

Sandro José Conde

**INTER-RELAÇÃO DA MODULAÇÃO GÊNICA
ENTRE TRIIODOTIRONINA (T3) E
ESTRADIOL (E2) EM CULTURA PRIMÁRIA
DE ADENOCARCINOMA DE MAMA**

Botucatu
2008

Sandro José Conde

**INTER-RELAÇÃO DA MODULAÇÃO GÊNICA
ENTRE TRIIODOTIRONINA (T3) E
ESTRADIOL (E2) EM CULTURA PRIMÁRIA
DE ADENOCARCINOMA DE MAMA**

Tese apresentada à Faculdade Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Prof. Dra. Célia Regina Nogueira

Botucatu
2008

Dedicado à minha esposa:

Carla Regiani Conde

O maior bem da minha
existência, qualquer conquista
só faz sentido a partir do
momento que estás ao meu
lado.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom maravilhoso que me deu: a vida. E por torná-la tão maravilhosa de ser vivida.

Aos meus pais por serem um porto seguro para os momentos difíceis.

À profa. Dra. Dirce Maria Carraro e sua equipe pelo auxílio com a coleta das amostras no Instituto Ludwig.

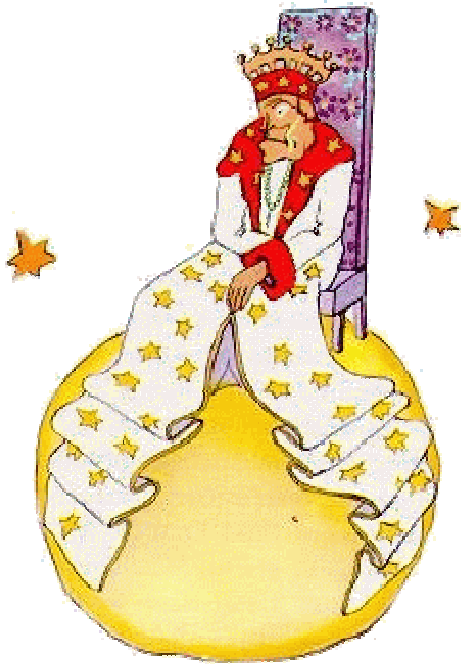
À profa. Dra. Maria Mitzi Brentani e sua equipe, principalmente a Dra. Maria Lúcia Hirata Katayama, por cederem o laboratório para a confecção das culturas primárias.

Ao prof. Dr. Peter Kopp pela revisão do trabalho e sugestões.

Ao prof. Dr. Carlos Roberto Padovani pela análise estatística.

A profa. Claudia Aparecida Rainho e a profa. Márcia Guimarães da Silva pela sugestões muito bem qualificadas.

Aos colegas de laboratório André Nascimento, André Leopoldo, Ana Paula, Renata, Loreta, Aline, Paula, Silvio, Djon, Marcelo, Maria Teresa, Dani, Sueli, Elenize, José Carlos, Mário Bruno, Dr. Cicogna, Giovana, Juliana, Sérgio, Rogério, Boca, Sandra, Camila, Corina, Denise, Nancy, Silvia Helena, Cris, Rô, Regiane, Ricardo, Danilo, Dra. Gláucia, e tantos outros amigos próximos, muito obrigado por todos os momentos juntos.



- Alors mon coucher de soleil?
rappela le petit prince qui
jamais n'oubliait une question
une fois qu'il l'avait posée.

- Ton coucher de soleil, tu
l'auras. Je l'exigerai. Mais
j'attendrai, dans ma science
du gouvernement, que les
conditions soient favorables.

- Quand ça sera-t-il?
s'informa le petit prince.

- Hem! Hem! lui répondit le
roi, qui consulta d'abord un
gros calendrier, hem! hem!
ce sera, vers... vers... ce sera
ce soir vers sept heures
quarante! Et tu verras comme
je suis bien obéi.

**Le Petit Prince - Antoine
de Saint-Exupéry**

RESUMO

Sabe-se que o E_2 e o *status* hormonal da paciente são importantes para a proliferação e o tratamento do câncer de mama, quanto ao T_3 , apesar dos estudos epidemiológicos serem ainda contraditórios em relação a sua influência no câncer de mama, estudos laboratoriais demonstram sua capacidade de induzir a sua proliferação e induzir genes que são induzidos por estrógeno. Portanto a hipótese formulada foi que os hormônios tireoidianos modulam a expressão dos mesmos genes que o estrógeno em carcinoma de mama. Para materializar a hipótese o objetivo foi comparar a expressão dos genes TGFA, TGFB1 e PGR, resultantes da ação do estrógeno, e dos genes TNFRSF9, BMP6 e THRA, resultantes da ação do hormônio tireoidiano, combinados ou não com a ação do Tamoxifem, em carcinoma de mama colocado em cultura primária. Foram selecionadas 12 pacientes do sexo feminino, menopausadas, com Carcinoma de Mama estágio grau 1 e 2, do Hospital do Câncer de São Paulo, verificou-se a existência de disfunção tireoidiana concomitante, através das dosagens laboratoriais de T3L, T4L, TSH, TPO-AB, assim como o *status* hormonal em relação aos níveis estrogênicos. Fragmentos tumorais obtidos cirurgicamente foram colocados em cultura primária. Essas células foram tratadas com E_2 ($10^{-7}M$), T_3 ($10^{-8}M$), E_2 ($10^{-7}M$) + TAM ($10^{-6}M$), T_3 ($10^{-8}M$) + TAM ($10^{-6}M$), TAM ($10^{-6}M$), com posterior extração de RNA total.

Foi utilizada a metodologia de PCR em Tempo Real para verificar a ação do T_3 e do E_2 em genes normalmente induzidos pelo E_2 (PGR, TGFA e TGFB1), verificada a expressão de genes que aumentam (TNFRSF9 e THRA) e diminuem (BMP6) pela ação do T_3 em seu receptor (TR) e a presença de mutações no TR. Não foram encontradas mutações envolvendo o receptor de hormônio tireoidiano. Quanto às expressões gênicas, nas pacientes ER positivas o tratamento com T_3 aumentou significativamente a expressão dos genes TGFA, THRA, TNFRSF9 e PGR e diminuiu a expressão de TGFB1 e BMP6. Ao comparar o tratamento com E_2 ao controle observou-se aumento da expressão de TGFA e PGR com diminuição da expressão

de TGFB1 e sem ação na expressão do THRA, BMP6 e TNFRSF9 demonstrando que o E2 não interfere na expressão de genes regulados pelo hormônio tireoidiano. Embora o número de amostras fosse insuficiente para essa avaliação, nas pacientes ER negativas não foram observadas as alterações de expressão encontradas nas pacientes ER positivas. Os resultados da ação do T3 nos genes THRA, TNFRSF9 e BMP6 demonstram que os receptores de hormônio tireoidiano no tumor das pacientes estudadas são funcionais, permitindo sua ligação e ação. Foi observado que o T3 elevou a expressão de TGFA e PGR, de maneira similar ao estrógeno. Concluiu-se que o hormônio tireoidiano, em carcinoma de mama humano modula a expressão de genes que estão envolvidos com a via de atuação do estrógeno.

Palavras-chave: Cultura primária, adenocarcinoma de mama, triiodotironina, estradiol, expressão gênica.

ABSTRACT

It is known that E2 and the patient's hormonal status is important for the proliferation and the treatment of the breast cancer. Despite the contradictory epidemic studies of T3 and its influence in the breast cancer, laboratory studies demonstrate its capacity to induce not only its proliferation but also genes that are induced by estrogen. Therefore the hypothesis was that the thyroid hormones modulate the expression of the same genes as the estrogen in breast carcinoma. The objective was to compare the expression of the genes TGFA, TGFB1 and PGR, resultant of the estrogen action and genes TNFRSF9, BMP6 and THRA, resultant of the thyroid hormone action, combined or not with the Tamoxifen action in breast carcinoma in primary culture. 12 menopausal patients with breast carcinoma stages 1 and 2, of São Paulo Cancer Hospital were selected. The existence of concomitant thyroid dysfunction was verified through laboratory dosages of T3L, T4L, TSH, TPO-AB, as well as the hormonal status in relation to the estrogen levels. Tumor fragments surgically obtained were put in primary culture. Those cells were treated with E2 (10-7M), T3 (10-8M), E2 (10-7M) + ..., with subsequent extraction of total RNA.

The methodology of PCR was used in Real Time to verify the action of T3 and E2 in genes usually induced by E2 (PGR, TGFA and TGFB1), verified the expression of genes which increase (TNFRSF9 and THRA) and decrease (BMP6) by the action of T3 in its receptor (TR) and the presence of mutations in TR. Mutations involving the thyroid hormone receptor were not found. Related to the genic expressions, in the ER positive patients, the treatment with T3 increased the expression of TGFA, THRA, TNFRSF9 and PGR genes significantly and reduced the expression of TGFB1 and BMP6. When comparing the treatment with E2 to the control it was observed increase of the expression of TGFA and PGR with decrease of the expression of TGFB1 and without action in the expression of THRA, BMP6 and TNFRSF9 demonstrating that E2 doesn't interfere in the expression of genes regulated by the thyroid hormone. Although the number of samples was insufficient

for the evaluation, in the ER negative patients the expression alterations found in the ER positive patients were not observed. The results of T3 action in the THRA, TNFRSF9 and BMP6 genes demonstrate that the thyroid hormone receptors in the studied patient's tumor are functional, allowing its connection and action. It was observed that T3 elevated the expression of TGFA and PGR similar to the estrogen. It was concluded that the thyroid hormone in breast cancer modulates the expression of genes that are involved with the estrogen performance.

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....	11
2.0 HIPÓTESE	17
3.0 OBJETIVO	18
4.0 PACIENTES E MÉTODOS.....	19
4.1 Bases Metodológicas:	19
4.2 Estudo da Associação de Disfunção Tireoidiana em Pacientes Portadoras de Câncer de Mama	19
4.3 Dosagens hormonais	20
4.4 Cultura Primária	21
4.5 Extração de RNA total.....	22
4.6 RT-PCR quantitativo em tempo real (Real-Time PCR):	24
4.7 Extração de DNA total e PCR.....	27
4.8 Sequenciamento	32
5.0 RESULTADOS.....	34
5.1 Descrição das pacientes	34
5.2. Avaliação dos fragmentos tumorais e dosagens hormonais:.....	34
5.3 Análise molecular dos fragmentos tumorais:	37
5.4 Expressão Gênica por RT-PCR em tempo real:	38
5.5 Extração de DNA e PCR	46
6.0 DISCUSSÃO.....	47
7.0 CONCLUSÕES.....	57
8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
9.0 ANEXOS	<i>Erro! Indicador não definido.</i>

1.0 INTRODUÇÃO

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 e Moger, 1967; Nisker e Siiteri, 1981). Os hormônios tireóideos não são essenciais para o desenvolvimento dos ductos mamários, mas parecem estimular o desenvolvimento dos lóbulos destas glândulas (Topper e Freeman, 1980). Além disso, acredita-se que, em estados de excesso ou deficiência do hormônio tireóideo, o processo possa ser afetado negativamente (Meites e Kragt, 1964). Vonderhaar et al (Vonderhaar, Tang *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 aos receptores de prolactina (Borellini e 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 e Oka, 1989).

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, Kirkland *et al.*, 1976; Natoli, Sica *et al.*, 1983). A controvérsia sobre o papel desses hormônios, tanto na etiologia quanto no tratamento do câncer de mama é bastante grande. Alguns autores encontraram associação entre a suplementação de hormônios tireóideos e aumento do risco de câncer mamário (Kapdi e Wolfe, 1976; Mustacchi e Greenspan, 1977). Por outro lado, Vorherr (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.

Estudos prévios demonstraram a associação entre aumento do volume tireoidiano e câncer de mama em regiões endêmicas de deficiência de iodo (Spencer, 1954; Adamopoulos, Vassilaros *et al.*, 1986), além do papel direto da deficiência de iodo em promover o câncer de mama (Eskin, 1977).

Há relatos de desenvolvimento de câncer de mama, em estudos experimentais, quando realizada a tireoidectomia (Muhlbock e Boot, 1959) e maior incidência de câncer de mama em pacientes portadores de bócio (Spencer, 1954).

Observou-se, também, aumento no risco e incidência de câncer mamário em pacientes hipertireóideas (Rose e Davis, 1978; Thomas, Bulbrook *et al.*, 1983; Takatani, Okumoto *et al.*, 1989). Supostamente o epitélio mamário torna-se sensível ao estrógeno, prolactina e carcinogênios. 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, Feldt-Rasmussen *et al.*, 1987; Giani, Fierabracci *et al.*, 1996).

Em estudo clínico recente com 26 pacientes com Carcinoma de Mama do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, com estágio grau II, e idade variando dos 35 aos 84 anos. Destas pacientes, 58% (15 pacientes) apresentavam algum tipo de doença tireoidiana, sendo o hipertireoidismo o distúrbio mais freqüente (31%), tendo diferença significativa em relação aos controles sem câncer de mama ($p < 0,05$). 20 pacientes eram menopausadas (76,9%). Destas, 50% apresentavam doenças tireoidianas (sendo

35% de hipertireoidismo) (Saraiva, Figueiredo *et al.*, 2005). Se, por um lado, observações clínicas (Adamopoulos, Vassilaros *et al.*, 1986; Rasmusson, Feldt-Rasmussen *et al.*, 1987; Vorherr, 1987) e epidemiológicas (Thomas, Bulbrook *et al.*, 1983) 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 doença tireoidiana que influencia o câncer de mama.

O hormônio tireoidiano (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 e Holloway, 1990).

Fatores prognósticos e preditivos são ferramentas indispensáveis no tratamento de doenças neoplásicas (West, Blanchette *et al.*, 2001). Sem contar que a concentração do receptor de estrógeno é um importante parâmetro no prognóstico do câncer de mama (Lacroix, Querton *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 e Fuqua, 2001). Portanto, a concentração do receptor fornece dados sobre quais tumores seriam responsivos à intervenção hormonal (Fuqua, Chamness *et al.*, 1993).

A presença de $ER\alpha$ 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 ($ER\alpha$) para estrógeno (Jensen, Cheng *et al.*, 2001). A presença ($ER+$) ou ausência (Rasmusson, Feldt-Rasmussen *et al.*) 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, Chamness *et al.*, 1979; Bernstein e Ross, 1993; Habel e Stanford, 1993).

A perda da dependência hormonal em tumores de mama pode ocorrer pela presença de receptores mutados. 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, Chamness *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 e Kobayashi, 1997).

No que se refere ao câncer de mama, pouco se sabe sobre a maneira como o T_3 modula o seu receptor no tecido tumoral. Foi demonstrada por Burke & McGuire (Burke e McGuire, 1978) a presença de receptores para T_3 no núcleo de uma linhagem de células derivadas de câncer de mama humano (MCF-7). Cerbon *et al* (Cerbon, Pichon *et al.*, 1981) comprovaram a presença de receptores nucleares para T_3 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* (Shao, Sheikh *et al.*, 1995) demonstraram que o T_3 potencializa a ação do estrógeno nas linhagens de câncer de mama ER+.

Barkhem *et al* (Barkhem, Carlsson *et al.*, 1991) clonaram o receptor de hormônio tireoidiano (TR) na linhagem celular T47D e verificaram que essa isoforma de TR é funcional nessas células. Da mesma forma, Zhang *et al* (Zhang, Jeyakumar *et al.*, 1996) demonstraram a presença de TR e ER nessa linhagem celular. Essas diferenças entre as isoformas do T_3 , 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 T_3 , em concentrações suprafisiológicas, induz à proliferação celular e a expressão de genes que primariamente eram estimulados pelo E2, possivelmente através do receptor de estrógeno, em linhagem MCF-7 de câncer de mama, que expressa receptor para estrógeno e para o hormônio tireoidiano, sendo esse efeito inibido pelo tamoxifen (TAM) (Nogueira e Brentani, 1996).

Os receptores de estrógeno devem estar presentes para o estrógeno influenciar a atividade biológica e a velocidade de crescimento das células mamárias (Mcguire, Chamness *et al.*, 1974; Wittliff, 1984; Habel e Stanford, 1993) tanto em tecido normal (Hayden e Forsyth, 1977), como em tecido neoplásico (Cerbon, Pichon *et al.*, 1981).

Sabe-se que o E₂ e o *status* hormonal da paciente são importantes para a proliferação e o tratamento do câncer de mama (Jensen, Cheng *et al.*, 2001), quanto ao T₃, apesar dos estudos epidemiológicos serem ainda contraditórios em relação a sua influência no câncer de mama (Spencer, 1954; Muhlbock e Boot, 1959; Rose e Davis, 1978; Thomas, Bulbrook *et al.*, 1983; Vorherr, 1987; Takatani, Okumoto *et al.*, 1989; Saraiva, Figueiredo *et al.*, 2005), estudos laboratoriais demonstram sua capacidade de induzir a proliferação do câncer de mama com ER positivo (Nogueira e Brentani, 1996) possivelmente através da ligação do T₃ ao receptor de estrógeno (Nogueira e Brentani, 1996; Saraiva, Figueiredo *et al.*, 2005).

Em estudo realizado por nosso grupo, utilizando lâminas de *microarray* para aproximadamente 4000 genes em linhagens celulares tumorais de mama, foram demonstradas semelhanças na expressão de oito genes na regulação por T₃ e por E₂: *Amphiregulin* (schwannoma-derived growth factor) (AR); *fibulin 1* (FBLN1); *claudin 6* (CLDN6), *pericentriolar material 1* (PCM1), *premature ovarian failure 1B* (POF1B), *factor for adipocyte differentiation-104* (FAD 104), *sterile alpha motif domain containing 9* (SAMD9), *likely ortholog of rat vacuole membrane protein 1* (VMP1). Destes genes AR, CLDN6 e FAD104 tiveram modulação positiva também no tratamento com TAM comparado ao controle. Quando adicionado TAM aos tratamentos (tanto E₂+TAM, quanto T₃+TAM) não houve diferença na modulação determinada pelos hormônios.

Portanto torna-se fundamental verificar a ação do T₃ e do E₂, em diferentes concentrações, sobre a indução da expressão de genes regulados pelo estrógeno (TGFA, TGFB1, PGR) e genes regulados pelo hormônio tireoidiano (TNFRSF9, BMP6

e THRA) através de carcinoma de mama das pacientes proveniente do Hospital do Câncer de São Paulo, obtidos de processo cirúrgico e colocados em cultura primária.

2.0 HIPÓTESE

Os hormônios tireoidianos e estrogênios modulam a expressão dos mesmos genes que o estrógeno em carcinoma de mama.

3.0 OBJETIVO

Comparar a expressão dos genes TGFA, TGFB1 e PGR, resultantes da ação do estrógeno, e dos genes TNFRSF9, BMP6 e THRA, resultantes da ação do hormônio tireoidiano, combinados ou não com a ação do Tamoxifem, no carcinoma de mama colocado em cultura primária.

Verificar no carcinoma de mama colocado em cultura se o receptor de T3 é funcionante estudando a expressão de genes que são modulados por T3: TNFRSF9, BMP6 e THRA.

4.0 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Bases Metodológicas:

Para atingir os objetivos, foi utilizada a seguinte metodologia:

1. Em pacientes portadoras de Carcinoma de mama foi verificada a existência de disfunção tireoidiana concomitante, através das dosagens laboratoriais de T3L, T4L, TSH, TPO-AB, TRAB, T3reverso, assim como o *status* hormonal em relação aos níveis estrogênicos.

2. Fragmentos tumorais obtidos cirurgicamente foram colocados em cultura primária. Essas células foram tratadas com E2 (10^{-7} M), T3 (10^{-8} M), E2 (10^{-7} M) + TAM (10^{-6} M), T3 (10^{-8} M) + TAM (10^{-6} M), TAM (10^{-6} M), com posterior extração de RNA total.

3. Utilização da metodologia de PCR em Tempo Real para verificar a ação do T₃ e do E₂ em genes normalmente induzidos pelo E₂ (PGR, TGFA e TGFB1) conforme já estudado anteriormente em células de câncer de mama colocadas em cultura (Nogueira e Brentani, 1996); verificar a expressão de genes que aumentam (TNFRSF9 e THRA) e diminuem (BMP6) pela ação do T3 em seu receptor (TR) e a presença de mutações no TR.

4.2 Estudo da Associação de Disfunção Tireoidiana em Pacientes Portadoras de Câncer de Mama

Foram selecionadas 12 pacientes do sexo feminino, menopausadas, com Carcinoma de Mama estágio grau 1 e 2, do Hospital do Câncer de São Paulo durante os meses entre março e julho de 2004, com o prévio esclarecimento e assinatura do termo de consentimento já aprovado pelo Comitê de Ética Médica para Desenvolvimento de Pesquisa em Humanos, do próprio Hospital do Câncer.

