

Nancy Bueno Figueiredo

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

Tese a ser apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia em Clínica Médica, Área de Concentração: Metabologia e Nutrição.

**Botucatu
2006**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Nancy Bueno Figueiredo

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

Tese a ser apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, *Campus* de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia em Clínica Médica, Área de Concentração: Metabologia e Nutrição.

Nancy Bueno Figueiredo

**INTER-RELAÇÃO ENTRE A MODULAÇÃO
GÊNICA DA TRIIODOTIRONINA (T3) E
DO ESTRADIOL (E2) EM
ADENOCARCINOMA DE MAM**

Tese a ser apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, *Campus* de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia em Clínica Médica, Área de Concentração: Metabologia e Nutrição.

Orientadora: Profa. Dra. Célia Regina Nogueira

**Botucatu
2006**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Figueiredo, Nancy Bueno.

Inter-relação entre a modulação gênica da triiodotironina (T3) e do estradiol (E2) em adenocarcinoma de mama / Nancy Bueno Figueiredo. – Botucatu : [s.n.], 2006.

**Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista, 2006.**

Orientador: Prof^a. Dr^a. Célia Regina Nogueira.
Assunto CAPES: 40500004

1. Mama - Câncer. 2. Etinil estradiol. 3. Biologia molecular. 4. Triiodotironina.

CDD 612.62

Palavras chave: Adenocarcinoma de mama; Estradiol; Expressão gênica; Triiodotironina.

À vida!

Agradecimientos

- Ao longo da realização deste trabalho, muitas pessoas tiveram papel fundamental, técnica ou emocionalmente me apoiando, doando-me um pouco de si... São por essas relações que valem a vida! Muito obrigada por me ajudarem! Agradeço do fundo da minha alma:
- Aos meus amados pais, José e Maria, os quais conceberam minha vida, minha educação e muito da minha determinação! Ofereço aos senhores, com muita gratidão, este trabalho.
- À minha Orientadora Maravilhosa, Profa. Dra. Célia Regina Nogueira, que foi além da área científica, uma orientadora da vida... Agradeço por tudo: pela minha formação científica, pela sua dedicação, pelo amparo e pela compreensão nas horas difíceis. São 13 anos de convívio e orientação! Muito obrigada!
- À FAPESP, pelo apoio financeiro. Sem ele, nada seria possível.
- À Dra. Maria Mitzi Brentani, pela doação das células MCF-7, MDA-MB-231 e HB4a. Agradeço também por abrir seu laboratório para que eu pudesse aprender a técnica de cultura de células, com pessoas encantadoras como a Dra. Lúcia, a Dra. Patrícia e a doutoranda Rosângela. Essas últimas pessoas estiveram sempre em colaboração constante na resolução de problemas rotineiros. Muito obrigada!
- À cara Sílvia Helena Cestari, pela ajuda diária, pelo companherismo e pela dedicação. Muito deste trabalho é seu! Muito obrigada por tudo!
- Aos caros colegas do Laboratório Experimental da Clínica Médica: Sueli, Sandro, Denise, Patrícia, José Carlos, Silvânia, Vivian, Olga, André. Obrigada pela convivência agradável e ajuda diária.
- À Dra. Dirce Maria Carraro e à Dra. Helena Paula Brentani do Instituto Ludwig de Pesquisa em Câncer (SP), com toda a sua equipe: Jane, Louise, Diogo, Eduardo... Agradeço pela colaboração na realização e análise dos *microarrays*. Muito obrigada!
- À Disciplina de Endocrinologia e Metabologia da FMB (UNESP): Dra. Célia, Dra. Ana Valéria, Dra. Gláucia, Dra. Walkíria, Adriana, Bibiana, Juliana e residentes. Muito obrigada pela minha formação e pela convivência.

- *Aos meus antigos orientadores de Iniciação Científica, que exerceram importante papel em minha formação: Dr. Brandão, Dra. Ana Valéria, Dr. Hoshino, Dr. Rollo. Muito obrigada!*
- *Ao Fê (José Fernando Grana)... Agradeço pela calma, paciência, compreensão e pelo amor. Você é muito importante para mim. Obrigada por tudo.*
- *A algumas pessoas especiais, que me apoiaram nessa trajetória, dando-me um ombro amigo e mais estabilidade emocional para enfrentar o dia-a-dia, deixando a estrada menos acidentada e mais florida: Elizabeth Murari, Renata B. N. Almeida, Roberta B. Molina, Cristiane S. Zoner, Alexander Pitas, meu irmão Flávio e minha cunhada Renata, Família Grana, Ileana Rubiò, Keila Bau. Muito obrigada.*

Sumário

1.	<i>INTRODUÇÃO</i>	24
1.1.	Tecido mamário e ação hormonal.....	25
1.2.	Tireoidopatia e adenocarcinoma de mama.....	26
1.3.	Os receptores nucleares.....	28
1.3.1.	Domínios funcionais dos receptores nucleares.....	30
1.3.2.	Co-reguladores dos receptores nucleares.....	32
1.3.3.	Mecanismo de ação clássico (genômico) dos receptores nucleares.....	34
1.3.4.	Receptores de hormônio estrógeno.....	35
1.3.4.1.	Via não clássica de regulação transcricional pelo ER.....	37
1.3.4.2.	Atividade não-genômica do ER.....	38
1.3.5.	Receptores de hormônios tireoidianos.....	42
1.3.5.1.	Mecanismo de ação dos receptores dos hormônios tireoidianos.....	44
1.3.6.	<i>Cross-talk</i> entre os RNs.....	46
1.4.	ER, TR e adenocarcinoma de mama.....	47
2.	<i>HIPÓTESE</i>	50
3.	<i>OBJETIVO</i>	52
4.	<i>MATERIAIS E MÉTODOS</i>	54
4.1.	Cultivo de células.....	55
4.2.	Manutenção das linhagens em estoque.....	56
4.3.	Tratamento do soro com carvão-dextrana.....	56
4.4.	Tratamento das linhagens celulares.....	57
4.5.	Extração de RNA total.....	57
4.6.	Purificação do RNA através da técnica de fenol clorofórmio.....	58
4.7.	A tecnologia do cDNA <i>microarrays</i>	58
4.7.1.	Mapa da membrana do <i>microarrays</i>	59
4.7.1.	Hibridização e análise dos <i>microarrays</i>	61
5.	<i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	63
6.	<i>RESULTADOS</i>	64
6.1.	Cultura de células.....	65
6.2.	Dendograma das membranas hibridizadas.....	68
6.5.	Resultados da hibridização das membranas.....	70
6.5.1.	Análise das hibridizações das células MCF-7.....	70
6.5.2.	Análise das hibridizações das células MDA-MB-231.....	72
6.5.3.	Análise das hibridizações das células S30.....	74

6.5.4.	Análise da ação do TAM nos genes diferencialmente expressos ($p < 0,05$; $\text{fold} > 2,0$ e $p\text{FDR} < 0,05$) nas linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e S30.....	75
7.	<i>DISCUSSÃO</i>	77
7.1.	Genes diferencialmente expressos nas células MCF-7.....	78
7.1.1.	<i>Amphiregulin</i>	78
7.1.2.	<i>Fibulin 1</i>	81
7.1.3.	<i>Claudin 6</i>	82
7.1.4.	<i>Pericentriolar material 1</i>	84
7.1.5.	<i>Premature Ovarian Failure 1B, Likely Ortholog of Rat Vacuole Membrane Protein 1, FAD104, Proteína FLJ20073</i>	84
7.2.	Genes diferencialmente expressos nas células MDA-MB-231.....	85
7.3.	Genes diferencialmente expressos nas células S30.....	86
8.	<i>CONCLUSÕES</i>	88
9.	<i>BIBLIOGRAFIA</i>	90
10.	<i>ANEXOS</i>	117

Lista de Abreviaturas

AF-2 – região de função de ativação 2
AIB1 - *amplified in breast cancer*
AMPc - adenosina Monofosfato cíclico
ANTI-TPO - anticorpo anti-tireoperoxidase
AP-1 – *activator protein 1*
AR – *amphiregulin*
ATV – tripsina
BCa – *breast cancer*
bHLH-PAS - *basic helix-loop-helix-Per/ARNT/Sim*
CaM – adenocarcinoma de mama
CARM-1 - *arginine metiltransferase 1*
Cat. n° - número no catálogo
cav1 - *caveolin 1*
CBP - *CREB-binding protein*
CCD - *charged-coupled device*
cDNA – ácido desoxirribonucléico complementar
COMT – catecol-O-metiltransferases
CR-1 – cripto-1
CREB – *cyclic AMP response element binding protein*
CYP1B1 - citocromo P450 (família 1, subfamília B, polipeptídeo 1)
CYP19 - aromatase
DBD – domínio de ligação ao DNA
DNA – ácido desoxirribonucleico
DMSO – dimetilsulfóxido
DEPC – dietilpirocarbonato
DRs – sequências de repetições diretas
E2 – 17beta-estradiol
ECM – matrix extracelular
EGF – fator de crescimento epidermal
EGFR – receptor do fator de crescimento epidermal
EMMPRIN - indutor de matrix metaloproteinases extracelular
ER – receptor de estrógeno
ERE – elemento responsivo ao estrógeno
FBS – soro fetal bovino

GR – receptor de glicocorticóide
HDACs - deacetilases de histonas
HMG - *high mobility group*
HRE – elementos responsivos a hormônios
HRG-β1- *heregulin*
HSPs – proteínas de choque térmico
HT – hormônios tireoidianos
HTA – *histone acetyltransferase*
IGFR-1 - *insulin-like growth factor receptor 1*
Kb – mil pares de base
LBD – domínio de ligação ao ligante
MAPK - *mitogen-activated protein kinase*
MISS - *membrane-initiated steroid signaling*
MNAR - *modulator of nongenomic activity of the estrogen receptor*
MMP - metaloproteinase da matriz extracelular
MR – receptor de mineralocorticóide
MTA1 - *metastasis-associated gene family*
Na/K-ATPase – enzima sódio/potássio dependente de adenosina trifosfato
NEAA – solução de aminoácidos não essenciais
N-CoR - *nuclear Receptor Corepressor*
NRIF3 - *nuclear receptor-interacting factor 3*
NQO1 – oxiredutases de quinonas 1 NADPH
PCR – reação em cadeia de polimerase
pFDR – *false discovery ratio*
PI3k - fosfaditil-inositol quinase 3
PPAR – receptores de proliferadores peroxissomais
PR – receptor de progesterona
PTA - *tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetato*
RAR – receptor do ácido retinóico
RN – receptores nucleares
RNA – ácido ribonucléico
RNAm – ácido ribonucléico mensageiro
RT-PCR – reação em cadeia de polimerase com transcriptase reversa
RXR – *retinoid x receptor*

SERMs - moduladores seletivos do receptor estrogênico
SP1 – SP1 *transcription factor*
SRY - *sex determinig region Y*
RPM – rotações por minuto
SHC - *Src homology 2 domain containing transforming*
SMRT - *silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor*
Src – *sarcoma Schmidt-Ruppin A-2 viral oncogene homolog*
SRC-1 - *steroid receptor coactivator-1*
SRC-3 – *steroid receptor coactivator-3*
STAT1 - *signal transducer and activator of transcription-1 α*
TAM - tamoxifem
T3 – 3, 3', 5-triiodo – L – tironina (triiodotironina)
T4 – tiroxina
Tetrac - ácido tetraiodotiroacético
TGF- α - fator de crescimento transformador alfa
TGF- β 1 - fator de crescimento transformador beta 1
TR – receptor de hormônio tireoidiano
TRE – elemento responsivo ao hormônio tireoidiano
uPA - *urokinase -type plasminogen activator*
VDR – receptor da vitamina D

Abstract

Advances in Molecular Biology allow us to identify thyroid hormone receptors (TR) as members of the nuclear receptor superfamily which include estrogen receptors (ER). Estrogen (E2) and a patient's hormonal status are known to be important for the proliferation and treatment of breast cancer (BCa). In the case of triiodothyronine (T3), even though epidemiological studies contradict on its influence on BCa, laboratory studies demonstrate its capacity to induce BCa cell proliferation in culture with positive ER (ER+), as well as inducing known E2 stimulated genes: progesterone receptor and TGF α . With the hypothesis that genes modulated by E2 were equally modulated by T3, the objective of this study was to verify genic expression resulting from E2 and T3 action in cells of BCa MCF-7 (ER+), MDA-MB-231 (ER-), and S30 (ER+). For this we used the microarrays technique with a glass membrane with universal platform. Considering only $p < 0.05$ from the Student *t* test, we verified the presence of 393, 144, and 144 gene modulators in a similar form after treatment with E2 and T3, in MCF-7, MDA-MB-231, and S30 cells respectively. As well as $p < 0.05$, also considering fold > 2 and $pFDR < 0.05$, we found eight genes equally influenced by E2 and T3, and not influenced by tamoxifen (TAM); these were amphiregulin (AR), Claudin 6 (CLDN 6), Fibulin 1 (FBLN1), Factor for adipocyte differentiation-104 (FAD104), Pericentriolar material 1 (PCM1), Likely ortholog of rat vacuole membrane protein 1 (VPM1), Premature ovarian failure 1B (POF1B), and Sterile alpha motif domain containing 9 (SAMD9). In MDA-MB-231 cells, only SOX17 was modulated by both E2 and T3 and not TAM. In S30 cells, the only gene differentially expressed equally by both E2 and T3 was CYP1B1, the cytochrome P450 gene (family 1, subfamily B, polypeptide 1), not influenced by TAM. Therefore we conclude that both E2 and T3 influence modulation of the same genes in BCa cells lines.

Key words: breast cancer, estradiol, genic expression, triiodothyronine

Resumo

Com o avanço da Biologia Molecular, foi possível identificar os receptores dos hormônios tireoidianos (TR) como membros da família de receptores intracelulares que incluem os receptores de estrógeno (ER). Sabe-se que o estrógeno (E2) e o *status* hormonal da paciente são importantes para a proliferação e o tratamento do adenocarcinoma de mama (CaM). Quanto ao hormônio triiodotironina (T3), apesar dos estudos epidemiológicos serem contraditórios em relação a sua influência no CaM, estudos laboratoriais demonstram sua capacidade de induzir a proliferação de células de CaM em cultura com ER positivo (ER+), induzindo também genes sabidamente estimulados por E2, tal como o receptor de progesterona e TGF α . Com a hipótese de que os genes modulados por E2 também o eram igualmente por T3, o objetivo foi verificar a expressão gênica resultante da ação do E2 e do T3 em células eternizadas de CaM MCF-7 (ER+), MDA-MB-231 (ER-) e S30 (ER+). Para tal, utilizou-se da técnica de *microarrays* com uma membrana de vidro com plataforma universal. Considerando-se apenas o $p < 0,05$ do teste de *Student*, verificou-se a presença de 393, 144 e 144 genes modulados de forma semelhante após o tratamento com E2 e T3, respectivamente nas células MCF-7, MDA-MB-231 e S30. Considerando-se, além do $p < 0,05$, também $fold > 2$ e o $pFDR < 0,05$, encontraram-se nas células MCF-7, oito genes igualmente influenciados por E2 e por T3, não sofrendo influência do tamoxifen (TAM), sendo eles a *amphiregulin* (AR), *Claudin 6* (CLDN 6), *Fibulin 1* (FBLN1), *Factor for adipocyte differentiation-104* (FAD104), *Pericentriolar material 1* (PCM1), *Likely ortholog of rat vacuole membrane protein 1* (VPM1), *Premature ovarian failure 1B* (POF1B), *Sterile alpha motif domain containing 9* (SAMD9). Nas células MDA-MB-231 apenas o gene SOX17 foi modulado tanto por E2 quanto por T3 e não por TAM. Nas células S30, o gene que foi diferencialmente expresso igualmente por E2 e T3 foi o gene do citocromo P450 (família 1, subfamília B, polipeptídeo 1) – CYP1B1, não sofrendo influência do TAM. Assim, conclui-se que o E2 e o T3 atuam modulando os mesmos genes em linhagens de células eternizadas de CaM.

Palavras chaves: Adenocarcinoma de mama; Estradiol; Expressão gênica; Triiodotironina.

1. Introdução

1.1. Tecido mamário e ação hormonal:

Os hormônios tireoidianos (HT) são essenciais para o crescimento e desenvolvimento, exercendo efeitos específicos em vários sistemas, incluindo o reprodutivo, cardiovascular, sistema nervoso central e periférico (Li *et al.*, 2000).

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

O estrógeno (E2) é um hormônio esteróide tradicionalmente envolvido com o sexo feminino. Ele é principalmente sintetizado nos ovários e nos testículos, mas também pode advir da aromatização de andrógenos nos tecidos periféricos (Wilson *et al.*, 1998). A deleção do gene dos receptores de estrógeno revelou essa importância do E2 para a função e o desenvolvimento normais dos órgãos no sexo feminino (Lubahn *et al.*, 1993; Krege *et al.*, 1998, Couse & Korach, 1999). Tanto estudos *in vivo* quanto *in vitro* em mamíferos sugerem que o E2 tem ações significativas na preservação da densidade mineral óssea (Srivastava *et al.*, 2001) e para a integridade do sistema arteriovenoso (Mendelsohn & Karas, 1999), assim como também contribui para a função cerebral (McEwen, 1999) e modula a imunidade (Wilder, 1998). Além disso, o E2 determina a proliferação e a manutenção de células de adenocarcinoma de mama (CaM) humano (Migliaccio *et al.*, 1996; Razandi *et al.*, 2000).

Também é importante clinicamente, sendo comumente usados na terapia de reposição hormonal, prevenindo e tratando os sintomas da menopausa e como contraceptivos. Antagonistas do receptor de estrógeno são usados no tratamento de

CaM hormônio-dependente e ocasionalmente no tratamento de adenocarcinoma de próstata (EnMark & Gustafsson, 1999).

1.2. Tireoidopatia e adenocarcinoma de mama

Desde a transição do século XIX para o XX, existem controvérsias sobre a associação de tireoidopatias e doenças da mama, inclusive o CaM (Beatson, 1896; Spencer, 1954; Bogardus & Finley, 1961; Smyth *et al.*, 1998). Um dos primeiros trabalhos que mostrou a associação de CaM com os HT foi o de Beatson (1896), o qual utilizou ooforectomia e extrato tireoidiano como tratamento para a doença. Desde então, numerosos trabalhos foram realizados na área mostrando a relação dessa patologia com o hipertireoidismo (Moossa *et al.*, 1973; Lemaire & Baugnet-Mahieu, 1986; Goldman, 1990; Saraiva *et al.*, 2005); com o hipotireoidismo (Mittra & Hayward, 1974; Rose & Davis, 1978; Adamopoulos *et al.*, 1986; Cristofanilli *et al.*, 2005); com o bócio atóxico (Bogardus & Finley, 1961; Giani *et al.*, 1996; Smyth *et al.*, 1996; Turken *et al.*, 2003); com a doença auto-imune da tireóide (Itoh & Maruchi, 1975; Adamopoulos *et al.*, 1986; Rasmusson *et al.*, 1987; Giani *et al.*, 1996; Smyth *et al.*, 1998; Turken *et al.*, 2003) e com a suplementação tireoidiana (Kapdi & Wolfe, 1976; Mustacchi & Greenspan, 1977).

Rose & Davis (1978) observaram, em mulheres na pós-menopausa, um aumento na incidência de hipotireoidismo (incidência de 15%) em mulheres com CaM em relação a mulheres com outros tipos de cânceres (1%) e controles normais (3%). Esses dados são corroborados por outros autores em mulheres com o adenocarcinoma, independentemente de seu *status* em relação ao estradiol (Mittra & Hayward, 1974; Perry *et al.*, 1978; Rose & Davis, 1979; Adamopoulos *et al.*, 1986). Porém, alguns estudos não mostram essa relação entre hipotireodismo e CaM (Capelli & Margotini, 1964; Sicher & Waterhouse, 1967; Hedley *et al.*, 1981; Smyth *et al.*, 1996). Recente trabalho publicado por Cristofanilli *et al.* (2005) demonstrou que o hipotireoidismo primário está associado a um menor risco para CaM e a uma doenças menos invasiva, pois as pacientes com CaM tiveram 57% menos hipotireoidismo que as controles. Somando-se a isso, as pacientes hipotireoideianas e com CaM tiveram seus tumores diagnosticados com idade superior, tinham

doenças mais localizadas e menos linfonodos envolvidos em relação as pacientes com CaM eutireoideanas.

Similarmente, a associação entre o CaM e o hipertireoidismo tem sido observada por alguns autores (Moossa *et al.*, 1973; Goldman, 1990; Saraiva *et al.*, 2005), mas não por todos (Lemaire & Baugnet-Mahieu, 1986). Realizamos um estudo clínico com vinte e seis pacientes com CaM do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, com estágio grau II, e idade variando dos 30 a 85 anos. Dessas pacientes, 58% (15 pacientes) apresentavam algum tipo de doença tireoidiana, sendo o hipertireoidismo o distúrbio mais freqüente (31%), tendo diferença significativa em relação aos controles sem câncer de mama ($p < 0,05$). Vinte pacientes eram menopausadas (76,9%). Dessas, 50% apresentavam doenças tireoidianas (sendo 35% de hipertireoidismo) (Saraiva *et al.*, 2005).

Quanto à presença de doença auto-imune da tireóide, representada pelo Anti-Tireoperoxidase (TPO) positivo, Giani *et al.* (1996) observaram 23,5% de positividade nas pacientes com CaM, enquanto as controles normais tiveram uma positividade de apenas 8%. Achados semelhantes foram publicados por outros autores (Rasmusson *et al.*, 1987; Smyth *et al.*, 1998; Turken *et al.*, 2003). Assim como na questão da auto-imunidade, também a presença de bócio atóxico é muito freqüente nessas pacientes. Alguns trabalhos mostram um aumento significativo do volume tireoidiano nas pacientes com essa patologia (Bogardous *et al.*, 1961; Smyth *et al.*, 1996; Turken *et al.*, 2003).

Kapdi & Wolfe (1976), observaram que a incidência de CaM em pacientes recebendo reposição de HT foi de 12,13%, enquanto no grupo controle de pacientes normais foi de 6,2%. Essa taxa de incidência variou conforme o tempo de reposição de HT, ou seja, foi de 10%; 9,42% e 19,48% nas pacientes recebendo suplementação por 1 a 5 anos, 5 a 15 anos e por mais de 15 anos respectivamente; sugerindo que quanto maior for o tempo da reposição hormonal, maior o risco do desenvolvimento dessa patologia. Além disso, a incidência nas mulheres nulíparas recebendo HT foi de 33%, enquanto nas nulíparas sem HT foi de 9,25%. Já Mustacchi & Greenspan (1977), não encontraram relação alguma entre o uso ou o tempo de uso de HT e a incidência de CaM.

Se, por um lado, observações clínicas e epidemiológicas (Thomas *et al.*, 1983; Adamopoulos *et al.*, 1986; Rasmusson *et al.*, 1987; Vorherr, 1987; Smyth *et al.*, 1996; Turken *et al.*, 2003) reforçam uma relação entre disfunção da glândula tireóide com a presença de CaM, os estudos são contraditórios no que se refere ao tipo de patologia tireoideana e como essa influência pode ocorrer.

1.3. Os receptores nucleares

Os hormônios, em geral, necessitam dos seus receptores para mediar suas ações (Rosen, 1997). Como a ação do T3 e do E2 são o foco do nosso estudo, optamos então, revisar sobre seus respectivos receptores e vias de ativação.

Os receptores hormonais nucleares (RN) são proteínas regulatórias que interagem com o DNA em regiões específicas, modulando a transcrição gênica nas células-alvo (Amero *et al.*, 1992).

A família dos RNs compreende 49 genes que codificam 75 proteínas diferentes, que estão envolvidas na transdução de sinais hormonais extracelulares em respostas transcricionais (Robinson-Rechavi *et al.*, 2001). A identificação de receptores em insetos como membros da família sugere uma origem comum e, claramente, demonstra que a sua evolução antecede a divergência de vertebrados e invertebrados (Ribeiro *et al.*, 1995).

A família dos RNs incluem os receptores para esteróides (entre eles o receptor de estrógeno – ER), vitamina D, retinóides, hormônios tireoideanos e prostaglandinas, além de outros receptores órfãos, em maior número, que não possuem ligantes conhecidos no momento de sua identificação (Mangelsdorf & Evans, 1995).

Os membros da família de receptores nucleares são fatores de transcrição dependentes do ligante e atuam por se acoplarem a seqüências específicas do DNA, denominadas elementos responsivos ao hormônio (HRE). Os HRE geralmente estão localizados na região promotora dos genes alvos, são específicos para cada receptor e possuem duas cópias imperfeitas de um hexanucleotídeo, que podem estar arranjadas em diferentes orientações, com espaçamento e seqüências flanqueadoras diferentes. Os RNs ligam-se aos HREs de

diversas formas, podendo atuar como monômeros, homodímeros ou heterodímeros (Glass, 1994; Mangelsdorf *et al.*, 1995; Ribeiro *et al.*, 1998).

Os receptores para os hormônios esteróides formam uma subclasse da família de RNs (Evans, 1988, Mangelsdorf *et al.*, 1995). Na ausência de ligante, os receptores dos esteróides glicocorticóide, mineralocorticóide, androgênios, estrogênios e progesterona (PR) estão associados em um complexo com proteínas de choque térmico (HSPs) no citoplasma e, em alguns casos, no núcleo da célula. A ligação induz à formação de homodímeros que se dirigem ao núcleo onde se ligam aos seus respectivos HREs, regulando a transcrição (Ribeiro *et al.*, 1998, Neves *et al.*, 2002).

Outra subclasse de RNs é representada pelos receptores dos HT (TRs), do ácido retinóico (RAR), da vitamina D (VDR) e dos proliferadores peroxissomais (PPAR), que formam heterodímeros com o retinoid X *receptor* (RXR) (Mangelsdorf *et al.*, 1995). Esses receptores, na ausência de ligante, estão localizados predominantemente no núcleo, em solução ou ligados ao DNA. Quando associado s ao DNA, estão predominantemente ligados a seqüências de repetições diretas (DRs) do hexâmero AGGTCA (AGGTCA N AGGTCA), onde 'N' é o número de bases que separa cada hexâmero (Ribeiro *et al.*, 1998, Rastinejad *et al.*, 1995). A capacidade de cada receptor reconhecer os HREs constituídos por DRs é chamada de regra 1 a 5, tomando como base o número de nucleotídeos que separa cada hexâmero (Figura 1). Dessa forma, o PPAR e o RXR se ligam a uma DR espaçada por uma base (DR-1), o RAR se liga a DRs espaçadas por duas ou cinco (DR-2 e DR-5), o VDR a uma DR espaçada por três (DR-3) e o TR a uma DR espaçada por quatro bases (DR-4) (Mangelsdorf, 1994; Mangelsdorf & Evans, 1995; Rastinejad *et al.*, 1995; Ribeiro *et al.*, 1998, Barra *et al.*, 2004). Além das DRs, os elementos responsivos aos hormônios podem estar na forma de palíndromos diretos e palíndromos invertidos (Ribeiro *et al.*, 1998).

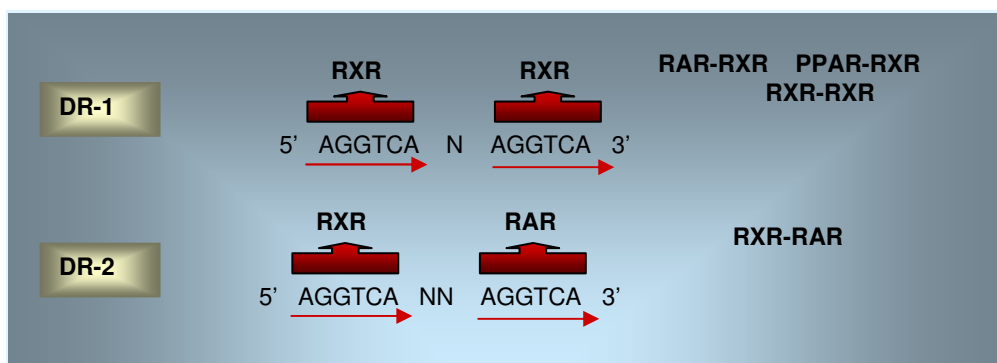


Figura 1. Ligação dos receptores nucleares não esteróides com o RXR em repetições diretas (DRs) separadas por espaçadores de tamanhos variados (N) – Regra de 1 a 5 espaçadores. Adaptado de Barra *et al.*, 2004.

1.3.1. Domínios funcionais dos receptores nucleares

A análise estrutural e funcional dos RNs demonstra que essa família exibe uma estrutura modular com domínios funcionais distintos. Os três principais domínios são: o amino-terminal (também chamado de região A/B), o de ligação ao DNA (DBD) – também chamado região C; e o de ligação ao ligante (LBD) – também chamado região E. Existe uma pequena região que conecta o DBD ao LBD, que é conhecida com dobradiça (*hinge*) – também chamado região D (Yen, 2001, Ribeiro *et al.*, 1998) (Figura 2).

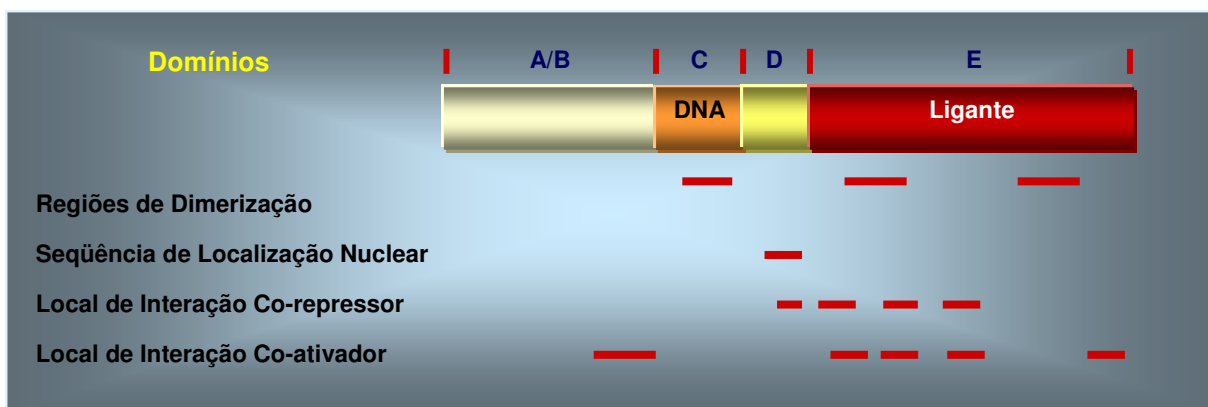


Figura 2. Organização geral dos domínios de um receptor nuclear e suas sub-regiões funcionais. Adaptado de Yen, 2001.

O domínio amino-terminal é extremamente variável entre os membros da superfamília dos receptores nucleares, tanto no tamanho quanto na seqüência de aminoácidos, e exibe uma função de ativação transcricional independente do ligante, denominada função de ativação 1 (AF-1) (Warnmark *et al.*, 2003).

O DBD é o domínio mais conservado entre todos os receptores nucleares e tem como função principal a ligação ao DNA. Esse domínio situa-se na porção central dos receptores e é organizado por dois segmentos estruturais conhecidos como dedos de zinco. Nesses segmentos, quatro resíduos de cisteína de cada dedo formam complexos coordenados por íons de zinco, formando duas estruturas independentes em forma de alça (Lazar, 1993, Mangelsdorf & Evans, 1995). Os dois dedos de zinco são separados por uma seqüência de 16 a 17 aminoácidos. Três aminoácidos da base do primeiro dedo representam a região chamada de caixa P (*P-box*). Esses aminoácidos são responsáveis pelo reconhecimento do elemento responsivo específico para cada receptor (Lazar, 1993; Umesono & Evans, 1989), ao passo que uma seqüência de cinco aminoácidos, localizada entre a primeira e a segunda cisteína na base do segundo dedo, é denominada de caixa D (*D-box*), uma região importante para a dimerização do receptor (Ribeiro *et al.*, 1998, Umesono & Evans, 1989). Os termos *P-box* e *D-box* estão relacionados com a posição proximal e distal dessas regiões, respectivamente (Glass, 1994).

O domínio de ligação do hormônio ou ligante é menos conservado que o DBD, refletindo a variedade de ligantes que atuam nesses receptores. Esse domínio se localiza na região carboxi-terminal e possui várias funções, como a homo e heterodimerização do receptor, localização nuclear, dissociação das HSPs (Ribeiro *et al.*, 1995) e interação com proteínas co-repressoras e co-ativadoras (Glass & Rosenfeld, 2000, McKenna & O'Malley, 2002). Portanto, o LBD contém uma superfície que é fundamental para a ativação transcricional, que se forma com a ligação do hormônio ao receptor. Após essa ligação, a região, denominada função de ativação 2 (AF-2), interage com os co-ativadores, que permitirão a formação do complexo protéico envolvido na ativação da transcrição (Wu *et al.*, 2001).

A região que conecta o DBD ao LBD, e que age como uma dobradiça, é extremamente variável entre os diferentes receptores (Yen, 2001). No caso específico do TR, a principal função dessa região seria promover o movimento de rotação do DBD em relação ao LBD, possibilitando que o TR se ligue nos TREs com diferentes orientações (Ribeiro *et al.*, 1998, Glass, 1994, Mangelsdorf & Evans, 1995).

1.3.2. Co-reguladores dos receptores nucleares

É sabido que a transcrição mediada pelos RNs é altamente complexa e envolve uma magnitude de fatores co-reguladores e um *cross-talk* entre distintas vias de sinalização (Hall *et al.*, 2001). A existência de fatores intermediários na ação dos RNs foi sugerida por vários pesquisadores, atualmente já contamos com mais de 30 moléculas descritas, sendo aqui citadas apenas algumas delas. De uma forma didática, eles são divididos em co-ativadores, os quais permitem a atividade dos receptores, e os co-repressores, os quais reprimem os efeitos mediados pelos receptores (Rosenfeld & Glass, 2001; McKenna & O' Malley, 2002).

A ativação transcricional envolve alterações na estrutura da cromatina mediadas por enzimas que remodelam a cromatina dependentes de ATP, além de um conjunto de fatores que possuem atividade de acetiltransferase de histonas (HTA) (Kingston & Narlikar, 1999). De acordo com esse conceito, é observado que os RNs recrutam BRG1, um homólogo mamífero do complexo de remodelação da cromatina SWI/SNF, para os HREs numa colaboração com as HTAs (DiRenzo *et al.*, 2000). Alguns dos co-ativadores dos RN possuem atividade HTA intrínseca, incluindo *cyclic AMP response element binding protein* (CREB) - *binding protein* (CBP)/p300, p/CAF e TAF250 (Ogryzko *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996; Ogryzko *et al.*, 1999).

Outros co-ativadores, tais como os p160, facilitam a transcrição mediada pelos RNs servindo de plataformas de recrutamento de HATs e proteínas metiltransferases de histonas (Ogryzko *et al.*, 1999).

Há três membros da família de co-ativadores p160: Co-ativadores de Receptores Esteróides NCoA1/SRC-1 (Onate *et al.*, 1995); Fator Transcricional

Intermediário NCoA-2/TIF-2/GRIP1/SCR-2 (Voegel *et al.*, 1996; Hong *et al.*, 1997) e o Ativador dos Receptores de Hormônio Tireoideanos e do Ácido Retinóico NCoA-3/AIB1/ACTR/RAC3/pCIP/TRAM-1/SCR-3 (Anzick *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997; Suen *et al.*, 1998; Takeshita *et al.*, 1997; Torchia *et al.*, 1997), os quais possuem homologia estrutural. Como a nomenclatura dessas proteínas é complexa e várias delas contêm mais de um nome, as diversas denominações encontradas na literatura foram incluídas e separadas por uma barra. Dessa forma, NCoA1/SRC-1 representam a mesma proteína (SRC-1 ou NCoA1). Eles todos contêm a bHLH-PAS (*basic helix-loop-helix-Per/ARNT/Sim*) em seu domínio amino-terminal. Através desse domínio, é que ocorre a ligação com outros fatores de ligação ao DNA, ou seja, não há evidências de que os co-ativadores p160 se liguem diretamente ao DNA. Na região central das proteínas p160, há um domínio de interação com a pequena hélice que possui a seqüência LXXLL da região LBD dos RNs (Heery *et al.*, 1997). A região C-terminal das proteínas p160 interagem com outros fatores que possuem papel na sinalização, por exemplo o ER, incluindo CBP, p300 e *arginine metiltransferase 1* (CARM-1) (Chen *et al.*, 2000).

