

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**EXPRESSÃO GÊNICA E PROTÉICA DAS ISOFORMAS A E B DO
RECEPTOR DE PROGESTERONA E EXPRESSÃO PROTÉICA DO RECEPTOR
DE ESTROGÊNIO-ALFA EM AMOSTRAS DE TECIDO MAMÁRIO NORMAL E
FIBROADENOMAS**

Gisele Branchini

Orientadora: Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação como
requisito parcial para obtenção do
título de mestre em Ciências
Biológicas: Fisiologia**

Porto Alegre, 2007

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva, agradeço a confiança e o apoio em mim depositados. A presença constante de orientação com certeza tornou este trabalho muito mais fácil, e a convivência muito mais agradável. Isso sem falar na troca de conhecimento...

Agradeço especialmente minha amiga e colega de mestrado, Lolita Schneider, por dividir experimentos, dúvidas, frustrações, conquistas e alegrias. Também agradeço a amizade de Vivian Treichel Giesel, por compartilhar visões de vida e de trabalho sempre bem interessantes, e por sempre me motivar a prosseguir.

À minha grande amiga Polyana Maier, agradeço pela presença e por dividir todas as experiências da vida de graduando e pós-graduando, que não são poucas. À Idelma Pithan agradeço o companheirismo e a alegria e prontidão com que preparava todos os materiais.

Aos companheiros de laboratório, Ana Luiza Ferrari, Simone Radavelli, Vanderlei Biolchi, Adriane Pozzobon, Gisela Llobet, Patrícia Gomes, Diego Pianta, Laiza Bröse, Anita Pimentel, e os demais colegas do Hospital de Clínicas, obrigada pelo ótimo ambiente de trabalho e pelo constante apoio.

Agradeço ao Prof. Dr. Edison Capp pelas indispensáveis dicas nos experimentos e oportunidades de trocar idéias e conhecimentos. Agradeço também à Profa. Dra. Helena von Eye Corleta, pela colaboração e estímulo.

À Profa. Dra. Maria Flávia Marques Ribeiro, agradeço as importantes sugestões, que permitiram melhorar os experimentos de *Western blot* e obter resultados mais apreciáveis. E também pela troca de idéias que estimulam o amadurecimento como pessoa e como profissional.

Aos colegas de mestrado, pelas experiências didáticas que nos fazem quase parecer professores, e por partilhar sentimentos parecidos de dúvida, indecisão e de objetivos de vida.

Agradeço à Profa. Dra. Maria Luiza Saraiva Pereira e equipe, por ceder o laboratório para realização de experimentos de expressão gênica e contribuir com sugestões importantes para o trabalho. Agradeço também ao serviço de Documentação Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre por disponibilizar seu espaço para a revelação das auto-radiografias.

Especialmente agradeço o apoio, muitas vezes silencioso, mas presente, da minha família, que, mesmo sem questionar, sempre torce pelo meu sucesso e me estimula a ir em frente e perseguir meus sonhos e ideais.

Por fim, agradeço à pessoa que mais se faz presente, e, sem dúvida, é o maior estímulo para meu trabalho: meu marido, André Teixeira. Obrigada pelo apoio, carinho, compreensão dos momentos críticos e por compartilhar as alegrias e conquistas (e também tristezas e decepções) durante todo o tempo.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	2
LISTA DE ABREVIATURAS	6
LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
RESUMO	10
ABSTRACT.....	12
INTRODUÇÃO.....	14
1. Glândula Mamária.....	14
2. Fibroadenoma	18
3. Mecanismo de Ação dos Hormônios Esteróides.....	21
4. Receptores de Progesterona	24
5. Receptores de Estrogênio.....	30
Justificativa.....	31
OBJETIVOS.....	33
MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
1. Delineamento do Estudo	34
2. Pacientes	34
3. Procedimentos	35

4. Análise Estatística	46
RESULTADOS	48
1. Análise dos níveis de mRNA dos receptores de progesterona	50
2. Análise dos níveis de proteínas dos receptores de progesterona A e B	53
3. Análise dos níveis protéicos do receptor de estrogênio- α	57
4. Análises de associação	60
5. Relação PRA:PRB	61
DISCUSSÃO	63
CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
ANEXOS	80
Anexo 1	81
Anexo 2	83

LISTA DE ABREVIATURAS

A_{260} – absorvância a 260 nm
AF – domínio de transativação
 β_2 -m – beta-2-microglobulina
BSA – albumina sérica bovina
cDNA – ácido desoxirribonucléico complementar
cm – centímetros
 C_T – ciclo limiar
DBD – domínio de ligação ao DNA
DEPC - dietilpirocarbonato
DIM – seqüência para dimerização do receptor
DNA – ácido desoxirribonucléico
dNTP – deoxirribonucleotídeo
DTT – ditioneitol
ECL – quimioluminescência enzimática
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
ER – receptor de estrogênio
ERE – elemento responsivo ao esteróide
ER- α – receptor de estrogênio alfa
ER- β – receptor de estrogênio beta
FSH – hormônio folículo-estimulante
g - grama
ID – domínio inibitório
IMC – índice de massa corporal
h – hora
HCl – ácido clorídrico
HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre
H-R – complexo hormônio-receptor
HSP – proteína de choque térmico
KCl – cloreto de potássio
KDa – quilo-Dalton
Kg - quilograma
LBD – domínio de ligação ao ligante
LH – hormônio luteinizante
Log - logaritmo

M – molar
μg – micrograma
MgCl₂ – cloreto de magnésio
min – minuto
mm - milímetro
mM – milimolar
μM – micromolar
mL – mililitro
μL – microlitro
mRNA – ácido ribonucléico mensageiro
NaF – fluoreto de sódio
Na₂P₂O₇ – pirofosfato decahidrato de sódio
Na₃VO₄ – ortovanadato de sódio
NC – nitrocelulose
NET – tampão tris-EDTA-cloreto de sódio
ng – nanograma
nm – nanômetro
PAAF – punção aspirativa por agulha fina
pb – pares de bases
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PMSF – phenylmethylsulfonyl fluoride
PR – receptor de progesterona
PRA – isoforma A do receptor de progesterona
PRAB – fragmento comum nas duas isoformas do receptor de progesterona
PRB – isoforma B do receptor de progesterona
RNA – ácido ribonucléico
RT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase a partir de Transcrição Reversa
SDS – dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
T_m – temperatura de melting
U – unidades
UA – unidades arbitrárias
V – volts
x g – vezes a força da gravidade

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Programas utilizados nas reações de PCR em tempo real, para amplificação dos genes em estudo. *(página 39)*

Tabela 2. Características dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real, para amplificação de fragmentos dos genes em estudo. *(página 39)*

Tabela 3. Parâmetros clínicos e antropométricos das pacientes incluídas no estudo. *(página 45)*

Tabela 4. Estudos de associação dos dados de expressão gênica e protéica e dados clínicos das pacientes. *(página 60)*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de ação genômica dos hormônios esteróides. (*página 18*)

Figura 2. Organização estrutural das isoformas A e B do receptor de progesterona humano. (*página 21*)

Figura 3. Curva de dissociação dos produtos obtidos nas reações de PCR em tempo real. (*página 36*)

Figura 4. Curva de padronização para as reações de PCR em tempo real. (*página 37*)

Figura 5. Expressão gênica de *PRB* em tecido mamário normal e fibroadenomas. (*página 47*)

Figura 6. Expressão gênica de *PRAB* em tecido mamário normal e fibroadenomas. (*página 48*)

Figura 7. *Western blot* para os receptores de progesterona. (*página 50*)

Figura 8. Expressão protéica de PRA em tecido mamário normal e fibroadenomas. (*página 51*)

Figura 9. Expressão protéica de PRB em tecido mamário normal e fibroadenomas. (*página 52*)

Figura 10. *Western blot* para o receptor de estrogênio- α . (*página 54*)

Figura 11. Expressão protéica de ER- α em tecido mamário normal e fibroadenomas. (*página 55*)

Figura 12. Correlação da relação PRA:PRB entre tecido normal e fibroadenomas. (*página 57*)

RESUMO

Os fibroadenomas são os tumores benignos mais comuns da mama feminina, afetando principalmente mulheres jovens. Os mecanismos de crescimento e desenvolvimento destas lesões proliferativas não estão bem esclarecidos. Por terem uma influência hormonal muito semelhante à mama normal, sugere-se que os receptores de hormônios esteróides possam desempenhar um papel importante na formação destes tumores. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão gênica e protéica dos receptores de progesterona A e B (PRA e PRB) e a expressão protéica do receptor de estrogênio- α (ER- α) em amostras de fibroadenoma, comparativamente ao tecido mamário normal adjacente. Foram obtidas amostras de fibroadenomas e de tecido normal adjacente de 18 pacientes em idade reprodutiva submetidas à cirurgia para retirada de fibroadenoma. Os tecidos foram submetidos à extração de RNA total, pelo método de Chomzynski e Sacchi (1987), para análise da expressão gênica pela técnica de RT-PCR em tempo real. Também foi realizada a extração de proteínas para análise da expressão protéica pela técnica de *Western blot*. Foi ainda realizada a dosagem de progesterona e estradiol no soro das pacientes, para determinação da fase do ciclo menstrual. Não foram observadas alterações nos níveis gênicos e protéicos dos PRs e da proteína ER- α entre as fases do ciclo menstrual, tanto nos tecidos normais quanto nos fibroadenomas. Foi observada uma maior expressão protéica de ambos receptores de progesterona (A e B) nos fibroadenomas (teste *t* pareado de Student, $P=0,038$ e $P=0,031$, respectivamente), enquanto não houve variação dos níveis de mRNA dos PRs entre os dois tecidos (teste *T* de Wilcoxon, $P=0,721$ e $P=0,139$). Também não foi observada diferença significativa na expressão protéica de ER- α entre tecido normal e tumor (teste *T* de Wilcoxon, $P=0,508$). A relação entre as isoformas (PRA:PRB) não foi diferente entre os tecidos e mostrou uma forte correlação entre ambos

(correlação de Spearman, $r=0,964$, $P=0,0001$). Alterações da relação PRA:PRB são observadas na carcinogênese da glândula mamária, assim como o aumento da expressão de ER- α . Assim, nossos dados sugerem uma participação dos receptores de progesterona no crescimento e formação dos fibroadenomas, mesmo sem alteração da proporção PRA:PRB nestes tumores. A expressão protéica inalterada do receptor de estrogênio- α pode ser uma resposta característica do fibroadenoma, ao contrário do que ocorre nos cânceres de mama.

ABSTRACT

Fibroadenomas are the most common benign breast tumors, occurring mainly in young women. The mechanisms of growth and development of these proliferative lesions are not elucidate. These lumps seem to have same hormonal environment that normal breast tissue, which suggest that steroid receptors can play a role on tumor development. The objective of this study was to evaluate gene and protein expression of progesterone receptors A and B (PRA and PRB) and protein expression of estrogen receptor α (ER- α) in fibroadenomas samples, comparing to adjacent normal breast. The samples provided from 18 premenopausal women undergoing surgical removal of breast fibroadenomas. Half of each sample fragment was submitted to RNA extraction by the guanidinium thiocyanate method (Chomzynski e Sacchi, 1987) to gene expression analysis by real time RT-PCR. The remaining fragment of each sample was submitted to protein extraction to analyze protein expression by Western Blot. Progesterone and estradiol determination were carried out from serum obtained from venous blood samples collected on the same day of surgical removal of tumor. No alterations on PRs gene and protein expression and ER- α protein expression were observed between follicular and luteal phase of menstrual cycle, neither in normal breast nor in fibroadenomas. Protein levels of progesterone receptors A and B were higher in fibroadenomas as compared with normal breast (Student's paired *t* test, $P=0.038$ and $P=0.031$, respectively), while the PRs mRNA levels were similar in both tissues (Wilcoxon's *T* test, $P=0.721$ and $P=0.139$). There were no differences of ER- α protein expression between normal breast and fibroadenomas (Wilcoxon's *T* test, $P=0.508$). The ratio PRA:PRB was similar in the tissues, and also showed a strong correlation in both (Spearman's correlation, $r=0.964$, $P=0.0001$). Alterations in the ratio PRA:PRB are seen in mammary gland carcinogenesis, like higher levels of ER- α . Thus, our data suggest a

role of progesterone receptors in the growth and development of fibroadenomas, although without alterations of PRA:PRB ratio in these tumors. The absence of alterations in ER- α protein levels could be a characteristic behavior of fibroadenomas, unlike breast cancer.

INTRODUÇÃO

1. Glândula Mamária

As glândulas mamárias são consideradas, embriologicamente, glândulas sudoríparas modificadas, de origem ectodérmica (Osborne, 1999). As mamas são constituídas por um conjunto heterogêneo de epitélio (ductal e alveolar), tecido conjuntivo e tecido adiposo (estroma) (Cotran *et al.*, 1989). Seu desenvolvimento e funcionalidade são controlados pela ação combinada de hormônios esteróides e peptídicos, fatores de crescimento, além de sofrerem influência de fatores genéticos e ambientais (Lydon *et al.*, 2000; Gadow, 2004). A regulação hormonal da glândula mamária, considerando os processos de proliferação, diferenciação e apoptose, ainda não está elucidada e é motivo de controvérsia, bem como os mecanismos de transformação neoplásica e carcinogênese (Cericatto, 2002).

O desenvolvimento mamário tem início na vida embrionária, mas ocorre predominantemente no período pós-natal, e somente se completa após a primeira gestação a termo (Lydon *et al.*, 2000; Gompel *et al.*, 2001). A morfogênese da glândula mamária ocorre em estágios de desenvolvimento distintos, dependentes da idade e do estado reprodutivo (Lydon *et al.*, 2000). Na ontogênese da mama reconhecem-se quatro principais etapas anátomo-funcionais: i) mama infantil ou pré-puberal; ii) mama puberal; iii) mama gestacional e iv) mama da lactação. Desde a

infância até a menopausa, a mama passa por etapas de ativa proliferação, ramificação dos ductos e diferenciação. Durante essas etapas, a mama evolui de um ducto epitelial primário rudimentar, com ramificação limitada a curtas distâncias do mamilo e ausência de alvéolos, na mama infantil, até o desenvolvimento lóbulo-alveolar completo da glândula durante a gravidez, e produção ativa de secreção durante a lactogênese (Lydon *et al.*, 2000; Gadow, 2004). Dois principais eventos de proliferação do epitélio mamário são reconhecidos: i) a partir da puberdade, quando os ductos mamários experimentam extensa atividade mitótica que resulta em alongação e bifurcação dos ductos mamários para a periferia do estroma e formação dos brotos alveolares, associados à proliferação do estroma circunjacente; e ii) em resposta aos níveis hormonais da gravidez, além da proliferação epitelial, ocorre a diferenciação epitelial manifestada pelo desenvolvimento das estruturas alveolares secretoras que progressivamente ocupam o restante do estroma durante a gravidez, no parto e na lactação. Na remoção do estímulo de sucção no desmame, os alvéolos secretores de leite sofrem um remodelamento redutivo mediado por apoptose chamado involução (Lydon *et al.*, 2000; Cericatto, 2002; Gadow, 2004).

Assim, a mama sofre processos cíclicos de proliferação, diferenciação e involução (Lydon *et al.*, 2000; Cericatto, 2002). Todos esses processos estão sob o controle de hormônios gonadais e da prolactina, esta última estando envolvida somente durante a gravidez e a lactação nos humanos (Gompel *et al.*, 2001). A proliferação está sob controle estrogênico, como observado durante o desenvolvimento exponencial da mama imatura durante a puberdade, enquanto que o papel da progesterona ainda é motivo de debate, sendo-lhe atribuídas funções

tanto proliferativas quanto diferenciadoras (Graham e Clarke, 1997; Gompel *et al.*, 2001; Conneely *et al.*, 2003).

Mudanças substanciais na composição mamária podem ocorrer em resposta a variações hormonais como as que a mama sofre durante a gravidez e a involução após a menopausa (Gertig *et al.*, 1999). A proliferação estromal e a involução parecem ser determinadas localmente por um balanço entre proteinases e seus inibidores, e a regulação da proliferação epitelial envolve fatores estromais (Gertig *et al.*, 1999). Assim, secreções alteradas de hormônios estimulantes e/ou inibidores da proliferação celular podem resultar em crescimento celular descontrolado, diferenciado ou não, levando ao aparecimento de lesões proliferativas, tanto benignas quanto malignas (Clemons e Goss, 2001).

