

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:**  
**ENDOCRINOLOGIA**

**EXPRESSÃO GÊNICA DO RECEPTOR ESTROGÊNICO- $\alpha$ , *bcl-2* E *c-myc* EM  
FIBROADENOMAS E NO TECIDO MAMÁRIO NORMAL CIRCUNJACENTE**

**RODRIGO CERICATTO**

**Porto Alegre, Dezembro de 2002.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:**  
**ENDOCRINOLOGIA**

**EXPRESSÃO GÊNICA DO RECEPTOR ESTROGÊNICO- $\alpha$ , *bcl-2* E *c-myc* EM  
FIBROADENOMAS E NO TECIDO MAMÁRIO NORMAL CIRCUNJACENTE**

**RODRIGO CERICATTO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, UFRGS, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas – Endocrinologia.

**Orientadora: Profa. Dra. Poli Mara Spritzer**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva**

**Porto Alegre, Dezembro de 2002.**

## AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Poli Mara Spritzer, minha orientadora desde a iniciação científica, pelo exemplo como médica e pesquisadora, pela sua liderança, dinamismo e capacidade de integração e aplicação dos conhecimentos da pesquisa básica e clínica ao atendimento das pacientes.

À Prof. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva, minha co-orientadora, pelo constante estímulo, dedicação, disponibilidade e habilidade na transmissão dos ensinamentos sobre as técnicas de pesquisa em biologia molecular, e pela amizade desde o período do seu mestrado.

Aos Professores do Serviço de Mastologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA): Prof. Carlos Henrique Menke, Prof. Jorge V. Biazús e Prof. Dr. Nilton L. Xavier, pelos exemplos de conduta profissional e constante estímulo à pesquisa e pelas oportunidades proporcionadas para meu contínuo aprimoramento.

Aos Colegas do Serviço de Mastologia do HCPA: Dr. José A. Cavalheiro, Dra. Ana Cristina Bittelbrunn e Enf. Eliane Rabin, pela amizade, apoio constante e carinho.

Ao Prof. Dr. Edison Capp pelo apoio e auxílio no entendimento das técnicas de pesquisa.

Às colegas de pesquisa Débora Martinho Morsch e Adriane Pozzobon pela amizade, disponibilidade e auxílio nas atividades laboratoriais e elaboração deste trabalho.

Às colegas de laboratório: Dra. Maria Beatriz Kohek, Dra. Isabel O. de Oliveira, e Lúcia Beatriz S. Furtado pela agradável convivência e amizade.

Às Secretárias Miriam Sant’Helena, Rosângela Rodrigues e Rozelaine Mulling pela eficiência e disponibilidade.

Aos médicos residentes dos Serviços de Mastologia e Ginecologia do HCPA que participaram dos procedimentos cirúrgicos.

Aos bolsistas de iniciação científica Maurício Longaray, Guilherme Geib, Valderes Agostinho Boeri pelo auxílio na coleta das amostras, preparo das soluções e participação nos experimentos.

À Iracema Vera Soares e Idelma Oliveira Pithan pela amizade e auxílio na preparação e manutenção dos materiais do laboratório.

Ao PPG em Endocrinologia e ao GPPG do HCPA por propiciarem os meios para o desenvolvimento do projeto.

À CAPES, ao Fundo de Incentivo à Pesquisa do HCPA (FIPE - Processo nº 00/401) e ao Pronex 26/98 pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste estudo, em especial às pacientes.

Aos meus pais e familiares pelo carinho e compreensão da ausência e dos silêncios, principalmente na etapa final do trabalho.

À Jussara pelo amor, apoio e por tornar tranquilos os momentos de dificuldade.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	06
LISTA DE TABELAS	08
LISTA DE FIGURAS	09
INTRODUÇÃO	10
Mecanismo de Ação de Hormônios Esteróides	13
Receptores de Estrogênios	14
A Mama e os Estrogênios	16
Proto-oncogene <i>c-myc</i>	20
Proto-oncogene <i>bcl-2</i> e Apoptose	22
OBJETIVOS	26
REFERÊNCIAS	27
ARTIGO	35
Estrogen Receptor- $\alpha$ , <i>bcl-2</i> and <i>c-Myc</i> Gene Expression in Fibroadenomas and Adjacent Normal Breast: Association with Phase of Menstrual Cycle, Oral Contraceptives and Nulliparity	36
Resumo	37
Abstract	38
List of Abbreviations	39
Introduction	40
Patients and Methods	41
Statistical Analysis	44
Results	45
Discussion	47
Conclusion	50
References	51
ANEXOS	
Anexo 1: Protocolo do Estudo	67
Anexo 2: Termo de Consentimento Informado	68
Anexo 3: Curvas de Ciclo de PCR para Padronização da Expressão Gênica do ER- $\alpha$ , <i>bcl-2</i> e <i>c-myc</i>	70

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>A</b>	Adenosina
<b><math>\beta_2m</math></b>	<i>Beta-microglobulina</i>
<b><i>bcl-2</i></b>	<i>B-cell lymphoma 2</i>
<b>C</b>	Citosina
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucléico complementar
<b>c-myc</b>	Homólogo celular do oncogene retroviral <i>v-myc</i>
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>dNTPs</b>	Desoxinucleotídeos trifosfatados
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EGF</b>	Fator de crescimento epidérmico
<b>EP</b>	Erro Padrão
<b>ER</b>	Receptor de estrogênio
<b>ER<math>\alpha</math></b>	Receptor de estrogênio- $\alpha$
<b>ER<math>\beta</math></b>	Receptor de estrogênio- $\beta$
<b>ERE</b>	Elemento responsivo ao esteróide
<b>FGF</b>	Fator de crescimento de fibroblastos
<b>G</b>	Guanina
<b>H</b>	Hormônio
<b>HR</b>	Complexo hormônio receptor
<b>IGF I</b>	Fator de crescimento semelhante à insulina I
<b>IGF II</b>	Fator de crescimento semelhante à insulina II
<b>M</b>	Molar
<b>MCF-7</b>	Linhagem de células de tumor de mama dependente de estrógeno
<b>mg</b>	Miligrama
<b>ml</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucléico mensageiro
<b>ng</b>	Nanograma
<b>nM</b>	Nanomolar

<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PR</b>	Receptor de progesterona
<b>R</b>	Receptor
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>RT-PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
<b>T</b>	Timina
<b>TGF<math>\alpha</math></b>	Fator de crescimento transformante tipo $\alpha$
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Fator de crescimento transformante tipo $\beta$
<b>UA</b>	Unidades Arbitrárias
<b>UV</b>	Luz ultra-violeta
<b><math>\mu</math>g</b>	Micrograma
<b><math>\mu</math>l</b>	Microlitro

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	63
A) Sequence and localization of primers in $\beta_2$ -microglobulin ( $\beta_2m$ ), <i>c-myc</i> , <i>bcl-2</i> and ER- $\alpha$ cDNA sequences, expected sizes of the amplified fragments	
B) PCR conditions	
TABELA 2.	65
Clinical, anthropometric, and hormonal parameters of patients	



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA I. Mecanismo de Ação dos Hormônios Esteróides	14
FIGURA II. Evolução Cíclica dos Lóbulos Mamários em Função do Estímulos Hormonais e Reprodutivos	17
FIGURA III. Modelos de ação do <i>c-myc</i> na Proliferação Celular e Apoptose	22
FIGURA 1A. Representative gels of <i>ER-<math>\alpha</math></i> , <i>bcl-2</i> and <i>c-myc</i> mRNA levels determined by RT-PCR from normal breast and fibroadenomas	60
FIGURA 1B. <i>ER-<math>\alpha</math></i> , <i>bcl-2</i> and <i>c-myc</i> mRNA quantitative results in relation to $\beta_2$ -m optical density (AU) of bands	60
FIGURA 2A, B, C. Quantitative results for <i>ER-<math>\alpha</math></i> , <i>bcl-2</i> and <i>c-myc</i> mRNA vs. $\beta_2$ -m optical density (AU) of bands, according to phase of menstrual cycle and use of hormonal contraceptives	61
FIGURA 3A. Representative gel showing <i>c-myc</i> mRNA levels determined by RT-PCR from fibroadenomas of non contraceptive users, according to nodule diameter	62
FIGURA 3B. Quantitative results for <i>c-myc</i> mRNA vs. $\beta_2$ -m optical density (AU) of bands, according to nodule diameter	62
FIGURA 3C. Representative gel showing <i>c-myc</i> mRNA levels determined by RT-PCR from fibroadenomas of non contraceptive users, according to patient's parity	62
FIGURA 3D. Quantitative results for <i>c-myc</i> mRNA vs. $\beta_2$ -m optical density (AU) of bands, according to patient's parity	62

## INTRODUÇÃO

A regulação hormonal da mama, incluindo os mecanismos moleculares que envolvem os processos de proliferação, diferenciação e apoptose não estão até hoje bem estabelecidos. O mesmo é verdadeiro para os mecanismos de transformação neoplásica e carcinogênese. Inúmeras evidências têm chamado a atenção sobre o estímulo proliferativo dos estrogênios sobre células epiteliais mamárias, benignas e malignas (Bernstein & Press 1998; Key 1999). São reconhecidos como fatores de risco para o desenvolvimento de carcinoma mamário a maior exposição aos estrogênios durante o período reprodutivo (menarca precoce, nuliparidade e menopausa tardia) ou após a menopausa (terapia de reposição hormonal, obesidade) (Willet et cols. 1999; Sharpe & Boivin 2000; Bernstein 2002). Estes dados incentivam o desenvolvimento de estudos sobre a influência dos esteróides sexuais nos processos fisiológicos e na carcinogênese da glândula mamária, no sentido de aprofundar o conhecimento da área e gerar novos caminhos na prevenção primária e secundária de doenças da mama dependentes de hormônios sexuais.

Embriologicamente, as mamas são consideradas glândulas sudoríparas modificadas, de origem ectodérmica (Osborne 1999), constituídas por um conjunto heterogêneo de epitélio (ductal e alveolar), tecido conjuntivo e adiposo (Cotran e cols. 1989). Seu desenvolvimento, integridade estrutural e funcional envolvem uma série de hormônios esteróides, peptídicos e fatores de crescimento, como os estrogênios, a progesterona, a prolactina, a insulina, os glicocorticóides, as gonadotrofinas, a somatostatina, os hormônios tireoideanos, o hormônio do

crescimento, o  $TGF\alpha$ ,  $TGF\beta$ , IGF I e II, EGF, FGF, entre outros. (Dahmouh 1994; Hansen & Bissell 2000).

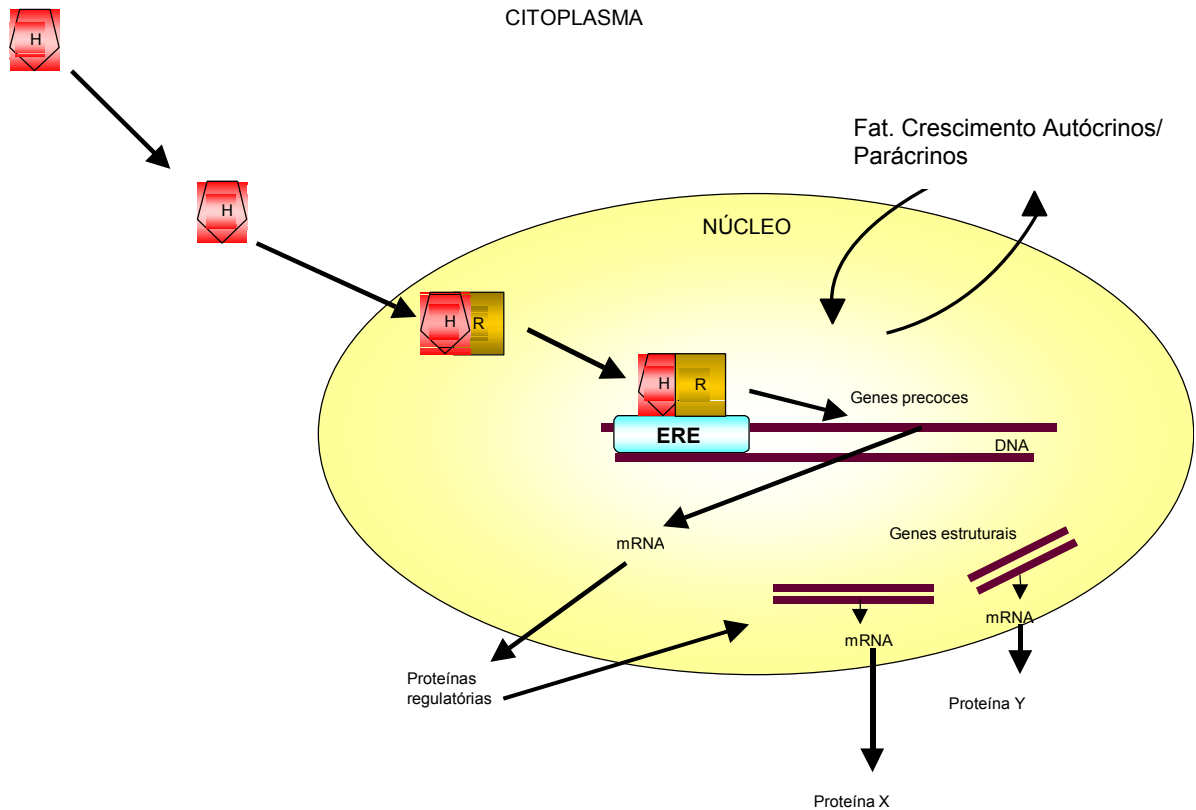
Durante a menacme, a glândula mamária passa por etapas cíclicas de desenvolvimento, diferenciação e apoptose (morte celular programada). Dentro desse processo cíclico, os estrogênios e a progesterona, têm papel regulatório primordial (Russo e cols. 2000). A mama tem sido um dos órgãos mais estudados em relação à influência dos hormônios sistêmicos sobre a homeostasia funcional e estrutural. Além de servir como um modelo versátil para o estudo do desenvolvimento, da fisiologia e da regulação gênica (Hansen & Bissell 2000), o fato das patologias mamárias, tanto benignas, quanto malignas, apresentarem alta incidência, morbidade e mortalidade, justifica esse crescente interesse. No Brasil foram estimados 36.090 novos casos de câncer mamário para o ano de 2002 (INCA 2002), sendo a neoplasia de maior incidência e a principal causa de morte por câncer entre as brasileiras. Na maioria dos países ocidentais tal magnitude também se repete (Russo e cols. 2000).

