de

câncer de mama já existentes nessas pacientes (Nogueira et al., 1996). Ainda não se sabe se esta ligação do T₃ ao ER é benéfica ou maléfica, porque dependendo do estatus hormonal da paciente ela pode estimular a proliferação celular em menor ou maior proporção que o E₂. Estudos atuais sugerem que a concentração celular dos receptores nucleares ER, TR α , TR β e receptor do ácido retinóico (RAR), os seus ligantes e a estrutura do elemento responsivo ao estrógeno (ERE) de uma determinada célula, no caso, o câncer de mama, determina qual receptor ocupa esses EREs e portanto modula sua transcrição gênica (Klinge et al., 1997). Como 66,7% das pacientes de nosso estudo, com câncer de mama, eram ER positivo e a concentração circulante de T₃, nessas pacientes, está aumentada em relação ao E₂, a ligação preferencial ao ERE poderia ser do ER previamente ligado ao T₃.

A hipótese da ligação do T₃ ao ER teve como origem pesquisas anteriores, nas quais foram realizados experimentos de *binding*, utilizando triiodotironina como inibidor. Foi observado que este hormônio tem a capacidade de deslocar, em menor magnitude que o E₂, a ligação do estrógeno marcado ao ER em células de linhagem MCF-7 (Nogueira et al., 1996). Nossos experimentos de *binding*, nos tecidos tumorais das pacientes, demonstraram que o T₃ foi capaz de deslocar o E₂ do ER, mas em menor magnitude que a obtida por Nogueira et al., 1996, nas células de linhagem MCF-7. Uma outra hipótese seria que as células MCF-7 estariam expressando um ER cuja estrutura está alterada, o que explicaria a capacidade do T₃ deslocar o E₂ uma vez que vários autores sugerem que alguns tumores de mama apresentam ER truncados (Dotzlaw et al., 1992; Murphy & Dotzlaw, 1989). Em relação ao ER das células MCF-7, Pfeffer et

al. (1993) detectaram alteração, especificamente no exon 4, o que poderia levar à modificação da ligação do hormônio ao seu receptor, favorecendo a ligação do T₃.

Vasudevan et al., 2001, mostrou que TRs interferem na transcrição mediada pelo ER a partir da região de ERE, possivelmente pela competição da região ligante de estrógeno ao ERE ou por silenciar coativadores essenciais para a transcrição ER-mediada. Se o mecanismo fisiológico estiver atuando desta forma, é possível que o receptor de T₃, ativado, ligue-se ao ERE, promovendo a transcrição de genes alvo, tendo como consequência, a proliferação celular.

Analisamos a estrutura espacial das moléculas de T₃, ER e raloxifeno, para verificarmos se a estrutura do T₃ permitiria sua ligação ao ER. Na FIGURA 12, está representado o raloxifeno, que comprovadamente se liga ao ER. Verificamos que o raloxifeno é uma estrutura em T. Um de seus braços se assemelha ao estradiol e o outro braço se assemelha a T₃. Portanto, consideramos que o T₃ se liga ao ER na mesma direção do segundo braço de raloxifeno. Essa orientação de ligação, entre T₃ e ER, é perpendicular à orientação da ligação do estradiol ao ER. Se as ligações ocorrerem dessa forma, a não planaridade de T₃ deixa de ser impedimento para que a união ao receptor de estrógeno se processe. Verificamos que, estruturalmente, é possível a ligação do T₃ ao ER.

8. CONCLUSÕES

1. Através de nossos estudos pudemos confirmar a existência de uma correlação clínica, estatisticamente significativa, entre patologias tireoidianas e câncer de mama.

2. Houve uma maior prevalência de hipertireoidismo em pacientes menopausadas portadoras dessa patologia.

3. Verificamos, pelo método de imunohistoquímica, que a maioria dos tumores de pacientes menopausadas eram ER+. Isto sugere que essas pacientes estariam mais susceptíveis à influência de níveis elevados de T_3 , já que os níveis baixos de estrogênio facilitariam a ligação do T_3 ao ER.

4. Os estudos de *binding* confirmam essa hipótese, pois foi possível constatar que o T_3 é capaz de inibir, isto é, deslocar o E_2 do ER quando presente em uma concentração 500 vezes maior que a concentração de E_2 .

5. Comprovamos, através do estudo da estrutura molecular espacial do T_3 e do ER, que a ligação entre essas estruturas é quimicamente possível.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Normas para publicações da UNESP.