A glândula mamária constitui um modelo versátil para o estudo da homeostase funcional e estrutural devido aos ciclos de proliferação, diferenciação e apoptose que apresenta durante o período reprodutivo, e a relação entre os hormônios esteróides e outros fatores reguladores destes processos pode ser mais bem entendida com o avanço das técnicas de biologia molecular (Da Silva, 1998; Hansen e Bissell, 2000; Gompel *et al.*, 2001). O crescente interesse em relação à glândula mamária é justificado pela alta incidência das patologias mamárias, tanto benignas quanto malignas. No Brasil foram estimados 48.930 novos casos de câncer para o ano de 2006, sendo o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo, e o primeiro entre as mulheres (INCA, 2006). Já a incidência das doenças benignas de mama geralmente não é bem estimada, pois estas nem sempre são sintomáticas e a maioria das mulheres não tem acompanhamento médico regular. Em uma revisão de vários estudos, Goehring e Morabia estimaram que uma em

cada duas mulheres desenvolve algum grau de doença fibrocística e que uma em cada cinco mulheres pode desenvolver fibroadenoma (Goehring e Morabia, 1997).

Um dos possíveis modelos de estudo na busca de uma maior compreensão dos processos envolvidos no desenvolvimento da hiperplasia, antes da transformação neoplásica de tecidos sensíveis a hormônios, é a análise de lesões mamárias benignas, comparadas ao tecido mamário normal (Cericatto, 2002).

2. Fibroadenoma

Os fibroadenomas são os tumores mais comuns da mama feminina (Reimer *et al.*, 2000; Iglesias *et al.*, 2007), e ocorrem em cerca de 25% das mulheres assintomáticas (Goehring e Morabia, 1997; El-Wakeel e Umpleby, 2003). Este tumor afeta principalmente mulheres entre 20 e 50 anos, sendo mais freqüente na faixa etária dos 20 aos 30 anos (Simomoto *et al.*, 1999; Reimer *et al.*, 2000), podendo inclusive ser diagnosticado mais precocemente, como aos 15 anos (Courtilot *et al.*, 2005).

Os fibroadenomas são formados pela proliferação das células epiteliais (dos ductos e do tecido acinar) e estromais, formando uma massa de 2 a 3 cm de diâmetro (La Rosa *et al.*, 2001). Seu crescimento é lento e auto-limitado, e na menopausa costuma regredir em volume, tornando-se endurecido devido à calcificação e à involução fibrosa (Takei *et al.*, 1999; Tobias *et al.*, 1999).

Em muitos aspectos a influência hormonal que os fibroadenomas sofrem é semelhante à observada na mama normal (Simomoto *et al.*, 1999). Todos os elementos celulares dos fibroadenomas são normais, e o epitélio e as células mioepiteliais mantêm uma relação normal (Courtilot *et al.*, 2005). Estudos genéticos demonstraram que as células epiteliais e estromais dos fibroadenomas têm origem policlonal, confirmando tratarem-se de processos hiperplásicos, em contraste com os processos neoplásicos, cuja origem é monoclonal (Noguchi *et al.*, 1993; Noguchi *et al.*, 1995; Paradis *et al.*, 1998).

Segundo El-Wakeel e Umpleby, a presença de fibroadenomas parece não estar associada a um aumento do risco de desenvolver câncer de mama (El-Wakeel e Umpleby, 2003) e, como relatado por Franco e colaboradores, esse risco é muito baixo devido à ausência de alterações genéticas relacionadas ao câncer, como a perda de heterozigossidade e mutações no gene *p53* (Franco *et al.*, 2003). Porém, Dupont e colaboradores, em um grande estudo retrospectivo de coorte, relataram um leve aumento no risco de desenvolver câncer de mama entre mulheres com fibroadenomas, mas esse risco seria dependente de características histológicas dos fibroadenomas (Dupont *et al.*, 1994). Pacientes com fibroadenomas complexos (que contenham cistos, adenose esclerosante, calcificações epiteliais ou mudanças apócrinas papilares) ou com doença proliferativa no parênquima mamário adjacente ao fibroadenoma apresentam um risco aumentado de desenvolver câncer mamário, que se torna ainda maior quando há presença de familiares com história de câncer de mama (Dupont *et al.*, 1994). Já pacientes com fibroadenomas sem lesões complexas e sem história familiar de câncer não teriam risco de desenvolver câncer de mama aumentado pela presença do tumor benigno (Dupont *et al.*, 1994). Assim, não parece haver um consenso a respeito dos fibroadenomas representarem um fator de risco para o câncer de mama.

Os mecanismos que controlam o desenvolvimento e crescimento dos fibroadenomas não são muito bem entendidos. La Rosa e colaboradores sugerem que múltiplas vias de sinalização estão envolvidas no crescimento e diferenciação destas lesões, incluindo as dos receptores de estrogênio e progesterona e dos fatores de crescimento e seus receptores (La Rosa *et al.*, 2001). Estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa já avaliaram o papel dos proto-oncogenes *bcl-2* e *c-myc*

(Cericatto, 2002) e dos reguladores do ciclo celular p53 e p21 (Schneider, 2007) em fibroadenomas, e sugerem um envolvimento destes fatores com a formação destes tumores. Neste contexto, a análise de expressão dos receptores dos hormônios esteróides pode contribuir para o entendimento da relação destes hormônios com os demais fatores reguladores do ciclo celular, da proliferação e da diferenciação.

3. Mecanismo de Ação dos Hormônios Esteróides

O modelo clássico para descrever o mecanismo de ação dos hormônios esteróides foi proposto em 1993 por Schuchard e colaboradores, que descreve uma ação nuclear dos receptores destes hormônios. O modelo é aplicável aos receptores de estrogênios, progesterona, androgênios, glicocorticóides e mineralocorticóides. O mecanismo de ação proposto está ilustrado na figura 1. Segundo o modelo, os hormônios esteróides difundem-se através da membrana celular, formando complexos de alta afinidade com o seu receptor, resultando na ativação do mesmo. A ativação envolve mudanças conformacionais e associações proteína-proteína, que capacitam o complexo hormônio-receptor a ligar-se com alta afinidade a regiões do DNA chamadas elementos responsivos a esteróides (EREs). Esses elementos responsivos correspondem a seqüências de DNA de 15 a 20 pares de base localizadas anteriormente (*upstream*) ao sítio de início da transcrição do gene responsivo ao esteróide. Uma vez ligado a essa seqüência, o complexo hormônio-receptor atua como fator de transcrição, modulando a taxa de transcrição do gene-alvo. O modelo propõe ainda que a ligação do complexo H-R aos EREs ativa a transcrição dos chamados genes regulatórios precoces (*early genes*), cuja resposta ocorre poucos minutos após a estimulação hormonal. As proteínas codificadas por estes genes retornam ao núcleo e modulam a expressão dos chamados genes estruturais tardios (*late genes*). Esses genes codificam proteínas envolvidas no efeito biológico determinado pelo hormônio (Schuchard *et al.*, 1993).

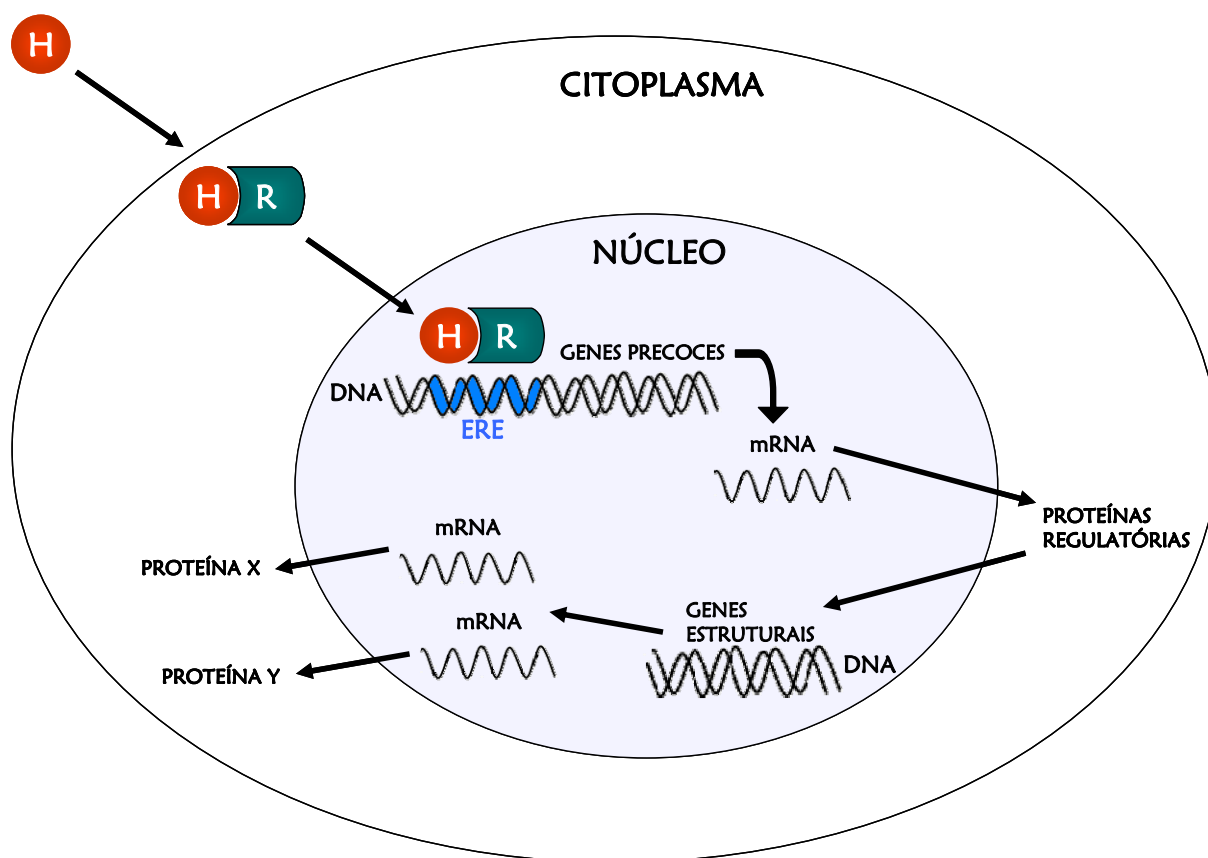


Figura 1. Mecanismo de ação genômica dos hormônios esteróides. O hormônio esteróide (H) difunde-se para dentro da célula ligando-se ao seu receptor específico (R) no núcleo ou citoplasma da célula-alvo. O complexo hormônio-receptor (HR) se liga a elementos responsivos aos hormônios esteróides (ERE) no DNA, localizados nos promotores dos genes-alvo, induzindo a transcrição imediata dos genes precoces. A proteína produzida por estes genes regula a transcrição dos genes estruturais tardios cujos produtos interferem no desenvolvimento celular (proteína X e proteína Y). Fatores de crescimento com efeitos autócrino e parácrino, além de seus receptores, também podem ser estimulados pela ligação HR-ERE. Adaptado de Schuchard *et al.*, 1993.

Estudos posteriores contribuíram para um maior esclarecimento sobre o funcionamento dos receptores de hormônios esteróides. Esses receptores caracterizam-se pela organização em domínios funcionais específicos, e apresentam diferentes graus de semelhança estrutural entre diferentes espécies (Graham e

Clarke, 2002). Os domínios funcionais incluem domínios de ligação ao hormônio (na região carboxi-terminal), de ligação ao DNA (central), domínios de transativação (na região amino-terminal), responsáveis pelo recrutamento de co-ativadores da transcrição, e ainda domínios inibitórios, responsáveis pelo recrutamento de co-repressores da transcrição gênica (Giangrande *et al.*, 2000; Takimoto *et al.*, 2003; Mulac-Jericevic e Conneely, 2004). Existem ainda domínios de dimerização, através dos quais os receptores, ligados ao hormônio, dimerizam-se, e assim formam o complexo hormônio-receptor ativado (Mulac-Jericevic e Conneely, 2004). Porém, estudos atuais questionam a necessidade de dimerização dos receptores para que sejam ativados, ficando este tema em aberto (Heneghan *et al.*, 2006). Demonstrou-se, ainda, que as regiões de ligação ao DNA e N-terminal da mesma molécula, uma vez o hormônio tendo se ligado ao receptor, interagem entre si, estabilizando o complexo e otimizando a ligação com proteínas co-regulatórias (Takimoto *et al.*, 2003).

Assim, desde o modelo proposto em 1993, diversos avanços foram feitos no entendimento dos mecanismos de ação dos hormônios esteróides através de seus receptores nucleares. Ainda, em adição ao seu papel como reguladores da transcrição gênica, os hormônios esteróides têm sido descritos exercendo efeitos sobre vias de sinalização intracelulares independentes da transcrição de genes, através de receptores de membrana (Bramley, 2003; Simoncini e Genazzani, 2003). Estes, porém, não serão abordados neste estudo.

4. Receptores de Progesterona

A progesterona possui um papel chave na regulação do desenvolvimento e da função reprodutora feminina. Dentre seus diversos efeitos, destacam-se a decidualização endometrial e o desenvolvimento de estruturas lóbulo-alveolares na glândula mamária durante o ciclo sexual feminino e a gravidez (Graham e Clarke, 1997). O principal local de síntese e secreção de progesterona, juntamente com o hormônio esteróide estradiol, é o ovário, e sua liberação é influenciada por diversos hormônios, como LH, FSH, prolactina, além de prostaglandinas e agentes β -adrenérgicos (Graham e Clarke, 1997).

Os efeitos fisiológicos da progesterona são mediados pela interação com proteínas intracelulares específicas, os receptores de progesterona (PRs) (Conneely e Lydon, 2000). Os PRs são fatores de transcrição ativados por ligante, membros da família de receptores nucleares para hormônios esteróides (Richer *et al.*, 2002). O receptor de progesterona apresenta duas isoformas, A e B (PRA e PRB), as quais são produtos de um único gene, como resultado da transcrição de dois promotores alternativos, induzidos por estrogênio, e também da tradução de dois códons de iniciação (AUG) alternativos do mRNA que codifica PRB (Kastner *et al.*, 1990; Conneely e Lydon, 2000). PRB é a maior isoforma (116KDa), possuindo uma região de 164 aminoácidos na extremidade N-terminal, não presente em PRA (94KDa) (Kastner *et al.*, 1990; Mote *et al.*, 2001).

A estrutura das duas isoformas do PR pode ser observada na figura 2. A região amino-terminal (região A/B) é a mais variável em termos de tamanho e seqüência de aminoácidos. Esta região contém domínios de transativação (AF-1 e

AF-3), que recrutam proteínas co-ativadoras do receptor, modulando o nível e a especificidade da ativação da transcrição do gene-alvo. Esta região também apresenta um domínio inibitório (ID), responsável pelo recrutamento de proteínas co-repressoras da transcrição. A região mais conservada (região C) corresponde ao domínio de ligação ao DNA (DBD), composto por duas estruturas do tipo “dedos de zinco”, que facilitam a ligação do receptor a seqüências específicas do DNA, os elementos responsivos. Um domínio extremamente conservado de ligação ao ligante (LBD) está localizado na região carboxi-terminal, que contém ainda um domínio de transativação adicional (AF-2), necessário para o recrutamento de co-ativadores, dependente do hormônio. Existem ainda seqüências importantes para interação dos receptores inativos com proteínas de choque térmico (*HSP – heat shock proteins*) e para dimerização do receptor (DIM) (Mulac-Jericevic e Conneely, 2004).

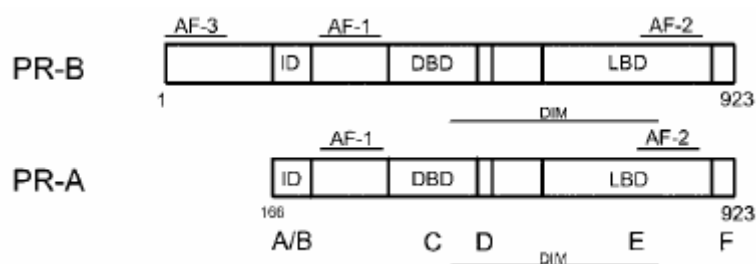


Figura 2. Organização estrutural das isoformas A e B do receptor de progesterona humano. Os números indicam a posição dos aminoácidos em cada proteína. AF-1, AF-2 e AF-3 são domínios de transativação; DBD: domínio de ligação ao DNA; LBD: domínio de ligação ao ligante; ID: domínio inibitório; DIM: seqüências importantes para a dimerização do receptor. (Mulac-Jericevic e Conneely, 2004).