Sabe-se que as secreções alteradas de um hormônio estimulante ou de fatores de crescimento, e a atividade diminuída de fatores supressores da proliferação celular podem originar um amplo espectro de manifestações clínicas, variando desde alterações morfológicas e funcionais do tecido afetado, até o crescimento celular descontrolado, diferenciado ou não, caracterizando a neoplasia (Clemons & Goss 2001, Palmieri e cols. 2002). Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, as interações entre os hormônios esteróides e outros fatores reguladores da proliferação, diferenciação, e apoptose podem ser mais bem esclarecidas (Da Silva 1998). Na busca de uma maior compreensão destes processos, especialmente dos primeiros eventos da hiperplasia antes da transformação

neoplásica de tecidos sensíveis a hormônios, a análise de lesões mamárias benignas, comparativamente ao tecido mamário normal, representa um dos possíveis modelos de estudo. Dentre as lesões mamárias benignas em potencial, destacam-se os fibroadenomas, que são os nódulos benignos mais comuns da mama feminina, com uma prevalência nas clínicas de mastologia de até 13%. (Clare & Morrow 1999). Frequentemente diagnosticados em mulheres jovens, entre 20 e 30 anos, apresentam crescimento geralmente auto-limitado, alcançando em média 2 a 3 cm de diâmetro, e uma proporção importante tende à regressão espontânea (Hindle & Alonzo 1991, Xavier e cols. 1996, Tobias e cols. 1999; Takei e cols. 1999). Os fatores envolvidos com esse comportamento ainda não foram identificados. Sua análise genética demonstrou ter origem policlonal a partir de células epiteliais e estromais, confirmando tratar-se de processo hiperplásico (Nogushi e cols. 1993), diferentemente dos processos neoplásicos que têm origem a partir de uma única célula precursora (monoclonal). Podem ser múltiplos e/ou bilaterais em 10 a 16% das pacientes (Xavier e cols. 1996), sugerindo-se nestes casos, que cada unidade lobular dê origem a um fibroadenoma (Santen & Pinkerton 2001). Os fibroadenomas mantêm semelhança tanto do ponto de vista histológico (componentes epitelial e estromal), como de sensibilidade hormonal, em relação à mama normal (Founier e cols. 1982; Nogushi e cols. 1993; Schnitt & Connolly 1999). Desta forma, a análise da expressão de proto-oncogenes e seus produtos, em função das variações hormonais do ciclo menstrual e da idade, pode se constituir em medidas indiretas das interações dos hormônios esteróides com os demais fatores reguladores do ciclo celular.

### **Mecanismo de Ação dos Hormônios Esteróides**

O modelo utilizado para descrever o mecanismo de ação dos hormônios esteróides foi relatado por Schuchard e cols., em 1993, sendo aplicável aos receptores de androgênios, estrogênios, progesterona e glicocorticóides. Segundo esta proposição, os esteróides atravessam a membrana celular ligando-se a receptores específicos no interior da célula, causando sua ativação. A ativação do receptor é seguida por alterações conformacionais em sua estrutura que irão permitir a ligação do complexo-hormônio receptor a seqüências específicas do DNA, denominadas de elementos responsivos a esteróides (ERE). Estes elementos responsivos correspondem a seqüências de DNA de 15 a 20 pares de bases localizados anteriormente ao sítio de início da transcrição (*upstream*) do gene responsivo a esteróides. Após a ligação do complexo hormônio-receptor ao ERE é induzida a transcrição imediata dos chamados genes regulatórios precoces (*early genes*). A resposta dos genes precoces ocorre em poucos minutos após o estímulo esteróide. Estes genes regulatórios transcrevem mRNA para proteínas que, por sua vez, entram no núcleo e regulam a transcrição de genes estruturais tardios (*late genes*). Os genes estruturais codificam mRNA para as proteínas que irão produzir o determinado efeito biológico. A figura I ilustra este modelo.



**FIGURA I**

O hormônio (H) esteróide difunde-se para dentro da célula ligando-se aos receptores específicos (R) no núcleo da célula-alvo. O complexo hormônio-receptor (HR) se liga a elementos responsivos aos hormônios esteróides (ERE) localizados na fita de DNA induzindo a transcrição imediata dos genes precoces (c-myc, por exemplo). 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 efeito autócrino e parácrino, além de seus receptores, também podem ser estimulados pela ligação H-ERE. (Adaptado de Schuchard e cols. 1993).

### Receptores de Estrogênios (ER)

Os receptores de estrogênios, denominados receptor estrogênico- $\alpha$  e, o mais recentemente descoberto, receptor estrogênico- $\beta$ , fazem parte da superfamília de receptores nucleares. Esta família inclui os receptores para os hormônios esteróides, para os hormônios tireoidianos, os ácidos graxos e as prostaglandinas (White & Parker 1998). Os receptores

estrogênicos estão presentes além dos tecidos sexuais acessórios, também em vários outros tipos de órgãos e sistemas como fígado, ossos, tecido adiposo, sistema nervoso central e cardiovascular. Ambos são reguladores dos processos transcricionais dependentes de hormônios, utilizando mecanismos genéticos complexos para guiar o desenvolvimento e as funções de diferentes tecidos-alvo (Dickson & Stancel 1999). A partir de sua ligação com o hormônio cognato, ativam ou reprimem a transcrição de genes, pela associação direta com elementos específicos do DNA e/ou proteínas, conforme descrito anteriormente. Outra via de ativação dos receptores estrogênicos, independentemente da ligação com os estrogênios foi descrita, e envolve a fosforilação do receptor por enzimas, como as tirosina quinases e as proteínas quinases ativadas por mitógenos, estando o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de crescimento transformante tipo  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ) entre os exemplos de sinalizadores para tal via (White & Parker 1998; Gruber e cols. 2002).

O ER $\alpha$ , clonado em 1986, é codificado por gene localizado no braço longo do cromossomo 6 (q24-27) (Dahmouh 1994), enquanto o gene do ER $\beta$  é descrito na banda q22-24 do cromossomo 14 (Enmark & Gustafsson 1998). Embora o domínio de ligação ao DNA seja muito semelhante entre os receptores, outras regiões, como o domínio de ligação ao ligante, não apresentam acentuada homologia, o que se reflete na diferente afinidade dos dois subtipos de receptores aos vários estrogênios. Estudos recentes sugerem que a distribuição tecidual dos receptores estrogênicos também possa divergir, sendo que os carcinomas mamários apresentam preponderantemente ER $\alpha$ , e o ER $\beta$  parece ser mais expresso no tecido mamário normal (Clemons & Goss 2001, Palmieri e cols. 2002). Podem também se associar na forma de heterodímeros para ligação ao elemento-responsivo (ERE) (Enmark &

Gustafsson 1998). A pesquisa da regulação do número e expressão dos ERs sobre a fisiologia mamária, e sobre o processo de carcinogênese busca, além de um melhor entendimento destes processos, potenciais alternativas para a prevenção e tratamento das neoplasias mamárias.

### **A Mama e os Estrogênios**

A glândula mamária humana na infância apresenta características semelhantes entre meninas e meninos, caracterizando-se por estruturas ductais rudimentares, retro-areolares, e pela ausência de alvéolos. Na puberdade, tem início o desenvolvimento do sistema ductal, através da coordenação e estímulo pelos estrogênios e progesterona, além da participação do hormônio do crescimento, das gonadotrofinas e prolactina, entre outros. A telarca, ou surgimento do botão mamário, que ocorre normalmente entre os 10 e 11 anos de idade, corresponde ao marcador do início da puberdade nas meninas (Dickson & Russo 1999). O alongamento e ramificação progressivos da árvore ductal e a formação dos brotos alveolares, associados à proliferação do estroma circunjacente, correspondem aos efeitos mediados pelos estímulos hormonais para o pleno desenvolvimento mamário. Com a progressiva evolução, a mama se organiza anatomicamente em 15 a 20 lobos, que correspondem às unidades morfofuncionais da glândula, cada um drenando por um ducto principal através do mamilo. A sub-segmentação dos ductos mamários leva à identificação das unidades terminais ducto-lobulares (TDLU), estruturas onde a maioria das neoplasias mamárias tem sua origem.(Dahmouh e cols. 1994), e anatomicamente compostas por um lóbulo (conjunto de alvéolos, ductos e estroma intralobulares) e seu ducto extra-lobular. Sua estrutura normal varia em função da idade e do *status* hormonal, sendo que sua diferenciação plena somente é



atingida com a gravidez e lactação. A avaliação da diferenciação das TDLU, também se reflete sobre sua atividade proliferativa. Russo e cols. (2001a) descrevem os lóbulos tipo 1, ou lóbulos virginais, típicos das nulíparas pré-menopáusicas, como as estruturas menos diferenciadas. A transição para os lóbulos tipo 2 e 3, mais freqüentes nas múltiparas pré-menopáusicas, envolve um aumento do números de ductos e alvéolos, além do aumento do volume lobular. Já os lóbulos tipo 4, são identificados somente durante a lactação (figura II). Em função da relação inversa entre diferenciação e atividade proliferativa, e pela maior probabilidade de acúmulo de erros ou mutações do DNA nas estruturas mais proliferativas, justifica-se a associação da nuliparidade (lóbulos tipo 1) como fator de risco para a carcinogênese mamária (Allred e cols. 2001, Russo e cols. 2001b). A expressão do ER $\alpha$  também difere nestas estruturas, sendo superior nos lóbulos menos diferenciados (tipo 1) em relação aos mais diferenciados (tipo 3 e 4) (Dickson & Russo 1999).

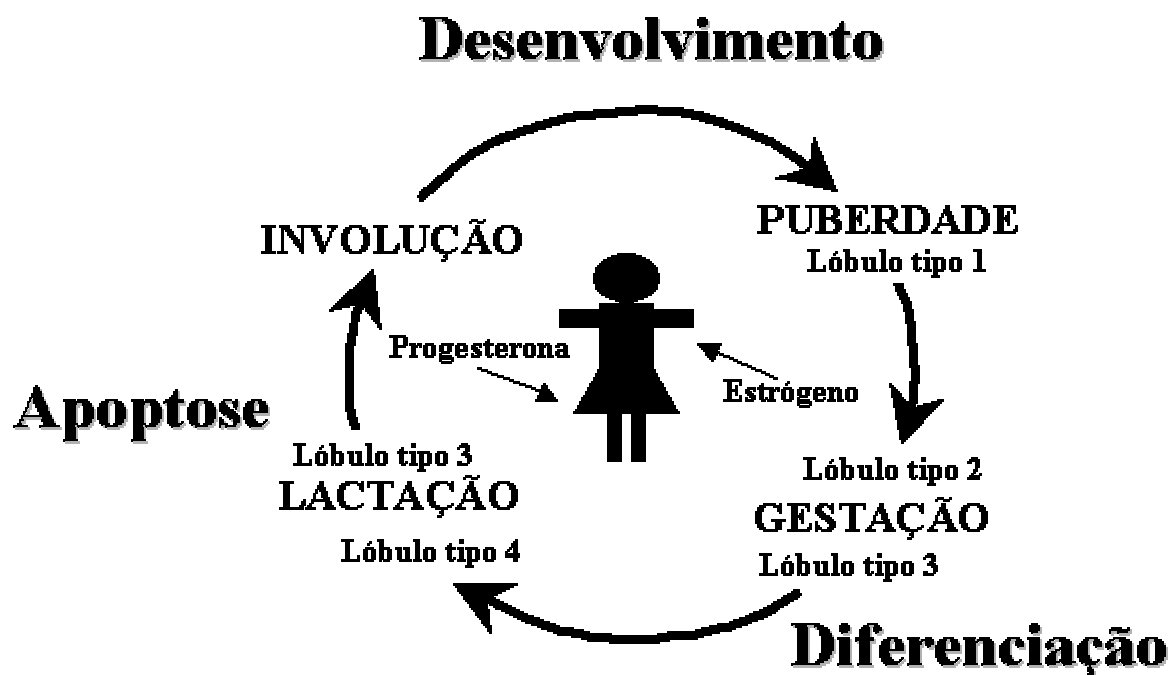


Figura II - Efeito das influências hormonais e reprodutivas sobre a proliferação, diferenciação e involução das estruturas lobulares mamárias. (Adaptado e modificado de Hansen & Bissell 2000 e Russo e cols. 2001a).

Na mama, as variações dos níveis hormonais, em função do ciclo menstrual e da idade causam repercussões nos processos de proliferação, diferenciação e apoptose, embora estes mecanismos e sua regulação hormonal não estejam ainda completamente esclarecidos. No tecido mamário normal, observa-se baixas taxas de expressão do ER $\alpha$  (7 a 20%) e de proliferação celular (~2%), e é evidenciada uma maior expressão do ER $\alpha$  na fase folicular do ciclo (Markopoulos e cols. 1988; Anderson e cols. 1997; Ricketts e cols 1991; Söderqvist e cols. 1997; Russo e cols. 2001). O pico da apoptose ocorre no final da fase lútea coincidindo com a queda das concentrações dos estrogênios e da progesterona (Sabourin e cols. 1994; Ferrières e cols. 1997; Anderson 1999). Uma dissociação entre células que expressam o ER $\alpha$  e células que estão em divisão celular foi relatada no tecido mamário normal (Clarke e cols. 1997). Com base nestas observações, os autores especulam que as células ER $\alpha$  positivas poderiam regular positivamente a proliferação das células ER $\alpha$  negativas por, via parácrina. Esta hipótese é atraente, mas em função da descoberta recente do ER $\beta$ , sua possível participação neste processo não pode ser descartada (Speirs e cols. 2002).

Evidências clínicas e experimentais *in vivo* sugerem uma maior proliferação celular mamária na segunda fase do ciclo, que estaria associada à interação sinérgica entre os estrogênios e a progesterona (Graham & Clarke 1997, Speroff 1999). Este é um tema ainda controverso, especialmente porque tais efeitos não são demonstrados nos estudos *in vitro* (Gompel e cols 1986, Graham & Clarke 1997).

Nos processos hiperplásicos e neoplásicos, o mecanismo normal do controle de crescimento está alterado. Entre os eventos moleculares associados a essas alterações pode-se destacar modificações na expressão de mediadores da proliferação celular, e na ativação de proto-oncogenes. O aumento na expressão do ER $\alpha$  além de representar a alteração transcricional mais comum nas neoplasias mamárias (Benz 1998), também está associado ao processo de tumorigênese mamária. Avaliando a expressão do ER $\alpha$  em lesões mamárias benignas, pré-malignas e malignas tem-se identificado uma crescente expressão do receptor, geralmente correspondente à maior atividade proliferativa da lesão (Shoker e cols. 1999a; Shoker e cols. 1999b; Hansen & Bissell 2000). Ao mesmo tempo, se observa um aumento no número de células que expressam o ER $\alpha$  e que estão em divisão celular. Comparativamente com o tecido mamário normal, ~70% dos carcinomas mamários expressam ER $\alpha$ , e a caracterização de uma neoplasia como ER positiva tem aplicação clínica no planejamento do tratamento da paciente. Procedimentos como ooforectomia, a utilização de moduladores seletivos dos receptores estrogênicos (SERMs) e de antagonistas de enzimas participantes do processo de esteroidogênese, têm sua efetividade influenciada por tal informação. O emprego de SERMs na quimioprevenção destes tumores também se baseia neste fato (EBCTCG 1998; Osborne 1998; White & Parker 1998, Cumings 1999, Santen & Harvey 1999). Os testes rotineiramente utilizados para quantificar a expressão do ER nos tumores mamários não detectam o ER $\beta$ . Sua participação nos processos associados ao tratamento destas neoplasias não está definida, sendo que alguns autores aventam uma possível contribuição deste receptor nos casos que há resistência à terapia hormonal (Gustafsson & Warner 2000).