ADAMOPOULOS, D.A., VASSILAROS, S., KAPOLLA, PAPADIAMANTIS, J., GEORGIAKODIS, F., MICHALADIS, A. Thyroid disease in patients with benign and malignant mastopathy. *Cancer*, v.57, p.125-8, 1986.

AMERO, S.A., KRETSINGER, R.H., MONCRIEF, N.D., YAMAMOTO, K.R., PEARSON, W.R. The origin of nuclear receptor proteins: A single precursor distinct from other transcription factors. *Mol. Endocrinol.*, v.6, p.3-7, 1992.

ANDERSSON, ML, VENNSTRÖM, B. A choice between transcriptional enhancement and repression by the V-erb A oncoprotein governed by one nucleotide in a thyroid hormone responsive half site. *Oncogene*. v.19, p.3563-9, 2000.

BARKHEM, T., CARLSSON, B., SIMONS, J., MOLLER, B., BERKENSTAM, A., GUSTAFSSON, J.A., NILSON, S. High level expression of functional full length human thyroid hormone receptor beta 1 in insect cells using a recombinant baculovirus. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, v.38, p.667-75, 1991.

BARRERA-HERNANDEZ, G., ZHAN, Q., WONG, R., CHEN, S.Y. Thyroid hormone receptor is a negative regulator in p53-mediated signaling pathways. *DNA Cell Biol.*, v.17, p.743-50, 1998.

BEATO, M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell*, v.56, p.335-44, 1989.

- BEATO, M., HERRLICH, P., SCHUTZ, G. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. Review. *Cell*, v.83, p.851-7, 1995.
- BERNSTEIN, L., ROSS, R.K. Endogenous hormones and breast cancer risk. *Epidemiol.Rev.*, v.15, p.48-65, 1993.
- BRENTANI, M.M., WAJCHENBERG, B.L., CÉSAR, F.B., MARTINS, V.R. Regulation of glucocorticoid receptor by glucocorticoid in human mononuclear leucocytes. *Horm. Res.*, v.24, p.9-17, 1986.
- BOGARDUS, G.M., FINLEY, J.W. Breast cancer and thyroid disease. *Surgery*, v.49, p. 461- 8, 1961.
- BONAR, B.D., McCOLGAN, B., SMITH, D.F., DARKE, C., GUTTRIDGE, M.G., WILLIAMS, H., SMYTH, P.P. Hypothyroidism and aging: the Rosses survey. *Thyroid*, v.10, p.821-7, 2000.
- BORELLINI, F., OKA, T. Growth control and differentiation in mammary epithelial cells. *Environ. Health Perspect.*, v.80, p.85-99, 1989.
- BURKE, R.E., MCGUIRE, W.L. Nuclear thyroid hormone receptors in a human breast cancer cell line. *Cancer Res.*, v.48, p.3769-73, 1978.
- CERBON, M.A., PICHON, M.F., MILGROM, E. Thyroid hormone receptors in human breast cancer. *Cancer Res.*, v.41, p.4167-73, 1981.
- CHEN, H., EVANS, R.M. *Nature*, v.377, p.454-7, 1995.
- CHIEN, P.Y., ITO, M., PARK, Y., TAGAMI, T., GEHM, B.D., JAMESON, J.L. A fusion protein of the estrogen receptor (ER) and nuclear receptor corepressor (NcoR) strongly inhibits estrogen-dependent responses in breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.*, v.13, p.2122-36, 1999.

- DOTZLAW, H., ALKHALAF, M., MURPHY, L.C. Characterization of estrogen receptor variant mRNA from human breast cancers. *Mol. Endocrinol.*, v.6, p.773-85, 1992.
- EDWARDS, D.P., CHAMNESS, G.C., MCGUIRE, W.L. Estrogen and progesterone receptors proteins in breast cancer. *Biochem. Biophys. Acta*, v.560, p.457-86, 1979.
- ENDL, E., KAUSCH, I., BAACK, M., KNIPPERS, R., GERDES, J., SCHOLZEN, T. The expression of Ki-67, MCM3, and p27 defines distinct subsets of proliferating, resting, and differentiated cells. *J. Pathol.*, v.195, p.457-62, 2001.
- EVANS, R.M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, v.240, p.889-95, 1988.
- FUQUA, S.A., CHAMNESS, G.C., MCGUIRE, W.L. Estrogen receptor mutations in breast cancer. *J. Cell Biochem.*, v.51, p.135-9, 1993.
- GIANI, C., FIERABRACCI, P., BONACCI, R., GIGLIOTTI, A., CAMPANI, D., NEGRI, F., CECCHETTI, D., MARTINO, E., PINCHERA, A. Relationship between breast cancer and thyroid disease: Relevance of autoimmune thyroid disorders in breast malignancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.81, 1996.
- GLASS, C.K., HOLOWAY, J.M. Regulation of gene expression by the thyroid hormone receptor. *Biochem. Biophys. Acta*, v.1032, p.157-76, 1990.
- GUISSOUMA, H., BECKER, N., SEUGNET, I., DEMENEIX, B.A. Transcriptional repression of TRH promoter function by T₃: analysis by in vivo gene transfer. *Biochem. Cell Biol.*, v.78, p.155-63, 2000.