Receptores de progesterona recém-traduzidos no citoplasma são montados em um complexo multiprotéico inativo, interagindo com chaperonas, que se dissocia

com a ligação do hormônio e conseqüente ativação do receptor (Graham e Clarke, 2002). A ligação da progesterona induz mudanças conformacionais no receptor que resultam: i) em dimerização de dois complexos hormônio-receptor; ii) aumento da fosforilação do receptor; iii) ligação dos dímeros aos elementos responsivos à progesterona presentes nos genes-alvo; e iv) interação do complexo hormônio-receptor com proteínas co-ativadoras e co-repressoras específicas e fatores de transcrição em geral, para formar um complexo de iniciação da transcrição nos promotores dos genes-alvo (Conneely e Lydon, 2000). PRA e PRB podem atuar como homodímeros ou heterodímeros, os quais são considerados funcionalmente diferentes (Graham *et al.*, 2005).

Por outro lado, como citado por Jacobsen e colaboradores, embora os PRs sejam classicamente definidos como "fatores de transcrição ativados por ligantes", eles também influenciam a expressão gênica na ausência de progesterona (Jacobsen *et al.*, 2005). Este mesmo grupo demonstrou que o PRA seria a isoforma dominante dos "receptores independentes do ligante" (Jacobsen *et al.*, 2005), o que foi igualmente demonstrado pelo grupo de Sartorius e colaboradores (Sartorius *et al.*, 2003). Outros receptores esteróides, como receptores de androgênios e estrogênios também são ativados de maneira independente do ligante (Cenni e Picard, 1999). Esses efeitos dos receptores esteróides não são usuais, sendo seus mecanismos ainda incertos, mas podem auxiliar no entendimento da ação dos PRs no desenvolvimento de tumores, uma vez que a inibição direta da expressão dos PRs por oligonucleotídeos antisense induziu uma inibição do crescimento de tumores mamários murinos, conforme descrito por Lamb e colaboradores (Lamb *et al.*, 2005).

PRA e PRB são expressos em tecidos-alvo da progesterona em níveis comparáveis, e a proporção PRA:PRB tem sido sugerida influenciando as ações biológicas da progesterona (Ariga *et al.*, 2001). A contribuição específica de cada uma das isoformas aos efeitos regulatórios da progesterona irá depender das propriedades diferenciais de transativação fornecidas aos complexos hormônio-receptor dimerizados pelo domínio N-terminal específico de PRB (Lydon *et al.*, 2000). Assim, a expressão relativa das isoformas na glândula mamária e em outros tecidos-alvo provavelmente tem um impacto significativo sobre as respostas funcionais à progesterona (Lydon *et al.*, 2000).

Os PRs são essenciais para o desenvolvimento da glândula mamária, tanto na puberdade quanto na gravidez, quando são necessários para proliferação dos ductos e diferenciação lóbulo-alveolar (Conneely *et al.*, 2003). Investigações morfológicas e análises moleculares demonstraram que há um envolvimento proliferativo e diferenciador da progesterona na mama, através da regulação de genes do ciclo celular, fatores de crescimento e seus receptores (Graham e Clarke, 1997; Conneely e Lydon, 2000; Lydon *et al.*, 2000). Estudos com camundongos *knock-out* para as isoformas dos receptores de progesterona demonstraram que, na ausência de PRA, PRB é suficiente para ativar os processos normais de proliferação e diferenciação no epitélio mamário em resposta à progesterona, e nenhum dos processos parece necessitar da expressão de PRA (Conneely *et al.*, 2003). Já na ausência de PRB, a ramificação dos ductos mamários e o desenvolvimento lóbulo-alveolar associados à gravidez são marcadamente reduzidos, como consequência do decréscimo da proliferação celular e da sobrevivência do epitélio alveolar (Conneely *et al.*, 2003).

Richer e colaboradores demonstraram que PRA e PRB regulam diferentes subgrupos de genes, e embora PRB seja transcricionalmente mais ativo, existem genes que são unicamente regulados por PRA (Richer *et al.*, 2002). PRB tem sido descrito como um forte ativador da transcrição de genes regulados pela progesterona, em vários tipos celulares nos quais PRA é inativo, enquanto que PRA parece diminuir a responsividade de genes específicos à progesterona, tendo uma capacidade repressora não só sobre o PRB, mas também sobre outros receptores esteróides (Conneely e Lydon, 2000; Mote *et al.*, 2002). Assim, sugere-se que PRB tende a ser um forte ativador de genes-alvo, e PRA atuaria como repressor dominante de PRB, sugerindo que uma alta expressão de PRA pode reduzir a responsividade à progesterona nos tecidos-alvo (Graham e Clarke, 1997). Porém, estudos mais recentes demonstraram que os efeitos da progesterona sobre a expressão de genes não foi diferente em células com predominância de PRA quando comparadas a células expressando níveis equivalentes de PRA e PRB, indicando que PRA não atua como inibidor dominante da atividade de PRB (Graham *et al.*, 2005).

No câncer de mama, a expressão equivalente de PRA e PRB vista em células normais é quebrada precocemente na carcinogênese, e a predominância de uma das isoformas é comum, sendo observados altos níveis de PRA (Graham e Clarke, 2002; Mote *et al.*, 2002). Isso demonstra que há uma regulação coordenada da expressão das duas isoformas em células mamárias normais, e que o balanço da expressão dos dois receptores é importante para o desenvolvimento normal da glândula mamária (Mote *et al.*, 2002; Graham *et al.*, 2005). Ariga e colaboradores mostraram que em algumas lesões proliferativas benignas de mama as isoformas

dos PRs mantêm-se em níveis iguais (Ariga *et al.*, 2001). A análise da expressão dos PRs em fibroadenomas, comparativamente ao tecido normal, pode contribuir para o entendimento das funções de cada isoforma na proliferação mamária.

5. Receptores de Estrogênio

Assim como a progesterona, os estrogênios desempenham papéis fundamentais no trato reprodutor, na glândula mamária e também no sistema nervoso (Lanari e Molinolo, 2002). A função mais bem estudada do estrogênio é a estimulação da proliferação do endométrio uterino após a menstruação e indução da expressão dos receptores de progesterona (Lanari e Molinolo, 2002), mas esse hormônio também é essencial para o desenvolvimento normal da glândula mamária, estimulando a proliferação dos ductos mamários (Mote *et al.*, 2002).

Em contraste aos PRs, os dois tipos de receptores de estrogênio, chamados ER- α e ER- β , são transcritos a partir de diferentes genes e apresentam distribuição distinta nos tecidos, assim como diferentes papéis fisiológicos (Saji *et al.*, 2002; Sartorius *et al.*, 2003). Como os receptores de progesterona, esses receptores pertencem à família de receptores nucleares de hormônios esteróides, e atuam como fatores de transcrição ligando-se a elementos responsivos ao estrogênio nos promotores dos genes-alvo (Palmieri *et al.*, 2002). Assim, os ERs apresentam a mesma estrutura de domínios funcionais dos PRs, já descrita anteriormente.

ER- α e ER- β apresentam homologia de cerca de 95% de entre seus domínios de ligação ao DNA, e de aproximadamente 60% entre seus domínios de ligação ao ligante, o que confere propriedades diferenciadas de ligação do hormônio aos dois receptores (Enmark e Gustafsson, 1999; Saji *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003). Assim, a responsividade de um tecido ou de um tipo celular expressando somente um dos tipos de receptor ou ambos pode variar, conforme a formação de homodímeros ou heterodímeros (Enmark e Gustafsson, 1999; Li *et al.*, 2003).

Segundo Palmieri e colaboradores, parece haver uma diferença fundamental entre o epitélio mamário normal e linhagens de células de carcinoma mamário na sua responsividade ao estrogênio (Palmieri *et al.*, 2002). A expressão de ER- α é intimamente associada à biologia do câncer mamário, especialmente com o desenvolvimento de tumores (Hayashi *et al.*, 2003), e o aumento da expressão de ER- α em relação a ER- β pode promover mudanças neoplásicas no epitélio ovariano normal (Li *et al.*, 2003). Speirs e colaboradores demonstraram que, na glândula mamária, a expressão de ER- α está restrita ao núcleo das células epiteliais dos ductos e lóbulos, e que ER- β também é expresso nestas células, mas está presente em maior quantidade nos núcleos das células mioepiteliais (Speirs *et al.*, 2002). Estes autores sugerem um papel de supressor de tumor natural para o ER- β , uma vez que as células mioepiteliais atuam como uma barreira natural que separa as células epiteliais que apresentam proliferação do estroma mamário, e que raramente sofrem transformação (Speirs *et al.*, 2002). Cericatto e colaboradores relataram uma maior expressão gênica de ER- α em fibroadenomas em relação ao tecido mamário normal (Cericatto *et al.*, 2005).

Justificativa

Está bem estabelecido que as concentrações dos PRs variam de acordo com a fase do ciclo menstrual no endométrio, e que estas mudanças estão relacionadas com os efeitos conhecidos do estrogênio e da progesterona sobre a expressão de PR, sendo que altos níveis de estrogênio na fase proliferativa induzem a síntese de PR, e a progesterona atua diminuindo a expressão do seu próprio receptor na fase

secretora (Mote *et al.*, 1999). Na glândula mamária, porém, a variação dos níveis de PRs não é tão clara, e parece não haver um efeito importante dos hormônios ovarianos da regulação dos níveis dos receptores de progesterona (Mote *et al.*, 2002). Do mesmo modo, é conhecido que os PRs regulam a expressão de ER- α , e a progesterona atua diminuindo a sua expressão, bem como dos seus próprios receptores (Speirs *et al.*, 2002). No endométrio, os PRs estão correlacionados significativamente com o ER- α , mas não com ER- β . Na glândula mamária, porém, faltam dados sobre a interação destes receptores, uma vez que não está bem claro como a ciclicidade dos hormônios ovarianos atua na regulação dos níveis destas proteínas. Como relatado por Gompel e colaboradores, é possível que a grande quantidade de tecido adiposo presente no estroma mamário possa interferir na difusão dos hormônios esteróides do plasma para o compartimento glandular, tornando-a progressivamente mais lenta, induzindo assim uma perda de ciclicidade no fluxo hormonal local (Gompel *et al.*, 2004). Assim, o estudo da expressão gênica e protéica de PRA, PRB e ER- α na mama normal e em lesões benignas proliferativas, como os fibroadenomas, pode contribuir para um melhor entendimento da ação dos hormônios esteróides na regulação da proliferação e diferenciação mamária.

OBJETIVOS

Determinar os níveis de mRNA das isoformas A e B do receptor de progesterona, bem como os níveis protéicos de PRA, PRB e do receptor de estrogênio- α , em fibroadenomas e tecido mamário normal circunjacente de mulheres em idade reprodutiva. Verificar possíveis associações com variáveis clínicas das pacientes e níveis séricos de progesterona e estradiol.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Delineamento do Estudo

O presente estudo trata-se de um estudo transversal.

2. Pacientes

Foram convidadas a participar do estudo pacientes atendidas pelo Serviço de Mastologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), com procedimento cirúrgico agendado por nódulos mamários, sugestivos de fibroadenoma, no período de agosto de 2006 a julho de 2007.

2.1. Critérios de Inclusão

- pacientes com nódulos sugestivos de fibroadenoma;
- os nódulos devem ter sido avaliados clinicamente, por exames de imagem (ecografia e/ou mamografia) e/ou por punção aspirativa por agulha fina (PAAF), e ter seu diagnóstico de fibroadenoma por exame anátomo-patológico;
- mulheres na menacme (período reprodutivo);
- informações sobre os antecedentes gineco-obstétricos disponíveis, incluindo a data da última menstruação e tipo de método contraceptivo em uso.

2.2. Critérios de Exclusão

- pacientes que ao exame anátomo-patológico não tenham confirmado a impressão pré-operatória de fibroadenoma;
- mulheres na menacme, mas em amenorréia (ausência de menstruação).

2.3. Cálculo do Tamanho da Amostra

O cálculo do tamanho da amostra foi baseado em um estudo anterior do mesmo grupo de pesquisa que utilizou PCR semi-quantitativo para análise da expressão gênica (Cericatto *et al.*, 2005). Considerando-se um poder de 90%, nível de significância de 0,05 e diferença entre médias de expressão de mRNA de 0,5 unidades arbitrárias, o número necessário foi de 14 pacientes.

2.4. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

As pacientes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1) concordando em participar do estudo, doando uma amostra do tumor removido cirurgicamente, uma amostra do tecido normal circunjacente e 10 mL de sangue venoso para análises hormonais.

3. Procedimentos

3.1. Coleta das amostras

As pacientes selecionadas que concordaram em participar do estudo foram submetidas a um recordatório (em consultório, anteriormente à cirurgia) para obtenção de dados antropométricos e de história ginecológica e obstétrica (Anexo 2).

Foram incluídas neste estudo 19 pacientes, as quais foram atendidas no Serviço de Mastologia do HCPA. As amostras foram coletadas no centro cirúrgico, onde as pacientes foram submetidas à remoção cirúrgica de nódulos sugestivos de fibroadenomas. Foram obtidos fragmentos da área central do fibroadenoma e fragmentos de tecido mamário normal adjacente, separados pelo cirurgião responsável, participante deste estudo, e o restante do material foi encaminhado ao exame anátomo-patológico. Os fragmentos foram acondicionados em microtubos devidamente identificados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido, e transferidos para um freezer -80°C para posterior extração de RNA total e proteínas. Uma das pacientes foi excluída das análises por não ter seu diagnóstico de fibroadenoma confirmado pelo exame anátomo-patológico.

Dez mL de sangue venoso foram coletados para obtenção do soro para dosagens hormonais de progesterona e estradiol, pelo método de eletroquimioluminescência.

3.2. Análise da expressão gênica

3.2.1. Extração do RNA total

As amostras foram submetidas à extração de RNA total pelo método da guanidina-tiocianato-fenol-clorofórmio, ou solução “D”, de Chomczynski e Sacchi (Chomczynski e Sacchi, 1987). Metade do fragmento do tecido congelado foi colocada em um tubo de vidro (5 mL) com 1 mL de solução “D” (tiocianato de guanidida 2 M; citrato de sódio 25 mM pH 7,0; sarcosyl 0,5% e 2-β-mercaptoetanol 0,1 M) e homogeneizado. O homogenato foi transferido para um tubo *ependorf* de 2 mL, ao qual foi acrescentado 50 µL de acetato de sódio 2 M pH 4,0 e agitado por

inversão. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL de fenol pH 5-6, agitou-se por inversão e adicionou-se 0,1 mL de clorofórmio:isoamílico (49:1), e a solução foi agitada vigorosamente em vórtex por 10 s, seguindo-se um período de incubação no gelo de 15 min. A solução foi então centrifugada a 10.000 x g por 20 min a 4°C. O sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para outro tubo de 2 mL, ao qual foi adicionado 1 mL de isopropanol, e incubado a -20°C por no mínimo 1 h. Após, o material foi centrifugado a 14.800 x g por 15 min a 4°C, sendo descartado o sobrenadante e o precipitado (*pellet*) dissolvido em 0,3 mL de solução “D”, e adicionado em seguida 1 mL de isopropanol, seguindo-se um período de precipitação do RNA *overnight* a -20°C. Após este período, o material foi centrifugado a 10.000 x g por 20 min a 4°C, o sobrenadante descartado e o RNA precipitado foi lavado com etanol 75%, sendo centrifugado a 10.000 x g por 8 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco em temperatura ambiente. O RNA foi dissolvido em volume variável (12 a 20 µL) de água ultrapura tratada com DEPC (*diethylpyrocarbonate*), incubado por 10 min a 65°C e em seguida por 1 min no gelo, para posterior quantificação e estocagem a -20°C.