Critérios de elegibilidade de pacientes à pesquisa:

1- Mulheres com idade maior ou igual a 30 anos;

2- Câncer de mama estágio 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 a 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 feito uso de beta-bloqueadores, aspirina, heparina, fenitoína, esteróides ou dopamina, um mês antes do início e/ou durante o estudo;
- 7- Ter usado contrastes iodados por um período de seis meses antes do início e/ou durante o estudo.

Após a cirurgia, foram realizadas novas dosagens desses hormônios séricos no laboratório de análises clínicas da Faculdade de Medicina - UNESP, a fim de se confirmar os dados anteriormente obtidos.

4.3 Dosagens hormonais

As dosagens hormonais (TSH, T3L, T4L, T3reverso, TPO-AB, TRAB, LH, FSH, E2) foram realizadas utilizando-se *kits* comerciais, pelo método da quimioluminescência (DPC-Medlab).

4.4 Cultura Primária

Para obtenção da cultura primária todos os procedimentos foram seguidos como previamente descrito por Jing et al. Foi retirado um pequeno fragmento, imerso em meio RPMI, fixado em 10% de formalina e usado para confirmar o diagnóstico histopatológico de carcinoma ductal de mama invasivo. O restante do tecido foi cortado em consecutivas tiras de 0.5 mm usando um micrótomo Krumdieck (Alabama Research and Development Corporation, Birmingham, AL). Estes cortes foram colocados em cultura ou fixados em formalina tamponada (amostras de pré-cultura). Os cortes colocados em cultura foram transferidos para lentes de silicone em papel retangular e mergulhados em 5ml em placas de 35mm com meio de cultura. O meio utilizado foi o RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100µg /ml de penicilina, 100 µg/ml de streptomicina e 5µg/ml de insulina. As culturas foram mantidas à 37° C em uma atmosfera umidificada com 95% O₂/5% CO₂. Cerca de 3 a 4 cortes do tecido tumoral foram colocados em placa de Petri, e tratados, por um período de 48 horas, com E2 fisiológico (10⁻⁷M), T3 suprafisiológico (10⁻⁸M), E2 fisiológico (10⁻⁷M) + TAM farmacológico (10⁻⁶M), T3 suprafisiológico (10⁻⁸M) + TAM farmacológico (10⁻⁶M), TAM farmacológico (10⁻⁶M) (Tabela 1) com concentrações conforme previamente estabelecido (Nogueira e Brentani, 1996). Em seguida foram conservadas em nitrogênio líquido até que fosse realizada a posterior extração de RNA total.

Tabela 1. Tratamentos em modelo de dois fatores (2x3) para a análise dos blocos completos casualizados.

TRATAMENTOS	Ausência de hormônios	Estrógeno (10 ⁻⁸ M)	Triiodotironina (10 ⁻⁸ M)
Ausência de Droga	Controle	E2 (10 ⁻⁸ M)	T3 (10 ⁻⁸ M)
Tamoxifen (10 ⁻⁶ M)	TAM (10 ⁻⁶ M)	E2 (10 ⁻⁸ M) + TAM (10 ⁻⁶ M)	T3 (10 ⁻⁸ M) + TAM (10 ⁻⁶ M)

Tamoxifen 10⁻⁶M: dose farmacológica; TAM: Tamoxifen; E2 10⁻⁸M: Dose fisiológica de estrógeno; T3 10⁻⁸M: Dose fisiológica de triiodotironina.

4.5 Extração de RNA total

4.5.1. Homogeinização:

As amostras de tumores congeladas e mantidas em nitrogênio líquido foram pulverizadas sob banho de gelo seco em um pulverizador Thermovac, da Telcolab Corporation e colocadas em tubos de centrifuga (Corex) contendo 1 mL de TRIZOL[®] Reagente, passando-se o lisado através de uma pipeta.

4.5.2. Fase de Separação:

Incubamos as amostras de homogenato durante 5 min a 15 – 30°C para permitir a completa dissociação dos complexos das nucleoproteínas. Adicionamos, então, 0,2 mL de Clorofórmio por 1 mL de Trizol. Fechamos os tubos adequadamente e fizemos uma agitação manual vigorosa por 15 segundos. Incubamos a 15 – 30°C durante 2 a 3 minutos. Centrifugamos as amostras durante 15 minutos a 12000xg a 2 – 8°C. Após a centrifugação, a mistura estava separada em 3 fases: a mais inferior rosa, a fase intermediária de fenol-clorofórmio e a superior, aquosa. O volume da fase aquosa é constituído por, aproximadamente, 60% do volume do Trizol usado para o homogenato.

4.5.3. Precipitação do RNA:

Transferimos a fase aquosa para um novo tubo. Colocamos 0,5 mL de álcool isopropílico para cada 1 mL de Trizol. Incubamos as amostras a 15 – 30°C durante 10 minutos e centrifugamos a 12000 x g durante 10 minutos a 2 – 8°C. Formou-se um *pellet* no fundo do tubo, o qual era o precipitado de RNA.

4.5.4. Lavagem do RNA:

Removemos o sobrenadante. Lavamos o *pellet* de RNA com 1mL de etanol 75% por 1 mL de Trizol. Misturamos as amostras com vortex e centrifugamos durante 5 minutos a 7500xg a 2 – 8 °C.

4.5.5. Redissolvendo o RNA:

No final do procedimento, retiramos o sobrenadante por inversão do tubo e secamos com cotonete autoclavado as paredes do tubo, sem perturbar o *pellet*. Dissolvemos o RNA com 10 μ L de água livre de RNase, passando-se a solução várias vezes pela ponteira de uma micropipeta. Incubamos as amostras durante 10 minutos entre 55 e 60°C. Deixamos as amostras com uma razão $A_{260/280}$ de 1,6 e confeccionamos um gel de agarose para verificarmos a qualidade do RNA total pelas bandas de rRNA 18S e 28S.

4.6 RT-PCR quantitativo em tempo real (Real-Time PCR):

O RNA total foi obtido utilizando o reagente Trizol (Life Technologies, Inc.), conforme descrito anteriormente. Após, 50µg de RNA total foi tratado com Dnase com a pureza e integridade das amostras sendo avaliadas pela relação da Densidade ótica 260/280 e pelo gel analítico de agarose. Ao final do processo cerca de 30-40µg de RNA total foi recuperada.

Os primers e as sondas utilizados foram obtidos a partir de ensaios testados fornecidos pela empresa AppliedBiosystems (Inventoried assays N: 4331182). Para confirmar a precisão, os primers e sondas foram redesenhados utilizando o programa "primer 3" localizado no sítio <http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3> www.cgi. Para verificar se não havia anelamento nas seqüências entre primers e sondas ou dentro de cada primer e cada sonda foi utilizado o programa do sítio <http://www.operon.com/oligos/toolkit.php>. Cada conjunto de primer e sonda foi desenhado para amplificar um fragmento que esteja localizado em regiões entre exons para evitar qualquer amplificação de um possível DNA genômico contaminante. As seqüências são apresentadas conforme segue:

Tabela 2: Primers utilizados para os experimentos de expressão gênica.

Gene de interesse	Primer	Tamanho do transcrito
TGFA – sense	5' CCACACTCAGTTCTGCTTCC 3'	95 Pb
Antisense	5' AGCGTGCACCAACGTACC 3'	
Sonda	5' AAGCCAGCATGTGTCTGCCATTCTG 3'	
TGFB1 – sense	5' CGCGTGCTAATGGTGGAA 3'	63 Pb
Antisense	5' TGCTGTGTGTACTCTGCTTGA 3'	
Sonda	5' ACCCACAACGAAATCTATGACAAGT 3'	
PGR – sense	5' GCGAGAGGCAACTTCTTTCA 3'	118 Pb
Antisense	5' AACACCATTAAGCTCATCCAAGA 3'	
Sonda	5' AAATCATTGCCAGGTTTTCGAAACT 3'	
TNFRSF9 - sense	5' GATCAGAAACGTGGCATCTG 3'	67 Pb
Antisense	5' TTCACAAGCACAGACTTTCCA 3'	
Sonda	5' TCGACCCTGGACAACTGTTCTTTG 3'	
BMP6 – sense	5' TTCCGCATCTACAAGGACTG 3'	196 Pb
Antisense	5' ACTACACGGGTGTCCAACAA 3'	
Sonda	5' CATCAGCACAGAGACTCTGACCTGT 3'	
THRA – sense	5' GGCAACTGGTTATCACTACCG 3'	89 Pb
Antisense	5' AGGTGGGATGGAGGTTCTTC 3'	
Sonda	5' GTGAGGGCTGCAAGGGCTTCTTTTCG 3'	
GAPDH - sense *	5' CAGACACCATGGGGAAGGT 3'	122 Pb
Antisense	5' AATGAAGGGGTCATTGATGG 3'	
Sonda	5' TTGGGCGCCTGGTCACCAGGGCTGC 3'	
Ciclofilina – sense *	5' GAGGCAGAAGACCACCTGAG 3'	271 Pb
Antisense	5' TCACTGCAGACTGACCCAAC 3'	
Sonda	5' CCTAGCTGATCTGGAGGCTG 3'	

*(Controle Interno da RT-PCR)

As sondas utilizadas para os genes alvo estavam marcadas com FAM (Applied Biosystems nº 4326317E). As reações de RealTime PCR foram realizadas em um ABI 7000HT Fast Real-Time PCR System em placas ópticas de "96-well" e cobertas com um adesivo óptico.

Para cada reação foram adicionados 2µL de cDNA, 1,5µL de solução contendo primers e sonda, 12,5µL de solução TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems N: 4304437) complementada com 9,25µL de água deionizada estéril autoclavada para completar 25µL de volume final.

Cada reação foi realizada em triplicata e o controle interno da reação foi quantificado sempre na mesma placa para cada amostra, evitando assim possíveis variações entre reações de placas diferentes. A curva foi padronizada conforme o ciclo em que a amplificação das amostras apresentou a melhor eficiência (fase exponencial) e, a partir dos valores das triplicatas, foram utilizados, no mínimo, dois valores com diferença menor que um ciclo entre as curvas para o cálculo da média do ciclo de amplificação exponencial (Ct) (quando os três valores eram menor que um ciclo, todos foram utilizados). Este procedimento foi realizado para o grupo tratado e o grupo controle com o gene de interesse e o controle interno e o cálculo de expressão relativa foi realizado utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4.7 Extração de DNA total e PCR

O DNA total dos tecidos foi extraído usando-se o método de extração fenólica. O DNA foi quantificado e a integridade do material isolado foi determinada por análise eletroforética em géis de agarose. Realizamos a reação de polimerase em cadeia (PCR) de todos os exons (6-9) do receptor de hormônio tireoidiano alpha (THRA) e exons (6-10) do receptor de hormônio tireoidiano beta (THRB) utilizando "primers" intrônicos.

Isolamento do DNA total (Maniatis et al., 1989):

Após cirurgia, o tecido fresco foi colocado em tubo falcon de 50ml e imediatamente colocado em gelo. Utilizando estilete esterilizado, uma amostra de aproximadamente 200mg a 1g foi retirada e congelada em freezer à -80°C até a utilização para a extração do DNA.

O "gral" e o pistilo foram congelados previamente à extração. O tecido congelado foi retirado do freezer e colocado no "gral" para a trituração, nitrogênio líquido era regularmente adicionado ao "gral" com o tecido durante a pulverização para impedir que o mesmo descongelasse. Após a trituração completa, foi adicionado 10ml de tampão de lise ao "gral" com o tecido e foi transferido para um tubo falcon de 50ml onde se adicionou 100µl de Proteinase K, 10µl de SDS 10% e deixado incubar durante toda noite à 37°C.

Na manhã seguinte foram adicionados 50µl de Proteinase K e deixada a digestão das proteínas ocorrer em mais 2 horas a 37°C. Enquanto a digestão ocorria, a solução de ANE 5x foi aquecida à 37°C. Após a digestão foram adicionados 2ml de ANE 5x, 10ml de Fenol-Clorofórmio-Alcool Isoamílico (25:24:1) e agitado no vortex para misturar. A mistura foi levada então para a centrifuga previamente refrigerada a 4°C e centrifugada por 20 minutos a 5000rpm. Após

centrifugação, o sobrenadante foi removido com pipeta "Pasteur" e colocado em um novo tubo falcon de 50ml.

A sequência de etapas seguintes à adição do Fenol-Clorofórmio-Alcool Isoamílico (25:24:1) foram repetidas até que a fase fenólica (inferior) da mistura estivesse quase transparente. Adicionou-se 10ml de Clorofórmio-Alcool Isoamílico (24:1) e agitou-se o tubo por inversão levando-o seguidamente a ser centrifugado durante 20 minutos a 5000rpm a 4°C. Após centrifugação foi removida a fase superior com pipeta Pasteur e colocada em um novo tubo falcon de 50ml. Adicionou-se 1ml de NaCl 4M e 20ml de Etanol absoluto previamente refrigerado a 4°C. Deixou-se a precipitação ocorrer durante toda noite à -20°C.

Na manhã seguinte a mistura foi centrifugada a 5000rpm, 4°C e, após centrifugação já se podia observar o "pellet" de DNA no fundo do tubo. Removeu-se o sobrenadante cuidadosamente e o "pellet" ficou secando durante 2 horas. Utilizou-se 200µ de H2O deionizada autoclavada para ressuspender o DNA e transferi-lo para tubos de 1,5ml.

Quantificação do DNA extraído

Da solução-mãe (200 µL de H2O deionizada autoclavada + DNA extraído), tomou-se 1µL e adicionou-se mais 70µL de H2O Milli Q (diluição de 1:70). As leituras foram realizadas num espectrofotômetro (modelo 80-2103-98 da Pharmacia Biotec) em A260 (concentração de DNA) e A280 (concentração de proteínas). Os valores obtidos foram aplicados à seguinte equação:

$$[\text{DNA}] \text{ ng}/\mu\text{L} = \frac{(\text{A}260) \cdot 50 \cdot 70}{1000}$$

A concentração de DNA foi determinada por leitura espectrofotométrica a 260 nm. Esta leitura nos permitiu o cálculo da concentração de ácido nucléico da

amostra. Uma unidade de densidade ótica (D.O.) corresponde a aproximadamente 40 µg/ml de DNA de fita simples e a relação entre as leituras a 260nm e 280nm (D.O. 260/D.O. 280) permite estimar a pureza do ácido nucléico. Esta relação, para uma preparação pura de DNA, deve ficar entre 1,8 e 2,0.

Amplificação do DNA (PCR)

A PCR (Polymerase Chain Reaction) foi realizada em tubos Eppendorf de 0,5 mL em volumes totais de 25 µL de solução "Mix" contendo 11,5 µl de água deionizada, 10 pM de cada primer (1,0 µL de cada primer a 10 pM/µL), PCR buffer 10x (2,5 µL para cada tubo), 1,5 µl de desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTP - 10mM), 7,5 µl de MgCl₂ a 50 mM. A solução da PCR foi preparada colocando-se um reagente por vez em um tubo Eppendorf de 1,5 mL.

Todo o procedimento de preparação da solução foi realizado em local apropriado para que fosse minimizado o risco de contaminação. Depois de preparada, foi adicionado "Was Bead", para otimizar a reação e a solução "Mix" foi centrifugada por 5 segundos.

A solução "Mix" foi dividida em tubos Eppendorf de 0,5 mL (um para cada amostra) de forma que em cada tubo contivesse 25,0 µL. Os tubos foram colocados no termociclador, onde se empregou os seguintes parâmetros : 80°C por cinco minutos e 25°C por 3 minutos seguido de resfriamento para 4°C. Os tubos foram retirados e a cada tubo adicionou-se PCR buffer 10x (10 µL para cada tubo), 1,0 µl de DNA - 500 ng, 63,5 µl de água deionizada, 2,5 unidades da enzima de restrição Taq Polimerase. As soluções foram centrifugadas por 5 segundos e colocadas no termociclador onde se empregou os seguintes parâmetros: 94°C por três minutos, 53°C por quarenta e cinco segundos, 72°C por quarenta e cinco segundos para o primeiro ciclo; 35 ciclos de: (a) quarenta e cinco segundos a 94°C (desnaturação), (b) quarenta e cinco segundos a 53°C (anelamento de primers), (c) quarenta e cinco segundos a 72°C (extensão da cadeia). Após o 35º ciclo as amostras

passaram por mais um ciclo de 94°C por quarenta e cinco segundos e 53°C por quarenta e cinco segundos, e foram incubadas por 3 minutos a 72°C para extensão da cadeia de DNA, seguido de resfriamento para 4°C. Quando os ciclos foram concluídos, os tubos foram retirados e congelados.

Eletroforese para verificação do DNA amplificado

A corrida de eletroforese foi realizada em gel de agarose 1%. A quantidade de gel preparada e determinada pelo tamanho da cuba de eletroforese.

Dissolveu-se 0,5g de agarose em 1ml de tampão TAE 50x com 49ml de Água Milli Q autoclavada esquentando-se a solução em forno de microondas. Adicionou-se o brometo de etídio ao gel de agarose 1%. O gel foi colocado em forma apropriada previamente nivelada e já com o pente encaixado. Esperou-se até que estivesse solidificado.

As amostras foram então aplicadas (com auxílio de uma micropipeta). A fonte de eletroforese foi ligada, adequando-se para 60V e 80mA. Finalizada a corrida, procedeu-se à leitura em transluminador UV e registro fotográfico no software da UVP LabWorks versão 3.0.02.00 para windows 95/NT.

Tabela 3: Primers utilizados para os receptores de hormônio tireoidiano (THRA e THRB) utilizados na reação de PCR.

Nome (Exon)	Seqüência do primer	Ta	Tamanho produto de PCR (pb)
THRA E 6s	CCAATACAAGGTCAGCCGTT	60°C	693
THRA E 6a	GAGAACAAAGTGGGGAGTGG	62°C	
THRA E 7s	TCCCTGTGCTTCTCCTGTCC	62°C	434
THRA E 7a	CCTGAGGCTTTAGACTTCCT	60°C	
THRA E 8s	CCAGAGGCTCATCTTGGAAT	60°C	586
THRA E 8a	GGAAGGGAAGGTGGTCTTAC	62°C	
THRA E 9s	GTAAGACCACCTTCCCTTCC	62°C	556
THRA E 9a	TAAGCCGCACCACCTACA	60°C	
THRB E 6s	ATTACTCCGACAGGCAACCC	62°C	746
THRB E 6a	GCCAAAACCTTACAACCCCTC	60°C	
THRB E 7s	TGGGTTGCTGTGTTGGTGGT	62°C	636
THRB E 7a	CCCCTCTTACTGCCGTTTTT	60°C	
THRB E 8s	AGTAGAGAGAGGGTTTTGCC	60°C	478
THRB E 8a	TTCTGGAAGAGGACTGGGAG	62°C	
THRB E 9s	AGTCCTATGGCATCATCAGC	60°C	541
THRB E 9a	AATGGCTCCACCTCCCTTT	62°C	
THRB E 10s	GTCTCATCTTTCTCCCCCTC	62°C	741
THRB E 10a	ACTCCCTCATTCCCATTGCC	62°C	

Ta – Temperatura de anelamento. Para cada exon, a primeira descrição corresponde ao primer sense e a segunda ao anti-sense

4.8 Seqüenciamento

Esta reação é similar a uma reação de PCR, onde uma pequena amostra de DNA é amplificada milhares de vezes *in vitro*, porém, diferentemente desta, apenas um primer é utilizado para síntese de uma das fitas.

Foi adicionado na reação de seqüenciamento, um tampão Save Money, os fragmentos de DNA amplificados, um primer sentido 5'-3' (forward) ou 3'-5' (reverse), e um kit contendo nucleotídeos livres (dntp's), nucleotídeos marcados com fluorescência (ddntp's), e a enzima Taq DNApolimerase.

Identificamos a placa no início do processo, e o volume final da reação de seqüenciamento. As placas precisam passar por um processo de purificação onde são utilizados isopropanol, e etanol, este procedimento permite melhor aproveitamento dos resultados já que elimina restos indesejáveis resultantes do PCR.

Adicionamos 80 µL de Isopropanol 75% em cada well, selamos a placa com adesivo e homogeneizamos por inversão. Deixamos 15 minutos à temperatura ambiente no escuro. Centrifugamos por 45 minutos (4000 rpm a 4º C), descartamos o sobrenadante na pia e invertemos em papel absorvente por alguns minutos. Repetimos duas vezes o seguinte procedimento: adicionar 150 µL de Etanol 70% em cada poço, selar com o mesmo adesivo e centrifugar por 12 minutos (4000 rpm a 4ºC). Descartamos o sobrenadante. Secamos a placa em temperatura ambiente por 1 hora (no escuro).