Os proto-oncogenes ou genes celulares normais, são assim conhecidos pela sua associação com os processos proliferativos. Sua regulação é feita por hormônios esteróides, fatores de crescimento e proteínas relacionadas à adesão celular. Quando alterados por translocações cromossômicas, deleções ou mutações, ou mesmo superexpressos, originam os oncogenes, genes com potencial de transformar células normais em neoplásicas, através da codificação de oncoproteínas. Dentre os proto-oncogenes, *c-myc* e *bcl-2* podem ser citados como importantes mediadores das ações dos esteróides sexuais e de seus receptores na proliferação celular e apoptose mamária (Dickson & Stancel 1999).

### **Proto-oncogene *c-myc***

O proto-oncogene *c-myc*, localizado no cromossomo 8, foi descoberto como homólogo celular do oncogene retroviral *v-myc* no final da década de 70, e codifica uma fosfoproteína nuclear (*C-myc* ou *Myc*), presente na maioria das células, com alto potencial de proliferação (Dang 1999). É expresso durante a proliferação em uma grande variedade de tecidos adultos, e em todos os estágios do desenvolvimento embrionário. Em condições fisiológicas, sua principal função parece estar associada à promoção da divisão celular (replicação do DNA, regulação da transição das fases G0/G1 do ciclo celular), tanto que nas células que não estão em divisão celular, os níveis de *C-myc* são baixos. A diferenciação celular se correlaciona inversamente com a intensidade da sua expressão (Nass & Dickson 1998). Estudos experimentais com células mamárias normais em cultura e com linhagens de células de câncer da mama, associam a expressão de *c-myc* com o estímulo pelo estradiol (Leygue e cols. 1995; Nass & Dickson 1998), enquanto que a utilização de antiestrogênios, como o tamoxifeno,

inibe a sua expressão (Leygue e cols.1995). Entre suas outras funções, são descritos os controles da diferenciação celular e da morte celular programada (apoptose) (Benz 1998). Uma das teorias para essa amplitude de funções é que dependendo do genótipo celular e de fatores associados ao seu microambiente (fatores estimulantes ou inibitórios do crescimento), a ativação do *c-myc* pode direcionar a célula tanto para o processo de divisão celular como para apoptose, conforme modelo apresentado na figura III. Em função das suas possibilidades de ação, e dos vários alvos genômicos (target genes) a que tem sido associado (Dang 1999), muito ainda do papel de *c-myc* na fisiologia mamária normal e no processo de tumorigênese mamária está para ser esclarecido. Alguns estudos têm sugerido uma associação sinérgica da amplificação do *c-myc* com outras alterações genéticas, como a expressão do *bcl-2* (Jager 1997), a inativação do gene supressor tumoral p53 ( Liao & Dickson 2000) e expressão do receptor de EGF (Nass & Dickson 1998), no processo de carcinogênese. Nas neoplasias da mama, sua amplificação está descrita em até 40% dos casos (Benz 1998), embora sejam relatados índices bastante variáveis conforme os estudos (4 a 52%). O grau de diferenciação histológica destes tumores e diferenças de sensibilidade e especificidade entre as técnicas utilizadas para sua mensuração podem explicar tal amplitude de expressão. A relação entre sua expressão e o prognóstico nestes tumores também é bastante diversa sendo que alguns autores o associam a um pior prognóstico, com alta proporção de células na fase S e tumores maiores (Nass & Dickson 1998; Bièche e cols. 1999, Pich e cols. 2000, Aullmann e cols. 2002), enquanto outros não demonstraram alteração no prognóstico ou até influência positiva (Liao & Dickson 2000). No tecido mamário normal e nas lesões benignas seu papel regulatório ainda não está esclarecido.

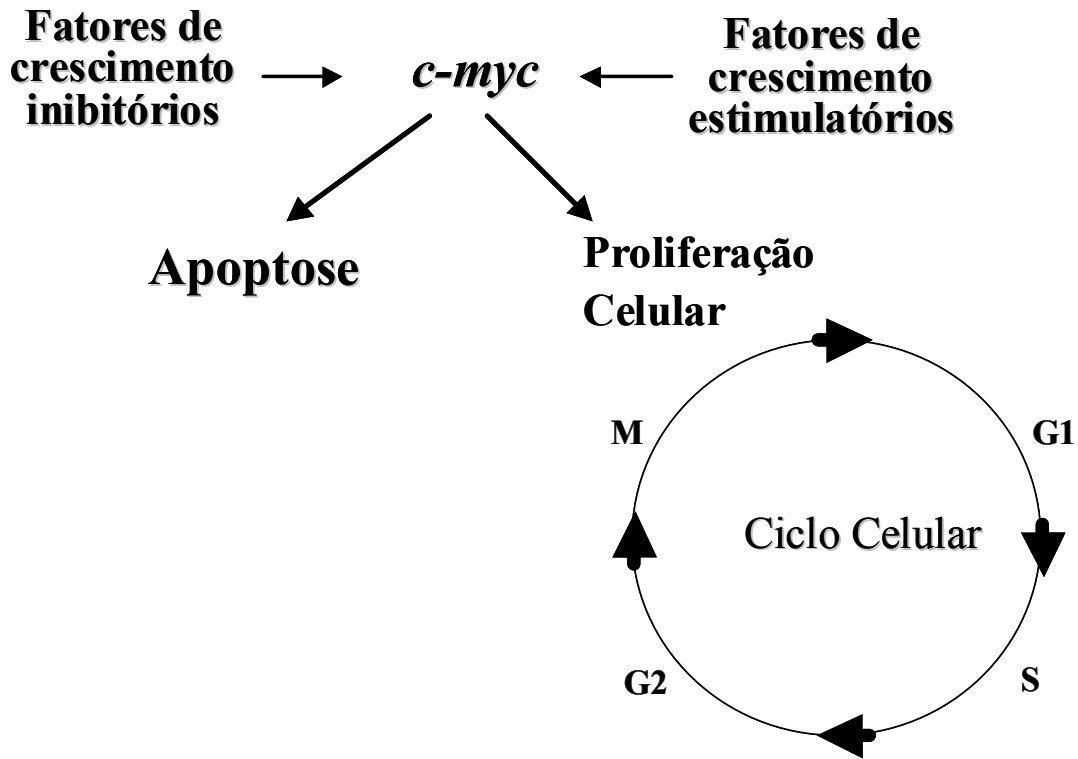


Figura III -Modelo mostrando possibilidades de participações do *c-myc* em processos proliferativos e apoptóticos em função de fatores estimulatórios e inibitórios associados, presentes no ambiente celular. (Adaptado de Dickson & Stancel, 1999)

### Proto-oncogene *bcl-2* e Apoptose

Apoptose pode ser definida como o mecanismo molecular responsável pela morte celular em células eucarióticas. É primariamente responsável pela eliminação programada das células que acompanham o desenvolvimento embrionário e regulação do tamanho dos órgãos na vida adulta. Histologicamente é caracterizada por alterações morfológicas no citoplasma (condensação e formação dos corpúsculos apoptóticos) e no núcleo (fragmentação do DNA) (Sabourin e cols. 1994). Tem um papel crítico na regulação da dinâmica tecidual, sendo que processos moleculares estão envolvidos. Embora a apoptose seja um processo geneticamente

regulado, pode ser disparada por agentes externos em cultura de células, como radiação física, toxinas e fatores de crescimento inibitórios. Numerosos fatores foram identificados por estarem implicados na regulação e modulação da apoptose, dentre eles estão os genes supressores de tumor como o *p53*, a família *bcl-2*, os proto-oncogenes *c-myc* e *c-jun*, fatores de crescimento como *TGF-β* (fator de crescimento transformante  $\beta$ ), entre outros (Gosden & Spears 1997).

A família *bcl-2* é assim denominada por apresentar vários genes relacionados, alguns com efeito anti-apoptótico (*bcl-2* e *bcl-x<sub>L</sub>*) e outros pró-apoptóticos (*bax*, e *bcl-x<sub>S</sub>*) (Hahn & Davidson 1998). O proto-oncogene *bcl-2* está localizado no cromossomo 18q21. Sua ativação por translocação cromossomal t(14-18), produz uma proteína de 26kDa que está associada a alterações no processo transcricional. Foi descoberto primeiramente em linfomas não-Hodgkin de células B, onde sua proteína estava expressa em mais de 80% dos tumores (Hockenbery e cols 1991; Sabourin e cols. 1994, Ferrières e cols 1997). Estudos de linhagens de células hematopoiéticas que sofrem apoptose quando são privadas de fatores de crescimento, tem a morte celular abolida se transfectadas com *bcl-2* (Hockenbery e cols. 1990). A característica peculiar do *bcl-2* é que ele pode promover a viabilidade celular sem acentuar a proliferação celular, em contraste com muitos genes cuja função é estimular a proliferação. A manutenção de um equilíbrio entre os processos de proliferação e apoptose é fundamental para a homeostasia tecidual. (Hahn & Davidson 1998, Hall 1999, Anderson 1999). Na mama, da mesma forma que na próstata e no endométrio, a privação hormonal (Mustonen e cols. 1997, Gompel e cols. 2000) ou seu bloqueio (Wang e cols. 1995) são estímulos para a apoptose. A expressão do *bcl-2* é considerada um marcador da ação

estrogênica (Wang e cols. 1995). Estudos experimentais com uma linhagem celular derivada de carcinoma humano e que é ER positiva, as células MCF-7, tratadas com estradiol demonstraram um aumento da expressão gênica e da proteína do *bcl-2* num padrão tempo e dose dependente (Wang e cols. 1995/Teixeira e cols. 1995). A presença de sua proteína, detectada por imunohistoquímica, em tecidos mamários e endometriais normais, demonstrou uma clara dependência hormonal entre seus níveis e a fase do ciclo menstrual, sendo superior na fase folicular. (Sabourin e cols. 1994; Gompel e cols. 1994). Quando comparados tecido mamário normal, patologias benignas e pré-malignas, a intensidade de expressão e a influência do ciclo menstrual foram variáveis relacionadas com a proliferação e a diferenciação da lesão. (Ferrières e cols. 1997, Mustonen e cols. 1997, Viacava e cols. 1999). Nas neoplasias mamárias, a expressão do *bcl-2* tem sido descrita em 53% (Aulmann e cols. 2002) a 80% dos tumores (Kumar e cols. 2000) e quando co-expresso com o *ER- $\alpha$*  têm sido associado a lesões bem diferenciadas, pouco proliferativas e com maior índice de resposta à hormonioterapia. Estes dados sugerem que tumores com uma relação *ER $\alpha$ -bcl-2* preservada, ou seja, similar ao padrão de expressão do tecido mamário normal, teriam melhor prognóstico.

Em função das várias lacunas ainda existentes quanto ao conhecimento dos processos envolvidos na proliferação, diferenciação e apoptose do tecido mamário, normal e hiperplásico, na presente Dissertação, selecionou-se como modelo de estudo a avaliação molecular de lesões nodulares benignas hiperplásicas (fibroadenomas), em comparação com seu tecido mamário normal circundante, em mulheres na menacme. A influência da expressão do receptor para estrogênios como mediador da ação dos estrogênios e sua relação com a expressão dos proto-oncogenes pode, em função da idade e de fatores hormonais e



reprodutivos das pacientes, se refletir no desenvolvimento e evolução destes dois fenótipos estudados. Quanto aos fibroadenomas por exemplo, muitas das suas características são bastante conhecidas (relação inversa entre idade e diâmetro tumoral, tendência a crescimento auto-limitado e estabilização ou até regressão com o passar dos anos), mas são escassas as informações sobre as bases fisiopatológicas e moleculares para esse tipo de comportamento. Através da investigação de eventos e processos que ocorrem antes da transformação celular neoplásica, buscamos identificar possíveis contribuintes para um melhor entendimento da mama e de sua dependência hormonal.

## OBJETIVOS

Com base nas informações descritas na Introdução, são objetivos deste trabalho:

- 1- Determinar os níveis de mRNA do receptor estrogênico- $\alpha$  e dos proto-oncogenes *c-myc* e *bcl-2*, nos fibroadenomas em comparação com o tecido mamário circunjacente, de mulheres no menacme;
- 2- Correlacionar a expressão dos genes em estudo com variáveis clínicas, como idade, diâmetro do nódulo, fase do ciclo menstrual e paridade.

## REFERÊNCIAS

- Allred DC, Mohsin SK, Fuqua SAW. Histological and biological evolution of human premalignant breast disease. *Endocrine-Related Cancer* 2001; 8:47-61.
- Anderson E, Clarke RB, Howell A. Changes in the normal human breast through the menstrual cycle: relevance to breast carcinogenesis. *Endocrine-Related Cancer* 1997; 4(1):23-33.
- Anderson TJ. Pathological studies of apoptosis in the normal breast. *Endocrine-Related Cancer* 1999; 6:9-12.
- Aulmann S, Bentz M, Sinn HP. C-myc oncogene amplification in ductal carcinoma in situ of the breast. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 74(1):25-31.
- Benz CC. Transcription factors and breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 1998;5:271-282.
- Bernstein L & Press MF. Does estrogen receptor expression in normal breast tissue predict breast cancer risk? *J Natl Cancer Inst* 1998;90(1):5-7.
- Bernstein L. Epidemiology of Endocrine-Related Risk Factors for Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2002;7(1):3-15.
- Bièche I, Laurendau I, Tozlu S, Olivi M, Vidauld D, Lidereau R et al. Quantification of Myc gene expression in sporadic breast tumors with a real-time reverse transcription-PCR assay. *Cancer Res* 1999; 59:2759-2765.
- Clare SE & Morrow M. Management of the Palpable Breast Mass. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK (eds). *Diseases of the Breast*. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins, 1999. p.37-45.

- Clarke RB, Howell A, Potten CS, Anderson E. Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast. *Cancer Res* 1997;57(22):4987-4991.
- Clemons M & Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer. *NEJM* 2001; 344(4):276-285.
- Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Female Breast. In: Cotran RS, Kumar V, Robbins SL editors. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Company; 1989. p.1183-1204.
- Cumings SR, Eckert S, Krueger KA, et al. The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women – Results from the MORE Trial. *JAMA* 1999;281:2189-2197.
- Dahmouch L, Pike MC, Press MF. Hormones and breast-cell proliferation. In: Lobo RA. editor. *Treatment of the postmenopausal woman: basic and clinical aspects*. New York: Raven Press; 1994. p.325-337.
- Dang CV. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis and metabolism. *Mol Cell Biology* 1999;19(1):1-11.
- Da Silva, ISB. Efeitos de andrôgenos sobre a proliferação celular e a expressão de *c-myc*, *c-jos*, *c-jun*, receptor de andrôgenio e TGF $\beta$  em células epiteliais prostáticas humanas não transformadas. [Tese de Doutorado]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1998.
- Dickson RB & Stancel GM. Estrogen receptor-mediated processes in normal and cancer cells. *J Natl Cancer Inst Monographs* 1999; 27:135-145.
- Dickson RB & Russo J. Biochemical control of breast development. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK (eds). *Diseases of the Breast*. Philadelphia : Lippincott William & Wilkins; 1999. p.15-31.