3.2.2. Quantificação do RNA

Alíquotas de 1 µL do RNA dissolvido foram diluídas com 499 µL de água com DEPC e lidas em duplicata em um espectrofotômetro para ácidos nucleicos (GeneQuant), nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A pureza do RNA foi considerada satisfatória quando a razão das absorbâncias a 260 e 280 nm (ratio – calculada pelo equipamento) foi superior a 1,6. A concentração de RNA na solução original foi calculada pela seguinte fórmula (considerando-se que uma unidade de absorbância a 260 nm corresponde a 40 µg de RNA por mL de solução):

$$[\text{RNA}] = A_{260} \times D \times 40 \mu\text{g/mL}$$

Onde: A = absorvância a 260 nm e D = diluição da alíquota usada para quantificação (neste caso, D = 500, pois 1 μL do RNA foi diluído com 499 μL de água).

3.2.3. Reação em Cadeia da Polimerase a partir de Transcrição Reversa em Tempo Real – *Real-Time* RT-PCR

A avaliação da expressão do mRNA das isoformas do receptor de progesterona foi realizada a partir da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real a partir de Transcrição Reversa. A técnica consiste de duas etapas, sendo a primeira a transcrição reversa do RNA mensageiro a DNA complementar (cDNA), o qual é submetido à Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real, que permite a quantificação do cDNA submetido à amplificação pela enzima Taq DNA Polimerase.

Síntese do cDNA

A síntese do cDNA das amostras foi feita a partir de 2 μg de RNA total, utilizando-se um oligonucleotídeo (*primer*) complementar à cauda poli-A característica do mRNA, produzindo-se um cDNA exclusivamente a partir do mRNA. Considerando que a fração do RNA total que corresponde ao mRNA é de aproximadamente 2 a 3%, estimou-se que 2 μg de RNA total dariam origem a 40 ng de cDNA, com uma concentração de 2ng/ μL . O kit usado foi o *Super Script First-Strand Synthesis System* for RT-PCR (Invitrogen – Life Technologies). O RNA foi inicialmente desnaturado a 65°C por 5 min juntamente com o *primer* Oligo(DT)₁₂₋₁₈ e os deoxirribonucleotídeos (dNTPS). Em seguida, adicionou-se uma mistura contendo

tampão Tris-HCl 200 mM pH 8,4 com KCl 50 mM, MgCl₂ 25 mM, ditioneitol (DTT) 0,1 M e 40 unidades da enzima RNase OUT, sendo incubado a 42°C por 2 min. Após a adição de 50U da enzima transcriptase reversa, seguiu-se um período de incubação a 42°C por 50 min. A seguir, a atividade enzimática foi inibida por um período de incubação a 70°C por 15 min. Para degradação do RNA remanescente no tubo, foram adicionadas 2U da enzima RNase H de *E. coli*, incubando-se a 37°C por 20 min. A síntese do cDNA totalizou um volume de 20 µL, que foi armazenado a -20°C até a amplificação por PCR.

PCR em Tempo Real

Trata-se de uma técnica bastante sensível que utiliza um sistema de detecção contínua da cinética da reação de RT-PCR por fluorescência (Bustin, 2000). Entre as variações da técnica disponíveis, optamos pela utilização do corante fluorescente *SYBR Green I* (Morrison *et al.*, 1998), utilizando o reagente *Power Sybr Green Master Mix* (Applied Biosystems).

O corante *SYBR Green I* se liga à fita dupla de DNA com um aumento de 800 a 1000 vezes na fluorescência. Como o corante liga-se a qualquer fita dupla de DNA, foram realizadas as chamadas curvas de desnaturação ou dissociação (*melting-Tm*), ou seja, curvas de fluorescência em função da temperatura. Com isso conseguiu-se obter a especificidade do produto amplificado, uma vez que a *Tm* é fortemente dependente da composição dos nucleotídeos. Produtos de amplificação que não correspondem ao esperado apresentam picos de desnaturação mais baixos. A figura 3 ilustra uma curva de dissociação obtida em uma das reações de PCR em tempo real para o mRNA de PRB.

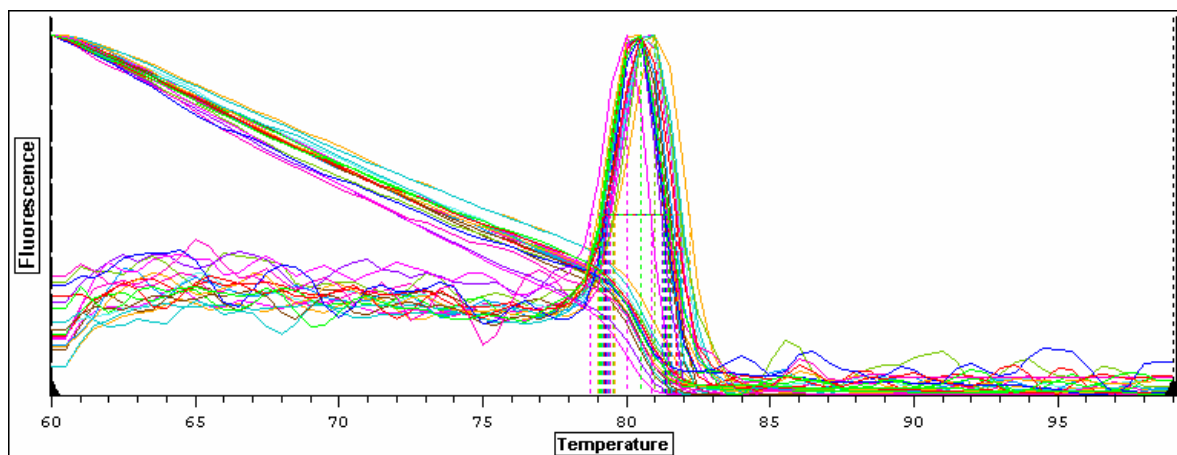


Figura 3. Curva de dissociação dos produtos obtidos nas reações de PCR em tempo real. Esta curva corresponde à do produto da amplificação da reação para o mRNA de PRB. A curva foi construída com aumentos gradativos de 0,5°C, entre 60 e 99°C. A fluorescência foi lida por 10s.

Curva de Padronização

Para cada gene em estudo foi realizada uma curva de padronização, através da qual foram calculados os valores (em ng) das amostras. A curva de padronização foi obtida através de reações de RT-PCR feitas a partir de diluições seriadas de cDNA de fibroadenomas (de 0,0002 ng a 2 ng). Cada diluição do cDNA foi feita em triplicata, juntamente com as amostras. As diluições foram escolhidas dentro de uma faixa que incluía o valor esperado para o mRNA nas amostras. O momento em que ocorre o aumento exponencial da fluorescência é definido como o C_T , que é inversamente proporcional ao logaritmo (log) da quantidade de cDNA (ng) (Higuchi *et al.*, 1993). Portanto, a curva de padronização é gerada jogando-se os valores de C_T , num intervalo de 95% de confiança, contra a intensidade da fluorescência do *SYBR Green I*, correspondendo ao logaritmo das ng de cDNA. A figura 4 ilustra uma

curva de padronização utilizada em uma das reações de PCR em tempo real para o mRNA do PRB.

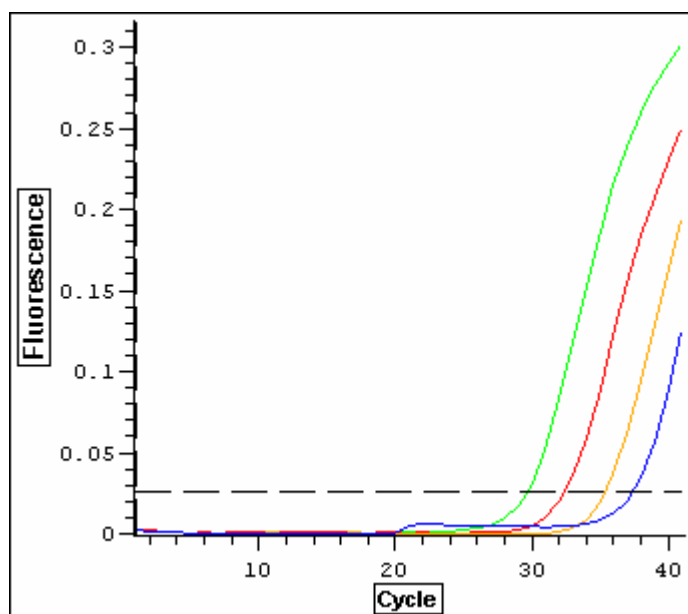


Figura 4. Curva de padronização para as reações de PCR em tempo real. Foram utilizadas diluições seriadas de cDNA, sendo que as curvas correspondem, da esquerda para a direita, a 2, 0,2, 0,02 e 0,002 ng de cDNA, respectivamente. Observa-se que, quanto menos amostra presente na reação, mais tardio é o aumento exponencial da fluorescência.

Curva de Normalização

Para minimizar possíveis variações de massa entre as amostras, nos procedimentos experimentais, foi amplificado simultaneamente ao gene de interesse um gene normalizador. O gene normalizador ou constitutivo é um gene expresso em níveis constantes entre os diferentes tecidos de um organismo, em todos os estágios do desenvolvimento não sofrendo alteração pelos tratamentos experimentais. Neste trabalho foi utilizado como gene constitutivo o da β_2 -microglobulina (β_2 -m) (Taplin *et al.*, 1995), amplificado da mesma forma que o gene de interesse (curva padrão de 0,0002 a 2 ng de cDNA). Em cada reação realizada para a amplificação do gene de

interesse foi feita a amplificação do gene constitutivo, minimizando assim as variações de pipetagem. Os resultados foram expressos como a relação gene de interesse/ β 2-microglobulina, em unidades arbitrárias.

Protocolo geral da RT-PCR em tempo real

As condições da reação de PCR para cada gene foram padronizadas, antes de proceder-se à quantificação das amostras. Foram testados: concentração e temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos e duração de cada etapa do ciclo. A concentração final dos oligonucleotídeos em cada reação foi de 100 nM, e os programas utilizados para amplificação de cada gene estão listados na tabela 1. A tabela 2 lista as características dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes em estudo.

O reagente *Power Sybr Green Master Mix* é fornecido a uma concentração de 2X. A *mix* é otimizada para reações com o reagente *SYBR Green*, e contém: corante *SYBR Green I*; AmpliTaq Gold DNA Polimerase, LD; dNTPS; solução tampão com concentrações otimizadas de seus componentes (Tris-HCl, KCl e MgCl₂). Assim, as reações foram realizadas adicionando-se, para cada amostra, 12,5 μ L deste reagente, 0,25 μ L da solução de uso de cada oligonucleotídeo (10 μ M), 2 μ L da amostra e 10 μ L de água, totalizando um volume final de 25 μ L. As amostras foram amplificadas no equipamento DNA Engine Opticon (MJ Research, EUA).

As leituras de fluorescência emitidas por cada amostra nas reações foram feitas ao final de cada ciclo. As reações foram realizadas com 40 ciclos, mas a quantificação das amostras foi realizada durante o início do aumento exponencial da fluorescência (C_T limiar), conforme descrito anteriormente.

Tabela 1. Programas utilizados nas reações de PCR em tempo real, para amplificação dos genes em estudo.

Gene	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Ciclos	T°de Melting (valor aproximado)
<i>β₂m</i>	-	-	-	-	77°C
<i>PRB</i>	94°C 50s	59°C 40s	72°C 45s	40	80°C
<i>PRAB*</i>	94°C 45s	56°C 30s	72°C 45s	40	81°C

* *PRAB* – fragmento comum às duas isoformas do receptor de progesterona. Por diferirem apenas na região N-terminal da proteína *PRB*, não é possível avaliar a expressão gênica de *PRA* isoladamente. Assim, utiliza-se a denominação *PRAB*, que indica a análise da expressão de ambos os mRNAs codificadores de *PRA* e *PRB*.

Tabela 2. Características dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real, para amplificação de fragmentos dos genes em estudo.

Gene	Sequência sintetizada	Fragmento	Referência
<i>β₂m</i>			
<i>sense</i>	5"CTATCCAGCGTACTCCAAAG 3'	168 pb	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
<i>antisense</i>	5"ACAAGTCTGAATGCTCCACT 3'		
<i>PRB</i>			
<i>sense</i>	5'GCCAGACCTCGGACACCTT3'	77 pb	(Sakaguchi <i>et al.</i> , 2004)
<i>antisense</i>	5'CAGGGCCGAGGGAAGAGTAG3'		
<i>PRAB</i>			
<i>sense</i>	5'AGAGCACTGGATGCTGTTGCT3'	68 pb	(Sakaguchi <i>et al.</i> , 2004)
<i>antisense</i>	5'TGGCTTAGGGCTTGGCTTT3'		

3.3. Análise da expressão protéica

3.3.1 Extração de Proteínas

Para extração das proteínas, a outra metade do fragmento de tecido congelado (aproximadamente 0,2 g) foi homogeneizada por 30 s com 0,5 mL de uma solução tampão de lise contendo Tris 10mM pH 7,4, EDTA 1mM pH 7,4 PMSF 1 mM, NaF 100 mM, Na₂P₂O₇ 10 mM, Na₃VO₄ 2mM e Triton X-100 1%. O material foi solubilizado por 16 h a 4°C, e após foi centrifugado a 12.000 x g por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo, foi realizada a dosagem de proteínas pelo método de Bradford (Bradford, 1976), e o material estocado a -20°C para análise da expressão protéica pelo método de *Western Blot*.

3.3.2. Western Blot

Para separação das proteínas foi utilizado o SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio) com uma concentração de poliacrilamida de 10%. Aproximadamente 50 µg da proteína extraída das amostras foram incubadas com solução de Laemmli (glicerol 50%, SDS 10%, Tris 62,5 mM, azul de bromofenol 0,1% e 2-β-mercaptoetanol 0,05%) a 95°C por 10 min (Laemmli, 1970), e adicionadas em cada poço do gel. A eletroforese foi efetuada na presença de tampão contendo glicina 192 mM, Tris 25 mM e SDS 0,1%, pH 8,3. As proteínas migraram no gel por aproximadamente 2 h e 30 min, submetidas a uma diferença de potencial elétrico de 120 V. A corrida das proteínas foi monitorada pelo azul de bromofenol, presente no tampão de amostra e pelo marcador de peso molecular. O equipamento utilizado foi o Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis Cell (BioRad, EUA).

Depois de efetuada a eletroforese, o gel de poliacrilamida foi retirado das placas de vidro e colocado no módulo de eletrotransferência em contato com a membrana de nitrocelulose, coberto com tampão de transferência (glicina 192 mM, Tris 25 mM, SDS 0,1% e metanol 20%, pH 8,3). A transferência foi efetuada no sistema Mini Trans-Blot Cell (BioRad, EUA), por 1 h e 30 min, com uma diferença de potencial elétrico de aproximadamente 80 V.

As membranas de nitrocelulose (NC) contendo as proteínas foram então incubadas durante 1 hora em solução bloqueadora (NET), contendo NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Tris 50 mM, Tween 20 0,05%, pH 7,4, acrescido de 2% de albumina sérica bovina (BSA). Esta solução satura sítios de ligação inespecíficos na membrana de nitrocelulose.

Após o bloqueio, as membranas de NC foram incubadas por, no mínimo, 16 h a 4°C, sob agitação constante, com os anticorpos específicos diluídos em NET (anti-PRs 1:500 e anti-ER- α 1:500, Santa Cruz Biotechnology, EUA). Após a incubação, as membranas foram lavadas com NET + BSA 1% (5 lavagens de 10 min cada) e então incubadas com o segundo anticorpo (IgG *goat anti-mouse* 1:15000, Zymed, EUA) conjugado com a enzima *horseradish peroxidase* por 1 h a 4°C. Após, as membranas foram novamente lavadas com NET sem Tween + BSA 1% (5 lavagens de 10 min cada). Finalmente, as membranas foram incubadas com solução para quimioluminescência (ECL) por 1 min, em sala escura.

Após a incubação com a solução para quimioluminescência, as membranas de NC foram colocadas em contato com o filme fotográfico (Immunodetection CL-XPosure Film – Pierce Biotechnology, EUA), de 30 s a 5 min. Para revelação, o filme foi colocado em solução reveladora por 1 min, lavado em água, colocado na solução

fixadora por mais 1 min, e novamente lavado em água, deixando-se secar em seguida. Após a revelação, seguiram-se a visualização e a análise dos resultados.