Assim como existe homologia na seqüência estrutural dos membros da família p160, várias evidências sugerem que tenham uma única função. Embora todos os três subtipos de co-ativadores p160 sejam expressos em pequena quantidade na maioria dos tecidos, eles exibem a propriedade de alguns serem muito expressos em tecidos seletivos. NCoA-1 tem elevação relativa de sua expressão no cérebro e na hipófise, enquanto NCoA-2 é altamente expresso nos testículos (Misiti *et al.*, 1998) e NCoA-3 na tireóide, timo, rim, pulmão e pele (Wang *et al.*, 2000). O nível de expressão desses co-ativadores é regulado hormonalmente. Por exemplo, o hormônio tireoideano estimula a expressão do RNAm do NCoA-1 na hipófise anterior, enquanto o E2 inibe essa expressão (Misiti *et al.*, 1998). Tanto o RNAm quanto o nível de proteína dos NCoA-3 são inibidos pelo E2, sendo essa repressão reversível após tratamento com anti-estrogênico ou ácido transretinóico (Lauritsen *et al.*, 2002).

É interessante ressaltar que, em 1999, foi descoberto um novo co-ativador específico para o TR e RXR, o NRIF3 (*nuclear receptor-interacting factor 3*), que não é capaz de interagir com nenhum outro receptor nuclear e não possui homologia com os outros co-ativadores já descritos (Li *et al.*, 1999). A importância desse co-

ativador na modulação específica do HT ainda não está totalmente definida (Barra *et al.*, 2004).

Por um mecanismo oposto ao realizado pelos co-ativadores para ativar a transcrição pela mudança do estado da cromatina, os co-repressores dos RN regulam negativamente a transcrição via o recrutamento de deacetilases de histonas (HDACs). A melhor caracterização dos co-repressores é a estrutura das proteínas N-CoR (*Nuclear Receptor Corepressor*) e SMRT (*silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor*), os quais interagem de uma forma repressora com os RN, impedindo a ligação do ácido retinóico e do TR (Chen & Evans, 1995; Horlein *et al.*, 1995). No caso do ER, ambos N-CoR e SMRT se ligam a ele na presença de antagonista, tal como o tamoxifem (TAM) e são recrutados para os promotores dos genes alvos (Shang *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2002; Webb *et al.*, 2003). Outras moléculas também interagem com ER, tais como *ER-specific corepressor REA* e os receptores órfãos SHP e DAX-1, os quais agem competindo com os co-ativadores p160 pela ligação agonista ao ER (Johansson *et al.*, 1999; Montano *et al.*, 1999; Oesterreich *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000).

1.3.3. Mecanismo de ação clássico (genômico) dos receptores nucleares

Até o presente, foi exposto o mecanismo de ação dos RNs com suas proteínas co-reguladoras. Neste módulo, descreveremos como ocorre essa via de ação clássica/genômica. Ela é similar para a grande maioria dos receptores nucleares, que consiste na ligação do hormônio com o seu receptor, através da homo ou heterodimerização, ligando-se aos respectivos HREs dos genes alvos, provocando mudanças conformacionais na estrutura do receptor (Schiff & Osborne, 2005), favorecendo a dissociação dos co-repressores (Makowski *et al.*, 2003), seguida de interação com os co-ativadores (Zhang & Lazar, 2000). Estes recrutam outras proteínas incluindo acetiltransferases, as quais alteram a estrutura da cromatina e facilitam a transcrição (McKenna *et al.*, 1999) A figura 3 exemplifica essa via, representando a ligação do E2 ao ER.

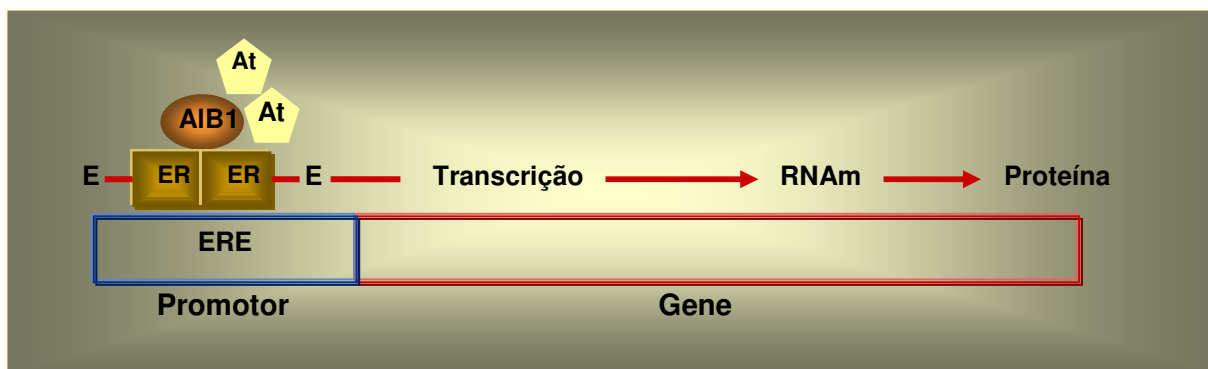


Figura 3. Início da sinalização estrogênica através da via clássica. O estrógeno (E) liga-se ao seu receptor (ER), induz a ligação de co-ativadores (AIB1 = *amplified in breast cancer*), liga-se a sua região responsiva no DNA (ERE) do gene alvo e a transcrição gênica é ativada. At = acetiltransferases. Adaptado de Schiff & Osborne, 2005.

1.3.4. Receptores de hormônio estrógeno

Dois diferentes ERs foram identificados em mamíferos, o ER α e o ER β , codificados por diferentes genes (Green *et al.*, 1986; Kuiper *et al.*, 1996; Mosselman *et al.*, 1996). O gene do ER α se localiza no cromossomo 6 e o gene do ER β no 14 (Enmark *et al.*, 1997). ER α foi clonado aproximadamente há duas décadas e acreditou-se durante vários anos ser o único ER. A descoberta do clone do ER β aumentou a complexidade da sinalização estrogênica. Ambas as isoformas de ER seguem a estrutura molecular característica da família de RN, no qual incluem os três domínios funcionais (Figura 4). As isoformas mostram homologia em seu domínio de ligação ao DNA, porém existe uma divergência na estrutura do domínio AF-1 (N-terminal) (Gustafsson, 1999). Há diferentes transcritos originados de *splicing* alternativo dos genes ER α e do β , gerando proteínas de tamanhos variados (Levin, 2001). O ER α é o receptor predominante na maioria dos órgãos. Já o ER β é expresso principalmente nos ovários, na próstata, nos pulmões e no hipotálamo (Couse *et al.*, 1997; Kuiper *et al.*, 1997). Tanto o ER α quanto o ER β possuem afinidade similar ao 17 β -estradiol, porém com diferentes papéis na regulação da expressão gênica.

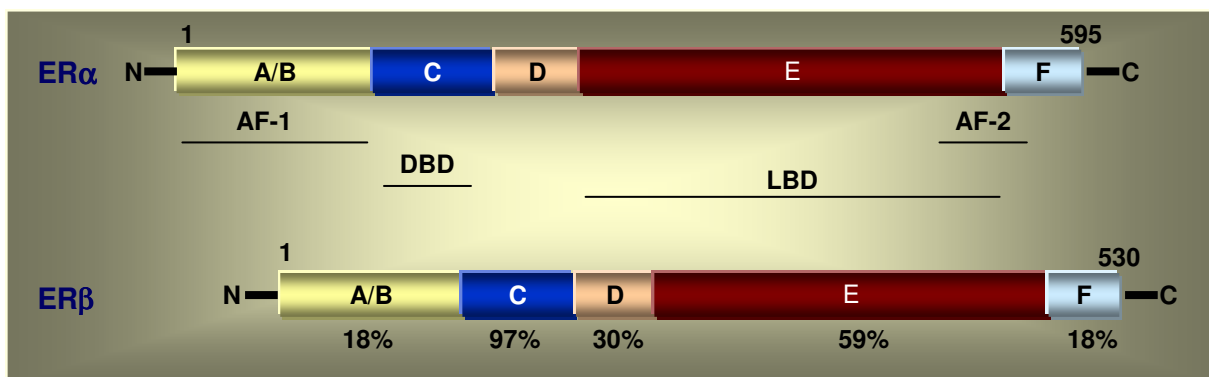


Figura 4. Diagrama esquemático dos dois receptores humanos de estrógeno, ER α e ER β . Ambos os receptores possuem domínios funcionais, incluindo o de ligação ao DNA (DBD – também chamado região C), o domínio de ligação ao ligante (LBD – também chamado região E), a região de ativação funcional independente do ligante (AF-1, também chamada região A/B), e a região de ativação funcional dependente do ligante (AF-2, faz parte da região E). D representa a região de dobradiça. A percentagem mostra a identidade entre os dois receptores. Adaptado de Shao & Brown, 2004.

Assim como os demais RN, o ER exerce seus efeitos transcricionais através da ligação direta ou indireta com locais específicos do DNA, chamados elementos responsivos ao estrógeno (EREs), localizados em regiões promotoras dos genes alvos (Klinge, 2001). Já é consenso que o ERE consiste em duas regiões palindrômicas invertidas, arranjadas como GGTCA. ER pode ligar-se ao ERE como ER α ou ER β homodímeros ou com ER $\alpha\beta$ heterodímeros. A afinidade e a especificidade da ligação do ER são determinadas tanto pela seqüência quanto pela organização espacial dos arranjos da cromatina (Glass, 1994; Aumais *et al.*, 1996).

Em adição, o ER pode agir como um co-ativador para modular a resposta transcricional via interação com outras classes de fatores transcricionais ligado ao DNA, tais como *Activator Protein-1* (AP-1) ou *SP1 transcription factor* (SP-1) (Kushner *et al.*, 2000a; Kushner *et al.*, 2000b), chamada via não clássica, discutida a seguir.

1.3.4.1. Via não clássica de regulação transcricional pelo ER

Além da via clássica de ativação transcricional descrita para todos os RN, o ER também possui uma via de modulação da expressão gênica alternativa, ligando-se a seqüências reguladoras do DNA, tais como AP -1, SP1 (Kushner *et al.*, 2000a; Safe, 2001). Nessa situação, o ER é um fator de transcrição secundário, fazendo parte do complexo de um outro determinado promotor específico, através do qual existe a interação com o fator transcricional que está ligado ao DNA, tal como *c-jun* ou *c-fos*, ou com outro co-ativador (Figura 5). Dessa forma, o ER possui em si a função de co-ativador por ser capaz de estabilizar o complexo do fator transcricional ligado ao DNA ou por recrutar outros co-ativadores. A transcrição de vários genes importantes na transdução de sinais de fatores de crescimento é regulada por essa via (Altucci *et al.*, 1996; Geum *et al.*, 1997; Dong *et al.*, 1999; Kushner *et al.*, 2000b). As proteínas codificadas por esses genes incluem o *insulin-like growth factor receptor 1* (IGFR-1), ciclin D1, *myc* e o fator de apoptose *bcl-2*. A importância dessa via para o crescimento tumoral *in vivo* ainda não está bem estabelecida (Osborne & Schiff, 2005); recentes estudos sugerem que pode haver um papel importante na manutenção e proliferação celular estrógeno-induzidas (Liu *et al.*, 2002).

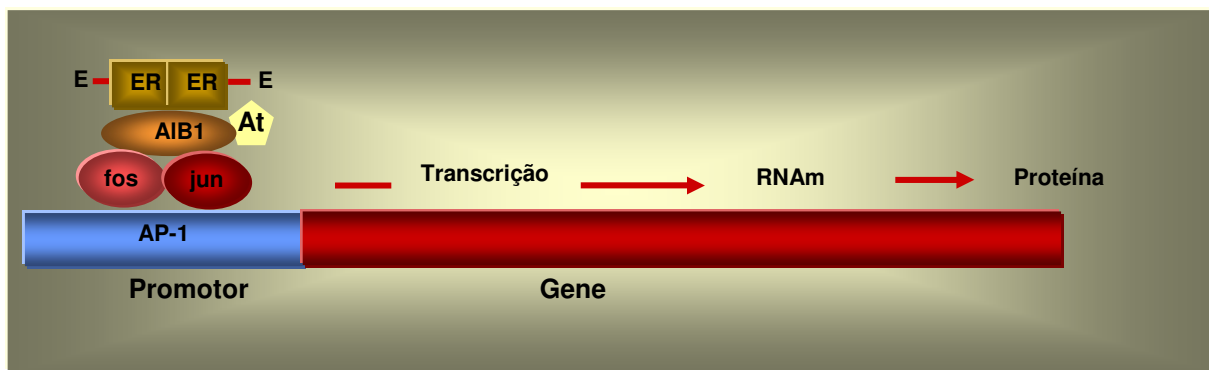


Figura 5. Início da sinalização estrogênica através da via não clássica. O estrógeno (E) liga-se ao seu receptor (ER), o qual se liga a outro complexo de co-ativadores, tal como o *c-fos* ou *c-jun*, para ativar a transcrição gênica de outra região do DNA, como o *Activator protein* (AP)-1. Co-ativador AIB1 = *amplified in breast cancer*. At = acetiltransferases. Adaptado de Schiff & Osborne, 2005.

1.3.4.2. Atividade não-genômica do ER

Há sessenta anos, foi descrito que os hormônios esteróides podiam ter uma ação rápida na célula, que não seria possível envolver os mecanismos transcricionais (Seile, 1942). Novos locais de ligação do E2 foram identificados na membrana de células endometriais, os quais induziam a formação de Adenosina Monofosfato Cíclico (AMPC) (Pietras & Szego, 1977). Estudos posteriores também evidenciaram a presença de ER fora do núcleo celular, o qual medeia sinais rápidos originados da membrana ou do citoplasma (Lösel *et al.*, 2003; Razandi *et al.*, 2004; Levin, 2005; Watson *et al.*, 2005). Essa ação não genômica do ER ou *membrane-initiated steroid signaling* (MISS) ocorre após minutos da adição do estrógeno (Kelly & Levin, 2001; Jakacka *et al.*, 2002; Marino *et al.*, 2002). Esses receptores foram encontrados nos tecidos ósseos, neural, uterino, gorduroso, nas células endoteliais, células tumorais de mama e hipófise (Ho & Liao, 2002; Li *et al.*, 2003; Chaban *et al.*, 2004; Razandi *et al.*, 2004; Watson *et al.*, 2005).

A localização precisa desses ER de membrana e o mecanismo pelo qual seus sinais são transmitidos têm sido recentemente esclarecidos (Figuras 6 e 7). Alguns estudos, usando uma variedade de técnicas, incluindo microscopia *confocal*, sugerem que uma pequena parte dos ERs está localizada na membrana plasmática e no citoplasma (Levin, 2002; Figtree *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003; Acconcia *et al.*, 2005).

Razandi *et al.* (2004) realizaram estudo mostrando a presença de ER α e β no núcleo e na membrana celular de células de CaM MCF-7 e a formação de homo ou heterodímeros. A grande maioria dos ER dessas células é do tipo α , encontrando-se principalmente na forma de homodímeros na presença de E2, tanto para os receptores do núcleo quanto dos da membrana. Poucos estão na forma de monômeros. Também foi encontrado ER β , porém em menor quantidade quando comparado ao ER α ; formando homodímeros, tanto no núcleo quanto na membrana plasmática. Não foram encontrados heterodímeros ER α /ER β , provavelmente pela quantidade muito pequena de ER β .

Chambliss *et al.* (2002) identificaram receptores de ER α com 67kDa e ER β com 54kDa na membrana celular de células endoteliais. Muitas evidências favorecem a idéia de que os receptores de membrana são proteínas semelhantes às nucleares e são codificadas a partir do mesmo gene (que codifica as proteínas

nucleares), as quais são transportadas para a membrana plasmática por mecanismo ainda desconhecido (Levin, 2005).

Li *et al.* (2003) mostraram a presença de uma proteína truncada de 46kDa, a qual foi caracterizada como a principal isoforma do ER α na membrana plasmática de linhagens de células endoteliais imortalizadas. Entretanto, outros pesquisadores, trabalhando com células endoteliais e de aorta não identificaram esse receptor de 46kDa como abundante, inclusive na membrana celular (Chambliss *et al.*, 2002; Pendaries *et al.*, 2002; Razandi *et al.*, 2004).

A atividade MISS do ER resulta na ativação de receptores de fatores de crescimento, de tirosina-quinase, de MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), fosfatidil-inositol quinase 3 (PI3k), e Akt (*protein kinase B*). Todas essas proteínas são enzimas sinalizadoras e adaptadas a adenilciclase e *Src homology 2 domain containing transforming* (Shc) (Simoncini *et al.*, 2000).

A interação direta entre o ER α de membrana tem sido observada com várias moléculas, incluindo o IGFR1 (Kahlert *et al.*, 2000), a subunidade da proteína reguladora PI3k, Src (*Sarcoma Schmidt -Ruppin A-2 viral oncogene homolog*) e Shc, uma proteína a qual pode acoplar diretamente o ER a vários receptores de fatores de crescimento, via tirosina quinase (Castoria *et al.*, 2001; Levin, 2005) (Figura 7). A ativação dessas vias pelo E2 leva ao aumento da sobrevivência celular e a proliferação celular mediada por ativação de Akt e MAPK. Somando-se a essas informações, essas quinases podem fosforilar o ER e seus co-reguladores aumentando a sinalização via ER nuclear. O anti-estrógeno puro *fulvestrant* não consegue ativar o ER da membrana por essa via; mas outros moduladores seletivos do receptor estrogênico (SERM), tal como o TAM, fazem-no similarmente ao E2, ou seja: o TAM é antagonista no ER nuclear e agonista no ER de membrana (Levin, 2002; Shou *et al.*, 2004). . A fosforilação Akt e MAPK pode aumentar a atividade agonista do TAM e de outros SERM (Shou *et al.*, 2004).

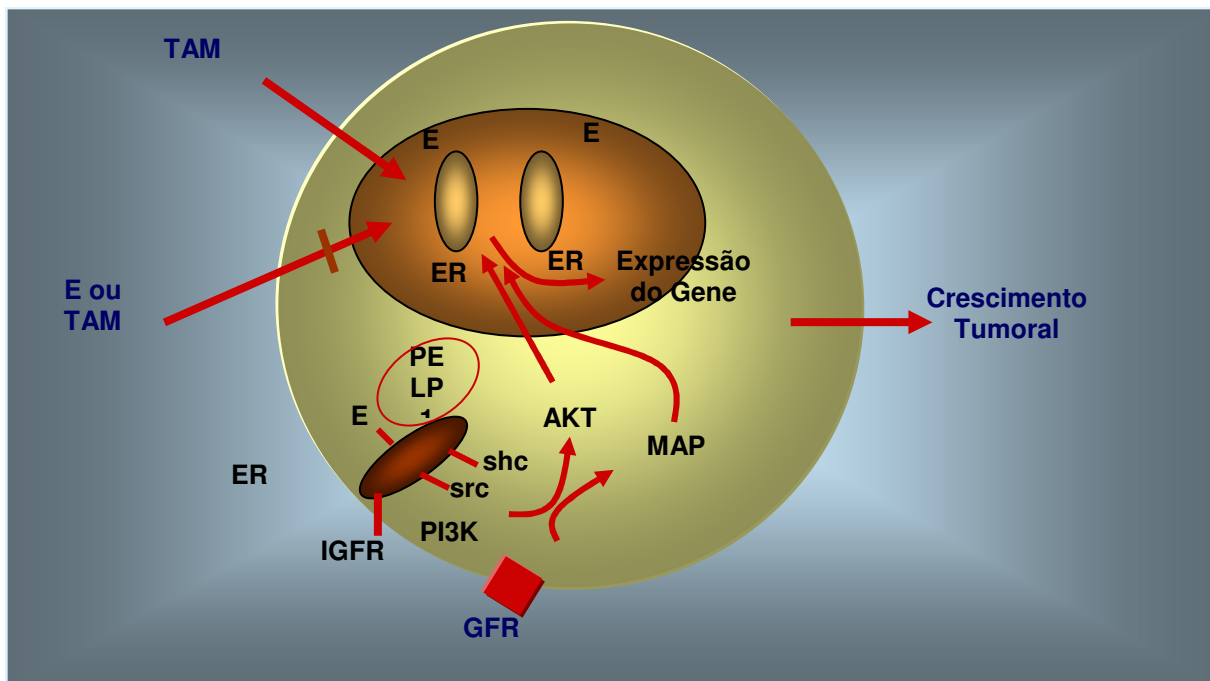


Figura 6. Sinalização do estrógeno via ER de membrana. Estrógeno (E) ativa seu receptor nuclear (ER) e também o ER na membrana celular ou perto dela. Tamoxifem (TAM) antagoniza a atividade nuclear, mas ativa o ER da membrana. O ER da membrana se liga então a fatores de crescimento sinalizadores, tais como *insulin-like growth factor receptor 1* (IGFR1), a uma subunidade do fosfatidilinositol 3 quinase p85 (PI3K), Src e Shc. Proteínas como PELP 1 ou MTAT1s ligam-se ao ER e o levam para o citoplasma para aumentar a atividade da membrana. O estrógeno, então, ativa fatores de crescimento sinalizadores, tal como um fator de crescimento ligado ao receptor de membrana (GFR), que tem capacidade de ativar Akt (*protein kinase B*) ou *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). Essas quinases podem fosforilar e ativar o ER intranuclear e seus co-reguladores para estimular seus efeitos nucleares na transcrição. Adaptado de Osborne & Schiff, 2005.

Outro mecanismo potencial para a atividade MISS do ER, o qual tem sido bem estudado, é o que envolve indiretamente a ativação do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) (Figura 8) (Levin, 2002; Levin 2003). O ER liga-se a *caveolin 1* (cav1) agindo como um receptor acoplado à proteína G na membrana da célula em resposta à ligação do E2 ou do TAM, ativando direta ou indiretamente a proteína G. Ocorre, então, a conseqüente ativação do c-Src, que ativa rapidamente as metaloproteinases da matrix (MMP), as quais possuem capacidade de clivar os fatores de crescimento epidermais ligantes da heparina (EGF) da membrana. Dessa forma, os EGF se ligam ao EGFR de maneira autócrina ou parácrina, ativando esse

receptor, que ativa as cascatas das quinases, incluindo ERK1/2 MAPK e Akt. Os efeitos do ER de membrana, assim como sua atividade genômica, celular, subtipos do receptor ou especificidade do ligante são influenciados pelos fatores de crescimento, principalmente no caso do aumento da expressão em CaM de EGFR ou HER-2 (Shou *et al.*, 2004). A estimulação da atividade MISS do ER pelo TAM e outros SERMs pode, em parte, explicar a resistência a esses fármacos algumas vezes observada em tumores com aumento da expressão de HER-2 (Osborne *et al.*, 2003; Shou *et al.*, 2004).

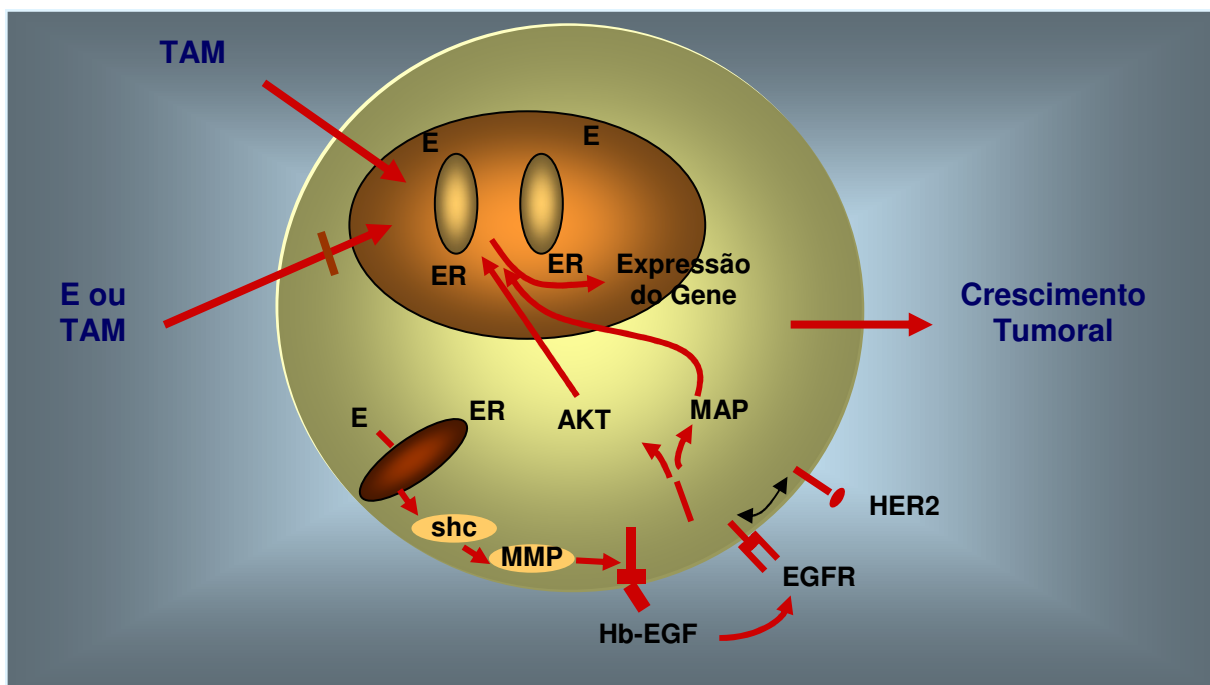


Figura 7. Sinalização do estrógeno via receptor de estrógeno (ER) de membrana. O estrógeno (E) ou o tamoxifem (TAM) se ligam ao ER de membrana, o qual ativa Src, que ativa metaloproteínas da matrix (MMP), as quais clivam o fator de crescimento epidermal ligante de heparina (Hb-EGF) da membrana. Hb-EGF ativa os receptores de EGF (EGFRs) adjacentes. A dimerização do EGFR com outro receptor ou com o HER-2 ativa a sinalização através da Akt e *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). Essas quinases então ativam o ER nuclear. Cav1 = caveolin-1. Adaptado de Osborne & Schiff, 2005.

Outras proteínas podem também desempenhar algum papel na atividade MISS do ER. MNAR/PELP1 (*modulator of nongenomic activity of the estrogen receptor*) modula tanto as ações genômicas quanto as de membrana do ER (Vadlamudi *et al.*, 2001). Ajuda a transportar o ER da membrana/citoplasma e também favorece a ligação do ER ao Src. Essa proteína de interação com o ER

também foi descrita como ligante da pRb de forma estrógeno-dependente (Balasenthil & Vadlamudi, 2003). Essa interação proporciona a progressão de células de câncer de mama na fase S e pode explicar por que o aumento da expressão dessa proteína tem prognóstico significativo no câncer de mama (Vadlamudi *et al.*, 2001).

Kumar *et al.* (2002) descreveram que a proteína *metastasis-associated gene family* (MTA1) também é um co-regulador do ER. MTA1 é um co-repressor da atividade genômica do ER. Sua variante de ocorrência natural, MTA1s, diminui a atividade do ER através do seqüestro do ER para o citoplasma. Essa captura do ER no citoplasma aumenta sua atividade não genômica por facilitar a interação com os componentes da membrana.

Resumindo, considerando o que foi explicitado até agora sobre as vias de ação do ER, ele possui duas principais funções: pode servir como um fator transcricional para os genes regulados pelo E2; e pode ser um co-fator para outros fatores transcricionais no núcleo, sendo, também, um co-fator fora do núcleo e na membrana plasmática, ativando a sinalização de fatores de crescimento.

1.3.5. Receptores de hormônios tireoidianos

Após a identificação dos cDNAs codificadores dos GR e ER em 1985, estudos de homologia demonstraram que os TRs, clonados em 1989 a partir de bibliotecas de embriões de galinha e placenta humana, eram homólogos celulares do oncogene viral *v-erbA* (vírus da eritroblastose aviária) (Ribeiro *et al.*, 1998). Existem dois genes distintos que codificam os TR α e TR β que, nos humanos, localizam-se nos cromossomos 17 e 3 respectivamente (Barrera-Hernandez *et al.*, 1998). Cada um desses genes codifica várias proteínas (α 1, α 2, $\Delta\alpha$ 1, $\Delta\alpha$ 2, β 1, β 2, β 3, $\Delta\beta$ 3), que são resultado do processamento alternativo do RNA mensageiro (*splicing* alternativo) ou da utilização de promotores alternativos (Figura 8). Dessa forma, as diferentes isoformas de TR são α 1, α 2, β 1, β 2 e β 3, sendo somente α 1, β 1, β 2, β 3 ligadas ao hormônio. As isoformas α 1 e α 2 diferem somente em sua região carboxi-terminal, por esse motivo, a isoforma α 2 não se liga ao hormônio, enquanto as isoformas β 1, β 2, β 3 diferem em sua região amino-terminal (Lazar,

1993). A isoforma $\alpha 2$, por não se ligar ao T3, pode inibir a transcrição mediada por $\alpha 1$ e $\beta 1$, provavelmente por competir com a ligação aos TRE e com a formação de heterodímeros com RXR (Ribeiro *et al.*, 1998).

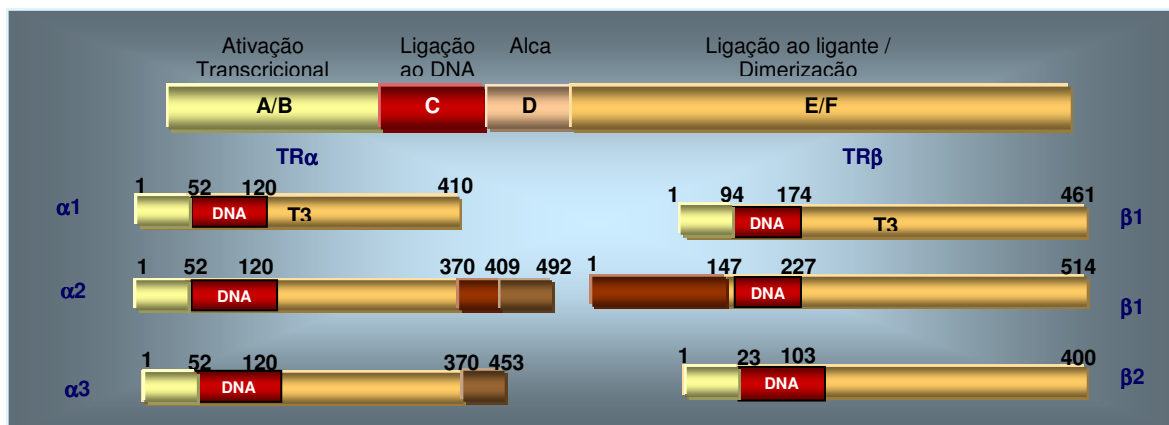


Figura 08. Isoformas do receptor de hormônio tireoidiano (TR). Os produtos protéicos são oriundos dos genes TR α e β . Os domínios funcionais presentes nessas proteínas, as quais fazem parte da família dos receptores nucleares, estão dispostos ao longo do diagrama esquemático. Os números representam a posição dos aminoácidos no TR humano. As áreas marrons mostram variações do TR geradas por processamento alternativo do RNA. Adaptado de Cheng, 2000 e O'Shea & Williams, 2002.

Assim como ocorre com o E2, sabe-se que os HT também possuem sítios de ligação na membrana celular (Lösel, 2003; Bassett *et al.*, 2003). Schwartz *et al.* (1968) encontraram esses sítios de ligação do HT na membrana plasmática de células vermelhas do sangue (eritrócitos e reticulócitos) já na década de 60. Desde então, outros pesquisadores demonstraram a presença do mesmo na membrana celular de outros tecidos, tais como: células hepáticas (Pliam & Golfine, 1977), placenta (Anderson *et al.*, 1985), timo (Segal, 1989), sinaptosomas (Giguere *et al.*, 1992). Porém, apenas estudos atuais têm tentado correlacionar esses sítios de ligação com o TR de membrana. Quando o TR é encontrado na membrana plasmática, ele normalmente é translocado ao núcleo, assim que o T3 se liga a ele (Zhu *et al.*, 1998; Baumann *et al.*, 2001). Atualmente, sabe-se que o sítio de ligação do HT na membrana plasmática não é igual ao TR nuclear, diferente do que ocorre com o ER, que o mesmo gene codifica o receptor nuclear e o de membrana (Davis *et al.*, 2002). Bergh *et al.* (2005) identificaram um sítio de ligação dos HT fazendo parte da proteína *integrin* $\alpha V\beta 3$. Esta proteína possui uma estrutura heterodimérica, fazendo parte da membrana plasmática, intermediando os sinais da matriz

extracelular com o intracelular, através de ligantes que possuem uma seqüência reconhecadora RGD (um peptídeo com Arg-Gly-Asp) (Davis *et al.*, 2005). O T4 liga-se a *integrin* $\alpha V\beta 3$ com alta afinidade, a qual é bloqueada pelo ácido tetraiodotiroacético (tetrac), anticorpos anti- $\alpha V\beta 3$ e peptídeos com seqüência reconhecadora RGD (peptídeos RGD). Assim que o T4 se liga ao seu sítio na *integrin* $\alpha V\beta 3$, ocorre a ativação de vias intracelulares de sinalização, tal como a MAPK, determinando angiogênese, por exemplo. A linhagem celular CV-1, que não possui TR nuclear, mas expressa *integrin* $\alpha V\beta 3$, após sofrer tratamento com doses fisiológicas de T4, tem a via da MAPK ativada, sendo inibida pelo tetrac, anticorpos anti- $\alpha V\beta 3$ e peptídeos RGD (Bergh *et al.*, 2005).

1.3.5.1. Mecanismo de Ação dos receptores dos hormônios tireoidianos

Os TRs exercem seus efeitos de forma similar à descrita para todos os RN pela via clássica, abordado no item 1.3.3. Há mais de 100 genes que são modulados pelo TR, por possuírem o elemento responsivo ao HT (TER) (Feng *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2004).

Muitos laboratórios demonstram a ativação direta da MAPK pelo T4, levando a ativação de outras proteínas nucleares (Lin *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 2000; Shih *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2004; Bergh *et al.*, 2005) (Figura 9). Dentre essas proteínas está o próprio TR (Davis *et al.*, 2000), o ER (Tang *et al.*, 2004) e a proteína do oncogene p53 (Shih *et al.*, 2001). A fosforilação da proteína p53 ocorre diretamente após a ativação da MAPK pela sinalização do HT através da membrana celular (Shih *et al.*, 2001). Também a fosforilação da serina do *signal transducer and activator of transcription-1* (α) (STAT1) é encontrada no núcleo de células tratadas com HT. A consequência dessa ativação é a amplificação dos sinais gerados na membrana plasmática de citocinas (Lin *et al.*, 1998), ativando EGF e TGF- α (Shih *et al.*, 2004).