- HABEL, L.A., STANFORD, J.L. Hormone receptors and breast cancer. *Epidemiol. Rev.*, v.15, p.209-19, 1993.
- HAYDEN, T.S., FORSYTH, I.A. Thyroid hormone binding in rat mammary glands. *J. Endocrinol.*, v.75, p.38-9, 1977.
- HORLEIN, A.J., NAAR, A.M., HEINZEL, T., TORCHIA, J., GLOSS, B., KUROKAWA, R., RYAN, A., KAMEI, Y., SÖDERSTRÖM, M., GLASS, C.K. *Nature*, v.377, p.397-404, 1995.
- IWASE, H., KOBAYASHI, S. Alterations and polymorphisms of the estrogen receptor genetic cancer. *Breast Cancer*, v.31, p.57-66, 1997.
- JENSEN, E.V., CHENG, G., PALMIERI, C., SAJI, S., MÄKELÄ, S., NOORDEN, S.V., WAHLSTRÖM, T., WARNER, M., COOMBES, R.C., GUSTAFSSON, J. Estrogen receptors and proliferation markers in primary and recurrent breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.98, p.15197-202, 2001.
- KAPDY, C.C., WOLFE, J.N. Breast cancer. Relationship to thyroid supplements for hypothyroidism. *JAMA*, v.236, p.1124-7, 1976.
- KAUFFMAN, R.F., BRYANT, H.U. Los moduladores selectivos de los receptores de estrógeno (MSRE) como un nuevo enfoque farmacológico ante la terapia de reemplazo estrogénica. Disponível em: <<http://www.encolombia.com/los-moduladores.htm>>. Acesso em: 20 fev. 2002.

- KESHGEGIAN, A.A., CNAAN, A. Proliferation markers in breast carcinoma. Mitotic figure count, S-phase fraction, proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 e MIB-1. *Am. J. Clin. Pathol.*, v.104, p.42-9, 1995.
- KLINGE, C.M., BROLEY, C.L., BAMBARA, R.A., HILF, R. hsp 70 is not required for high affinity binding of purified calf uterine estrogen receptor to estrogen response element DNA in vitro. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, v.63, p.283-301, 1997.
- KUROKAWA, R., SÖDERSTRÖM, M., HÖRLEIN, A., HALACHMI, S., BROWN, M., ROSENFELD, M.G., GLASS, C.K. *Nature*, v.377, p.451-4, 1995.
- LACROIX, M., QUERTON, G., HENNEBERT, P., LARSIMONT, D., LECLERCQ, G. Estrogen receptor analysis in primary breast tumors by lint assay, immunocytochemical assay, and northern blot. *Breast Cancer Res. Treat.*, v. 67, p.263-71, 2001.
- LAZAR, M.A. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr. Rev.*, v.14, p.184-93, 1993.
- LAZAR, M.A., CHIN, W.W. Nuclear thyroid hormone receptors. *J. Clin. Invest.*, v.86, p.1777-82, 1990.
- LI, Q.L., JANSEN, E., BRENT, G.A., NAQUI, S., WILBER, J.F., FRIEDMAN, T.C. Interactions between the prohormone convertase 2 promoter and thyroid hormone receptor. *Endocrinology*, v.141, p.3256-66, 2000.
- LIPPMAN, M., BARR, R. Glucocorticoid receptors in purified subpopulations of human peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.*, v.118, p.1977-81, 1977.

MANGELSDORF, D.F., THUMMEL, C., BEATO, M., HERLICH, P., SCHUTZ, G., UMESONO, K., BLUMBERG B., KASTNER, P., MARK, M., CHAMBOM, P. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Rev. Cell*, v.83, p.835-9, 1995.