A densidade ótica das bandas foi medida por um sistema de processamento de imagem (ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech, EUA). A densitometria obtida para as bandas de PRA, PRB e ER- α foi corrigida pela quantidade total de proteína presente na membrana de NC obtida pela coloração com *Red Ponceau S*, sendo os resultados expressos em unidades arbitrárias.

3.4. Dosagens Hormonais

Os níveis séricos de progesterona e estradiol foram obtidos junto ao serviço de Patologia Clínica do HCPA, pelo método de eletroquimioluminescência (Kit de reagentes Elecsys Progesterone II e Elecsys Estradiol, Roche, e equipamento Modular Roche, Suíça).

4. Análise Estatística

Para cada amostra, os dados obtidos de expressão gênica e expressão protéica foram expressos como média \pm desvio padrão da média (DP) quando apresentaram distribuição normal, ou como mediana e intervalos interquartis quando não apresentaram distribuição normal. Os resultados foram avaliados quantitativamente, pelos testes: *t* de Student para amostras pareadas, *T* de Wilcoxon, além de correlação de Spearman para avaliar a relação PRA:PRB entre tecido normal e fibroadenoma, e também para avaliar associações entre os dados de expressão gênica e protéica e parâmetros clínicos das pacientes (descritos como média \pm DP).

Foi considerado o nível de significância quando $P < 0,05$. Todas as análises foram feitas utilizando-se o processador de dados SPSS 14.0 (*Statistical Packages for the Social Sciences*, EUA).

RESULTADOS

Foram incluídas neste estudo 19 pacientes. Destas, uma foi excluída pelo tumor ter sido diagnosticado ao anátomo-patológico como do tipo *Phyllodes*. Das 18 restantes, 6 não apresentaram boa qualidade do RNA, e, portanto não foram utilizadas nas análises de expressão gênica. Seis também apresentaram quantidade insuficiente de proteínas para realização da técnica de *Western blot*. Assim, os valores de N variam de análise para análise, de acordo com a qualidade de RNA e proteínas obtida, e com a qualidade dos dados obtidos nas técnicas de avaliação da expressão de ambos. Para cada teste estatístico foi realizado um cálculo de poder, e as amostras excluídas nas análises por má qualidade do material obtido não prejudicaram o poder discriminatório dos mesmos.

Das 18 pacientes incluídas no estudo, 4 já tiveram gestação a termo, 10 apresentavam apenas um fibroadenoma e 8 apresentavam dois ou mais nódulos. Seis pacientes faziam uso de método anticoncepcional hormonal, 9 encontravam-se na fase folicular do ciclo menstrual, e 3 na fase lútea. A tabela 3 apresenta os dados clínicos e antropométricos das pacientes.

Tabela 3. Parâmetros clínicos e antropométricos das pacientes incluídas no estudo.

	Média ± DP
Número de casos	18
Idade (anos)	24,1 ± 7,3
Idade da menarca (anos)	12,71 ± 1,1
IMC (kg/m ²)	20,87 ± 2,8
Diâmetro do nódulo (cm)	1,96 ± 0,8

1. Análise dos níveis de mRNA dos receptores de progesterona

Os resultados da expressão de mRNA foram obtidos por reação de PCR em tempo real a partir de transcrição reversa. Os genes em estudo e o gene constitutivo da β_2 -microglobulina foram quantificados em ng e os resultados expressos como mediana e intervalo interquartis (25-75) em unidades arbitrárias como a relação *PRB*/ β_2 -microglobulina e *PRAB*/ β_2 -microglobulina.

A expressão do mRNA do *PRB* foi avaliada em tecido mamário normal [2,359 (0,60-3,11)] e em fibroadenoma [0,259 (0,11-1,46)] não mostrando diferença significativa na sua expressão entre estes tecidos (Teste *T* de Wilcoxon, $P=0,139$). Estes dados são apresentados na figura 5 como valores individuais de expressão gênica e mediana.

A figura 6 representa a expressão do mRNA do *PRAB* em tecido normal [1,787 (0,47-3,34)] e em fibroadenoma [0,535 (0,16-3,38)], como valores individuais de expressão gênica e mediana. Não houve diferença significativa de expressão deste gene quando comparados os dois tecidos (Teste *T* de Wilcoxon, $P=0,721$).

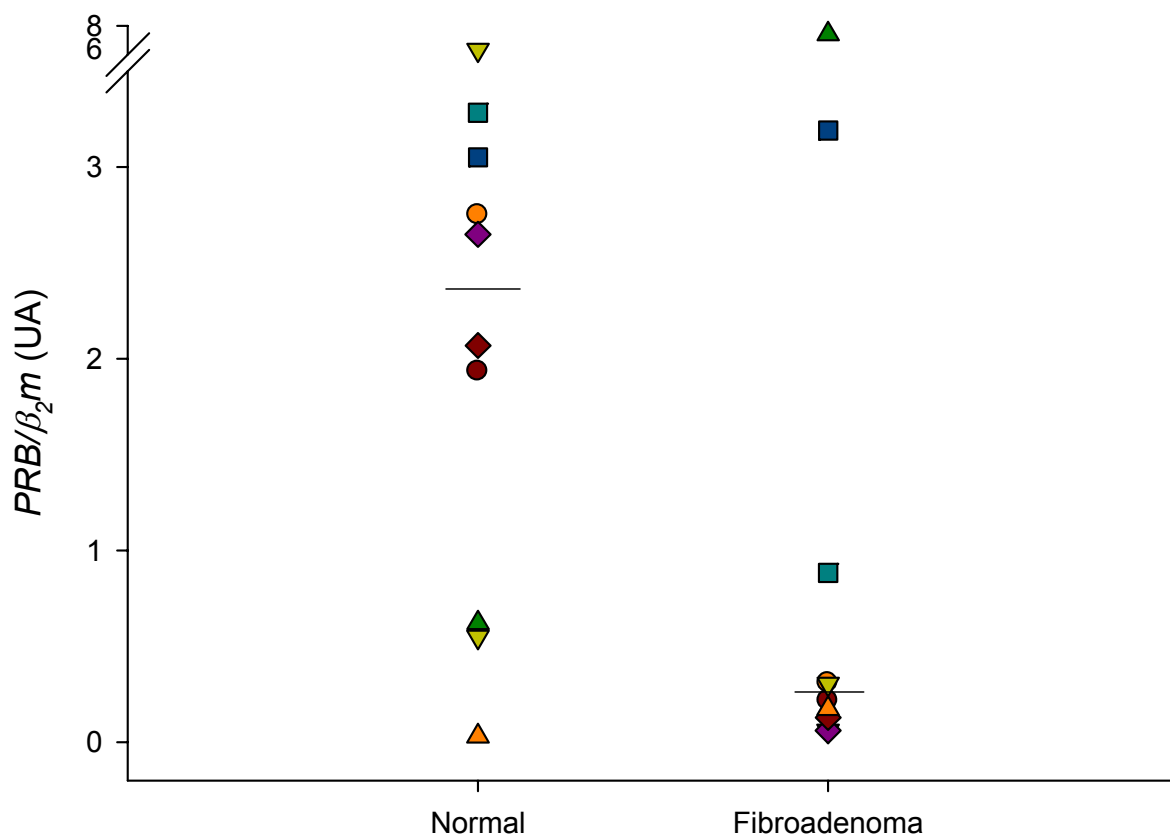


Figura 5. Expressão gênica de PRB em tecido mamário normal e fibroadenomas. Cada ponto representa um indivíduo e os símbolos iguais representam a mesma paciente. As barras representam as medianas dos valores de expressão gênica. N=10.

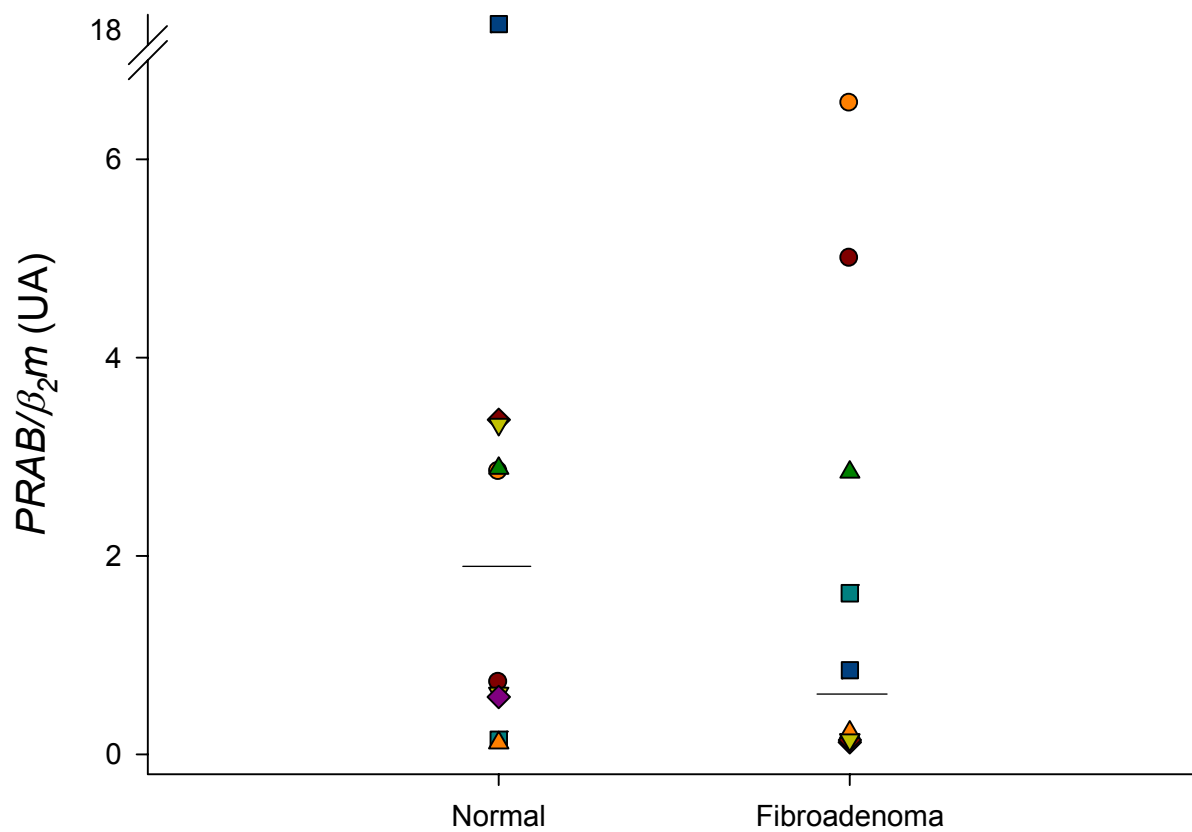


Figura 6. Expressão gênica de PRAB em tecido mamário normal e fibroadenomas. Cada ponto representa um indivíduo e os símbolos iguais representam a mesma paciente. As barras representam as medianas dos valores de expressão gênica. N=10.

2. Análise dos níveis de proteínas dos receptores de progesterona A e B

A figura 7 ilustra os níveis protéicos de PRA e PRB avaliados pela técnica de *western blot* com um anticorpo específico para ambas as isoformas. A quantificação foi feita a partir da análise densitométrica das bandas obtidas na auto-radiografia, e os valores foram normalizados pela quantificação do total de proteínas presente na membrana, marcadas pela coloração de *Red Ponceau S*. As figuras 8 e 9 representam graficamente os resultados obtidos na quantificação, expressos como média \pm desvio padrão em unidades arbitrárias.

A proteína PRA tem uma expressão significativamente maior nas amostras de fibroadenomas ($0,0474 \pm 0,014$) em relação ao tecido normal ($0,0366 \pm 0,02$) (teste *t* pareado de Student, $P=0,038$) (figura 8). Resultado similar também foi encontrado na expressão da proteína PRB (tecido normal: $0,0307 \pm 0,02$; fibroadenoma: $0,0388 \pm 0,026$) (teste *t* pareado de Student, $P=0,031$) (figura 9).

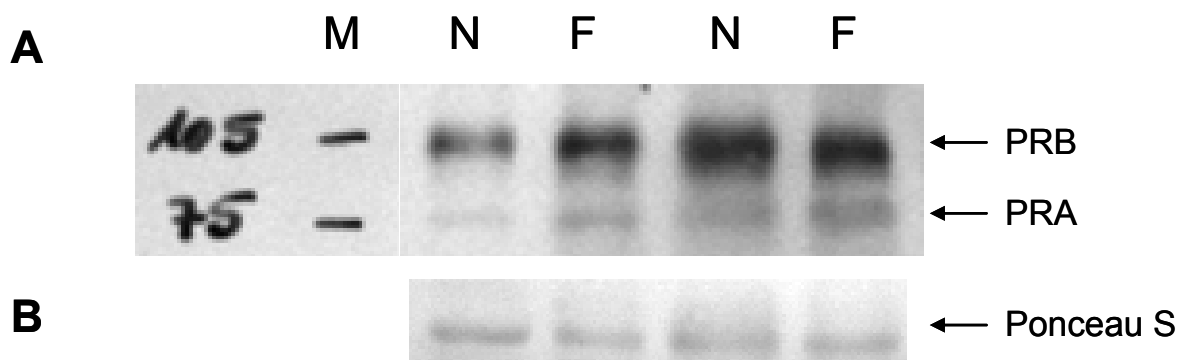


Figura 7. *Western blot* para os receptores de progesterona. **A.** Auto-radiografia representativa da expressão das proteínas PRA (82KDa) e PRB (112KDa) em 2 amostras de tecido mamário normal (N) e fibroadenomas (F). **B.** imagem representativa das bandas obtidas pela coloração de *Red Ponceau S*. M = marcador de peso molecular.

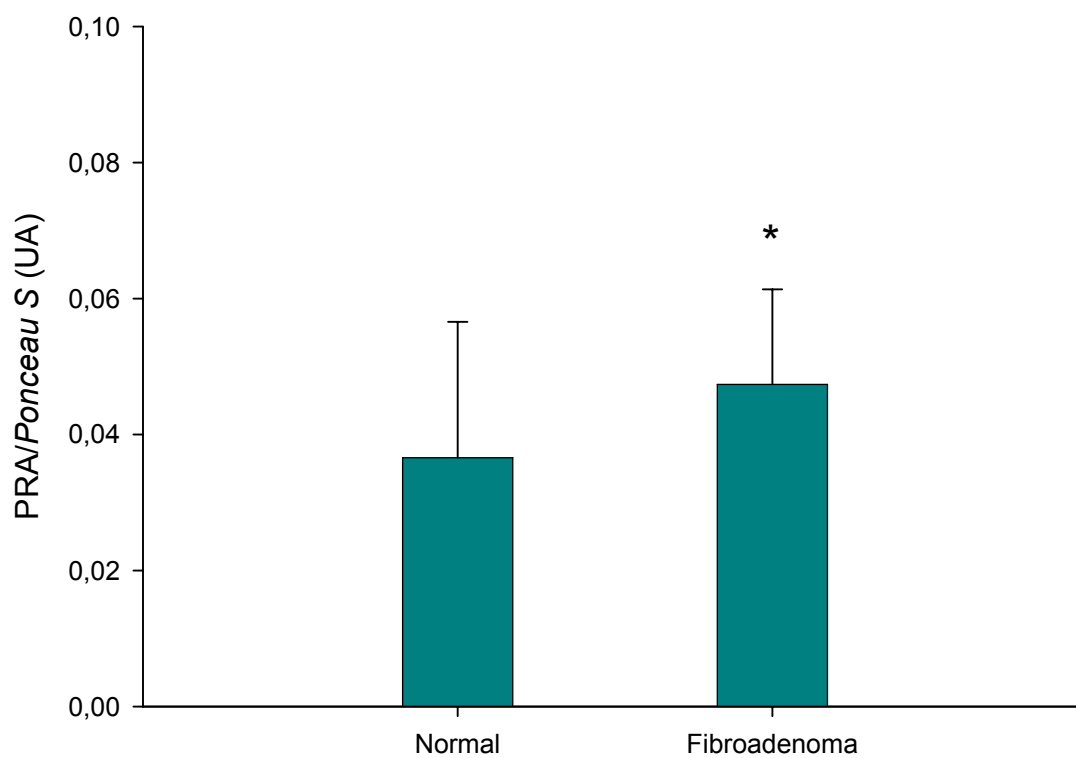


Figura 8. Expressão protéica de PRA em tecido mamário normal e fibroadenomas. As colunas representam as médias dos valores de expressão protéica. As amostras analisadas pertencem à mesma paciente. N=8. * $P=0,038$.