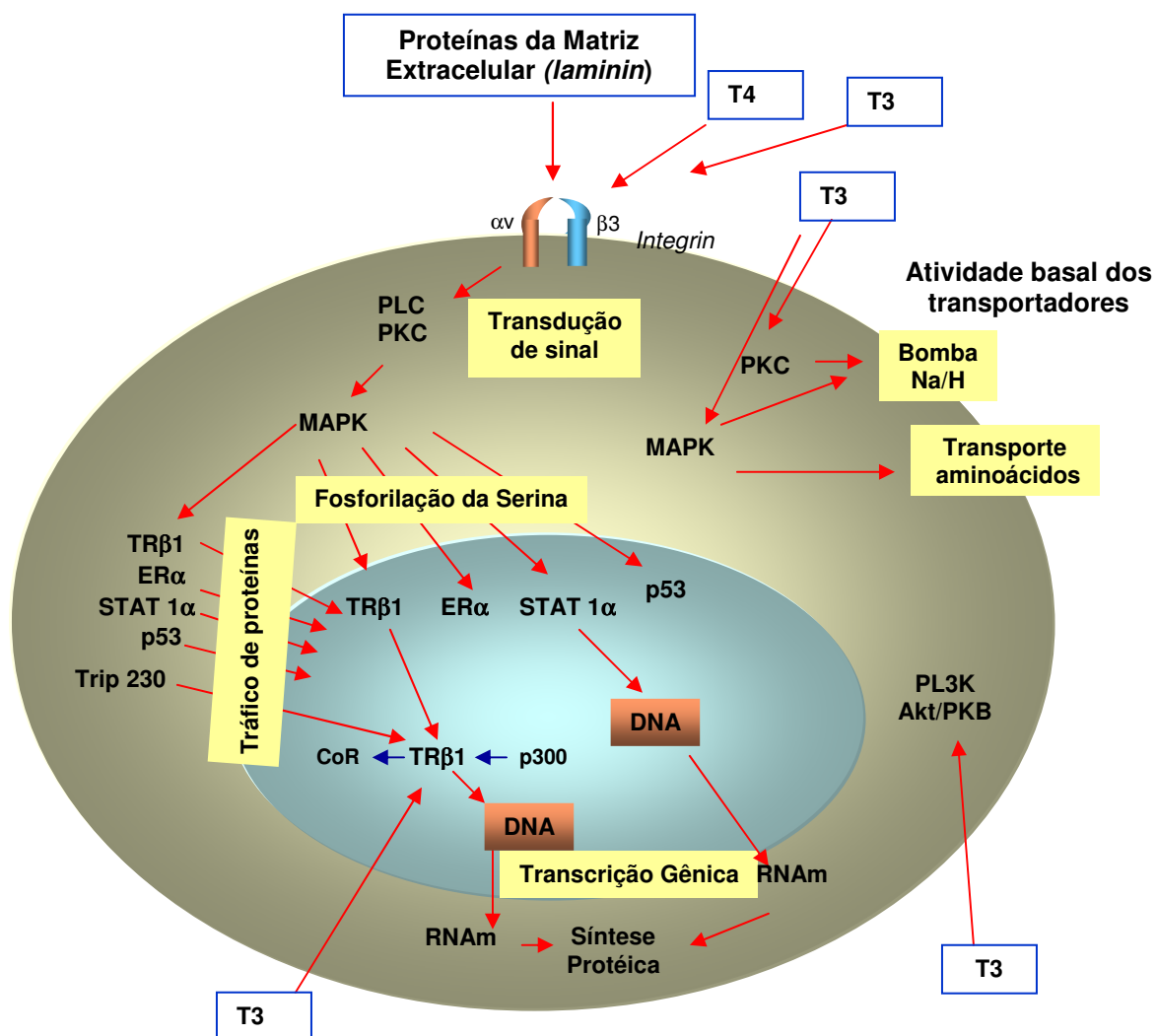


Figura 9. Resumo das ações iniciadas na membrana dos homônios tireoideanos (HT) – triiodotironina (T3) e tiroxina (T4). Os HT são ligantes do receptor de membrana celular na proteína heterodimérica da membrana plasmática, *integrin* $\alpha v \beta 3$. Proteínas da matriz extracelular (ECM) também são ligantes da *integrin*. A *integrin* permite a transdução de sinal do espaço intracelular para as proteína da ECM, tais como a *laminin*, ou conduz o sinal do domínio extracelular para o intracelular, como quando está ligada ao HT (como mostrado aqui), para a cascata da MAPK(ERK1/2). Estando a MAPK fosforilada, ela se transloca até o núcleo e pode determinar a fosforilação do TR β 1, ER α , p53 e STAT1 α (ou provoca essa fosforilação no próprio citoplasma e depois essas proteínas fosforiladas se translocam até o núcleo). O TR β 1 fosforilado determina a expulsão dos co-repressores (CoR) e recruta os co-ativadores (p300). Assim há a transcrição do gene alvo. Em adição, a MAPK e/ou a proteína quinase C (Pkt), fosforiladas pelo sinal HT vindo da membrana, estimula o transporte através da membrana, ativando a Na/K-ATPase. HT também ativa fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), levando a repercussões nucleares. FLC = fosfolipase C. Adaptado de Davis *et al.*, 2005.

Não só o T4, mas também o T3 podem ser associados a eventos iniciados na membrana e que vão culminar no núcleo celular. Por exemplo, T3 pode ativar a via do PI3K-Akt, uma efeito modulado em fibroblastos de pele (Cao *et al.*, 2005) ou ativar a Na/K-ATPase (enzima sódio/potássio dependente de adenosina trifosfato) (Lei *et al.*, 2004).

A linhagem celular de CaM MCF-7 teve seu crescimento aumentado por uma ação iniciada na membrana pelo HT (Tang *et al.*, 2004). Outros pesquisadores encontraram que o HT estimula o crescimento celular de gliomas (C6) por um mecanismo dependente da MAPK (Hopkins, 2004). Nessas duas linhagens, tanto tetrac quanto os peptídeos RGD inibiram o crescimento determinado pelo HT. Possivelmente esse achado *in vitro* correlacione com os achados clínicos de que o hipotireoidismo afeta negativamente o curso do glioblastoma e do CaM (Hercbergs *et al.*, 2003; Cristofanilli *et al.*, 2005), assim como o hipertireoidismo favorece o CaM (Saraiva, 2005). Esses estudos recentes sugerem que o HT é um fator facilitador no crescimento de alguns tumores. A atividade pró-angiogênica desse hormônio seria o segundo mecanismo pelo qual o HT poderia sustentar o crescimento tumoral (Bergh *et al.*, 2005).

1.3.6. *Cross-talk* entre os RN

O ER, TR e outros RN podem modular a atividade transcricional um do outro. Esse *Cross-talk* pode ocorrer via diversos mecanismos: ligações “promíscuas” aos HRE, formação de heterodímeros e competição por co-fatores (Yen & Chin, 1994; Weiss *et al.*, 1999).

TR e ER possuem a seqüência do “P Box” idêntica e reconhecem a mesma seqüência de consenso: AGGTCA (Glass, 1994). Entretanto, os ER ligam-se normalmente aos ERE em homodímeros em palíndromos separados por 3 nucleotídeos. É descrito que os TR podem se ligar aos ERE (Ribeiro *et al.*, 1994). Às vezes, essa ligação do TR-ERE inibe a transcrição do gene alvo (Segars *et al.*, 1993), como no caso da expressão do gene *vitellogenin*, provavelmente formando um complexo inativo de TR/RXR no ERE (Glass *et al.*, 1988; Segars *et al.*, 1993, Zhu *et al.*, 1996). Zhu *et al.* (1995) demonstraram que o TR, ligando-se ao ERE do gene da pró-encefalina em células de hipotálamo de ratos, diminuía o RNAm sintetizado ao comparar quando estimulado pelo E2.

Vasudevan *et al.* (2001) mostraram que TRs interferem na transcrição mediada pelo ER a partir da região de ERE, possivelmente pela competição da região ligante de estrógeno ao ERE ou por silenciar co-ativadores essenciais para a transcrição ER-mediada. Se o mecanismo fisiológico estiver atuando dessa forma, é

possível que o receptor de T3, ativado, ligue-se ao ERE, promovendo a transcrição de genes alvo, tendo como consequência a proliferação celular.

Nosso grupo, através de experimentos de *binding*, utilizando triiodotironina como inibidor, observou que esse hormônio tem a capacidade de deslocar, em menor magnitude que o E2, a ligação do estrógeno marcado ao ER em células de linhagem MCF-7 (Nogueira & Brentani, 1996). Nesse mesmo trabalho, estudos *in vitro* demonstraram que o hormônio triiodotironina (T3), em concentrações supra-fisiológicas, induz à proliferação celular e à expressão de genes que primariamente são estimulados pelo E2 (como por exemplo o PR, fator de crescimento transformador [TGF]- α), possivelmente através do receptor de estrógeno, em linhagem de câncer de mama (MCF-7), a qual expressa receptor para estrógeno e para o hormônio tireoidiano, sendo esse efeito inibido pelo anti-estrógeno parcial TAM.

Há também a ligação de ER ao TRE e outras múltiplas combinações de ligações cruzadas entre os diversos RNs e os vários HREs (Yarwood *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1996).

Falando-se em *cross-talk* por uma via não-genômica, Tang et al (2004) verificaram que, após tratarem as células MCF-7 com HT, houve ativação da via da MAPK, a qual fosforila o ER α e determina o aumento da proliferação celular.

1.4. ER, TR e adenocarcinoma de mama

O importante papel do ER no câncer de mama vem sendo descrito ao longo dos últimos 40 anos (Jensen & Jacobson, 1962). Tanto o ER α quanto o ER β têm importância, porém as relações com o câncer de mama e o ER β ainda não estão muito claras (Speirs, 2002).

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

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

Foi demonstrado que os HT são necessários para o desenvolvimento de alguns tumores de ratos estrógeno-dependentes (Sorrentino *et al.*, 1976; Natoli *et al.*, 1983). A controvérsia sobre o papel desses hormônios, tanto na etiologia quanto no tratamento do câncer de mama, é bastante ampla.

Fatores prognósticos e predictivos são ferramentas indispensáveis no seguimento de doenças neoplásicas (West *et al.*, 2001). A concentração do receptor de estrógeno é um importante parâmetro no prognóstico do câncer de mama (Lacroix *et al.*, 2001). A determinação da presença ou ausência de receptores de estrógeno (ER) pode, também, funcionar como um importante delineador do tratamento do câncer de mama através da utilização de anti-estrógenos (Sommer & Fuqua, 2001). Portanto, a concentração do receptor fornece dados sobre quais tumores seriam responsivos à intervenção hormonal (Fuqua *et al.*, 1993; Jensen *et al.*, 2001).

No que se refere ao câncer de mama, pouco se sabe sobre a maneira como o T_3 modula o seu receptor no tecido tumoral. Foi demonstrada por Burke & McGuire (1978) a presença de receptores para T_3 no núcleo de uma linhagem de células derivadas de câncer de mama humano (MCF-7). Cerbon *et al.* (1981) comprovaram a presença de receptores nucleares para T_3 em câncer de mama, embora não tenha sido observada correlação alguma com a concentração de outros receptores hormonais (estrógeno e progesterona) ou estadiamento do tumor. Shao *et al.* (1995) demonstraram que o T_3 potencializa a ação do estrógeno nas linhagens de câncer de mama ER+.

Barkhem *et al.* (1991) clonaram o TR na linhagem celular T47D e verificaram que essa isoforma de TR é funcional nessas células. Da mesma forma, Zhang *et al.* (1996) demonstraram a presença de TR e ER nessa linhagem celular.

Sabe-se que o E2 e o *status* hormonal da paciente é importante para a proliferação e o tratamento do câncer de mama (Jensen *et al.*, 2001). Quanto ao T_3 ,

apesar dos estudos epidemiológicos serem ainda contraditórios em relação a sua influência no câncer de mama (Smithcors & Leonard, 1942; Spencer, 1954; Bogardus & Finley, 1961; Muhlbock & Boot 1961 ; Rose & Davis, 1978; Thomas *et al.*, 1983; Vorherr,1987; Takatani *et al.*, 1989; Cristofanilli *et al.*, 2005; Saraiva, 2005), estudos laboratoriais demonstram sua capacidade de aumentar a proliferação de células de CaM com ER positivo, induzindo a expressão de genes normalmente estimulados por E2 (PR, TGF α e β)(Nogueira & Brentani, 1996).

2. Hipótese

- T3 suprafisiológico e E2 fisiológico estimulam os mesmos genes em células eternizadas de CaM.

3. Objetivo

- Comparar a expressão gênica resultante da ação do E2 e do T3 em linhagens celulares de adenocarcinoma de mama MCF-7, MDA-MB-231 e S30.

4. Materiais e Métodos

4.1. Cultivo de células

As linhagens celulares de carcinoma mamário humano MCF-7 e MDA-MB-231, Hb4a (as quais foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Maria Mitzi Brentani, do Laboratório de Oncologia da FMUSP) foram cultivadas em meio RPMI (Gibco™, Cat. n° 31800-014) contendo 1,2g/l de NaHCO₃ (Merck, Cat. n° 6329) , Hepes 10nM 7,4 (Gibco, Cat. n° 11344-041), suplementado com soro fetal bovino (FBS) 10% inativado (Gibco™, Cat. n°10082-147), solução antibiótico-antimicótico (Gibco™, Cat. n° 15240-062). O meio foi esterilizado por filtração através de membrana de nitrocelulose com poro de 0,22 micra (Millipore, Cat. n°. GPWP04700).

A célula Hb4a é uma célula humana mamária normal, cujo RNA foi utilizado como controle interno das hibridizações das membranas de *microarrays* e não foram submetidas a tratamento algum.

A linhagem MCF-7 é uma célula eternizada de câncer de mama, obtida inicialmente de uma cultura primária de células de câncer de mama, originadas de uma efusão pleural de uma paciente feminina com metástase dessa doença (Brooks *et al.*, 1973). Essa célula possui ER α (principal ER expresso nessa célula) e β e também TR α e β (McGuire *et al.*, 1974; Nogueira & Brentani, 1996; Razandi *et al.*, 2004).

A linhagem MDA-MB-231 uma linhagem eternizada de CaM, a qual não possui ER, mas TR α e β (Nogueira & Brentani, 1996).

Cultivou-se, também, a linhagem celular de carcinoma mamário humano S30 (gentilmente cedida pelo Dr. V. Craig Jordan – Robert H. Lurie Cancer Center, Chicago, IL) em MEM sem fenol vermelho (Gibco™, Cat. n° 51200-038), com Earle's Salts, 25 mM de Hepes, suplementado com solução antibiotic-antimycotic 1% (Gibco™, Cat. n° 15240-062) , L-Glutamina 200 nM 1% (Gibco™, Cat. n° 25030-081), solução de aminoácidos não essenciais (NEAA) 100x (10nM) 1% (Gibco™, Cat. n° 11140-050) , FBS inativado 5% (Gibco™, Cat. n°10082-147), insulina bovina 6 ng/ml (Gibco™, Cat. n° 18125-039), G418 (Geneticin) 500 μ g/ml (Gibco™, Cat. n° 11811-031). Essa linhagem trata-se de uma MDA-MB-231 transfectata com o ER α selvagem pelo Dr. Craig Jordan, o qual realizou testes funcionais, mostrando que o ER tranfectado era funcionante (Jiang & Jordan, 1992). Experimento de Reação em

Cadeia de Polimerase com Transcriptase Reversa (RT-PCR), realizados em nosso laboratório, evidenciaram a presença de TR α e β nessas células (dados não publicados).

O cultivo foi feito em garrafas de plástico e, antes das células atingirem a confluência total, foram subcultivadas através de tripsinização com ATV (tripsina 0,2% e EDTA 0,02% - Gibco™, Cat. n° 25200-072) por 2 a 5 minutos a 37°C. A neutralização da ATV foi feita com a adição de meio contendo 10% de FBS (Gibco™, Cat. n°10082-147). Após a tripsinização, alíquotas contendo as células foram transferidas para novas garrafas, para que as culturas fossem ampliadas.

4.2. Manutenção das linhagens em estoque

Após a tripsinização das culturas na pré-confluência, acrescentam-se FBS 30% (Gibco™, Cat. n°10082-147) e dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma, Cat. n° D8418) 10% em alíquotas de 2ml, contendo cerca de 10⁶ células/ml, que foram transferidas para tubos de polietileno (Wheaton-Cryulevial), colocadas em estantes de isopor com gelo e congelados a –70°C por 24h e depois estocados em nitrogênio líquido.

4.3. Tratamento do soro com carvão-dextrana (Armelin, 1978)

Para a retirada dos esteróides e dos hormônios tireoidianos, o FBS (Gibco™, Cat. n°10082-147) foi incubado com carvão-dextrana (2,5% de carvão + 0,25% de dextran T70 – Sigma, Cat. n° C6197), na proporção de 2:1, respectivamente.

Para 500ml de FBS, dissolve-se o carvão dextrana em 250 ml de PBSA (2,5 g de carvão em 100 ml de PBSA). Centrifugou-se em Sorval-RC2-B por 20min a 10.000 g. Foi descartado o sobrenadante, acrescentando-se o SFB ao precipitado, incubou-se em banho de gelo a 4°C por 1 hora, com agitação de 10 em 10 minutos. Ao término do período de incubação, centrifugou-se essa solução por 20min a 10.000 g, filtrou-se com papel-filtro Whatman n° 1 por três vezes e depois em filtro

Millipore poro de 0,22 micra (Cat. n° SCGPS02RE) por quatro vezes consecutivas para esterilização.

Para testar a eficiência do tratamento, 1ml de soro contendo 5×10^5 cpm de estradiol- ^3H foi incubado com carvão-dextrana como descrito acima. Alíquotas do sobrenadante foram contadas em Cintilador Beckman LS-100 e verificada a eficiência do tratamento.

4.4. Tratamento das linhagens celulares

Cada linhagem celular foi plaqueada em garrafas para cultura de 150cm^3 , até a confluência de 40%, seguida de tratamento com E_2 (Sigma, Cat. n° E8874) na dose de 10^{-8}M , T_3 (Sigma, Cat. n° T2752) 10^{-8}M , TAM (Sigma, Cat. n° T9262) 10^{-6}M , E_2 (10^{-8}M) + TAM (10^{-6}M), T_3 (10^{-8}M) + TAM (10^{-6}M) e apenas etanol absoluto (controle), em triplicata, durante 72h, com troca de meio a cada 24h, para posterior extração de RNA total. Houve a troca, no início do tratamento, do SFB inativado pelo tratado com carvão dextrana em todas as linhagens celulares, além da troca do RPMI pelo RPMI sem fenol vermelho (Gibco™, Cat. n°11835-030) nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7. Os suplementos restantes foram mantidos como citados no item 4.1.

4.5. Extração de RNA total

O RNA total foi extraído através do protocolo do fabricante, utilizando-se TRIZOL Reagente (Gibco™, Cat. n°15596-026). Para visualizar a técnica em todos os seus detalhes, vide anexo 01.

4.6. Purificação do RNA através da Técnica de Fenol-clorofórmio :

Para que o RNA ficasse mais puro, realizou-se a técnica de fenol-clorofórmio, retirando principalmente resquícios de reagentes. Segue, no anexo 2, a técnica mais detalhada.

4.7. A Tecnologia do cDNA *microarrays*

Para melhor entendimento das bases moleculares em oncologia, recentemente têm sido utilizados estudos que permitam a avaliação de padrões globais de expressão gênica (Nathanson *et al.*, 2001; Monni *et al.*, 2001). A utilização da metodologia dos *cDNA microarrays* permite o monitoramento do nível de expressão de milhares de genes simultaneamente, utilizando o RNA extraído de tumores ou de linhagens celulares. A vantagem dessa metodologia é a de que uma vez que as características de um tumor são determinadas pela expressão de milhares de genes, é possível identificar grupos de genes cujo padrão de expressão é capaz de predizer o comportamento biológico de tumores individuais. O nível de expressão relativa de todos os genes testados dentro de uma mesma amostra constitui o seu “perfil de expressão gênica”, que pode ser então comparado com os perfis obtidos a partir de outras amostras. Também pode ser utilizado como *screening* para verificar quais genes poderiam estar sofrendo influência de um dado tratamento, como neste estudo. Para tal, utilizou-se uma membrana de vidro de *microarrays* contendo 4608 genes para analisar quais genes tiveram sua expressão influenciada em células de CaM de cultura, pós-estímulos com o E2 e o T3. Esses fragmentos de c-DNA possuem sua seqüência total conhecida e foram escolhidos de um banco do Projeto Genoma do Câncer Humano (HCGP) do Instituto Ludwig Para a Pesquisa do Câncer de São Paulo (Brentani *et al.*, 2005).

De forma simplificada, os *cDNA* de interesse (ou parte deles) são imobilizados em uma lâmina de vidro de forma ordenada, originando o chamado *cDNA microarrays*. Na etapa seguinte, a lâmina de vidro é hibridizada simultaneamente com duas populações de cDNA, marcadas com fluorocromos de cores diferentes (por exemplo: vermelho para a amostra tumoral e verde para a

amostra controle). Aqueles transcritos que possuem homologia com seqüências fixadas à lâmina de vidro se ligarão ao *microarray* e a razão entre as intensidades dos diferentes fluorocromos (vermelho/verde) em cada ponto indicará a expressão relativa do gene dentro da população de RNAs do tumor ou da célula controle. Pode ser usado o RNA total ou o mensageiro. Para a utilização de RNA total, as quantidades são bem grandes de cada amostra, variando de 40 a 100ug por amostra, o que normalmente só é possível obter em experimentos utilizando linhagens celulares. Já com o RNA mensageiro, a quantidade de RNA é menor, podendo ser obtida através da amplificação de RNA, procedimento este utilizado principalmente em casos de tumores advindo de pacientes.

A utilização de lâmina de vidro como o suporte sólido para a fixação do painel de genes a ser estudado possui vantagens sobre as membranas de *nylon*, pois reduz a área de difusão necessária para que a sonda encontre as seqüências alvo, reduzindo assim o volume necessário para a hibridização. Como resultado, uma menor quantidade de RNA das amostras em estudo é necessária, tornando possível o estudo de material de biópsia (Duggan *et al.*, 1999). Os *cDNA microarrays* podem ser diferentes quanto ao tamanho dos fragmentos de DNA fixados, métodos de arranjo, ligações existentes entre o DNA e o suporte, métodos de hibridização e detecção. Os formatos mais conhecidos para os *microarrays* que usam a lâmina de vidro como o suporte sólido são os arranjos de cDNAs e os de oligonucleotídeos sintetizados *in situ* (Cheung *et al.*, 1999).

O uso de *cDNA microarray* para a análise da expressão gênica possui diversas outras aplicações. Eles podem ser utilizados para o monitoramento de genes sabidamente expressos em determinada situação, na descoberta de genes que são relevantes em uma doença ou via metabólica, ou na determinação da expressão gênica tecido-específica.

4.7.1. Mapa da membrana do *microarrays*

A membrana foi elaborada em cooperação com o Laboratório de Biologia Computacional (LBC) do Hospital do Câncer, tendo como pesquisadora atuante a Dra. Helena Brentani, juntamente com o Laboratório de Análise de Expressão Gênica (LGEA) do Instituto Ludiwig de Pesquisa sobre o Câncer, tendo com

pesquisadora atuante a Dra. Dirce Maria Carraro. A lâmina é composta de 4608 genes advindos de bibliotecas do Projeto Genoma do Câncer Humano, os quais são relacionados a múltiplas funções celulares (Figura 10), sendo a maior parte deles relacionada com a regulação da transcrição gênica, seguida pelas proteínas que são fosforiladas. Trata-se então de uma plataforma universal (Brentani *et al.*, 2005). Esses mesmos genes estão distribuídos por todos os cromossomos humanos. Os RNA totais de cada amostra foram hibridizados, usando como controle interno o RNA da célula Hb4a.

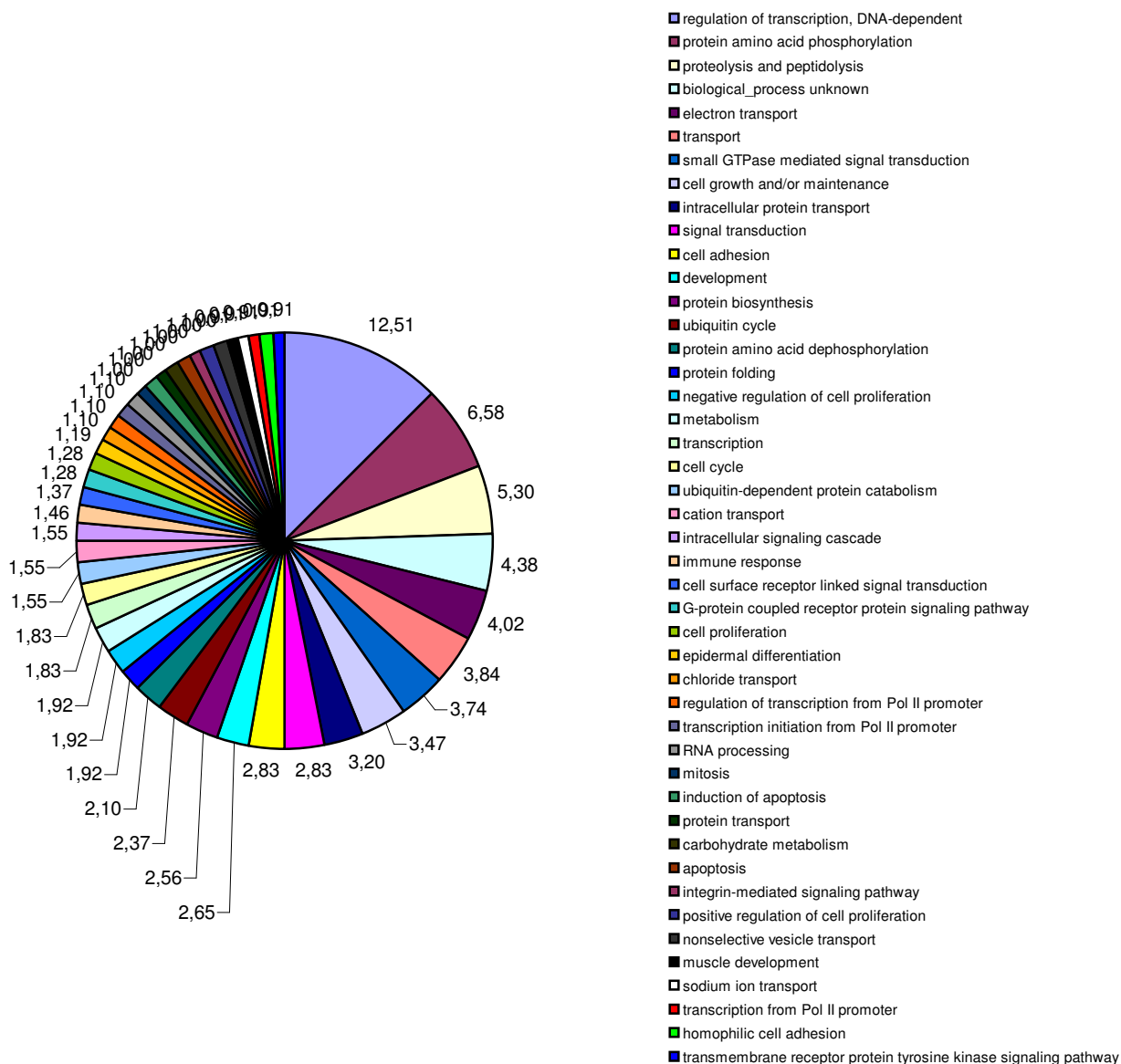


FIGURA 10 – Descrição das características dos genes contidos na membrana de *microarrays*

4.7.2. Hibridização e análise dos *microarrays*:

A hibridização e análise dos *microarrays* foram realizadas seguindo o protocolo descrito em Folgueira *et al.* (2005), o qual utilizou RNA amplificado. Como neste trabalho foi utilizado RNA total, algumas variações na técnica foram necessárias. Maiores detalhes são encontrados no Anexo 3.

5. Análise Estatística

Realizado Teste T *student* permutado (com 10000 permutações) sem *bootstrap*, com cálculo do FDR (*Falso Discovery Ratio* - pFDR) menor que 0,05 e *fold* maior que 2,0 nos experimentos de *microarrays*.

6.1. Cultura de células

As linhagens celulares de CaM MDA-MB-231 (Figura 11), MCF-7 (Figura 12) e S30 (Figura 13) foram mantidas em cultura, submetidas aos tratamentos com E_2 ($10^{-8}M$), T_3 ($10^{-8}M$), E_2 ($10^{-8}M$) + TAM ($10^{-6}M$), T_3 ($10^{-8}M$) + TAM ($10^{-6}M$), TAM ($10^{-6}M$) somente, e apenas etanol absoluto (controle). No início do tratamento, retirou-se o soro bovino normal, o qual foi substituído pelo tratado com carvão. A célula Hb4a (Figura 14) foi utilizada como controle interno das hibridizações, portanto não foi tratada.

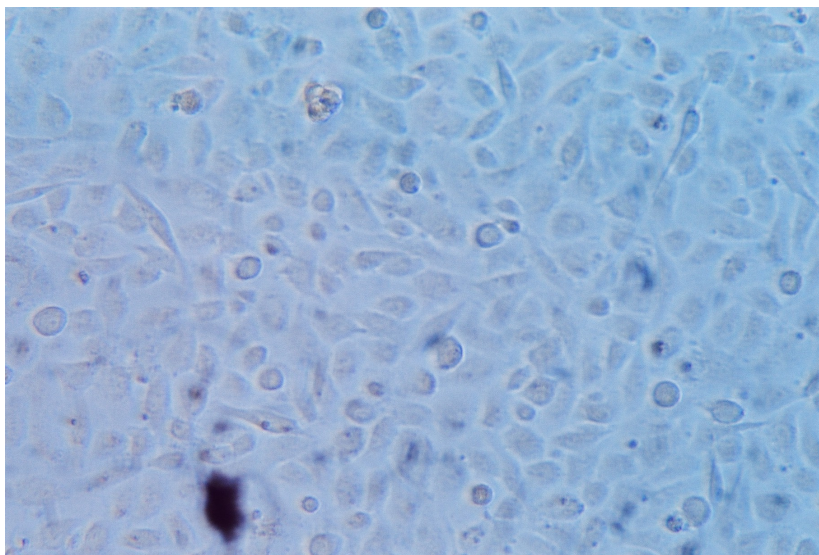


FIGURA 11 – Representação fotográfica da linhagem celular MDA-MB-231 mantida em cultura com RPMI e SFB.

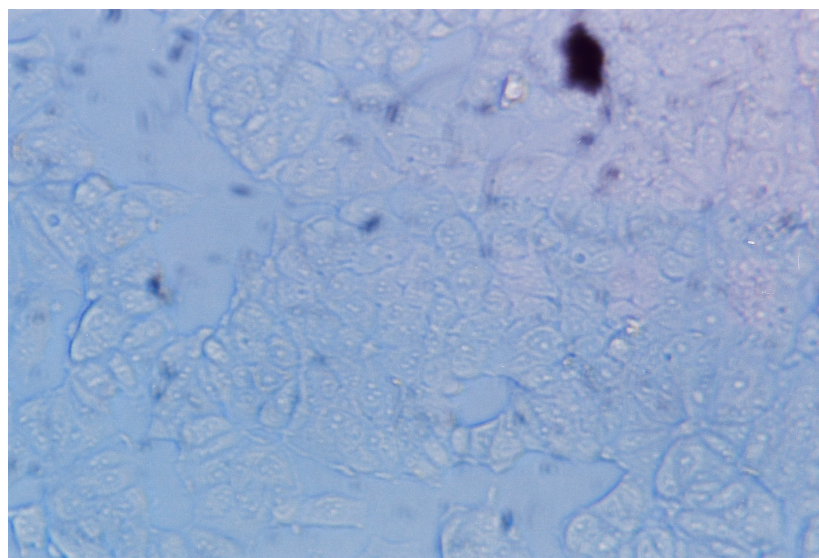


FIGURA 12 – Representação fotográfica da linhagem MCF-7 mantida em cultura com RPMI e SFB.

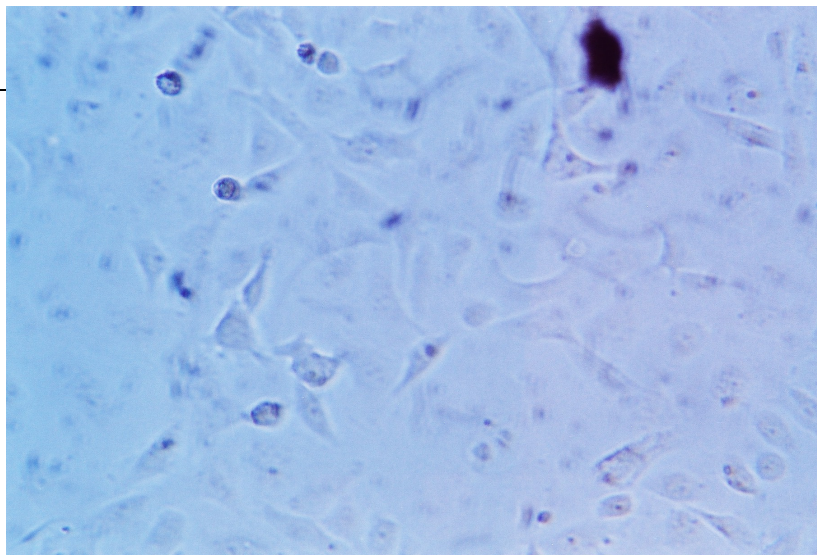


FIGURA 13 – Representação fotográfica da linhagem celular S30 mantida em cultura com MEM sem fenol vermelho, SFB, L-glutamina, aminoácidos não essenciais, geneticin e insulina.

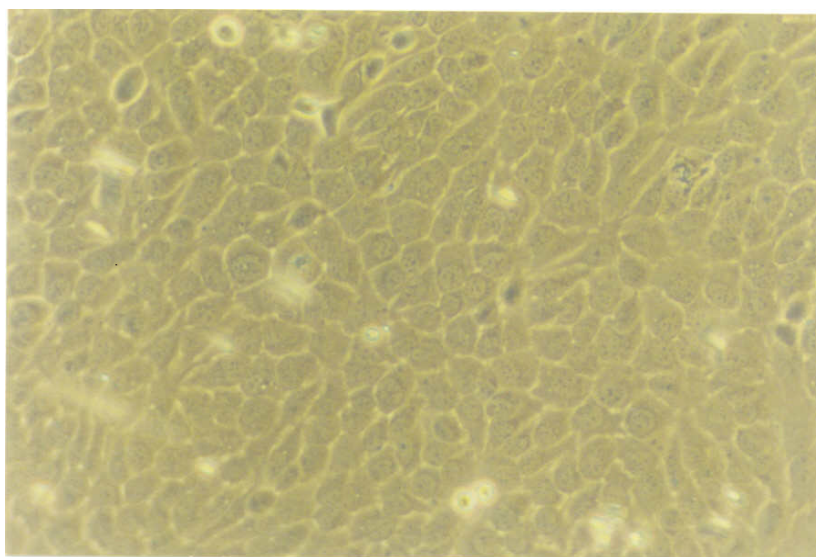


FIGURA 14 – Representação fotográfica da linhagem celular Hb4a mantida em cultura com RPMI e SFB.

6.2. Dendograma das membranas hibridizadas

O resultado da hibridização das membranas de *cDNA microarray* foi apresentado sob a forma de um dendograma (Figura 15), no qual amostras com maiores similaridades foram dispostas mais próximas, enquanto amostras que apresentam maiores diferenças entre si foram dispostas mais distantes umas das outras.