Ressuspendemos em 2 uL de formamida. Desnaturamos por 5 minutos a 95ºC no termociclador. Colocamos em gelo por 2 minutos, em seguida aplicamos as amostras no gel.

O seqüenciamento foi mediado pelo uso de softwares onde cada comprimento de onda emitido pelos fluorocromos é captado pelo seqüenciador e processado em um computador. Utilizamos o Seqüenciador Applied Biosystems

modelo 377: seqüenciador baseado em gel vertical de poliacrilamida no qual o carregamento de amostras é feito manualmente.

Esta reação é similar a uma reação de PCR, onde uma pequena amostra de DNA é amplificada milhares de vezes *in vitro*, porém, diferentemente desta, apenas um primer é utilizado para síntese de uma das fitas.

Foi adicionado na reação de sequenciamento, um tampão Save Money, os fragmentos de DNA amplificados, um primer sentido 5'-3' (forward) ou 3'-5' (reverse), e um kit contendo nucleotídeos livres (dntp's), nucleotídeos marcados com fluorescência (ddntp's), e a enzima Taq DNApolimerase.

5.0 RESULTADOS

5.1 Descrição das pacientes

No anexo 1 encontra-se a descrição de cada paciente participante do estudo com dados obtidos de seus respectivos prontuários.

5.2. Avaliação dos fragmentos tumorais e dosagens hormonais:

Dos fragmentos tumorais de cada paciente, que obedeceram aos critérios para inclusão na pesquisa, uma pequena amostra foi levada para análise anatomo-patológica que permitiu diagnosticar a origem tumoral e o estadiamento do mesmo. Ainda foi possível, através de imunohistoquímica, verificar a presença dos receptores de estrógeno e progesterona nestas células. Alguns outros dados foram retirados do prontuário de cada paciente para apurar a caracterização. Estes dados encontram-se sintetizados na Tabela 4.

TABELA 4: Caracterização de 12 pacientes com Ca de mama segundo seu tipo histológico, estadiamento tumoral, menopausada há quantos anos e resultado da Imunohistoquímica do ER e PR.

Nº do caso	Idade	Diagnóstico	Estadiamento	Menopausa (anos)	Imunohistoquímica
01	76	CLI	T(4) N(1) M(0)	34	ER(+); PGR(+)
02	58	CDI	T(2) N(0) M(0)	2	ER(+); PGR(-)
03	60	CDI	T(2) N(0) M(0)	15	ER(-); PGR(-)
04	71	CLI	T(1) N(0) M(0)	20	ER(+); PGR(+)
05	78	CDI	T(2) N(0) M(0)	32	ER(+); PGR(+)
06	72	CDI	T(1) N(2) M(0)	27	ER(+); PGR(+)
07	50	CDI	T(2) N(1) M(0)	2	ER(+); PGR(-)
08	59	CDI	T(2) N(0) M(0)	10	ER(+); PGR(-)
09	76	CDI	T(1) N(0) M(0)	23	ER(+); PGR(+)
10	65	CDI	T(2) N(1) M(0)	15	ER(-); PGR(+)
11	59	CDI	T(2) N(0) M(0)	5	ER(+); PGR(+)
12	76	CDI	T(4) N(0) M(0)	21	ER(+); PGR(-)

CDI = Carcinoma Ductal Invasivo; CLI = Carcinoma Lobular infiltrante.

Antes do início da cirurgia de cada paciente foi obtida alíquota de sangue para análise do perfil hormonal, os dados desta dosagem encontram-se na Tabela 5. Observamos que as pacientes número 01 e 05 apresentavam hipertireoidismo clínico (TSH baixo para um T4L elevado) no momento da coleta.

TABELA 5: Dosagens hormonais realizadas nas pacientes com adenocarcinoma de mama pelo método da quimiluminescência.

Pacientes	TPOAB ⁽¹⁾	TSH ⁽²⁾	T4L ⁽³⁾	E2 ⁽⁴⁾	FSH ⁽⁵⁾	LH ⁽⁶⁾
01	11,5	0,034	3,38	<20,0	91,6	40,9
02	<10,0	3,03	1,48	26,7	65,7	29,8
03	22,3	1,22	1,78	<20,0	84,7	31,0
04	22,9	0,962	1,44	26,8	51,9	27,2
05	<10,0	0,304	1,94	<20,0	32,4	10,9
06	354	5,11	1,26	<20,0	42,4	30,7
07	<10,0	1,85	2,30	26,9	122	56,9
08	23,9	1,83	1,75	26,1	101	39,3
09	13,5	1,34	1,85	28,2	74,8	27,7
10	18,4	0,917	1,85	23,8	31,1	18,1
11	<10,0	4,47	1,39	<20,0	20,0	16,4
12	<10,0	1,60	1,53	<20,0	44,3	12,1

(1) normalidade da dosagem de ANTI-TPO: < 35,00UI/ml = negativo.

(2) normalidade da dosagem de TSH: 0,4 a 4,0 mUI/ml.

(3) normalidade da dosagem de T4L: 0,8 a 1,9 ng/dl.

(4) normalidade da dosagem de E2: pós menopausa = 0 a 30 pg/ml.

(5) normalidade da dosagem de FSH: pós menopausa = 21,7 a 153 mUI/ml.

(6) normalidade da dosagem de LH: pós menopausa = 11,3 a 40,0 mUI/ml

Para maior clareza dos dados, as linhas que representam as pacientes com hipertireoidismo clínico estão representadas em vermelho, hipotireoidismo subclínico em verde e Anti-TPO positivo em azul. A incidência destes casos está sintetizada na Tabela 6.

TABELA 6: Alterações tireoidianas encontradas nas pacientes com carcinoma de mama, menopausadas, do Hospital do Câncer de São Paulo.

Alteração Tireoidiana	Percentagem encontrada
Hipertireoidismo subclínico	16,67%
Hipotireoidismo subclínico	8,33%
ANTI-TPO +	8,33%
Ausência Tireoidopatias	66,67%

5.3 Análise molecular dos fragmentos tumorais:

Cada um dos fragmentos tumorais das pacientes em estudo foram subdivididos em seis conjuntos para cada tratamento e para a cultura controle, conforme descrito anteriormente. Estes fragmentos foram utilizados para a extração de RNA total, que foi quantificado e colocado sob corrida eletroforética em gel de agarose. Os resultados encontram-se no anexo 2.

5.4 Expressão Gênica por RT-PCR em tempo real:

As figuras de 01 a 06 representam a expressão de cada gene nos diversos tratamentos, excluindo desses gráficos as pacientes 01 e 05 por apresentarem status tireoidiano alterado e as pacientes 03 e 10 por não apresentarem positividade para o receptor de estrógeno (Rasmusson, Feldt-Rasmussen *et al.*). As tabelas de 07 a 12 apresentam a expressão gênica obtida por cada paciente relacionando os tratamentos ao controle não tratado padronizado no valor 1 (um). Todas as amostras apresentaram expressão do receptor de hormônio tireoidiano.

Na expressão de TGFA observamos um aumento significativo nos tratamentos com T3, T3+TAM, TAM e E2 não havendo diferença estatística para o controle não tratado no tratamento de E2+TAM. O aumento da expressão por T3 foi estatisticamente maior que os outros (cerca de 15 vezes) e o tratamento com TAM (cerca de 6 vezes) maior que os grupos T3+TAM e E2, que não formaram grupos estatisticamente diferentes.

Tabela 7: Expressão relativa do gene TGFA nas pacientes ER+ para os diferentes tratamentos

Pacientes	Controle	T3	TT	TAM	E2	ET
2	1	12,08	3,19	5,34	2,63	1,66
4	1	16,59	3,72	6,47	2,91	1,90
6	1	13,11	3,39	5,25	2,54	2,15
7	1	15,39	2,18	4,76	1,92	2,28
8	1	14,91	1,16	6,23	1,76	1,09
9	1	5,72	2,17	2,85	6,78	1,32
11	1	13,60	3,46	5,30	2,54	2,27
12	1	18,13	3,53	6,58	1,65	1,31

Média dos valores obtidos de expressão gênica de TGFA das pacientes ER+. Todos os valores são relativos ao controle que foi padronizado numericamente a 1 (um). T3: triiodotironina; TT: triiodotironina associado ao tamoxifen; TAM: tamoxifen; E2: estrógeno; ET: estrógeno associado ao tamoxifen.

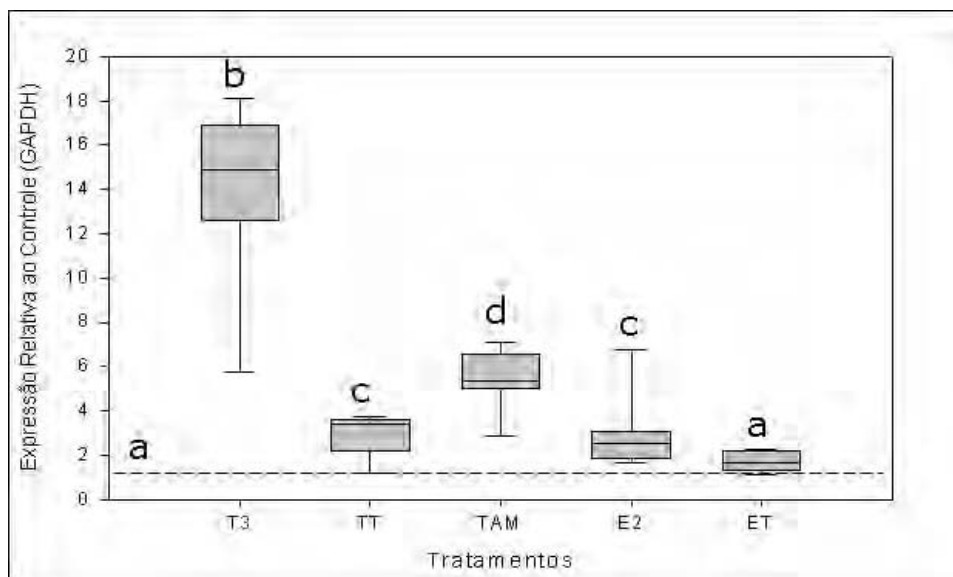


Fig 01. “box plot” da expressão gênica de TGFA relativa aos controles (GAPDH e Ciclofilina). A linha tracejada representa a normalização da cultura controle no valor adimensional 1 (letra a), as demais letras significam diferença estatística entre os grupos para um nível de significância de 5%.

Na expressão de TGFB1 observamos uma diminuição nos tratamentos com T3+TAM e E2 e um aumento da expressão no tratamento por E2+TAM, não havendo diferença estatística para o controle não tratado nos tratamentos por T3 e TAM. A diminuição da expressão por T3+TAM e por E2 não diferenciou esses grupos sendo estatisticamente semelhantes.

Tabela 8: Expressão relativa do gene TGFB1 nas pacientes ER+ para os diferentes tratamentos

Pacientes	Controle	T3	TT	TAM	E2	ET
2	1	0,99	0,60	0,72	0,44	1,70
4	1	1,20	0,63	0,84	0,48	1,57
6	1	0,95	0,57	0,68	0,41	1,78
7	1	0,56	0,94	1,59	0,73	1,96
8	1	2,08	0,22	0,85	0,58	1,13
9	1	0,25	0,45	0,59	0,23	0,25
11	1	0,90	0,55	0,64	0,39	1,87
12	1	9,16	3,76	11,80	5,51	4,52

Média dos valores obtidos de expressão gênica de TGFB1 das pacientes ER+. Todos os valores são relativos ao controle que foi padronizado numericamente a 1 (um). T3: triiodotironina; TT: triiodotironina associado ao tamoxifen; TAM: tamoxifen; E2: estrógeno; ET: estrógeno associado ao tamoxifen.

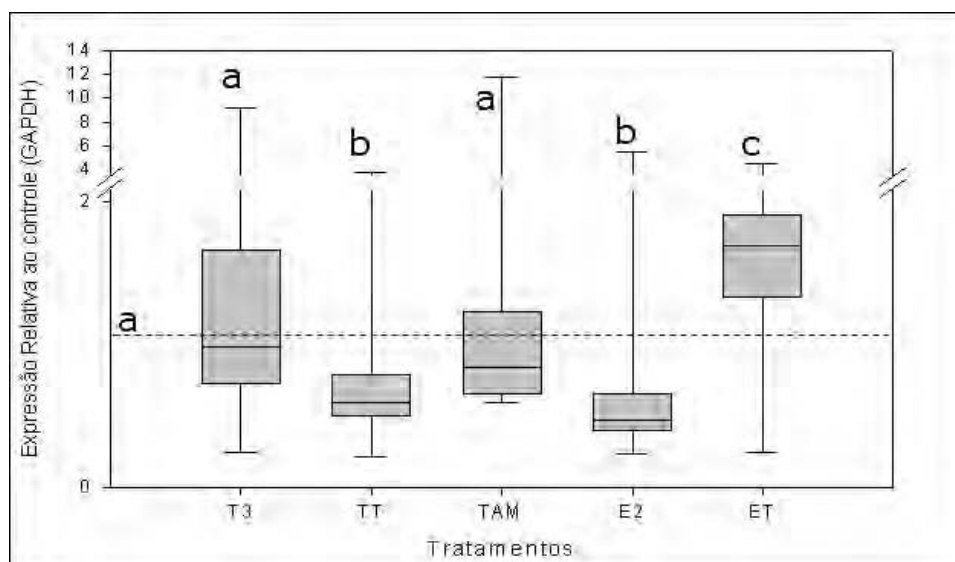


Fig 02. “box plot” da expressão gênica de TGFB1 relativa aos controles (GAPDH e Ciclofilina). A linha tracejada representa a normalização da cultura controle no valor adimensional 1 (letra a), as demais letras significam diferença estatística entre os grupos para um nível de significância de 5%.

Na expressão de PGR observamos um aumento significativo nos tratamentos com T3, T3+TAM, TAM e E2 não havendo diferença estatística para o controle não tratado no tratamento de E2+TAM. O aumento da expressão por T3, T3+TAM e TAM formou um grupo estatisticamente semelhante e o aumento por E2 foi maior que esses outros grupos.

Tabela 9: Expressão relativa do gene PGR nas pacientes ER+ para os diferentes tratamentos

Pacientes	Controle	T3	TT	TAM	E2	ET
2	1	1,97	2,39	3,86	8,65	1,09
4	1	2,57	2,88	5,36	12,49	0,99
6	1	2,87	2,95	3,55	5,81	0,91
7	1	1,56	1,19	1,05	2,23	1,00
8	1	2,46	1,80	0,85	2,84	0,74
9	1	0,99	3,52	2,82	8,47	6,93
11	1	2,01	2,64	4,40	11,44	1,16
12	1	6,87	4,74	3,17	10,64	1,31

Média dos valores obtidos de expressão gênica de PGR das pacientes ER+. Todos os valores são relativos ao controle que foi padronizado numericamente a 1 (um). T3: triiodotironina; TT: triiodotironina associado ao tamoxifen; TAM: tamoxifen; E2: estrógeno; ET: estrógeno associado ao tamoxifen.

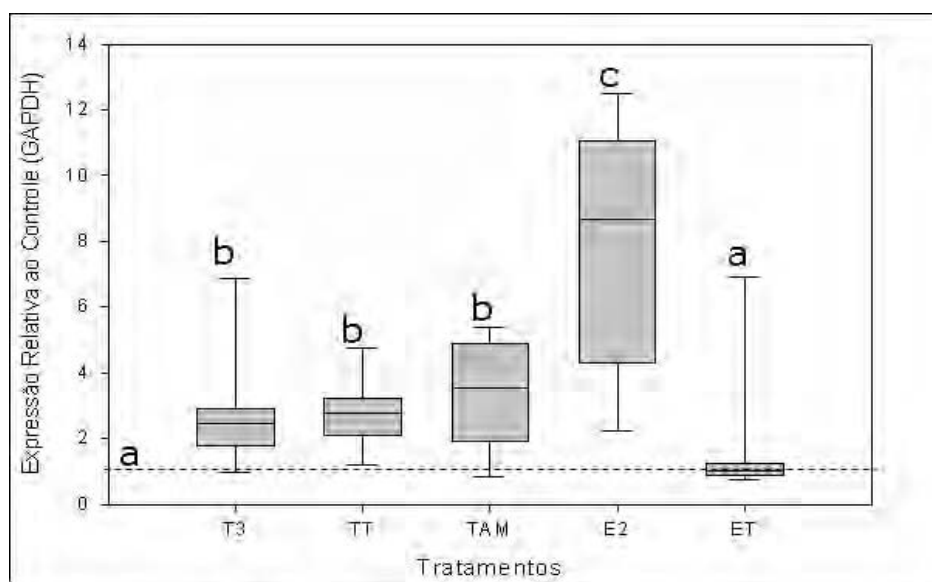


Fig 03. “box plot” da expressão gênica de PGR relativa aos controles (GAPDH e Ciclofilina). A linha tracejada representa a normalização da cultura controle no valor adimensional 1 (letra a), as demais letras significam diferença estatística entre os grupos para um nível de significância de 5%.

Na expressão de THRA observamos um aumento significativo nos tratamentos com T3, TAM e ET não havendo diferença estatística para o controle não tratado nos tratamentos por T3+TAM e E2. O aumento da expressão por T3 foi estatisticamente maior que dos outros grupos mas não houve diferença estatística quando comparados os tratamentos por TAM e E2+TAM entre si.

Tabela 10: Expressão relativa do gene THRA nas pacientes ER+ para os diferentes tratamentos

Pacientes	Controle	T3	TT	TAM	E2	ET
2	1	1,12	0,82	1,93	0,91	1,92
4	1	6,08	0,91	2,46	1,05	1,85
6	1	4,80	0,83	1,99	0,92	2,09
7	1	0,66	0,84	1,34	3,13	2,79
8	1	5,69	1,52	6,64	1,68	3,64
9	1	5,93	0,97	2,10	0,98	1,50
11	1	4,81	0,81	1,94	0,89	2,21
12	1	19,43	3,56	4,49	0,85	2,07

Média dos valores obtidos de expressão gênica de THRA das pacientes ER+. Todos os valores são relativos ao controle que foi padronizado numericamente a 1 (um). T3: triiodotironina; TT: triiodotironina associado ao tamoxifen; TAM: tamoxifen; E2: estrógeno; ET: estrógeno associado ao tamoxifen.

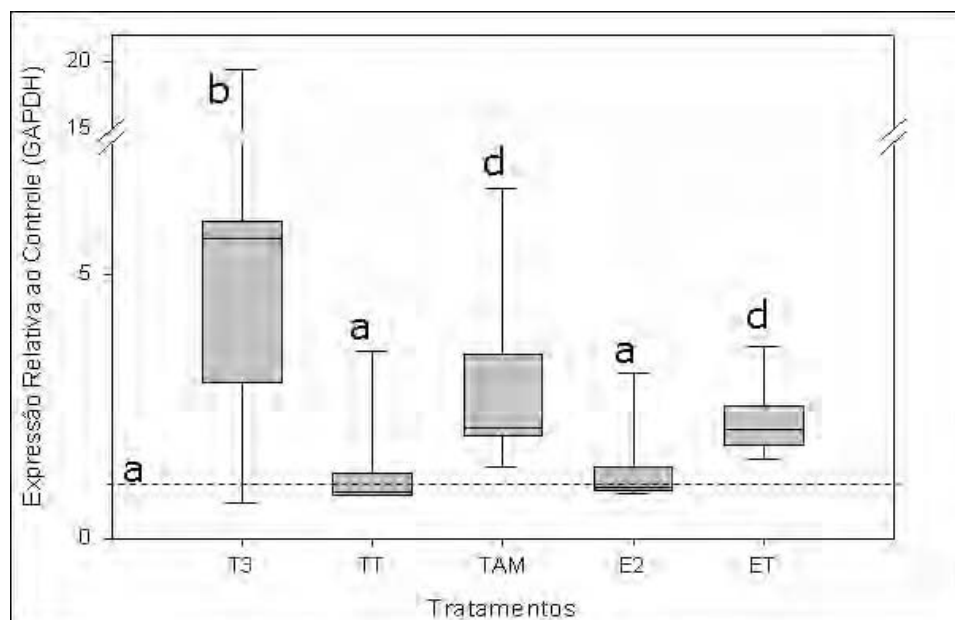


Fig 04. “box plot” da expressão gênica de THRA relativa aos controles (GAPDH e Ciclofilina). A linha tracejada representa a normalização da cultura controle no valor adimensional 1 (letra a), as demais letras significam diferença estatística entre os grupos para um nível de significância de 5%.