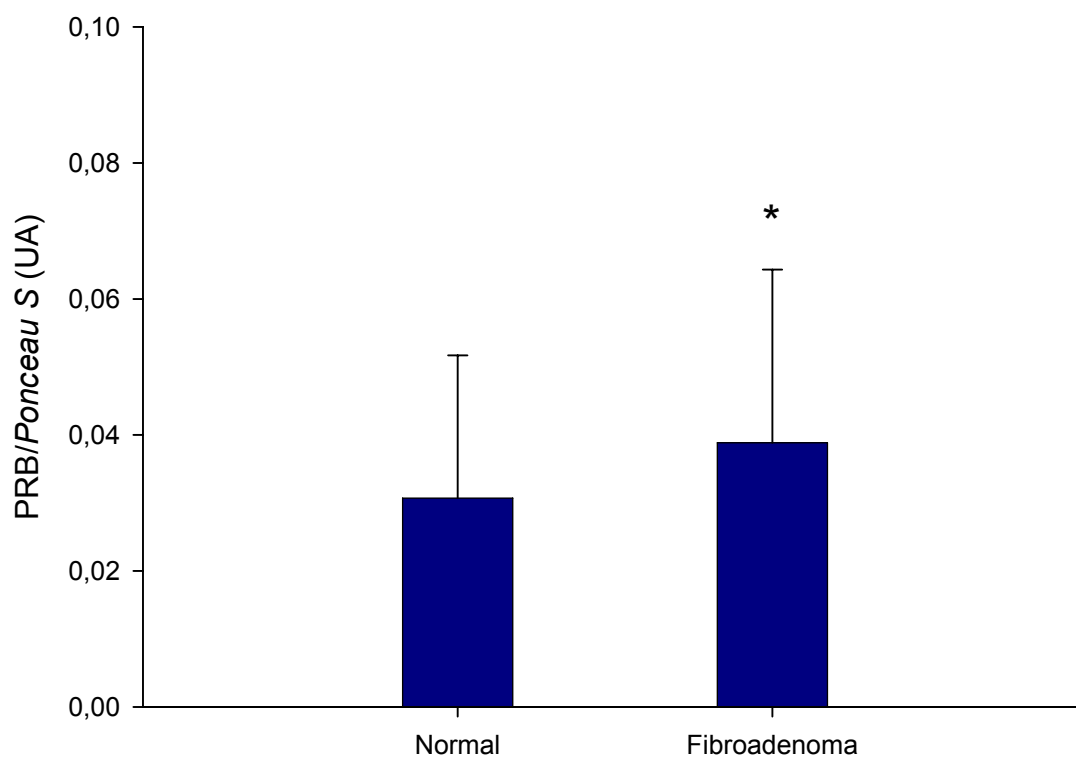


Figura 9. Expressão protéica de PRB em tecido mamário normal e fibroadenomas. As colunas representam as médias dos valores de expressão protéica. As amostras avaliadas pertencem à mesma paciente. N=8. * $P=0,031$.

3. Análise dos níveis protéicos do receptor de estrogênio- α

A figura 10 ilustra os níveis protéicos de ER- α avaliados pela técnica de *western blot* com um anticorpo específico para esta proteína. A quantificação foi feita a partir da análise densitométrica das bandas obtidas na auto-radiografia, e os valores foram normalizados pela quantificação do total de proteínas presente na membrana, marcadas pela coloração de *Red Ponceau S*. A figura 11 representa graficamente os resultados obtidos na quantificação, expressos como mediana e intervalo interquartis (25-75) em unidades arbitrárias. Expressão no tecido normal: 0,039 (0,030-0,050); expressão no fibroadenoma: 0,034 (0,030-0,059). Não houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão de ER- α no tecido normal e no fibroadenoma (teste *T* de Wilcoxon, $P=0,508$).

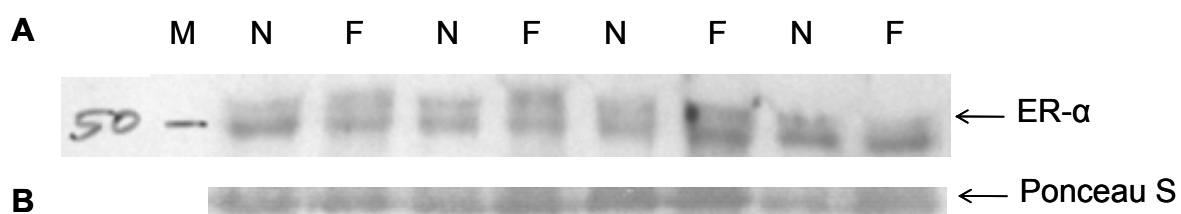


Figura 10. *Western blot* para o receptor de estrogênio- α . **A.** Auto-radiografia representativa da expressão da proteína ER- α (66KDa) em 4 amostras de tecido mamário normal (N) e fibroadenomas (F). **B.** imagem representativa das bandas obtidas pela coloração de *Red Ponceau S*. M = marcador de peso molecular.

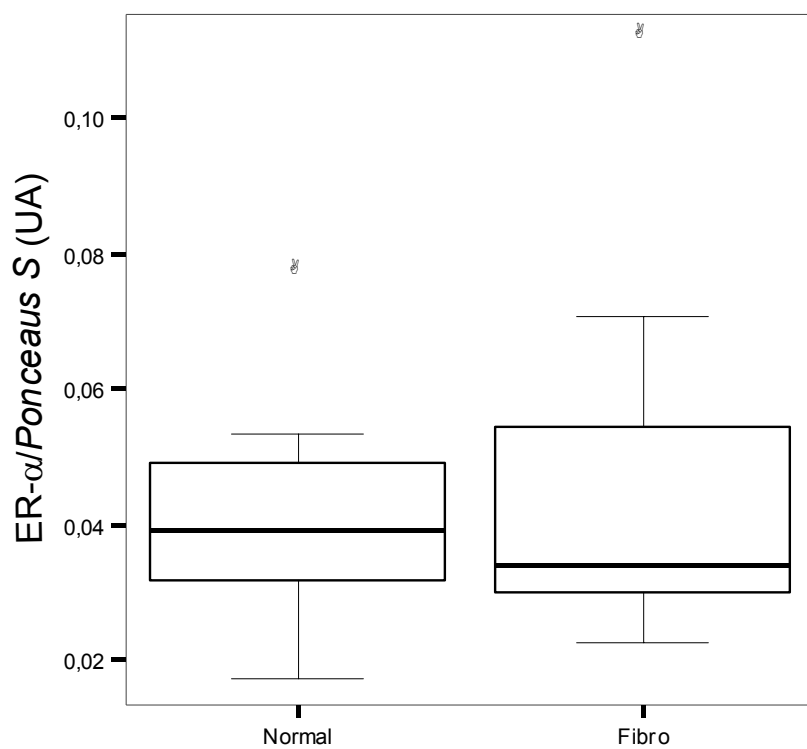


Figura 11. Expressão protéica de ER- α em tecido mamário normal e fibroadenomas (Fibro). As amostras avaliadas pertencem à mesma paciente. N=10.

4. Análises de associação

A tabela 4 resume algumas das análises de associação entre os dados clínicos e de expressão gênica e protéica.

Tabela 4. Estudos de associação dos dados de expressão gênica e protéica e dados clínicos das pacientes.

Variáveis	r (Spearman)	P
Diâmetro do nódulo x idade	-0,565	0,023*
Progesterona x proteína PRA no tecido normal	0,371	0,365
Progesterona x proteína PRA no fibroadenoma	0,419	0,301
Progesterona x proteína PRB no tecido normal	-0,443	0,272
Progesterona x proteína PRB no fibroadenoma	-0,431	0,286
Progesterona x proteína ER- α no tecido normal	-0,091	0,802
Progesterona x proteína ER- α no fibroadenoma	0,025	0,946
Estradiol x proteína PRA no tecido normal	0,299	0,471
Estradiol x proteína PRA no fibroadenoma	0,180	0,670
Estradiol x proteína PRB no tecido normal	-0,587	0,126
Estradiol x proteína PRB no fibroadenoma	-0,455	0,257
Estradiol x proteína ER- α no tecido normal	0,591	0,072
Estradiol x proteína ER- α no fibroadenoma	0,296	0,406
Expressão protéica de PRA: tecido normal x fibroadenoma	0,786	0,021*
Expressão protéica de PRB: tecido normal x fibroadenoma	0,929	0,001*
Expressão protéica de ER- α : tecido normal x fibroadenoma	0,656	0,039*
Expressão gênica de <i>PRAB</i> no tecido normal x expressão protéica de PRA no tecido normal	-1	0,000*
Expressão gênica de <i>PRAB</i> no tecido normal x expressão protéica de PRB no tecido normal	1	0,000*

*Diferença significativa.

5. Relação PRA:PRB

A relação entre os níveis de PRA e PRB foi obtida pela razão dos valores de expressão protéica da mesma paciente (N=7), sendo os valores ilustrados na figura 12. Valores de mediana e percentis 25 e 75 da relação no tecido normal: 0,953 (0,368-4,354) e no fibroadenoma: 1,187 (0,591-2,036). Não há diferença significativa desta relação entre os dois tecidos estudados (teste *T* de Wilcoxon, $P=0,866$). Por meio de uma análise de associação da relação PRA:PRB entre o tecido normal e os fibroadenomas, foi observada uma forte correlação desta razão nos dois tecidos (correlação de Spearman, $r=0,964$, $P=0,0001$).

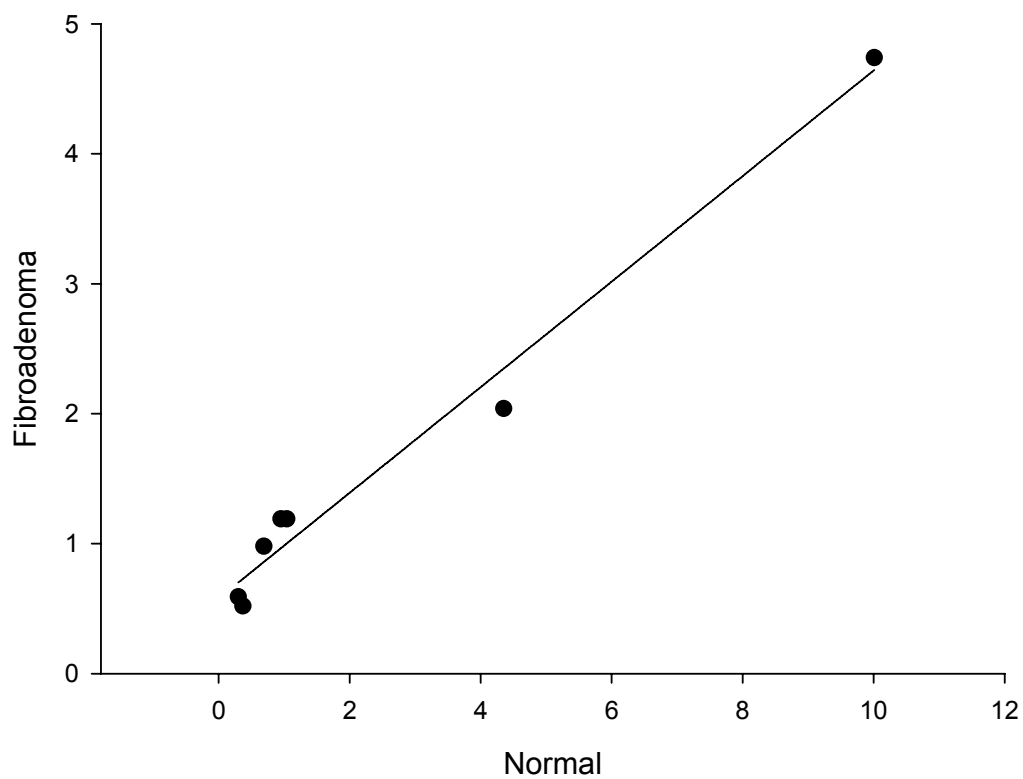


Figura 12. Correlação da relação PRA:PRB entre tecido normal e fibroadenomas. Correlação de Spearman, $r=0,964$, $P=0,0001$.

DISCUSSÃO

A glândula mamária sofre, durante seu desenvolvimento, grande influência dos hormônios esteróides, estrogênio e progesterona. Porém, os mecanismos através dos quais estes hormônios, principalmente a progesterona, exercem seus efeitos sobre a proliferação e diferenciação da mama ainda são alvos de muitos estudos e não estão bem estabelecidos. Em adição, o papel destes fatores e dos seus receptores no desenvolvimento de lesões proliferativas benignas, como os fibroadenomas, permanece incerto, pois o principal alvo de estudo das alterações na glândula mamária é o câncer de mama.

Uma vez que a responsividade celular aos hormônios esteróides é dependente dos níveis dos seus receptores, os mecanismos que modificam as concentrações destes receptores podem ser os principais controladores da ação hormonal (Tuohimaa *et al.*, 1996). A avaliação dos níveis dos receptores hormonais em tumores, comparando-os ao tecido normal, pode ser útil para o entendimento do papel dos hormônios esteróides na formação tumoral. Este estudo visou determinar a expressão dos receptores de progesterona e do receptor de estrogênio- α nos fibroadenomas, comparativamente ao tecido normal.

Inicialmente, em relação aos dados clínicos, a correlação negativa entre o diâmetro do nódulo e a idade das pacientes observada neste estudo encontra-se de acordo com os resultados de Takei e colaboradores, que demonstraram uma

redução significativa no tamanho dos fibroadenomas com o aumento da idade das mulheres (Takei *et al.*, 1999). Isso confirma a visão de que os fibroadenomas têm crescimento auto-limitado e podem regredir de tamanho na menopausa (Tobias *et al.*, 1999).

Ao avaliarmos os níveis do mRNA e de proteína dos receptores de progesterona e também os níveis protéicos do ER- α nas diferentes fases do ciclo menstrual e também nas pacientes usuárias de anticoncepcional hormonal, verificamos que os níveis de mRNA e das proteínas estudadas não se alteram entre cada um dos grupos, independentemente do nível de progesterona e estradiol, tanto no tecido normal quanto nos fibroadenomas (dados não mostrados). Isso nos levou a incluir todas as pacientes em um único grupo, e priorizar a comparação entre os dois tecidos estudados. Podemos justificar essa escolha pelo fato de que, apesar de estudos clássicos demonstrarem uma regulação dos níveis dos receptores hormonais pelos hormônios esteróides em diferentes tecidos, principalmente no endométrio (Graham e Clarke, 1997; Mote *et al.*, 1999; Mote *et al.*, 2002; Speirs *et al.*, 2002), na glândula mamária, os níveis dos PRs parecem não variar entre as fases folicular e lútea do ciclo menstrual (Battersby *et al.*, 1992; Graham e Clarke, 1997; Mote *et al.*, 2002). Esta ausência de variação poderia estar relacionada tanto com uma resistência aos efeitos de repressão da expressão dos receptores exercidos pela progesterona, quanto com a perda de ciclicidade do fluxo hormonal local na glândula mamária, devido à presença de grande quantidade de tecido adiposo (Graham e Clarke, 1997; Mote *et al.*, 2002; Gompel *et al.*, 2004).

Assim, em relação aos receptores de progesterona, nossos dados mostraram que os níveis de mRNA dos PRs não foram diferentes entre os dois tecidos, mas foi

possível verificar um aumento significativo dos níveis das proteínas PRA e PRB nos fibroadenomas.

A ausência de diferença significativa na expressão do mRNA de PRB e PRA pode ser explicada pelo fato das duas isoformas serem produtos de um único gene. Conforme já citado anteriormente, as isoformas do receptor de progesterona são produto de um único gene, a partir da transcrição de dois promotores alternativos ou pela tradução de dois códons de iniciação alternativos no mRNA que codifica PRB. As duas proteínas diferem somente pela presença de uma região amino-terminal de 164 aminoácidos em PRB (Kastner *et al.*, 1990; Conneely e Lydon, 2000; Mote *et al.*, 2001). Assim, na análise da expressão gênica, pode-se diferenciar o mRNA que codifica PRB, mas não se pode avaliar diretamente o mRNA que codifica PRA, pois os oligonucleotídeos ligam-se a regiões comuns nos dois mRNAs.