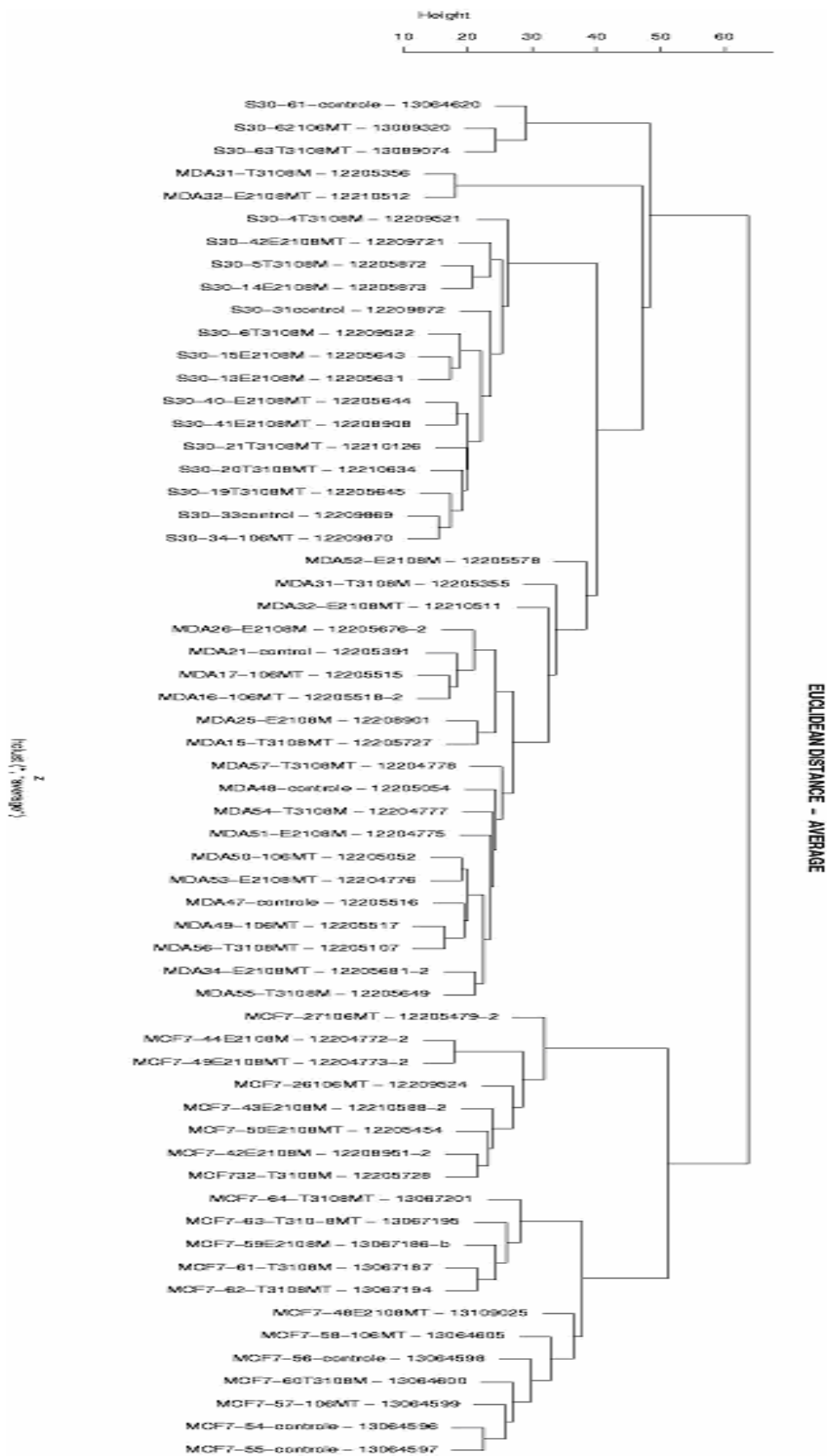


FIGURA 15. Dendrograma das membranas hibridizadas dos diferentes tratamentos nas 3 linhagens celulares de adenocarcinoma de mama.

6.5. Resultados da hibridização das membranas

6.5.1. Análise das Hibridizações das células MCF-7

Analisando os resultados dos tratamentos com E2 e T3 nas células MCF-7, utilizando-se apenas o parâmetro do teste *T student*, com $p < 0,05$ (não se levando em consideração nem o *fold chance*, nem o $pFDR < 0,05$), foi observado que há uma intersecção de grande parte dos genes diferencialmente regulados por ambos os tratamentos (ou seja, se um gene é estimulado por E2, o é também por T3; se inibido por E2, o é também por T3, e vice-versa). São 391 genes que possuíram um mesmo comportamento após dois estímulos distintos (o total de genes analisados foram 393). Mesmo genes fracamente regulados pelo E2 possuem o mesmo padrão de resposta com o T3 (Gráfico 1; Anexo 04 – Tabela 2).

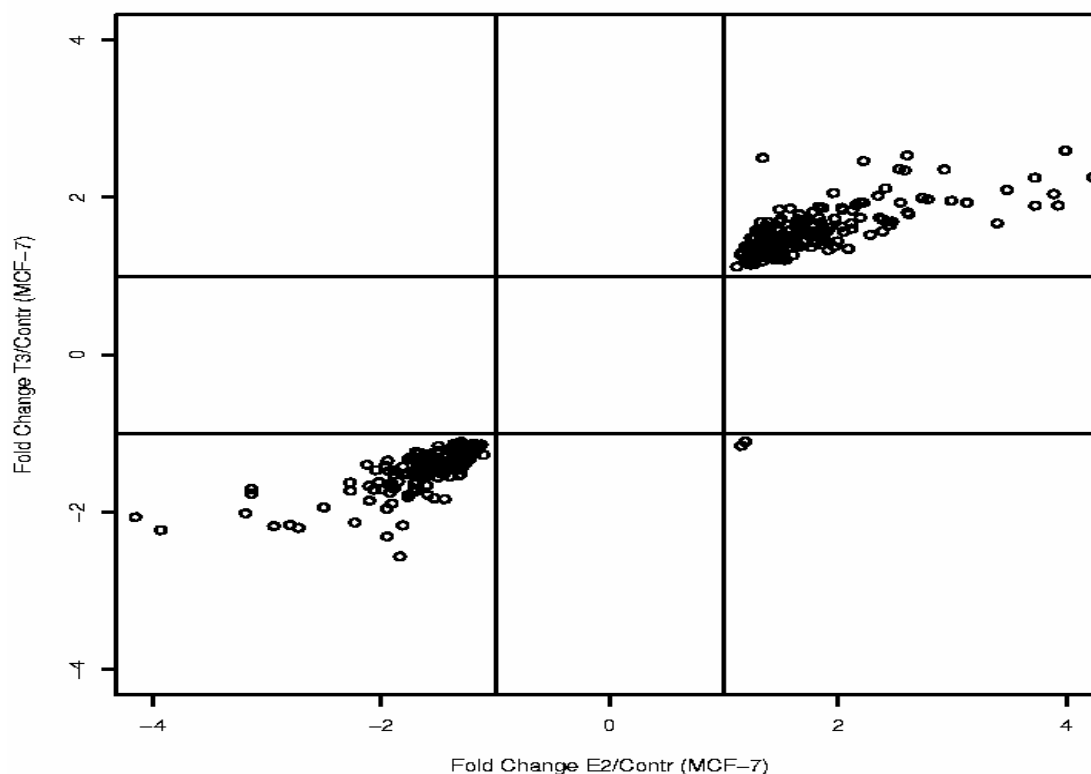


GRÁFICO 1. Dispersão dos *fold*s dos 393 genes modulados por E2 e T3 nas células MCF-7. Observa-se que a dispersão dos pontos é semelhante em ambos os tratamentos, não sendo semelhante em apenas dois genes. Cada ponto representa a expressão de um gene.

Levando-se em consideração os critérios definidos na análise estatística ($p < 0,05$; $p\text{FDR} < 0,05$ e $Fold > 2,0$), as células MCF-7 tiveram 39 genes diferencialmente expressos em relação ao controle quando tratadas com E2. Quando tratadas com T3, tiveram 26 genes diferencialmente expressos em relação ao controle. Quando se realiza a intersecção entre os resultados do tratamento com E2 e T3, são oito os genes em comum, e a adição de tamoxifem a esses tratamentos não os alterou de maneira significativa.

Esses genes foram os seguintes: *Amphiregulin* (schwannoma-derived growth factor) (AR); *fibulin 1* (FBLN1); *claudin 6* (CLDN6), *pericentriolar material 1* (PCM1), *premature ovarian failure 1B* (POF1B), *factor for adipocyte differentiation-104* (FAD 104), FLJ20073 protein (FLJ20073), *likely ortholog of rat vacuole membrane protein 1* (VMP1) (Quadro 1).

A AR teve um *fold* de 18,126 no tratamento com E2 e 3,63 no tratamento com T3, e após a adição do TAM esses *fold* caíram respectivamente para 15,35 e 1,47. Como a técnica de microarrays é suscetível a grandes variações, para considerar-se uma inibição ou estímulo por TAM, seria necessário que ao menos tivesse uma variação de duas vezes para cima ou abaixo do valor do *fold* considerado como significativo (ou seja, teria que haver uma variação maior que 4). Observando o Quadro 1, vê-se que todas as percentagens de variação foram inferiores a esse ponto de corte. Por isso considera-se que a adição de TAM nesses 8 genes não os influenciou de forma significativa, não inibindo a ação do E2 ou do T3.

Quadro 1: Expressão Diferencial de oito genes sob tratamento com estradiol (E2) e Triiodotironina (T3) e a variação da expressão após adição de tamoxifen (TAM) na linhagem celular MCF-7. Quando a expressão diminui, após a adição de TAM, a representação é dada com o sinal -. Quando aumento, após a adição de TAM, é dada pelo sinal +.

gene	E2xC	(E2+TAM)xC	Varição	T3xC	(T3+TAM)xC	Varição
AR	18,126	15,348	-2,778	3,630	1,474	-2,16
FBLN1	2,603	1,972	-0,631	2,532	5,464	+2,932
CLDN6	2,532	3,364	+0,832	2,362	1,932	-0,43
PCM1	2,349	2,347	-0,02	2,018	1,865	-0,163
POF1B	2,585	3,200	+0,615	2,343	3,406	+1,063
FAD104	3,885	3,204	-0,681	2,042	1,647	-0,395
FLJ20073	2,219	1,682	-0,537	2,462	2,014	-0,448
VMP1	2,412	2,378	-0,034	2,114	2,809	+0,695

AR = *amphiregulin*; FBLN1 = *fibulin 1*; CLDN6 = *claudin 6*; PCM1 = *pericentriolar material 1*; POF 1B = *premature ovarian failure 1B*; FAD104 = *factor for adipocyte differentiation-104*; FLJ20073 = proteína FLJ20073; VMP1 = *likely ortholog of rat vacuole membrane protein 1*; C = controle; E2 = tratamento com E2; T3 = tratamento com T3; X = versus; E2+TAM = tratamento de E2 associado ao TAM; T3+TAM = tratamento de T3 associado ao TAM.

6.5.2 Análise das hibridizações das células MDA-MB-231

A análise dos resultados dos tratamentos com E2 e T3 nas células MDA-MB-231, utilizando-se apenas o teste *T student*, com $p < 0,05$ (não levando em consideração nem o *fold chance*, nem o $pFDR < 0,05$), mostra que há uma intersecção de grande parte dos genes diferencialmente regulados por ambos os tratamentos (semelhante ao que ocorre com os resultados na MCF-7). São 144 genes que possuem um mesmo comportamento após dois estímulos distintos (Gráfico 2; Anexo 05 – Tabela 03).

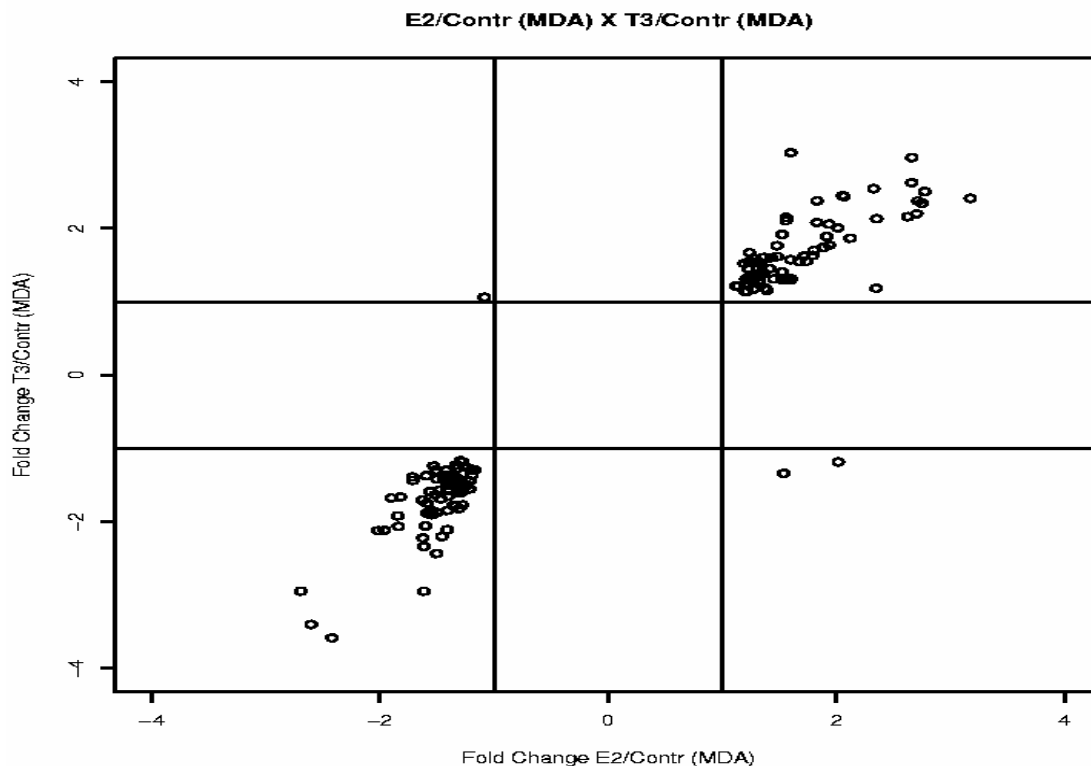


GRÁFICO 2. Dispersão dos *fold*s dos 144 genes modulados por E2 e T3 nas células MDA-MB-231. Cada ponto representa a expressão de um gene. Observa-se que a dispersão dos pontos é semelhante em ambos os tratamentos, não o sendo em apenas 3 genes.

A intersecção dos resultados das células MCF-7 e MDA-MB-231, da respectiva intersecção dos tratamentos de E2 e T3, revela que 12 genes são comuns. Se aplicados os demais critérios estatísticos, nenhum gene fica na intersecção entre as células.

Levando-se em consideração os critérios descritos na análise estatística ($p < 0,05$; $p\text{FDR} < 0,05$ e $Fold > 2,0$), nas células MDA-MB-231 após o tratamento com E2, 15 genes foram diferencialmente regulados em relação ao controle, e, após a adição de TAM, 7 genes permaneceram diferencialmente regulados em relação ao controle. Em relação ao tratamento com T3, 18 genes foram diferencialmente regulados em relação ao controle, e, após a adição do TAM, 13 genes permaneceram diferencialmente regulados em relação ao controle.

Realizando a intersecção entre os tratamentos com E2 e T3, o único gene que é diferencialmente regulado é o *SOX 17*. Ele apresentou uma expressão diferencial de 2,65 vezes em relação ao controle com o tratamento com o E2, e, quando adicionado o TAM, a expressão foi de 1,91 vezes. Quando tratado com T3, a expressão diferencial foi de 2,62 em relação ao controle, adicionando-se TAM, essa expressão foi de 1,54 vezes.

6.5.3 Análise das hibridizações das células S30

A análise dos resultados dos tratamentos com E2 e T3 nas células S30, utilizando-se apenas o do teste *T student*, com $p < 0,05$ (não levando em consideração nem o *fold chance*, nem o $pFDR < 0,05$), revela que há uma intersecção de grande parte dos genes diferencialmente regulados por ambos os tratamentos (semelhante ao que ocorre com os resultados na MCF-7 e da MDA_MB-231). São 144 genes que possuem um mesmo comportamento após dois estímulos distintos (Gráfico 3; Anexo 06 – Tabela 04).

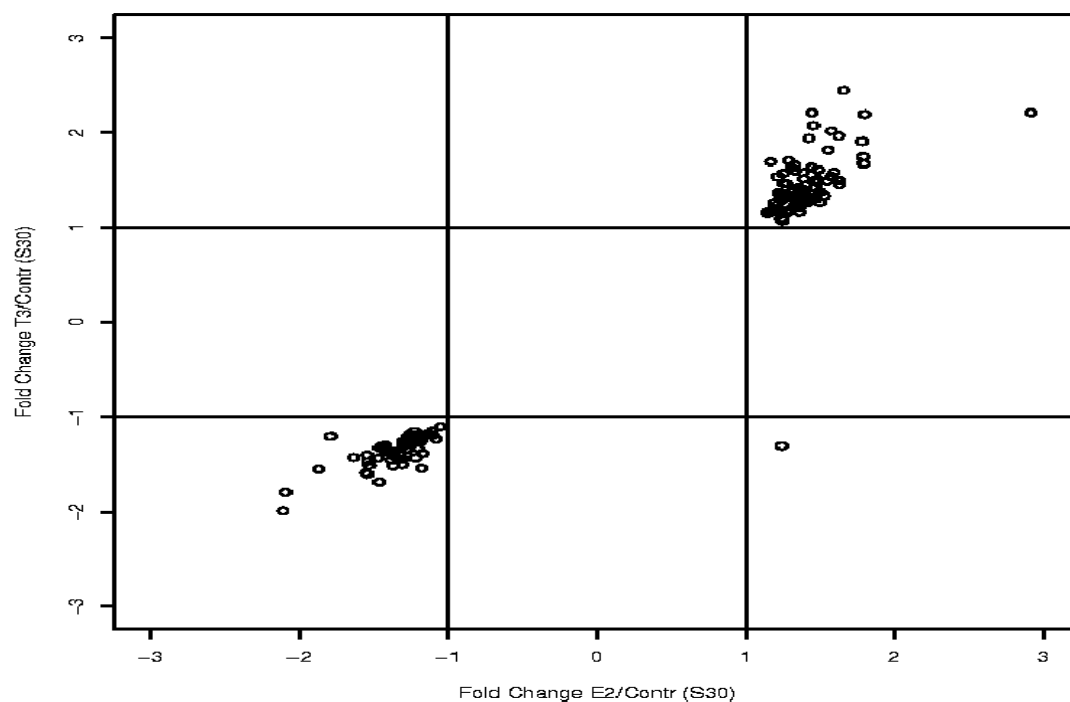


GRÁFICO 3. Dispersão dos *fold*s dos 144 genes modulados por E2 e T3 nas células S30. Observa-se que a dispersão dos pontos é semelhante em ambos os tratamentos.

Seguindo os mesmos critérios para considerar um gene diferencialmente expresso nas células S30 ($p < 0,05$; $\text{fold} > 2,0$ e $\text{pFDR} < 0,05$), após o tratamento com E2, 5 genes foram diferencialmente expressos. Com o tratamento com T3, 9 genes. Após a adição de TAM ao E2, 4 genes foram modulados, e após a adição de TAM ao tratamento com T3, apenas 2 genes.

Realizando a intersecção entre os resultados dos tratamentos com E2 e T3, verificou-se apenas o gene do citocromo P450 (família 1, subfamília B, polipeptídeo 1 - CYP1B1) em comum. Esse gene apresentou uma expressão de 2,9 vezes em relação ao controle sob ação do E2, e, após a adição de TAM, esse *fold* se tornou de 1,25. Sob a influência do T3, observa-se um *fold* de 2,22; assim como após a adição de TAM 1,11 vezes.

6.5.4. Análise da ação do TAM nos genes diferencialmente expressos ($p < 0,05$; $\text{fold} > 2,0$ e $\text{pFDR} < 0,05$) nas linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e S30.

Levando-se em consideração que o TAM tem efeito antagonista no ER nuclear e agonista no ER de membrana, foi interesse analisar as expressões dos genes diferencialmente expressos ($p < 0,05$; $\text{fold} > 2,0$ e $\text{pFDR} < 0,05$) sob o tratamento com TAM comparado ao controle, nas células MCF-7, MDA-MB-231 e S30, lembrando-se que esses mesmos genes foram modulados tanto por E2 quanto por T3 (Tabela 1).

Tabela 1. *Fold*, *pvalue* e *pFDR* dos genes modulados por E2 e T3 nas células MCF-7 (8 primeiros genes), MDA-MB-231(SOX17) e S30 (CYP1B1) sob o tratamento com tamoxifem comparado ao controle.

<i>Símbolo do Gene</i>	<i>FOLD TAM x CONT</i>	<i>pFDR</i>	<i>pValue student</i>
PCM1	1.850609	0.59476824	0.135
FAD104	2.462289	0.48964451	0.066
POF1B	1.585788	0.47240773	0.055
CLDN6	2.188587	0.42231760	0.041
SAMD9	1.602140	0.00000000	0
AR	4.055838	0.39277978	0.023
FBLN1	1.958841	0.39277978	0.027
VMP1	1.125058	1.00000000	0.758
SOX17	1.0000000	0.4149000	0.061
CYP1B1	0.8	0.0900000	1

AR = *amphiregulin*; FBLN1 = *fibulin 1*; CLDN6 = *claudin 6*; PCM1 = *pericentriolar material 1*; POF 1B = *premature ovarian failure 1B*; FAD104 = *factor for adipocyte differentiation-104*; SAMD9 = *sterile alpha motif domain containing 9*; VMP1 = *likely ortholog of rat vacuole membrane protein 1*; CYP1B1 = citocromo P450 (família 1, subfamília B, polipeptídeo 1); TAM = *tamoxifen*; CONT = controle; *fold* = diferença de expressão; *pFDR* = *false discovery ratio*.

Analisando-se apenas o *fold*, observando a tabela 1, vê-se que os genes FAD104, CLDN6 e AR tiveram *fold* >2,0 sob o tratamento com TAM. Portanto o TAM modulou positivamente esses genes, sendo todos eles na linhagem MCF-7. Nos demais genes (PCM1, POF1B, SAMD9, FBLN1, VPM1 na linhagem MCF-7; SOX17 na linhagem MDA-MB-231 e CYP1B1 na linhagem S30) o TAM não influenciou (*fold*<2).

7. Discussão

7.1. Genes diferencialmente expressos nas células MCF-7

Observa-se que nos Gráficos 1, 2 e 3, os tratamentos de E2 e T3 possuem ação semelhante em diversos genes na linhagem MCF-7, MDA-MB-231 e S30. Porém, quando os critérios de corte mais restritos são aplicados, observam-se apenas oito genes igualmente regulados por E2 e T3 nas células MCF-7, que serão discutidos abaixo.

7.1.1. Amphiregulin

O gene da *amphiregulin* (AR) está localizado no cromossomo 4q13-q21. Sua proteína é membro da família dos fatores de crescimento epidermais (EGF). Foi originalmente isolada do meio sem soro da linhagem celular MCF-7, após tratamento com *phorbol ester, tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetato* (TPA) (Shoyab *et al.*, 1988).

A família das proteínas dos EGF engloba vários polipeptídeos, tais como o fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento transformador alfa (TGF- α), amphiregulin (AR), a Heregulin (HRG- β 1) (Kondapaka *et al.*, 1997) e CRIPTO-1 (CR-1) (Normanno *et al.*, 1994). Esses fatores atuam em seu receptor específico, o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR). Esse receptor é de membrana, ligado as proteínas quinases. (Ciardiello & Tortora, 1998). O meio da porção carboxi-terminal da molécula da AR possui uma identidade entre os membros da família EGF (Shoyab *et al.*, 1989). Em particular, AR mostra 38% de seqüência idêntica protéica com EGF e 32% com TGF- α . AR liga-se ao EGFR, mas com menor afinidade que o EGF e o TGF- α (Shoyab *et al.*, 1989). É sintetizado com um precursor transmembrana com 252 aminoácidos e é secretado como um monômero com 78 ou 84 resíduos de aminoácidos após proteólise do precursor (Shoyab *et al.*, 1989; Plowman *et al.*, 1990).

O AR é um fator de crescimento regulador multifuncional. Dependendo de sua concentração, células alvo e presença de outros fatores de crescimento, AR é capaz de inibir ou estimular a proliferação celular (Johnson *et al.*, 1991). Por exemplo, *in vitro*, AR pode inibir o crescimento de algumas células, mas pode estimular o crescimento de fibroblastos, queratinócitos, células epiteliais mamárias e

outras células tumorais (Shoyab *et al.*, 1988; Johnson *et al.*, 1992; Cook *et al.*, 1991).

Kenney *et al.* (1996) inseriram *pads* com AR recombinante em mamas de ratas ooforectomizadas, o que determinou o restabelecimento da atividade de desenvolvimento precoce do epitélio ductal mamário e induziu hiperplasia dele mesmo. Logo, a AR pode ser um importante intermediário na maturação glandular mamária e na progressão inicial da oncogênese mamária.

Evidências experimentais sugerem que a proliferação induzida por E2 em células mamárias normais ou tumorais seja mediada em parte pelos fatores de crescimento EGF (Normanno & Ciardiello, 1997). Ocorre aumento da expressão de AR em células de adenocarcinoma de mama tratadas com estradiol (Martinez-Lacaci *et al.*, 1995; Weinstein *et al.*, 2002; Vendrell *et al.*, 2004).

Martinez-Lacaci *et al.* (1995) realizaram experimento tratando células MCF-7 com E2 10^{-9} M, E2 10^{-9} M associado ao TAM 10^{-6} M (E2+TAM), TAM sozinho e controle (apenas com etanol) durante 24 horas. Observaram que a adição de TAM ao tratamento com E2 fez com que houvesse uma diminuição de 38% da expressão do RNAm da AR. Assim, sugerem que o mecanismo de ação do E2 estimulando a expressão de AR seja via ER. Por outro lado, a análise dos resultados demonstra que a adição de TAM ao E2 no tratamento da MCF-7 diminuiu em 15% a expressão ocasionada pelo E2 sozinho (Quadro 1). Como essa diminuição foi pouco importante, esse resultado sugere que o mecanismo de ação seja não genômico.

Vendrell *et al.* (2004), através de cDNA *mini-arrays*, após tratarem as células MVLN, as quais são uma linhagem celular de CaM derivada da MCF-7, por 4 dias com E2, também tiveram resultado semelhante aos aqui apresentados nas células MCF-7: a AR foi um dos genes diferencialmente expressos.

Em relação à modulação gênica do T3 na AR, não há nada anteriormente publicado. Verificou-se neste trabalho que o aumento de expressão de AR no tratamento com T3, nas células MCF-7, foi menor que o apresentado com o tratamento com E2, porém ainda relevante.

Independentemente da influência hormonal, existem trabalhos mostrando a expressão aumentada de AR em diversos tipos tumorais, tais como colorretais (Saeki *et al.*, 1992), pulmonares (Ciardiello & Tortora, 1998), mama (Kenney *et al.*, 1996; Panico *et al.*, 1996; Qi *et al.*, 1994; Normanno *et al.*, 1994, Normanno *et al.*,

1995). Quando realizada técnica de imunistoquímica para AR, observa-se maior positividade em tumores de mama invasivos, comparados com as lesões *in situ* (Panico *et al.*, 1996; Normanno *et al.*, 1994; Qi *et al.*, 1994; Salomonn *et al.*, 1995).

Porém, trabalhos tentando relacionar a positividade de AR na imunistoquímica, com parâmetros clinicopatológicos do adenocarcinoma de mama, que pudessem determinar o AR como um fator prognóstico, são bastante controversos (LeJeune *et al.*, 1993; Qi *et al.*, 1994; Panico *et al.*, 1996; Visscher *et al.*, 1997; Desruisseau *et al.*, 2004). Visscher *et al.* (1997) observaram 85% de recorrência do adenocarcinoma de mama em pacientes positivos para AR na imunistoquímica, enquanto apenas 29% dos negativos tiveram recorrência. LeJeune *et al.* (1993) encontraram uma expressão maior por *Northern dot blots* de AR em tumores de pacientes com linfonodos positivos do que naqueles com linfonodos negativos. Já outros autores não tiveram correlação alguma entre a positividade de AR na imunistoquímica e algum outro parâmetro clinicopatológico (Qi *et al.*, 1994; Panico *et al.*, 1996; Desruisseau *et al.*, 2004).

A supressão da expressão de AR, em células transformadas epiteliais de mama, reduz o tamanho e a vascularização de tumores mamários desenvolvidos em *nude mice* (Ma *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 1999). Essa expressão reduzida de AR foi seguida de importante diminuição do nível de *urokinase-type plasminogen activator* (uPA) e do fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- β 1). O mesmo grupo de pesquisadores demonstrou (Giusti *et al.*, 2003) que o tratamento com AR estimulou a expressão de uPA e TGF- β 1 em células epiteliais mamárias transformadas, havendo um sinergismo quando adicionado também TGF- β 1, com maior expressão de uPA. Esse aumento de expressão de uPA foi acompanhado de aumento do número de células e invasão da *matrigel in vitro*. Interessante é o fato de que o aumento do ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) do uPA, que precede a formação da proteína, é bloqueado pelo inibidor da MAPK PD098059, sugerindo fortemente que o efeito sinérgico de AR e TGF- β 1, na expressão de uPA, necessita da ativação da via da *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK).

As MAPK têm papel importante na via de transdução de sinal mitogênico e são determinantes essenciais do crescimento e diferenciação celular. Ativação constitutiva da cascata da MAPK está associada com a carcinogênese e metástases de adenocarcinoma de mama e renal (Reddy *et al.*, 1999). Já as metaloproteinases

da matriz extracelular (MMPs), constituem uma família de proteases responsáveis pelo remodelamento normal da matriz extracelular. Essas proteínas são expressas tanto pelas células epiteliais tumorais quanto pelo microambiente estromal, incluindo fibroblastos, células endoteliais e inflamatórias (Menashi *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2003). Trabalhos têm mostrado a relação entre algumas MMPs e adenocarcinoma de mama, como por exemplo, que os fibroblastos podem regular a invasão de células epiteliais mamárias tumorais por produzir MMP-9 (Wang *et al.*, 2002). Menashi *et al.* (2003) observaram que a AR, após se ligar ao EGFR, regula a atividade do indutor de matrix metaloproteinases extracelular (EMMPRIN) em células de adenocarcinoma de mama NS2T2A1. Reddy *et al.* (1999) demonstraram que tanto o EGF quanto o AR estimulam a produção de MMP-9, sendo essa ação fortemente diminuída com inibidor de MAPK (*apegenin*). Assim a atuação da via da MAPK tem papel importante no crescimento e na invasividade de tumores.

Além disso, Normanno & Ciardiello (1997) demonstraram que o proto-oncogene *c-H-ras*, ativado em células epiteliais mamárias humanas, resulta em transformação e aumento da produção de alguns fatores de crescimento EGF, tais como TGF- α e AR. Essa co-expressão desses dois peptídeos freqüentemente ocorre no adenocarcinoma de mama, sugerindo uma via autócrina de crescimento celular não controlado, mantendo a transformação neoplásica.

O *fold* determinado pelo TAM para esse gene foi de +4,06 (Tabela 1). Trabalhos anteriores mostram que o TAM é um agonista no ER de membrana (Levin *et al.*, 2002; Shou *et al.*, 2004). O TAM aumentou a expressão do AR, sugerindo que esse efeito seja via ER de membrana.

Assim, o AR parece ser um gene importante para a modulação do E2 e, pelos resultados deste trabalho, do T3, em células de câncer de mama MCF-7, tanto pela via clássica (genômica) quanto pela via não genômica.

7.1.2. Fibulin 1

O gene fibulin 1 está locado no cromossomo 22q13.31. É composto de quatro diferentes isoformas, derivadas de *splicing* alternativo (A, B, C e D), mas sem distinção funcional entre elas (Argraves *et al.*, 1989; Tran *et al.*, 1997). A *fibulin*

1 é uma glicoproteína secretada, a qual se incorpora na matrix extracelular fibrilar, ou seja, é uma proteína da matriz extracelular. É um mediador da adesão plaquetária via ligação com o fibrinogênio (www.fatigo.org).

A expressão do gene da *fibulin 1* foi aumentada em tumores ovarianos e de mama. O E2 estimula a expressão desse gene em células de câncer ovariano (Clinton *et al.*, 1996) e de mama (Greene *et al.*, 2003).

Pode estar envolvido também na motilidade celular e no crescimento-ancorado das células tumorais (Qing *et al.*, 1997; Hayashido *et al.*, 1998; Twal *et al.*, 2001).

Outros estudos mostram que a fibulin-1 tem papel na diferenciação celular, interagindo com fatores de crescimento tais como pro-HB-EGF, NOvH ou β -amilóide, podendo regular a biodisponibilidade celular desses fatores (Perbal *et al.*, 1999; Ohsama *et al.*, 2001; Brooke *et al.*, 2002)

O gene da fibulin-1 teve sua expressão estimulada tanto com E2 (dados concordantes com os de Greene *et al.*, 2003) quanto com T3 nas células MCF-7, podendo estar influenciando o crescimento e a diferenciação tumoral hormônio dependente.

7.1.3. Claudin 6

Esse gene foi diferencialmente expresso nas células MCF-7 tanto tratadas com E2 quanto com T3.

Ele está locado no cromossomo 16p13.3. Esse gene faz parte da família das proteínas Claudins (do latim *claudere* que significa fechar). Até hoje foram descritas 24 moléculas membros dessa família, porém essa lista vem crescendo (Sobel *et al.*, 2005, Morita *et al.*, 1999, Simon *et al.*, 1999, Tsukita & Furuse, 1999). Algumas não possuem função ainda clara, porém toda a família está envolvida na formação de junções firmes posteriores entre as células (Tsukita & Furuse, 2000). Trata-se então de uma proteína com aproximadamente 23kD, apresentando quatro domínios transmembrânicos. Experimentos de *Northern blotting* têm demonstrado que o padrão de distribuição para cada CLDN é distinto (Furuse *et al.*, 1998, Morita *et al.*, 1999). Por exemplo, CLDM-1 e 2 são expressas em altos níveis no fígado e nos

rins, enquanto o mRNA da CLDN-3 foi detectado principalmente no pulmão e fígado. Esses achados, juntos com outros de microscopia eletrônica, sugerem que, em vários tecidos, mais de 2 espécies de CLDN são co-expressas em um única célula (Morita *et al.*, 1999).

Junto com outras proteínas, também envolvidas no papel de junção celular tais como as *occludin* e as JAM (*junctional adhesion molecule*), têm o papel de criar, na fenda juncional, uma barreira primária para prevenir e controlar o transporte paracelular de solutos e restringir a difusão lateral de lipídeos e proteínas, mantendo a polaridade celular (Madara, 1998, Offner *et al.*, 2005). Além disso, mantêm a adesão celular (Sobel *et al.*, 2005).

Offner *et al.* (2005) demonstraram a presença de mRNA de CLDNs 1, 3, 4 e 7 em diferentes linhagens celulares de carcinomas, enquanto a CLDN 8 foi seletivamente expressa em linhagens celulares de cânceres de mama (BT20, CAMA-1, ZR-75-1, T47D, MDA-MB-231) e pâncreas. Assim como este último trabalho citado, outros também tentam relacionar a expressão de CLDNs em carcinomas (Soini, 2004, Soini, 2005, Sobel *et al.*, 2005), porém seu papel na carcinogênese é controverso. Vários estudos relatam o aumento da expressão das CLDNs nas fases iniciais da carcinogênese em lesões intra-epiteliais, a qual decresce durante a progressão para lesões invasivas.

Esse mesmo padrão de correlação inversa entre a expressão de CLDN e a agressividade do tumor se mantém em um trabalho que avaliou a expressão de CLDN7 em adenocarcinomas de mama (Kominsky *et al.*, 2003).

O TAM aumentou a expressão do gene CLDN6 em +2,19 vezes (Tabela 1) em relação ao controle, sugerindo que essa modulação possa estar acontecendo via ER de membrana.

Porém nada há descrito relacionando especificamente a CLDN6 com carcinomas. Também não há descrição de modulação gênica da família CLDN via hormonal, seja T3 ou de E2.