- EBCTCG (Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group) Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomized trials. *Lancet* 1998;351:1451-67.
- Enmark E & Gustafsson JÁ. Estrogen receptor  $\beta$ - a novel receptor opens up new possibilities for cancer diagnosis and treatment. *Endocrine-Related Cancer* 1998;5:213-222.
- Ferrières G, Cuny M, Simony-Lafontaine J, et al. Variation of bcl-2 expression in breast ducts and lobules in relation to plasma progesterone levels: overexpression and absence of variation in fibroadenomas. *J Pathol* 1997;183:204-211.
- Fournier S, Kuttann F, de Cicco F, Baudot N, Malet C, Mauvais-Jarvis P. Estradiol 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in human breast fibroadenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1982;55(3):428-33.
- Gompel A, Malet C, Spritzer P, Lalardrie JP, Kuttann F, Mauvais-Jarvis P. Progestin effect on cell proliferation and 17-hydroxysteroid dehydrogenase activity in normal human breast cells in culture. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 63: 1174-1180.
- Gompel A, Sabourin JC, Martin A, Yaneva H, Audoin J, Decroix et al. Bcl-2 expression in normal endometrium during the menstrual cycle. *Am J Pathol* 1994;144(6):1195-1202.
- Gompel A, Somai S, Chaouat M, Kazem A, Kloosterboer HJ, Beusman I et al. Hormonal regulation of apoptosis in breast cells and tissues. *Steroids* 2000;65:593-598.
- Gosden R & Spears N Programmed cell death in the reproductive system. *Br Med Bull* 1997;53(3):644-661.
- Graham JD & Clarke C. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine Reviews* 1997;18(4):502-519.

- Gruber CJ, Tschuggel W, Schneeberger C, Huber JC. Productions and actions of estrogens. NEJM 2002; 346(5):340-352.
- Gustafsson JA & Warner M. Estrogen receptor  $\beta$  in the breast: role in estrogen responsiveness and development of breast cancer. J Steroid Biochem Mol Biol 2000;74:245-248.
- Hahn HÁ & Davidson NE. Apoptosis in the mammary gland and breast cancer. Endocrine-Related Cancer 1998;5:199-211.
- Hall PA. Assessing apoptosis: a critical survey. Endocrine-Related Cancer 1999;6:3-8.
- Hansen RK & Bissell MJ. Tissue architecture and breast cancer: the role of extracellular matrix and steroid hormones. Endocrine-Related Cancer. 2000;7:95-113.
- Hindle WH & Alonzo LJ. Conservative management of breast fibroadenomas. AJOG 1991;164:1647-51.
- Hockenbery DM, Nunez G, Minniman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is a inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. Nature 1990;348:334-336.
- Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:6961-6995.
- INCA (Instituto Nacional do Câncer). Ministério da Saúde, Brasil. Estimativa de Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil para 2002.
- Jager R, Herzer U, Schenkel J, et al. 1997 Overexpression of bcl-2 inhibits alveolar cell apoptosis during involution and accelerates c-myc-induced tumorigenesis of mammary gland in transgenic mice. Oncogene 15:1787-95.

- Key TJ. Serum oestradiol and breast cancer risk. *Endocrine-Related Cancer* 1999;6:175-180.
- Kumar R, Vadlamudi RK, Adam L. Apoptosis in mammary gland and cancer. 2000 *Endocrine-Related Cancer* 2000;7:257-269.
- Leygue E, Gol-Winkler R, Gompel A, Louis-Sylvestre C, Soquet L, Staub S, et al. Estradiol stimulates c-myc proto-oncogene expression in normal human breast epithelial cells in culture. *J Steroid Biochem Molec Biol.* 1995;52(4):299-305.
- Liao DJ & Dickson RB. *c-Myc* in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 2000;7:143-164.
- Markopoulos C, Berger U, Wilson P, Gazet J, Coombes RC. Oestrogen receptor content of normal breast cells and breast carcinomas throughout the menstrual cycle. *Br Med J* 1988; 296:1349-51.
- Mustonen M, Raunio H, Paakko P, Soini Y. The extent of apoptosis is inversely associated with bcl-2 expression in premalignant and malignant breast lesions. *Histopathol* 1997;31(4):347-354.
- Nass SJ & Dickson RB. Epidermal growth factor-dependent cell cycle progression is altered in mammary epithelial cells that overexpress c-Myc. *Clin Cancer Res* 1998;4:1813-1822.
- Noguchi S, Motomura K, Inaji H, Imaoka S, Koyama H. Clonal analysis of fibroadenoma and phyllodes tumor of the breast. *Cancer Res* 1993;53:4071-4074.
- Osborne CK. Tamoxifen in the Treatment of Breast Cancer. *NEJM* 1998;339(22):1609-1618.
- Osborne MP. Breast Anatomy and Development. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK (eds). *Diseases of the Breast*. Philadelphia : Lippincott William & Wilkins, 1999. p.1-13.
- Palmieri C, Cheng GJ, Saji S, Zelada-Hedman M, Wärrri A, Weihua Z, et al.. Estrogen receptor beta in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 2002; 9:1-13.

- Pich A, Margaria E, Chiusa L. Oncogenes and Male Breast Carcinoma: c-erb-2 and p53 coexpression predicts a poor survival. *J Clin Oncol* 2000;18(16):2948-56.
- Ricketts D, Turnbull L, Ryall G, Bakhshi R, Rawson NSB, Gazet JC, et al. Estrogen and progesterone receptors in normal female breast. *Cancer Res* 1991;51:1817-1822.
- Russo J, Hu YF, Yang X, Russo IH. Developmental, cellular, and molecular basis of human breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monographs* 2000; 27:17-37.
- Russo J, Santen RJ, Russo I. Hormonal control of breast development. In: DeGroot LJ, Jameson JL editors. *Endocrinology*. 4th. Philadelphia, Pennsylvania. W.B. Saunders Company;2001a.p.2181-2188.
- Russo J, Lynch H, Russo IH. Mammary gland architecture as a determining factor in the susceptibility of the human breast to cancer. *Breast J* 2001b;7(5):278-91.
- Sabourin JC, Martin A, Baruch J, Truc JB, Gompel A, Poitout P. Bcl-2 expression in normal breast tissue during the menstrual cycle. *Int J Cancer* 1994;59(1):1-6.
- Santen RJ& Harvey HA Use of aromatase inhibitors in breast carcinoma. *Endocrine-Related Cancer* 1999;6:75-92.
- Santen RJ & Pinkerton J. Benign Breast Disorders. In DeGroot LJ, Jameson JL editors. *Endocrinology*. 4th. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Company;2001. p.2189-2198.
- Schnitt SJ & Connolly JL. Pathology of Benign Breast Disorders. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK (eds). *Diseases of the Breast*. Philadelphia : Lippincott William & Wilkins; 1999. p.75-93.



- Schuchard M, Landers JP, Sandhu NP, et al. Steroid hormone regulation of nuclear proto-oncogenes. *Endocrine Reviews*, 1993;14(6):659-669.
- Sharpe C & Boivin JF. The etiology of female breast cancer. *Medical Principles and Practice* 2000;9(1):1-24.
- Shoker BS, Jarvis C, Clarke RB, Anderson E, Hewlett J, Davies MPA, *et al.* Estrogen receptor-positive proliferating cells in the normal and precancerous breast. *Am J Pathol* 1999a;155:1811-1815.
- Shoker BS, Jarvis C, Sibson DR, Walker C, Sloane JP. Oestrogen receptor expression in the normal and pre-cancerous breast. *J Pathol* 1999b;188:237-244.
- Söderqvist G, Isaksson E, Schoultz B, et al. Proliferation of breast epithelial cells in health women during the menstrual cycle. *Am J Obst Gynecol* 1997;176:123-128.
- Speirs V, Slikiris GP, Burdall SE, Carder PJ. Distinct expression patterns of ER $\alpha$  and ER $\beta$  in normal human mammary gland. *J Clin Pathol* 2002;55:371-374.
- Speroff L. Role of progesterone in normal breast physiology. *J Reprod Med* 1999;44:172-179.
- Takei H, Iino Y, Horiguchi J, Maemura M, Yokoe T, Koibuchi Y, *et al.* Natural history of fibroadenomas based on the correlation between size and patient age. *Jpn J Clin Oncol* 1999;29(1):8-10.
- Teixeira C, Reed JC, Pratt C. Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving bcl-2 proto-oncogene expression in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1995;55:3902-3907.
- Tobias P, De Luca LA, Schmitt FCL, Frederigue Jr U, Uemura G. Revisão histopatológica e análise dos fibroadenomas. *Rev Bras Mastol* 1999;9:68-74.

- Viacava P, Naccarato A and Bevilacqua G. Different proliferative patterns characterize different preinvasive breast lesions. *J Pathol* 1999;188:245-251.
- Wang TTY, Phang JM. Effects of estrogen on apoptotic pathways in human breast cancer cell line MCF-7. *Cancer Res* 1995;55:2487-2489.
- White R & Parker MG. Molecular mechanisms of steroid hormone action. *Endocrine-Related Cancer* 1998; 5:1-14.
- Willet WC, Rockhill B, Hankinson SE, Hunter DJ, Colditz GA. Epidemiology and nongenetic causes of breast cancer. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK (eds). *Diseases of the Breast*. Philadelphia : Lippincott William & Wilkins, 1999. p. 175-220.
- Xavier NL, Silveira LGG, Schmidt SN, Hannauí ND, Gheller JP, Xavier MC. Fibroadenoma de mama – aspectos clínicos e epidemiológicos. *J Bras Ginecol* 1996;106(7):249-253.

**ARTIGO**

**ESTROGEN RECEPTOR- $\alpha$ , *bcl-2* AND *c-myc* GENE EXPRESSION IN FIBROADENOMAS AND ADJACENT NORMAL BREAST: ASSOCIATION WITH PHASE OF MENSTRUAL CYCLE, ORAL CONTRACEPTIVES, AND NULLIPARITY**

**R Cericatto<sup>1</sup>; A Pozzobon<sup>2</sup>; DM Morsch<sup>3</sup>; IS Brum<sup>4</sup>; PM Spritzer<sup>5</sup>**

<sup>1</sup> Breast Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: +55-51-33110075, Fax: +55-51-33110671, Email: [cericatto@terra.com.br](mailto:cericatto@terra.com.br)

<sup>2</sup> Department of Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: +55-51-33163671, Fax: +55-51-33163453, Email: [adpozzobon@terra.com.br](mailto:adpozzobon@terra.com.br)

<sup>3</sup> Department of Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: +55-51-33163671, Fax: +55-51-3316-3453, Email: [deborarh@cpovo.net](mailto:deborarh@cpovo.net)

<sup>4</sup> Department of Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: +55-51-3316-3671, Fax: +55-51-3316-3453, Email: [ilma@vortex.ufrgs.br](mailto:ilma@vortex.ufrgs.br)

<sup>5</sup> Department of Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; and Gynecological Endocrinology Unit, Division of Endocrinology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil. Correspondence to: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: +55-51-3316-3671, Fax: +55-51-3316-3453, E-mail: [spritzer@ufrgs.br](mailto:spritzer@ufrgs.br)

**Short title:** ER- $\alpha$ , *bcl-2* and *c-myc* gene expression in fibroadenomas and normal breast.

## RESUMO

**Objetivo:** Fibroadenomas correspondem aos nódulos mamários benignos mais comuns entre as mulheres. O estudo das alterações genéticas durante o período reprodutivo pode auxiliar na elucidação dos processos fisiológicos envolvidos no desenvolvimento e evolução destes nódulos. O objetivo deste estudo foi o de comparar a expressão gênica do receptor estrogênico alfa (ER- $\alpha$ ), *bcl-2* e *c-myc* entre fibroadenomas e o tecido mamário normal circunjacente, além da influência de características hormonais e reprodutivas sobre esses tecidos.

**Pacientes e Métodos:** Cinquenta e sete mulheres, pré-menopáusicas (14 aos 49 anos), oriundas do Serviço de Mastologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e submetidas a exérese cirúrgica de nódulos mamários foram incluídas. Amostras do nódulo e do tecido mamário circunjacente foram coletadas para realização dos experimentos de RT-PCR (reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa), com posterior análise pareada dos níveis de RNAm do receptor estrogênico alfa, *bcl-2* e *c-myc*. As pacientes foram divididas em grupos de acordo com a fase do ciclo, paridade e uso de método anticoncepcional hormonal.

**Resultados:** Das 57 pacientes selecionadas, 32 tiveram amostras adequadas para avaliação da expressão gênica. Quatorze pacientes foram excluídas devido à baixa qualidade do RNA extraído, 6 por laudo histopatológico diferente de fibroadenoma e 5 devido à discordância entre a fase do ciclo calculada e a concentração da progesterona sérica. A idade média das pacientes foi de 25,9 anos e o diâmetro médio dos nódulos foi de 2,84 cm. Os fibroadenomas apresentaram níveis superiores do RNAm do ER- $\alpha$  (P = 0,012) e do *bcl-2* (P = 0,001) em relação ao tecido mamário normal circunjacente, enquanto o *c-myc* apresentou expressão semelhante entre os pares. Os níveis do RNAm do ER- $\alpha$  foram superiores nas pacientes na fase folicular em relação às usuárias de pílula anticoncepcional e aos grupos de tecido mamário normal (P=0,003). Os níveis de RNAm do *bcl-2* foram superiores nos fibroadenomas de pacientes na fase lútea, em relação aos grupos de tecido mamário normal (P=0,007). A expressão gênica do *c-myc* não diferiu conforme a fase do ciclo menstrual, mas foi superior nas pacientes com fibroadenomas com diâmetro  $\geq 3$  cm (P = 0,015). Uma correlação positiva entre os níveis do RNAm do *c-myc* e o diâmetro dos fibroadenomas também foi identificada ( $r=0,536$ ; P=0,007). As pacientes núlparas apresentaram nódulo com diâmetro médio superior em relação às múltiparas (3,2 cm X 2,2 cm; P= 0,008), bem como níveis de RNAm *c-myc* superiores (P=0,04).

**Conclusões:** A expressão gênica do ER- $\alpha$  e *bcl-2* e *c-myc* nos fibroadenomas é influenciada por fatores hormonais e reprodutivos, com uma possível contribuição para sua formação e evolução.

**Unitermos:** receptor estrogênico alfa, proto-oncogenes *c-myc* e *bcl-2*, fibroadenomas e tecido mamário normal.

## ABSTRACT

**Background:** Fibroadenomas are the most common benign lump in females. The study of gene alterations and/or deregulation in reproductive years, may help explain hormonal physiological processes involved in nodule development and evolution. The objective was to compare *ER- $\alpha$* , *c-myc*, and *bcl-2* gene expression in breast fibroadenomas and in normal tissue and evaluate menstrual cycle, parity, and oral contraceptive influences.

**Methods:** Fifty-seven premenopausal women (14-49 years) undergoing surgical removal of fibroadenomas were selected. Samples from fibroadenomas and circumjacent normal tissue were obtained for RT-PCR paired analysis. Patients were divided in groups according to menstrual cycle, use of contraceptives and parity.

