

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

**PESQUISA DOS RECEPTORES DE ESTRÓGENO (RE) E DO  
RECEPTOR DA PROGESTERONA (RP) *IN VIVO* E  
VERIFICAÇÃO DA INFLUÊNCIA DESTES HORMÔNIOS *IN*  
*VITRO* EM DUAS LINHAGENS DE ADENOMAS  
PLEOMÓRFICOS**

**ARTUR ABURAD DE CARVALHOSA**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da  
Universidade de São Paulo, para obter o Título de  
Doutor, pelo Programa de Pós-graduação em  
Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal

São Paulo

2001

Data da Defesa \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## **Banca Examinadora**

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Julgamento \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Julgamento \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Julgamento \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Julgamento \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Julgamento \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

**PESQUISA DOS RECEPTORES DE ESTRÓGENO (RE) E DO  
RECEPTOR DA PROGESTERONA (RP) *IN VIVO* E  
VERIFICAÇÃO DA INFLUÊNCIA DESTES HORMÔNIOS *IN*  
*VITRO* EM DUAS LINHAGENS DE ADENOMAS  
PLEOMÓRFICOS**

**ARTUR ABURAD DE CARVALHOSA**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da  
Universidade de São Paulo, para obter o Título de  
Doutor, pelo Programa de Pós-graduação em  
Odontologia.

Área de Concentração: em Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto

Júnior

São Paulo

2001

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo milagre da vida,  
o poder vislumbrar através dos sentidos,  
a explosão que surge na mistura de sons, cores, cheiros, sabores, texturas e amores ...  
numa incontestável confirmação do “ser” vivo, presente e maravilhosamente  
mutante.

Agradeço aos encontros e desencontros que a vida me proporciona, ao calor da luta,  
a mão cega que por vezes executa, mas acima de tudo ao coração manso que  
perdoa...

(Aretuza 2001)

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Tadeu e Célia pelo amor e apoio incondicional, sem o qual seria impossível chegar aonde cheguei.

A minha querida avó Helena pela dedicação em minha criação, irmãos e irmãs pelo amor que sentimos uns pelos outros.

Aos meus avós Nelson, Arlindo e Marina (*post mortem*) por dedicarem suas vidas à nossa família.

Ao meu pai Augusto, pelos momentos agradáveis que tivemos juntos.

Ao Prof. Dr. Décio pela amizade e pelo valoroso apoio em prol da realização desta tese, assim como o meu aperfeiçoamento profissional.

Ao Dr. Ney e a Dra Vera, agradeço pela oportunidade de aprendizagem que me foi transmitida, nos ensinamentos de patologia bucal, no aprendizado da pesquisa; no exercício da ética, numa dinâmica onde o compromisso se faz presente pela comunicação do conhecimento que cada mestrando e doutorando irá levar consigo, numa multiplicação do saber, para os mais diversos sítios deste imenso país.

Agradeço aos Professores Doutores, Suzana, Ruy, Márcia, Marina e Fábio, pelo constante apoio e ao que considero como o maior patrimônio do ser humano: o saber.

Aos amigos Élcio, Carlos, Ricardo Mesquita, Elena, Ricardo Navarro, Rogério, João, James, Antônio, Cabral e Vera, pelo companheirismo à vida a fora, naqueles momentos em que nos sentimos sozinhos, longe de nossos entes queridos e distante da nossa terra.

Aos amigos James e Ricardo, pelos verdadeiros valores da vida, do sentido das coisas, demonstrando que suas amizades não necessitam vigia, pois próximos ou distantes tenho a plena certeza do apoio incondicional de ambos.

Ao amigo Ricardo Mesquita pelas fotos desta tese.

As amigas Ana Paula N. Gomes e Eliete Neves da Silva Guerra pelas correções iniciais do projeto deste trabalho.

A Edna pelo ensinamento da técnica de imuno-histoquímica, e na ajuda da aquisição dos anticorpos.

A Elisa agradeço pelos diversos cortes histológicos para a execução da imuno-histoquímica.

A Gleice e Neuza ao grande trabalho que tiveram na manipulação dos produtos necessários para o cultivo de células.

A Graça que ajudou nos cálculos das diluições utilizados nesta tese.

A dedicação e atenção que nunca me foi negada pelas meninas da secretaria, que tanto estimo, Zilda, Neia e Nair.

A Verinha e Vilma pelo carinho e ajudas prestadas ao longo de nosso convívio.

A Bia, Patrícia e Maria Helena, Sandrinha, pelo convívio agradável.

A Renata aluna de iniciação científica, pela colaboração na caracterização das linhagens celulares através da imunofluorescência.

À CAPES agradeço pela contribuição financeira, que proporcionou o meu desenvolvimento profissional.

Ao Prof. Dr. Marcelo G. P. Cavalcanti, pela disponibilidade do uso de seu laboratório.

A Luciana Corrêa, Prof. Dr. Moacir e Luizete pelas dicas de informática, amizade e pela prontidão que me serviram toda vez que precisei.

A Vânia M. B. de O. Funaro e Luzia Marilda Z. M. Moraes, pela valiosa e fundamental correção e normatização desta tese.

A Sílvia pela linhagem AP8, a Andreia pela linhagem T-47D e ao Prof. Dr. Décio pela linhagem HN30.

A Profa. Dr. Miriam L. Turbino, pela atenção e análise estatística desta tese.

Ao Prof. Dr. Martinelli, Profa. Célia, Dr. Altamiro e Profa. Evanice. Pela confiança em mim depositada.