Na expressão de TNFRSF9 observamos um aumento significativo nos tratamentos com T3, T3+TAM e TAM não havendo diferença estatística para o controle não tratado nos tratamentos por E2 e E2+TAM. O aumento da expressão por T3 foi estatisticamente maior que os outros e os tratamentos com T3+TAM e TAM não apresentaram diferença estatística entre si.

Tabela 11: Expressão relativa do gene TNFRSF9 nas pacientes ER+ para os diferentes tratamentos

Pacientes	Controle	T3	TT	TAM	E2	ET
2	1	10,26	3,85	2,82	1,35	1,19
4	1	16,00	4,77	4,03	1,69	1,01
6	1	16,69	4,80	4,38	1,82	0,93
7	1	17,12	3,89	3,01	1,23	0,94
8	1	22,28	1,48	7,30	1,09	0,84
9	1	19,35	5,38	4,59	1,79	0,99
11	1	13,37	4,46	3,27	1,45	1,17
12	1	28,78	4,47	1,15	0,17	0,06

Média dos valores obtidos de expressão gênica de TNFRSF9 das pacientes ER+. Todos os valores são relativos ao controle que foi padronizado numericamente a 1 (um). T3: triiodotironina; TT: triiodotironina associado ao tamoxifen; TAM: tamoxifen; E2: estrógeno; ET: estrógeno associado ao tamoxifen.

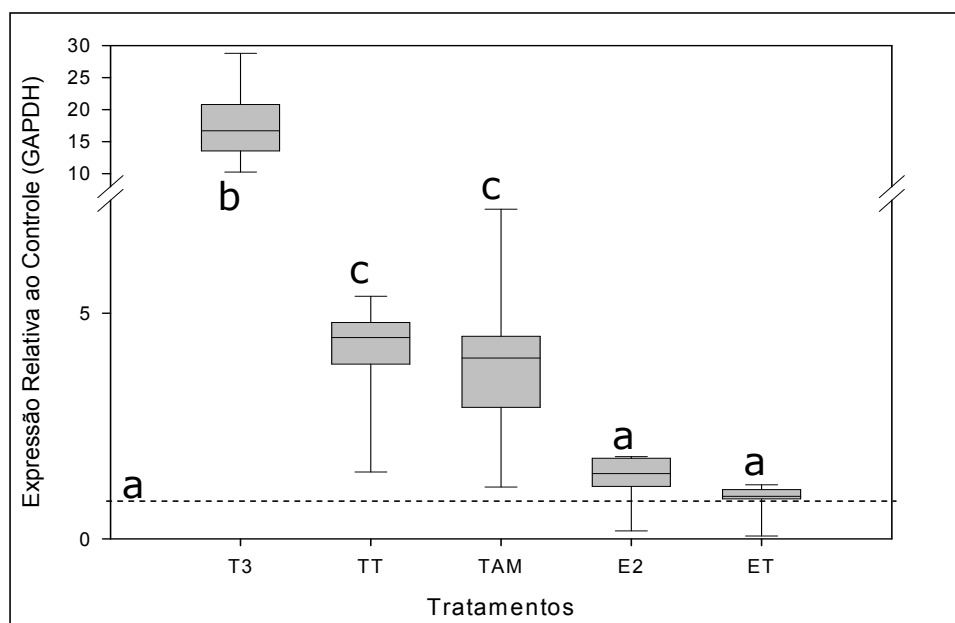


Fig 05. “box plot” da expressão gênica de TNFRSF9 relativa aos controles (GAPDH e Ciclofilina). A linha tracejada representa a normalização da cultura controle no valor adimensional 1 (letra a), as demais letras significam diferença estatística entre os grupos para um nível de significância de 5%.

Na expressão de TGFA observamos um aumento significativo nos tratamentos com T3, T3+TAM, TAM e E2 não havendo diferença estatística para o controle não tratado no tratamento de E2+TAM. O aumento da expressão por T3 foi estatisticamente maior que os outros (cerca de 15 vezes) e o tratamento com TAM (cerca de 6 vezes) maior que os grupos T3+TAM e E2, que não formaram grupos estatisticamente diferentes.

Tabela 12: Expressão relativa do gene BMP6 nas pacientes ER+ para os diferentes tratamentos

Pacientes	Controle	T3	TT	TAM	E2	ET
2	1	0,31	0,57	0,47	0,67	0,65
4	1	0,44	0,67	0,66	0,84	0,52
6	1	0,53	0,72	0,77	0,93	0,50
7	1	0,35	0,65	0,97	0,43	1,01
8	1	1,65	0,32	1,72	0,36	0,39
9	1	0,74	0,87	1,06	3,93	2,98
11	1	0,33	0,58	0,50	0,70	0,60
12	1	0,46	0,66	0,37	0,51	0,85

Média dos valores obtidos de expressão gênica de BMP6 das pacientes ER+. Todos os valores são relativos ao controle que foi padronizado numericamente a 1 (um). T3: triiodotironina; TT: triiodotironina associado ao tamoxifen; TAM: tamoxifen; E2: estrógeno; ET: estrógeno associado ao tamoxifen.

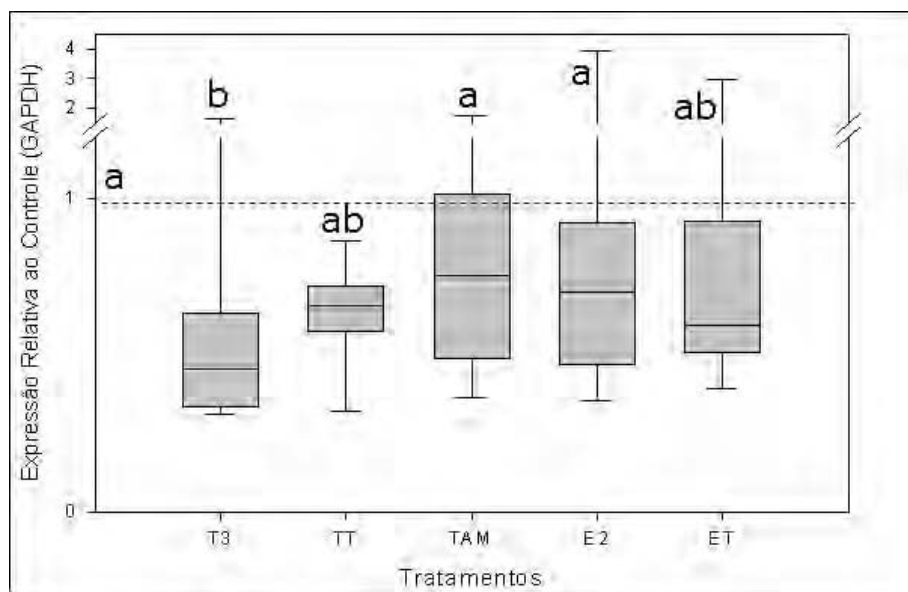


Fig 06. “box plot” da expressão gênica de BMP6 relativa aos controles (GAPDH e Ciclofilina). A linha tracejada representa a normalização da cultura controle no valor adimensional 1 (letra a), as demais letras significam diferença estatística entre os grupos para um nível de significância de 5%.

Portanto, nas pacientes ER+ o tratamento com T3 aumentou significativamente a expressão dos genes TGFA, THRA, TNFRSF9 e PGR e diminuiu a expressão de TGFB1 e BMP6. Ao comparar o tratamento com E2 ao controle observamos aumento da expressão de TGFA e PGR com diminuição da expressão de TGFB1 e sem ação na expressão do THRA, BMP6 e TNFRSF9. Embora o número de amostras fosse insuficiente para essa avaliação, nas pacientes ER- não observamos as alterações de expressão encontradas nas pacientes ER+.

5.5 Extração de DNA e PCR

Os fragmentos tumorais, incluídos no estudo, passaram pela extração de DNA concomitante à extração de RNA por solução monofásica de guanidina isotiocianato e fenol (Chomczynski e Sacchi, 1987). A quantificação em espectrofotômetro de cada amostra, os géis de agarose para confirmar a presença de ácido nucléico e o sequenciamento encontram-se no anexo 3:

Não foram encontradas mutações em nenhum dos exons estudados para os receptores de hormônio tireoideo alpha e beta.

6.0 DISCUSSÃO

É estabelecida a relação de hormônios tireoidianos (Vonderhaar e Greco, 1979), insulina e fatores de crescimento semelhantes à insulina (Stewart, Johnson *et al.*, 1990) ao regular o crescimento das células epiteliais mamárias. No entanto, evidências considerando a relação entre doenças tireoidianas e risco de câncer de mama são controversas. Um dos primeiros trabalhos que mostrou a associação de CaM com doenças tireoidianas foi o de Beatson (1896), o qual utilizou ooforectomia e extrato tireoidiano como tratamento para a doença. Desde então, numerosos trabalhos foram realizados na área e, entre eles, alguns não encontraram relação significativa entre doença tireoidiana (Kalache, Vessey *et al.*, 1982) ou tratamento dessas doenças (Weiss, Brinton *et al.*, 1999) e o risco de câncer mamário, enquanto outros mostraram a relação desta doença com o hipertireoidismo (Moossa, Evans *et al.*, 1973; Lemaire e Baugnet-Mahieu, 1986; Goldman, 1990; Saraiva, Figueiredo *et al.*, 2005); com o hipotireoidismo (Mittra e Hayward, 1974; Rose e Davis, 1978; Adamopoulos, Vassilaros *et al.*, 1986); com o bócio atóxico (Giani, Fierabracci *et al.*, 1996; Smyth, Smith *et al.*, 1996; Turken, Narin *et al.*, 2003); com a doença auto-imune da tireóide (Ito e Maruchi, 1975; Adamopoulos, Vassilaros *et al.*, 1986; Rasmusson, Feldt-Rasmussen *et al.*, 1987; Giani, Fierabracci *et al.*, 1996; Smyth, Shering *et al.*, 1998; Turken, Narin *et al.*, 2003); com a suplementação tireoidiana (Kapdi e Wolfe, 1976; Mustacchi e Greenspan, 1977).

Rose e Davis (Rose e Davis, 1978) observaram, em mulheres na pós-menopausa, um aumento na incidência de hipotireoidismo (incidência de 15%) em mulheres com carcinoma mamário em relação a mulheres com outros tipos de cânceres (1%) e controles normais (Hull, Clark *et al.*). Esses dados são corroborados por outros autores em mulheres com o adenocarcinoma, independente de seu *status* em relação ao estradiol (Mittra e Hayward, 1974; Perry, Goldie *et al.*, 1978; Rose, 1978; Rose e Davis, 1978; Adamopoulos,

Vassilaros *et al.*, 1986). Porém, alguns estudos não mostram esta relação entre hipotireodismo e CaM (Sicher e Waterhouse, 1967; Hedley, Jones *et al.*, 1981; Smyth, Smith *et al.*, 1996).

Quanto à presença de doença auto-imune da tireóide, representada pelo Anti-Tireoperoxidase (TPO) positivo, Giani *et al* (Giani, Fierabracci *et al.*, 1996) observaram 23,5% de positividade nas pacientes com CaM, enquanto as controles normais tiveram uma positividade de apenas 8%. Achados semelhantes foram publicados por outros autores (Rasmusson, Feldt-Rasmussen *et al.*, 1987; Smyth, Shering *et al.*, 1998; Turken, Narin *et al.*, 2003). Assim como na questão da autoimunidade, também a presença de bócio atóxico é muito freqüente nessas pacientes. Alguns trabalhos mostram um aumento significativo do volume tireodiano nas pacientes com essa doença (Smyth, Shering *et al.*, 1998; Turken, Narin *et al.*, 2003).

Kapdi & Wolfe (Kapdi e Wolfe, 1976) observaram que a incidência de CaM em pacientes recebendo reposição de HT foi de 12,13%, enquanto no grupo controle de pacientes normais foi de 6,2%. Essa taxa de incidência variou conforme o tempo de reposição de HT, ou seja, foi de 10%; 9,42% e 19,48% nas pacientes recebendo suplementação por 1 a 5 anos, 5 a 15 anos e por mais de 15 anos respectivamente, sugerindo que o maior tempo de reposição hormonal aumenta o risco de desenvolver essa doença. Além disso, a incidência nas mulheres nulíparas recebendo HT foi de 33%, enquanto nas nulíparas sem HT foi de 9,25%. Já Mustacchi & Greenspan (Mustacchi e Greenspan, 1977) não encontraram nenhuma relação entre o uso ou o tempo de uso de extrato tireoidiano e a incidência de CaM. Além disso, Brinton *et al* (Brinton, Hoffman *et al.*, 1984) encontraram um efeito protetor ao CaM em pacientes portadoras de bócio não tratado.

Se, por um lado, observações clínicas (Thomas, Bulbrook *et al.*, 1983; Adamopoulos, Vassilaros *et al.*, 1986; Rasmusson, Feldt-Rasmussen *et al.*, 1987; Vorherr, 1987) reforçam uma relação entre disfunção da glândula tireóide com a

presença de CaM, os estudos são contraditórios no que se refere ao tipo de disfunção tireoidiana e como essa influência pode ocorrer. Em nosso trabalho houve uma prevalência de 33,33% de doenças tireoidianas nas pacientes portadoras de carcinoma de mama, sendo o hipertireoidismo clínico a condição mais freqüente.

Embora o número de pacientes seja um fator limitante para avaliar tal relação observa-se que, mesmo em um grupo pequeno de indivíduos, há uma prevalência de altos níveis de hormônio tireoidiano circulante na ausência de estrógeno, sugerindo que a presença daquele hormônio possa levar aos efeitos estimulatórios deste no adenocarcinoma de mama (Takatani, Okumoto *et al.*, 1989).

Tanto o estrógeno como a triiodotironina exercem efeitos em culturas celulares levando ao aumento ou diminuição da expressão de vários genes que podem estar relacionados à progressão tumoral. Alguns desses genes já foram estudados e possuem um padrão de expressão conhecido em alguns tipos tumorais.

A literatura revela influência do estrógeno na expressão gênica do PGR, TGFA e de TGFB1 (Nogueira e Brentani, 1996). Em nosso trabalho, observamos os mesmos comportamentos de expressão evidenciados em linhagens celulares de tumores mamários tratadas com estrógeno, e uma atenuação desses comportamentos com a adição do antagonista parcial Tamoxifen. Comparando-se os mesmos efeitos com aqueles gerados pelo tratamento por T3 encontramos os mesmos aumentos de expressão gerados pelo E2 em TGFA e PGR.

Uma possível explicação para um comportamento de expressão alterada na via de sinalização por T3 poderia ocorrer caso os seus receptores apresentassem mutações, provocando uma expressão que, eventualmente, poderia mimetizar os efeitos gerados pelo E2. Para descartar essa hipótese foi realizado o sequenciamento dos receptores de hormônio tireoidianos de todas as pacientes

aqui estudadas e não foi encontrada qualquer tipo de mutação que alterasse sua função.

O TGFA (transforming growth factor – alpha) é um hormônio peptídico de 6kDa composto de 50 aminoácidos, o primeiro a ser isolado de meio condicionado de células transformadas por retro-vírus e subsequentemente foi identificado em meio condicionado de linhagens celulares de câncer de mama (Derynck, 1986; Bates, Davidson *et al.*, 1988). O TGFA maduro é produzido após clivagem do domínio intracelular da proteína transmembrana TGFA, uma proteína de 160 aminoácidos. TGFA é um potente mitógeno (Marquardt, Hunkapiller *et al.*, 1984; Macias, Perez *et al.*, 1987), possui homologia estrutural com EGF, e como EGF é um ligante de EGFR e interage com EGFR (Macias, Perez *et al.*, 1987), a ligação do TGFA ao EGFR resulta em várias respostas que são similares àsquelas observadas pelo estímulo do receptor por EGF (Derynck, 1986; Brachmann, Lindquist *et al.*, 1989).

TGFA foi detectado tanto em adenocarcinomas de mama como em lesões benignas da mama, embora os níveis de TGFA tendem a ser maiores nas neoplasias malignas (Perroteau, Salomon *et al.*, 1986). Mais de 70% dos cânceres de mama analisados em linhagens celulares de mama também possuem níveis detectáveis de mRNA para TGFA (Perroteau, Salomon *et al.*, 1986). Este fator de crescimento é sintetizado e secretado em células de câncer de mama estrógeno-dependentes quando tratadas com estradiol (Bates, Davidson *et al.*, 1988). Em amostras de câncer de mama humano, a correlação entre receptor de hormônio esteróide e expressão do mRNA de TGFA é conflitante (Perroteau, Salomon *et al.*, 1986; Bates, Davidson *et al.*, 1988). Nossos resultados evidenciaram aumento na expressão deste gene nas pacientes ER+.

Alguns estudos foram realizados para determinar como TGFA se relaciona com a transformação celular. O crescimento independente de ancoragem é uma característica do fenótipo transformado que é bloqueada em linhagens celulares de

câncer de mama quando elas são tratadas com anticorpos contra TGFA (Bates, Davidson *et al.*, 1988). Estudos mostram também que super-expressão de TGFA em cultura de células resultou em alguns aspectos da transformação celular (Rosenthal, Lindquist *et al.*, 1986). Quando TGFA está expresso na glândula mamária de ratos transgênicos podemos observar hiperplasia e neoplasia mamária (Matsui, Halter *et al.*, 1990). Dessa forma, TGFA possui implicações na proliferação celular e parece ter um papel na estimulação autócrina de células de tumor mamário. Assim como foi observado em experimentos com linhagens celulares (Nogueira e Brentani, 1996), nós encontramos um aumento significativo da expressão de TGFA nos tratamentos com E2 e com T3, atenuado na presença dos hormônios com TAM. Esses resultados mostram que o TAM pode inibir a expressão gênica mediada pelo E2 como já foi provado por nosso grupo, mas também mostram que ele pode inibir a expressão gênica de TGFA mediada pelo T3, fato observado apenas em modelos experimentais onde o TAM inibe os efeitos provocados pela administração de T3 (Dipippo, Lindsay *et al.*, 1995). Considerando ainda o TAM, observamos que o tratamento envolvendo somente essa droga acarretou um aumento na expressão de TGFA e PGR demonstrando que os resultados obtidos em linhagens celulares são semelhantes mas não idênticos aos estudados em cultura primária. Considerando-se que o TGFA está associado à progressão tumoral, podemos observar um efeito semelhante em trabalhos que mostraram um tratamento prolongado por TAM ser um promotor do crescimento celular mamário (Gottardis e Jordan, 1988) podendo apresentar ações divergentes conforme sua atuação no receptor de estrógeno alpha ou beta, sendo a ação nesse último capaz de levar ao aumento da expressão de TGFA (Barkhem, Carlsson *et al.*, 1998).

O fator de crescimento (TGF)-beta tem um importante papel na regulação do desenvolvimento dos ductos mamários e na proliferação celular da glândula mamária durante a vida adulta. TGFB1 é parte de uma superfamília que inclui ativina, inibina e BMP (Massague, 1990). TGFs-beta exercem um amplo conjunto de

efeitos em uma grande variedade de células, incluindo supressão e regulação do crescimento, diferenciação, produção de estroma e modulação imune. Eles são particularmente importantes na embriogênese e na cicatrização e, devido às suas diferentes funções, eles possuem um importante papel na carcinogênese (Walker, 2000).

Assim como todos os fatores de crescimento e hormônios, TGFs-beta exercem seus efeitos em células pela ligação a receptores que são ativados e interagem com proteínas transdutoras do sinal que se translocam para o núcleo e direcionam a transcrição para que a célula efetive a resposta ao TGFB1 (Massague e Weis-Garcia, 1996; Heldin, Miyazono *et al.*, 1997).

No epitélio mamário humano, o TGFB1 é um inibidor da proliferação celular (Hosobuchi e Stampfer, 1989) e é um importante regulador do desenvolvimento da glândula mamária. Isso apóia os nossos resultados de diminuição da expressão desse gene nas culturas tratadas com E2 e a reversão desse efeito na associação deste hormônio com TAM, porém não houve relação do T3 com a expressão de TGFB1 indicando que o que encontramos no modelo "in vitro" (Nogueira e Brentani, 1996), em relação ao T3, não foi evidenciado nesse trabalho em relação ao "in vivo". Estudos de linhagens celulares de câncer de mama mostraram que, enquanto alguns tumores possuem o crescimento inibido por TGFB1 exógeno, outros não são. Esta perda da inibição do crescimento pode ser devido à expressão alterada de receptores de TGFB1, Smad2 ou Smad4. Mas as causas dessas alterações não são conhecidas até o momento (Reiss e Barcellos-Hoff, 1997).

O papel do TGFB1 no câncer de mama é muito complexo. Reiss e Barcellos-Hoff, 1997 (Reiss e Barcellos-Hoff, 1997) propuseram que em mama normal e nos estágios iniciais do desenvolvimento do câncer de mama o TGFB1 age como um antipromotor tumoral, mas com a progressão ele age como um promotor tumoral.