MCGUIRE, W.L., CHAMNESS, C.G., COSTLOW, M.E., SHEPHERD, R.E. Hormone dependence in breast cancer. *Metabolism*, v.23, p.75-100, 1974.

MEITES, J., KRAFT, C.L. Effect of pituitary homotransplant and thyroxine on body and mammary growth in immature hypophysectomized rats. *Endocrinology*, v.75, p.565-70, 1964.

MUHLBOCK, O., BOOT, L.M. The mechanism of hormonal carcinogenesis. In: CIBA F. SYMPOSIUM, 1959, Boston. *Resumo...* Boston, 1959. p.83-94.

MURPHY L.C., DOTZLAW, H. Endogenous growth factor expression in T-47D, human breast cancer cells, associated with reduced sensitivity to antiproliferative effects of progestins and antiestrogens. *Cancer Res.*, v.49, p.599-604, 1989.

MUSTACCHI, P., GREENSPAN, F. Thyroid supplementation for hypothyroidism. An iatrogenic cause of breast cancer? *JAMA*, v.237, p.1446-7, 1977.

NATOLI, C., SICA, G., RANELLETTI, F.O., IACOBELLI, S. Proliferative effects of thyroid hormones on mouse mammary carcinoma cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, v.3, p.291-7, 1983.

NISHIYAMA, K., MATSUSHITA, A., NATSUME, H., MIKAMI, T., GENMA, R., SASAKI, S., NAKAMURA, H. Differences between the silencing-related

- properties of the extreme carboxyl-terminal regions of thyroid hormone receptors alpha 1 and beta 1. *J. Endocrinol.*, v.67, p.219-27, 2000.
- NISHER, J.A., SIITERI, P.K. Estrogens and breast cancer. *Clin. Obstet. Gynecol.*, v.24, p.301-22, 1981.
- NOGUEIRA, C.R., BRENTANI, M.M. Triiodothyronine mimics the effects of estrogen in breast cancer cell lines. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, v.59, p.271-9, 1996.
- OLSON, D.P., SUN, B., KOENIG, R.J. Thyroid hormone response element architecture affects corepressor release from thyroid hormone receptor dimers. *J. Biol. Chem.*, v.273, p.3375-80, 1998.
- PFEFFER, U., FECAROTTA, E., CASTAGNETTA, L., VIDALI, G. Estrogen receptor variant messenger RNA lacking exon 4 in estrogen responsive human breast cancer cell lines. *Cancer Res.*, v.53, 741-3, 1993.
- RASMUSSEN, B., RASMUSSEN, U.F., HEGEDÜS, L., PERRILD, H., KARINE, B., HOIER MADSEN, M. Thyroid function in patients with breast cancer. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, v.23, p.553-6, 1987.
- RASTINEJAD, F., PERLMANN, T., EVANS, R.M., SIGLER, P.B. Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature*, v.375, 1995.
- RIVOLTA, G., CERUTTI, R., COLOMBO, R., MIANO, G., DIONISIO, P., GROSSI, E. Prevalence of subclinical hypothyroidism in a population living in the Milan metropolitan area. *J. Endocrinol. Invest.*, v.22, p.693-7, 1999.

- ROSE, D.P., DAVIS, T.E. Plasma thyroid-stimulating hormone and thyroxine concentrations in breast cancer. *Cancer*, v.41, p.666-9, 1978.
- ROSEN, P.P. *Breast pathology*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. p.295-320.
- SCATCHARD, G. The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad. Sci.*, v.51, p.660-72, 1949.
- SCHMIDT, G.H., MOGER, W.H. Effect of thyroactive materials upon mammary gland growth and lactation in rats. *Endocrinology*, v.81, p.14-8, 1967.
- SCHOLZEN, T., ENDL, E., WOHLBERG, C., VAN DER SAR, S., COWELL, I.G., GERDES, J., SINGH, P.B. The Ki-67 protein interacts with members of the heterochromatin protein 1(HP1) family: a potential role in the regulation of higher-order chromatin structure. *J. Pathol.*, v.196, p.135-44, 2002.
- SHAO, Z., SHEIKH, M.S., RISHI, A.H., DAWSON, M.I., LI, X., WILBER, J.F., FENG, P., FONTANA, J.A. Thyroid hormone enhancement of estradiol stimulation of breast carcinoma proliferation. *Exp. Cel. Res.*, v.218, p.1-8, 1995.
- SMITHCORS, J.F., LEONARD, S.L. Relation of thyroid to mammary gland structure in rat with special reference to male. *Endocrinology*, v.31, p.454-60, 1942.
- SOMMER, S., FUQUA, S.A. Estrogen receptor and breast cancer. *Semin. Cancer Biol.*, v.11, p.339-52, 2001.
- SORRENTINO, J.M., KIRKLAND, W.L., SIRBASKU, D.A. Control of cell growth. II. Requirement of thyroid hormones for the in vivo estrogen