Ao companheirismo e contribuições valorosas, agradeço os queridos amigos, Adriana Etgues, Adriana da Costa Neves, Allan, Ana Miriam, Ana Paula Sobral, Cristiane França, Patriane, Cristiane Furuze, Daniela Bueno, Elizabhet (Betinha), Eveline, Fabrício Passador, Fabrício Bitu, Juliana Kawamura, Luciana Matizonkas, Márcia Rodrigues, Nathalie, Neuza Fujihara, Regina Dorta, Renata Tucci, Renato Guedes Pinto, Rhoner Gonçalves, Rogério Castilho, Cristiane Squarize, Sueli Miyagi, Vanessa Veltrini, Manoela Domingues, Marília Martins Costinha, Lélia Maria, Sandra e Flávio.

Para Aretuza.

Ao meu amor e companheira querida,  
sou muito agradecido pela dedicação exibida,  
a correção ortográfica desta tese e a minha vida,  
quero que saiba que nunca ficará perdida  
se depender da minha paixão infinita,  
te amo.

## SUMÁRIO

	p.
RESUMO	
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	2
2.1 Neoplasias de glândulas salivares e adenoma pleomórfico.....	2
2.1.1 Adenoma pleomórfico .....	2
2.1.2 Histórico e histogênese.....	3
2.1.3 Epidemiologia das neoplasias das glândulas salivares e do adenoma pleomórfico.....	6
2.2 Semelhança entre as glândulas mamárias e as glândulas salivares e suas neoplasias .....	9
2.3 Estrógeno e progesterona .....	10
2.3.1 Relação entre hormônios esteróides e neoplasias.....	10
2.3.2 Estrógeno e seus receptores.....	14
2.3.3 Progesterona e seus receptores .....	24
3 PROPOSIÇÃO.....	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	36
4.1 Imuno-histoquímica.....	36



4.2 Estabelecimento das culturas celulares .....	40
4.3 Imunofluorescência .....	43
4.4 Cultura celular.....	44
4.5 Descongelamento de linhagens celulares .....	45
4.6 Subcultivo celular.....	45
4.7 Contagem das células.....	46
4.8 Curva de crescimento .....	48
4.9 Análise estatística .....	50
4.10 Controle da curva de crescimento .....	50
5 RESULTADOS.....	52
5.1 Análise estatística da linhagem T-47D.....	55
5.2 Análise estatística da linhagem AP9 .....	62
5.3 Análise estatística da linhagem AP8 .....	69
5.4 Análise estatística da linhagem HN30.....	76
6 DISCUSSÃO.....	83
7 CONCLUSÕES .....	100
REFERÊNCIAS .....	101
<i>SUMMARY</i> .....	116

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 2.1 - História clínica das 4 pacientes com diagnóstico de neoplasia de glândula salivar que vieram posteriormente a desenvolver carcinoma de mama (Abbey, *et al.*, 1994). .....08
- Tabela 2.2 - Pacientes do sexo masculino: níveis de receptor de estrógeno em tecido normal e neoplásias de glândulas salivares (Dimery *et al.*, 1987). .....22
- Tabela 2.3 - Pacientes do sexo feminino: níveis de receptor de estrógeno em tecido normal e neoplásias de glândulas salivares (Dimery *et al.*, 1987). ....23
- Tabela 4.1 - Casos clínicos dos APs que foram submetidos a pesquisa das proteínas RE e RP. ....37
- Tabela 5.1 - Casos de AP emblocados em parafinas que foram submetidos a pesquisa das proteínas RE e RP. ....52

Tabela 5.2 - Demonstração do número total de células pertencentes à linhagem T-47D contidas em cada Placa de Petri, submetidas e não submetidas à ação hormonal, além da média e do desvio padrão.....	55
Tabela 5.3 - Valores originais da análise de variância do teste estatístico (linhagem T-47D).....	56
Tabela 5.4 - Demonstração dos resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem T-47D, sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol e as utilizadas como controle.....	58
Tabela 5.5 - Demonstração dos resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem T-47D, sob a ação da progesterona e as utilizadas como controle.....	59
Tabela 5.6 - Demonstração dos resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem T-47D, sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol e da progesterona. ....	60
Tabela 5.7 - Demonstração do número total de células pertencentes à linhagem AP9 contidas em cada Placa de Petri, submetidas e não submetidas a ação hormonal, além da média e do desvio padrão. ....	62

Tabela 5.8 - Valores originais da análise de variância do teste estatístico (linhagem AP9). .....	63
Tabela 5.9 - Demonstração dos resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem AP9, sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol e as utilizadas como controle.....	65
Tabela 5.10 - Demonstração dos resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem AP9, sob a ação da progesterona e as utilizadas como controle.....	66
Tabela 5.11 - Demonstração dos resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem AP9, sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol e da progesterona.....	67
Tabela 5.12 - Demonstração do número total de células pertencentes à linhagem AP8 contidas em cada Placa de Petri, submetidas e não submetidas à ação hormonal, além da média e do desvio padrão.....	69
Tabela 5.13 - Valores originais da análise de variância do teste estatístico (linhagem AP8).....	70

Tabela 5.14 - Demonstração dos resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem AP8, sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol e às utilizadas como controle. ....	72
Tabela 5.15 - Demonstração dos resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem AP8, sob a ação da progesterona e às utilizadas como controle. ....	73
Tabela 5.16 - Demonstração dos resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem AP8, sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol e da progesterona.....	74
Tabela 5.17 - Demonstração do número total de células pertencentes à linhagem HN30 contidas em cada Placa de Petri, submetidas e não submetidas à ação hormonal, além da média e do desvio padrão. ....	76
Tabela 5.18 - Valores originais da análise de variância do teste estatístico (linhagem HN30). ....	77
Tabela 5.19 - Demonstração dos resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem HN30, sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol e às utilizadas como controle. ....	79