No tratamento das culturas celulares com T3 não houve diferença para as culturas não tratadas em relação à expressão de TGFB1, o mesmo ocorreu quando

essas culturas foram tratadas com TAM, mas ao associar esses tratamentos observamos uma diminuição da expressão de TGFB1. Recentemente foi demonstrado que existem receptores de estrógeno que se localizam na membrana plasmática e que o TAM pode atuar nesses receptores exercendo uma ação agonista (Osborne e Schiff, 2005) e também foi demonstrado que um tratamento por breve período de tempo com T3 resulta em fosforilação do receptor de estrógeno sem a necessidade da translocação deste hormônio ao núcleo (Zhao, Lorenc *et al.*, 2005).

Embora TGFA e TGFB1 sejam bons marcadores da ação do estrógeno em células de câncer de mama, um dos genes regulados pelo ER mais estudados é o receptor de progesterona (PGR). Quando o PGR foi identificado como um gene regulado por ER, foi sugerido que a sua presença deve indicar um funcionamento da via do ER e um tipo tumoral que é altamente dependente do estrógeno para crescer e, conseqüentemente, que poderia responder a várias terapias hormonais (Horwitz e McGuire, 1978). Enquanto tumores sem PGR poderiam ser menos responsivos a terapias hormonais. Esta hipótese foi defendida por vários estudos clínicos. Foi descoberto que aproximadamente 75% dos cânceres de mama primários expressam ER e mais da metade deles também expressam PGR (Mcguire, 1978), um dado confirmado em nossos dados onde 9 entre 12 pacientes apresentaram ER+ e destas, 5 eram PR+. Menos de 10% dos tumores expressam PGR na ausência de ER e aproximadamente 20% dos cânceres de mama não expressam qualquer receptor. Estudos também mostraram que os níveis de ER e PGR podem mudar a história natural da doença ou a opção por determinada terapia. Biopsias seqüenciais demonstraram que, enquanto a completa perda do ER é incomum com a terapia endócrina, níveis de PGR diminuem mais drasticamente em mais da metade dos tumores perdendo completamente a expressão de PGR quando a resistência a terapia endócrina está envolvida (Hull, Clark *et al.*, 1983; Gross, Clark *et al.*, 1984). Estes tumores metastáticos ER+/PR- mostram muito mais agressividade com menor sobrevida após a perda do PGR comparado com

aqueles que retêm a expressão de PGR (Gross, Clark *et al.*, 1984; Balleine, Earl *et al.*, 1999). Estas mudanças no comportamento do tumor sugerem que mudanças em outros mecanismos reguladores da célula tumoral acompanham a perda do PR.

Nossos resultados comprovam que E2 e T3 aumentam significativamente a expressão do PGR em cultura primária de tumores mamários. O TAM, quando associado ao E2, reverteu significativamente o aumento da expressão de PGR, por outro lado o TAM isolado levou ao aumento da expressão de PR. O TAM isolado pode inibir a ação do E2 atuando como antagonista parcial do receptor nuclear desse hormônio, porém isso pode confirmar sua atuação como agonista para os receptores de membrana do E2 (Osborne e Schiff, 2005).

Apenas o nosso grupo havia relacionado o PGR ao hormônio tireoidiano (Nogueira e Brentani, 1996) e agora evidenciamos que as culturas primárias de câncer de mama apresentaram aumento significativo da expressão desse receptor nos tratamentos com T3 e TAM, mostrando uma possível relação entre a expressão de PGR e níveis de hormônio tireoidiano.

A triiodotironina pode levar ao aumento da expressão gênica de TNFRSF9 e THRA ou ainda diminuir a expressão gênica de BMP6 em células colocadas em cultura (Yamada-Okabe, Satoh *et al.*, 2003). Todos esses fatos já observados na literatura foram confirmados nas culturas primárias indicando que o T3 está agindo normalmente através de sua via de sinalização. Observamos ainda que o E2 não atua nessa via uma vez que não alterou a expressão desses genes nesses tumores.

A expressão dos receptores de hormônios tireoidianos em carcinomas mamários também parece estar envolvida na caracterização dessa doença, embora os estudos nesse sentido sejam escassos. Apenas um pequeno número de trabalhos descreve a presença de TR nesses tumores (Burke e McGuire, 1978; Alvarado-Pisani, Chacon *et al.*, 1986) e em linhagens celulares de câncer de mama (Silva, Dominguez *et al.*, 2002; Garcia-Silva e Aranda, 2004).

Em diferentes tipos de carcinoma, incluindo mama, já foi demonstrada a existência de alterações específicas na expressão de THRA e de THRB, sugerindo que a transcrição desregulada de genes alvo do hormônio tireoidiano pode estar relacionada à gênese dessa neoplasia. Conde et al (Conde, Paniagua *et al.*, 2006) observaram que a expressão destes receptores confere importantes modificações em diferentes graus da diferenciação do câncer de mama.

García-Silva e Aranda (Garcia-Silva e Aranda, 2004) relataram mudanças na expressão dos receptores de hormônios tireoidianos na proliferação e nos mecanismos de transformação tumoral, sugerindo que os TRs podem ter um potente papel supressor da ação do oncogene ras.

Nossos resultados não demonstraram uma relação entre o E2 e a expressão de THRA. O T3 aumentou a expressão de seu receptor e TAM também apresentou um aumento significativo na expressão desse receptor. Posteriores estudos são necessários para correlacionar a influência dessa associação no tratamento do câncer de mama.

TNFRSF9 (também conhecido como 4-1BB ou CD-137) é uma glicoproteína de superfície da família dos receptores de TNF. Está expresso em células T e NK ativadas. Este receptor, associado ao ligante, estimula a proliferação de linfócitos e secreção de citocinas. TNFRSF9 ativa várias vias de sinalização intracelular que incluem: TRAF-2, Fator nuclear Kbeta, MAP Kinase, BCL-xL, Bfl-1 e outros. Este receptor contribui para a expansão clonal, sobrevivência e desenvolvimento de células T. Pode também induzir a proliferação de linfócitos periféricos, e aumentar a resposta imune mediada por células T. O TNFRSF9 pode ativar as caspases mesmo sem a ligação de seu ligante. Mas também possui efeitos anti-apoptóticos em neutrófilos e eosinófilos, enquanto induz Bcl-cL e Bfl-1 e promove a sobrevivência de linfócitos T CD8+. Tratamento de células HeLa estavelmente transfectadas com THRA resultou em aumento da expressão de TNFRSF9 cerca de 22 vezes maior que as células não tratadas ou tratadas na ausência do receptor mostrando que esse

gene é regulado pela triiodotironina ligada ao seu receptor (Yamada-Okabe, Satoh *et al.*, 2003). Nós também observamos um aumento considerável na expressão de TNFRSF9 por T3, indicando que esse hormônio pode atuar em células de tumor mamário através de seu receptor. O tratamento com E2 aumentou levemente essa expressão e o TAM, embora atenua o aumento promovido pelo T3, ainda assim apresentou níveis de expressão maiores que o controle, provavelmente pela ligação ao receptor de T3, mas futuros estudos são necessários para identificar essa ligação.

BMPs (Bone morphogenetic proteins) são fatores de crescimento multifuncionais que pertencem à superfamília do TGFB1. O papel dos BMPs no desenvolvimento embrionário e nas funções celulares em animais recém-nascidos e adultos tem sido extensivamente estudado nos últimos anos (Christiansen, Coles *et al.*, 2000; Munoz-Sanjuan e Brivanlou, 2002). Estudos de transdução de sinal revelaram que Smad1, 5 e 8 são moléculas da via dos receptores de BMP e possuem um papel central na transdução do sinal do BMP (Zhao, Qiao *et al.*, 2004). Yamada-Okabe *et al.* (Yamada-Okabe, Satoh *et al.*, 2003), tratando células HeLa transfectadas com THRA, demonstraram que o hormônio tireoidiano diminui cerca de 15 vezes a expressão de BMP6 de maneira dependente do receptor. Nós também observamos essa diminuição pelo T3 nos tumores mamários, reforçando a ligação desse hormônio ao seu receptor na sua atuação. Para BMP6, os outros tratamentos não revelaram mudança estatística sendo observado apenas uma atenuação dos efeitos do T3 na sua associação com o TAM, indicando uma possível competição dessa droga pelo THRA.

Além disso, os resultados da ação do T3 nos genes THRA, TNFRSF9 e BMP6 demonstram que os receptores de hormônio tireoidiano no tumor das pacientes estudadas são funcionais, permitindo sua ligação e ação, o que comprova a associação desses hormônios na indução de PGR e TGFA e sua ligação com a proliferação do câncer de mama.

7.0 CONCLUSÕES

Em carcinoma de mama colocado em cultura primária verificou-se que:

1. O T3 e E2 agem de maneira similar modulando positivamente os genes TGFA e PGR. Em relação ao TGFB1 o T3 e o E2 não agem de forma similar.
2. O T3 apresentou-se funcional devido à modulação positiva em THRA, TNFRSF9 e negativamente BMP6.

8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- Adamopoulos, D. A., S. Vassilaros, *et al.* Thyroid disease in patients with benign and malignant mastopathy. Cancer, v.57, n.1, Jan 1, p.125-8. 1986.
- Alvarado-Pisani, A. R., R. S. Chacon, *et al.* Thyroid hormone receptors in human breast cancer: effect of thyroxine administration. Anticancer Res, v.6, n.6, Nov-Dec, p.1347-51. 1986.
- Balleine, R. L., M. J. Earl, *et al.* Absence of progesterone receptor associated with secondary breast cancer in postmenopausal women. Br J Cancer, v.79, n.9-10, Mar, p.1564-71. 1999.
- Barkhem, T., B. Carlsson, *et al.* Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists. Mol Pharmacol, v.54, n.1, Jul, p.105-12. 1998.
- _____. 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, n.6, Jun, p.667-75. 1991.
- Bates, S. E., N. E. Davidson, *et al.* Expression of transforming growth factor alpha and its messenger ribonucleic acid in human breast cancer: its regulation by estrogen and its possible functional significance. Mol Endocrinol, v.2, n.6, Jun, p.543-55. 1988.
- Beato, M. Gene regulation by steroid hormones. Cell, v.56, n.3, Feb 10, p.335-44. 1989.
- Bernstein, L. e R. K. Ross. Endogenous hormones and breast cancer risk. Epidemiol Rev, v.15, n.1, p.48-65. 1993.
- Borellini, F. e T. Oka. Growth control and differentiation in mammary epithelial cells. Environ Health Perspect, v.80, Mar, p.85-99. 1989.
- Brachmann, R., P. B. Lindquist, *et al.* Transmembrane TGF-alpha precursors activate EGF/TGF-alpha receptors. Cell, v.56, n.4, Feb 24, p.691-700. 1989.
- Brinton, L. A., D. A. Hoffman, *et al.* Relationship of thyroid disease and use of thyroid supplements to breast cancer risk. J Chronic Dis, v.37, n.12, p.877-93. 1984.
- Burke, R. E. e W. L. Mcguire. Nuclear thyroid hormone receptors in a human breast cancer cell line. Cancer Res, v.38, n.11 Pt 1, Nov, p.3769-73. 1978.
- Cerbon, M. A., M. F. Pichon, *et al.* Thyroid hormone receptors in human breast cancer. Cancer Res, v.41, n.10, Oct, p.4167-73. 1981.

* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references.[homepage on the Internet]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine; 2003[last updated 2003 July 09; cited 2005 Jun 01]. Available from:http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html
National Library of Medicine. List of journals indexed in Index Medicus. Washington, 2003. 240p.

- Chomczynski, P. e N. Sacchi. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem, v.162, n.1, 1987 Apr, p.156-9. 1987.
- Christiansen, J. H., E. G. Coles, *et al.* Molecular control of neural crest formation, migration and differentiation. Curr Opin Cell Biol, v.12, n.6, Dec, p.719-24. 2000.
- Conde, I., R. Paniagua, *et al.* Influence of thyroid hormone receptors on breast cancer cell proliferation. Ann Oncol, v.17, n.1, Jan, p.60-4. 2006.
- Derynck, R. Transforming growth factor-alpha: structure and biological activities. J Cell Biochem, v.32, n.4, p.293-304. 1986.
- Dipippo, V. A., R. Lindsay, *et al.* Estradiol and tamoxifen interactions with thyroid hormone in the ovariectomized-thyroidectomized rat. Endocrinology, v.136, n.3, Mar, p.1020-33. 1995.
- Edwards, D. P., G. C. Chamness, *et al.* Estrogen and progesterone receptor proteins in breast cancer. Biochim Biophys Acta, v.560, n.4, Dec 19, p.457-86. 1979.
- Eskin, B. A. Iodine and mammary cancer. Adv Exp Med Biol, v.91, p.293-304. 1977.
- Evans, R. M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Science, v.240, n.4854, May 13, p.889-95. 1988.
- Fuqua, S. A., G. C. Chamness, *et al.* Estrogen receptor mutations in breast cancer. J Cell Biochem, v.51, n.2, Feb, p.135-9. 1993.
- Garcia-Silva, S. e A. Aranda. The thyroid hormone receptor is a suppressor of ras-mediated transcription, proliferation, and transformation. Mol Cell Biol, v.24, n.17, Sep, p.7514-23. 2004.
- Giani, C., P. Fierabracci, *et al.* Relationship between breast cancer and thyroid disease: relevance of autoimmune thyroid disorders in breast malignancy. J Clin Endocrinol Metab, v.81, n.3, Mar, p.990-4. 1996.
- Glass, C. K. e J. M. Holloway. Regulation of gene expression by the thyroid hormone receptor. Biochim Biophys Acta, v.1032, n.2-3, Dec 11, p.157-76. 1990.
- Goldman, M. B. Thyroid diseases and breast cancer. Epidemiol Rev, v.12, p.16-28. 1990.
- Gottardis, M. M. e V. C. Jordan. Development of tamoxifen-stimulated growth of MCF-7 tumors in athymic mice after long-term antiestrogen administration. Cancer Res, v.48, n.18, Sep 15, p.5183-7. 1988.
- Gross, G. E., G. M. Clark, *et al.* Multiple progesterone receptor assays in human breast cancer. Cancer Res, v.44, n.2, Feb, p.836-40. 1984.
- Habel, L. A. e J. L. Stanford. Hormone receptors and breast cancer. Epidemiol Rev, v.15, n.1, p.209-19. 1993.
- Hayden, T. J. e I. A. Forsyth. Thyroid hormone binding in rat mammary gland [proceedings]. J Endocrinol, v.75, n.3, Dec, p.38P-39P. 1977.

- Hedley, A. J., S. J. Jones, *et al.* Breast cancer in thyroid disease: fact or fallacy? Lancet, v.1, n.8212, Jan 17, p.131-3. 1981.
- Heldin, C. H., K. Miyazono, *et al.* TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. Nature, v.390, n.6659, Dec 4, p.465-71. 1997.
- Horwitz, K. B. e W. L. McGuire. Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer. Correlation with nuclear processing of estrogen receptor. J Biol Chem, v.253, n.7, Apr 10, p.2223-8. 1978.
- Hosobuchi, M. e M. R. Stampfer. Effects of transforming growth factor beta on growth of human mammary epithelial cells in culture. In Vitro Cell Dev Biol, v.25, n.8, Aug, p.705-13. 1989.
- Hull, D. F., 3rd, G. M. Clark, *et al.* Multiple estrogen receptor assays in human breast cancer. Cancer Res, v.43, n.1, Jan, p.413-6. 1983.
- Ito, K. e N. Maruchi. Breast cancer in patients with Hashimoto's thyroiditis. Lancet, v.2, n.7945, Dec 6, p.1119-21. 1975.
- Iwase, H. e S. Kobayashi. Alterations and Polymorphisms of the Estrogen Receptor Gene in Breast Cancer. Breast Cancer, v.4, n.2, Jul 31, p.57-66. 1997.
- Jensen, E. V., G. Cheng, *et al.* Estrogen receptors and proliferation markers in primary and recurrent breast cancer. Proc Natl Acad Sci U S A, v.98, n.26, Dec 18, p.15197-202. 2001.
- Kalache, A., M. P. Vessey, *et al.* Thyroid disease and breast cancer: findings in a large case-control study. Br J Surg, v.69, n.7, Jul, p.434-5. 1982.
- Kapdi, C. C. e J. N. Wolfe. Breast cancer. Relationship to thyroid supplements for hypothyroidism. Jama, v.236, n.10, Sep 6, p.1124-7. 1976.
- Lacroix, M., G. Querton, *et al.* Estrogen receptor analysis in primary breast tumors by ligand-binding assay, immunocytochemical assay, and northern blot: a comparison. Breast Cancer Res Treat, v.67, n.3, Jun, p.263-71. 2001.
- Lemaire, M. e L. Baugnet-Mahieu. Thyroid function in women with breast cancer. Eur J Cancer Clin Oncol, v.22, n.3, Mar, p.301-7. 1986.
- Macias, A., R. Perez, *et al.* Identification of transforming growth factor alpha in human primary breast carcinomas. Anticancer Res, v.7, n.6, Nov-Dec, p.1271-5. 1987.
- Marquardt, H., M. W. Hunkapiller, *et al.* Rat transforming growth factor type 1: structure and relation to epidermal growth factor. Science, v.223, n.4640, Mar 9, p.1079-82. 1984.
- Massague, J. Transforming growth factor-alpha. A model for membrane-anchored growth factors. J Biol Chem, v.265, n.35, Dec 15, p.21393-6. 1990.
- Massague, J. e F. Weis-Garcia. Serine/threonine kinase receptors: mediators of transforming growth factor beta family signals. Cancer Surv, v.27, p.41-64. 1996.
- Matsui, Y., S. A. Halter, *et al.* Development of mammary hyperplasia and neoplasia in MMTV-TGF alpha transgenic mice. Cell, v.61, n.6, Jun 15, p.1147-55. 1990.

Mcguire, W. L. Hormone receptors: their role in predicting prognosis and response to endocrine therapy. Semin Oncol, v.5, n.4, Dec, p.428-33. 1978.

Mcguire, W. L., G. C. Chamness, *et al.* Hormone dependence in breast cancer. Metabolism, v.23, n.1, Jan, p.75-100. 1974.

Meites, J. e C. L. Kragt. Effects Of A Pituitary Homotransplant And Thyroxine On Body And Mammary Growth In Immature Hypophysectomized Rats. Endocrinology, v.75, Oct, p.565-70. 1964.

Mittra, I. e J. L. Hayward. Hypothalamic-pituitary-thyroid axis in breast cancer. Lancet, v.1, n.7863, May 11, p.885-9. 1974.

Moossa, A. R., D. A. Evans, *et al.* Thyroid status and breast cancer. Reappraisal of an old relationship. Ann R Coll Surg Engl, v.53, n.3, Sep, p.178-88. 1973.

Muhlbock, O. e L. M. Boot. Induction of mammary cancer in mice without the mammary tumor agent by isografts of hypophyses. Cancer Res, v.19, n.4, May, p.402-12. 1959.

Munoz-Sanjuan, I. e A. H. Brivanlou. Neural induction, the default model and embryonic stem cells. Nat Rev Neurosci, v.3, n.4, Apr, p.271-80. 2002.

Mustacchi, P. e F. Greenspan. Thyroid supplementation for hypothyroidism. An iatrogenic cause of breast cancer? Jama, v.237, n.14, Apr 4, p.1446-7. 1977.

Natoli, C., G. Sica, *et al.* Two new estrogen-supersensitive variants of the MCF-7 human breast cancer cell line. Breast Cancer Res Treat, v.3, n.1, p.23-32. 1983.

Nisker, J. A. e P. K. Siiteri. Estrogens and breast cancer. Clin Obstet Gynecol, v.24, n.1, Mar, p.301-22. 1981.

Nogueira, C. R. e M. M. Brentani. Triiodothyronine mimics the effects of estrogen in breast cancer cell lines. J Steroid Biochem Mol Biol, v.59, n.3-4, Nov, p.271-9. 1996.

Osborne, C. K. e R. Schiff. Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. J Clin Oncol, v.23, n.8, Mar 10, p.1616-22. 2005.

Perroteau, I., D. Salomon, *et al.* Immunological detection and quantitation of alpha transforming growth factors in human breast carcinoma cells. Breast Cancer Res Treat, v.7, n.3, p.201-10. 1986.

Perry, M., D. J. Goldie, *et al.* Thyroid function in patients with breast cancer. Ann R Coll Surg Engl, v.60, n.4, Jul, p.290-3. 1978.

Rasmusson, B., U. Feldt-Rasmussen, *et al.* Thyroid function in patients with breast cancer. Eur J Cancer Clin Oncol, v.23, n.5, May, p.553-6. 1987.