7.1.4. Pericentriolar material 1

Esse gene (PCM1) está locado no cromossomo 8p22-p21.3 e sua função molecular está relacionada com a atividade da enzima polimerase na ação com a produção de DNA e/ou RNA. Faz parte como componente celular do centrômero e possui como processo biológico o transporte de elétrons (www.fatigo.org).

A amplificação do centrômero está implicada no desenvolvimento de mitoses, gerando instabilidade genômica e perda da polaridade celular, favorecendo o desenvolvimento de tumores mais agressivos da mama. Dentro da caracterização da amplificação do centrômero está o acúmulo de material pericentriolar (Lingle & Salisbury, 1999; Salisbury *et al.*, 2004). Nenci (1978) observou a presença de esteróides no material pericentriolar modulando sua atividade.

7.1.5. Premature Ovarian Failure 1B, Likely Ortholog of Rat Vacuole Membrane Protein 1, factor for adipocyte differentiation-104, Proteína FLJ20073.

Todos os genes abaixo não possuem descrição de que estejam relacionados com o adenocarcinoma de mama até o momento.

O *premature ovarian failure 1B* (POF1) é um gene que está localizado no cromossomo Xq21.2. Há alguns estudos tentando relacionar o POF1 e a presença de falência clínica ovariana precoce, porém essa relação ainda não está clara (Bione & Toniolo, 2000).

O *likely ortholog of rat vacuole membrane protein 1* (VMP1) está localizado no cromossomo 17q23.2 (www.fatigo.org), não tendo função biológica alguma descrita em mamíferos.

O FAD104 (*factor for adipocyte differentiation-104*) pode ser também chamado de *fibronectin type III domain containing 3B* (FND3B). Sua localização cromossômica é 3q26.31 (www.fatigo.org). Pouco há sobre esse gene na literatura, observando apenas sua expressão aumentada na fase inicial da adipogênese (Tominaga *et al.*, 2004). Está envolvido com a atividade de transmissão de sinal e apresenta certa atividade como receptor (www.godatabase.org). O TAM aumentou a expressão desse gene em +2,46 vezes (Tabela 1) em relação ao controle, sugerindo que essa modulação possa estar acontecendo via ER de membrana.

Sobre a Proteína FLJ20073, apenas sabe-se que é originada de um gene localizado no cromossomo 7q21.2 (www.fatigo.org). Trata-se do gene SAMD9

(*sterile alpha motif domain containing 9*), o qual tem a função molecular de ligação entre sites específicos ou entre outras moléculas (www.godatabase.org) .

Portanto, a partir da análise dos resultados, que evidenciaram esses oito genes, os quais foram estimulados por E2 e também por T3, porém não inibidos por TAM, especula-se que esses hormônios estejam modulando suas respostas por alguma via não genômica.

7.2. Gene diferencialmente expresso na célula MDA-MB-231

Seguindo os critérios estatísticos de $fold > 2$ e $pFDR < 0,05$, houve apenas o gene SOX-17, o qual foi tanto diferencialmente expresso após o tratamento com T3 quanto após o com E2 nas células MDA-MB-231.

A família de gene SOX representa um grupo de fatores transcricionais envolvidos em processos de desenvolvimento embrionário e diferenciação sexual em vertebrados. As proteínas – SOX são caracterizadas por um domínio conservado, chamado *high mobility group* (HMG), o qual é responsável pela ligação ao DNA (Hett & Ludwig, 2005).

SOX17 alfa e beta têm relação com a modulação negativa da via de sinalização WNT- β catenin-TCF. A proteína SOX17 é constituída de 414 aminoácidos como *box-HMG* homólogo ao da SOX18 e 7. O gene SOX17 tem 2 exons e está localizado na região cromossômica 8q12q13.

O RNAm do SOX17 tem tamanho de 2,5 ou 2,2 kb; o qual foi detectado em humanos no coração, pulmão, baço, nos testículos, ovários, na placenta, no pulmão fetal e nos rins. No tecido gastrointestinal normal, o RNAm foi expresso preferencialmente no esôfago, estômago e intestino delgado. Não foi detectado em várias linhagens celulares de câncer humano e em nenhum tumor primário de vários tecidos analisados (Kato, 2002).

Não há na literatura descrição de que fosse expresso em células S30 e também não há descrição de modulação desse gene por E2 ou T3. Também não é um gene relacionado à carcinogênese, até o momento.

7.3. Gene diferencialmente expresso na célula S30

Seguindo os critérios estatísticos de $\text{fold} > 2$ e $\text{pFDR} < 0,05$, houve apenas o gene do citocromo P450 (família 1, subfamília B, polipeptídeo 1) – CYP1B1, também chamado estrogênio4-hidroxilase, o qual foi tanto diferencialmente expresso após o tratamento com T3 quanto após o com E2 nas células S30.

Esse gene codifica um membro das enzimas que faz parte da família do citocromo P450. As proteínas do citocromo P450 são mono-oxigenases, as quais catalizam reações envolvidas no metabolismo de drogas e na síntese de esteróides, colesterol e outros lipídios. Esse gene está locado na região cromossômica 2p21. Sua enzima se localiza no retículo endoplasmático e metaboliza pró-carcinogênicos (tal como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos) e o E2 (www.fatigo.org).

Sabe-se que o E2 é um fator de risco para o CaM. Talvez o início desse câncer possa ocorrer quando o metabolismo do E2 gera estrogênio-3,4-quinonas catecol em níveis elevados, o qual pode reagir com o DNA induzindo mutações. As enzimas-chaves para o metabolismo do E2 são a citocromo P450 19 (CYP19 = aromatase), a qual converte o andrógeno em E2; e a CYP1B1, a qual converte o E2 principalmente em estrogênio-4-catecol, os quais podem ser oxidados a estrogênio-3,4-quinonas catecol. A formação de quinonas é impedida através da metilação do estrogênio-4-catecol, pela enzima catecol-O-metiltransferase (COMT). Em adição, os estrogênios-quinonas-catecol podem ser reduzidos novamente a estrogênios-catecol pela oxidoreductase quinona 1 NADPH (NQO1) e/ou ser acoplado à glutationa, prevenindo a reação com o DNA. Em CaM, já foi descrito o aumento da expressão da CYP19 e da CYP1B1, além da diminuição da expressão da COMT e NQO1 (Singh et al, 2005).

Oyama *et al.* (2005) analisaram 34 tumores de CaM de pacientes japonesas através de imunistoquímica e encontraram positividade de 82,4% de CYP1B1.

Os polimorfismos genéticos da CYP1B1 relacionam-se ao risco de câncer de mama. Os alelos comuns do gene CYP1B1 são Arg (79,97%) no códon 48 (Arg48Gly); Ala (80,53%) no códon 119 (Ala119Ser) e Leu (86,57%) no códon 432 (Val432Leu) (Wen *et al.*, 2005). Zimarina et al (2004) observaram esse risco aumentado nas pacientes que possuíam os polimorfismos Arg48 e Ala119, porém

não com o Val432. Houve aumento de risco também para câncer de endométrio nesses polimorfismos, assim como para aqueles que possuíam Val432. Já Wen *et al.* (2005) não encontraram relação entre o risco de câncer de mama e a presença desses polimorfismos. Observaram apenas que as pacientes que carregavam uma cópia dos alelos de CYP1B1 Arg48 ou Ala119 tinham menor chance de serem ER+.

Não há, até o momento, descrição da modulação positiva do gene CYP1B1 por E2 e T3 em células S30, como verificado neste trabalho.

8. Conclusões

1. Levando-se em consideração apenas o teste T *Student* com $p < 0,05$, muitos genes foram modulados igualmente por E2 e por T3 em células de CaM MCF-7, MDA-MB-231 e S30.
2. Considerando, além do teste T *Student* com $p < 0,05$; também $fold > 2,0$ e $pFDR < 0,05$, foram obtidos oito genes diferencialmente expressos, tanto por E2 quanto por T3 em células MCF-7, sendo eles: *Amphiregulin* (schwannoma-derived growth factor) (AR); *fibulin 1* (FBLN1); *claudin 6* (CLDN6), *pericentriolar material 1* (PCM1), *premature ovarian failure 1B* (POF1B), *factor for adipocyte differentiation-104* (FAD 104), *sterile alpha motif domain containing 9* (SAMD9), *likely ortholog of rat vacuole membrane protein 1* (VMP1). Desdes genes, apenas a AR, a CLDN6 e o FAD104 tiveram modulação positiva pelo TAM comparado ao controle. Quando adicionado TAM aos tratamentos (tanto E2+TAM, quanto T3+TAM) não houve diferença na modulação determinada pelos hormônios.
3. O gene SOX17 foi regulado positivamente tanto por E2 quanto por T3 (com $p < 0,05$, $fold > 2,0$ e $pFDR < 0,05$) em células MDA-MB-231. Não sofrendo influência quando adicionado TAM aos hormônios ou pelo TAM sozinho.
4. A expressão do gene citocromo P450 (família 1, subfamília B, polipeptídeo 1) – CYP1B1 foi influenciada positivamente, tanto por E2 quanto por T3 (com $p < 0,05$, $fold > 2,0$ e $pFDR < 0,05$) nas células S30. Não sofrendo influência quando adicionado TAM aos hormônios ou pelo TAM sozinho.

9. Bibliografia

- ACCONCIA F, AXCENZI P, BOCEDI A, SPISNI E, TOMASI V, TRENTALANCE A, VISCA P, MARINO M. Palmitoylation-dependent estrogen receptor α membrane localization: regulation by 17 β -estradiol. *Mol Biol Cell* 16:231-7, 2005.
- ADAMOPOULOS, D.A., VASSILAROS, S., KAPOLLA, PAPADIAMANTIS, J., GEORGIAKODIS, F., MICHALADIS, A. Thyroid disease in patients with benign and malignant mastopathy. *Cancer*, 57:125-8, 1986.
- ARGRAVES WS, DICKERSON K, BURGESS WH, RUOSLAHTI E. Fibulin, a novel protein that interacts with the fibronectin receptor beta subunit cytoplasmic domain. *Cell* 58(4):623-9, 1989
- ALTUCCI L, ADDEO R, CICTIELLO L, et al. 17 beta-estradiol induces cyclin D1 gene transcription, P36D1-p34cdk4 complex activation and p105Rb phosphorylation during mitogenic stimulation of G(1)-arrested human breast cancer cell. *Oncogene* 12:2315-24, 1996.
- AMERO, S.A., KRETSINGER, R.H., MONCRIEF, N.D., YAMAMOTO, K.R., PEARSON, W.R. The origin of nuclear receptor proteins: A single precursor distinct from other transcription factors. *Mol. Endocrinol.*, 6: 3-7, 1992.
- ANDERSON R, PASTAN I, CHENG S. Characterization of the 3,3',5-triiodo-L-thyronine-binding site on plasma membranes from human placenta. *Endocrinology* 116: 2621-30, 1985.
- ANZICK SL, KONONEN J, WALKER RL, AZORSA DO, TANNER MM, GUAN XY SAUTER G, KALLIONIEMI OP, TRENT JM, MELTZER OS. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 277:965-8, 1997.
- ARMELIN, A.A. O papel dos hormônios e fatores de crescimento no controle da proliferação celular em mamíferos. *Anais do simpósio sobre cultura de células. Academia de Ciência do Estado de São Paulo*: 41-4, 1978.
- AUMAIS JP, LEE HS, DEGANNES C, HORSFORD J, WHITE JH. Function of directly repeated half-sites as response elements for steroid hormone receptors. *J Biol Chem* 271:12568-77, 1996.
- BALASENTHIL S, VADLAMUDI RK. Functional interactions between the estrogen receptor coactivator PELP1/MNAR and retinoblastoma protein. *J Biol Chem* 278:22119-27, 2003.
- BARRA GB, VELASCO LFR, PESSANHA RP, CAMPOS AM, MOURA FN, DIAS AMG, POLIKARPOV I, RIBEIRO RCJ, SIMEONI LA, NEVES FAR. Mecanismo

- Molecular da Ação do Hormônio Tireoideano. *Arq Bras Endocrinol Metab* 48(1):25-39, 2004.
- BARKHEM, T., CARLSSON, B., SIMONS, J., MOLLER, B., BERKENSTAM, A., GUSTAFSSON, J.A., NILSON, S. High level expression of functional full length human thyroid hormone receptor beta 1 in insect cells using a recombinant baculovirus. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 38: 667-75, 1991.
- BARRERA-HERNANDEZ, G., ZHAN, Q., WONG, R., CHEN, S.Y. Thyroid hormone receptor is a negative regulator in p53-mediated signaling pathways. *DNA Cell Biol.* 17: 743-50, 1998.
- BASSETT JH, HARVEY CB, WILLIAMS GR. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Mol Cell Endocrinol* 213(1):1-11, 2003.
- BAUMANN CT, MARUVADA P, HAGER GL, YEN PM. Nuclear cytoplasmic shuttling by thyroid hormone receptors. Multiple protein interactions are required for nuclear retention. *J Biol Chem* 276(14):11237-45, 2001.
- BEATSON GT. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mama: suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. *Lancet* ii:104-7, 1896.
- BERGH JJ, LIN HY, LANSING L, MOHAMED SN, DAVIS FB, MOUSA S, DAVIS PJ. Integrin alpha Vbeta3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology* 146(7):2861-3, 2005.
- BIONE S, TONIOLO D. X chromosome genes and premature ovarian failure. *Semin Reprod Med* 18(1):51-7, 2000.
- BRENTANI RB, CARRARO DM, VERJOVSKI-ALMEIDA S, REIS EM, NEVES EJ, SOUZA SJ, CARVALHO AF, BRENTANI H, REIS LFL. Gene Expression arrays in câncer research: methods and applications. *Crit Rev Oncol Hemat* 54:95-105, 2005.
- BOGARDUS, G.M., FINLEY, J.W. Breast cancer and thyroid disease. *Surgery* 49: 461- 8, 1961.
- BORELLINI, F., OKA, T. Growth control and differentiation in mammary epithelial cells. *Environ. Health Perspect.* 80: 85-99, 1989.

- BROOKE JS, CHA JH, EIDELS L. Latent transforming growth factor β -binding protein-3 and fibulin-1C interact with the extracellular domain of the heparin-binding EGF-like growth factor precursor. *BMC Cell Biol* 3:2, 2002.
- BROOKS, SC, LOCKE, ER, SOULE, HD. Estrogen Receptor in a Human Cell Line (MCF-7) from Breast Carcinoma. *The Journal of Biological Chemistry* 248(17): 6251-53, 1973.
- BURKE, R.E., MCGUIRE, W.L. Nuclear thyroid hormone receptors in a human breast cancer cell line. *Cancer Res.* 48: 3769-73, 1978.
- CAO X, KAMBE F, MOELLER LC, REFETOFF S, SEO H. Thyroid hormone induces rapid activation of Akt/protein kinaseB-mammalian target of rapamycin-p70S6K cascade through phosphatidylinositol 3-kinase in human fibroblasts. *Mol Endocrinol* 19(1):102-12, 2005.
- CAPELLI L & MARGOTINI M. Thyroid function in breast cancer. *Acta Un Int Cancer* 20: 1493-6, 1964.
- CASTORIA G, MIGLIACCIO A, BILANCIO A, DOMENICO MD, FALCO A, LOMBARDI M, FIORENTINO R, VARRICHIO L, BARONE MV, AURICCHIO F. PL3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *EMBO J* 20:6050-9, 2001
- CERBON, M.A., PICHON, M.F., MILGROM, E. Thyroid hormone receptors in human breast cancer. *Cancer Res.* 41: 4167-73, 1981.
- CHABAN VV, LAKHTER AJ, MICEVYCH P. A membrane estrogen receptor mediates intracellular calcium release in astrocytes. *Endocrinol* 145: 3788-95, 2004.
- CHAMBLISS KL, YUHANN IS, ANDERSON RG, MENDELSON ME, SHAUL PW. ER β has nongenomic action in caveolae. *Mol Endocrinol* 16:938-46, 2002.
- CHEN, H., EVANS, R.M. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* .377: 454-7, 1995.
- CHEN H, LIN RJ, SCHILTZ RL, CHAKRAVARTI D, NASH A, NAGY L, PRIVALSKY ML, NADATANI Y, EVANS RM. Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* 90:569-80, 1997.
- CHEN D, HUANG SM, STALLCUP MR. Synergistic p160 coactivator-dependent enhancement of estrogen receptor function by CARM-1 and p300. *J Biol Chem* 275:40810-6, 2000.

- CHENG S-Y. Multiple mechanisms for regulation of the transcriptional activity of thyroid hormone receptors. *Rev End Metab Dis* 1:9-18, 2000.
- CHEUNG VG, MARLEY M, AGUILAR F, MASSIMI A, KUCHERLAPATI R, CHILDS G. Making and reading microarrays. *Nat. Genet.* 21:15-9, 1999.
- CIARDIELLO F, TORTORA G. Interactions between the epidermal growth factor receptor and type I protein kinase A: biological significance and therapeutic implications. *Clin Cancer Res.* 4(4):821-8, 1998.
- CLINTON GM, ROUGEOT C, DERANCOURT J, ROGER P, DEFRENNE A, GODYNA S, ARGRAVES WX, ROCHEFORT H. Estrogen increase the expression of fibulin-1, a extracelular matrix protein secreted by humam ovarian cancer cells.. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:316-20, 1996.
- COOK PW, MATTOX PA, KEEBLE WW, PITTELKOW MR, PLOWMAN GD, SHOYAB M, ADELMAN JP, SHIPLEY GD. A heparin sulfate-regulated human keratinocyte autocrine growth factor is similar or identical to amphiregulin. *Mol Cell Biol* 11: 2547-57, 1991.
- COUSE JF, LINDZEY J, GRANDIEN K, GUSTAFSSON J, DORCH KS. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor - α (ER α) e estrogen receptor - β (ER β) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER α -knockout mouse. *Endocrinology* 138: 4613-21, 1997.
- COUSE JF AND KORACH KS. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us. *Endocr Rev* 20:358-417, 1999.
- CRISTOFONILLI M, YAMAMURA Y, KAU SW, BEVERS T, STROM S, PATANGAN M, HSU L, KRISHNAMURTHY S, THERIAULT RL, HORTOBAGYI GN. Thyroid hormone and breast carcinoma. Primary hypothyroidism is associated with a reduced incidence of primary breast carcinoma. *Cancer* 103(6):1122-8, 2005.
- DAVIS PJ, SHIH A, LIN HY, MARTINO LJ, DAVIS FB. Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR. *J Biol Chem* 275(48):38032-9, 2000.
- DAVIS PJ, TILLMANN HC, DAVIR FB, WEHLING M. Comparison of the mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone and steroid hormones. *J Endocrinol Invest* 25(4):377-88, 2002.
- DAVIS PJ, FAITH BD, CODY V. Membrane receptors mediating thyroid hormone action. *TRENDS in Endocr Metab* 16(9):429-35, 2005

- DESRUISSEAU S, PALMARI J, GIUSTI C, ROMAIN S, MARTIN PM, BERTHOISY. Clinical relevance of amphiregulin and VEGF in primary breast cancers. *Int J Cancer* 111(5):733-40, 2004.
- DiRENZO J, SHANG Y, PHELAN M, SIF S, MYERS M, KINGSTON R, BROWN M. BRG-1 is recruited to estrogen-responsive promoters and cooperates with factors involved in histone acetylation. *Mol Cell Biol* 20:7541-9, 2000.
- DONG L, WANG W, WANG F, SONER M, REED JC, HARIGAI M, SAMUDIO I, KLADDE MP, VYHLIDAL C, SAFE S. Mechanisms of transcriptional activation of bcl-2 gene expression by 17 beta-estradiol in breast cancer cell. *J Biol Chem* 274:32099-107, 1999.
- DUGGAN DJ, BITTNER M, CHEN Y, MELTZER P, TRENT JM. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat. Genet.* 21(S1):10-4, 1999.
- EDWARDS, D.P., CHAMNESS, G.C., MCGUIRE, W.L. Estrogen and progesterone receptors proteins in breast cancer. *Biochem. Biophys. Acta*, 560: 457-86, 1979.
- ENMARK E, PELTO-HUIKKO M, GRANDIEN K, LAGERCRANTZ S, LAGERCRANTZ J, FRIED G, NORDENSKJÖLD M, GUSTAFSSON JA. Human estrogen receptor β - gene structure, chromosomal localization, expression pattern. *J. Clin. Endocr. Metab.* 82: 4258-65, 1997.
- ENMARK E, GUSTAFSSON JA. Oestrogen receptors – an overview. *J Int Med* 246:133-8. 1999.
- EVANS, R.M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889-95, 1988.
- FENG X, JIANG Y, MELTZER P, YEN PM. Thyroid Hormone Regulation of hepatic genes *in vivo* detected by complementary DNA microarray. *Mol Endocr* 14(7)947-61, 2000.
- FIGTREE GA, McDONALD D, WATKINS H, CHANNON KM. Truncated estrogen receptor alpha 46-kDa isoform in human endothelial cells: Relationship to acute activation of nitric oxide synthase. *Circulation* 107:120-6, 2003.
- FOLGUEIRA MAAK, CARRARO DM, BRENTANI H, PATRÃO DFC, BARBOSA EM, MOURÃO NETTO M, CALDEIRA JRF, KATAYAMA MLH, SOARES FA, OLIVEIRA CT, REIS LFL, KAIANO JHL, CAMARGO LP, VÊNICO RZN, SHITCOVSKY IML, MAKDISSI FBA, SILVA PJS, GÓES JCGS, BRENTANI MM. Gene Expression profile associated with response to doxorubicin-based therapy in breast cancer.

- FUQUA, S.A., CHAMNESS, G.C., MCGUIRE, W.L. Estrogen receptor mutations in breast cancer. *J. Cell Biochem.* 51: 135-9, 1993.
- FURUSE M, FUJITA K, HIIRAGI, T, FUJIMOTO K, TSUKITA S. Claudin-1 and 2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occluding. *J. Cell. Biol.* 141:1539-50, 1998.
- GEUM D, SUN W, PAIK SK, LEE CC, KIM K. Estrogen-induced cyclin D1 and D3 gene expressions during mouse uterine cell proliferation in vivo: Differential induction mechanism of cyclin D1 and D3. *Mol Reprod Dev* 46:450-8, 1997.
- GIANI, C., FIERABRACCI, P., BONACCI, R., GIGLIOTTI, A., CAMPANI, D., NEGRI, F., CECCHETTI, D., MARTINO, E., PINCHERA, A. Relationship between breast cancer and thyroid disease: Relevance of autoimmune thyroid disorders in breast malignancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81: 1996.
- GIGUERE A, LEHOUX JG, GALLO-PAYET N, BELLABARBA D. 3,5,3'-Triiodothyronine binding sites in synaptosomes from brain of chick embryo. Properties and ontogeny. *Brain Res* 66:221-7, 1992.
- GIUSTI C, DESRUISSEAU S, MA L, CALVO F, MARTIN PM, BERTHOIS Y. Transforming growth factor beta-1 and amphiregulin act in synergy to increase the production of urokinase-type plasminogen activator in transformed breast epithelial cells. *Int J Cancer* 105(6):769-78, 2003.
- GLASS CK, HOLLOWAY JM, DEVARY PV, ROSENFELD MG. The thyroid hormone receptor binds with opposite transcriptional effects to a common sequence motif in thyroid hormone and estrogen response elements. *Cell* 54:313-23, 1988.
- GLASS CK. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev* 15: 391-407, 1994.
- GLASS CK, ROSENFELD MG. The co-regulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptor. *Genes Dev* 14:121-41, 2000.
- GOLDMAN MB. Thyroid diseases and breast cancer. *Epidemiology Rev* 12:28-30, 1990.
- GREEN S, WALTER P, GREENE G, KRUST A, GOFFIN C, JENSEN E, SCRACE G, WATERFIELD M, CHAMBON P. Cloning of the human oestrogen receptor cDNA. *J Steroid Biochem* 24:77-83, 1986.
- GREENE LM, TWAL WO, DUFFY MJ, McDERMOTT EW, HILL AD, O'HIGGINS NJ, McCANN AH, DEVAN PA, ARGRAVES WX, GALLAGHER WM. Elevated

- expression and altered processing of fibulin-1 protein in human breast cancer cells induced by fibronectin. *Int J Cancer* 88:971-8, 2003.
- GUSTAFSSON JA. Estrogen receptor beta: a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol* 163:379-83, 1999.
- HALL JM, COUSE JF, KORACH KS. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem* 276:36869-72, 2001.
- HABEL, L.A., STANFORD, J.L. Hormone receptors and breast cancer. *Epidemiol. Rev.*15: 209-19, 1993.
- HAYASHIDO Y, LUCAS A, ROUGEOT C, GODYNA S, ARGRAVES WS, TOCHEFOR H. Estradiol and fibulin-1 inhibit a motility of human ovarian and breast cancer cells induced by fibronectin. *Int J Cancer* 75:654-8, 1998.
- HAYDEN, T.S., FORSYTH, I.A. Thyroid hormone binding in rat mammary glands. *J. Endocrinol.* 75: 38-9, 1977.
- HEDLEY AH, SPIEGELHALTER DJ, JONE SJ. Breast cancer in thyroid disease: fact or fallacy? *Lancet* I, 131-2, 1981.
- HEERY DM, KALKHOVEN E, HOARE S, PARKER MG. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptor. *Nature* 387:733-6, 1997.
- HERCBERGS AA, GOYAL LK, SUH JH, LEE S, REDDY CA, COHEN BH, STEVENS GH, REDDY SK, PEEREBOOM DM, ELSON PJ, GUPTA MK, BARNETT GH. Propylthiouracil-induced chemical hypothyroidism with high-dose tamoxifen prolongs survival in recurrent high grade glioma: a phase/II study. *Anticancer Res* 23(1B):617-26, 2003.
- HETT AK, LUDWIG A. SRY-related (Sox) genes in the genome of European Atlantic sturgeon (*Acipenser sturio*). *Genome* 48(2):181-6, 2005.
- HO KJ, LIAO JK. Nonnuclear actions of estrogen. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1952-61, 2002.
- HONG H, KOHLI K, GARABEDIAN MJ, STALLCUP M. GRIP1, a transcriptional coactivator for the AF-2 transactivation domain of steroid, thyroid, retinoid and vitamin d receptors. *Mol Cell Biol* 17:2735-44, 1997.
- HOPKINS RL. Thyroid hormone activates MAPK in glial cells and induces cell proliferation. Annual Meeting of the American Thyroid Association, Vancouver, BC, Canada, October 2, 2004, Abstract 224.

- HORLEIN, A.J., NAAR, A.M., HEINZEL, T., TORCHIA, J., GLOSS, B., KUROKAWA, R., RYAN, A., KAMEI, Y., SÖDERSTRÖM, M., GLASS, C.K. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* .377: 397-404, 1995.
- HUANG HJ, NORRIS JD, McDONNELL DP. Identification of a negative regulatory surface within estrogen receptor α provides evidence in support of a role for corepressors in regulating cellular responses to agonists and antagonists. *Mol Endocrinol* 16:1778-92, 2002.
- ITOH, K and MARUCHI, N. Breast cancer in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Lancet* 2:1119-21, 1975.
- JAKACKA M, ITO M, MARTINSO F, ISHIKAWA T, LEE EJ, JAMESON JL. An estrogen receptor ER α deoxyribonucleic acid-binding domain knock-in mutation provides evidence for nonclassical ER pathway signaling *in vivo*. *Mol Endocrinol* 16:2188-201, 2002.
- JENSEN EV, JACOBSON HI. Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Prog Horm Res* 18:387-414, 1962.
- JENSEN, E.V., CHENG, G., PALMIERI, C., SAJI, S., MÄKELÄ, S., NOORDEN, S.V., WAHLSTRÖM, T., WARNER, M., COOMBES, R.C., GUSTAFSSON, J. Estrogen receptors and proliferation markers in primary and recurrent breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 15197-202, 2001.
- JIANG SY, JORDAN VG. Growth regulation of estrogen receptor-negative breast cancer cells transfected with complementary DNAs for estrogen receptor. *J Natl Cancer Inst* 84:580-91, 1992.
- JONES JL, SHAW JA, PRINGLE JH, WALKER RA. Primary breast myoepithelial cells exert an invasion-suppressor effect on breast cancer cells via paracrine down-regulation of MMP expression in fibroblasts and tumour cells. *J. Pathol.* 201(4):562-72, 2003.
- JOHANSSON L, THOMSEN JS, DAMDIMOPOULOS AE, SPYROU G, GUSTAFSSON JA, TREUTER E. The orphan nuclear receptor SHP inhibits agonist-dependent transcriptional activity of estrogen receptors ER α and ER β . *J Biol Chem* 274:345-53, 1999.
- JOHNSON GR, SAEKI T, AUERSPERG N, GORDON AW, SHOYAB M, SALOMON DS, STROMBERG K. Response to and expression of amphiregulin by ovarian

- carcinoma and normal ovarian surface epithelial cells: nuclear localization of endogenous amphiregulin. *Biochem Biophys Res Commun* 180:481-8, 1991.
- JOHNSON GR, SAEKI T, GORDON AW, SHOYAB M, SALOMON DS, STROMBERG K. Autocrine action of amphiregulin in a colon carcinoma cell line and immunocytochemical localization of amphiregulin in human colon. *J Cell Biol* 118:741-51, 1992.
- KAHLERT S, NUEDING S, VAN EICKELS M, VETTER H, MEYER R, GROHÉ C. Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *J Biol Chem* 275:18447-53, 2000.
- KAPDY, C.C., WOLFE, J.N. Breast cancer. Relationship to thyroid supplements for hypothyroidism. *JAMA* 236: 1124-7, 1976.
- KATOH M. Molecular cloning and characterization of human SOX17. *Int J Mol Med* 9(2):153-7, 2002.
- KELLY MJ, LEVIN ER. Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab* 12:152-6, 2001.
- KENNEY NJ, SMITH GH, MAROULAKOU IG, GREEN JH, MULLER WJ, CALLAHAN, SALOMON DS, DICKSON RB. Detection of amphiregulin and Cripto-1 in mammary tumors from transgenic mice. *Mol Carcinog* 15(1):44-56, 1996.
- KINGSTON RE, NARLIKAR GJ. ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev* 13:2339-52, 1999.
- KLINGE CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res* 29:2905-19, 2001.
- KOMINSKY SL, ARGANI P, KORZ D, EVRON E, RAMAN V, GARRET E, REIN A, SAUTER G, KALLIONIEMI OP, SUKUMAR S. Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene* 22(13): 2021-33, 2003.
- KONDAPAKA SB, FRIDMAN R, REDDY KB. Epidermal growth factor and amphiregulin up-regulate matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human breast cancer cells. *Int J Cancer* 70(6):722-6, 1997.
- KREGG JH, HODGEIN JB, COUSE JF, ENMARK E, WARNER M, MAHLER JF, SAR M, KORACH KS, GUSTAFSSON J SMITHIES O. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor β . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:15677-82, 1998.

- KUIPER GC, ENMARK E, PELTO-HUIKKO M, NILSSON S, GUSTAFSSON JA. Cloning a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5925-30, 1996.
- KUIPER GGJM, CARLSSON B, GRANDIEN K, ENMARK E, HAGGBLAD J, NILSSON S, GUSTAFSSON JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138:863-70, 1997.
- KUMAR R, WANG RA, MAZUMDAR A, TALUKDER AH, MANDAL M, YANG Z, BAGHETI-YARMAND R, SAHIN A, HORTOBAGVI G, ADAM L, BARNES CJ, VADLAMUDI RK. A naturally occurring MTA1 variant sequesters oestrogen receptor-alpha in the cytoplasm. *Nature* 418:654-7, 2002.
- KUSHENER PJ, AGARD DA, GREENE GL, SCANLAN TS, SCHIAU AK, UHT RM, WEBB P. Estrogen receptor pathways to AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74:311-7, 2000a.
- KUSHENER PJ, AGARD DA, FENG WJ, LOPEZ G, SCHIAU AK, UHT RM, WEBB P, GREENE G. Oestrogen receptor function at classical and alternative response elements. *Novartis Found Symp* 230:20-6; discussion 27-40, 2000b.
- LACROIX, M., QUERTON, G., HENNEBERT, P., LARSIMONT, D., LECLERCQ, G. Estrogen receptor analysis in primary breast tumors by lint assay, immunocytochemical assay, and northern blot. *Breast Cancer Res. Treat.* 67: 263-71, 2001.
- LAURITSEN KJ, LIST HJ, REITER R, WELLSTEIN A, RIEGEL AT. A role for TGF- β in estrogen and retinoid mediated regulation of nuclear receptor coactivator AIB1 in MCF-7 breast cancer cell. *Oncogene* 21:7147-55, 2002.
- LAZAR, M.A. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr. Rev.* 14: 184-93, 1993.
- LEI J, MARIASH CN, INGBAR DH. 3,3',5-Triiodo-L-thyronine up-regulation of Na,K-ATPase activity and cell surface expression in alveolar epithelial cells is Src kinase- and phosphoinositide 3-kinase-dependent. *J Biol Chem* 279(46):47589-600, 2004.
- LeJEUNE S, LEEK R, HORAK E, PLOWMAN G, GREENALL M, HARRIS AL. Amphiregulin, epidermal growth factor receptor, and estrogen receptor expression in human primary breast cancer. *Cancer Res* 53(15):3597-602, 1993.

- LEMAIRE M, BAUGNET-MAHIEU L. Thyroid function in women with breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 22: 301-7, 1986.
- LEVIN ER. Cell localization, physiology and nongenomic actions of estrogen receptors. *J Appl Physiol* 91:1860-7, 2001.
- LEVIN ER. Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. *Steroids* 67:471-5, 2002.
- LEVIN ER. Bidirectional signaling between the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor. *Mol Endocrinol* 17:309-17, 2003.
- LEVIN ER. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol* 19 (8):1951-9, 2005.
- LI D, DESAI-YAJNIK V, LO E, SCHAPIRA M, ABAGYAN R, SAMUELS HH. NRIF3 is a novel co-activator mediating functional specificity of nuclear hormone receptors. *Mol Cell Biol* 19:7191-202, 1999.
- LI H, GOMES PJ, CHEN JD. RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:8479-84, 1997.
- LI L, HAYNES MP, BENDER JR. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:4807-12, 2003.
- LI, Q.L., JANSEN, E., BRENT, G.A., NAQUI, S., WILBER, J.F., FRIEDMAN, T.C. Interactions between the prohormone convertase 2 promoter and thyroid hormone receptor. *Endocrinology* 141: 3256-66, 2000.
- LIN HY, MARTINO LJ, WILCOX BD, DAVIS FB, GORDINIER JK, DAVIS PJ. Potentiation by thyroid hormone of human IFN-gamma-induced HLA-DR expression. *J Immunol* 161(2):843-9, 1998.
- LIN HY, DAVIS FB, GORDINIER JK, MARTINO LJ, DAVIS PJ. Thyroid hormone induces activation of mitogen-activated protein kinase in cultured cells. *Am J Physiol* 276(5Pt1):C1014-24, 1999.
- LINGLE WL, SALISBURY JL. Altered centrosome structure is associated with abnormal mitoses in human breast tumors. *Am J Pathol* 155:1941-51, 1999.
- LIU Y, LUDES-MEYERS J, ZHANG Y, MUNOZ-MEDELLIN D, KIM, HT, LU C, GE G, SCHIFF R, HILSENBECK SG, OSBORNE CK, BROWN PH. Inhibition of AP-1 transcription factor causes of multiple signal transduction pathways and inhibits breast cancer growth. *Oncogene* 21:7680-9, 2002.