Tabela 5.20 - Demonstração dos resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem HN30, sob a ação da progesterona e às utilizadas como controle.....80

Tabela 5.21 - Demonstração dos resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem HN30, sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol e da progesterona.....81

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 5.1 - Representação da curva do crescimento da população celular da linhagem T-47D sob a influência do 17- $\beta$ -estradiol, da progesterona e das utilizadas como controle.....61
- Gráfico 5.2 - Representação da curva do crescimento da população celular da linhagem AP9 sob a influência do 17- $\beta$ -estradiol, da progesterona e das utilizadas como controle.....68
- Gráfico 5.3 - Representação da curva do crescimento da população celular da linhagem AP8 sob a influência do 17- $\beta$ -estradiol, da progesterona e das utilizadas como controle.....75
- Gráfico 5.4 - Representação da curva do crescimento da população celular da linhagem HN30 sob a influência do 17- $\beta$ -estradiol, da progesterona e das utilizadas como controle.....82

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1 – Corte histológico do adenoma pleomórfico (AP) que deu origem a linhagem AP8 (HE, aumento original 100X).....42
- Figura 4.2 – Corte histológico do adenoma pleomórfico (AP) que deu origem a linhagem AP9 (HE, aumento original 100X).....42
- Figura 5.1 – Adenoma pleomórfico (AP) exibindo positividade para o receptor de estrógeno (RE) (aumento original 100X).....54
- Figura 5.2 – Tecido uterino utilizado como controle positivo para a marcação de receptor de estrógeno (RE) (aumento original 100X).....54
- Figura 5.3 – Adenoma pleomórfico (AP) exibindo positividade para o receptor de progesterona (RP) (aumento original 100X).....54
- Figura 5.4 – Tecido uterino utilizado como controle positivo para a marcação de receptor de progesterona (RP) (aumento original 100X).....54



## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AP Adenoma pleomórfico

AP nº número da requisição do exame anatomopatológico do arquivo do Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSP

BSA albumina bovina

cDNA ácido desoxiribonucléico complementar

DMEM Dulbelco's Modified Eagle's Medium – (Sigma Chemical Co.,  
St. Lous, MO, USA)

DNA ácido desoxiribonucléico

FOUSP Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

HE hematoxilina-eosina

NS não significante

Obs. observação

P probabilidade

PBS solução tampão fosfato-salina sem cálcio e sem magnésio- (Sigma Chemical  
Co., St. Lous, MO, USA)

RE receptor de estrógeno

RE $\alpha$  receptor de estrógeno  $\alpha$

RE $\beta$  receptor de estrógeno  $\beta$

RP receptor de progesterona

RPA receptor de progesterona A

RPB receptor de progesterona B

S significante

Tris Tris-hidroxi-metil-aminocetano

USP Universidade de São Paulo

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$  Alfa

$\beta$  Beta

$\text{cm}^2$  centímetros quadrados

$^{\circ}\text{C}$  graus Celcius

$\text{CO}_2$  Dióxido de Carbono

$\text{H}_2\text{O}_2$  Água oxigenada

Hz Hertz

Kd Kilo-dalton- unidade de peso molecular

> maior

< menor

mg Miligramas

ml Mililitros

$\pm$  mais ou menos

$\mu\text{l}$  microlitro

$\mu\text{m}$  micrômetros

mm milímetros

mM Milimolar

nº número

% por cento

pH Potencial Hidrogeniônico

v volts

W Watts

## **RESUMO**

### **PESQUISA DOS RECEPTORES DE ESTRÓGENO (RE) E DO RECEPTOR DA PROGESTERONA (RP) *IN VIVO* E VERIFICAÇÃO DA INFLUÊNCIA DESTES HORMÔNIOS *IN* *VITRO* EM DUAS LINHAGENS DE ADENOMAS PLEOMÓRFICOS**

A similaridade entre o tecido da mama e o da glândula salivar está bem estabelecida. A porção das estruturas acinares e ductais destes órgãos são basicamente semelhantes. Estes aspectos, associados ao fato de que uma coexistência de carcinomas da mama e de glândula salivar, têm sido relatados em uma incidência maior do que a esperada. Guiaram estudos tentando determinar a importância dos receptores de estrógeno e progesterona em adenomas pleomórficos (AP). A neoplasia é mais freqüente nas glândulas salivares e exibe uma predileção para o sexo feminino. Recentemente a presença do receptor de estrógeno (RE) e do receptor de progesterona (RP) tem sido investigada no AP, entre outras neoplasias de glândula salivar, questionando-se a possibilidade da existência da dependência hormonal. A