Reiss, M. e M. H. Barcellos-Hoff. Transforming growth factor-beta in breast cancer: a working hypothesis. Breast Cancer Res Treat, v.45, n.1, Aug, p.81-95. 1997.

Rose, D. P. The interactions between vitamin B6 and hormones. Vitam Horm, v.36, p.53-99. 1978.

Rose, D. P. e T. E. Davis. Plasma thyroid-stimulating hormone and thyroxine concentrations in breast cancer. Cancer, v.41, n.2, Feb, p.666-9. 1978.

Rosenthal, A., P. B. Lindquist, *et al.* Expression in rat fibroblasts of a human transforming growth factor- α cDNA results in transformation. Cell, v.46, n.2, Jul 18, p.301-9. 1986.

Saraiva, P. P., N. B. Figueiredo, *et al.* Profile of thyroid hormones in breast cancer patients. Braz J Med Biol Res, v.38, n.5, May, p.761-5. 2005.

Schmidt, G. H. e W. H. Moger. Effect of thyroactive materials upon mammary gland growth and lactation in rats. Endocrinology, v.81, n.1, Jul, p.14-8. 1967.

Shao, Z. M., M. S. Sheikh, *et al.* Thyroid hormone enhancement of estradiol stimulation of breast carcinoma proliferation. Exp Cell Res, v.218, n.1, May, p.1-8. 1995.

Sicher, K. e J. A. Waterhouse. Thyroid activity in relation to prognosis in mammary cancer. Br J Cancer, v.21, n.3, Sep, p.512-8. 1967.

Silva, J. M., G. Dominguez, *et al.* Expression of thyroid hormone receptor/erbA genes is altered in human breast cancer. Oncogene, v.21, n.27, Jun 20, p.4307-16. 2002.

Smyth, P. P., S. G. Shering, *et al.* Serum thyroid peroxidase autoantibodies, thyroid volume, and outcome in breast carcinoma. J Clin Endocrinol Metab, v.83, n.8, Aug, p.2711-6. 1998.

Smyth, P. P., D. F. Smith, *et al.* A direct relationship between thyroid enlargement and breast cancer. J Clin Endocrinol Metab, v.81, n.3, Mar, p.937-41. 1996.

Sommer, S. e S. A. Fuqua. Estrogen receptor and breast cancer. Semin Cancer Biol, v.11, n.5, Oct, p.339-52. 2001.

Sorrentino, J. M., W. L. Kirkland, *et al.* 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, n.6, Jun, p.1155-8. 1976.

Spencer, J. G. The influence of the thyroid in malignant disease. Br J Cancer, v.8, n.3, Sep, p.393-411. 1954.

Stewart, A. J., M. D. Johnson, *et al.* Role of insulin-like growth factors and the type I insulin-like growth factor receptor in the estrogen-stimulated proliferation of human breast cancer cells. J Biol Chem, v.265, n.34, Dec 5, p.21172-8. 1990.

Takatani, O., T. Okumoto, *et al.* Relationship between the levels of serum thyroid hormones or estrogen status and the risk of breast cancer genesis in Japanese women. Cancer Res, v.49, n.11, Jun 1, p.3109-12. 1989.

Thomas, B. S., R. D. Bulbrook, *et al.* Thyroid function in early breast cancer. Eur J Cancer Clin Oncol, v.19, n.9, Sep, p.1213-9. 1983.

Topper, Y. J. e C. S. Freeman. Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. Physiol Rev, v.60, n.4, Oct, p.1049-106. 1980.

Turken, O., Y. Narin, *et al.* Breast cancer in association with thyroid disorders. Breast Cancer Res, v.5, n.5, p.R110-3. 2003.

Vonderhaar, B. K. e A. E. Greco. Lobulo-alveolar development of mouse mammary glands is regulated by thyroid hormones. Endocrinology, v.104, n.2, Feb, p.409-18. 1979.

Vonderhaar, B. K., E. Tang, *et al.* Thyroid hormone regulation of epidermal growth factor receptor levels in mouse mammary glands. Endocrinology, v.119, n.2, Aug, p.580-5. 1986.

Vorherr, H. Thyroid function in benign and malignant breast disease. Eur J Cancer Clin Oncol, v.23, n.3, Mar, p.255-7. 1987.

Walker, R. A. Transforming growth factor beta and its receptors: their role in breast cancer. Histopathology, v.36, n.2, Feb, p.178-80. 2000.

Weiss, H. A., L. A. Brinton, *et al.* Breast cancer risk in young women and history of selected medical conditions. Int J Epidemiol, v.28, n.5, Oct, p.816-23. 1999.

West, M., C. Blanchette, *et al.* Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene expression profiles. Proc Natl Acad Sci U S A, v.98, n.20, Sep 25, p.11462-7. 2001.

Wittliff, J. L. Steroid-hormone receptors in breast cancer. Cancer, v.53, n.3 Suppl, Feb 1, p.630-43. 1984.

Yamada-Okabe, T., Y. Satoh, *et al.* Thyroid hormone induces the expression of 4-1BB and activation of caspases in a thyroid hormone receptor-dependent manner. Eur J Biochem, v.270, n.14, Jul, p.3064-73. 2003.

Yamamoto, K. R. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. Annu Rev Genet, v.19, p.209-52. 1985.

Zhang, X., M. Jeyakumar, *et al.* Ligand-dependent cross-talk between steroid and thyroid hormone receptors. Evidence for common transcriptional coactivator(s). J Biol Chem, v.271, n.25, Jun 21, p.14825-33. 1996.

Zhao, M., M. Qiao, *et al.* Smurf1 inhibits osteoblast differentiation and bone formation in vitro and in vivo. J Biol Chem, v.279, n.13, Mar 26, p.12854-9. 2004.

Zhao, X., H. Lorenc, *et al.* Thyroid hormone can increase estrogen-mediated transcription from a consensus estrogen response element in neuroblastoma cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.13, Mar 29, p.4890-5. 2005.

ANEXO 1

Descrição das Pacientes

01

Iniciais: STD

Profissão: Professora

Data da Mastectomia: 23/03/2004

Resultado do Anatomopatológico: Carcinoma Lobular Invasivo

Imunohistoquímica:

ER: + (positivo) em 95% das células

PGR: + (positivo) em 20% das células

Nº do caso	Idade	Diagnóstico	Estadiamento	Menopausa (anos)	Imunohistoquímica
01	76	CLI	T(4) N(1) M(0)	34	ER(+); PGR(+)

Dosagens hormonais:

Iniciais	TPOAB	TSH	T4L	E2	FSH	LH
STD	11,5	0,034	3,38	<20,0	91,6	40,9

Descrição:

Paciente apresenta hipertireoidismo clínico evidenciado pelo TSH < 0,4 mUI/ml e T4L > 1,9 ng/dl.

02

Iniciais: CMEM

Profissão: Advogada

Data da Mastectomia: 06/04/2004

Resultado do Anatomopatológico: Carcinoma Ductal Invasivo

Imunohistoquímica:

ER: + (positivo) em 50% das células

PGR: - (negativo)

Nº do caso	Idade	Diagnóstico	Estadiamento	Menopausa (anos)	Imunohistoquímica
02	58	CTI	T(2) N(0) M(0)	2	ER(+); PGR(-)

Dosagens hormonais:

Iniciais	TPOAB	TSH	T4L	E2	FSH	LH
CMEM	<10,0	3,03	1,48	26,7	65,7	29,8

Descrição:

Paciente em eutireoidismo.

03

Iniciais: RPM**Profissão: Prendas domésticas****Data da Mastectomia: 29/04/2004****Resultado do Anatomopatológico: Carcinoma Ductal Invasivo****Imunohistoquímica:****ER: - (negativo)****PGR: - (negativo)**

Nº do caso	Idade	Diagnóstico	Estadiamento	Menopausa (anos)	Imunohistoquímica
03	60	CDI	T(2) N(0) M(0)	15	ER(-); PGR(-)

Dosagens hormonais:

Iniciais	TPOAB	TSH	T4L	E2	FSH	LH
RPM	22,3	1,22	1,78	<20,0	84,7	31,0

Descrição:**Paciente em eutireoidismo.**

04

Iniciais: TAG**Profissão: Aposentada****Data da Mastectomia: 06/05/2004****Resultado do Anatomopatológico: Carcinoma Lobular Invasivo****Imunohistoquímica:****ER: + (positivo) em 100% das células****PGR: + (positivo) em 80% das células**

Nº do caso	Idade	Diagnóstico	Estadiamento	Menopausa (anos)	Imunohistoquímica
04	71	CLI	T(1) N(0) M(0)	10	ER(+); PGR(+)

Dosagens hormonais:

Iniciais	TPOAB	TSH	T4L	E2	FSH	LH
TAG	22,9	0,962	1,44	26,8	51,9	27,2

Descrição:**Paciente em eutireoidismo.**

05

Iniciais: PRF**Profissão: Prendas domésticas****Data da Mastectomia: 25/05/2004****Resultado do Anatomopatológico: Carcinoma Ductal Invasivo****Imunohistoquímica:****ER: + (positivo) em 100% das células****PGR: + (positivo) em 40% das células**

Nº do caso	Idade	Diagnóstico	Estadiamento	Menopausa (anos)	Imunohistoquímica
05	78	CDI	T(2) N(0) M(0)	32	ER(+); PGR(+)

Dosagens hormonais:

Iniciais	TPOAB	TSH	T4L	E2	FSH	LH
PRF	<10,0	0,304	1,94	<20,0	32,4	10,9

Descrição:

Paciente apresenta hipertireoidismo clínico evidenciado pelo TSH < 0,4 mUI/ml e T4L > 1,9 ng/dl.

06

Iniciais: MCO**Profissão: Prendas domésticas****Data da Mastectomia: 01/06/2004****Resultado do Anatomopatológico: Carcinoma Ductal Invasivo****Imunohistoquímica:****ER: + (positivo) em 100% das células****PGR: + (positivo) em 10% das células**

Nº do caso	Idade	Diagnóstico	Estadiamento	Menopausa (anos)	Imunohistoquímica
06	72	CDI	T(1) N(2) M(0)	27	ER(+); PGR(+)

Dosagens hormonais:

Iniciais	TPOAB	TSH	T4L	E2	FSH	LH
MCO	354	5,11	1,26	<20,0	42,4	30,7

Descrição:

Paciente apresenta hipotireoidismo subclínico evidenciado pelo TSH > 4,0 mUI/ml e T4L dentro da normalidade.

Ainda apresenta ANTI-TPO positivo (acima de 35,00UI/ml)

07

Iniciais: NSB**Profissão: Matemática (Aposentada)****Data da Mastectomia: 04/06/2004****Resultado do Anatomopatológico: Carcinoma Ductal Invasivo****Imunohistoquímica:****ER: + (positivo) em 95% das células****PGR: + (positivo) em 10% das células**

Nº do caso	Idade	Diagnóstico	Estadiamento	Menopausa (anos)	Imunohistoquímica
07	50	CDI	T(2) N(1) M(0)	2	ER(+); PGR(+)

Dosagens hormonais:

Iniciais	TPOAB	TSH	T4L	E2	FSH	LH
NSB	<10,0	1,85	2,30	26,9	122	56,9

Descrição:**Paciente em eutireoidismo.**

08

Iniciais: EEKF**Profissão: Administradora****Data da Mastectomia: 15/06/2004****Resultado do Anatomopatológico: Carcinoma Ductal Invasivo****Imunohistoquímica:****ER: + (positivo) em 100% das células****PGR: + (positivo) em 15% das células**

Nº do caso	Idade	Diagnóstico	Estadiamento	Menopausa (anos)	Imunohistoquímica
08	59	CDI	T(2) N(0) M(0)	10	ER(+); PGR(+)

Dosagens hormonais:

Iniciais	TPOAB	TSH	T4L	E2	FSH	LH
EEKF	23,9	1,83	1,75	26,1	101	39,3

Descrição:**Paciente em eutireoidismo.**

09

Iniciais: ALZ**Profissão: Prendas do Lar****Data da Mastectomia: 24/06/2004****Resultado do Anatomopatológico: Carcinoma Ductal Invasivo****Imunohistoquímica:****ER: + (positivo) em 100% das células****PGR: + (positivo) em 95% das células**

Nº do caso	Idade	Diagnóstico	Estadiamento	Menopausa (anos)	Imunohistoquímica
09	76	CDI	T(1) N(0) M(0)	17	ER(+); PGR(+)

Dosagens hormonais:

Iniciais	TPOAB	TSH	T4L	E2	FSH	LH
ALZ	13,5	1,34	1,85	28,2	74,8	27,7

Descrição:**Paciente em eutireoidismo.**

10

Iniciais: JFS**Profissão: Prendas do Lar****Data da Mastectomia: 15/07/2004****Resultado do Anatomopatológico: Carcinoma Ductal Invasivo****Imunohistoquímica:****ER: - (negativo)****PGR: + (positivo) em 40% das células**

Nº do caso	Idade	Diagnóstico	Estadiamento	Menopausa (anos)	Imunohistoquímica
10	65	CDI	T(2) N(1) M(0)	5	ER(-); PGR(+)

Dosagens hormonais:

Iniciais	TPOAB	TSH	T4L	E2	FSH	LH
JFS	18,4	0,917	1,85	23,8	31,1	18,1

Descrição:**Paciente em eutireoidismo.**

Iniciais: MGR

Profissão: Prendas do Lar

Data da Mastectomia: 18/07/2004

Resultado do Anatomopatológico: Carcinoma Ductal Invasivo

Imunohistoquímica:

ER: não informado

PGR: não informado

Nº do caso	Idade	Diagnóstico	Estadiamento	Menopausa (anos)	Imunohistoquímica
11	59	CDI	T(2) N(0) M(0)	5	ER(+); PGR(+)

Dosagens hormonais:

Iniciais	TPOAB	TSH	T4L	E2	FSH	LH
MGR	<10,0	4,47	1,39	<20,0	20,0	16,4

Descrição:

Paciente apresenta hipotireoidismo subclínico evidenciado pelo TSH > 4,0 mUI/ml e T4L dentro da normalidade.

Iniciais: AAM

Profissão: Prendas do Lar

Data da Mastectomia: 15/07/2004

Resultado do Anatomopatológico: Carcinoma Ductal Invasivo

Imunohistoquímica:

ER: + (positivo) em 70% das células

PGR: - (negativo)

Nº do caso	Idade	Diagnóstico	Estadiamento	Menopausa (anos)	Imunohistoquímica
12	76	CDI	T(4) N(0) M(0)	21	ER(+); PGR(-)

Dosagens hormonais:

Iniciais	TPOAB	TSH	T4L	E2	FSH	LH
AAM	<10,0	1,60	1,53	<20,0	44,3	12,1

Descrição:

Paciente em eutireoidismo.

ANEXO 2

Paciente 01: STD, idade 76 anos.

Tabela 13: Quantificação de mRNA total dos fragmentos tumorais da paciente STD após 48h de cultura.

	230 nm	260 nm	280 nm	Razão (260/280)	Concentração (ng/μl)
Controle	0,070	0,155	0,083	1,881	435
T3	0,054	0,120	0,063	1,917	336
T3+TAM	0,053	0,112	0,059	1,886	313,6
TAM	0,072	0,160	0,084	1,892	448
E2	0,048	0,103	0,055	1,886	290
E2+TAM	0,079	0,130	0,070	1,873	364

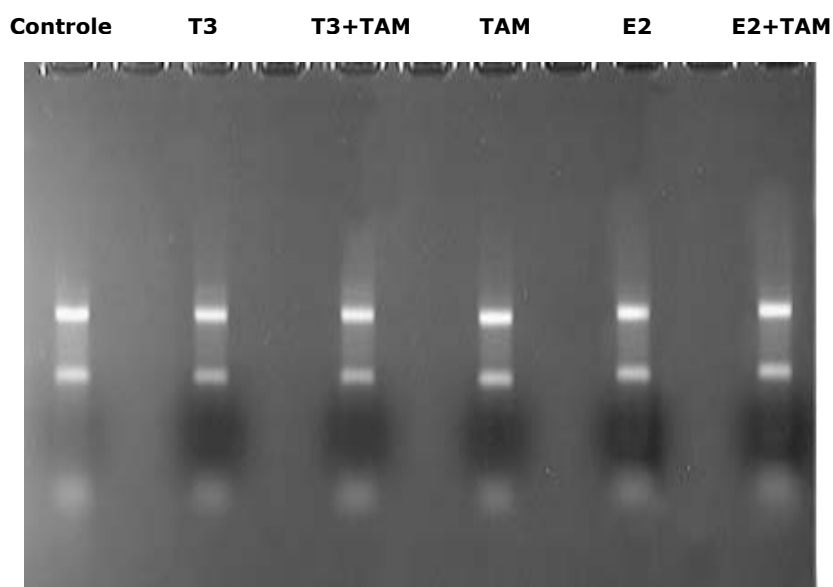
Controle T3 T3+TAM TAM E2 E2+TAM



Paciente 02: CMEM, idade 58 anos.

Tabela 14: Quantificação de mRNA total dos fragmentos tumorais da paciente CMEM após 48h de cultura.

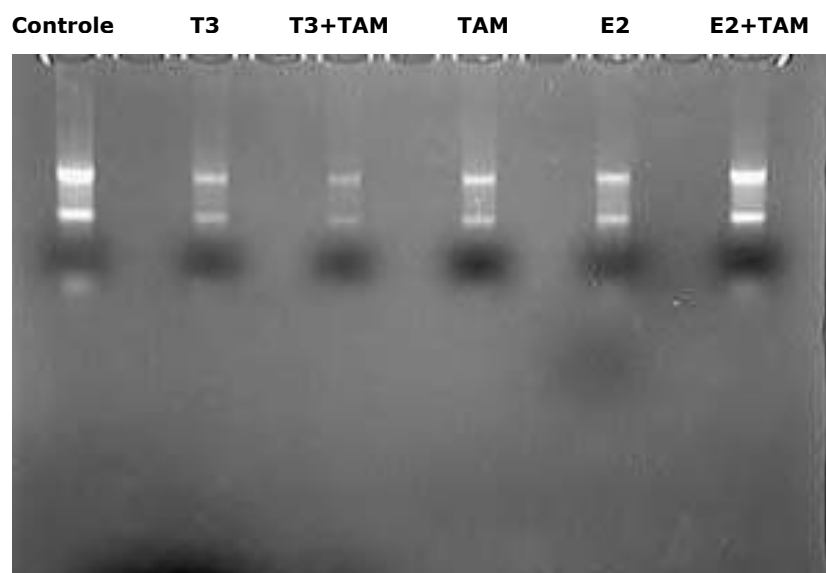
	230 nm	260 nm	280 nm	Razão (260/280)	Concentração (ng/ μ l)
Controle	0,052	0,144	0,077	1,881	405
T3	0,075	0,159	0,081	1,961	446
T3+TAM	0,091	0,156	0,082	1,913	436,8
TAM	0,040	0,075	0,041	1,813	210
E2	0,053	0,112	0,059	1,886	313,6
E2+TAM	0,060	0,123	0,064	1,929	346



Paciente 03: RPM, idade 60 anos.

Tabela 15: Quantificação de mRNA total dos fragmentos tumorais da paciente RPL após 48h de cultura.

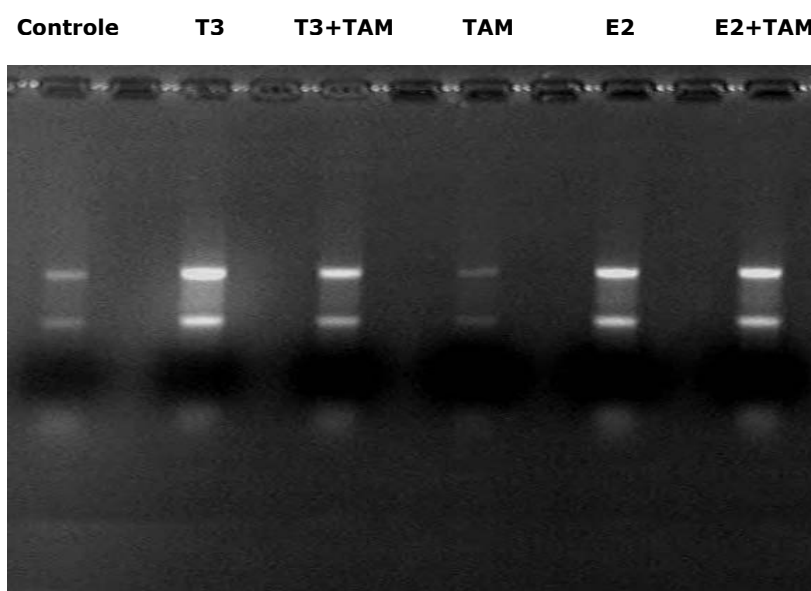
	230 nm	260 nm	280 nm	Razão (260/280)	Concentração (ng/μl)
Controle	0,071	0,163	0,084	1,935	456,4
T3	0,035	0,090	0,046	1,950	252
T3+TAM	0,016	0,042	0,021	1,989	117,6
TAM	0,041	0,103	0,054	1,932	288,4
E2	0,098	0,104	0,054	1,928	291,2
E2+TAM	0,105	0,222	0,119	1,863	621,6



Paciente 04: TAG, idade 71 anos.