**Results:** Tissue from 32 patients was adequate for RT-PCR. Paired analysis showed higher expression of *ER- $\alpha$*  (P=0.012) and *bcl-2* (P=0.001) in fibroadenomas than in normal breast, while *c-myc* presented a similar expression (P=0.655). *ER- $\alpha$*  was higher in fibroadenomas of patients in follicular phase vs. contraceptive users and normal tissue (P=0.003); *bcl-2* was higher in fibroadenomas of patients in luteal phase than in the normal samples from all groups (P=0.007). *c-myc* did not differ according to menstrual cycle, but was higher in fibroadenomas  $\geq 3$  cm vs.  $< 3$  cm (P=0.015) and in nulliparous women (P=0.04). A positive correlation between *c-myc* levels and fibroadenoma diameter was demonstrated (r=0.536; P=0.007). Nulliparous mean nodule diameter was superior than parous women (P=0.008).

**Conclusion:** The expression of *ER- $\alpha$* , *bcl-2* and *c-myc* depends on hormonal and reproductive factors, with a possible contribution to lump formation and evolution.

**Key words:** estrogen receptor, proto-oncogenes, fibroadenomas and normal breast.

## **LIST OF ABBREVIATIONS**

ANOVA - analysis of variance

AU - arbitrary units

BMI - body mass index

DTT - dithiothreitol

ER - estrogen receptor

FP - follicular phase

HC - hormonal contraceptive group

LP - luteal phase

PCR - polymerase chain reaction

PR - progesterone receptor

SEM - standard error of mean

UV - ultraviolet

## INTRODUCTION

Fibroadenomas are the most common type of benign breast lumps; they are normally diagnosed in young women and are frequently multiple. Most of the series reports have described their self-limited growth aspect. Their evolution is variable, remaining unchanged or even regressing in size with time.

Fibroadenomas are characterized by hyperplasia and abnormal growth of the lobular breast units [1-3]. Moreover, they express steroid receptors and their growth is influenced by age, parity, and hormones [4-6]. The study of gene alterations and/or deregulation during the reproductive life and the comparison of fibroadenomas with normal tissue may help explain hormonal influences and physiological processes involved in nodule development and evolution.

The estrogen receptor (ER) plays an important role in both normal and neoplastic mammary tissue [7], acting as a nuclear transcription factor and modulating the expression of multiple genes [8,9]. In addition, the c-myc and the bcl-2 gene families have been shown to be important downstream mediators of estrogen actions on proliferation and survival of cancer cells [10], although the mechanisms by which they influence normal or non-transformed breast tissue have not been clearly elucidated. Under the influence of steroid hormones and growth factors, the c-myc proto-oncogene participates in the recruitment of cells into the cell cycle as well as in cellular differentiation and apoptosis [11]. The inner mitochondrial membrane protein bcl-2, in turn, is a marker of estrogen activity which is associated with apoptosis inhibition [12].

Therefore, the aims of the present study were: 1) to compare the gene expression of ER- $\alpha$ , c-myc, and bcl-2 in breast fibroadenomas and in normal circumjacent breast tissue; and 2)



to evaluate the possible influences of menstrual cycle phases, parity, nodule diameter, and use of hormonal contraception on the expression of these genes.

## **PATIENTS AND METHODS**

### **Patients**

The study population included premenopausal women undergoing surgical removal of breast nodules suggestive of fibroadenomas, seen consecutively during a 12-month period at the Breast Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. Fifty-seven patients, whose ages ranged from 14 to 49 years, were selected for the study.

The study protocol was approved by the local Ethics Committee, and written, informed consent was obtained from every subject.

### **Study protocol**

All patients were submitted to routine preoperative assessment. Clinical and reproductive history was recorded, with emphasis on the last three menstrual periods, use of sex steroid-containing drugs, and parity. Body weight, height, and body mass index (BMI) (current weight in kilograms divided by the square of height in meters) were measured. Samples from the central area of fibroadenomas and from the circumjacent normal mammary tissue (i.e. tissue of normal gross appearance) were obtained during the surgery (length = 10 x 5 mm), identified, immediately frozen in liquid nitrogen and then transferred to a -70° C freezer for posterior RNA extraction. The diagnosis of fibroadenoma was based on anatomopathologic examination.

On the same day when excisional biopsy was performed, venous blood samples were drawn for progesterone (P4) determination from an antecubital vein, after 6 to 8 h of fasting. A progesterone value of  $\geq 3$  ng/mL was considered compatible with good lutein activity [13].

Based on the records concerning the last three menstrual periods and on the progesterone dosage, patients were divided into three groups: Group 1, follicular phase (FP), 1-15th day; Group 2, luteal phase (LP), 16-28th day; and Group 3, hormonal contraceptive group (HC), users of combined estrogen and progestin contraceptives. For each group, both fibroadenoma and normal breast tissue were analyzed.

#### **Progesterone (P4) assay**

P4 was measured by chemiluminescent enzyme immunoassay (DPC<sup>®</sup>, Los Angeles, CA, USA), with an assay sensitivity of 0.2 ng/mL, and intra- and inter-assay coefficient of variation of 6.3% and 9.1%.

#### **RNA Extraction**

Sample fragments were submitted to homogenization at 0-4° C in a plastic tube containing 1 ml of Solution D (4M guanidinium thiocyanate; 25 mM sodium citrate, pH 7; 0.5% sarcosyl; 0.1M 2-mercaptoethanol). Total RNA extraction was performed following the guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform method [14]. The optical density ratios (260 nanometers/280 nanometers) of the RNA preparations were greater than 1.6.

### **Reverse-transcriptase polymerase chain reaction**

First strand cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA, using the Super-Script Preamplification System (Invitrogen, life technologies). After denaturing the template RNA and primers Oligo(dT)<sub>12-18</sub> and 10 mM dNTPmix at 65° C for 5 min, a mixture of 200 mM Tris-HCl (pH 8.4) plus 500 mM KCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M dithiothreitol (DTT) and RNaseOUT was added and incubated at 42° C for 2 min, followed by the addition of reverse transcriptase and incubation at 42° C for 50 min. The mixture was heated at 70° C for 15 min to interrupt the reaction, centrifuged and cooled in ice. *E. coli* RNase was added to the mixture and incubated for 20 min at 37° C to destroy untranscribed RNA, as previously described [15]. After this process, cDNA was stored or immediately submitted to polymerase chain reaction (PCR).

PCR was carried out in a final volume of 50 µl. Two µl of the first strand synthesis reaction (with an expected cDNA yield of 4 ng) were denatured at 94° C for 2 min, in the presence of 200 mM Tris-HCl (pH 8.4) plus 500 mM KCl and 50 mM MgCl<sub>2</sub>. After this hot start, the reaction was cooled in ice and a mixture of 10 µl of the same Tris-HCl buffer and 50mM MgCl<sub>2</sub> with dNTP mix, primer sense and antisense and Taq DNA polymerase was added. A 483 base pair (bp) fragment of the ER- $\alpha$  cDNA sequence, a 304 bp fragment of the bcl-2 cDNA sequence, and a 218 bp fragment of the c-myc cDNA sequence were amplified using primers designed to span intron-exon borders, in order to prevent the amplification of any contaminating genomic DNA. Amplification of a 623 bp cDNA fragment, corresponding to the ubiquitously expressed protein  $\beta_2$ -microglobulin ( $\beta_2m$ ), was carried out to adjust the

amounts of cDNA in each sample. All the primers have been previously described [16-19].

The cDNA sequences of the ER- $\alpha$ , bcl-2, c-myc and  $\beta_2$ -m primers are listed in Table 1A.

The standardization of PCR reactions was done by testing a number of cycles (20 to 45) and the amplification was performed in the linear range. All transcripts were analyzed in parallel on at least two separate occasions. A negative control consisted of the product of the first strand reaction performed without the reverse transcription. Final PCR conditions are listed in Table 1B. Following amplification, 15  $\mu$ l of the PCR reaction were size-fractionated on a 1.6% agarose gel stained with ethidium bromide, run at 100 V and visualized under ultraviolet (UV) light. The expected bands were quantified by densitometric analysis using an image-processing system (ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), and the result of the normalization of the gene vs.  $\beta_2$ -microglobulin was expressed as arbitrary units (AU).

### **Statistical analysis**

Results are presented as means  $\pm$  standard error of mean (SEM), unless otherwise noted. Comparisons between group means were analyzed by paired Student's *t* test or one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Duncan's test. Comparisons between median values were analyzed using the Kruskal-Wallis test. Pearson's correlation coefficients were calculated between variables using a two-tailed significance test for variables with Gaussian distribution. Differences were considered to be statistically significant at  $P < 0.05$ . All analyses were performed using the Statistical Packages for the Social Sciences (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

## RESULTS

Among the 57 participants included in the study, 32 had tissue samples submitted to RT-PCR analysis. Fourteen were excluded because of the poor quality of the total RNA extracted, 6 because the anatomopathological diagnosis was discordant from fibroadenoma (1 case of carcinoma, 2 phyllodes tumors, 1 juvenile papillomatosis, 1 lipoma, and 1 case of stromal fibrosis), and 5 because the progesterone levels did not agree with the menstrual phase recording. The mean age of the 32 remaining participants was 25.9 years, and the mean age at menarche was 12.9 years. Ten women had had a full term pregnancy.

Twenty-six patients presented one breast fibroadenoma and six had two or more nodules. In these last cases, only the biggest nodule was sampled and analyzed. The mean diameter of the fibroadenomas was 2.84 cm.

Table 2 shows the clinical, anthropometric and gynecological characteristics of the patients, according to menstrual cycle phase (follicular and luteal phase) and use of hormonal contraceptive. No differences were observed between the three groups, except for the expected higher serum progesterone concentrations in Group 2 (luteal phase).

Thirty-two samples of fibroadenomas paired with adjacent normal mammary tissue were analyzed for expression of ER- $\alpha$ , bcl-2 and c-myc mRNA using RT-PCR as described above.

Figure 1 shows mRNA levels for each gene according to type of tissue (paired statistical comparison). ER- $\alpha$  and bcl-2 mRNA levels were higher in fibroadenomas as compared with normal breast ( $P=0.012$  and  $P=0.001$ , respectively). The expression of c-myc mRNA products was similar in both tissues ( $P=0.647$ ). This was true even when users of hormonal contraceptives were excluded from the analysis (data not shown). The impact of menstrual phase and use of hormonal contraceptives on ER- $\alpha$ , bcl-2 and c-myc mRNA expression in

fibroadenoma and normal breast tissue from all groups is shown in Figure 2. ER- $\alpha$  mRNA levels were significantly higher in the fibroadenoma tissue of patients in the follicular phase when compared with fibroadenomas of contraceptive users and with normal breast tissue from all groups ( $P=0.003$ , ANOVA). bcl-2 mRNA levels were significantly higher in the fibroadenoma tissue of patients in the luteal phase than in the normal breast samples from all groups ( $P=0.007$ ), but similar to the levels found in the fibroadenoma tissue from all other groups. The three groups were similar concerning ER- $\alpha$  and bcl-2 gene expression in normal tissue. In addition, c-myc mRNA levels were similar among the three groups for both fibroadenoma and normal tissue samples ( $P=0.311$ ).

Gene expression was also evaluated in association with nodule size, age, and parity in subjects not using hormonal contraceptives. c-myc mRNA levels were significantly higher in fibroadenomas with a diameter  $\geq 3$  cm as compared to fibroadenomas with  $< 3$  cm in diameter ( $P=0.015$ ) (Figure 3). A positive correlation, not affected when controlled by age, between c-myc mRNA levels and fibroadenoma diameter was demonstrated (Pearson correlation  $r=0.536$ ;  $P=0.007$ ). Concerning parity history, the mean nodule diameter of nulliparous women was 3.2 cm, vs. 2.2 cm in parous women ( $P=0.008$ , Student's *t* test). A significant difference in mean age between nulliparous (21.2 yr) and parous (36.6 yr) women was observed ( $P<0.0001$ ). As could be expected based on this observation, c-myc mRNA levels in fibroadenomas were significantly higher in the nulliparous (younger) group when compared with the parous (older) group ( $P=0.04$ , Student's *t* test) (Figure 3). ER- $\alpha$  and bcl-2 mRNA levels were not affected by the diameter of fibroadenomas and by age or parity.

## DISCUSSION

In the present study, we observed a marked increase in gene expression in fibroadenomas when compared with the matched normal circumjacent breast tissue for ER- $\alpha$  and bcl-2, but not for c-myc. Previous studies have described very broad rates of expression of ER- $\alpha$  mRNA in mammary tissue [7,8,20-22]. ER- $\alpha$  mRNA expression has been observed to be significantly lower in normal tissue than in carcinoma, especially in low-grade ER protein-positive tumors [22,23] from postmenopausal women [24-26]. A positive correlation between ER- $\alpha$  mRNA expression and protein expression has also been demonstrated in previous studies, although the majority of these reports employed breast cancer cell lines and breast carcinoma samples without comparison with normal tissue [8,27,28]. Concerning fibroadenomas, our results showing higher ER- $\alpha$  gene expression in these benign lesions in relation to normal breast tissue are in agreement with previous reports [25,29-32], denoting their hormonal dependence and offering evidence of the existence of a positive correlation between ER- $\alpha$  expression and the proliferative rate of tumors.

The bcl-2 gene is considered to be an estrogen-dependent anti-apoptotic mediator of mammary cell proliferation and tumorigenesis. Wang & Phang [33] have shown a time- and dose-dependent expression of bcl-2 mRNA in MCF-7 cells, a lineage of estrogen-dependent human breast cancer cells following treatment with estradiol. A good association between mRNA levels and bcl-2 protein has also been observed in estradiol-treated human breast cancer cells [34]. Studying different preinvasive breast lesions and normal adjacent lobules and ducts, Viacava et al. [35] reported bcl-2 protein expression in ~90% of the normal structures and in all preinvasive lesions, with the exception of low and intermediately

differentiated ductal carcinoma in situ. Mustonen et al. [36] detected bcl-2 protein in all samples of benign and atypical hyperplasia and sclerosing adenoses.

Like the progesterone receptor (PR), bcl-2 is known to be an ER-inducible marker [33]. In hormone-dependent tissues, such as prostate and breast, hormone deprivation [36,37] or blockade [33] are a stimulus to apoptosis. As shown by our data, the higher expression of ER- $\alpha$  in fibroadenomas in relation to normal breast tissue was associated with a similar behavior of bcl-2 expression, indicating that the influence of estrogen on bcl-2 was preserved in these benign tumors. The same observation of coupled ER and bcl-2 overexpression has also been made in well-differentiated carcinomas [38-40]. In addition, Ferrières et al. [41], studying bcl-2 expression in normal breast and benign tumor tissue have detected a superior expression of bcl-2 protein in fibroadenomas and adenoses as compared to normal lobules and ducts. Gompel et al. [42] also showed increased bcl-2 staining in endometrium (another example of hormone-dependent tissue) hyperplasias in relation to normal tissue.