Observamos também uma correlação negativa entre o mRNA de *PRAB* e a proteína PRA, enquanto que houve uma correlação positiva entre o mRNA de *PRAB* e a proteína PRB no tecido mamário. Isso nos sugere que, dentre os mRNAs de *PRB* e *PRA* que são avaliados em conjunto na técnica de PCR, denominados assim de *PRAB*, exista uma maior proporção de mRNA codificando PRB do que PRA. A produção da proteína PRA, portanto, seria a partir da tradução do códon de iniciação AUG alternativo presente no mRNA de *PRB*.

O aumento dos níveis protéicos de PRA e PRB no fibroadenoma sugere que os PRs possam estar envolvidos no processo de proliferação celular presente nesse tipo de lesão. Conneely e colaboradores afirmam que os PRs exercem efeitos proliferativos e diferenciadores no desenvolvimento do epitélio mamário (Conneely e Lydon, 2000). No entanto, Krämer e colaboradores demonstraram que a

progesterona teve um efeito neutro sobre a taxa de proliferação:morte celular de células mamárias epiteliais saudáveis estimuladas por fatores de crescimento (Kramer *et al.*, 2006).

Já Gompel e colaboradores afirmam que os dados obtidos em culturas de linhagens celulares e de tecidos obtidos de pacientes são contraditórios e contribuem para o debate acerca das ações da progesterona no tecido mamário. Em uma revisão de diversos estudos, eles relatam que, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, a progesterona exibe uma ação antiproliferativa em células mamárias epiteliais normais (Gompel *et al.*, 2004).

Outros estudos relatam um papel proliferativo da progesterona na glândula mamária (Soderqvist *et al.*, 1997; Conneely e Lydon, 2000; Conneely *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2006). Esta ação, porém, é vista principalmente em células de câncer de mama, onde a progesterona atua como inibidor da apoptose, sugerindo um papel da progesterona na progressão do câncer (Moore *et al.*, 2006).

É importante ter em mente, ao avaliar o papel proliferativo ou anti-proliferativo da progesterona, como salientado por Gompel e colaboradores, que, nos estudos que envolvem tratamento intermitente de células em cultura com progesterona, a resposta da célula pode ser proliferação, diferenciação ou apoptose, dependendo do padrão de proteínas presente na célula (Gompel *et al.*, 2004). Graham e Clarke também ressaltaram este aspecto afirmando que, uma vez que os PRs atuam em combinação com múltiplos fatores de transcrição, é possível que a variabilidade de expressão tecido-específica dos componentes deste complexo multiprotéico pode resultar em atividades diferentes de PRA e PRB na mesma célula, e assim influenciar a resposta das células à progesterona (Graham e Clarke, 2002).

Porém, verificamos que os níveis dos PRs não se alteram em relação aos níveis de progesterona sérica, mas estão aumentados nos fibroadenomas, o que nos sugere que possa existir uma regulação dos níveis dessas proteínas que é independente da regulação hormonal pela progesterona, fato que contribui ainda mais para o debate sobre a função proliferativa da progesterona através de seus receptores. Cabe salientar, assim, que pode haver um envolvimento dos receptores de progesterona, mas não necessariamente da progesterona, no processo de formação dos fibroadenomas, conforme proposto por Jacobsen e colaboradores para o câncer de mama, onde os PRs seriam marcadores de prognóstico da doença independentemente do *status* progestacional (Jacobsen *et al.*, 2005).

Os primeiros estudos relacionados à atividade dos PRs sobre os genes-alvo da progesterona descreveram PRB como sendo o ativador da transcrição gênica, exercendo os efeitos biológicos determinados pela progesterona, e PRA como sendo um inibidor dominante da atividade de PRB e de outros receptores de hormônios esteróides (Graham e Clarke, 1997; Conneely e Lydon, 2000). Porém, mais recentemente, demonstrou-se que PRA e PRB ativam diferentes subgrupos de genes (Richer *et al.*, 2002), e PRA inclusive induz a expressão de genes envolvidos no metabolismo celular e na regulação da forma e adesão celular (Graham *et al.*, 2005). Portanto, o aumento nos níveis das duas isoformas verificado nos fibroadenomas nos leva a crer que ambos tenham papel nos processos de proliferação e diferenciação da glândula mamária, e que esta maior expressão possa estar relacionada com o processo de formação destes tumores.

Ariga e colaboradores relataram que as isoformas do PR são expressas em tecidos-alvo da progesterona em níveis comparáveis, e sugerem que a proporção

PRA:PRB tem influência nas ações biológicas da progesterona (Ariga *et al.*, 2001). Em adição, outros estudos demonstraram que esta expressão equivalente das isoformas vista nas células normais é quebrada precocemente na carcinogênese, e que a predominância de uma das isoformas, principalmente PRA, é comum (McGowan e Clarke, 1999; Graham e Clarke, 2002).

Ao avaliarmos a relação PRA:PRB em nossas amostras, verificamos que, tanto no tecido normal, quanto nos fibroadenomas, as isoformas não são expressas em níveis equimolares. Contudo, esta relação não é diferente entre os tecidos. Ainda, ao fazermos uma análise de associação desta relação entre os dois tecidos, verificamos que existe uma forte correlação. Isso nos sugere que, ao contrário do que ocorre nos cânceres, onde geralmente PRA é superexpresso (McGowan e Clarke, 1999), esta expressão coordenada das duas isoformas não é perdida nestas lesões proliferativas benignas. Além disso, quando avaliadas separadamente, ambas as proteínas PRA e PRB apresentaram correlação positiva de expressão entre o tecido normal e os fibroadenomas, o que confirma essa visão de regulação coordenada da expressão dos dois PRs.

Como relatado por Graham e colaboradores e por McGowan e Clarke, os principais alvos de PRA são genes envolvidos na morfologia e na adesão celular. Estes pesquisadores demonstraram ainda que a expressão de PRA pode variar dentro de uma ampla faixa na qual os genes-alvo da progesterona são insensíveis à proporção PRA:PRB alterada, mas que a predominância de PRA pode resultar na aquisição de responsividade à progesterona de um pequeno grupo de genes envolvidos nas vias de sinalização que influenciam o formato e a adesão das

células, e a superexpressão de PRA pode ter um papel na perda da adesão celular observada nas células malignas (Graham *et al.*, 1995; McGowan e Clarke, 1999).

Mesmo não tendo observado uma expressão equimolar de PRA e PRB no tecido normal e também nos fibroadenomas, ao verificarmos a forte correlação da proporção PRA:PRB nos dois tecidos, podemos concluir que esta relação não se altera entre as células normais e as células proliferativas que formam os fibroadenomas, o que indica um comportamento diferente dos PRs neste processo proliferativo benigno, onde as células não alteram sua forma celular e não perdem a adesão, ao contrário do observado nas células malignas, onde ocorre predominância de PRA.

Conforme sugerido por Graham e colaboradores, PRA e PRB podem atuar como homodímeros ou heterodímeros, que provavelmente são funcionalmente diferentes (Graham *et al.*, 2005). Apesar de não termos realizado um estudo que permitisse avaliar qual a proporção de cada dímero (PRA:PRA, PRA:PRB ou PRB:PRB) nos diferentes tecidos, é possível que possa ocorrer uma mudança no padrão de dimerização dos PRs nos fibroadenomas, o que determinaria uma resposta de aumento na proliferação celular ao estímulo da progesterona, mesmo que a relação PRA:PRB não se altere entre tecido normal e fibroadenoma.

É possível que os PRs possam ter um papel de estimulação da proliferação na mama normal podendo levar à formação de lesões benignas como os fibroadenomas, por um aumento da sua expressão, mas mantendo constante a proporção PRA:PRB, mesmo esta não sendo equimolar.

Em um estudo anterior, nosso grupo de pesquisa verificou uma expressão aumentada do mRNA codificando ER- α em fibroadenomas em relação ao tecido mamário normal circunjacente (Cericatto *et al.*, 2005). No presente estudo, avaliamos a expressão protéica de ER- α , para confirmar os resultados de expressão gênica obtidos anteriormente. No entanto, não observamos diferenças significativas de expressão da proteína do receptor de estrogênio- α nos dois tecidos.

O aumento significativo da expressão gênica de ER- α nos fibroadenomas que Cericatto e colaboradores observaram em seu estudo, quando avaliado nas diferentes fases do ciclo menstrual, persistiu significativo somente na fase folicular, predominantemente estrogênica, não havendo diferença de expressão na fase lútea (progestogênica) ou com o uso de contraceptivos hormonais (Cericatto *et al.*, 2005). Das pacientes analisadas neste estudo, 33,3% estavam em uso de contraceptivo hormonal, 50% em fase folicular e 16,7% em fase lútea. Não houve variação dos níveis de ER- α nas diferentes fases do ciclo ou com o uso de contraceptivos hormonais, bem como não houve correlação com os níveis de estradiol.

É bem estabelecido que os PRs regulam a expressão de ER, diminuindo os níveis dos receptores de estrogênio, mas essa regulação parece ser célula-específica (Graham e Clarke, 1997; Speirs *et al.*, 2002). Nossos resultados estão de acordo com essa visão, pois observamos um aumento dos níveis dos PRs e níveis não alterados de ER- α . Assim, os PRs poderiam estar reprimindo uma expressão aumentada de ER- α , por mecanismos pós-transcricionais e de uma maneira independente do estímulo estrogênico. Mote e colaboradores relataram que os PRs, em determinadas circunstâncias e por mecanismos pouco conhecidos, podem ser resistentes ao efeito de repressão de sua expressão exercido pela progesterona, o

qual também é classicamente conhecido (Graham e Clarke, 1997; Mote *et al.*, 1999). Isso pode explicar porque encontramos níveis aumentados de PRs nos fibroadenomas e níveis inalterados de ER- α entre os mesmos e o tecido normal: os PRs podem não sofrer o efeito de “*down-regulation*” exercido pela progesterona, mas esta e seus receptores ainda podem reprimir a expressão de ER- α .

A expressão de ER- α é intimamente associada com a biologia do câncer de mama, especialmente o desenvolvimento de tumores, e sugere-se que a superexpressão desta proteína é um evento inicial significativo na gênese do câncer mamário (Hayashi *et al.*, 2003). Não observamos alterações na expressão proteica de ER- α nos fibroadenomas, os quais mantêm alguma semelhança com o tecido normal, sem transformações neoplásicas presentes nos cânceres. A análise de associação, que demonstrou a existência de uma correlação positiva da expressão da proteína ER- α entre o tecido mamário normal e os fibroadenomas, contribui com essa visão.

Um aspecto interessante, bem revisado por Palmieri e colaboradores, é que as células mamárias normais que sofrem proliferação não são as mesmas que expressam ER- α , ao contrário de linhagens celulares de câncer de mama, onde as células ER- α positivas sofrem intensa proliferação em resposta aos estrogênios, sugerindo uma diferença fundamental na resposta ao estrogênio destes dois tipos celulares (Palmieri *et al.*, 2002). Tudo isto torna ainda mais difícil o entendimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento de tumores, tanto benigno quanto malignos, e, como relatado por Hayashi e colaboradores, o mecanismo integral da via de sinalização de ER- α que leva à proliferação e à progressão de tumores mamários está longe de ser completamente elucidado (Hayashi *et al.*, 2003).

Por fim, um último aspecto deve ser ressaltado: diversos estudos têm avaliado a expressão de ERs e PRs nos compartimentos epitelial e estromal da glândula mamária, observando diferenças na expressão destes receptores em cada compartimento (Lydon *et al.*, 2000; Palmieri *et al.*, 2002; Gompel *et al.*, 2004). Em nosso estudo, trabalhamos com o tecido homogeneizado, e não pudemos avaliar se a expressão é aumentada nas células epiteliais ou estromais. Talvez estudos posteriores de imuno-histoquímica possam avaliar o padrão de distribuição dos receptores de estrogênio e progesterona nos diferentes tipos celulares dos fibroadenomas, e assim contribuam ainda mais para o esclarecimento da função de ERs e PRs na formação destes tumores.

CONCLUSÕES

A análise do mRNA dos receptores de progesterona não apresentou diferença significativa entre o tecido normal e fibroadenomas. No entanto, observamos uma maior expressão protéica dos receptores de progesterona A e B em fibroadenomas quando comparados com a mama normal, o que sugere uma participação destes receptores, e talvez da progesterona, no processo de formação destes tumores.

Os resultados do presente estudo mostraram a expressão protéica inalterada do receptor de estrogênio- α , o que pode ser uma resposta característica do fibroadenoma, ao contrário do que ocorre nos cânceres de mama. Porém, outros estudos são necessários para esclarecer o papel do ER- α nos tumores benignos de mama.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ariga, N., Suzuki, T., Moriya, T., Kimura, M., Inoue, T., Ohuchi, N., Sasano, H. 2001. Progesterone receptor A and B isoforms in the human breast and its disorders. *Jpn J Cancer Res* **92**(3): 302-8.
- Battersby, S., Robertson, B.J., Anderson, T.J., King, R.J., McPherson, K. 1992. Influence of menstrual cycle, parity and oral contraceptive use on steroid hormone receptors in normal breast. *Br J Cancer* **65**(4): 601-7.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-54.
- Bramley, T. 2003. Non-genomic progesterone receptors in the mammalian ovary: some unresolved issues. *Reproduction* **125**(1): 3-15.
- Bustin, S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **25**(2): 169-93.
- Cenni, B., Picard, D. 1999. Ligand-independent Activation of Steroid Receptors: New Roles for Old Players. *Trends Endocrinol Metab* **10**(2): 41-46.
- Cericatto, R. 2002. *Expressão gênica do receptor estrogênico- α , bcl-2 e c-myc em fibroadenomas e no tecido mamário normal circunjacente*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- Cericatto, R., Pozzobon, A., Morsch, D.M., Menke, C.H., Brum, I.S., Spritzer, P.M. 2005. Estrogen receptor-alpha, bcl-2 and c-myc gene expression in fibroadenomas and adjacent normal breast: association with nodule size, hormonal and reproductive features. *Steroids* **70**(3): 153-60.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**(1): 156-9.
- Clemons, M., Goss, P. 2001. Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* **344**(4): 276-85.
- Conneely, O.M., Lydon, J.P. 2000. Progesterone receptors in reproduction: functional impact of the A and B isoforms. *Steroids* **65**(10-11): 571-7.

- Conneely, O.M., Mulac-Jericevic, B., Lydon, J.P. 2003. Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids* **68**(10-13): 771-8.
- Cotran, R.S., Kumar, V., Robbins, S.L. 1989. Female Breast. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. Cotran, R.S., Kumar, V., Robbins, S.L. Philadelphia, W.B. Saunders Company: 1183-1204.
- Courtillot, C., Plu-Bureau, G., Binart, N., Balleyguier, C., Sigal-Zafrani, B., Goffin, V., Kuttann, F., Kelly, P.A., Touraine, P. 2005. Benign breast diseases. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **10**(4): 325-35.
- Da Silva, I.S.B. 1998. *Efeitos de androgênios sobre a proliferação celular e a expressão de c-myc, c-fos, c-jun, receptor de androgênio e TGFb em células epiteliais prostática humanas não transformadas*. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- Dupont, W.D., Page, D.L., Parl, F.F., Vnencak-Jones, C.L., Plummer, W.D., Jr., Rados, M.S., Schuyler, P.A. 1994. Long-term risk of breast cancer in women with fibroadenoma. *N Engl J Med* **331**(1): 10-5.
- El-Wakeel, H., Umpleby, H.C. 2003. Systematic review of fibroadenoma as a risk factor for breast cancer. *Breast* **12**(5): 302-7.
- Enmark, E., Gustafsson, J.A. 1999. Oestrogen receptors - an overview. *J Intern Med* **246**(2): 133-8.
- Franco, N., Arnould, L., Mege, F., Picard, S.F., Arveux, P., Lizard-Nacol, S. 2003. Comparative analysis of molecular alterations in fibroadenomas associated or not with breast cancer. *Arch Surg* **138**(3): 291-5.
- Gadow, E.C. 2004. Fisiologia da Glândula Mamária. *Fisiologia Humana de Houssay*. Cingolani, H.E., Houssay, A.B. Porto Alegre, Artmed: 722-725.
- Gertig, D.M., Stillman, I.E., Byrne, C., Spiegelman, D., Schnitt, S.J., Connolly, J.L., Colditz, G.A., Hunter, D.J. 1999. Association of age and reproductive factors with benign breast tissue composition. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **8**(10): 873-9.
- Giangrande, P.H., Kimbrel, E.A., Edwards, D.P., McDonnell, D.P. 2000. The opposing transcriptional activities of the two isoforms of the human progesterone receptor are due to differential cofactor binding. *Mol Cell Biol* **20**(9): 3102-15.
- Goehring, C., Morabia, A. 1997. Epidemiology of benign breast disease, with special attention to histologic types. *Epidemiol Rev* **19**(2): 310-27.
- Gompel, A., Chaouat, M., Hugol, D., Forgez, P. 2004. Steroidal hormones and proliferation, differentiation and apoptosis in breast cells. *Maturitas* **49**(1): 16-24.
- Gompel, A., Levy, D., Chaouat, M., Forgez, P., Rostene, W. 2001. Apoptosis and aging: breast cells and apoptosis. *Maturitas* **38**(1): 39-44.