- dependent growth of rat pituitary tumor cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, v.56, p.1155-64, 1976.
- SPENCER, J.G.C. The influence of the thyroid in malignant disease. *Br. J. Cancer*. v.8, p.393-411, 1954.
- TAKATANI, O., OKUMOTO, T., KOSANO, H., NISHIDA, M., HIRAIDE, H., TAMAKUMA, S. Relationship between the levels of serum thyroid hormones or estrogen status and the risk of breast cancer genesis in japanese woman. *Cancer Res.*, v.49, p.3109-12, 1989.
- TAN, J.A., HALL, S.H., PETRUSZ, P., FREUCH, F.S. Thyroid receptor activator molecule, TRAM-1, is an androgen receptor coactivator. *Endocrinology*, v.141, p.3440-50, 2000.
- THOMAS, B.S., BULBROOK, R.D., RUSSELL, M.J., HAYWARD, J.L., MILLIS, R. Thyroid function in early breast cancer. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, v.19, p.1213-9, 1983.
- THUESTAD, G., KRAUS, I., APRILETTI, J., SAATCIOGLU, F. The N-terminal domain of thyroid hormone receptor-alpha is required for its biological activities. *DNA Cell Biol.*, v.19, p.389-99, 2000.
- TOPPER, Y.J., FREEMAN, C.S. Multiple hormone interations in the developmental biology of the mammary gland. *Physiol. Rev.*, v.60, p.1049-106, 1980.
- UPOROV, A.V., SEMIGLAZOV, V.F., POZHARISSKII, K.M. Immunohistochemical study of breast neoplasms cells using different markers of proliferation. *Arkh. Patol.*, v.62, p.26-30, 2000.

- VASUDEVAN, N., KOIBUCHI, N., CHIN, W.W., PFAFF, D.W. Differential crosstalk between estrogen receptor (ER) alpha and ER beta and the thyroid hormone receptor isoforms results in flexible regulation of the consensus ERE. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, v.95, p.9-17, 2001.
- VONDERHAAR, B.K., TANG, E., LYSTER, R.R., NASCIMENTO, M.C.S. Thyroid hormone regulation of epidermal growth factor levels in mouse mammary glands. *Endocrinology*, v.119, p.580-5, 1986.
- VORHERR, H. Thyroid function in benign and malignant breast disease. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, v.23, p.255-7, 1987.
- WEST, M., BLANCHETTE, C., DRESSMAN, H., HUANG, E., ISHIDA, S., SPANG, R., OLSON, J.A. Jr, MARKS, J.R. Predicting the clinical status of human breast cancer by use of expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.98, p.11462-7, 2001.
- WITTLIFF, J.L. Steroid-hormone receptors in breast cancer. *Cancer*, v.53, p.630-43, 1984.
- YAMAMOTO, K.R. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and genes networks. *Ann. Rev. Genet.*, v.19. p.209-52, 1985.
- ZHANG, X., JEYAKUMAR, M., BAGCHE, M.K. Ligant-dependent cross-talk between steroid and thyroid hormone receptors. *J. Biol. Chem.*, v.271, p.14825-33, 1996.

10. Anexos

Anexo A – Termo de Consentimento Livre Esclarecido

Prezado colaborador, este termo de consentimento foi elaborado de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, sobre pesquisas envolvendo seres humanos. Refere-se a sua participação somente na pesquisa abaixo descrita, não havendo possibilidade de envolvimento em outras pesquisas não mencionadas aqui, sem a devida permissão prévia.

Esta pesquisa está sendo conduzida pelos seguintes pesquisadores: Dr.^a Célia Regina Nogueira (Prof.^a Dr.^a do Depto. de Clínica Médica, disciplina de Endocrinologia, Unesp-Botucatu); e Patrícia Pinto Saraiva (aluna da pós-graduação em Clínica Médica da Unesp-Botucatu).

Neste estudo, participarão pacientes com câncer de mama, com plano de tratamento realizado, no qual incluem a realização de cirurgia para remoção tumoral e pacientes sem câncer de mama (comprovado através de mamografia recente) para dosagens hormonais.