Since tumor/nodule formation involves alterations in the physiological balance between cell proliferation and apoptosis [35], it seemed appropriate to address the gene expression of the proto-oncogene c-myc in the present study. c-myc has been implicated in the regulation of cell proliferation, differentiation, and apoptosis, but despite intense investigation the function of c-myc and its physiologically relevant targets have not been fully understood yet [43]. In the present study, c-myc gene expression as well as nodule diameter were higher in nulliparous/younger women. This may indicate that the upregulation of c-myc, and consequently of its proliferative activity, is associated with the less differentiated and more proliferative lobules found in this subset of patients. Conversely, c-myc expression decreases with the full breast tissue differentiation reached after a term pregnancy. In breast carcinomas,



c-myc gene expression has also been associated with large and rapidly proliferating tumors [44,45]. One of the difficulties in studying c-myc resides in the variety of roles it may play in mammary epithelial cells, depending on cell genotype and environment (growth or inhibitor factors). Moreover, a great variation in c-myc expression has been reported depending on the tissue employed [46,47]. In normal human breast epithelial cells in culture, the stimulation of c-myc mRNA by treatment with estradiol has been associated with a similar pattern of c-myc protein response [48]; however, this was not the case in the present study, when the absence of changes in c-myc expression in the two cycle phases was analyzed in both fibroadenomas and normal breast tissue.

In the present study, phase of menstrual cycle or use of oral contraceptives did not affect the gene expression of ER- $\alpha$ , bcl-2, and c-myc in normal breast samples. In contrast, fibroadenomas presented higher expression of ER- $\alpha$  mRNA in the follicular phase in comparison to normal breast tissue and fibroadenoma from contraceptive users. Several investigators [49-54] have demonstrated a higher expression of ER- $\alpha$  protein in normal breast during the follicular phase of the cycle in comparison to the luteal phase. Our data concerning fibroadenomas, showing lower and higher ER- $\alpha$  mRNA levels in contraceptive users and in the follicular phase, respectively, may be suggesting that these nodules present a similar physiological fluctuation of ER- $\alpha$  expression as previously described in normal breast tissue.

Apoptosis also appears to go through cyclic variations in normal breast. A higher expression of bcl-2 protein has been reported in the follicular phase of the cycle, with a gradual decrease during the luteal phase [41,55], and with the end of the luteal phase corresponding to a peak in breast cell apoptosis [55]. In contrast, no such change has been observed in fibroadenoma samples [41]. Taken together, the lack of variation in bcl-2 levels in

fibroadenomas reported by Ferrières et al. [41] and also observed in the present study may be suggesting that bcl-2 contributes to nodule proliferation.

The mean fibroadenoma diameter observed in our study was similar to that described in other series [56]; the inverse correlation between nodule diameter and age has also been previously demonstrated [6]. The exclusion of contraceptive users from the analysis when age and parity were evaluated in relation to gene expression and nodule diameter was justified because of a possible interference of contraceptives on breast proliferative rate [50,57].

## **CONCLUSION**

In conclusion, the results of the present study demonstrate that the gene expression of ER- $\alpha$ , bcl-2 and c-myc varies in benign breast tumors and is associated with nodule size, hormonal and reproductive factors, with a possible contribution to the understanding of fibroadenoma development and evolution.

## **Acknowledgments**

We are grateful to Drs. Carlos Henrique Menke, Jorge Villanova Biazús, Nilton Leite Xavier, José Antônio Cavalheiro and Ana Cristina Bittelbrunn and to Eliane Rabin, from the Breast Service at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, for their support in patient selection. We thank the Graduate Research Group (GPPG) at Hospital de Clínicas de Porto Alegre for providing editorial support. This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul) and PRONEX 26/98 (Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência em Pesquisa).

## REFERENCES

1. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL: **Female breast**. In Robbins Pathologic Basis of Disease. Edited by Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Philadelphia: WB Saunders; 1989:1183-1204.
2. Noguchi S, Motomura K, Inaji H, Imaoka S, Koyama H: **Clonal analysis of fibroadenoma and phyllodes tumor of the breast**. Cancer Res 1993, 53:4071-4074.
3. Santen RJ, Pinkerton J: **Benign breast disorders**. In Endocrinology. Edited by DeGroot LJ, Jameson JL. Philadelphia: WB Saunders; 2001:2189-2198.
4. Kuttann F, Fournier S, Durand JC, Mauvais-Jarvis P: **Estradiol and progesterone receptors in human breast fibroadenomas**. J Clin Endocrinol Metab 1981, 52:1225-1229.
5. Fournier S, Kuttann F, de Cicco F, Baudot N, Malet C, Mauvais-Jarvis P: **Estradiol 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in human breast fibroadenomas**. J Clin Endocrinol Metab 1982, 55:428-433.
6. Takei H, Iino Y, Horiguchi J, Maemura M, Yokoe T, Koibuchi Y, Oyama T, Ohwada S, Morishita Y: **Natural history of fibroadenomas based on the correlation between size and patient age**. Jpn J Clin Oncol 1999, 29:8-10.
7. Dotslaw H, Leygue E, Watson PH, Murphy LC: **Expression of estrogen receptor-beta in human breast tumors**. J Clin Endocrinol Metab 1997, 82:2371-2374.
8. Cullen R, Maguire TM, McDermott EW: **Studies on oestrogen receptor- $\alpha$  and - $\beta$  mRNA in breast cancer**. Eur J Cancer 2001, 37:1118-1122.

9. Quirik CC, Nilson JH: **Hormones and gene expression: basic principles.** In *Endocrinology*. Edited by DeGroot LJ, Jameson JL. Philadelphia: WB Saunders; 2001:3-13.
10. Dickson RB, Stancel GM: **Estrogen receptor-mediated processes in normal and cancer cells.** *J Natl Cancer Inst Monogr* 1999, 27:135-145.
11. Nicholson RI, McClelland RA, Robertson JFR, Gee JM: **Involvement of steroid hormone and growth factor cross-talk in endocrine response in breast cancer.** *Endocr Relat Cancer* 1999, 6:373-387.
12. Moore T, Lee AHS: **Expression of CD34 and bcl-2 in phyllodes tumors, fibroadenomas and spindle cell lesions of the breast.** *Histopathology* 2001, 38:62-67.
13. Israel R, Mishell DR, Stone SC, Thorneycroft IH, Moyer DL: **Single luteal phase serum progesterone assay as a indicator of ovulation.** *Am J Obstet Gynecol* 1997, 176:490; discussion 491.
14. Chomczynski P, Sacchi N: **Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** *Anal Biochem* 1987, 162:156-159.
15. Silva ISB, Morch DM, Urnauer L, Spritzer PM: **Androgen-induced cell growth and c-myc expression in human non-transformed epithelial prostatic cell in primary culture.** *Endocr Res* 2001, 27:153-169.
16. Dotslaw H, Leygue E, Watson PH, Murphy LC: **Expression of estrogen receptor-beta in human breast tumors.** *J Clin Endocrinol Metab* 1996, 82(7):2371-2374
17. Taplin TM, Bublely G, Shuster TD, Frantz ME, Spooner AE, Ogata GK, Keer HN, Balk SP: **Mutation of androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer.** *New Engl J Med* 1995, 332(21):1393-1398.

18. Wong H, Anderson WD, Cheng T, Riabowol KT: **Monitoring mRNA expression by polymerase chain reaction: the "Primer-Dropping" method.** Anal Biochem 1994, 223:251-258.
19. Chen Y, Kayano T, Takagi M: **Dysregulated expression of bcl-2 and bax in oral carcinomas: evidence of post-transcriptional control.** J Oral Pathol Med 2000, 29(2):63-69.
20. Speirs V, Parkes AT, Kerin MJ, Walton DS, Carleton PJ, Fox JN, Atkin SL: **Coexpression of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$ : poor prognostic factors in human breast cancer?** Cancer Res 1999, 59:525-528.
21. Shaw JA, Udokang K, Mosquera JM, Chauhan H, Jones JL, Walker RA: **Oestrogen receptors alpha and beta differ in normal human breast and breast carcinomas.** J Pathol 2002, 198:450-457.
22. Iwao K, Miyoshi Y, Egawa C, Ikeda N, Tsukamoto F, Noguchi S: **Quantitative analysis of estrogen receptor-alpha and -beta messenger RNA expression in breast carcinoma by real-time polymerase chain reaction.** Cancer 2000, 89:1732-1738.
23. Leygue E, Dotzlaw H, Watson PH, Murphy LC: **Altered estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  messenger RNA expression during human breast tumorigenesis.** Cancer Res 1998, 58:3197-3201.
24. Hansen RK, Bissell MJ: **Tissue architecture and breast cancer: the role of extracellular matrix and steroid hormones.** Endocr Relat Cancer 2000, 7:95-113.
25. Shoker BS, Jarvis C, Clarke RB: **Estrogen receptor-positive proliferating cells in the normal and precancerous breast.** Am J Pathol 1999, 155:1811-1815.

26. Shoker BS, Jarvis C, Sibson DR, Walker C, Sloane JP: **Oestrogen receptor expression in the normal and pre-cancerous breast.** *J Pathol* 1999, 188:237-244.
27. Tong D, Schneeberger C, Czerwenka K, Schmutzler RK, Speiser P, Kucera E, Concin N, Kubista E, Leodolter S, Zeillinger R: **Messenger RNA determination of estrogen receptor, pS2, and plasminogen activator inhibitor-1 by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction in human breast cancer.** *Clin Cancer Res* 1999, 5:1497-1502.
28. Nagai MA, Marques LA, Yamamoto L, Fujiyama CT, Brentani MM: **Estrogen and progesterone mRNA levels in primary breast cancer: association with patient survival and other clinical and tumor features.** *Int J Cancer* 1994, 59:351-356.
29. Dahmouh L, Pike MC, Press MF: **Hormones and breast-cell proliferation.** In *Treatment of the Postmenopausal Woman: Basic and Clinical Aspects.* Edited by Lobo RA. New York: Raven Press; 1994:325-337.
30. Allred DC, Mohsin SK, Fuqua SAW: **Histological and biological evolution of human premalignant breast disease.** *Endocr Relat Cancer* 2001, 8:47-61.
31. Roger P, Sahla ME, Makela S, Gustafsson JA, Baldet P, Rochefort H: **Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors.** *Cancer Res* 2001, 61:2537-2541.
32. Palmieri C, Cheng GJ, Saji S, Zelada-Hedman M, Warri A, Weihua Z, Van Noorden S, Wahlstrom T, Coombes RC, Warner M, Gustafsson JA: **Estrogen receptor beta in breast cancer.** *Endocr Relat Cancer* 2002, 9:1-13.
33. Wang TTY, Phang JM: **Effects of estrogen on apoptotic pathways in human breast cancer cell line MCF-7.** *Cancer Res* 1995, 55:2487-2489.

34. Teixeira C, Reed JC, Pratt C: **Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving bcl-2 proto-oncogene expression in human breast cancer cells.** *Cancer Res* 1995, 55:3902-3907.
35. Viacava P, Naccarato A, Bevilacqua G: **Different proliferative patterns characterize different preinvasive breast lesions.** *J Pathol* 1999, 188:245-251.
36. Mustonen M, Raunio H, Paakko P, Soini Y: **The extent of apoptosis is inversely associated with bcl-2 expression in premalignant and malignant breast lesions.** *Histopathology* 1997, 31:347-354.
37. Gompel A, Somai S, Chaouat M, Kazem A, Kloosterboer HJ, Beusman I, Forgez P, Mimoun M, Rostene W: **Hormonal regulation of apoptosis in breast cells and tissues.** *Steroids* 2000, 65:593-598.
38. Quong J, Eppenberger-Castori S, Moore D, Scott GK, Birrer MJ, Kueng W, Eppenberger U, Benz CC. **Age-dependent changes in breast cancer hormone receptors and oxidant stress markers.** *Breast Cancer Res Treat* 2002, 76:221-236.
39. Hahm HA, Davidson NE: **Apoptosis in the mammary gland and breast cancer.** *Endocr Relat Cancer* 1998, 5:199-211.
40. Yang Q, Sakurai T, Jing X, Utsunomiya H, Shan L, Nakamura Y, Nakamura M, Oura S, Suzuma T, Yoshimura G, Umemura T, Kokawa Y, Kakudo K: **Expression of bcl-2, but not bax, correlates with estrogen receptor status and tumor proliferation in invasive breast cancer.** *Pathol Int* 1999, 49:775-780.
41. Ferrières G, Cuny M, Simony-Lafontaine J. **Variation of bcl-2 expression in breast ducts and lobules in relation to plasma progesterone levels: overexpression and absence of variation in fibroadenomas.** *J Pathol* 1997, 183:204-211.

42. Gompel A, Sabourin JC, Martin A, Yaneva H, Audouin J, Decroix Y, Poitout P: **Bcl-2 expression in normal endometrium during the menstrual cycle.** Am J Pathol 1994, 144:1195-1202.
43. Nass SJ, Dickson RB. **Epidermal growth factor-dependent cell cycle progression is altered in mammary epithelial cells that overexpress c-myc.** Clin Cancer Res 1998, 4:1813-1822.
44. Aulmann S, Bentz M, Sinn HP: **C-myc oncogene amplification in ductal carcinoma in situ of the breast.** Breast Cancer Res Treat 2002, 74:25-31.
45. Bieche I, Laurendau I, Tozlu S: **Quantification of Myc gene expression in sporadic breast tumors with a real-time reverse transcription-PCR assay.** Cancer Res 1999, 59:2759-2765.
46. Liao DJ, Dickson RB: **C-myc in breast cancer.** Endocr Relat Cancer 2000, 7:143-164.
47. Pich A, Margaria E, Chiusa L: **Oncogenes and male breast carcinoma: cerb-2 and p53 coexpression predicts a poor survival.** J Clin Oncol 2000, 18:2948-2956.
48. Leygue E, Gol-Winkler R, Gompel A, Louis-Sylvestre C, Soquet L, Staub S, Kuttenn F, Mauvais-Jarvis P: **Estradiol stimulates c-myc proto-oncogene expression in normal human breast epithelial cells in culture.** J Steroid Biochem Mol Biol 1995, 52:299-305.
49. Markopoulos C, Berger U, Wilson P, Gazet JC, Coombes RC **Oestrogen receptor content of normal breast cells and breast carcinomas throughout the menstrual cycle.** Br Med J 1988, 296:1349-1351.
50. Anderson TJ, Battersby S, King RJ, McPherson K, Going JJ: **Oral contraceptive use influences resting breast proliferation.** Hum Pathol 1989, 20:1139-1144.



51. Ricketts D, Turnbull L, Ryall G, Bakhshi R, Rawson NS, Gazet JC, Nolan C, Coombes RC: **Estrogen and progesterone receptors in normal female breast.** *Cancer Res* 1991, 51:1817-1822.
52. Söderqvist G, Isaksson E, von Schoultz B, Carlstrom K, Tani E, Skoog L: **Proliferation of breast epithelial cells in healthy women during the menstrual cycle.** *Am J Obstet Gynecol* 1997, 176:123-128.
53. Kahn SA, Rogers MAM, Khurana KK, Meguid MM, Numann PJ: **Estrogen receptor expression in benign breast epithelium and breast cancer risk.** *J Natl Cancer Inst* 1998, 90:37-42.
54. Russo J, Santen RJ, Russo I: **Hormonal control of breast development.** In *Endocrinology*. Edited by DeGroot LJ, Jameson JL. Philadelphia: WB Saunders; 2001:2181-2188.
55. Sabourin JC, Martin A, Baruch J, Truc JB, Gompel A, Poitout P: **Bcl-2 expression in normal breast tissue during the menstrual cycle.** *Int J Cancer* 1994, 59:1-6.
56. Haagensen CD: **Adenofibroma.** In *Diseases of the Breast*, edn 3. Edited by Haagensen CD. Philadelphia: WB Saunders; 1986:267-283.
57. Olsson H: **Tumor biology of a breast cancer at least partly reflects the tumor biology of the tissue/epithelial cell of origin at the time of the initiation a hypothesis.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000, 74:345-350.