- Graham, J.D., Clarke, C.L. 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* **18**(4): 502-19.
- Graham, J.D., Clarke, C.L. 2002. Expression and transcriptional activity of progesterone receptor A and progesterone receptor B in mammalian cells. *Breast Cancer Res* **4**(5): 187-90.
- Graham, J.D., Yager, M.L., Hill, H.D., Byth, K., O'Neill, G.M., Clarke, C.L. 2005. Altered progesterone receptor isoform expression remodels progestin responsiveness of breast cancer cells. *Mol Endocrinol* **19**(11): 2713-35.
- Graham, J.D., Yeates, C., Balleine, R.L., Harvey, S.S., Milliken, J.S., Bilous, A.M., Clarke, C.L. 1995. Characterization of progesterone receptor A and B expression in human breast cancer. *Cancer Res* **55**(21): 5063-8.
- Hansen, R.K., Bissell, M.J. 2000. Tissue architecture and breast cancer: the role of extracellular matrix and steroid hormones. *Endocr Relat Cancer* **7**(2): 95-113.
- Hayashi, S.I., Eguchi, H., Tanimoto, K., Yoshida, T., Omoto, Y., Inoue, A., Yoshida, N., Yamaguchi, Y. 2003. The expression and function of estrogen receptor alpha and beta in human breast cancer and its clinical application. *Endocr Relat Cancer* **10**(2): 193-202.
- Heneghan, A.F., Connaghan-Jones, K.D., Miura, M.T., Bain, D.L. 2006. Cooperative DNA binding by the B-isoform of human progesterone receptor: thermodynamic analysis reveals strongly favorable and unfavorable contributions to assembly. *Biochemistry* **45**(10): 3285-96.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* **11**(9): 1026-30.
- Iglesias, A., Arias, M., Santiago, P., Rodriguez, M., Manas, J., Saborido, C. 2007. Benign breast lesions that simulate malignancy: magnetic resonance imaging with radiologic-pathologic correlation. *Curr Probl Diagn Radiol* **36**(2): 66-82.
- INCA. 2006. *Estimativa 2006. Incidência de Câncer no Brasil*. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/index.asp?link=tbregioes consolidado.asp&ID=1>. Acessado em 06 de agosto de 2007.
- Jacobsen, B.M., Schittone, S.A., Richer, J.K., Horwitz, K.B. 2005. Progesterone-independent effects of human progesterone receptors (PRs) in estrogen receptor-positive breast cancer: PR isoform-specific gene regulation and tumor biology. *Mol Endocrinol* **19**(3): 574-87.
- Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., Chambon, P. 1990. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *Embo J* **9**(5): 1603-14.
- Kramer, E.A., Seeger, H., Kramer, B., Wallwiener, D., Mueck, A.O. 2006. The effect of progesterone, testosterone and synthetic progestogens on growth factor- and estradiol-treated human cancerous and benign breast cells. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **129**(1): 77-83.

- La Rosa, S., Sessa, F., Colombo, L., Tibiletti, M.G., Furlan, D., Capella, C. 2001. Expression of acidic fibroblast growth factor (aFGF) and fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) in breast fibroadenomas. *J Clin Pathol* **54**(1): 37-41.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Lamb, C.A., Helguero, L.A., Giulianelli, S., Soldati, R., Vanzulli, S.I., Molinolo, A., Lanari, C. 2005. Antisense oligonucleotides targeting the progesterone receptor inhibit hormone-independent breast cancer growth in mice. *Breast Cancer Res* **7**(6): R1111-21.
- Lanari, C., Molinolo, A.A. 2002. Progesterone receptors--animal models and cell signalling in breast cancer. Diverse activation pathways for the progesterone receptor: possible implications for breast biology and cancer. *Breast Cancer Res* **4**(6): 240-3.
- Li, A.J., Baldwin, R.L., Karlan, B.Y. 2003. Estrogen and progesterone receptor subtype expression in normal and malignant ovarian epithelial cell cultures. *Am J Obstet Gynecol* **189**(1): 22-7.
- Lydon, J.P., Sivaraman, L., Conneely, O.M. 2000. A reappraisal of progesterone action in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **5**(3): 325-38.
- McGowan, E.M., Clarke, C.L. 1999. Effect of overexpression of progesterone receptor A on endogenous progestin-sensitive endpoints in breast cancer cells. *Mol Endocrinol* **13**(10): 1657-71.
- Moore, M.R., Spence, J.B., Kiningham, K.K., Dillon, J.L. 2006. Progestin inhibition of cell death in human breast cancer cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* **98**(4-5): 218-27.
- Morrison, T.B., Weis, J.J., Wittwer, C.T. 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* **24**(6): 954-8, 960, 962.
- Mote, P.A., Balleine, R.L., McGowan, E.M., Clarke, C.L. 1999. Colocalization of progesterone receptors A and B by dual immunofluorescent histochemistry in human endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* **84**(8): 2963-71.
- Mote, P.A., Bartow, S., Tran, N., Clarke, C.L. 2002. Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* **72**(2): 163-72.
- Mote, P.A., Johnston, J.F., Manninen, T., Tuohimaa, P., Clarke, C.L. 2001. Detection of progesterone receptor forms A and B by immunohistochemical analysis. *J Clin Pathol* **54**(8): 624-30.
- Mulac-Jericevic, B., Conneely, O.M. 2004. Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction* **128**(2): 139-46.
- Noguchi, S., Aihara, T., Koyama, H., Motomura, K., Inaji, H., Imaoka, S. 1995. Clonal analysis of benign and malignant human breast tumors by means of polymerase chain reaction. *Cancer Lett* **90**(1): 57-63.

- Noguchi, S., Motomura, K., Inaji, H., Imaoka, S., Koyama, H. 1993. Clonal analysis of fibroadenoma and phyllodes tumor of the breast. *Cancer Res* **53**(17): 4071-4.
- Osborne, M.P. 1999. Breast Anatomy and Development. *Diseases of the Breast*. Harris, J.R., Lippman, M.E., Morrow, M., Osborne, C.K. Philadelphia, Lippincott William & Wilkins: 1-13.
- Palmieri, C., Cheng, G.J., Saji, S., Zelada-Hedman, M., Warri, A., Weihua, Z., Van Noorden, S., Wahlstrom, T., Coombes, R.C., Warner, M., Gustafsson, J.A. 2002. Estrogen receptor beta in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* **9**(1): 1-13.
- Paradis, V., Laurendeau, I., Vieillefond, A., Blanchet, P., Eschwege, P., Benoit, G., Vidaud, M., Jardin, A., Bedossa, P. 1998. Clonal analysis of renal sporadic angiomyolipomas. *Hum Pathol* **29**(10): 1063-7.
- Reimer, T., Koczan, D., Muller, H., Friese, K., Krause, A., Thiesen, H.J., Gerber, B. 2000. Human chorionic gonadotrophin-beta transcripts correlate with progesterone receptor values in breast carcinomas. *J Mol Endocrinol* **24**(1): 33-41.
- Richer, J.K., Jacobsen, B.M., Manning, N.G., Abel, M.G., Wolf, D.M., Horwitz, K.B. 2002. Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J Biol Chem* **277**(7): 5209-18.
- Saji, S., Omoto, Y., Shimizu, C., Warner, M., Hayashi, Y., Horiguchi, S., Watanabe, T., Hayashi, S., Gustafsson, J.A., Toi, M. 2002. Expression of estrogen receptor (ER) (beta)cx protein in ER(alpha)-positive breast cancer: specific correlation with progesterone receptor. *Cancer Res* **62**(17): 4849-53.
- Sakaguchi, H., Fujimoto, J., Hong, B.L., Nakagawa, Y., Tamaya, T. 2004. Drastic decrease of progesterone receptor form B but not A mRNA reflects poor patient prognosis in endometrial cancers. *Gynecol Oncol* **93**(2): 394-9.
- Sartorius, C.A., Shen, T., Horwitz, K.B. 2003. Progesterone receptors A and B differentially affect the growth of estrogen-dependent human breast tumor xenografts. *Breast Cancer Res Treat* **79**(3): 287-99.
- Schneider, L. 2007. *Expressão gênica e protéica de p53 e p21 em fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- Schuchard, M., Landers, J.P., Sandhu, N.P., Spelsberg, T.C. 1993. Steroid hormone regulation of nuclear proto-oncogenes. *Endocr Rev* **14**(6): 659-69.
- Simomoto, M.M., Nazario, A.C., Gebirim, L.H., Simoes, M.J., Baracat, E.C., De Lima, G.R. 1999. Morphometric Analysis of the Epithelium of Mammary Fibroadenomas During the Proliferative and Secretory Phases of the Menstrual Cycle. *Breast J* **5**(4): 256-261.
- Simoncini, T., Genazzani, A.R. 2003. Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur J Endocrinol* **148**(3): 281-92.

- Soderqvist, G., Isaksson, E., von Schoultz, B., Carlstrom, K., Tani, E., Skoog, L. 1997. Proliferation of breast epithelial cells in healthy women during the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* **176**(1 Pt 1): 123-8.
- Speirs, V., Skliris, G.P., Burdall, S.E., Carder, P.J. 2002. Distinct expression patterns of ER alpha and ER beta in normal human mammary gland. *J Clin Pathol* **55**(5): 371-4.
- Takei, H., Iino, Y., Horiguchi, J., Maemura, M., Yokoe, T., Koibuchi, Y., Oyama, T., Ohwada, S., Morishita, Y. 1999. Natural history of fibroadenomas based on the correlation between size and patient age. *Jpn J Clin Oncol* **29**(1): 8-10.
- Takimoto, G.S., Tung, L., Abdel-Hafiz, H., Abel, M.G., Sartorius, C.A., Richer, J.K., Jacobsen, B.M., Bain, D.L., Horwitz, K.B. 2003. Functional properties of the N-terminal region of progesterone receptors and their mechanistic relationship to structure. *J Steroid Biochem Mol Biol* **85**(2-5): 209-19.
- Taplin, M.E., Buble, G.J., Shuster, T.D., Frantz, M.E., Spooner, A.E., Ogata, G.K., Keer, H.N., Balk, S.P. 1995. Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N Engl J Med* **332**(21): 1393-8.
- Tobias, P., De Luca, L.A., Schmitt, F.C.L., Frederique Jr, U., Uemura, G. 1999. Revisão histopatológica e análise dos fibroadenomas. *Revista Brasileira de Mastologia* **9**: 68-74.
- Tuohimaa, P., Blauer, M., Pasanen, S., Passinen, S., Pekki, A., Punnonen, R., Syvala, H., Valkila, J., Wallen, M., Valiaho, J., Zhuang, Y.H., Ylikomi, T. 1996. Mechanisms of action of sex steroid hormones: basic concepts and clinical correlations. *Maturitas* **23 Suppl**: S3-12.

ANEXOS

Anexo 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do estudo: “Expressão Gênica e Protéica das Isoformas A e B do Receptor de Progesterona Humano e do Receptor de Estrogênio-alfa em Amostras de Tecido Mamário Normal e Fibroadenomas”

Prezada Sra.:

Estamos conduzindo um estudo para identificar características genéticas que possam estar associadas ao surgimento e crescimento de nódulos mamários benignos. Dentre as lesões mamárias benignas que podem ser estudadas destacam-se os fibroadenomas, que são nódulos bastante freqüentes nas clínicas de mastologia. A expressão modificada de alguns genes pode alterar o tecido normal da mama e levar a formação de tumores como o fibroadenoma. Como a Sra. tem o diagnóstico de fibroadenoma e foi recomendada cirurgia para retirada do mesmo, gostaríamos de convidá-la para participar do estudo. Caso aceite, sua participação no estudo consistirá em informar dados sobre sua história ginecológica e obstétrica, uma coleta sangüínea no dia da sua cirurgia e a permitir que um pequeno fragmento do seu nódulo mamário (10 mm x 5 mm) e do tecido mamário normal (10 mm x 5 mm) que o envolve, sejam encaminhados para estudo genético. O restante do nódulo da mama será destinado ao exame histopatológico normal.

Quanto à coleta sangüínea, a Sra. será submetida à coleta de 10 mL de sangue venoso, no dia da cirurgia, com o objetivo de realizar dosagens hormonais e confirmar em qual fase do ciclo menstrual foi realizado o procedimento. Os riscos envolvidos com essa coleta são mínimos, sendo a ocorrência de pequenos hematomas/equimoses a alteração mais comum.

Se a Sra. concordar, armazenaremos as amostras por até 5 anos para que outras características possam ser analisadas no futuro, em outros trabalhos de nosso grupo (nesse

caso, estes trabalhos serão também apresentados ao Comitê de Ética em Pesquisa e, se possível, será solicitado novo Termo de Consentimento como este). No futuro, essas características poderão auxiliar na identificação precoce de pacientes sob risco de desenvolver tumores de mama. No entanto, os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para a senhora.

A Sra. é livre para decidir por participar ou não do estudo, e sua recusa não implicará em nenhum prejuízo em seu atendimento neste Hospital. Todas as informações obtidas estarão à sua disposição se assim desejar. Todos os resultados referentes à pesquisa serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa, sendo resguardada sua total confidencialidade.

Os pesquisadores responsáveis por este Projeto são a Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva (51 33163671 ou 51 99969044), o Dr. Rodrigo Cericatto (51 99632234) e Gisele Branchini (51 32277101 ou 51 81401240). Caso a Sra. tenha qualquer dúvida sobre o projeto poderá nos contactar nos telefones indicados acima. Tendo este projeto sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição.

Eu, _____, fui informada dos objetivos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada, bem como do procedimento de coleta de sangue a que serei submetida e das determinações de características genéticas que serão feitas. Recebi também a garantia de resposta a dúvidas ou esclarecimentos relacionados à pesquisa e da segurança da confidencialidade dos dados obtidos.

Local e data _____

Paciente ou responsável _____

Pesquisador _____

Anexo 2

Protocolo de estudo de técnicas de RT-PCR na avaliação de Fibroadenomas e do Tecido Mamário Normal:

Caso N°:

Registro Prontuário:

Iniciais do Nome:

Data do Procedimento Cirúrgico:

Tipo de Cirurgia: Mama: ()D ()E

N° de nódulos:

Idade:

Peso:

Altura:

Idade da Menarca (primeira menstruação):

Paridade: G ___ P ___ C ___ Ab ___

Primeira gestação no termo aos ___ anos

Data de término da última gestação: ___ / ___ / ___

Período de amamentação na última gestação: ___ dias

Método Anticoncepcional atual:

Datas de início dos 3 últimos ciclos menstruais e duração do fluxo:

1- ___ / ___ / 200_ , fluxo de ___ dias;

2- ___ / ___ / 200_ , fluxo de ___ dias;

3- ___ / ___ / 200_ , fluxo de ___ dias.

Fase do ciclo em que foi realizada a cirurgia:

1- () Fase folicular inicial;

2- () Fase folicular tardia;

3- () Fase lútea inicial;

4- () Fase lútea tardia;

5- () Uso de método anticoncepcional hormonal.