Sua participação neste estudo será através da realização de coleta de sangue anteriormente aos procedimentos cirúrgicos e de radio e quimioterapia; e autorização para que o tecido tumoral removido na cirurgia seja submetido a análises laboratoriais.

Serão realizadas dosagens laboratoriais de T₄ livre, TSH, anticorpo anti-TPO e TRAB antes do procedimento cirúrgico, da radio e da quimioterapia. Após a cirurgia, o tecido tumoral removido será utilizado para verificação da fase tumoral em que se encontra e parte do material cirúrgico será utilizada para extração de material genético e realização de exames laboratoriais, através dos quais serão obtidas respostas para associação entre hormônios da tireóide e estrógeno no desenvolvimento do câncer mamário.

Não estão previstos nenhum tipo de riscos, danos ou prejuízos aos pacientes. O objetivo deste estudo é comprovarmos a existência de associação entre patologias tireoidianas e o câncer de mama e estabelecermos novas formas de diagnóstico, favorecendo a indicação de formas de tratamento mais direcionadas e adequadas a cada caso.

Os nomes dos participantes serão mantidos em sigilo absoluto. Somente serão utilizados dados como idade e resultados dos exames realizados.

Deve ficar claro que o paciente tem o livre arbítrio para recusar-se a participar e/ou desistir a qualquer momento, sem que nenhum tipo de prejuízo ao tratamento ou punição seja instituído.

Quaisquer dúvidas ou melhores esclarecimentos podem ser obtidos diretamente com Dr.^a Célia Regina Nogueira, pelo telefone: (14)6802-6213.

Declaro-me ciente das normas acima estabelecidas, optando livremente por minha participação.

Botucatu,...../...../.....

.....

assinatura do paciente (ou responsável)

Anexo B - Relação das pacientes pertencentes ao grupo com câncer de mama.

Faixa Etária	Idade	Paciente	Tipo histológico	Metástases
30-40	35	EMR	CA medular	Ausente
41-60	42	MAA	CA ductal infiltrante	Presente
	43	MLR	CA ductal invasivo	Presente
	49	MAV	CA ductal infiltrante	Ausente
	47	MAR	CA ductal in situ+CA intraductal residual papilífero	Ausente
	47	MTAG	CA ductal	Presente
	46	RMBS	CA tubulo-lobular	Inconclusivo
	54	CFL	CA ductal invasivo	Ausente
>60	69	HSO	CA ductal invasivo	Ausente
	61	OLR	CA ductal invasivo	Ausente
	62	JE	CA papilífero invasivo+CA ductal+CA colóide	Presente
	68	AGT	CA ductal invasivo grau II	Inconclusivo
	67	NPA	CA ductal invasivo	Inconclusivo
	66	ASC	CA ductal invasivo	Inconclusivo
	78	MJOP	CA ductal invasivo grau II	Inconclusivo
	84	EBD	CA ductal infiltrante	Inconclusivo
	58	MAO	CA ductal infiltrante	Ausente
	72	NB	CA ductal invasivo	Inconclusivo
		62	TMLO	*
61		ACS	*	Inconclusivo
84		MCBP	CA ductal invasivo grau II	Inconclusivo
72		DR	CA ductal invasivo	Inconclusivo
68		DBS	CA ductal infiltrante	Inconclusivo
83		AL	CA ductal invasivo	Inconclusivo
73		MER	CA ductal infiltrante	Inconclusivo
74		GPMA	CA ductal infiltrante grau I	Inconclusivo

* não foram encontrados os laudos das biópsias até o momento

Anexo C – Níveis hormonais e relação entre T₃ e E₂, em pacientes com câncer de mama

Faixa Etária	Paciente	TSH	T ₄ L	T ₃ L	E ₂	T ₃ /E ₂
30-40	EMR	1,41	1,27	3,36	16,06	20
41-60	MAA	1,84	1,34	3,30	8,58	38
	MLR	2,71	1,11	3,21	4,13	77
	MAV	1,74	1,68	4,39	11,03	39
	MAR	6,28	1,66	4,62	71,44	6
	MTAG	1,40	1,49	3,46	65,41	5
	RMBS	1,80	1,0	2,69	19,20	14
	CFL	3,37	1,16	3,88	8,71	44
>60	HSO	0,71	0,96	2,63	4,0	65
	OLR	1,31	1,31	3,30	18,95	17
	JE	3,68	1,18	4,99	36,37	13
	AGT	0,84	1,70	4,37	28,84	15
	NPA	0,32	1,55	5,81	26,94	21
	ASC	1,08	1,36	3,93	1,57	250
	MJOP	0,52	1,41	2,98	23,0	12
	EBD	0,31	2,21	5,90	1,11	536
	MAO	2,49	1,29	3,65	3,37	108
	NB	0,54	1,38	3,31	66,92	4
	TMLO	4,22	1,07	3,25	1,11	295
	ACS	0,37	2,10	4,76	10,73	44
	MCBP	0,57	1,08	3,15	75,84	4
	DR	0,32	1,91	4,76	4,18	99
	DBS	0,84	1,96	4,22	43,91	9
	AL	0,32	1,66	3,44	1,11	312
MER	3,74	1,45	3,43	95,08	3	
GPMA	0,005	2,0	3,99	15,02	26	