Tabela 16: Quantificação de mRNA total dos fragmentos tumorais da paciente TAG após 48h de cultura.

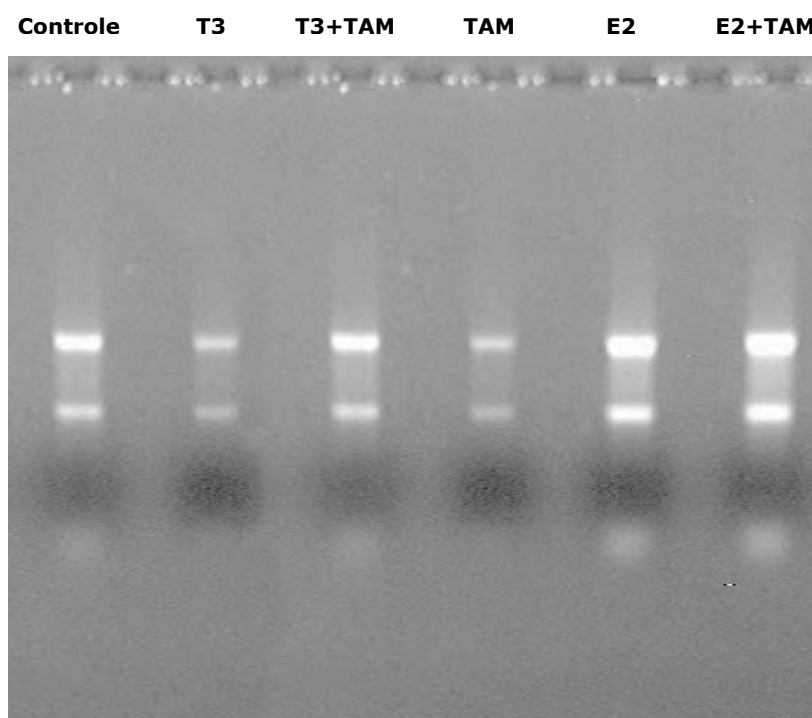
	230 nm	260 nm	280 nm	Razão (260/280)	Concentração (ng/ μ l)
Controle	0,071	0,118	0,062	1,883	332,5
T3	0,070	0,200	0,104	1,906	560,2
T3+TAM	0,066	0,164	0,085	1,939	460,3
TAM	0,041	0,082	0,044	1,855	230
E2	0,098	0,157	0,082	1,920	442
E2+TAM	0,105	0,156	0,082	1,903	436,8



Paciente 05: PRF, idade 78 anos.

Tabela 17: Quantificação de mRNA total dos fragmentos tumorais da paciente PRF após 48h de cultura.

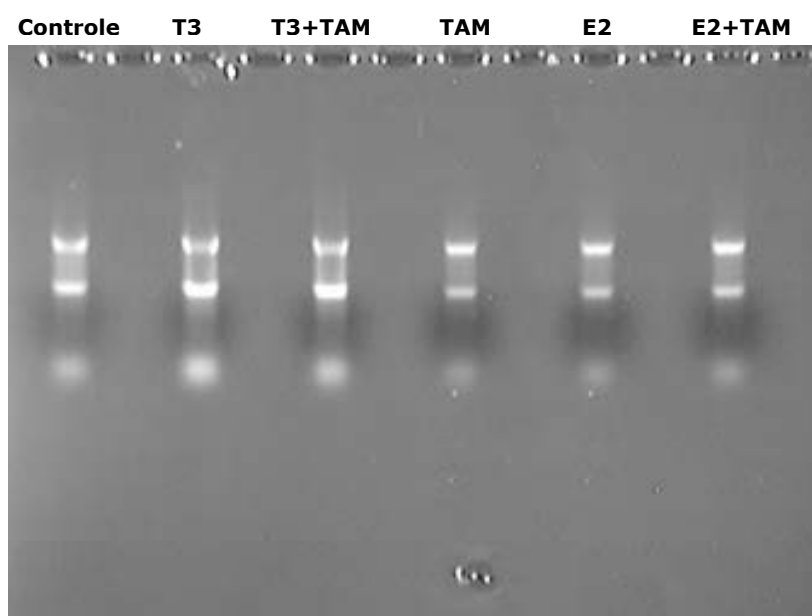
	230 nm	260 nm	280 nm	Razão (260/280)	Concentração (ng/ μ l)
Controle	0,360	0,691	0,367	1,883	1936,5
T3	0,198	0,402	0,211	1,911	1125,6
T3+TAM	0,347	0,738	0,382	1,932	2066,4
TAM	0,413	0,721	0,370	1,946	2018,8
E2	0,220	0,473	0,244	1,939	1324,4
E2+TAM	0,181	0,383	0,198	1,935	1072,4



Paciente 06: MCO, idade 72 anos.

Tabela 18: Quantificação de mRNA total dos fragmentos tumorais da paciente MCO após 48h de cultura.

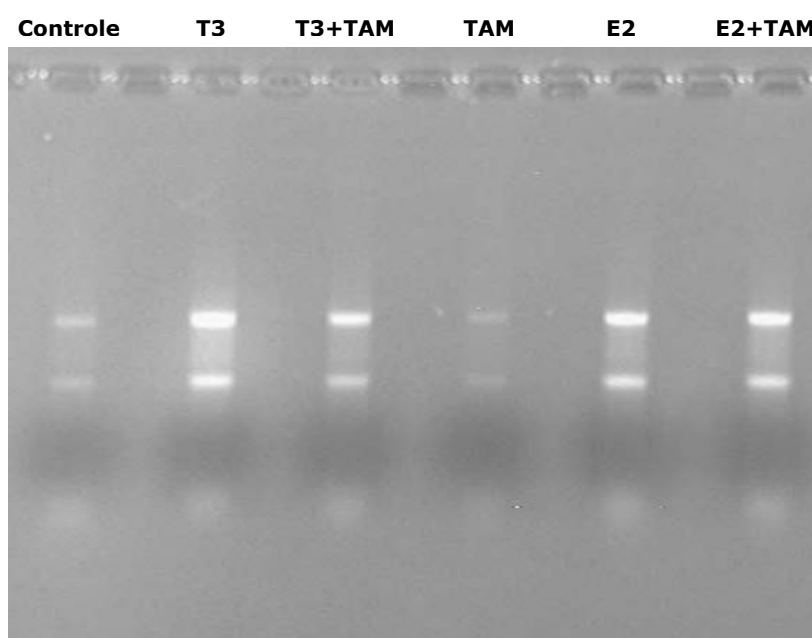
	230 nm	260 nm	280 nm	Razão (260/280)	Concentração (ng/ μ l)
Controle	0,201	0,251	0,136	1,843	702,8
T3	0,198	0,398	0,212	1,881	1114,4
T3+TAM	0,151	0,316	0,168	1,879	884,8
TAM	0,072	0,147	0,080	1,830	411,6
E2	0,098	0,165	0,079	2,092	462
E2+TAM	0,080	0,144	0,074	1,935	403,6



Paciente 07: NSB, idade 50 anos.

Tabela 19: Quantificação de mRNA total dos fragmentos tumorais da paciente NSB após 48h de cultura.

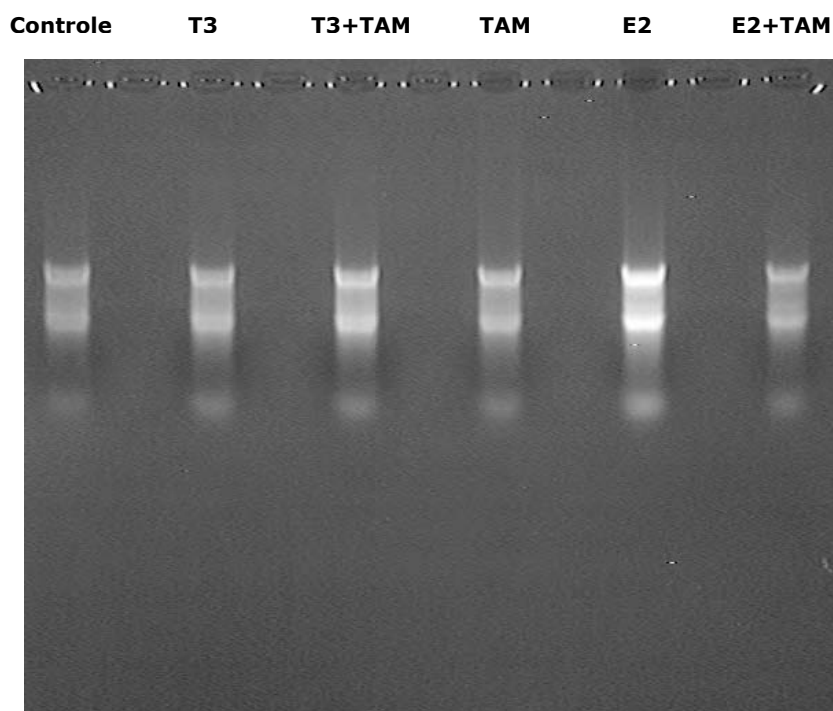
	230 nm	260 nm	280 nm	Razão (260/280)	Concentração (ng/ μ l)
Controle	0,060	0,117	0,063	1,863	327,6
T3	0,103	0,209	0,109	1,909	585,2
T3+TAM	0,070	0,165	0,085	1,939	462
TAM	0,053	0,080	0,043	1,885	224
E2	0,084	0,166	0,087	1,913	464,8
E2+TAM	0,080	0,145	0,073	1,981	407



Paciente 08: EEKF, idade 59 anos.

Tabela 20: Quantificação de mRNA total dos fragmentos tumorais da paciente EEKF após 48h de cultura.

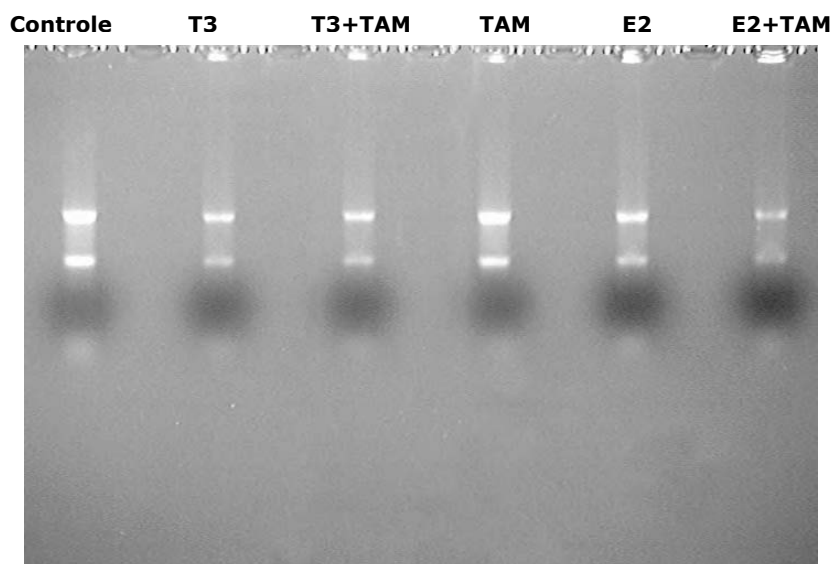
	230 nm	260 nm	280 nm	Razão (260/280)	Concentração (ng/μl)
Controle	0,201	0,428	0,224	1,914	1198,4
T3	0,257	0,557	0,291	1,915	1559,6
T3+TAM	0,270	0,614	0,318	1,931	1719,2
TAM	0,295	0,643	0,344	1,868	1800,4
E2	0,435	0,930	0,483	1,927	2604
E2+TAM	0,168	0,380	0,198	1,923	1064



Paciente 09: ALZ, idade 76 anos.

Tabela 21: Quantificação de mRNA total dos fragmentos tumorais da paciente ALZ após 48h de cultura.

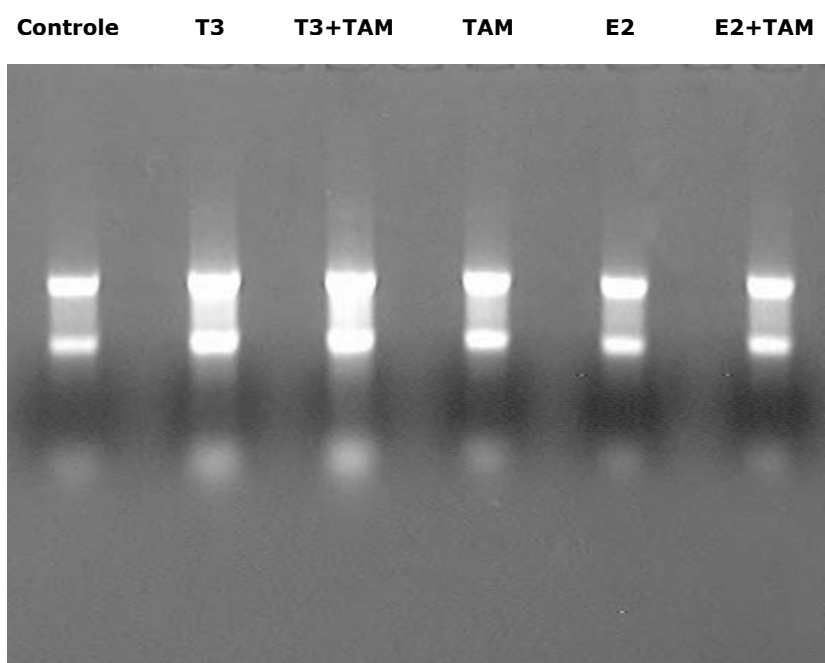
	230 nm	260 nm	280 nm	Razão (260/280)	Concentração (ng/ μ l)
Controle	0,179	0,327	0,171	1,910	915,6
T3	0,117	0,221	0,114	1,933	618,8
T3+TAM	0,125	0,220	0,113	1,931	615,3
TAM	0,126	0,253	0,135	1,875	708,4
E2	0,120	0,227	0,120	1,891	635,6
E2+TAM	0,134	0,175	0,093	1,887	490



Paciente 10: JFS, idade 65 anos.

Tabela 22: Quantificação de mRNA total dos fragmentos tumorais da paciente JSF após 48h de cultura.

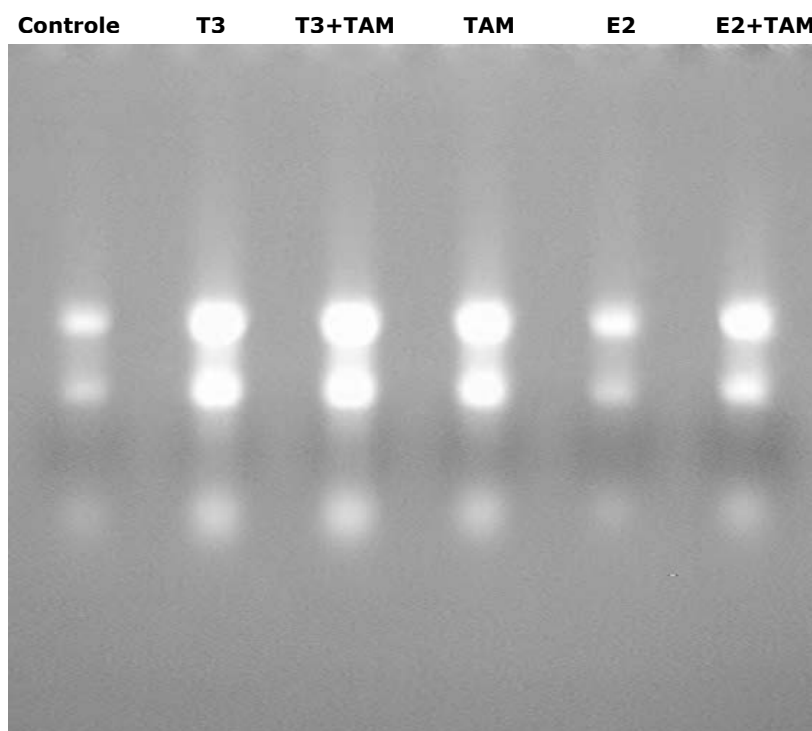
	230 nm	260 nm	280 nm	Razão (260/280)	Concentração (ng/μl)
Controle	0,198	0,402	0,211	1,911	1125,6
T3	0,347	0,738	0,382	1,932	2066,4
T3+TAM	0,413	0,721	0,370	1,946	2018,8
TAM	0,220	0,437	0,244	1,939	1324,4
E2	0,181	0,383	0,198	1,935	1072,4
E2+TAM	0,168	0,380	0,198	1,923	1064



Paciente 11: MGR, idade 59 anos.

Tabela 23: Quantificação de mRNA total dos fragmentos tumorais da paciente MGR após 48h de cultura.

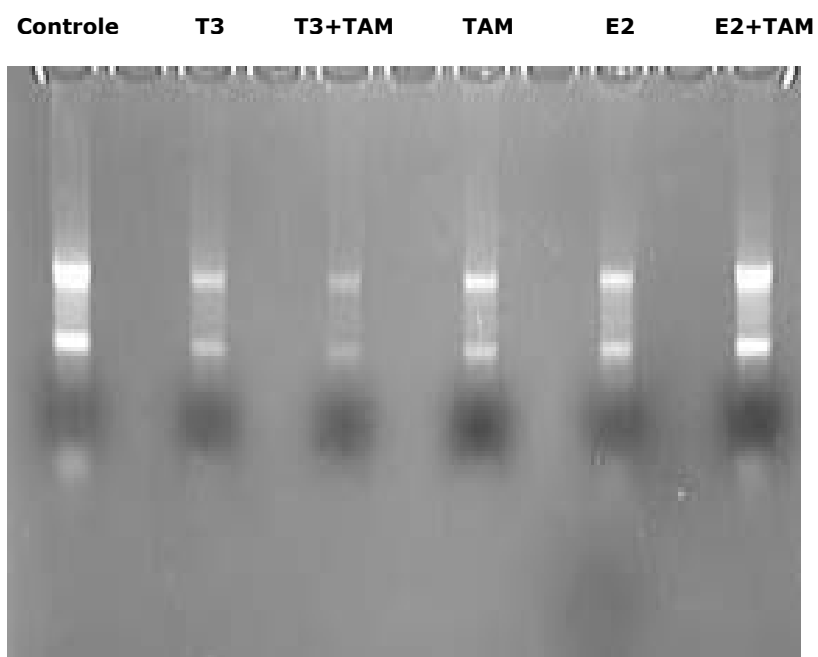
	230 nm	260 nm	280 nm	Razão (260/280)	Concentração (ng/ μ l)
Controle	0,340	0,382	0,186	2,053	1069,6
T3	0,368	0,736	0,384	1,918	2060,8
T3+TAM	0,347	0,699	0,364	1,918	1957,2
TAM	0,312	0,601	0,315	1,906	1682,8
E2	0,145	0,253	0,133	1,898	708,4
E2+TAM	0,265	0,399	0,210	1,904	1117,2



Paciente 12: AAM, idade 76 anos.

Tabela 24: Quantificação de mRNA total dos fragmentos tumorais da paciente AAM após 48h de cultura.

	230 nm	260 nm	280 nm	Razão (260/280)	Concentração (ng/μl)
Controle	0,072	0,164	0,085	1,936	446,7
T3	0,040	0,095	0,048	1,933	255,7
T3+TAM	0,020	0,050	0,026	1,989	117,6
TAM	0,041	0,103	0,054	1,932	288,4
E2	0,096	0,102	0,052	1,928	289,2
E2+TAM	0,107	0,225	0,121	1,863	623,6



ANEXO 3

Tabela 25 - Leitura das absorbâncias do fragmento tumoral de cada paciente. A absorbância a 260nm foi multiplicada por 50 (fator de correção para DNA) e por 70 (diluição feita para a leitura) para o cálculo da concentração em ng/ μ l.