expressão dos receptores hormonais nos carcinomas de mama é importante para determinar o prognóstico e a probabilidade de responder à manipulação hormonal. Neoplasias que apresentam positividade para ambos os receptores, estrógeno e progesterona, exibem maior probabilidade de resposta à terapia anti-estrogênica do que as neoplasias que são negativas para estes receptores. Baseando-se na literatura científica pertinente, o presente trabalho se propõe a investigar a presença da proteína RE e da proteína RP em APs humanos, relacionando-os com a proliferação de linhagens celulares sob a influência destes hormônios. A técnica utilizada foi a imuno-histoquímica para a pesquisa dos RE e RP em 10 APs emblocados em parafina pertencentes ao arquivo do Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSP, e de duas linhagens de APs estabelecidas no mesmo serviço: uma derivada de um paciente do sexo masculino e a outra de um paciente do sexo feminino. No meio de cultivo onde subculturas destas células proliferavam foram diluídos 17- $\beta$ -estradiol e progesterona. Através de contagens destas células em períodos pré-determinados (24 horas, 48 horas e 72 horas), pretendeu-se verificar a influência dos respectivos hormônios na multiplicação celular. Como controle positivo utilizou-se uma linhagem denominada T-47D, que foi largamente estudada na literatura. A T-47D é derivada de um carcinoma metastático de mama, reconhecidamente hormônio dependente. E como controle negativo, utilizou-se de uma linhagem de carcinoma epidermóide, denominada HN30. Encontrou-se positividade para o RE em 7 de 10 APs estudados (4 em homens e 3 em mulheres) e positividade para o RP em 8 APs estudados (4 em mulheres e 4 em homens). Pela análise estatística, constatou-se que existe uma diferença significativa no índice proliferativo entre o controle e as células submetidas à ação do 17- $\beta$ -estradiol e da progesterona. Para a linhagem derivada do

paciente do sexo masculino houve diferença entre o controle e as células expostas ao 17- $\beta$ -estradiol e a progesterona somente nas últimas 72 horas. Para a linhagem derivada do sexo feminino constatou-se uma diferença significativa entre o controle e as células sob a influência da progesterona, a partir de 48 horas de proliferação celular. A diferença significativa entre o controle e as células sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol ocorreu somente a partir das 72 horas, sugerindo que o AP poderia ser uma neoplasia influenciada pela ação hormonal.

## 1 INTRODUÇÃO

As neoplasias de glândulas salivares representam importante grupo de lesões, que acometem a região de cabeça e pescoço, correspondendo a aproximadamente 3% das neoplasias benignas e malignas desta região.

O adenoma pleomórfico (AP) tumor mais freqüente das glândulas salivares, tem sido estudado em seus diversos aspectos: clínico, histológico, ultraestrutural, imuno-histoquímico, e de cultivo celular, entre outros. Recentemente, a presença do receptor estrogênico e da progesterona tem sido investigado nesta neoplasia, questionando a possibilidade de sua dependência hormonal, devido a sua maior ocorrência no sexo feminino e à semelhança existente entre as neoplasias de mama e as de glândulas salivares.

Baseando-se nas informações da literatura científica pertinente, o presente trabalho, se propõe a investigar *in vivo* a presença do receptor do estrógeno e da progesterona em AP, relacionando-os com a proliferação celular de duas linhagens de APs, sob a influência destes hormônios.



## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Neoplasias de glândulas salivares e adenoma pleomórfico**

#### 2.1.1 Adenoma pleomórfico

As neoplasias de glândulas salivares representam importante grupo de lesões da região de cabeça e pescoço, correspondendo de 2 a 6,5% das neoplasias benignas e malignas desta região (Abiose *et al.*, 1990; Leegaard & Lindeman, 1969, Spiro *et al.*, 1973; Spiro, 1986).

O AP é a neoplasia mais freqüente das glândulas salivares, maiores e menores. É uma neoplasia benigna, originária do epitélio ductal glandular, na qual se observa o crescimento combinado de células epiteliais luminais e mioepiteliais, caracterizado por estruturas ductiformes compostas por duas camadas celulares, sendo as epiteliais localizadas centralmente e as mioepiteliais periféricamente, juntamente com a elaboração e secreção de produtos celulares (Ellis & Alclair, 1996). O AP pode ocorrer em qualquer idade, apresentando dois picos de incidência, sendo mais comum por volta da 3ª década de vida e outra acima dos 50 anos de idade, apresentando predileção para o sexo feminino (Loyola *et al.*, 1995).

### 2.1.2 Histórico e histogênese

A histogênese dos tumores de glândula salivar tem sido um tópico controverso desde as primeiras observações do AP por Virchow e Billroth na primeira metade do século XIX. Surgiram várias teorias a respeito da origem celular do AP, tendo sido incluído células do tecido conjuntivo, células endoteliais, células embrionárias e células da notocorda primitiva (Daley & Dardick 1983).

Até meados do século XIX eram esporádicos e pouco detalhados os relatos de neoplasias de glândulas salivares, atribuindo-se a Paget (1853), o destaque destas lesões como um tipo distinto de neoplasia (Sousa,1990).

Alguns anos após os estudos de Paget (1853); Billroth (1859) publicaram um relato de oito casos de neoplasias de parótida e da região submandibular. As oito neoplasias apresentavam aspectos histopatológicos semelhantes e, uma vez que em todas elas estavam presentes tecidos conjuntivo, cartilaginoso, ou mucoso, este autor os considerou como sendo de origem mesenquimal. Este foi o primeiro relato da neoplasia que é hoje conhecida como adenoma pleomórfico. A partir deste primeiro relato de Billroth (1859), tiveram início numerosos estudos sobre o adenoma pleomórfico, principalmente em relação ao seu aspecto histopatológico peculiar, fato que tornou difícil o estabelecimento de sua histogênese (Sousa, 1990).

Em 1874, Minssen, introduziu o termo “tumor misto”, que atualmente ainda é utilizado por alguns patologistas para designar o adenoma pleomórfico. Tal terminologia foi escolhida, por acreditar o autor, que esta neoplasia fosse de origem epitelial e mesenquimal. Ainda nesta época, apesar das afirmações de Minssen (1874) muitos autores discordavam da sua teoria a respeito da histogênese,

acreditando que o adenoma pleomórfico fosse de origem puramente epitelial, tendo-o Nasse (1892) denominado como “adenoma” (Sousa, 1990).