Anexo D - Níveis hormonais e relação entre T₃ e E₂, em pacientes do grupo controle

Paciente	TSH	T ₄ L	T ₃ L	E ₂	T ₃ /E ₂
MAM	1,35	1,0	2,53	27,3	9
AFB	6,26	0,91	2,72	25,1	10
MCQ	1,09	0,90	3,03	20,0	15
MCM	4,42	1,00	2,89	32,5	8
NC	3,86	1,10	3,57	18,5	19
ICF	4,73	0,96	2,56	19,4	13
AGS	2,41	1,10	3,07	41,3	7
ZV	3,33	1,10	2,80	20,2	13
LFO	1,48	0,75	2,25	24,3	9
MIL	0,65	0,85	2,85	17,3	16
RPL	0,859	1,10	2,78	19,3	14
LOGA	1,18	1,20	2,90	23,4	12
EBPF	0,84	1,6	3,90	26,2	14
UE	2,69	0,73	2,68	28,7	9
NF	3,33	1,10	2,80	30,2	9
LCG	2,41	1,10	3,07	22,4	13
ARM	3,02	0,90	3,55	18,2	19
AI	0,021	0,20	3,86	31,61	12
APM	3,25	0,65	2,71	25,0	10
VF	4,02	0,94	3,07	18,6	16
FSSP	2,40	0,70	3,15	18,0	17
MIF	1,62	1,10	2,83	21,2	13

Anexo E – Relação das pacientes pertencentes ao grupo com câncer de mama.

Paciete	Idade	Menopausa	Alterações tireoidianas	Presença de ER
EMR	35	não	TPO +	*
MAA	42	não	(-)	+
MLR	43	não	TPO +	*
MAV	49	sim	T ₃ L↑	*
MAR	47	não	T ₃ L↑, TPO+, TSH↑	+
MTAG	47	não	(-)	*
RMBS	46	não	(-)	*
CFL	54	sim	(-)	-
HSO	69	sim	(-)	-
OLR	61	sim	(-)	-
JE	62	sim	(-)	+
AGT	68	sim	T ₃ L↑, TPO+	+
NPA	67	sim	T ₃ L↑, TPO+, TSH↓	*
ASC	66	sim	(-)	-
MJOP	78	sim	(-)	-
EBD	84	sim	T ₃ L↑, TPO+, TSH↓	+
MAO	58	sim	TPO+	+
NB	72	sim	(-)	+
TMLO	62	sim	TSH↑	*
ACS	61	sim	T ₃ L↑, TSH↓	*
MCBP	84	sim	(-)	+
DR	72	sim	T ₃ L↑, TPO+, TSH↓	+
DBS	68	sim	TPO+	*
AL	83	sim	TPO+, TSH↓	+
MER	73	sim	TPO+, TSH↑	*
GPMA	74	sim	T ₃ L↑, TSH↓	*

(-) sem alterações dos hormônios tireóideos

* não foi possível realizar o estudo imunohistoquímico nesses tumores

Anexo F – Relação das pacientes pertencentes ao grupo controle.

Faixa Etária	Idade	Paciente	Menopausa	Alterações tireoidianas
30-40	35	MAM	não	(-)
41-60	43	AFB	não	TSH↑
	44	MCQ	*	(-)
	52	MCM	**	TSH↑
	43	NC	não	(-)
	60	ICF	sim	TSH↑
	48	AGS	não	(-)
	45	ZV	sim	(-)
	59	LFO	sim	(-)
	54	MIL	***	(-)
	60	RPL	sim	(-)
	49	LOGA	não	(-)
	47	EBPF	não	(-)
	59	UE	sim	(-)
	45	NF	sim	(-)
41	LCG	sim	(-)	
>60	67	ARM	sim	(-)
	65	AI	sim	(-)
	67	APM	sim	(-)
	61	VF	sim	TSH↑
	68	FSSP	sim	(-)
	62	MIF	sim	(-)

Obs.: Considerada menopausada a ausência de menstruação por pelo menos um ano.