Pacientes (n°)	230 nm	260 nm	280 nm	Razão (260/280)	[] (ng/ μ l)
01	0,088	0,048	0,039	1,248	168
02	0,158	0,128	0,117	1,096	448
03	0,483	0,626	0,448	1,395	2191
04	0,090	0,108	0,102	1,051	378
05	0,130	0,150	0,142	1,059	525
06	0,031	0,017	0,012	1,404	59,5
07	0,036	0,008	0,005	1,403	28
08	0,064	0,052	0,034	1,537	182
09	0,136	0,160	0,144	1,114	560
10	0,130	0,144	0,110	1,311	504
11	0,112	0,163	0,137	1,215	570,5
12	0,123	0,148	0,126	1,235	518

A figura 8 permite a visualização de uma reação de PCR utilizando primers para teste do Kit Invitrogen Platinum Taq DNA Polymerase (Cat. No. 10966-030) juntamente com o DNA extraído das amostras de tecido das pacientes portadoras de adenocarcinoma de mama.

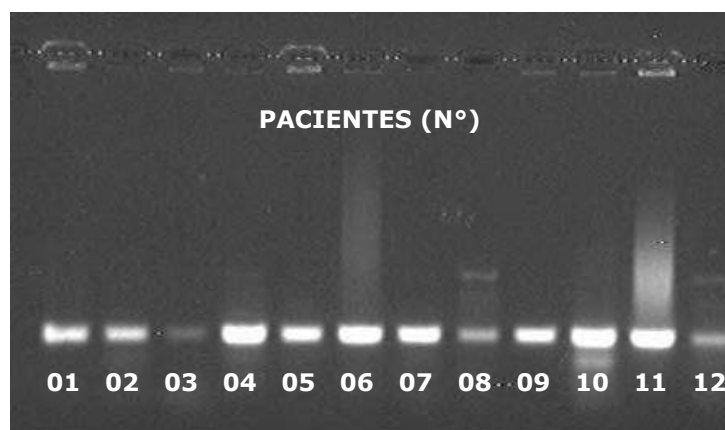


Figura 8 - Reação teste de PCR para verificar a viabilidade de uso do DNA extraído.

Confirmada a qualidade suficiente das amostras para a realização da reação de PCR, seguimos com as reações para os exons 6 à 9 do THRA e 6 à 10 do THRB. As fotos das corridas eletroforéticas para cada paciente são apresentadas a seguir (Figuras 09 a 20):

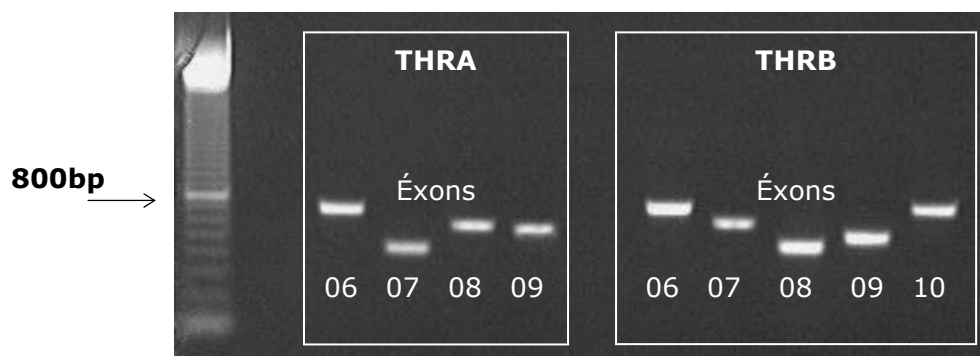


Figura 09 – Corrida eletroforética em gel de agarose a 1% para os exons 06 – 09 do receptor de hormônio tireoidiano alpha (THRA) e 06 – 10 do receptor de hormônio tireoidiano beta (THRB) da paciente 01.

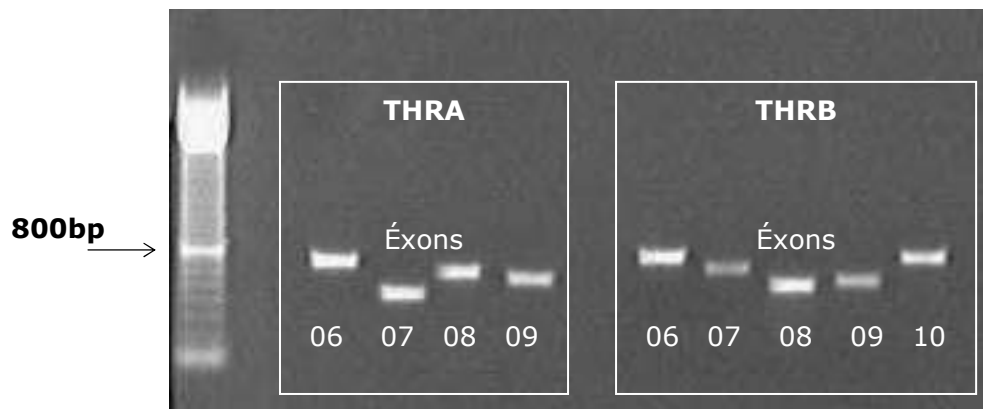


Figura 10 – Corrida eletroforética em gel de agarose a 1% para os exons 06 – 09 do receptor de hormônio tireoidiano alpha (THRA) e 06 – 10 do receptor de hormônio tireoidiano beta (THRB) da paciente 02.

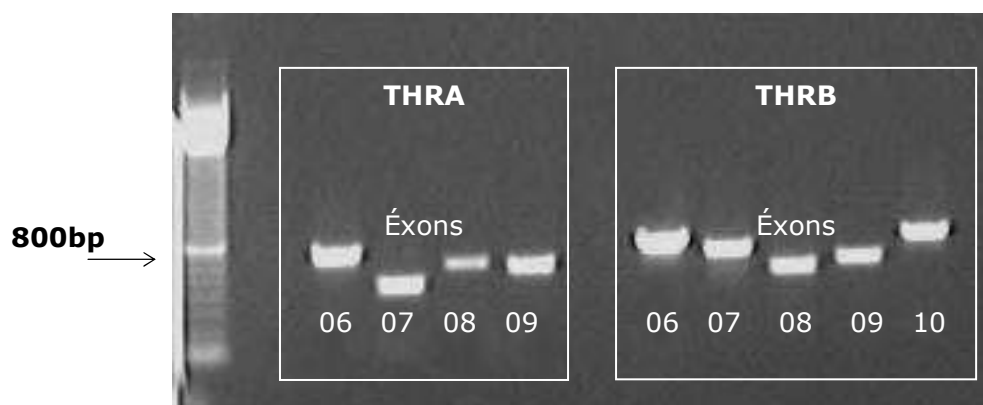


Figura 11 – Corrida eletroforética em gel de agarose a 1% para os exons 06 – 09 do receptor de hormônio tireoidiano alpha (THRA) e 06 – 10 do receptor de hormônio tireoidiano beta (THRB) da paciente 03.

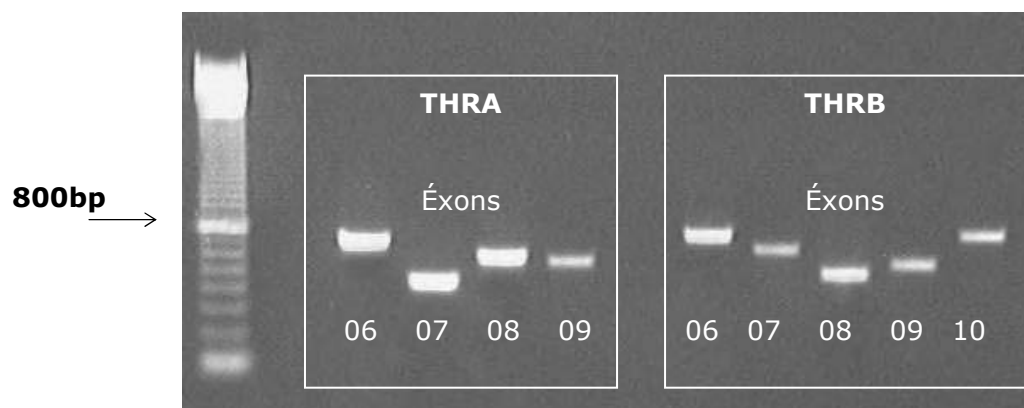


Figura 12 – Corrida eletroforética em gel de agarose a 1% para os exons 06 – 09 do receptor de hormônio tireoidiano alpha (THRA) e 06 – 10 do receptor de hormônio tireoidiano beta (THRB) da paciente 04.

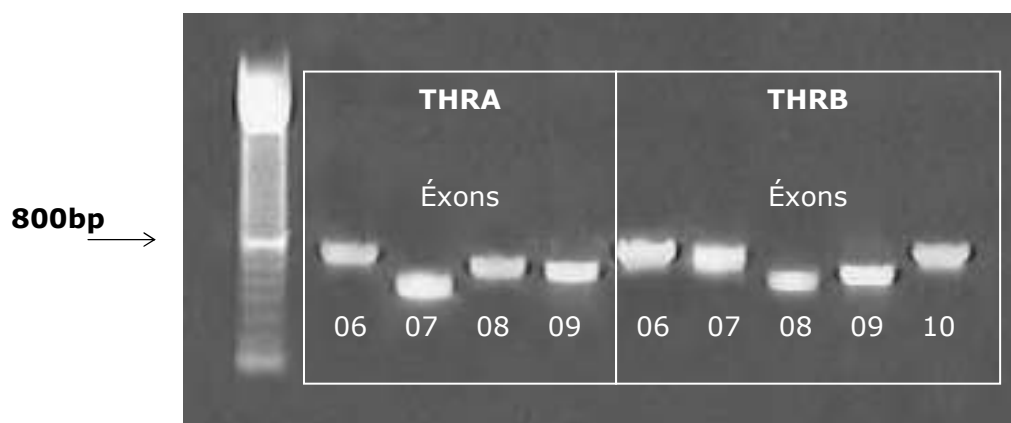


Figura 13 – Corrida eletroforética em gel de agarose a 1% para os exons 06 – 09 do receptor de hormônio tireoidiano alpha (THRA) e 06 – 10 do receptor de hormônio tireoidiano beta (THRB) da paciente 05.

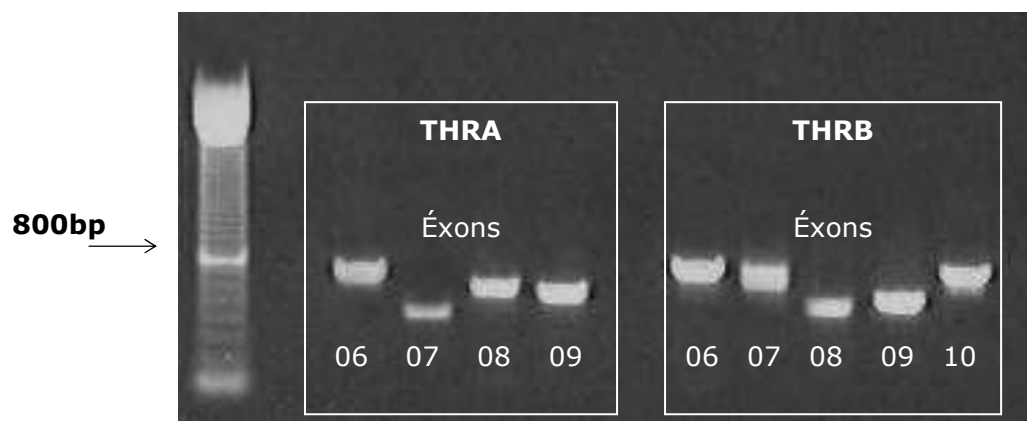


Figura 14 – Corrida eletroforética em gel de agarose a 1% para os exons 06 – 09 do receptor de hormônio tireoidiano alpha (THRA) e 06 – 10 do receptor de hormônio tireoidiano beta (THRB) da paciente 06.

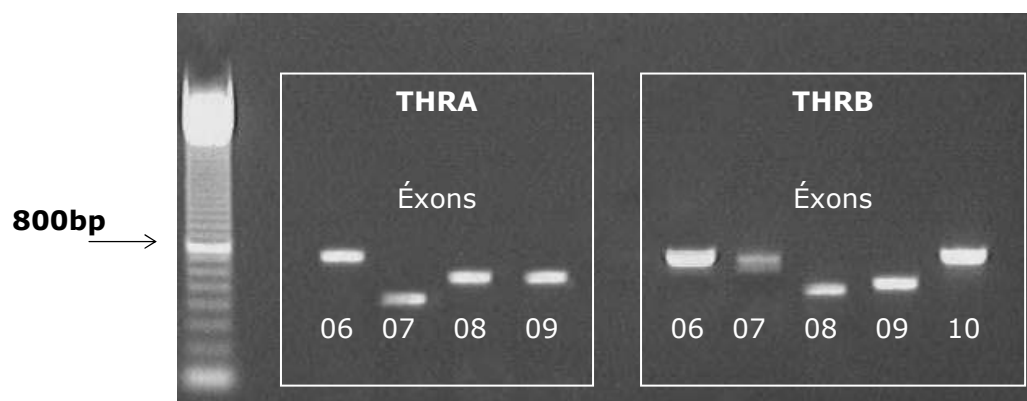


Figura 15 – Corrida eletroforética em gel de agarose a 1% para os exons 06 – 09 do receptor de hormônio tireoidiano alpha (THRA) e 06 – 10 do receptor de hormônio tireoidiano beta (THRB) da paciente 07.

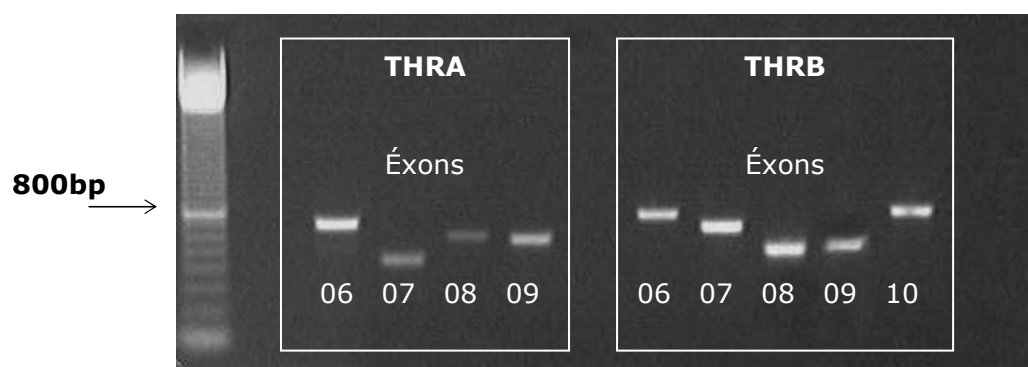


Figura 16 – Corrida eletroforética em gel de agarose a 1% para os exons 06 – 09 do receptor de hormônio tireoidiano alpha (THRA) e 06 – 10 do receptor de hormônio tireoidiano beta (THRB) da paciente 08.

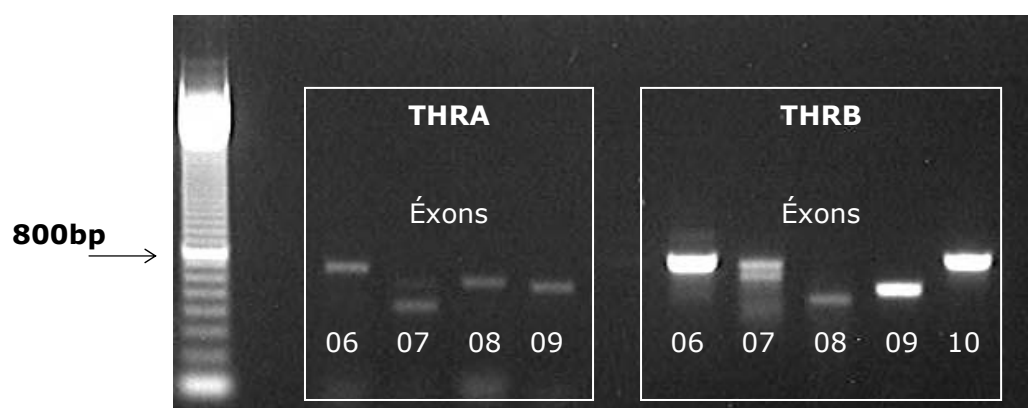


Figura 17 – Corrida eletroforética em gel de agarose a 1% para os exons 06 – 09 do receptor de hormônio tireoidiano alpha (THRA) e 06 – 10 do receptor de hormônio tireoidiano beta (THRB) da paciente 09.

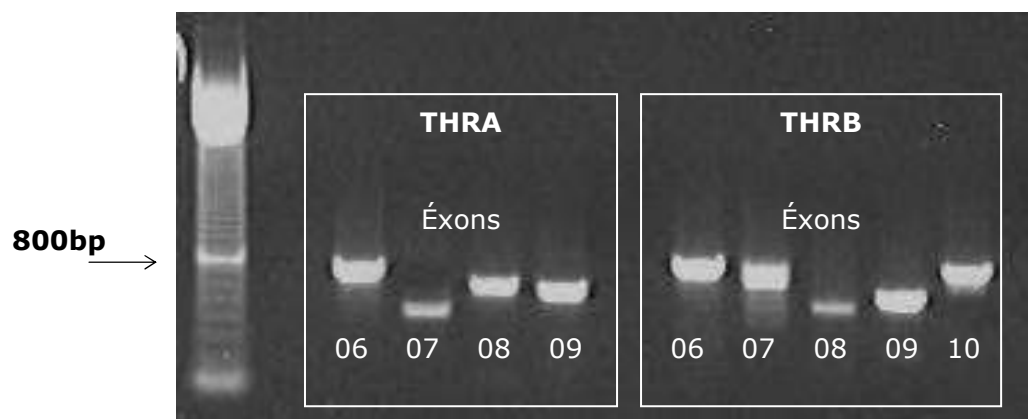


Figura 18 – Corrida eletroforética em gel de agarose a 1% para os exons 06 – 09 do receptor de hormônio tireoidiano alpha (THRA) e 06 – 10 do receptor de hormônio tireoidiano beta (THRB) da paciente 10.

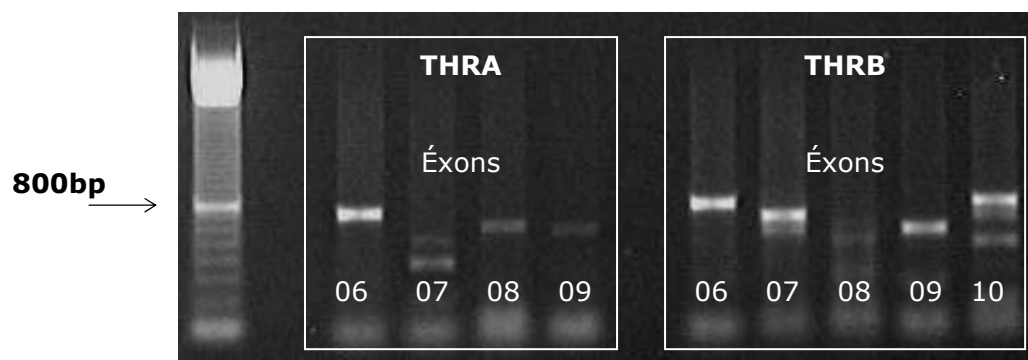


Figura 19 – Corrida eletroforética em gel de agarose a 1% para os exons 06 – 09 do receptor de hormônio tireoidiano alpha (THRA) e 06 – 10 do receptor de hormônio tireoidiano beta (THRB) da paciente 11.

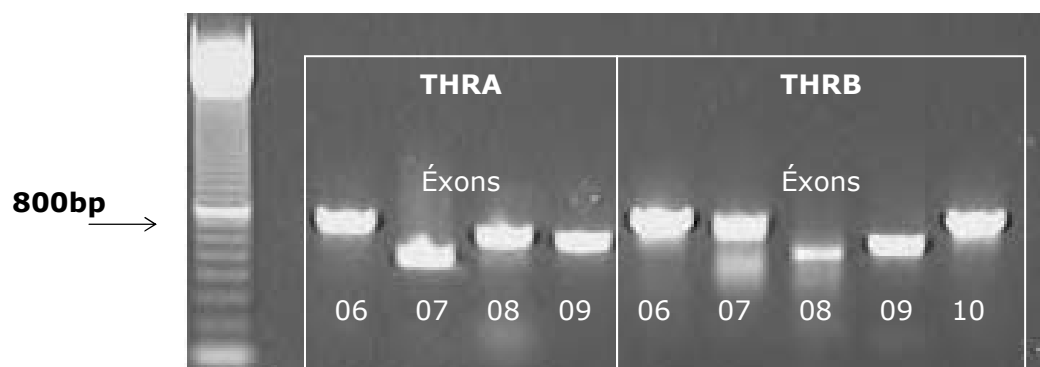


Figura 20 – Corrida eletroforética em gel de agarose a 1% para os exons 06 – 09 do receptor de hormônio tireoideano alpha (THRA) e 06 – 10 do receptor de hormônio tireoideano beta (THRB) da paciente 12.