A participação da célula mioepitelial no desenvolvimento de neoplasias foi primeiramente estudada por Peyron, (1924), quando mostrou em neoplasias mamárias de cães, que as células mioepiteliais proliferavam a partir dos túbulos terminais e migravam para um tecido mixóide ou condróide. Também enfatizou a semelhança entre as neoplasias mamárias de cães e os tumores de glândulas salivares em humanos. Em glândula normal humana, a célula mioepitelial foi primeiro descrita por Zimmermann, 1898 em parótida. Estas células localizam-se junto à porção basal das células epiteliais dos ácinos e ductos intercalares, apresentando formato estrelado ou fusiforme (Sousa, 1990).

O trabalho de Sheldon (1943) além da importância do grande número de casos estudados, mostrou também a preocupação com a presença de células mioepiteliais no adenoma pleomórfico. Ao estudo de Sheldon (1943) seguiram-se os de Bauer & Fox (1945); Grishman (1952); Bauer & Bauer (1953) e Rauch (1959) todos eles agora afirmando que as estruturas mesenquimais dos tumores mistos foram elaboradas por células mioepiteliais. Paralelamente a estes achados, Wills em 1967, propôs a mudança da denominação “tumor misto” para “adenoma pleomórfico”, ressaltando a origem epitelial e a variedade no padrão estrutural (Sousa, 1990).

Welsh & Mayer (1968) estudando o AP por meio de microscopia de luz e eletrônica de transmissão, concluíram novamente que esta neoplasia não era puramente epitelial e apresentava uma mistura de células epiteliais e mesenquimais, defendendo, assim, manutenção de termo tumor misto.

Eversole (1971) citados por Daley & Dardick (1983) baseando-se na premissa da diferenciação celular e da não capacidade das células que compõem as glândulas salivares de se dividir, lançou uma teoria na qual as neoplasias de glândulas salivares originavam-se das células de reserva do ducto intercalar ou excretor. Outros estudos demonstraram que as células acinares e as células mioepiteliais eram capazes de se dividir.

Seifert *et al.* (1976) estudaram 310 casos de adenoma pleomórfico de parótida, encontrando as células luminais de ducto e as células mioepiteliais como células mais freqüentemente observadas, sendo que 75% apresentavam aspecto epidermoide.

Batsakis *et al.* (1980) citados por Dardick *et al.* (1982) afirmaram que as células acinares e mioepiteliais são de origem ectodermal e originam-se de uma mesma célula mãe.

Shirasuna *et al.* (1980) isolaram células neoplásicas de adenoma pleomórfico, utilizando técnicas de cultura de células, e encontraram clones de células semelhantes às células mioepiteliais da neoplasia inicial. A inoculação de um destes clones celulares em camundongos atímicos resultou na formação de um mioepitelioma, que é neoplasia formada exclusivamente por células mioepiteliais, sugerindo que a célula mioepitelial é o elemento celular responsável pela histogênese do adenoma pleomórfico, sendo participante ativo na proliferação celular.

Estudos ultraestruturais do AP realizados por Dardick *et al.* (1982) e Daley & Dardick (1983), indicaram uma diferenciação multidirecional dos elementos epiteliais luminais e célula mioepitelial modificada.

Há relatos de que uma célula germinativa, ou uma célula de reserva no sistema do ducto salivar é responsável pela histogênese do AP. Jaeger *et al.* (1997) investigando o efeito do arranjo espacial da membrana basal em células cultivadas de um adenoma pleomórfico humano com a utilização das técnicas imuno-histoquímica, microscopia eletrônica e microscopia confocal, puderam demonstrar *in vitro* que as células mioepiteliais neoplásicas cultivadas podem se diferenciar em células ductais ou mioepiteliais, fortalecendo a sugestão de que as células epiteliais e mioepiteliais que compõem o adenoma pleomórfico apresentam uma célula precursora em comum.

A microanatomia e a embriogênese das glândulas salivares relacionam-se com a histogênese e classificação de suas neoplasias. Acredita-se ser considerável o papel da célula mioepitelial na gênese e crescimento de inúmeras neoplasias de glândulas salivares. Embora não seja considerada a célula básica de origem, com exceção do mioepitelioma, a célula mioepitelial é parte importante das neoplasias que se originam do ducto intercalar, como o adenoma pleomórfico, carcinoma adenóide cístico e o carcinoma epitelial-mioepitelial (Reguezi & Sciubba, 1999; Araújo *et al.*; 1994, Araújo *et al.*, 1999).

### 2.1.3 Epidemiologia das neoplasias das glândulas salivares e do adenoma pleomórfico

A incidência anual de neoplasias de glândulas salivares é de 0,4% a 6,5% por 100.000 pessoas (Auclair, 1992, citado por Ellis & Auclair, 1996) e representa de 2% a 6,5% de todas as neoplasias da região de cabeça e pescoço (Abiose *et al.*, 1990; Spiro, 1986; Spiro *et al.*, 1973; Leegaard & Lindeman, 1969).

De 64% a 80% de todas as neoplasias epiteliais primárias ocorrem na glândula parótida, 7% a 11% na glândula submandibular, menos de 1% na sublingual e de 9% a 23% nas glândulas salivares menores. Entre 54% a 79% de todas as neoplasias são benignas e 21% a 46% pertencem ao grupo das malignas (Auclair, 1991 citados por Ellis & Auclair, 1996; Seifert *et al.*, 1986; Spiro, 1986; Everson & Cawson 1985; Eneroth, 1971).