- LÖSEL RM, FALKENSTEIN E, FEURING M, SCHULTZ A, TILLMANN JC, ROSSOL-HASEROTH, WEHLING M. Nongenomic steroid action: Controversies, questions and answers. *Physiol Rev* 83:965-1016, 2003.
- LUBAHN DB, MOYER JS, GOLDING TS, COUSE JF, KORACH KS, SMITHIES O. Alternation of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11162-6, 1993.
- MA L, GAUVILLE C, BERTHOIS Y, DEGEORGES A, MILLOT G, MARTIN PM, CALVO F. Role of epidermal-growth-factor receptor in tumor progression in transformed human mammary epithelial cells. *Int J Cancer* 78(1):112-9, 1998.
- MA L, GAUVILLE C, BERTHOIS Y, MILLOT G, JOHNSON GR, CALVO F. Antisense expression for amphiregulin suppresses tumorigenicity of a transformed human breast epithelial cell line. *Oncogene* 18(47):6513-20, 1999.
- MADARA JL. Regulation of the movement of solutes across tight junctions. *Annu. Rev. Physiol.* 60: 143-159, 1998.
- MAKOWSKI A, BRZOSTEK S, CHOHEN RN, HOLLENBERG AN. Determination of nuclear receptor co-repressor interactions with the thyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol* 17:273-86, 2003.
- MANGELSDORF, D.J. Vitamina A receptors. *Nutr Rev* 52: S32-44, 1994.
- MANGELSDORF, D.J., THUMMEL, C., BEATO, M., HERLICH, P., SCHUTZ, G., UMESONO, K., BLUMBERG B., KASTNER, P., MARK, M., CHAMBOM, P. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835-9, 1995.
- MANGELSDORF, D.J, EVANS RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83: 841-50, 1995.
- MARINO M, ACCONCIA F, BRESCIANI F, WEISZ A, TRENTALANCE A. Distinct non-genomic signal transduction pathways controlled by 17 β -estradiol regulate DNA synthesis and cyclin D1 gene transcription in HepG2 cells. *Mol Biol Cell* 13:3720-9, 2002.
- MARTINEZ-LACACI I, SACEDA M, PLOWMAN GD, JOHNSON GR, NORMANNO N, SALOMON DS, DICKSON RB. Estrogen and phorbol esters regulate amphiregulin expression by two separate mechanisms in human breast cancer cell lines. *Endocrinology* 136(9):3983-92, 1995.
- McEWEN BS. The molecular and neuroanatomical basis for estrogen effects in the central nervous system. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84:1790-7, 1999.

- MCGUIRE, W.L., CHAMNESS, C.G., COSTLOW, M.E., SHEPHERD, R.E. Hormone dependence in breast cancer. *Metabolism* 23: 75-100, 1974.
- McKENNA NJ, LANZ RB, O'MALLEY BW. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20:321-44, 1999.
- McKENNA NJ, O'MALLEY BW. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and co-regulators. *Cell* 108: 465-74, 2002.
- MENASHI S, SEROVA M, MA L, VIGNOT S, MOURAH S, CALVO F. Regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer and matrix metalloproteinase expression by amphiregulin in transformed human breast epithelial cells. *Cancer Res* 63(22):7575-80, 2003.
- MEITES, J., KRAFT, C.L. Effect of pituitary homotransplant and thyroxine on body and mammary growth in immature hypophysectomized rats. *Endocrinology* 75: 565-70, 1964.
- MENDENSOHN ME & KARAS RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N. Engl. J. Med* 340:1801-11, 1999.
- MIGLIACCIO A, DI DOMENICO M, CASTORIA G, DE FALCO A, BONTEMPO P, NOLA E, AURICCHIO F. Tyrosine kinase/p21ras/MAO-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J* 15:1292-300, 1996.
- MILLER LD, McPHIE P, SUZUKI H, DATO Y, LIU ET CHENG SY. Multi-tissue gene-expression analysis in a mouse model of thyroid hormone resistance. *Genome Biol* 5(5):R31, 2004.
- MISITI S, SCHOMBURG L, UEN PM, CHIN WW. Expression and hormonal regulation of coactivator and corepressor genes. *Endocrinology* 139:2493-500, 1998.
- MITTRA I & HAYWARD JL. Hypothalamic-pituitary-thyroid axis in breast cancer. *Lancet* 1:885-8, 1974.
- MONNI O, BARLUND M, MOUSSES S, KONONEN J, SAUTER F, HEISKANEN M, PAAVOLA P, AVELA K, CHEN Y, BITTNER ML, KALLIONIEMI A. Comprehensive copy number and gene expression profiling of the 17q23 amplicon in human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98(10):5711-6. 2001.
- MONTANO MM, EKENA K, DELAGE-MOURROUX R, CHANG W, MARTINI P, KATZENELLENBOGEN BS. An estrogen receptor-selective coregulator that

- potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6947-52, 1999.
- MOOSSA AR, PRICE EVANS DA, BREWER AC. Thyroid status and breast cancer:reappraisal of an old relationship. *Ann R Coll Surg* 53:178-88, 1973.
- MORITA K, FURUSE M, FUJIMOTO K, TSUKITA S. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc. Natl, Acad. Sci. USA.* 145:579-88, 1999.
- MOSSELMAN S, POLMAN J, DIJKEMA R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392:49-53, 1996.
- MUHLBOCK, O., BOOT, L.M. The mechanism of hormonal carcinogenesis. In: CIBA F. SYMPOSIUM,1959, Boston. *Resumo...* Boston, 1961. p.83-94.
- MUSTACCHI, P., GREENSPAN, F. Thyroid supplementation for hypothyroidism. An iatrogenic cause of breast cancer? *JAMA* 237: 1446-7, 1977.
- NATHANSON KN, WOOSTER R, WEBER BL. Breast cancer genetics: what we know and what we need. *Nat. Med.* 7(5):552-6, 2001.
- NATOLI, C., SICA, G., RANELLETTI, F.O., IACOBELLI, S. Proliferative effects of thyroid hormones on mouse mammary carcinoma cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res* 3: 291-7, 1983.
- NENCI I. Receptor and centriole pathways of steroid action in normal and neoplastic cells. *Cancer Res* 38:4204-11, 1978.
- NEVES FAR, WEBB P, RIBEIRO RCJ, BAXTER, JD. Syndrome of Resistance to glucocorticoid and mineralocorticoid hormones. *Genetics in Endocrinology*, Lippincott Williams & Wilkins 2002.
- NISHER, J.A., SIITERI, P.K. Estrogens and breast cancer. *Clin. Obstet. Gynecol.*24: 301-22, 1981.
- NOGUEIRA, C.R., BRENTANI, M.M. Triiodothyronine mimics the effects of estrogen in breast cancer cell lines. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 59: 271-9, 1996.
- NORMANNO N, CIARDIELLO F, BRANDT R, SALOMON DS. Epidermal growth factor-related peptides in the pathogenesis of human breast cancer. *Breast Cancer Res.* 29 (1):11-27, 1994.
- NORMANNO N, KIM N, WEN D, SMITH K, HARRIS AL, PLOWMAN G, COLLETTA G, CIARDIELLO F, SALOMON DS. Expression of messenger RNA for amphiregulin, heregulin, and cripto-1, three new members of the epidermal

- growth factor family, in human breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 35(3): 293-7, 1995
- NORMANNO N & CIARDIELLO F. EGF-related in the pathophysiology of the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2(2):143-51, 1997.
- OESTERREICH S, ZHANG Q, HOOP T, FUQUA SA, MICHAELIS M, ZHAO HH, DAVIE JR, OSBORNE CK, LEE AV. Tamoxifen-bound estrogen receptor (ER) strongly interacts with the nuclear matrix protein HET/SAF-B, a novel inhibitor of ER-mediated transactivation. *Mol Endocrinol* 14:369-81, 2000.
- OFFNER S, HEKELE A, TEICHMANN U, WEINBERGER S, GROSS S, KUFER P, ITIN C, BAEUERLE PA, KOHLEISEN B. Epithelial tight junction proteins as potential antibody targets for pancarcinoma therapy. *Cancer Immunol Immunother* 54:431-5, 2005.
- OGRYZKO VV, SCHILTZ RL, RUSSANOVA V, HOWARD BH, NAKATANI Y. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87:053-9, 1996.
- OGRYZKO VV, KOTANIT, ZHANG X, SCHILTZ RL, HOWARD T, YANG XJ, HOWARD BH, QIN J, NAKATANI Y. Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex. *Cell* 94:35-44, 1999.
- OHSAWA J, TADAMURA C, KOHSADA S. Fibulin-1 binds the amino-terminal head of β -amyloid precursor protein and modulates its physiological function. *J Neurochem* 76:1411-20, 2001.
- ONATE SA, TASI SY, TSAI MJ, O' MALLEY BW. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270:1354-7, 1995.
- OSBORNE CK, BARDOU V, HOPP TA, *et al.* Role of the estrogen receptor coactivator AIB1(SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 95:352-60, 2003.
- OSBORNE CK, SCHIFF R. Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *J Clin Oncol* 23:1616-22, 2005.
- O'SHEA PJ, WILLIAMS GR. Insight into the physiological actions of thyroid hormone receptors from genetically modified mice. *J Endocrin* 175:553-70, 2002.
- OYAMA T, MORITA M, ISSE T, KAGAWA N, NAKATA S, SO T, MIZUKAMI M, ICHIKI Y, ONO K, SUGAYA M, URAMOTO H, YOSHIMATSU T, HANAQIRI T,

- SUGIO K. Immunohistochemical evaluation of cytochrome P450 (CYP) and p53 in breast cancer. *Front Biosci* 10:1156-61, 2005.
- PANICO L, D'ANTONIO A, SALVATORE G, MEZZA E, TORTORA G, DE LAURENTIIS M, DE PLACIDO S, GIORDANO T, MERINO M, SALOMON DS, MULLICK WJ, PETTINATO G, SCHNITT SJ, BIANCO AR, CIARDIELLO F. Differential immunohistochemical detection of transforming growth factor alpha, amphiregulin and CRIPTO in human normal and malignant breast tissues. *Int. J. Cancer* 65(1):51-6, 1996.
- PENDARIES C, DARBLADE B, ROCHAIX P, KRUST A, CHAMBON P, KORACH KS, BAYARD F, ARNAL JF. The AF-1 activation-function of ER α may be dispensable to mediate the effect of estradiol on endothelial NO production in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:2205-10, 2002.
- PERBAL B, MARTINERIE C, SAINSON R, WERNERM, HE B, ROIZMAN B. The C-terminal domain of the regulatory protein NOVH is sufficient to promote interaction with fibulin 1C: a clue for a role of NOVH in cell-adhesion signaling. *Proc. Natl Acad USA* 96:869-74, 1999.
- PERRY M, GOLDIE DJ, SELF M. Thyroid function in patients with breast cancer. *Ann Roy Coll Surg Eng* 60: 290-3. 1978.
- PIETRAS RJ, SZEGO CM. Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* 265:68-72, 1977.
- PLIAM NB & GOLDFINE ID. High affinity thyroid hormone binding sites on purified rat liver plasma membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 79:166-72, 1977.
- PLOWMAN GD, GREEN JM, MCDONALD VL, NEUBAUER MG, DISTECHE CM, TODARO GJ, SHOYAB M. The amphiregulin gene encodes a novel epidermal growth factor-related protein with tumor inhibitor activity. *Mol Cell Biol* 10:1969-81, 1990.
- QI CF, LISCIA DS, NORMANNO N, JOHNSON GR, GULLICK WJ, CIARDIELLO F, SAEKI T, BRANDT R, KIM N et al. Expression of transforming growth factor alpha, amphiregulin and cripto-1 in human breast carcinoma. *Br J Cancer* 69(5):903-10, 1994.
- QING J, MAHER VM, TRAN H, ARGRAVES WS, DUNSTAN RW, McCormick jj. Suppression of anchorage-independent growth and matrigel invasion and delayed tumor formation by elevated expression of fibulin-1D in human fibrosarcoma-derived cell lines. *Oncogene* 15:2159-68, 1997.

- RASMUSSEN, B., RASMUSSEN, U.F., HEGEDÜS, L., PERRILD, H., KARINE, B., HOIER MADSEN, M. Thyroid function in patients with breast cancer. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 23: 553-6, 1987.
- RASTINEJAD, F., PERLMANN, T., EVANS, R.M., SIGLER, P.B. Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature* 375: 1995.
- RAZANDI M, PEDRAM A, LEVIN ER. Plasma membrane estrogen receptors signal to anti-apoptosis in breast cancer. *Mol Endocrinol* 14:1434-47, 2000.
- RAZANDI M, PEDRAM A, MERCHENTHALER I, GREENE GL, LEVIN ER. Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers. *Mol Endocrinol* 18: 2854-65, 2004.
- REDDY KB, KRUEGER JS, KONDAPAKA SB, DIGLIO CA. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) regulates the expression of progelatinase B (MMP-9) in breast epithelial cells. *Int J Cancer* 82(2): 268-73, 1999.
- RIBEIRO RC, APRILETTI JW, YEN PM, CHIN WW, BAXTER JD. Heterodimerization and deoxyribonucleic acid-binding properties of retinoic X receptor-related factor. *J Biol Chem* 135:2076-85, 1994.
- RIBEIRO RCJ, KUSHNER PJ, BAXTER JD. The nuclear hormone receptor gene superfamily. *Ann Rev Med* 46:443-53, 1995.
- RIBEIRO RCJ, APRILETTI JW, WAGNER RL, WEST BL, GENG W, HUBER R, ET AL. Mechanisms of Thyroid Hormone Action: Insights from X-ray Crystallographic and Functional Studies. *Recent Prog Horm Res* 53: 351-94, 1998.
- ROBINSON-RECHAVI M, CARPENTIER AS, DUFFRAISSE M, LAUDET V. How many nuclear hormone receptors are there in the human genome? *Trends Genet*; 17: 554-6, 2001.
- ROSE, D.P., DAVIS, T.E. Plasma thyroid-stimulating hormone and thyroxine concentrations in breast cancer. *Cancer*, v.41, p.666-9, 1978.
- ROSE, D.P., DAVIS, T.E. Plasma triiodothyronine concentrations in breast cancer. *Cancer* 43: 1134-8, 1979.
- ROSEN, P.P. *Breast pathology*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 295-320, 1997.
- ROSENFELD MG, GLASS CK. Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J Biol Chem* 276:36865-8, 2001.
- SAEKI T, STROMBERG K, QI CF, GULLICK WJ, TAHARA E, NORMANNO N, CIARDIELLO F, KENNEY N, JOHNSON GR, SALOMON DS. Differential

- immunohistochemical detection of amphiregulin and cripto in human normal colon and colorectal tumors. *Cancer Res.* 52(12):3467-73, 1992.
- SAFE S. Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions. *Vitam Horm* 62:231-52, 2001.
- SALISBURY JL, D'ASSORO AB, LINGLE WL. Centrosome amplification and the origin of chromosomal instability in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 9(3):275-83, 2004.
- SALOMONN DS, NORMANNO N, CIARDIELLO F, BRANDT R, SHOUAB M, TODARO GJ. The role of amphiregulin in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 33(2):103-14, 1995.
- SARAIVA PP, FIGUEIREDO NB, PADOVANI CR, BRENTANI MM, NOGUEIRA CR. Profile of thyroid hormone in breast cancer patients. *Braz J Med Biol Res* 38(5):761-5, 2005.
- SCHIFF R, OSBORNE CK. New insight into estrogen receptor- α function and its implication for endocrine therapy resistance in breast cancer. *Breast Cancer Res* 7:205-11, 2005.
- SCHMIDT, G.H., MOGER, W.H. Effect of thyroactive materials upon mammary gland growth and lactation in rats. *Endocrinology* .81: 14-8, 1967.
- SCHWARTZ HL, CARTER AC, SINGH SP, KYDD DM, COSTANZO RR Jr. Relationship of red blood cell 131-I-L-triiodothyronine binding coefficient and cell maturation. Binding to mature erythrocyte and reticulocyte cell membranes. *Endocr* 82(3):569-74, 1968.
- SEGAL J. Action of the thyroi hormone at the level of the plasma membrane. *Endocr Res* 15:619-49, 1989.
- SEGARS JH, MARKS MS, HIRSCHFELD S, DRIGGERS PH, MATINEZ E, GRIPPO JF, BROWN M, WAHLI W, OZATO K. Inhibition of estrogen-responsive gene activation by the retinoid X receptor beta: evidence for multiple inhibitory pathways. *Mol Cell Biol* 13:2258-68, 1993.
- SEILE H. Correlations between the chemical structure and de pharmacololgical actions of the esteroids. *Endocrinology* 30:437-53, 1942.
- SHANG Y, HU X, DiRENZO J, LAZAR MA, BROWN M. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* 103:843-52, 2000.

- SHAO W, BROWN M. Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy. *Breast Cancer Res* 6:39-52, 2004.
- SHAO, Z., SHEIKH, M.S., RISHI, A.H., DAWSON, M.I., LI, X., WILBER, J.F., FENG, P., FONTANA, J.A. Thyroid hormone enhancement of estradiol stimulation of breast carcinoma proliferation. *Exp. Cel. Res.*, v.218, p.1-8, 1995.
- SHIH A, LIN HY, DAVIS FB, DAVIS PJ. Thyroid hormone promotes serine phosphorylation of p53 by mitogen-activated protein kinase. *Biochem* 40(9):2870-8, 2001.
- SHIH A, ZHANG S, CAO HJ, TANG HY, DAVIS FB, DAVIS PJ, LIN HY. Disparate effects of thyroid hormone on actions of epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are mediated by 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent protein kinase II. *Endocrinology* 145(4):1708-17, 2004.
- SHOU J, MASSARWEH S, OSBORNE CK, WALKELING AE, ALI S, WEISS H, SCHIFF R. Mechanisms of tamoxifen resistance: Increase estrogen receptor-HER-2/neu cross-talk in ER/HER-2-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 96:926-35, 2004.
- SHOYAB M, MCDONALD VL, BRADLEY JG, TODARO GJ. Amphiregulin: a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:6528-32, 1988.
- SHOYAB M, PLOWMAN GD, MCDONALD VL, BRADLEY JG, TODARO GJ. Structure and function of human amphiregulin: a member of the epidermal growth factor family. *Science* 243:1074-6, 1989.
- SICHER K, WATERHOUSE JHH. Thyroid activity in relation to prognosis in mammary cancer. *Br J Cancer* 21: 512-8, 1967.
- SIMON DB, LU Y, CHOATE KA, VELAZQUEZ H, AL-SABBAN, et al. Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg resorption. *Science* 285:103-6, 1999.
- SIMONCINI T, HAFEZI-MOGHADAM A, BRAZIL DP, LEY K, CHIN WW, LIAO JK. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 407:538-41, 2000.
- SINGH S, CHAKRAVARTI D, EDNEY JA, HOLLINS RR, JOHNSON PJ, WEST WW, HIGGINBOTHAM SM, CAVALIERI EL, ROGAN EG. Relative imbalances in the

- expression of estrogen-metabolizing enzymes in the breast tissue of women with breast carcinomas. *Oncol Rep* 14(4):1091-6, 2005.
- SMYTH PPA, SMITH DF, McDERMOTT WM, MURRAY MJ, GERAGHTY JG, O' HIGGINS NJ. A direct relationship between thyroid enlargement and breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 937-41, 1996.
- SMYTH PPA, SHERING SG, KILBANE MT, MURRAY MJ, McDERMOTT WM, SMITH DF, O' HIGGINS NJ. Serum thyroid peroxidase autoantibodies, thyroid volume, and outcome in breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 2711-6, 1998.
- SMITHCORS, J.F., LEONARD, S.L. Relation of thyroid to mammary gland structure in rat with special reference to male. *Endocrinology*, v.31, p.454-60, 1942.
- SPEIRS V. Oestrogen receptor β in breast cancer: good, bad or still too early to tell? *J Pathol* 197:143-7, 2002.
- SOBEL G, PASKA C, SZABO I, KISS A, KADAR A, SCHAFF Z. Increased expression of claudins in cervical squamous intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Hum Pathol* 36(2):162-9, 2005.
- SOINI Y. Claudins 2, 3, 4 and 5 in Paget's Disease and Breast Carcinoma. *Hum Pathol* 35:1531-6, 2004.
- SOINI Y. Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumors. *Histopathology* 46(5):551-60, 2005.
- SOMMER, S., FUQUA, S.A. Estrogen receptor and breast cancer. *Semin. Cancer Biol.* 11: 339-52, 2001.
- SORRENTINO, J.M., KIRKLAND, W.L., SIRBASKU, D.A. Control of cell growth. II. Requirement of thyroid hormones for the in vivo estrogen dependent growth of rat pituitary tumor cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 56: 1155-64, 1976.
- SPENCER, J.G.C. The influence of the thyroid in malignant disease. *Br. J. Cancer.* 8: 393-411, 1954.
- SRIVASTAVA S, TORALDO G, WEITZMAN NM, CENCI S, ROSS FP, PACIFICI R. Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activation of NF-kB ligand (RAKL)-induced JNK activation. *J Biol Chem* 276:8836-40, 2001.
- SUEN CS, BERRODIN TJ, MASTROENI R, CHESKIS BJ, LYTTLE CR, FRAIL DE. A transcriptional coactivator, steroid receptor coactivator-3, selectively augments steroid receptor transcriptional activity. *J Biol Chem* 273:27645-53, 1998.

- TAKESHITA A , CARDONA GR, KOIBUCHI N, SUEN CS, CHIN WW. TRAM-1, a novel 160KDa thyroid hormone receptor activator molecule, exhibits distinct properties from steroid receptor coactivator-1. *J Biol Chem* 272:27629-34, 1997.
- TAKATANI O, OKUMOTO T, KOSANO H, NISHIDA M, HIRAIDE H, TAMAKUMA S. Relationship between the levels of serum thyroid hormones or estrogen status and the risk of breast cancer genesis in japanese women. *Cancer Research* 49: 3109-12, 1989.
- TANG HY, LIN HY, ZHANG S, DAVES FB, DAVIS PJ. Thyroid hormone causes mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of the nuclear estrogen receptor. *Endocrinology* 145:3265-72, 2004.
- THOMAS, B.S., BULBROOK, R.D., RUSSELL, M.J., HAYWARD, J.L., MILLIS, R. Thyroid function in early breast cancer. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, v.19, p.1213-9, 1983.
- TOMINAGA K, KONDO C, JOHMURA Y, IMAGAWA M. The novel gene FAD104, containing a fibronectin type III domain, has a significant role in adipogenesis. *FEBS Lett* 577(1-2):49-54, 2004.
- TOPPER, Y.J., FREEMAN, C.S. Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiol. Rev.* 60: 1049-106, 1980.
- TORCHIA J, ROSE DW, INOSTROZA J, KAMEI Y, WESTIN S, GLASS CK, ROSENFELD MG. The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* 387: 677-84, 1997.
- TRAN H, MATTEI M, GODYNA S, ARGRAES WS. Human fibulin-1D: molecular cloning, expression and similarity with S1-5 protein, a new member of the fibulin gene family. *Matrix Biol* 15: 479-93, 1997.
- TSUKITA S, FURUSE M. Occludin and claudins in tight junction strands:leading or supporting players? *Trend. Cell Biol.* 9:268-73, 1999.
- TSUKITA S, FURUSE M. Pores in the Wall: Claudins Constitute Tight Junction Strands Containing Aqueous Pores. *The Journal of Cell Biology* 149 (1): 13-6, 2000.
- TURKEN, O., NARIN, Y., DEMIRBAS, S., ONDE, M.E., SAYAN, O., KANDEMIR, E.G., YAYLACI, M., OZTURK, A.. *Breast Cancer Res.* 5(5): R110-3, 2003.
- TWAL WO, CZIROK A, HEGEDUS B, KNAAK C, CHINTALAPUDI MR, OKAGAWA H, SUGI Y ARGRAVES WS. Fibuli-1 supression of fibronectin-regulated cell adhesion and motility. *J Cell Sci* 114: 4587-98, 2001.

- UMESONO K, EVANS RM. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 276: 1139-46, 1989.
- UPOROV, A.V., SEMIGLAZOV, V.F., POZHARISSKII, K.M. Immunohistochemical study of breast neoplasms cells using different markers of proliferation. *Arkh. Patol.*, 62: 26-30, 2000.
- VADLAMUDI RK, WANG RA, MAZUMDAR A, KIM Y, SHIN J, SHAIN A, KUMAR R. Molecular cloning and characterization of PELP1, a novel human coregulator of estrogen receptor alpha. *J Biol Chem* 276: 38272-9, 2001.
- VASUDEVAN, N., KOIBUCHI, N., CHIN, W.W., PFAFF, D.W. Differential crosstalk between estrogen receptor (ER) alpha and ER beta and the thyroid hormone receptor isoforms results in flexible regulation of the consensus ERE. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 95: 9-17, 2001.
- VENDRELL JA, MAGNINO F, DANIS E, DUCHESNE MJ, PINLOCHE S, PONS M, BIRNBAUM D, NGUYEN C, THEILLET C, COHEN PA. Estrogen regulation in human breast cancer cells of new downstream gene targets involved in estrogen metabolism, cell proliferation and cell transformation. *J Mol. Endocrinol* 32(2):397-414, 2004.
- VISSCHER DW, SARDAR FH, KASUNIC TC, REDDY KB. Clinicopathologic analysis of amphiregulin immunostaining in breast neoplasia. *Breast Cancer Res. Treat.* 45(1):75-80, 1997.
- VOEGEL JJ, HEINE MJ, ZECHEL C, CHAMBON P, GRONEMEYER H. TIF2, a 160KDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J* 15: 3667-75, 1996.
- VONDERHAAR, B.K., TANG, E., LYSTER, R.R., NASCIMENTO, M.C.S. Thyroid hormone regulation of epidermal growth factor levels in mouse mammary glands. *Endocrinology* 119: 580-5, 1986.
- VORHERR, H. Thyroid function in benign and malignant breast disease. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 23: 255-7, 1987.
- WANG Z, ROSE DW, HERMANSON O, LIU F, HERMAN T, WU W, SZETO D, GLEIBERMAN A, KRONES A, PRATT K, ROSENFELD R, GLASS DK, ROSENFELD MG. Regulation of somatic growth by the p160 coactivator p/CIP. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:13549-54, 2000.

- WANG TN, ALBO D, TUSZYNSKI GP. Fibroblasts promote breast cancer cell invasion by upregulating tumor matrix metalloproteinase-9 production. *Surgery* 132(2):220-5, 2002.
- WARNSMARK A, TREUTER E, WRIGHT AP, GUSTAFSSON JA. Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Mol Endocrinol* 17: 1901-9, 2003.
- WATSON CS, BULAYEVA NN, WOZNIAK AL, FINNERTY CC. Signaling from the membrane via membrane estrogen receptor- α : estrogens, xenoestrogens, and phytoestrogens. *Steroids* 70(5-7):364-71, 2005.
- WEBB P, NGUYEN P, KUSHNER PJ. Differential SERM effects on corepressor binding dictate ER α activity in vivo. *J Biol Chem* 278: 6912-20, 2003.
- WEI LN, HU X, CHANDRA D, SETO E, FAROOQUI M. Receptor-interacting protein 140 directly recruits histone deacetylases for gene silencing. *J. Biol. Chem* 275: 40782-7, 2000.
- WEINSTEIN-OPPENHEIMER CR, BURROWS C, STEELMAN LS, McCUBREY JA. The effects of beta-estradiol on Raf activity, cell cycle progression and growth factor synthesis in the MCF-7 breast cancer cell line. *Cancer Biol. Ther.* 1(3):256-62, 2002.
- WEISS RE, XU J, NING G, POHLENZ J, O'MALLEY BW, REFETTOFF S. Mice deficient in the steroid receptor co-activator 1 (SRC-1) are resistant to thyroid hormone. *EMBO J* 18:1900-4, 1999.
- WEN W, CAI O, SHU XO, CHENG JR, PARL F, PIERCE L, GAO YT, ZHENG W. Cytochrome P450 1B1 and catechol-O-methyltransferase genetic polymorphisms and breast cancer risk in Chinese women: results from the shanghai breast cancer study and a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 14(2): 329-35, 2005.
- WEST, M., BLANCHETTE, C., DRESSMAN, H., HUANG, E., ISHIDA, S., SPANG, R., OLSON, J.A. Jr, MARKS, J.R. Predicting the clinical status of human breast cancer by use of expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 11462-7, 2001.
- WILDER RL. Hormones, pregnancy and autoimmune diseases. *Ann NY Acad Sci* 840:45-50, 1998.
- WITTLIFF, J.L. Steroid-hormone receptors in breast cancer. *Cancer*, v.53, p.630-43, 1984.

- WINSON JD, FOSTER DW, KRONENBERG HM AND LARSEN PR. *Thyroid gland*, 389-515, 1998 (W.B. SAUDERS COMPANY).
- WU Y, XU B, KOENIG RJ. Thyroid hormone response element sequence and the recruitment of retinoid X receptors for thyroid hormone responsiveness. *J Biol Chem* 276: 3929-36, 2001.
- YANG XJ, OGRYZKO W, NISHIKAWA J, HOWARD BH, NAKATANI Y. A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* 382:319-24, 1996.
- YARWOOD NJ, GURR JA, SHEPPARD MC, FRANKLYN JA. Estradiol modulates thyroid hormone regulation of the human glycoprotein hormone alpha subunit gene. *J Biol Chem* 268:21984-89, 1993.
- YEN PM. Physiological and molecular basis of Thyroid Hormone Action. *Physiol Rev* 81(3): 1097-142, 2001.
- YEN PM, CHIN WW. New advances in understanding the molecular mechanisms of thyroid hormone action. *Trends Endocrinol Metab* 5:65-72, 1994.
- YIM JH, RO SH, LOWNEY JK, WO SJ, CONNETT J, DOHERTY GM. The role of interferon regulatory factor-1 and interferon regulatory factor-2 in IFN-gamma growth inhibition of human breast carcinoma cell lines. *J Interferon Cytokine Res* 23(9):501-11, 2003.
- ZHANG J, LAZAR MA. The mechanism of action of thyroid hormones. *Ann Rev Physiol* 62:439-66, 2000.
- ZHANG, X., JEYAKUMAR, M., BAGCHE, M.K. Ligand-dependent cross-talk between steroid and thyroid hormone receptors. *J. Biol. Chem.*, 271:14825-33, 1996.
- ZHANG H, THOMSEN JS, HOHANSSON L, GUSTAFSSON JA, TREUTER E. DAX-1 functions as an LXXLL-containing corepressor for activated estrogen receptors. *J Biol Chem* 275:39855-9, 2000.
- ZHU S, YEN PM, CHIN WW, PEAFF DW. Interaction of estrogen and thyroid hormone on regulation of proenkephalin gene expression in hypothalamus and striatum of female rats. *Proc Neurosci Meet San Diego CA*, 180-6, 1995.
- ZHU S, YEN PM, CHIN WW, PEAFF DW. Estrogen and thyroid hormone interaction in regulation of gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:12587-92, 1996.
- ZHU XG, HANOVER JA, HAGER GL, CHENG SY. Hormone-induced translocation of thyroid hormone receptors in living cells visualized using a receptor green fluorescent protein chimera. *J Biol Chem* 273(42):27058-63, 1998.

ZIMARINA TC, KRISTENSEN VN, IMIANITOV EN, BERSHETEIN LM.
Polymorphisms of CYP1B1 and COMT in breast and endometrial cancer. Mol
Biol 38(3):386-93, 2004.

ANEXO 01

Extração de RNA total

1. Homogeinização

As células foram lisadas diretamente na garrafa de cultura, adicionando-se 1 ml de TRIZOL Reagente (Gibco™, Cat. nº15596-026) para cada 10cm² de garrafa, usando-se *cells scrapers*, passando-se o lisado através de uma pipeta várias vezes.

2. Fase de Separação

As amostras de homogenato foram incubadas durante 5 min a 15 – 30°C para permitir a completa dissociação dos complexos das nucleoproteínas. Adicionou-se, então, 0,2 ml de Clorofórmio (Merck, Cat. nº UN1888) por 1 ml de Trizol (Gibco™, Cat. nº15596-026). Fecharam-se os tubos adequadamente e fez-se uma agitação manual vigorosa por 15 segundos. Incubaram-se a 15 – 30°C durante 2 a 3 minutos. Centrifugaram-se as amostras durante 15 minutos (a 12000 x g, numa temperatura de 2 – 8°C). Após a centrifugação, a mistura ficou separada em 3 fases: a mais inferior rosa, a fase intermediária e a superior aquosa. O volume da fase aquosa é constituído por aproximadamente 60% do volume do Trizol (Gibco™, Cat. nº15596-026) usado para o homogenato, no qual está contido o RNA.

3. Precipitação do RNA

Transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo. Colocou-se 0,5 ml de álcool isopropílico (Merck, Cat. nº UN1219) para cada 1 ml de Trizol (Gibco™, Cat. nº15596-026). Incubaram-se as amostras a 15 – 30°C durante 10 minutos e centrifugaram-se a 12000 x g durante 10 minutos a 2 – 8°C. Formou-se um *pellet* no fundo do tubo, o qual é o precipitado de RNA.

4. Lavagem do RNA

Removeu-se o sobrenadante. Lavou-se o *pellet* de RNA com 1ml de etanol 75% (Nuclear, Cat. nº 0377) por 1 ml de Trizol (Gibco™, Cat. nº15596-026). As amostras foram agitadas e centrifugadas durante 5 minutos a 7500 x g a 2 – 8 °C.

5. Redissolvendo o RNA

No final do procedimento, retirou-se o sobrenadante por inversão do tubo e secou-se com cotonete autoclavado as suas paredes, sem perturbar o *pellet*. Dissolveu-se o RNA com 30 µL de água ultrapura (Gibco™, Cat. nº 10977-015, ou em sua falta, foi utilizada água ultrapura tratada com dietilpirocarbonato, também chamada água tratada com DEPC), passando-se a solução várias vezes pela ponteira de uma micropipeta. As amostras foram incubadas durante 10 minutos a 55 – 60 °C. Realizou-se a técnica de fenol-clorofórmio (anexo 02) para deixar o RNA livre de reagentes.

ANEXO 02

1. Purificação do RNA através da Técnica de Fenol Clorofórmio :

As amostras foram completadas com água tratada com DEPC para 50microl. Colocou-se igual volume de solução fenol-clorofórmio (50uL) com pH=4,0. Agitou-se por 2min. Após 10 minutos à temperatura ambiente. Centrifugou-se a 13200 rotações por minuto (rpm) durante 15 minutos a 22°C. Passou-se o sobrenadante para um tubo de 1,5ml. Colocou-se 50uL de clorofórmio (Merck, Cat. n° UN1888). Agitou-se por 2min. Após, esperou-se 10min à temperatura ambiente. Centrifugou-se 13200rpm durante 15 minutos a 22°C. Recuperou-se o sobrenadante. Completou-se três vezes o volume com etanol (Nuclear, Cat. n° 0377) absoluto gelado. Adicionou-se 10% do volume final de solução de NaOAc pH5,2 3M. Agitou-se 2 minutos. Deixou-se a -20°C por 20 minutos. Centrifugou-se durante 30 minutos a 14000rpm a 4°C. Descartou-se o sobrenadante. Lavou-se o *pellet* com 1ml de etanol 70% (Nuclear, Cat. n° 0377). Centrifugou-se a 14000rpm durante 5 minutos a 4°C e descartou-se, com cuidado, o etanol (Nuclear, Cat. n° 0377). Repetiu-se o último passo de 5 a 6 vezes. Deixou-se secar a 37°C com o tudo emborcado. Re-suspendeu-se em 10 µL de água tratada com DEPC. Realizou-se a leitura deixando as amostras com uma razão $A_{260/280}$ de no mínimo 1,8. Foi realizado um gel de agarose (Gibco™, Cat. n° 15510-019) para RNA, para certificarmos sua qualidade.