## LEGENDS TO FIGURES

**Figure 1. A)** Representative gels showing ER- $\alpha$ , bcl-2, and c-myc mRNA levels determined by RT-PCR from normal breast and fibroadenomas. 483 bp, 304 bp, 218 bp, and 623 bp fragments corresponding, respectively, to ER- $\alpha$ , bcl-2, c-myc, and  $\beta_2$ -microglobulin RT-PCR products, are visualized in agarose gel stained with ethidium bromide. **B)** ER- $\alpha$ , bcl-2, and c-myc mRNA quantitative results in relation to  $\beta_2$ -microglobulin optical density (arbitrary units) of bands (mean  $\pm$  SEM). \*P=0.012 ER- $\alpha$  in fibroadenomas vs. normal breast (Student's paired *t* test, two tailed). \*\*P=0.001 bcl-2 in fibroadenomas vs. normal breast (Student's paired *t* test, two tailed).

**Figure 2. A)** ER- $\alpha$ , **B)** bcl-2, and **C)** c-myc mRNA quantitative results in relation to  $\beta_2$ -microglobulin optical density (arbitrary units) of bands (mean  $\pm$  SEM), according to menstrual phase and use of hormonal contraceptive. HC: Hormonal Contraceptive Group. \*P=0.003 vs. fibroadenomas from contraceptive users and all normal tissue from all groups (one-way ANOVA, Duncan's test). \*\*P=0.007 vs. normal breast samples from all groups (one-way ANOVA, Duncan's test).

**Figure 3. A)** Representative gel showing c-myc mRNA levels from fibroadenomas determined by RT-PCR, according to nodule diameter (band 1-12, <3 cm; band 13-24,  $\geq$ 3 cm). 218 bp and 623 bp fragments corresponding, respectively, to c-myc and  $\beta_2$ -microglobulin RT-PCR products, are visualized in agarose gel stained with ethidium bromide. **B)** c-myc mRNA quantitative results in relation to  $\beta_2$ -microglobulin optical density (arbitrary units) of bands (mean  $\pm$  SEM). \* P=0.015 vs. fibroadenoma diameter <3 cm (Student's *t* test, two tailed);

**C)** Representative gel showing fibroadenoma c-myc mRNA levels determined by RT-PCR according to patient's parity (1-8, nulliparous; 9-16, parous women). 218 bp and 623 bp fragments corresponding, respectively, to c-myc and  $\beta_2$ -microglobulin RT-PCR products, are visualized in agarose gel stained with ethidium bromide. **D)** c-myc mRNA quantitative results in relation to  $\beta_2$ -microglobulin optical density (arbitrary units) of bands (mean  $\pm$  SEM). \*\* P=0.04 vs. parous women (Student's t test, two tailed).

**Figure 1**

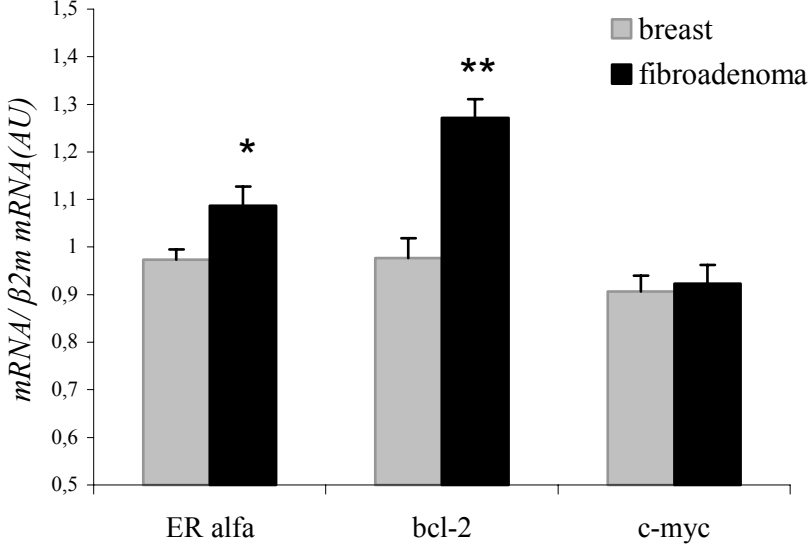
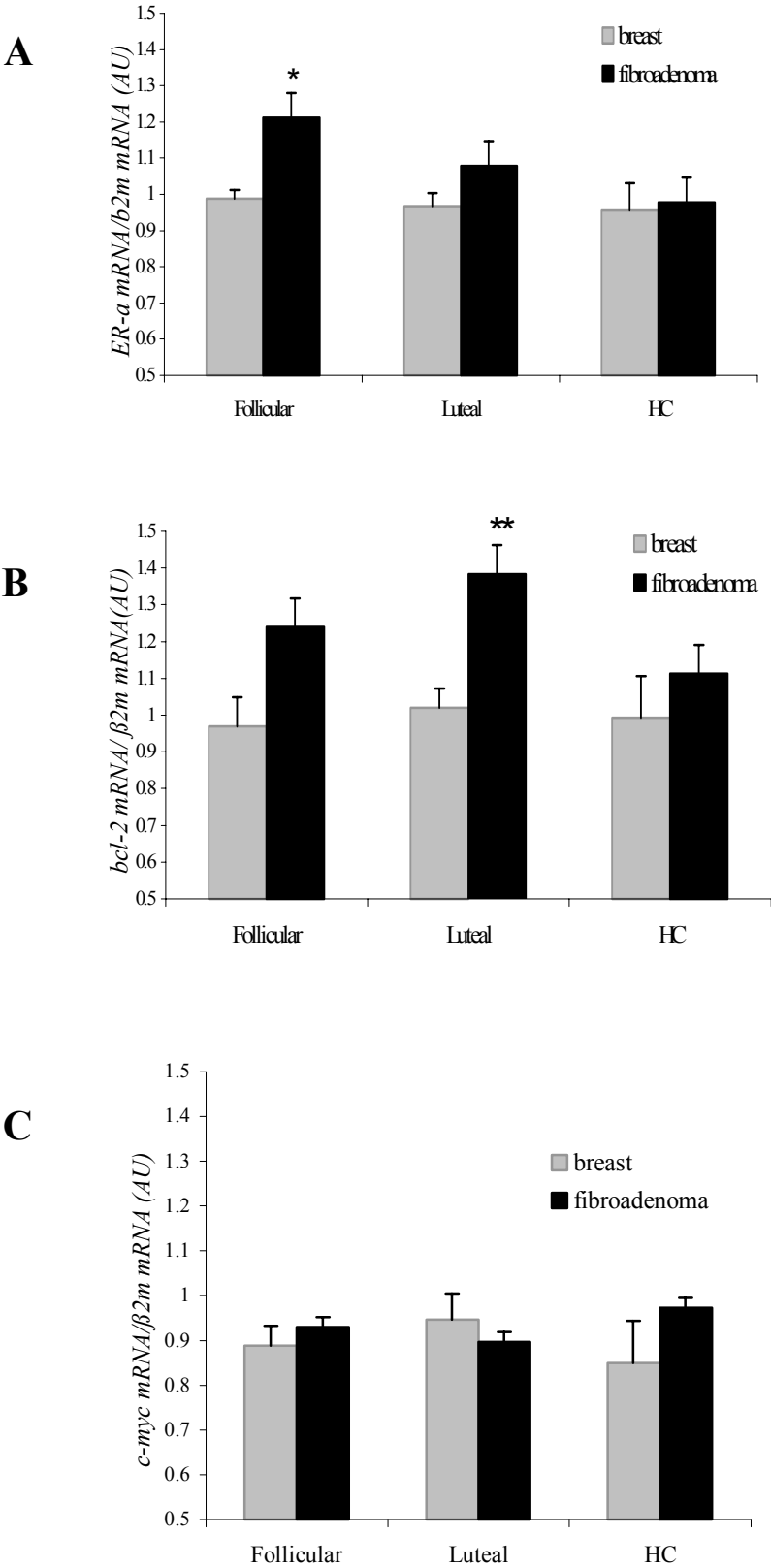
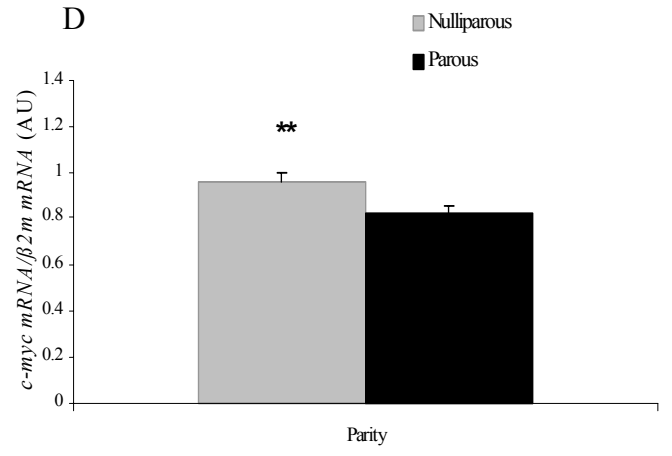
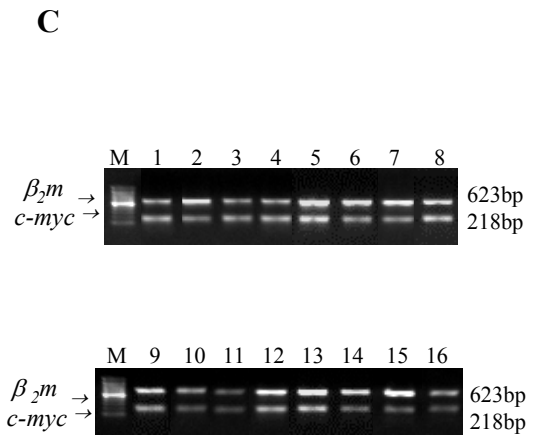
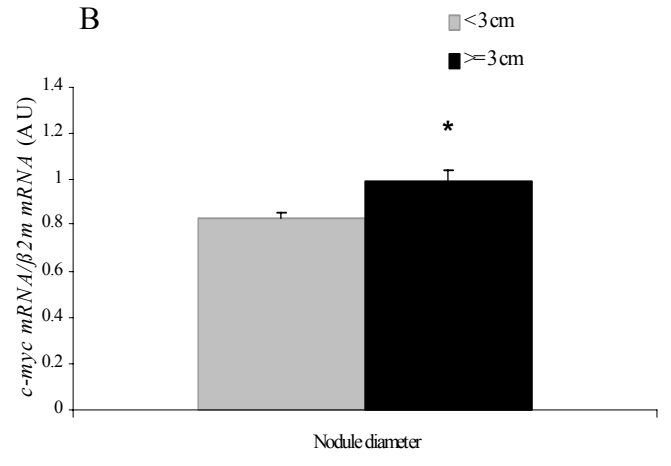
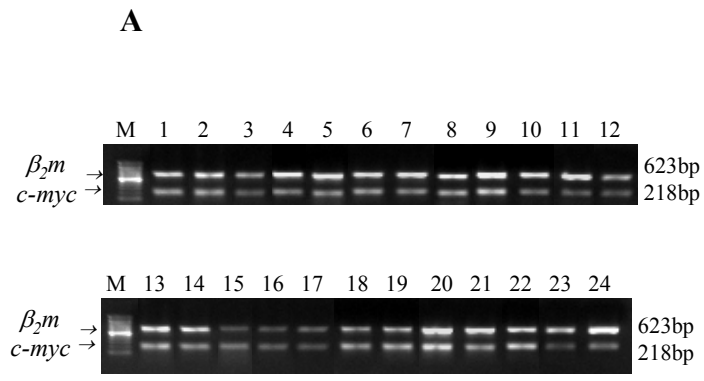


Figure 2



**Figure 3**



**Table 1. A)** Sequence and localization of primers in  $\beta_2$ -microglobulin ( $\beta_2m$ ), c-myc, bcl-2 and ER- $\alpha$  cDNA sequences, expected sizes of the amplified fragments and **B)** PCR conditions

**A)**

<b>Gene</b>	<b>Reference</b>	<b>Nucleotide location</b>	<b>Sequence (5'-3')</b>	<b>Size of fragment</b>
<b><math>\beta_2m</math></b>				
Sense (5'-3')	Taplin 1995	*	5' ATCCAGCGTACTCCAAAGATTCAG 3'	623 bp
antisense (3'-5')			5' AAATTGAAAGTTAACTTATGCACGC 3'	
<b>c-myc</b>				
Sense (5'-3')	Wong 1994	*	5' CAAGAGGCGAACACACAACGTCT 3'	218 bp
antisense (3'-5')			5' AACTGTTCTCGTCGTTTCCGCAA 3'	
<b>bcl-2</b>				
Sense (5'-3')	Chen 2000	431-450	5' GTGGAGGAGCTCTTCAGGGA 3'	304 bp
antisense (3'-5')		715-734	5' AGGCACCCAGGGTGATGCAA 3'	
<b>ER-<math>\alpha</math></b>				
Sense (5'-3')	Dotslaw 1996	1060-1083	5' CAGGGGTGAAGTGGGGTCTGCTG 3'	483 bp
antisense (3'-5')		1520-1543	5' ATGCGGAACCGAGATGATGTAGC 3'	

**B) PCR conditions\*\***

Gene	Denaturation	Annealing	Extension	Cycles	Final Extension
$\beta_2m$	94° C 1 min	55° C 1 min	72° 1 min	30	72° C 5 min (Taplin 1995)
c-myc	94° C 1 min	55° C 1 min	72° 1 min	30	72° C 5 min (Wong 1994)
bcl-2	94° C 1 min	59° C 45 seg	72° 45 seg	35	72° C 5 min (Chen 2000)
ER- $\alpha$	94° C 1 min	60° C 30 seg	72° 1 min	32	72° C 5 min (Dotslaw 1996)

\*Original reference does not describe nucleotide location, but corresponds to the following sequences:

$\beta_2m$ : GenBank, accession no. M17986 (sense: 943-1356; antisense: 2609-2633).

c-myc: GenBank, accession no. NM002467 (sense: 1620-1642; antisense: 1816-1838).

\*\*RT- PCR protocols were adjusted according to the cited references.



**Table 2.** Clinical, anthropometric, and hormonal parameters of patients

	<b>Follicular phase</b>	<b>Luteal phase</b>	<b>HC<sup>φ</sup></b>
	<b>P</b>		
Number of cases	12	12	8
Age (yr)	24.8±9.3	27.9±9.8	24.6±4.6
	0.607		
Age at menarche (yr)	13.5±1.6	12.7±1.2	12.4±1.6
	0.202		
Nulliparity <sup>#</sup>	8	8	6
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21.5±3.6	22.6±3.6	23.9±5.0
	0.432		
Nodule diameter (cm)	2.9±1.0	2.85±0.8	2.8±1.4
	0.986		
Progesterone*	0.5 (0.4-1.3)	6.6** (3.8-13.5)	0.3 (0.2-0.4)
	0.000**		

Values are expressed as mean ± SD (One-way ANOVA, Duncan's test) or \*median and interquartile range (25% to 75%) (Kruskall-Wallis test).