Loyola *et al.* (1995) realizaram levantamento epidemiológico dos casos de neoplasias de glândulas salivares menores no arquivo do Serviço de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, no período de 1970 a 1993, encontrando 164 casos. Destas neoplasias 62% eram benignas e 38% malignas, o palato foi o local de maior incidência, seguido da mucosa jugal e lábio inferior, predominante no sexo feminino, na razão de 1,3: 1, sendo a idade média de 39,9 anos, equivalendo a 40,8 para o sexo feminino e 39,7 para o masculino.

Neste levantamento foram encontrados 87 casos de APs, que correspondiam a 86% das neoplasias benignas e 53% dos casos pertencente ao grupo das neoplasias benignas e malignas, destes, 48 eram derivados de pacientes do sexo feminino e 38 do sexo masculino. Em um dos casos de AP não se pode determinar o sexo, por falta de dados no arquivo (Loyola *et al.*, 1995).

Na maioria dos levantamentos epidemiológicos, o adenoma pleomórfico responde por 50% de todas neoplasias, tanto benignas como malignas, de glândulas salivares (Auclair, 1991 citado por Ellis & Auclair, 1996; Seifert *et al.*, 1986; Spiro, 1986; Everson & Cawson 1985; Loyola *et al.*, 1995). Entretanto, Eneroth (1971) encontrou uma porcentagem um pouco maior (74%) em relação aos autores citados anteriormente.

Vários relatos têm apontado associação entre neoplasias primárias benignas e malignas de glândulas salivares, com o subsequente desenvolvimento de câncer de mama (Berg *et al.*, 1968; Moertel & Elverback, 1969; Dunn *et al.*, 1972; Prior & Waterhouse, 1977, citados por Abbey *et al.*, 1984 e por Jeannom *et al.*, 1999).

Abbey *et al.* (1984) encontraram 372 casos com diagnóstico de neoplasia de glândula salivar pertencentes ao acervo do registro de neoplasias de Virginia, dos quais 182 eram do sexo masculino e 190 do sexo feminino. Em 4 destas mulheres, 3 com o diagnóstico de AP e uma com o diagnóstico de carcinoma ex adenoma pleomórfico, desenvolveram posteriormente carcinoma de mama. A história clínica destes 4 casos está exposta na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - História clínica das 4 pacientes com diagnóstico de neoplasia de glândula salivar que vieram posteriormente a desenvolver carcinoma de mama (Abbey, *et al.*, 1994)

Paciente	Primeiro neoplasia			Segunda neoplasia			Idade entre o 1 <sup>o</sup> e o 2 <sup>o</sup> diagnóstico
	Diagnóstico	Local	Idade (anos)	Diagnóstico	Local	Idade (anos)	
1	Carcinoma ex A.P.	Glândula submandibular	37 e 46	Carcinoma lobular infiltrativo	Mama esquerda	48	11 anos e 3 meses
2	A.P.	Glândula submandibular	79	Carcinoma lobular infiltrativo	Mama direita	87	7 anos e 8 meses
3	A.P.	Glândula submandibular	42	Carcinoma scirrhous unidiferencial	Mama esquerda	48	6 anos e 6 meses
4	A.P.	Glândula parótida	44	Carcinoma medular	Mama esquerda	44	2 meses

Concluíram que os dados do registro das neoplasias de Virginia entre 1960 e 1979, apontavam que uma paciente com o diagnóstico de neoplasia de glândula

salivar apresenta um risco de 4 a 5 vezes maior de desenvolver carcinoma de mama (Abbey *et al.*, 1984).

## **2.2 Semelhança entre as glândulas mamárias e as glândulas salivares e suas neoplasias**

Glândulas salivares e mamárias, são glândulas túbulo alveolares, exibindo progressiva diminuição linear do epitélio e terminações em estruturas semelhantes a sacos, representados por coleções de células secretórias do tipo exócrina. As várias características estruturais e fisiológicas próprias das glândulas salivares e mamárias, levaram a crer que tenham mais em comum do que se acreditava previamente, embora não apresentem a mesma origem (Abbey *et al.*, 1989).

Sugano *et al.* (1981) estudando as células mioepiteliais de glândulas salivares humanas e de neoplasias mamárias, as quais suportam os elementos ductais e são comuns para ambas as glândulas, observaram que estas células apresentam uma origem a partir das células epiteliais tubulares.

A distribuição das células é semelhante em ambos os órgãos, com exceção da localização das células mioepiteliais, as quais abraçam o túbulo intercalar na mama e não o fazem na glândula salivar (Dardick *et al.*, 1982). Além disso, estas estruturas exibem algumas neoplasias em comum. As glândulas mamárias apresentam uma neoplasia correspondente ao adenoma pleomórfico de glândula salivar, denominada de tumor misto benigno (Makek & vom Hochstetter, 1980) lembrando que o AP já foi chamado inicialmente de tumor misto benigno, por Minssen, em 1874 (Sousa, 1990).



No trabalho realizado por Lawrence & Mazur (1982), comparou-se o carcinoma adenóide cístico nas glândulas salivar, mamária, pulmão e base do colo uterino através da imuno-histoquímica, microscopia de luz e eletrônica, concluindo que os carcinomas adenóides císticos destes vários locais eram indistintos e a célula mioepitelial apresentava uma importante parte da histogênese destas neoplasias.

## **2.3 Estrógeno e progesterona**

### 2.3.1 Relação entre hormônios esteróides e neoplasias

Fatores específicos ambientais são de difícil identificação e estabelecimento na atuação do desenvolvimento das neoplasias. Alguns certamente operam como iniciadores mutagênicos, provocando diretamente mudanças genéticas, como o tabaco. Outros agem como promotores neoplásicos, ajudando a aumentar a população de células susceptíveis, a se dividirem através de mais mutações. Um exemplo deste fato são os hormônios reprodutivos femininos, indicando uma correlação existente entre a história reprodutiva da mulher e o risco de desenvolver câncer mamário (Alberts *et al.*, 1994).