* Climatério há 4 meses

** Ooforectomia com TRH há 5 anos

*** Climatério há 8 meses

11. RESUMO

Os hormônios tireóideos, o estrógeno e outros hormônios atuam no crescimento e desenvolvimento do tecido mamário. Os receptores de estrógeno devem estar presentes para que o estrógeno possa atuar na atividade biológica das células mamárias. A presença ou ausência destes receptores no tecido tem influência direta na terapêutica e prognóstico clínico do câncer de mama.

Os receptores do estrógeno e do hormônio tireóideo (T_3) são membros da “superfamília de receptores” intracelulares. Estes receptores atuam na ativação da transcrição de genes alvo, através da união ao seu elemento responsivo hormonal.

Ainda não se sabe de que forma o hormônio tireóideo atua no tecido tumoral mamário. Estudos epidemiológicos são contraditórios, mostrando que, quando os níveis de T_3 estão elevados existe proteção contra o desenvolvimento de câncer de mama. Outros estudos demonstram haver aumento no risco e incidência do câncer mamário em pacientes hipertireoideas. Análises *in vitro* demonstraram que o T_3 , em concentrações suprafisiológicas induz a proliferação celular.

Em pacientes com câncer de mama realizamos dosagens hormonais e verificamos a expressão dos receptores de estrógeno. Também foi estudada a conformação da molécula do T_3 e do receptor de estrógeno, para confirmar se uma possível ligação estaria ocorrendo entre o T_3 e o ER.

Nossos resultados mostram a existência de uma correlação clínica entre doenças tireoidianas, de forma mais prevalente o hipertireoidismo, e o desenvolvimento do câncer de mama. Através da imunohistoquímica demonstramos que a maioria dos tumores, em pacientes menopausadas, possui receptores de estrógeno. Níveis elevados do hormônio tireóideo possibilitariam sua ligação ao receptor de estrógeno, comprovado através de estudos de *binding*, no qual o T₃ desloca a ligação do estrógeno ao seu receptor. A possibilidade da ligação entre o hormônio tireóideo e o receptor de estrógeno foi comprovada pela conformação molecular destas estruturas, que tornam esta ligação quimicamente possível.

Demonstramos, portanto, que existe uma relação positiva entre concentração elevada de T₃ e a proliferação celular em câncer de mama. Este fato faz com que se torne necessária uma avaliação tireoidiana em pacientes geneticamente predispostas ao desenvolvimento de câncer mamário.

12. ABSTRACT

Thyroid hormones, estrogen and other hormones act in the growth and development of breast tissue. Estrogen receptors must be present so that estrogen can act in the biological activity of breast cells. The presence or the absence of these receptors in tissue has direct influence on therapeutics and clinical prognosis of breast cancer.

Estrogen and thyroid hormone (T_3) receptors are members of intracellular “receptors superfamily”. These receptors work in the activation of the transcription of target genes, linking them to their hormonal response.

It is not known in which way thyroid hormone act in tumoral breast tissue. Epidemiologic studies are contradicting, showing that, when T_3 levels are high, there is protection against the development of breast cancer. Other studies show that there must be an increase in the risk and incidence of breast cancer in hyperthyroid patients. *In vitro* analysis present that supra-physiological concentrations of T_3 induces cellular proliferation.

We performed hormonal dosage and verified the expression of estrogen receptors in breast cancer patients. The morphology of T_3 molecule and of the estrogen receptor were also studied, to confirm if a possible link would exist between T_3 and ER.

Our results show an existence of a clinical relation between thyroid diseases, prevailing the hyperthyroidism, and the development of breast cancer.

Using immunohistochemistry we present that most of the tumors in menopausal women, show estrogen receptors. High levels of thyroid hormone would make possible its link to the estrogen receptor, confirmed by means of binding studies, when T_3 dislocates estrogen from its receptor. The possibility of a link between thyroid hormone and estrogen receptor was confirmed by the molecular morphology of these structures, that make this link possible.

We showed, however, that there is a positive relation between high concentration of T_3 and cell proliferation in breast cancer. It makes thyroid evaluation necessary in patients who are genetically predisposed to the development of breast cancer.