\*\*P<0.0001

φHC: hormonal contraceptive group

#Nulliparity: Not having had a pregnancy reaching 20 weeks of gestational age or more.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1

Protocolo do estudo “Expressão gênica de *c-myc*, *bcl-2*, e do receptor estrogênico- $\alpha$ , em tecido mamário normal e fibroadenomas.”

Caso N°:

Registro HCPA:

Iniciais do Nome:

Data do Procedimento Cirúrgico:

Cirurgia Mama: ( ) D ( ) E

N° de nódulos: Mama: ( ) D ( ) E

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 estimada do ciclo em que foi realizada a cirurgia:

1- ( ) Fase folicular;

2- ( ) Fase lútea;

3- ( ) Uso de método anticonceptivo hormonal.

Progesterona sérica:

Laudo AP:

## ANEXO 2

### TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

#### Nome da paciente:

**Investigador principal:** Rodrigo Cericatto

**Orientadora:** Prof. Dra. Poli Mara Spritzer

**Co-orientadora:** Prof. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva

#### Título do Projeto:

“Expressão gênica de c-myc, bcl-2, e do receptor estrogênico- $\alpha$ , em tecido mamário normal e em fibroadenomas.”

O objetivo deste estudo é o de buscar explicações para o surgimento e crescimento de nódulos mamários benignos. Na literatura médica, vários são os fatores que têm sido envolvidos com a origem dos nódulos mamários. Recentemente, com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, novos métodos de estudo dos nódulos da mama, e do tecido mamário normal, estão à disposição. Entre estes métodos, podemos analisar algumas características genéticas das lesões mamárias benignas e do tecido mamário normal. Dentre as lesões mamárias, benignas, que podem ser estudadas, destacam-se os fibroadenomas, que são nódulos bastante frequentes nas clínicas de mastologia.

A minha participação no estudo, Sra. \_\_\_\_\_, corresponde a informar dados sobre minha história ginecológica e obstétrica, uma coleta sangüínea no dia da minha cirurgia e a permitir que um pequeno fragmento/pedaço do meu 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, estou ciente de que serei submetida à coleta de 10mL de sangue venoso, no dia da minha cirurgia, com o objetivo de calcular 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.

Eu fui informada que todos os dados coletados sobre mim, e os resultados do estudo genético do meu nódulo, e do tecido mamário normal que o envolve, serão examinados pelos pesquisadores acima relatados, sendo seus resultados confidenciais e não compartilhados com outras pessoas. Dados que possam me identificar, como nome, serão mantidos em um arquivo separado dos demais informações do estudo. Meu sangue e todas as demais informações sobre mim serão identificados somente por números.

Eu também compreendo que posso sair do projeto ou negar-me a realizar qualquer procedimento a qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer prejuízo a meu atendimento.

Eu fui informada e compreendo o objetivo do projeto descrito acima e seus procedimentos. Eu também fui informada e entendi os riscos, desconforto e benefícios previstos.

Eu fui informada e compreendi que tenho acesso ao Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre se tiver qualquer questão em relação aos meus direitos como participante do projeto de pesquisa, através de seu presidente ou representante legal. Eu também compreendo que o comitê pode ter acesso a mim e/ou meus dados para desempenho de suas atribuições.

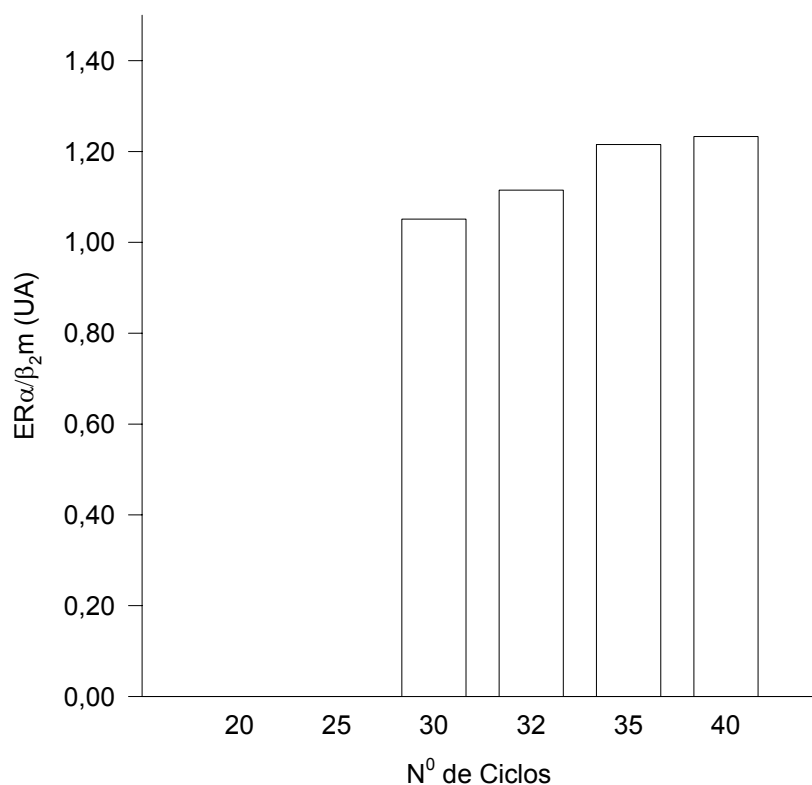
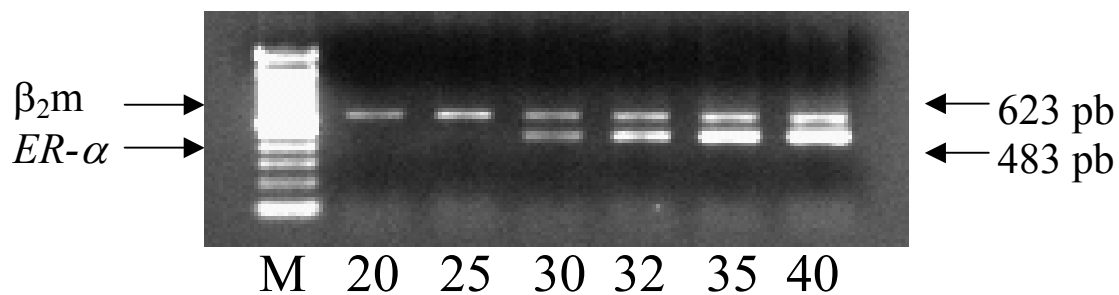
O pesquisador responsável é o médico Rodrigo Cericatto, sob orientação do Profa. Dra. Poli Mara Spritzer.

Fone para contato no HCPA ++ - 51-3316-8103.

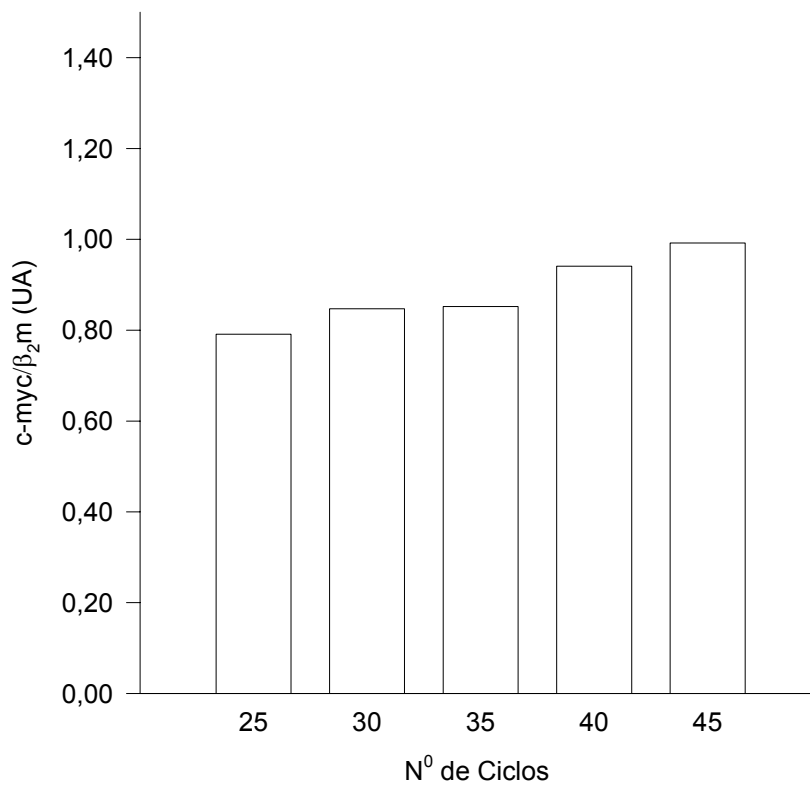
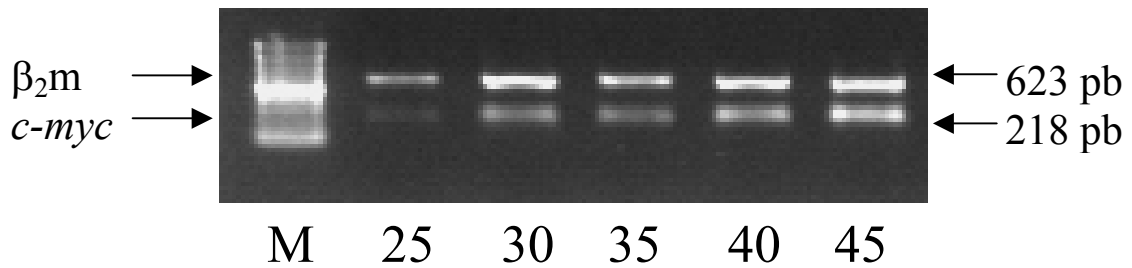
Pesquisador  
Data e local

Paciente  
Data e local

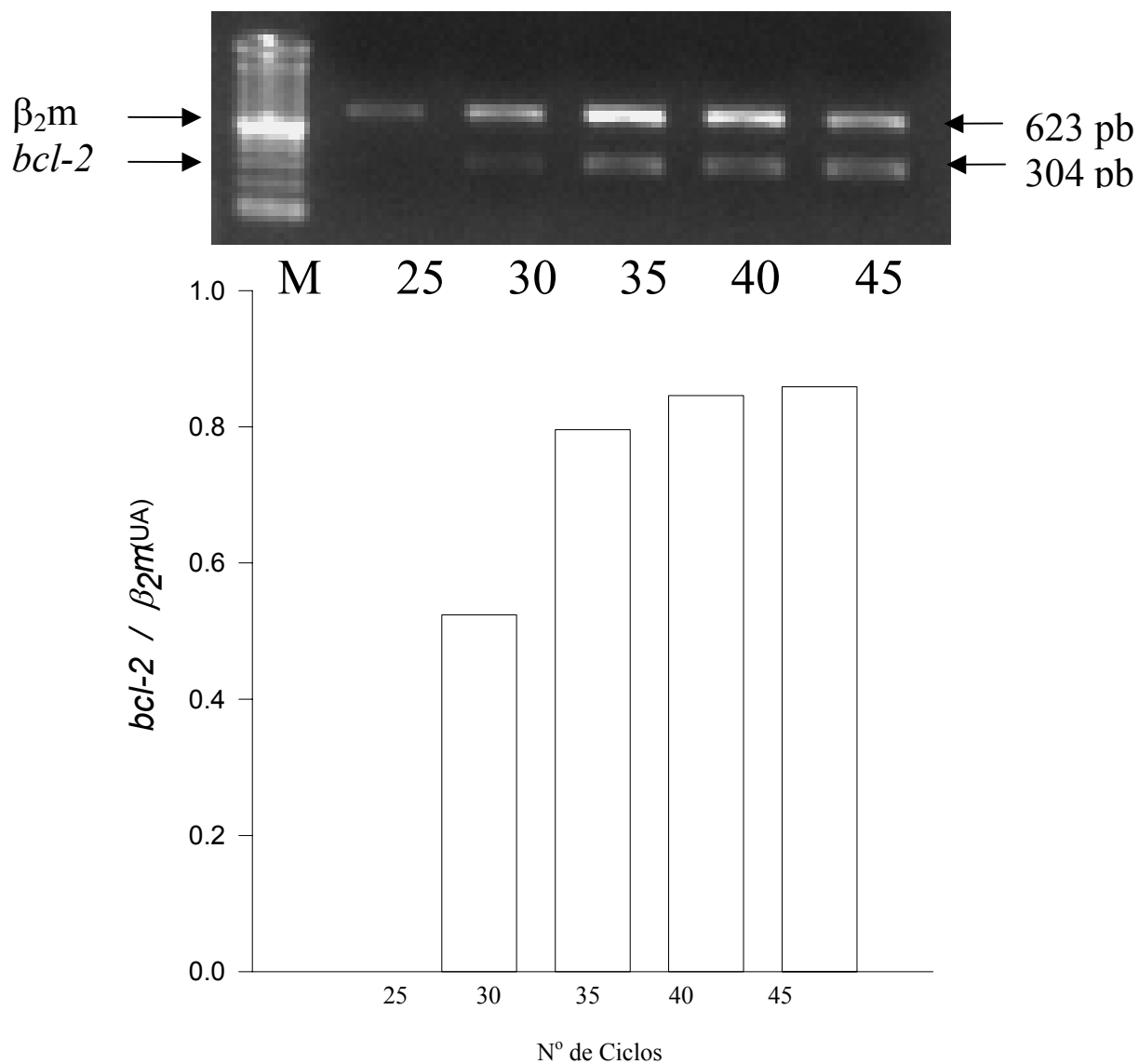
**ANEXO 3 – Curvas de ciclos de PCR para padronização da expressão gênica de ER- $\alpha$ , *c-myc*, *bcl-2*.**



Curva de ciclos de PCR para padronização e determinação dos níveis de mRNA de ER- $\alpha$  no tecido mamário normal. O gel demonstra que a expressão do gene do ER $\alpha$  se inicia com 30 ciclos, aumentando progressivamente até 40 ciclos. As barras representam a relação ER $\alpha$ / $\beta_2$ m (483 pb/ 623pb). Optou-se por 32 ciclos para a amplificação das amostras partindo de 4 ng de cDNA.



Curva de ciclos de PCR para padronização e determinação dos níveis de mRNA de *c-myc* no tecido mamário normal. O gel demonstra que a expressão do gene do *c-myc* se inicia com 25 ciclos, aumentando progressivamente até 45 ciclos. As barras representam a relação *c-myc*/ $\beta_2m$  (218 pb/ 623 pb). Optou-se por 30 ciclos para a amplificação das amostras partindo de 4 ng de cDNA.



Curva de ciclos de PCR para padronização e determinação dos níveis de mRNA de *bcl-2* no tecido mamário normal. O gel demonstra que a expressão do gene do *bcl-2* se inicia com 30 ciclos, aumentando progressivamente até 45 ciclos. As barras representam a relação *bcl-2*/ $\beta_2m$  (304 pb/ 623pb). Optou-se por 35 ciclos para a amplificação das amostras partindo de 4 ng de cDNA.