ANEXO 03

Hibridização e análise dos cDNA *microarrays* (colaboração com a Dra. Dirce Maria Carraro – Laboratório de Expressão Gênica do Instituto Ludwig)

1. Síntese do cDNA marcado com fluorocromos

O *pellet* de RNA total em 10,4µl de água tratada com DEPC. As amostras foram aquecidas a 37°C durante 5 a 10 minutos. Após a adição de 4µl de oligo(dT) 0,5µg/µl (Invitrogen, Cat. n° 18418-012), 30 µg de RNA total, 3 µl de dN6 (3 µg/µl, Pharmacia Biotec, Cat. n°27-2166-01), 1,1 µl controle 4.5x (Q-gene); completou-se o volume para 14,4 µl com água tratada com DEPC. Incubou-se a 70°C por 10 minutos, e após, em gelo. A essa reação, adicionaram-se: 6 µl *first strand buffer* 5x (Invitrogen, Cat. n° 11904-018) pré-aquecido a 42°C, 3 µl 0,1M DTT (Invitrogen, Cat. n° 15508-013), 0,6 µl Low C (solução preparada a partir de dNTPs – Pharmacia, Cat. n° 27-2035-02), 0.5 ul Rnasin (Promega, cat n° N251B, 40 U / µl), 2,5 µl SuperScript II (Invitrogen, Cat. n° 19064-014), 3 µl dCTP³ (25 nmol; CY3 ou CY5, Cat. n° PA53021 ou PA55021 respectivamente, Amersham Pharmacia). Foram incubados a 42°C por 42 horas.

2. Degradação do RNA (volume/ volume)

Acrescentou-se, às amostras, 1,5 µl 0,5M EDTA (Gibco™, Cat. n° 15576-028) e 1,5µl 1M NaOH. Incubou-se a 70°C por 20 min. Neutralizou-se a reação adicionando 1,5 µl 1M HCl (Nuclear, Cat. n° 0051). Incubou-se no escuro enquanto a coluna de purificação foi preparada.

3. Purificação do cDNA em coluna Autoseq G50 (Amersham Pharmacia, Cat. n° 27-5340-01)

A resina foi re-suspendida por agitação. Adicionou-se a cada reação de ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA), a qual estava com um volume aproximado de 34,5 µl, no centro da resina de cada coluna. Transferiu-se a coluna para tubo *ependorf* 1,5 ml. Realizou-se uma centrifugação a 2000g / 1min com a coluna adaptada em tubo de 2ml. Armazenou-se o eluato a 4^oC, ao abrigo da luz.

4. Pré-hibridização das lâminas

As lâminas foram incubadas em solução contendo 5X SSC; 0,2% SDS; 1% BSA, 5X solução Denhardt's (filtrada com membrana 0,22 µm – Millipore, Cat. n° GPWP04700). Aqueceu-se a solução a 42^oC para o uso. As lâminas foram lavadas mergulhando-as 10 vezes em água destilada seguida de centrifugação a 1000 rpm durante 1 minuto em tubo Falcon 50 ml à temperatura ambiente. As lâminas foram utilizadas imediatamente, pois a eficiência da hibridização diminui se secarem por mais de uma hora.

5. Hibridização

Tampão de hibridização 2X: 10 X SSC; 0,2% SDS. Filtrado (filtro 0,22 µm– Millipore, Cat. n° GPWP04700) e separado em alíquotas e guardadas à temperatura ambiente. Antes do uso, aqueceu-se a 70^oC (até re-suspender todo o precipitado).

6. Estação de hibridização:

As duas reações de cDNA Cy3 e Cy5 foram misturadas e purificadas. Adicionaram-se a cada novo tubo: 2 µl poly A DNA (2 ug /ul, Amersham-Pharmacia, Cat. n° 27-7988-01), 2 µl Cot1 DNA (2 µg/µl, Gibco BRL, Cat. n° 15279-011), 2 µl de BSA 10 mg/ml. O volume foi reduzido em *SpeedVac* para 12,25 µl a -4^oC. Adicionou-se 47,5 µl de tampão de hibridização previamente aquecido a 70^oC e devidamente solubilizado, 23,75 µl de Formamida deionizada (Sigma, Cat. n° 114K0568) (mantida no escuro e em temperatura ambiente), 9,5 µl de solução

Denhardt's 50X, 2 µl de Esperma de Salmão 5 µg/µl (Biosciences, Cat. nº 27-4565-01). Misturou-se com cuidado e incubou-se a 45°C até o momento de uso.

A lâmina pré-hibridizada foi montada na estação de hibridização. Aqueceu-se a 70°C durante 2 minutos ou até a adição do cDNA. As amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos.

7. Hibridização

Adicionou-se o cDNA *mix* na câmara de hibridização e incubou-se a 42°C por pelo menos 16 horas. Após desmontar a câmara de hibridização, cada lâmina foi retirada e submersa em solução de SSC 2X por aproximadamente 1 minuto.

8. Lavagens

Os tampões foram pré-aquecidos a 37°C antes do uso. Lavaram-se as lâminas sob agitação e devidamente acondicionadas (estante de imunoistoquímica). Para um máximo de quatro lâminas, foram utilizados em torno de 400ml de cada tampão. As lavagens ocorreram sucessivamente, como descritas abaixo:

- 1 vez em 2X SSC por 10 minutos.
- 2 vezes em 0,1X SSC; 0,1% SDS por 10 minutos.
- 2 vezes em 0,1 X SSC por 10 minutos.
- *Spin* a 1000 rpm por 2 minutos em tubo Falcon 50ml.

9. Leitura e análise dos dados (colaboração com a Dra. Helena Brentani - Bioinformática do Instituto Ludwig):

Os sinais gerados pela hibridização dos cDNA das amostras estudadas às seqüências fixadas nas lâminas de vidro foram capturados pelo *scanner* Gene Tac 2000 (Genomic Solutions, Reino Unido). Esse sistema se baseia em câmara CCD (*charged-coupled device*), que capta os sinais de fluorescência emitidos pelos *spots* presentes nas lâminas de hibridização, quando os fluorocromos Cy3 e Cy5 são excitados pela luz fluorescente emitida pelo sistema. A luz emitida pelos

fluorocromos excitados é convertida em energia elétrica, produzindo um sinal mensurável que é proporcional ao número de fótons detectados. A visualização da composição da imagem capturada foi realizada no *software* GT e para análise quantitativa, foi utilizado o *software* GeneTac Analyser (ambos Genomic Solutions, Reino Unido). Este último programa permite a localização automática dos *spots* de cDNA na lâmina, baseando-se em marcadores de posição. Posteriormente, o refinamento dessa localização foi realizado de forma manual. Numa segunda etapa, o *software* calculou o volume de cada *spot*, o qual corresponde à intensidade média da fluorescência de cada *pixel* multiplicada pela área do *spot*. A terceira etapa do processo de quantificação das intensidades de sinal foi a normalização entre os sinais dos canais Cy3 (pois essa fluorescência marca bem mais que a outra, ou seja, seu sinal é mais intenso) e Cy5 da lâmina através do cálculo da energia total de cada canal.

Após todas as etapas de normalização, o valor da intensidade para cada EST (*expressed sequence tags*), fixada ao *cDNA microarray*, foi comparado entre as amostras analisadas utilizando o programa Gene Tac Query (Genomic Solutions, Reino Unido). Considerou-se um gene como sendo diferencialmente expresso quando a razão entre os valores de expressão daquele gene entre duas amostras for maior que dois. A análise final foi realizada utilizando o programa GeneSpring (Sigenetics, EUA), que permite a criação de gráficos de distribuição e a seleção de *clusters* de genes consistentemente regulados, positiva ou negativamente, entre diferentes amostras.

ANEXO 04.

Tabela 02: 193 genes modulados por E2 e T3 nas células MCF-7 com $p < 0,05$.

<i>Símbolo do gene</i>	<i>FOLD E2</i>	<i>pvalue E2</i>	<i>pFDR E2</i>	<i>FOLD T3</i>	<i>pvalue T3</i>	<i>pFDR T3</i>
NEK2	-1.933.480	0.038	0.20232945	-1.475.496	0	0.00000000
ARFGAP3	-1.414.116	0	0.00000000	-1.384.054	0	0.00000000
VPS52	1.271.913	0	0.00000000	1.169.588	0	0.00000000
H2AFZ	1.459.728	0	0.00000000	1.300.170	0	0.00000000
KIFC2	3.923.388	0.034	0.19603604	1.896.185	0	0.00000000
BCL3	-1.705.270	0	0.00000000	-1.536.875	0	0.00000000
MSF	1.706.452	0	0.00000000	1.571.345	0	0.00000000
CAMK2B	1.591.073	0.006	0.06450168	1.505.247	0	0.00000000
PC-LKC	1.551.862	0.001	0.01163636	1.412.254	0.007	0.06109091
CD14	-1.489.677	0	0.00000000	-1.499.000	0	0.00000000
KIAA1949	-1.914.543	0.03	0.19212809	-1.677.136	0	0.00000000
PIK3C3	-1.502.849	0	0.00000000	-1.559.085	0	0.00000000
H6PD	-1.601.030	0	0.00000000	-1.657.490	0	0.00000000
C14orf137	1.279.872	0.015	0.14414414	1.216.722	0	0.00000000
NAG	1.181.238	0.025	0.19186768	1.377.737	0.032	0.25880371
C5orf6	-1.352.848	0	0.00000000	-1.212.513	0	0.00000000
ZNF331	1.350.974	0	0.00000000	1.382.232	0	0.00000000
GALNT3	1.720.467	0	0.00000000	1.455.990	0	0.00000000
CSTA	-5.621.285	0	0.00000000	-2.313.376	0.036	0.27803701
MYH10	-1.300.620	0.004	0.04408726	-1.217.735	0	0.00000000
KIAA0826	1.337.093	0.017	0.15844660	1.297.829	0	0.00000000
VCP	-1.200.803	0.025	0.19186768	-1.215.037	0	0.00000000
PKD1-like	-1.767.855	0	0.00000000	-1.515.401	0	0.00000000
CTSC	1.635.804	0	0.00000000	1.558.329	0	0.00000000
UCHL3	-1.494.849	0.028	0.19186768	-1.339.784	0	0.00000000
UBAP2	-1.489.677	0	0.00000000	-1.501.079	0	0.00000000
DPP9	-1.614.402	0.007	0.07450111	-1.340.713	0	0.00000000
C9orf78	-1.630.823	0	0.00000000	-1.513.092	0	0.00000000
C14orf170	1.341.921	0.046	0.22530612	1.191.105	0	0.00000000
C21orf107	1.547.565	0.038	0.20232945	1.658.639	0	0.00000000
UPF2	1.256.317	0	0.00000000	1.287.882	0	0.00000000
JAK2	1.264.003	0	0.00000000	1.271.913	0	0.00000000
SYNE2	1.476.314	0	0.00000000	1.369.833	0	0.00000000
CRK	-2.275.210	0.001	0.01163636	-1.623.379	0	0.00000000
ARID1B	1.775.223	0	0.00000000	1.572.435	0	0.00000000
MLL3	1.223.488	0	0.00000000	1.203.303	0	0.00000000
RFP2	-1.952.064	0.031	0.19237233	-1.956.127	0	0.00000000
KLF7	-1.267.513	0	0.00000000	-1.287.882	0	0.00000000
FLJ21168	1.762.105	0.028	0.19186768	1.369.168	0	0.00000000
GRSP1	-1.588.869	0	0.00000000	-1.492.778	0	0.00000000

FYCO1	1.420.107	0	0.00000000	1.464.086	0	0.00000000
KIAA1109	1.464.086	0	0.00000000	1.603.251	0	0.00000000

continuação Tabela 02.

<i>Símbolo do gene</i>	<i>FOLD E2</i>	<i>pvalue E2</i>	<i>pFDR E2</i>	<i>FOLD T3</i>	<i>pvalue T3</i>	<i>pFDR T3</i>
SDBCAG84	-2.503.593	0	0.00000000	-1.935.894	0	0.00000000
MGC5306	2.049.114	0	0.00000000	1.564.824	0.037	0.28190476
TERF2IP	-1.815.038	0	0.00000000	-2.167.452	0	0.00000000
ZNF266	2.030.732	0.027	0.19186768	1.626.758	0	0.00000000
MGC12981	-1.707.635	0	0.00000000	-1.487.614	0	0.00000000
C11orf24	1.155.086	0	0.00000000	1.304.955	0	0.00000000
PRKAB1	-1.909.242	0	0.00000000	-1.890.804	0	0.00000000
IGSF1	4.231.004	0.028	0.19186768	2.254.801	0	0.00000000
CAPN3	-1.392.811	0.034	0.19603604	-1.178.539	0	0.00000000
RABAC1	-1.403.861	0	0.00000000	-1.401.430	0	0.00000000
PTPRH	1.368.884	0	0.00000000	1.381.274	0	0.00000000
FAM33A	1.523.089	0.047	0.22822458	1.507.335	0.03	0.24721030
SMARCD3	1.359.146	0	0.00000000	1.261.990	0.035	0.27450980
NAB2	2.987.627	0.036	0.19896373	1.957.483	0	0.00000000
KIAA1833	1.594.385	0.021	0.18260870	1.355.664	0	0.00000000
BRAP	1.956.127	0	0.00000000	2.056.228	0	0.00000000
DKFZP564M182	-1.969.733	0	0.00000000	-1.411.276	0	0.00000000
CEBPG	1.840.375	0.006	0.06450168	1.580.083	0	0.00000000
LPIN2	1.583.372	0.039	0.20436681	1.586.668	0	0.00000000
TNFAIP1	1.867.360	0.017	0.15844660	1.449.947	0.045	0.33256351
SWAP70	-1.671.913	0	0.00000000	-1.394.260	0	0.00000000
NF1	-1.185.175	0	0.00000000	-1.158.373	0	0.00000000
HRAS	-1.712.021	0.035	0.19741481	-1.640.232	0.036	0.27803701
AXUD1	1.486.583	0.026	0.19186768	1.413.724	0	0.00000000
FLJ20699	-1.633.538	0	0.00000000	-1.414.449	0	0.00000000
CLIC4	1.408.344	0.017	0.15844660	1.629.015	0	0.00000000
GNAO1	-1.615.712	0	0.00000000	-1.562.006	0	0.00000000
COPZ1	-1.376.496	0	0.00000000	-1.264.880	0	0.00000000
NMT2	-3.188.770	0.03	0.19212809	-2.013.911	0	0.00000000
FLJ20399	-1.374.493	0	0.00000000	-1.343.503	0	0.00000000
ARRDC3	2.112.571	0	0.00000000	1.669.019	0	0.00000000
SPHK1	1.358.486	0	0.00000000	1.367.935	0	0.00000000
ZNF213	1.692.317	0.031	0.19237233	1.440.930	0	0.00000000
PPGB	-1.768.958	0	0.00000000	-1.803.626	0	0.00000000
FBLN1	2.602.684	0	0.00000000	2.531.513	0	0.00000000
STAT6	-3.135.727	0.042	0.21254613	-1.765.161	0	0.00000000
SLC1A5	1.382.568	0.02	0.17893756	1.241.729	0.034	0.27019868
SAP130	1.192.509	0.038	0.20232945	1.182.631	0	0.00000000
HUMAGCGB	-1.383.191	0.032	0.19357278	-1.201.636	0.035	0.27450980
MIR16	-1.731.473	0	0.00000000	-1.292.353	0	0.00000000
TRIM41	1.496.923	0	0.00000000	1.354.349	0	0.00000000

CASC3	1.380.796	0.027	0.19186768	1.320.112	0	0.00000000
FLJ10159	1.388.955	0.037	0.20056465	1.551.862	0	0.00000000
DES	-1.699.370	0.011	0.10988554	-1.231.144	0	0.00000000
KIAA0310	-1.172.022	0.034	0.19603604	-1.222.132	0	0.00000000

continuação Tabela 02.

<i>Símbolo do gene</i>	<i>FOLD E2</i>	<i>pvalue E2</i>	<i>pFDR E2</i>	<i>FOLD T3</i>	<i>pvalue T3</i>	<i>pFDR T3</i>
SERPINA3	1.827.663	0	0.00000000	1.741.101	0	0.00000000
TPD52L1	-1.205.808	0.008	0.08393443	-1.187.560	0	0.00000000
PC-1	-1.691.965	0.033	0.19531443	-1.611.830	0	0.00000000
UBA2	1.562.656	0.004	0.04408726	1.573.525	0	0.00000000
Eu-HMTase1	-1.501.391	0	0.00000000	-1.215.879	0	0.00000000
FAD104	3.885.230	0	0.00000000	2.042.024	0	0.00000000
PCM1	2.348.924	0	0.00000000	2.018.103	0	0.00000000
RPS6KA1	-1.446.835	0	0.00000000	-1.832.737	0	0.00000000
FER1L3	1.875.142	0.048	0.23109328	1.508.589	0.025	0.21371327
FMNL1	2.361.985	0.029	0.19186768	1.741.101	0	0.00000000
DCXR	-2.272.059	0	0.00000000	-1.726.081	0	0.00000000
DEPDC4	-1.235.247	0	0.00000000	-1.257.650	0	0.00000000
NEB	2.424.689	0.031	0.19237233	1.689.739	0	0.00000000
C3orf1	-1.363.033	0	0.00000000	-1.128.964	0	0.00000000
FLJ32028	1.695.840	0.02	0.17893756	1.539.007	0	0.00000000
PDHB	-1.536.875	0.035	0.19741481	-1.313.121	0	0.00000000
SFPQ	2.470.837	0.021	0.18260870	1.689.973	0	0.00000000
CDCA2	-1.783.857	0	0.00000000	-1.508.798	0	0.00000000
DKFZp762C1112	5.502.167	0.024	0.19136213	2.694.467	0	0.00000000
PORIMIN	2.219.139	0	0.00000000	1.931.873	0	0.00000000
BUB1	-1.388.281	0	0.00000000	-1.352.379	0	0.00000000
EIF5B	1.455.788	0	0.00000000	1.443.529	0	0.00000000
PRSS11	-1.997.229	0.021	0.18260870	-1.708.819	0	0.00000000
OPTN	2.029.325	0	0.00000000	1.866.066	0	0.00000000
DKFZp761C169	1.291.099	0	0.00000000	1.395.324	0	0.00000000
FREQ	1.647.182	0.014	0.13644670	1.366.040	0.041	0.30582751
DNCH2	1.185.914	0	0.00000000	1.223.997	0	0.00000000
OGFR	2.605.211	0.025	0.19186768	1.808.007	0	0.00000000
LARS	1.859.610	0	0.00000000	1.623.379	0	0.00000000
PLOD2	1.863.481	0	0.00000000	1.467.133	0	0.00000000
AP3M2	1.268.919	0	0.00000000	1.219.086	0	0.00000000
NOTCH1	1.828.930	0.029	0.19186768	1.880.348	0	0.00000000
FLJ12875	-1.221.962	0	0.00000000	-1.253.707	0	0.00000000
FLJ13089	1.362.844	0	0.00000000	1.353.692	0	0.00000000
ADAM9	-2.942.413	0.037	0.20056465	-2.176.485	0	0.00000000
LOC91137	-1.892.115	0.032	0.19357278	-1.522.244	0	0.00000000
FLJ22170	1.846.765	0.025	0.19186768	1.679.463	0.025	0.21371327
CYFIP1	-1.359.899	0	0.00000000	-1.306.041	0	0.00000000
LYSAL1	-1.686.345	0.019	0.17256386	-1.335.056	0	0.00000000

SUPT4H1	-1.604.362	0.044	0.21942857	-1.440.930	0.041	0.30582751
APC	-1.262.252	0.02	0.17893756	-1.237.990	0	0.00000000
FLJ23441	1.374.589	0	0.00000000	1.308.759	0	0.00000000
ZNF297B	1.289.767	0	0.00000000	1.356.708	0	0.00000000
SELS	1.793.776	0.001	0.01163636	1.540.074	0.034	0.27019868
PGR1	-1.582.275	0.021	0.18260870	-1.519.925	0	0.00000000
NR4A2	-1.286.989	0.016	0.15147929	-1.318.594	0.041	0.30582751

continuação Tabela 02.

<i>Símbolo do gene</i>	<i>FOLD E2</i>	<i>pvalue E2</i>	<i>pFDR E2</i>	<i>FOLD T3</i>	<i>pvalue T3</i>	<i>pFDR T3</i>
KPNA1	1.241.427	0.005	0.05423729	1.269.271	0	0.00000000
PRKCABP	-1.561.573	0	0.00000000	-1.473.248	0	0.00000000
C1orf33	-1.729.074	0	0.00000000	-1.522.033	0	0.00000000
POLQ	1.489.884	0	0.00000000	1.250.929	0	0.00000000
VWF	1.337.464	0	0.00000000	2.500.991	0	0.00000000
ATP6V1C1	1.386.070	0	0.00000000	1.682.959	0	0.00000000
SCAMP4	1.402.499	0	0.00000000	1.329.607	0	0.00000000
RBM5	1.377.450	0.032	0.19357278	1.432.962	0	0.00000000
CSNK1G3	-2.231.479	0	0.00000000	-2.130.216	0	0.00000000
ZNF281	-1.315.855	0	0.00000000	-1.330.529	0	0.00000000
TCF19	-1.587.768	0.034	0.19603604	-1.460.032	0	0.00000000
PPP3CA	-1.287.882	0.009	0.09290323	-1.427.015	0	0.00000000
C1R	-4.152.557	0.041	0.20992000	-2.061.937	0.023	0.19856115
H41	1.855.747	0.025	0.19186768	1.400.916	0	0.00000000
PRPSAP1	-1.330.134	0	0.00000000	-1.413.724	0	0.00000000
RPS16	1.402.499	0.017	0.15844660	1.346.300	0	0.00000000
EST1B	-1.209.994	0.024	0.19136213	-1.251.796	0	0.00000000
PDE4DIP	1.254.750	0.028	0.19186768	1.227.319	0	0.00000000
LOC199800	-1.390.882	0.027	0.19186768	-1.363.203	0	0.00000000
TCF12	-1.106.497	0.03	0.19212809	-1.270.151	0.027	0.22796834
SRPX	1.314.578	0	0.00000000	1.302.786	0	0.00000000
IGFBP5	1.991.700	0.037	0.20056465	1.440.930	0	0.00000000
ZC3HDC8	-1.688.334	0.009	0.09290323	-1.719.036	0	0.00000000
APP	1.520.979	0	0.00000000	1.473.248	0	0.00000000
C14orf104	1.278.223	0.023	0.18936535	1.335.278	0	0.00000000
ARFGEF2	1.350.974	0.031	0.19237233	1.385.109	0	0.00000000
USP47	1.231.913	0.036	0.19896373	1.232.511	0.027	0.22796834
POF1B	2.581.483	0	0.00000000	2.342.745	0	0.00000000
BCL7B	-1.224.931	0	0.00000000	-1.318.502	0	0.00000000
GMPPA	-1.308.578	0	0.00000000	-1.147.902	0	0.00000000
SHC3	1.202.636	0.031	0.19237233	1.154.445	0.035	0.27450980
TTC13	-1.813.781	0.023	0.18936535	-1.421.092	0	0.00000000
GNA13	1.969.187	0	0.00000000	1.729.794	0.028	0.23496503
TSPYL1	-1.159.900	0	0.00000000	-1.194.163	0	0.00000000
ADCY3	-1.432.267	0.046	0.22530612	-1.275.710	0	0.00000000
AKAP10	1.418.140	0	0.00000000	1.269.271	0	0.00000000

PFKFB3	2.928.171	0	0.00000000	2.353.813	0.035	0.27450980
PCYT2	1.491.744	0	0.00000000	1.295.043	0	0.00000000
PSMD8	-1.366.987	0.027	0.19186768	-1.262.252	0	0.00000000
ICA1	1.630.145	0.021	0.18260870	1.395.711	0	0.00000000
PIGO	1.458.009	0	0.00000000	1.584.470	0	0.00000000
FLJ12785	-1.314.032	0.044	0.21942857	-1.373.731	0	0.00000000
FLJ23518	-1.438.036	0.034	0.19603604	-1.369.928	0	0.00000000
IL6ST	2.084.932	0.015	0.14414414	1.347.234	0.041	0.30582751
FLJ10849	-1.297.109	0.003	0.03376319	-1.313.394	0	0.00000000

continuação Tabela 02.

<i>Símbolo do gene</i>	<i>FOLD E2</i>	<i>pvalue E2</i>	<i>pFDR E2</i>	<i>FOLD T3</i>	<i>pvalue T3</i>	<i>pFDR T3</i>
EPSTI1	-2.724.138	0.02	0.17893756	-2.197.404	0	0.00000000
RNF40	-1.678.299	0.01	0.10126582	-1.428.004	0.036	0.27803701
OTUB1	-1.385.109	0.009	0.09290323	-1.398.616	0.046	0.33917051
GLUL	1.527.317	0.01	0.10126582	1.256.142	0.027	0.22796834
LGALS1	-1.373.636	0.031	0.19237233	-1.442.929	0	0.00000000
EMP1	-7.037.193	0.033	0.19531443	-3.041.958	0	0.00000000
RCOR1	1.419.123	0	0.00000000	1.431.969	0	0.00000000
SNX19	-1.689.973	0.039	0.20436681	-1.544.350	0	0.00000000
APPBP2	3.477.378	0.028	0.19186768	2.096.525	0.049	0.36018377
LOC124245	-1.715.465	0.036	0.19896373	-1.339.784	0	0.00000000
ACTR1A	-1.542.211	0	0.00000000	-1.363.675	0	0.00000000
PRO2730	-1.317.132	0	0.00000000	-1.253.881	0	0.00000000
AK1	-1.609.531	0	0.00000000	-1.525.878	0	0.00000000
NFIX	-1.534.746	0.03	0.19212809	-1.820.078	0	0.00000000
PEX12	1.292.317	0	0.00000000	1.329.515	0	0.00000000
ZNF565	1.550.786	0.03	0.19212809	1.504.204	0	0.00000000
FBXL10	1.803.751	0.028	0.19186768	1.507.962	0	0.00000000
PAX8	-1.502.120	0.036	0.19896373	-1.483.495	0.029	0.24166667
RAB31	3.389.330	0	0.00000000	1.671.334	0	0.00000000
PDGFC	-2.106.722	0.025	0.19186768	-1.853.176	0	0.00000000
TCERG1	1.441.229	0	0.00000000	1.375.542	0	0.00000000
TEGT	-2.124.318	0.027	0.19186768	-1.396.679	0	0.00000000
LOC348262	1.333.299	0.028	0.19186768	1.429.985	0.036	0.27803701
TSGA14	1.344.435	0	0.00000000	1.260.503	0	0.00000000
LASS2	-1.888.185	0.013	0.12813142	-1.694.665	0	0.00000000
LOC144501	2.385.018	0.033	0.19531443	1.719.513	0	0.00000000
KIAA1602	-1.321.338	0.048	0.23109328	-1.531.877	0	0.00000000
ABLIM1	2.781.764	0.034	0.19603604	1.975.202	0	0.00000000
CPNE1	1.491.744	0	0.00000000	1.209.994	0.031	0.25284622
UNG	-1.331.452	0.038	0.20232945	-1.459.020	0	0.00000000
ZNF482	-1.475.291	0	0.00000000	-1.432.962	0	0.00000000
EIF2C3	1.414.704	0	0.00000000	1.502.120	0	0.00000000
BTG2	-1.888.185	0	0.00000000	-1.476.314	0	0.00000000
REV1L	1.652.901	0	0.00000000	1.589.971	0	0.00000000

FLJ11336	1.725.483	0	0.00000000	1.715.941	0	0.00000000
KIAA1441	1.909.242	0.046	0.22530612	1.331.452	0	0.00000000
PPP1R13B	1.254.663	0.038	0.20232945	1.240.825	0	0.00000000
HNRPM	1.365.094	0	0.00000000	1.640.346	0	0.00000000
SSFA2	3.986.161	0.023	0.18936535	2.593.679	0.028	0.23496503
HUCEP11	-1.723.570	0	0.00000000	-1.478.362	0	0.00000000
IFNAR2	-2.799.172	0	0.00000000	-2.162.950	0	0.00000000
LPHN1	1.291.457	0.034	0.19603604	1.585.568	0	0.00000000
APG7L	1.729.074	0.026	0.19186768	1.697.016	0	0.00000000
MUF1	-1.616.843	0	0.00000000	-1.378.405	0	0.00000000
DEF6	-1.198.309	0.026	0.19186768	-1.135.557	0	0.00000000

continuação Tabela 02.

<i>Símbolo do gene</i>	<i>FOLD E2</i>	<i>pvalue E2</i>	<i>pFDR E2</i>	<i>FOLD T3</i>	<i>pvalue T3</i>	<i>pFDR T3</i>
PAK1	1.448.942	0	0.00000000	1.208.067	0	0.00000000
DKFZP564D0478	-1.333.299	0.04	0.20711974	-1.169.588	0.039	0.29272869
ODC1	-1.650.611	0.005	0.05423729	-1.531.558	0.034	0.27019868
NEDL2	1.625.631	0	0.00000000	1.491.744	0	0.00000000
XPO6	1.488.645	0.026	0.19186768	1.369.833	0.032	0.25880371
KTN1	1.580.083	0.012	0.11913133	1.857.034	0	0.00000000
GTF3C1	1.678.299	0	0.00000000	1.625.631	0	0.00000000
FLJ20105	-1.337.928	0.03	0.19212809	-1.319.508	0	0.00000000
NEDD5	-1.628.451	0	0.00000000	-1.301.793	0	0.00000000
ARL8	1.336.074	0	0.00000000	1.534.746	0.036	0.27803701
TNFSF13	2.121.375	0	0.00000000	1.834.008	0	0.00000000
FLJ22021	1.469.169	0	0.00000000	1.353.786	0	0.00000000
IRAK4	-1.234.734	0	0.00000000	-1.213.522	0	0.00000000
DRE1	1.421.092	0	0.00000000	1.268.391	0	0.00000000
PLOD	-1.595.490	0	0.00000000	-1.776.454	0	0.00000000
ZNF198	1.666.198	0.045	0.22233659	1.717.798	0	0.00000000
SLC11A2	1.262.252	0.01	0.10126582	1.297.739	0.036	0.27803701
PPP2CB	-1.295.941	0	0.00000000	-1.231.998	0.032	0.25880371
MRPS18A	1.264.003	0.03	0.19212809	1.315.855	0.038	0.28701810
SMT3H1	-1.543.280	0	0.00000000	-1.315.855	0	0.00000000
KIAA0446	-2.022.304	0.029	0.19186768	-1.617.763	0	0.00000000
ZNF581	-1.502.432	0.031	0.19237233	-1.158.534	0	0.00000000
SLC27A3	2.453.770	0.007	0.07450111	1.643.760	0	0.00000000
MGC4248	-1.370.783	0.03	0.19212809	-1.284.316	0	0.00000000
DDR1	-1.358.486	0.009	0.09290323	-1.303.147	0.036	0.27803701
SPEC1	-1.723.092	0	0.00000000	-1.741.101	0	0.00000000
VMP1	2.411.616	0.004	0.04408726	2.114.036	0	0.00000000
COL6A3	1.647.182	0.037	0.20056465	1.720.705	0	0.00000000
FLJ20643	-1.927.860	0.011	0.10988554	-1.749.570	0.036	0.27803701
AKAP1	1.318.594	0.008	0.08393443	1.580.083	0.03	0.24721030
KIAA1117	1.782.868	0	0.00000000	1.428.994	0	0.00000000
ZFP67	1.379.361	0	0.00000000	1.566.994	0	0.00000000

ATP2C1	1.660.940	0.05	0.23540951	1.677.136	0	0.00000000
CLIPR-59	1.333.114	0.034	0.19603604	1.336.815	0	0.00000000
GJA1	1.282.448	0.03	0.19212809	1.583.372	0	0.00000000
CHUK	1.230.888	0.032	0.19357278	1.352.848	0	0.00000000
ANKIB1	1.220.101	0.01	0.10126582	1.225.185	0.034	0.27019868
C11orf15	-1.710.004	0	0.00000000	-1.484.524	0	0.00000000
ORMDL3	1.962.918	0	0.00000000	1.375.542	0	0.00000000
FLJ20323	1.226.885	0.001	0.01163636	1.351.911	0.037	0.28190476
HLCS	-1.301.793	0.031	0.19237233	-1.148.300	0	0.00000000
FLJ20073	2.219.139	0	0.00000000	2.462.289	0	0.00000000
KIAA0157	-1.418.533	0.03	0.19212809	-1.212.009	0	0.00000000
ZNF42	1.379.361	0.026	0.19186768	1.269.271	0	0.00000000
SNX13	1.626.758	0.026	0.19186768	1.512.568	0	0.00000000

continuação Tabela 02.

<i>Símbolo do gene</i>	<i>FOLDE E2</i>	<i>pvalue E2</i>	<i>pFDR E2</i>	<i>FOLD T3</i>	<i>pvalue T3</i>	<i>pFDR T3</i>
BC002942	-1.361.314	0.023	0.18936535	-1.366.987	0	0.00000000
SLC30A4	1.263.390	0	0.00000000	1.479.388	0	0.00000000
TPD52	1.862.190	0	0.00000000	1.866.066	0	0.00000000
PQBP1	1.678.299	0.021	0.18260870	1.634.671	0	0.00000000
ARF6	1.266.634	0.037	0.20056465	1.280.760	0	0.00000000
GHITM	-1.304.955	0.045	0.22233659	-1.107.265	0.041	0.30582751
CRY2	1.328.686	0.047	0.22822458	1.573.525	0	0.00000000
NEK9	-1.277.214	0.039	0.20436681	-1.271.032	0.028	0.23496503
SPINT2	-1.215.879	0.033	0.19531443	-1.193.336	0	0.00000000
LOC115509	-1.312.211	0.028	0.19186768	-1.347.234	0	0.00000000
NEDL1	-1.565.909	0.007	0.07450111	-1.337.000	0	0.00000000
CDS2	-1.593.943	0.028	0.19186768	-1.504.308	0	0.00000000
ATIC	-1.164.734	0.004	0.04408726	-1.140.764	0	0.00000000
FLNB	3.123.146	0.001	0.01163636	1.931.873	0	0.00000000
DDX50	1.232.767	0	0.00000000	1.148.062	0	0.00000000
E2F2	1.110.339	0.05	0.23540951	1.120.389	0	0.00000000
BHC80	1.328.686	0	0.00000000	1.388.955	0.038	0.28701810
ODC-p	1.183.451	0	0.00000000	-1.102.287	0	0.00000000
HCCS	1.148.460	0	0.00000000	-1.156.688	0	0.00000000
CALM3	-1.262.252	0.021	0.18260870	-1.372.875	0	0.00000000
ACAT2	1.147.107	0.028	0.19186768	1.271.032	0	0.00000000
WDC1	-1.241.772	0.024	0.19136213	-1.208.653	0	0.00000000
FBXW1B	1.645.927	0	0.00000000	1.609.821	0	0.00000000
AMID	-1.350.974	0	0.00000000	-1.328.686	0	0.00000000
SLC27A2	1.256.142	0.008	0.08393443	1.249.196	0.016	0.13938294
CCNL2	1.721.898	0.034	0.19603604	1.541.142	0.035	0.27450980
CD207	2.540.830	0.044	0.21942857	1.932.274	0.029	0.24166667
RABIF	-1.517.819	0	0.00000000	-1.311.302	0	0.00000000
SLC39A7	1.662.092	0.038	0.20232945	1.786.332	0	0.00000000
HIAT1	1.536.875	0.012	0.11913133	1.205.808	0	0.00000000

ANKRD10	-2.108.183	0.041	0.20992000	-1.664.167	0	0.00000000
CLDN12	2.386.671	0	0.00000000	1.569.168	0	0.00000000
TCF7L1	-1.509.426	0.026	0.19186768	-1.316.128	0.03	0.24721030
MFHAS1	-1.604.362	0.029	0.19186768	-1.356.604	0	0.00000000
STXBP3	1.701.727	0.027	0.19186768	1.684.126	0.034	0.27019868
MIR	1.265.406	0.017	0.15844660	1.157.972	0	0.00000000
SGPL1	1.500.039	0	0.00000000	1.329.607	0	0.00000000
DDAH2	2.279.947	0.032	0.19357278	1.525.202	0.042	0.31159196
GSS	-1.760.518	0	0.00000000	-1.773.993	0	0.00000000
NDFIP1	-1.517.083	0	0.00000000	-1.330.806	0	0.00000000
MAPT	-3.138.336	0.04	0.20711974	-1.705.270	0.035	0.27450980
ACTR10	-1.261.377	0.042	0.21254613	-1.166.349	0	0.00000000
PRPH	1.602.140	0.02	0.17893756	1.265.757	0	0.00000000
CPSF5	1.810.013	0	0.00000000	1.518.872	0	0.00000000
KDEL3	1.424.050	0.05	0.23540951	1.400.556	0	0.00000000
HOMER1	1.422.275	0.002	0.02291169	1.417.059	0	0.00000000

continuação Tabela 02.