O tratamento efetivo pode, às vezes, ser baseado na compreensão das causas de um determinado câncer. O estrógeno, por exemplo, parece atuar como promotor natural em câncer de mama, e o tratamento com antagonistas de estrógeno, tal como tamoxifem, é utilizado em muitos pacientes, seja na prevenção ou para retardar a recorrência da doença (Alberts *et al.*, 1994).

Existem dois tipos de hormônios: os hidrossolúveis e os lipossolúveis, que também são denominados esteróides. Os hidrossolúveis representam a grande maioria e atuam sobre receptores situados na membrana plasmática. Os lipossolúveis, como por exemplo o estrógeno e a progesterona, atravessam a membrana celular com facilidade e se fixam a receptores localizados no citoplasma e no núcleo da célula alvo (Junqueira & Carneiro, 1997).

As células endócrinas especializadas na síntese de substâncias esteróides de ação hormonal são encontradas em vários órgãos, como por exemplo: testículo, ovário e glândulas adrenais (Junqueira & Carneiro, 1997).

Os receptores dos hormônios esteróides, RE, RP, hormônio da tireóide, vitamina D, e retinóide, pertencem à superfamília dos receptores nucleares. Incluí também nesta família os receptores órfãos, que apresentam ligações não bem definidas (Mangelsdorf *et al.*, 1995).

Os receptores dos hormônios esteróides são as chaves regulatórias do processo que envolve o desenvolvimento e a manutenção do sistema reprodutivo (Clarke & Sutherland, 1990). Todos eles partem de um composto estrutural básico similar, tendo: 1) um domínio específico do DNA altamente conservado; 2) um domínio específico hormonal que é conservado entre os receptores de hormônios relatados como o RP, o receptor do glucocorticóide, e o receptor do mineralocorticóide; 3) uma região dependente localizada entre o domínio específico do DNA e o domínio específico hormonal; e 4) um domínio terminal-amino, que é a região mais variável entre os membros desta superfamília (Gronemeyer, 1991; Kastner *et al.*, 1990; Beato *et al.*, 1989).

Das pacientes que apresentam câncer de mama, aproximadamente 2/3 possuem receptores estrogênicos (RE+). A incidência destas neoplasias positivas é maior entre mulheres na pós-menopausa do que na pré-menopausa. As neoplasias de mama que apresentam estes receptores possuem um prognóstico relativamente satisfatório e maior probabilidade de obter benefício da terapia hormonal (Osborne *et al.*, 1980; Narbone, 1989; Jones, *et al.*, 1992; Ruder, *et al.*, 1989, citados por Shick, *et al.*, 1995; Berkow, 1995). A pesquisa da presença do RE no carcinoma primário de mama é um importante indicador de prognóstico, pois a ausência do RE indica alta probabilidade de recorrência e curta sobrevida (Osborne *et al.*, 1980; Narbone, 1989; Jones, *et al.*, 1992; Ruder, *et al.*, 1989, citados por Shick *et al.* 1995; Berkow *et al.*, 1995).

Schmitt *et al.* (1980) citados por Shick, *et al.* (1995) constataram uma maior agressividade nos carcinomas adenóides císticos de glândulas salivares, manifestados em mulheres grávidas. Sabendo ainda que o carcinoma adenóide cístico de glândula salivar é histologicamente idêntico ao de mama, sugeriram que a porção da glândula salivar responsável pela origem desta neoplasia, poderia expressar o RE e o RP.

Também há uma preocupação com a dependência hormonal em outros tipos de neoplasias. Relatos demonstram uma grande variedade de neoplasias, como carcinoma endometrial, sarcoma estromal de baixo grau, adenocarcinoma cervical, carcinomas foliculares de tireóide, adenocarcinoma de cólon, carcinomas de células renais, carcinomas pancreáticos, melanoma maligno, gliomas, carcinomas de próstata e carcinoma ginecológico, além dos carcinomas de mama e neoplasias da região de cabeça e pescoço como os de glândulas salivares, expressando as proteínas RE e RP

(Stedman *et al.*, 1980; Molteni *et al.*, 1981; Narbone *et al.*, 1989; Ruder *et al.*, 1989 citados por Shick *et al.*, 1995).

Dimery *et al.* (1987) em seus estudos obtiveram achados que indicam que os carcinomas de glândulas salivares podem ser hormônio dependente. Entre eles o adenoma pleomórfico é um dos que sofreriam maiores influências destes hormônios.

Leimola-Virtanen *et al.* (2000) pesquisaram a expressão do RE em mucosa bucal e em glândulas salivares menores e maiores, constatando através da técnica Western blot a presença do RE, insinuando apresentar um papel biológico na mucosa bucal e nas glândulas salivares.

Shadaba *et al.* (1997) relataram um caso de carcinoma adenóide cístico de glândula parótida com recorrência local e metástase. Após tratamento inicial cirúrgico e radioterápico, com a impossibilidade de uma nova intervenção cirúrgica, optou-se pelo uso do Tamoxifen, antagonista do receptor de estrógeno utilizado nos tratamento de carcinomas de mama. Uma resposta parcial foi observada, promovendo uma melhora no quadro clínico da paciente, que após o tratamento, veio a óbito.

Os genes regulados pelos hormônios esteróides são diferentes conforme o tipo da célula-alvo. De uma forma geral, as respostas da célula ativada pelo hormônio dependem do próprio hormônio e das características da célula-alvo. Os receptores podem ser semelhantes, mas os genes ativados são diferentes, dependendo do tipo celular (Junqueira & Carneiro, 1991).