<i>Símbolo do gene</i>	<i>FOLDE2</i>	<i>pvalue E2</i>	<i>pFDR E2</i>	<i>FOLD T3</i>	<i>pvalue T3</i>	<i>pFDR T3</i>
FLJ20241	2.193.143	0.05	0.23540951	1.937.236	0	0.00000000
GALNAC4S-6ST	-1.913.216	0	0.00000000	-1.631.275	0	0.00000000
NUP107	1.557.249	0	0.00000000	1.356.604	0	0.00000000
NSE1	-1.765.406	0	0.00000000	-1.319.508	0	0.00000000
ZNF325	2.732.081	0.03	0.19212809	1.994.463	0	0.00000000
MTX1	-1.659.789	0.034	0.19603604	-1.244.012	0	0.00000000
LOC85865	1.776.454	0	0.00000000	1.813.781	0	0.00000000
MAX	-1.283.426	0.035	0.19741481	-1.156.688	0	0.00000000
ZFYVE21	1.267.513	0	0.00000000	1.502.120	0	0.00000000
PPP1R10	-2.062.794	0	0.00000000	-1.712.377	0	0.00000000
MGC33867	1.201.636	0.039	0.20436681	1.215.037	0.021	0.18211382
MOAP1	1.405.419	0	0.00000000	1.306.222	0	0.00000000
PSMD14	-1.298.639	0	0.00000000	-1.245.737	0	0.00000000
P24B	-1.239.708	0.026	0.19186768	-1.339.784	0.043	0.31851852
NRXN3	1.413.626	0.042	0.21254613	1.484.935	0.029	0.24166667
TARBP1	1.475.291	0.028	0.19186768	1.435.945	0.029	0.24166667
MOKA	-1.323.814	0	0.00000000	-1.278.720	0	0.00000000
DHCR24	-3.931.282	0.025	0.19186768	-2.226.843	0	0.00000000
NALP7	-1.837.826	0	0.00000000	-2.561.520	0	0.00000000
CABC1	1.432.962	0	0.00000000	1.438.934	0	0.00000000
HSPC117	1.279.872	0	0.00000000	1.243.150	0	0.00000000
PTCD2	-1.371.448	0.037	0.20056465	-1.233.707	0	0.00000000
FLJ20254	1.905.276	0.029	0.19186768	1.570.256	0	0.00000000
CML66	2.039.195	0.002	0.02291169	1.840.375	0	0.00000000
MBD1	-1.684.126	0.013	0.12813142	-1.478.362	0	0.00000000
PRPF4B	1.471.207	0.027	0.19186768	1.430.977	0	0.00000000
DLG5	1.469.169	0.027	0.19186768	1.234.991	0	0.00000000

OLFM1	1.484.524	0.014	0.13644670	1.337.928	0	0.00000000
MGC2747	-1.382.232	0.025	0.19186768	-1.322.255	0	0.00000000
TORC3	1.387.897	0.009	0.09290323	1.348.168	0.025	0.21371327
KIAA1737	1.201.636	0	0.00000000	1.341.642	0	0.00000000
MYC	3.719.220	0	0.00000000	2.250.117	0.029	0.24166667
ATP11B	-1.946.659	0.031	0.19237233	-1.343.503	0	0.00000000
KIAA1924	-1.949.359	0.035	0.19741481	-2.308.571	0	0.00000000
FLOT2	-1.384.821	0.029	0.19186768	-1.429.291	0	0.00000000
RCN2	1.630.145	0.034	0.19603604	1.387.993	0	0.00000000
TIPARP	1.264.003	0.018	0.16535885	1.150.372	0	0.00000000
LRBA	2.190.105	0.019	0.17256386	1.742.308	0	0.00000000
PIAS1	1.313.758	0.014	0.13644670	1.249.196	0.045	0.33256351
DKFZP434P0316	-1.332.375	0.045	0.22233659	-1.377.450	0	0.00000000
PHKB	-1.581.178	0.04	0.20711974	-1.426.026	0	0.00000000
RW1	1.212.513	0	0.00000000	1.320.423	0	0.00000000
CA11	1.484.524	0	0.00000000	1.846.765	0.034	0.27019868
RER1	-1.186.737	0.025	0.19186768	-1.137.605	0.03	0.24721030
ATP8B2	-1.302.244	0	0.00000000	-1.515.717	0	0.00000000
C10orf45	-2.048.120	0	0.00000000	-1.465.406	0	0.00000000

continuação Tabela 02.

<i>Símbolo do gene</i>	<i>FOLD E2</i>	<i>pvalue E2</i>	<i>pFDR E2</i>	<i>FOLD T3</i>	<i>pvalue T3</i>	<i>pFDR T3</i>
BCL2L13	-1.123.500	0	0.00000000	-1.139.183	0	0.00000000
CLDN6	2.531.513	0	0.00000000	2.361.985	0	0.00000000
CCNL1	1.627.548	0.04	0.20711974	1.633.198	0	0.00000000
CS	-1.462.057	0.027	0.19186768	-1.346.113	0	0.00000000
CHC1	2.617.156	0.018	0.16535885	1.785.094	0	0.00000000
TEKT3	1.232.852	0.004	0.04408726	1.484.524	0	0.00000000
SYNCRIP	1.209.156	0.027	0.19186768	1.273.677	0	0.00000000
C21orf97	1.880.348	0.03	0.19212809	1.585.568	0	0.00000000
C21orf59	-1.960.199	0	0.00000000	-1.416.175	0	0.00000000
STAR	1.221.793	0.032	0.19357278	1.282.537	0.027	0.22796834
C9orf83	1.922.522	0.031	0.19237233	1.614.402	0	0.00000000
CAB39L	1.338.855	0.022	0.18575198	1.243.494	0	0.00000000
UGCGL1	-1.564.824	0.01	0.10126582	-1.298.639	0.032	0.25880371
DGAT2	1.499.000	0.039	0.20436681	1.722.853	0.019	0.16521739
HECA	2.153.973	0	0.00000000	1.905.276	0	0.00000000
PPARA	-1.450.952	0	0.00000000	-1.511.415	0	0.00000000
CDK2AP1	1.626.420	0.031	0.19237233	1.623.042	0	0.00000000
GART	2.115.059	0.033	0.19531443	1.602.140	0	0.00000000
AREG	18.126.142	0	0.00000000	3.630.077	0	0.00000000
PADI2	1.319.508	0.03	0.19212809	1.686.462	0	0.00000000
COMT	-1.700.548	0.028	0.19186768	-1.481.440	0	0.00000000
OCLN	-1.575.708	0	0.00000000	-1.257.013	0	0.00000000
USP12	1.239.708	0.028	0.19186768	1.335.343	0	0.00000000

FOLD = diferença de expressão; *pvalue* = valor de significância do teste T Student; *pFDR* = valor do falso discovery ratio

ANEXO 05.**Tabela 03:** 144 genes modulados por E2 e T3 nas células MDA-MB-231 com $p < 0,05$.

<i>Símbolo do gene</i>	<i>FOLD E2</i>	<i>pvalue E2</i>	<i>pFDR E2</i>	<i>FOLD T3</i>	<i>pvalue T3</i>	<i>pFDR T3</i>
M17S2	-1.358.483	0.003000	0.11076923	-1.355.165	0.026100	0.35899642
NXF1	-1.324.634	0.000000	0.00000000	-1.405.991	0.000000	0.00000000
TDE2L	-1.624.950	0.036000	0.52844037	-2.221.112	0.015800	0.29741176
LOC144501	-1.414.874	0.018000	0.46829268	-1.400.154	0.000000	0.00000000
SLC4A5	1.556.748	0.000000	0.00000000	2.148.322	0.000000	0.00000000
ACADSB	1.389.787	0.036000	0.52844037	1.157.581	0.000000	0.00000000
C10orf97	1.205.042	0.035000	0.52582160	1.312.408	0.027300	0.35899642
CREBBP	-1.350.147	0.020000	0.50928382	-1.401.159	0.030000	0.35899642
FLJ25476	-1.342.175	0.000000	0.00000000	-1.780.664	0.000000	0.00000000
CKTSF1B1	2.746.024	0.010000	0.29179331	2.342.383	0.015900	0.29754386
VRK3	-1.416.140	0.000000	0.00000000	-1.465.425	0.000000	0.00000000
RNF121	-1.420.352	0.036000	0.52844037	-1.368.463	0.027400	0.35899642
FLJ13052	-2.420.874	0.030000	0.51029900	-3.583.452	0.000000	0.00000000
LRP10	-1.505.793	0.000000	0.00000000	-1.873.249	0.000000	0.00000000
KIAA0892	-1.203.063	0.009000	0.27084639	-1.295.043	0.026600	0.35899642
IBRDC3	-1.458.077	0.009000	0.27084639	-2.199.921	0.026600	0.35899642
FLJ10006	1.116.412	0.038000	0.53100437	1.217.624	0.010900	0.21937107
RAI17	1.517.808	0.014000	0.37752809	1.305.313	0.028000	0.35899642
GOLPH2	-1.443.543	0.032000	0.51029900	-1.426.547	0.000000	0.00000000
FBXO7	1.556.748	0.000000	0.00000000	2.104.002	0.006400	0.14189376
PSMD7	1.268.635	0.001000	0.03902439	1.171.637	0.000000	0.00000000

HT007	1.344.975	0.004000	0.14117647	1.394.740	0.028200	0.35899642
C1orf21	1.234.351	0.036000	0.52844037	1.671.286	0.029200	0.35899642
TGFB114	-1.193.184	0.044000	0.57081081	-1.367.561	0.015300	0.29027668
TXNIP	-2.020.598	0.000000	0.00000000	-2.120.630	0.029800	0.35899642
HNRPU	-1.231.590	0.025000	0.51029900	-1.262.616	0.044400	0.45009504
C9orf74	2.711.214	0.031000	0.51029900	2.373.314	0.030500	0.35899642
ACSL3	1.825.665	0.000000	0.00000000	2.081.117	0.000000	0.00000000
JMJD3	-1.546.246	0.032000	0.51029900	-1.903.132	0.000000	0.00000000
OSR2	3.170.475	0.027000	0.51029900	2.409.440	0.041500	0.42941935
KIAA0152	-1.413.467	0.000000	0.00000000	-1.502.545	0.000000	0.00000000
RIPK1	-1.313.562	0.044000	0.57081081	-1.456.867	0.008100	0.17513514
COG4	-1.844.491	0.000000	0.00000000	-1.919.680	0.000000	0.00000000
SPON1	-1.280.414	0.010000	0.29179331	-1.770.004	0.000000	0.00000000
APLN	1.234.351	0.029000	0.51029900	1.548.547	0.000000	0.00000000
SDBCAG84	-1.712.939	0.029000	0.51029900	-1.436.224	0.000000	0.00000000
FLJ20308	-1.419.431	0.000000	0.00000000	-1.397.515	0.005300	0.11943662
ORC3L	1.286.438	0.007000	0.22474916	1.589.273	0.000000	0.00000000
TERF2IP	2.012.071	0.028000	0.51029900	2.003.862	0.000000	0.00000000
ELK3	1.324.236	0.000000	0.00000000	1.527.866	0.000000	0.00000000
STK24	-1.530.551	0.038000	0.53100437	-1.240.815	0.004600	0.10770732
NAP1L5	2.658.735	0.000000	0.00000000	2.964.901	0.024000	0.35899642
ZNF266	1.715.888	0.000000	0.00000000	1.621.234	0.000000	0.00000000
FBXO23	-1.502.526	0.028000	0.51029900	-1.417.644	0.042400	0.43580300
GTF3C4	1.374.476	0.030000	0.51029900	1.182.633	0.000000	0.00000000
STAM	1.350.035	0.000000	0.00000000	1.374.287	0.047800	0.46248175

Continuação Tabela 03

<i>Símbolo do gene</i>	<i>FOLD E2</i>	<i>pvalue E2</i>	<i>pFDR E2</i>	<i>FOLD T3</i>	<i>pvalue T3</i>	<i>pFDR T3</i>
ACN9	1.424.290	0.013000	0.35965418	1.599.796	0.000000	0.00000000
CELSR2	-1.551.048	0.038000	0.53100437	-1.852.931	0.028800	0.35899642
ISLR	1.537.299	0.041000	0.55671853	-1.341.994	0.000000	0.00000000
HADHA	-1.276.902	0.029000	0.51029900	-1.575.966	0.039900	0.41816594
MFN2	-1.234.783	0.000000	0.00000000	-1.504.449	0.000000	0.00000000
HADHA	1.596.506	0.043000	0.56547945	1.295.952	0.034100	0.37412571
SPPL3	-1.211.532	0.028000	0.51029900	-1.444.331	0.000000	0.00000000
C20orf110	1.299.424	0.000000	0.00000000	1.544.729	0.034400	0.37527273
CEBPG	-1.595.164	0.000000	0.00000000	-1.371.050	0.002800	0.06822335
MRPS21	1.597.395	0.026000	0.51029900	1.573.524	0.028900	0.35899642
PITPNM2	1.596.506	0.043000	0.56547945	1.316.541	0.029400	0.35899642
BAT5	-1.409.147	0.021000	0.51029900	-1.574.274	0.000000	0.00000000
SPINT2	-1.589.507	0.000000	0.00000000	-1.744.943	0.005800	0.13009346
P4HB	-1.628.383	0.038000	0.53100437	-1.703.475	0.000000	0.00000000
FLJ21977	2.350.261	0.044000	0.57081081	2.131.560	0.001900	0.04943089
NEURL	-2.602.402	0.050000	0.59925094	-3.399.461	0.046000	0.46192469
C20orf11	-1.507.631	0.009000	0.27084639	-1.295.404	0.000000	0.00000000
CTL2	-1.401.407	0.029000	0.51029900	-1.647.412	0.028600	0.35899642
RUNDC1	1.477.420	0.027000	0.51029900	1.763.603	0.000000	0.00000000

MGC19595	1.790.616	0.000000	0.00000000	1.631.420	0.018000	0.32851711
CYP11A1	-1.515.817	0.000000	0.00000000	-1.632.299	0.048300	0.46248175
RNASEH1	1.521.334	0.024000	0.51029900	1.407.000	0.000000	0.00000000
LOC51320	-1.171.951	0.028000	0.51029900	-1.295.728	0.000000	0.00000000
CRNKL1	1.276.569	0.026000	0.51029900	1.361.781	0.000000	0.00000000
ODZ4	1.224.301	0.000000	0.00000000	1.449.468	0.000000	0.00000000
BAP1	1.733.995	0.037000	0.52935917	1.549.644	0.005100	0.11601896
SORT1	1.826.531	0.032000	0.51029900	2.375.953	0.002100	0.05361702
SLC37A1	2.052.628	0.000000	0.00000000	2.443.942	0.000000	0.00000000
ZDHHC6	1.480.929	0.005000	0.16961131	1.614.813	0.000000	0.00000000
MRPL47	2.324.390	0.000000	0.00000000	2.541.112	0.000000	0.00000000
MGC17301	1.217.142	0.010000	0.29179331	1.141.015	0.008700	0.18477876
DHX9	-1.298.404	0.017000	0.44958678	-1.167.245	0.010300	0.21128205
LYAR	1.315.391	0.023000	0.51029900	1.358.882	0.021100	0.35899642
C13orf1	2.014.463	0.022000	0.51029900	-1.184.708	0.000000	0.00000000
CAPS	-1.961.376	0.036000	0.52844037	-2.114.465	0.000000	0.00000000
ODF2	1.550.650	0.029000	0.51029900	1.296.084	0.000000	0.00000000
CASP3	1.132.754	0.041000	0.55671853	1.207.186	0.029900	0.35899642
AKAP7	2.346.572	0.000000	0.00000000	1.181.984	0.000000	0.00000000
SFRS10	1.249.977	0.000000	0.00000000	1.299.208	0.019700	0.35152416
SOX17	2.658.735	0.000000	0.00000000	2.622.546	0.000000	0.00000000
MAP3K12	1.597.395	0.030000	0.51029900	3.030.635	0.027800	0.35899642
LOC162427	-1.468.379	0.000000	0.00000000	-1.687.180	0.000000	0.00000000
M11S1	-1.087.023	0.026000	0.51029900	1.061.192	0.010200	0.21012876
ACSL6	1.933.278	0.033000	0.51179321	2.060.075	0.029400	0.35899642
FLJ20241	-1.364.685	0.048000	0.58925831	-1.776.495	0.000000	0.00000000
LYSAL1	-1.247.682	0.039000	0.53638968	-1.510.435	0.000000	0.00000000
HEXB	1.360.366	0.006000	0.19793814	1.603.876	0.029900	0.35899642

Continuação Tabela 03

<i>Símbolo do gene</i>	<i>FOLD E2</i>	<i>pvalue E2</i>	<i>pFDR E2</i>	<i>FOLD T3</i>	<i>pvalue T3</i>	<i>pFDR T3</i>
NPEPL1	-1.588.460	0.006000	0.19793814	-1.882.087	0.020500	0.35899642
TRIM31	-1.615.983	0.029000	0.51029900	-2.947.114	0.029200	0.35899642
SLC19A2	1.261.107	0.033000	0.51179321	1.272.187	0.026900	0.35899642
PHAX	1.333.329	0.028000	0.51029900	1.521.208	0.000000	0.00000000
PTTG1IP	-1.902.576	0.018000	0.46829268	-1.675.245	0.004800	0.11157385
PGR1	-1.332.379	0.027000	0.51029900	-1.279.321	0.027300	0.35899642
MTX1	-1.299.199	0.000000	0.00000000	-1.437.900	0.000000	0.00000000
ITGAM	-1.247.452	0.000000	0.00000000	-1.502.832	0.031600	0.35915294
RNF19	1.801.523	0.037000	0.52935917	1.701.171	0.023400	0.35899642
LTBP3	-1.615.983	0.000000	0.00000000	-2.337.448	0.015500	0.29291339
PWP1	1.193.845	0.041000	0.55671853	1.141.887	0.000000	0.00000000
PAK6	1.190.481	0.030000	0.51029900	1.519.403	0.000000	0.00000000
MRE11A	2.062.553	0.043000	0.56547945	2.435.238	0.008900	0.18819383
KIAA0261	-1.278.440	0.000000	0.00000000	-1.184.916	0.026500	0.35899642
EST1B	-1.482.564	0.000000	0.00000000	-1.573.044	0.000000	0.00000000

MOV10	-1.373.235	0.000000	0.00000000	-1.505.122	0.000000	0.00000000
C20orf3	-1.562.597	0.000000	0.00000000	-1.590.284	0.026700	0.35899642
CDC16	1.231.301	0.000000	0.00000000	1.229.597	0.045300	0.45632739
LOC113444	1.887.686	0.000000	0.00000000	1.739.545	0.000000	0.00000000
PSME3	1.224.025	0.033000	0.51179321	1.321.863	0.014200	0.27264000
SCRN3	1.448.785	0.000000	0.00000000	1.311.750	0.000000	0.00000000
FLJ32452	-1.412.547	0.028000	0.51029900	-2.106.398	0.000000	0.00000000
ECM2	1.360.395	0.003000	0.11076923	1.394.811	0.000000	0.00000000
ARHGEF15	2.772.309	0.036000	0.52844037	2.500.764	0.000000	0.00000000
GEMIN4	1.667.349	0.027000	0.51029900	1.550.894	0.042900	0.43812766
HYPC	2.117.747	0.033000	0.51179321	1.865.140	0.036100	0.38765101
XAB2	1.316.344	0.028000	0.51029900	1.282.063	0.028900	0.35899642
CAMP	-1.840.107	0.030000	0.51029900	-2.063.783	0.025200	0.35899642
PTGS1	2.700.778	0.028000	0.51029900	2.198.394	0.047500	0.46248175
MGC3121	-1.215.458	0.017000	0.44958678	-1.551.849	0.000000	0.00000000
HADHSC	1.275.334	0.042000	0.56234310	1.305.784	0.021200	0.35899642
GRTP1	2.623.799	0.036000	0.52844037	2.159.724	0.027800	0.35899642
PIK3R3	-1.417.041	0.000000	0.00000000	-1.293.565	0.000000	0.00000000
NFE2L1	-1.603.824	0.031000	0.51029900	-2.055.679	0.000000	0.00000000
LOC196337	1.411.960	0.000000	0.00000000	1.451.156	0.000000	0.00000000
CKAP4	-1.353.021	0.003000	0.11076923	-1.385.852	0.000000	0.00000000
MGAT4B	-1.309.797	0.004000	0.14117647	-1.819.292	0.000000	0.00000000
MGC5391	-2.694.562	0.045000	0.57908847	-2.946.467	0.046400	0.46248175
FBXL5	1.913.620	0.030000	0.51029900	1.890.684	0.026500	0.35899642
CCNI	-1.333.935	0.024000	0.51029900	-1.226.354	0.032100	0.36084309
SPAG4	1.242.258	0.029000	0.51029900	1.356.624	0.010100	0.20896552
C21orf97	-1.411.320	0.043000	0.56547945	-1.846.063	0.000000	0.00000000
NACA	-1.505.794	0.000000	0.00000000	-2.432.256	0.034600	0.37659864
SCNN1A	1.522.459	0.000000	0.00000000	1.916.637	0.000000	0.00000000
MDS028	-1.823.261	0.032000	0.51029900	-1.660.518	0.000000	0.00000000
STXBP2	-1.287.686	0.000000	0.00000000	-1.601.944	0.000000	0.00000000

Continuação Tabela 03

<i>Símbolo do gene</i>	<i>FOLD E2</i>	<i>pvalue E2</i>	<i>pFDR E2</i>	<i>FOLD T3</i>	<i>pvalue T3</i>	<i>pFDR T3</i>
MKL1	1.933.339	0.029000	0.51029900	1.772.961	0.005000	0.11455847
KIAA1190	-1.323.010	0.047000	0.58673602	-1.606.815	0.034100	0.37412571

FOLD = diferença de expressão; *pvalue* = valor de significância do teste T Student; *pFDR* = valor do falso discovery ratio

ANEXO 06.**Tabela 04:** 144 genes modulados por E2 e T3 nas células S30 com $p < 0,05$.

<i>Símbolo do gene</i>	<i>FOLD E2</i>	<i>pvalue E2</i>	<i>pFDR E2</i>	<i>FOLD T3</i>	<i>pvalue T3</i>	<i>pFDR T3</i>
DDEF2	1.440.630	0	0.0000000	1.636.938	0	0.0000000
LPIN1	1.477.338	0	0.0000000	1.475.291	0	0.0000000
RIG-I	-1.240.567	0	0.0000000	-1.213.354	0	0.0000000
CKLFSF4	-1.868.655	0	0.0000000	-1.552.938	0	0.0000000
CYP1B1	2.909.961	0	0.0000000	2.211.461	0	0.0000000
SKP1A	-1.206.560	0	0.0000000	-1.334.223	0	0.0000000
C14orf109	1.569.168	0.036	0.6041958	1.536.875	0.048	0.7783784
DKFZP434C212	-1.542.211	0	0.0000000	-1.401.527	0	0.0000000
DNPEP	-1.051.027	0	0.0000000	-1.100.226	0	0.0000000
TTYH3	1.778.918	0	0.0000000	1.906.597	0	0.0000000
SERTAD4	-1.102.669	0	0.0000000	-1.195.820	0	0.0000000
NSMAF	1.236.704	0	0.0000000	1.287.525	0	0.0000000
LASS5	1.264.880	0	0.0000000	1.320.423	0	0.0000000
DPF2	-1.241.514	0	0.0000000	-1.236.361	0	0.0000000
ZNF20	1.333.299	0	0.0000000	1.247.466	0	0.0000000
FUCA1	1.786.332	0	0.0000000	1.743.516	0	0.0000000
KIAA1414	1.443.609	0.024	0.4430769	2.208.398	0.031	0.5410909
FLJ22471	1.188.383	0	0.0000000	1.256.142	0	0.0000000
MGC61571	1.171.210	0	0.0000000	1.171.210	0.033	0.5647059
SAS10	-1.239.020	0	0.0000000	-1.252.404	0	0.0000000
SCD	1.790.050	0	0.0000000	1.670.176	0	0.0000000
S100A6	-1.321.338	0.025	0.4580153	-1.396.679	0	0.0000000
VCP	-1.399.974	0	0.0000000	-1.374.970	0	0.0000000
CL25022	-1.264.880	0	0.0000000	-1.281.648	0	0.0000000
CD5	-1.335.148	0	0.0000000	-1.447.938	0	0.0000000
C3	1.569.168	0.032	0.5575318	2.013.911	0.031	0.5410909
DKFZP586N0721	-1.450.349	0	0.0000000	-1.308.034	0	0.0000000
C14orf170	-1.542.211	0	0.0000000	-1.603.251	0	0.0000000
SEC8L1	1.250.929	0	0.0000000	1.463.071	0	0.0000000
FGFR2	1.301.973	0	0.0000000	1.629.015	0	0.0000000
NXT1	-1.173.567	0	0.0000000	-1.384.054	0	0.0000000
MAN1A2	1.479.388	0.025	0.4580153	1.502.120	0.041	0.6774527
DDEF1	1.373.636	0	0.0000000	1.310.393	0	0.0000000
OSR2	1.494.849	0	0.0000000	1.265.757	0	0.0000000
SPAG9	-1.225.185	0	0.0000000	-1.154.285	0	0.0000000
ANKRD27	1.387.031	0.03	0.5303867	1.510.473	0	0.0000000
RIF1	-1.529.860	0	0.0000000	-1.512.987	0	0.0000000
ADIPOR2	1.204.388	0	0.0000000	1.232.169	0	0.0000000
CD59	1.188.383	0.03	0.5303867	1.201.636	0.042	0.6868825
SAT	1.906.729	0	0.0000000	3.460.787	0	0.0000000
FLJ14957	1.249.196	0	0.0000000	1.568.081	0.02	0.3650190
KIAA0446	-1.205.808	0	0.0000000	-1.191.683	0	0.0000000

KIAA1109	1.309.485	0	0.0000000	1.317.680	0	0.0000000
PRO0971	-1.304.684	0	0.0000000	-1.316.128	0	0.0000000
STK24	1.376.496	0.027	0.4863039	1.241.427	0	0.0000000

Continuação Tabela 03

<i>Símbolo do gene</i>	<i>FOLD E2</i>	<i>pvalue E2</i>	<i>pFDR E2</i>	<i>FOLD T3</i>	<i>pvalue T3</i>	<i>pFDR T3</i>
SLC14A1	1.613.284	0	0.0000000	1.496.923	0	0.0000000
ZNF216	1.229.439	0	0.0000000	1.327.765	0	0.0000000
RASA1	1.286.097	0	0.0000000	1.335.148	0	0.0000000
RGS2	-1.361.314	0	0.0000000	-1.366.987	0	0.0000000
CAPN2	1.406.393	0	0.0000000	1.258.757	0	0.0000000
FLJ11301	-1.434.850	0	0.0000000	-1.346.300	0	0.0000000
MGST3	-1.275.887	0	0.0000000	-1.261.815	0	0.0000000
TRIM32	1.140.764	0	0.0000000	1.156.688	0	0.0000000
OSBPL7	1.539.007	0.012	0.2267717	1.484.524	0	0.0000000
NEK9	-1.120.389	0	0.0000000	-1.187.724	0	0.0000000
NUPL1	-1.216.301	0	0.0000000	-1.247.898	0	0.0000000
CDK10	1.269.271	0	0.0000000	1.459.020	0	0.0000000
E2F2	1.353.786	0	0.0000000	1.328.686	0.026	0.4674157
RAE1	-1.353.786	0	0.0000000	-1.421.092	0.03	0.5323475
CREM	-1.220.439	0	0.0000000	-1.429.985	0	0.0000000
MACF1	1.221.793	0.028	0.4987013	1.360.371	0	0.0000000
CARS	1.167.158	0	0.0000000	1.691.145	0	0.0000000
KLK2	-2.092.170	0	0.0000000	-1.796.265	0	0.0000000
XRN2	1.148.698	0	0.0000000	1.139.973	0	0.0000000
PUM2	1.337.928	0	0.0000000	1.295.043	0	0.0000000
TOP2A	1.582.275	0	0.0000000	1.525.202	0	0.0000000
MORF4L2	-1.398.616	0.034	0.5807829	-1.360.371	0.036	0.6063158
PCM1	1.400.556	0	0.0000000	1.445.932	0	0.0000000
PEMT	1.360.371	0	0.0000000	1.155.887	0	0.0000000
NEDD9	1.424.050	0	0.0000000	1.938.580	0	0.0000000
C3orf1	-1.425.630	0	0.0000000	-1.300.080	0	0.0000000
HNRPA2B1	1.211.589	0.038	0.6257290	1.533.683	0.03	0.5323475
SFPQ	1.655.194	0	0.0000000	2.446.976	0	0.0000000
NBS1	1.273.236	0	0.0000000	1.154.285	0	0.0000000
IPO7	-1.289.668	0	0.0000000	-1.262.252	0	0.0000000
FLJ10700	-1.550.786	0	0.0000000	-1.592.176	0	0.0000000
PMPCB	1.274.561	0.02	0.3742690	1.172.022	0.026	0.4674157
CCNG2	1.451.958	0	0.0000000	1.313.121	0	0.0000000
GALNT11	1.234.563	0	0.0000000	1.315.855	0	0.0000000
GDI2	1.208.402	0	0.0000000	1.162.395	0	0.0000000
SGK	-1.790.050	0	0.0000000	-1.205.808	0	0.0000000
SKB1	1.160.141	0	0.0000000	1.169.831	0	0.0000000
UBE2J1	-1.189.207	0	0.0000000	-1.216.722	0	0.0000000
TPBG	1.622.254	0	0.0000000	1.962.918	0	0.0000000
AFAP	1.173.648	0	0.0000000	1.177.723	0	0.0000000
AP3M2	1.441.929	0	0.0000000	1.626.758	0	0.0000000
GTL3	-1.079.602	0	0.0000000	-1.237.476	0	0.0000000

RPL18	-1.475.291	0	0.0000000	-1.434.950	0.049	0.7919192
M11S1	-1.194.991	0	0.0000000	-1.242.288	0	0.0000000
VLDLR	-2.106.722	0	0.0000000	-1.987.562	0	0.0000000
RBAF600	-1.257.013	0	0.0000000	-1.180.993	0	0.0000000
PLXND1	1.453.973	0	0.0000000	2.070.530	0	0.0000000
GALNAC4S-6ST	1.627.209	0	0.0000000	1.494.228	0	0.0000000

Continuação Tabela 03

<i>Símbolo do gene</i>	<i>FOLD E2</i>	<i>pvalue E2</i>	<i>pFDR E2</i>	<i>FOLD T3</i>	<i>pvalue T3</i>	<i>pFDR T3</i>
ASAH1	1.437.937	0	0.0000000	1.280.316	0	0.0000000
PTTG1IP	1.547.565	0	0.0000000	1.815.038	0	0.0000000
ARHGAP4	-1.370.783	0	0.0000000	-1.518.872	0	0.0000000
MRPL27	-1.317.680	0	0.0000000	-1.380.509	0	0.0000000
ACTR1B	1.345.367	0	0.0000000	1.356.604	0	0.0000000
USP52	1.325.007	0	0.0000000	1.660.940	0	0.0000000
KIAA1450	-1.190.857	0	0.0000000	-1.265.844	0	0.0000000
ZNF75A	1.480.926	0	0.0000000	1.606.254	0	0.0000000
FLJ22649	-1.537.941	0.035	0.5936396	-1.473.248	0.044	0.7159322
TARBP1	1.520.979	0	0.0000000	1.331.452	0	0.0000000
WDR26	1.350.880	0	0.0000000	1.415.096	0	0.0000000
THAP11	1.283.248	0	0.0000000	1.703.852	0.033	0.5647059
ARL1	1.225.185	0	0.0000000	1.295.941	0	0.0000000
GOLGA5	-1.306.131	0	0.0000000	-1.262.515	0.023	0.4181818
NCOA6	-1.273.677	0	0.0000000	-1.218.410	0	0.0000000
ITGB5	1.588.428	0.027	0.4863039	1.580.849	0	0.0000000
BCAS2	-1.138.394	0	0.0000000	-1.176.091	0.015	0.2748092
UACA	1.627.886	0	0.0000000	1.448.942	0	0.0000000
KLK4	1.384.150	0	0.0000000	1.576.800	0	0.0000000
MADH5	1.464.086	0	0.0000000	1.301.342	0	0.0000000
CDA08	1.464.086	0	0.0000000	1.409.321	0	0.0000000
PSME3	-1.463.071	0	0.0000000	-1.326.845	0	0.0000000
MGAM	-1.281.204	0	0.0000000	-1.343.969	0	0.0000000
ITGB1	1.490.710	0	0.0000000	1.373.636	0.032	0.5525180
FLJ11106	-1.183.287	0	0.0000000	-1.545.421	0	0.0000000
SH3KBP1	1.238.849	0	0.0000000	-1.307.671	0	0.0000000
CGGBP1	1.360.371	0	0.0000000	1.209.156	0	0.0000000
RCN2	1.180.256	0	0.0000000	1.164.007	0	0.0000000
PPP1R12A	1.328.686	0	0.0000000	1.591.073	0	0.0000000
SPRED2	1.462.057	0.032	0.5575318	1.492.778	0.033	0.5647059
GRTP1	1.394.744	0	0.0000000	1.375.542	0	0.0000000
MAPK14	1.236.275	0	0.0000000	1.090.508	0	0.0000000
AASDHPPT	-1.318.594	0	0.0000000	-1.444.930	0.041	0.6774527
ALG3	-1.107.418	0	0.0000000	-1.146.233	0	0.0000000
SLC6A14	1.312.757	0	0.0000000	1.212.177	0	0.0000000
POLR2H	-1.304.955	0	0.0000000	-1.505.247	0	0.0000000
FLJ11184	-1.280.849	0	0.0000000	-1.278.188	0	0.0000000
RNF40	-1.466.727	0.037	0.6134715	-1.684.826	0	0.0000000

MDM2	1.245.737	0	0.0000000	1.068.806	0	0.0000000
CPD	1.795.020	0	0.0000000	2.191.624	0	0.0000000
RPA2	-1.385.109	0.025	0.4580153	-1.455.990	0	0.0000000
COQ4	1.237.990	0	0.0000000	1.179.357	0	0.0000000
FLJ10871	1.304.322	0	0.0000000	1.369.738	0	0.0000000
MAPRE2	-1.635.351	0	0.0000000	-1.427.608	0	0.0000000
GTF2A2	-1.180.174	0	0.0000000	-1.245.737	0	0.0000000
FEN1	-1.298.639	0.033	0.5687612	-1.443.929	0	0.0000000
HECA	1.376.496	0.05	0.8026756	1.396.679	0.03	0.5323475

Continuação Tabela 03

<i>Símbolo do gene</i>	<i>FOLD E2</i>	<i>pvalue E2</i>	<i>pFDR E2</i>	<i>FOLD T3</i>	<i>pvalue T3</i>	<i>pFDR T3</i>
TXNL2	-1.271.913	0	0.0000000	-1.349.103	0	0.0000000

FOLD = diferença de expressão; *pvalue* = valor de significância do teste T Student; *pFDR* = valor do *falso discovery ratio*

ANEXO 7:

Ofício de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)