Gompel *et al.* (2000) desenvolveram um modelo *in vitro* utilizando linhagens celulares de carcinoma de mama, sabidamente hormônios dependentes. Utilizaram as linhagens T-47D, ZR75, MCF-7, nas quais observaram efeito antiapoptótico do

estradiol e um potente efeito apoptótico de alguns antiestrogênicos. Concluíram que a homeostasia tecidual é resultante de um fino balanço entre a proliferação celular, diferenciação e apoptose. A apoptose é entretanto, a chave do desenvolvimento e regulação do crescimento de tecido normal e neoplásico (Gompel *et al.*, 2000).

### 2.3.2 Estrógeno e seus receptores

O estrógeno regula o metabolismo celular em vários tecidos, desempenhando um papel importante no desenvolvimento, crescimento e diferenciação das características sexuais secundárias femininas, na reprodução e no metabolismo celular (Clark. *et al.*, 1992; Korach, 1994). Essas ações ocorrem através da interação dos hormônios com sua respectiva proteína receptora, ou seja, o RE, levando a transativação do gene, resumindo assim como se dá a ativação pelo hormônio (Evans, 1988; Carson-Jurica *et al.*, 1990; Tsai & O'Malley, 1994).

O receptor de estrógeno (RE) é um fator de transativação mediada através da ligação com o hormônio esteróide 17- $\beta$ -estradiol, isto em ambos os sexos, masculino e feminino (Enmark *et al.*, 1997).

Duas isoformas da proteína receptora para o estrógeno foram encontradas, clonadas e caracterizadas em várias espécies, denominadas receptor estrogênico  $\alpha$  (RE $\alpha$ ) (Greene *et al.*, 1986; Krust *et al.*, 1986; White *et al.*, 1987) e receptor estrogênico  $\beta$  (RE $\beta$ ) (Kuiper *et al.*, 1996; Mosselman *et al.*, 1996; Moore *et al.*, 1998; Ogawa *et al.*, 1998). Estes receptores são membros da superfamília dos genes que compreendem receptores nucleares de diversos ligantes hidrófobos, como os hormônios esteróides (estrógeno, progestin, glucocorticóides, mineralocorticóides),

ácidos retinóicos (vitamina A), vitamina D, prostaglandina e hormônios da tireóide (Evans, 1988; Green, 1988; Beato, 1989; Gronemeyer, 1991; Laudet *et al.*, 1992; Leid *et al.*, 1992; Mangelsdorf *et al.*, 1995).

A grande maioria dos membros destas superfamílias apresentam ligações e transativações dependentes, ou seja, subsequentemente a interação dos hormônios com sua respectiva proteína receptora, leva a transativação do gene, que por sua vez responde, resumido assim como se dá a ativação do gene pelo hormônio específico (Tsai & O'Malley, 1994).

O clássico RE (RE $\alpha$ ) foi descoberto por Elwood & Jensen em 1958 e clonado em 1986, por Green *et al.*, utilizando-se de tecido uterino (Enmark & Gustafsson, 1999).

A não esperada descoberta de um segundo subtipo de RE (RE $\beta$ ), aproximadamente 10 anos após a clonagem do RE $\alpha$  (Kuiper *et al.*, 1996) tem causado considerável agitação em vários endocrinologistas, levantando a numerosas questões, reconsiderando o respectivo papel fisiológico destes dois receptores (Katzenellenbogen & Korach, 1997). Alguns destes vários aspectos interessantes sobre o novo RE referem-se à importância clínica como a fertilidade, estabilidade óssea e a saúde cardiovascular (Enmark *et al.*, 1997).

Estudos iniciais do RE $\alpha$  em ratos demonstraram que a deleção do gene tem pouco ou nenhum efeito na estabilidade óssea e no sistema cardiovascular (Lubahn *et al.*, 1993 citados por Enmark *et al.*, 1997). Hoje, revistos estes conceitos, se reconhece a importância da descoberta do RE $\beta$  nestes tecidos (Enmark *et al.*, 1997). Atualmente considera-se que o estrógeno é um hormônio esteróide que tem profundos efeitos no sistema reprodutivo de ambos os sexos. Também tem um

importante papel no sistema cardiovascular e na manutenção do tecido ósseo, efeitos mediados por um fator de transcrição ativado pelo RE (Enmark *et al.*, 1997).

A clonagem e estudos da função do cDNA RE em diferentes espécies conduziram à obtenção de maiores informações desta proteína. Sabe-se que o RE apresenta, em uma das extremidades, um radical amino (NH<sub>2</sub>), e na outra, um radical carboxila (COOH), sendo dividido em 6 distintos domínios com funções específicas e exibindo diferentes graus de seqüência de aminoácidos denominados de “A” a “F” (Kumar *et al.*, 1987; Krust *et al.*, 1986).

O RE $\alpha$  humano é sintetizado através de um gene localizado no braço longo do cromossomo 6 (Enmark. *et al.*, 1997 e Enmark. & Gustafsson, 1999) sendo composto por 595 aminoácidos e apresentando um peso molecular entre 66 a 70 KDa. (Krust *et al.*, 1986; Kumar *et al.*, 1987).

O domínio “A/B” corresponde à seqüência de aminoácidos de 1 a 184 e está junto ao radical amino terminal (NH<sub>2</sub>). Esta região foi pouco conservada entre as espécies (Kurst. *et al.*, 1986) e contém a Função Ativadora 1, sendo importante para a transativação do gene específico (Krust *et al.*, 1986). A região “C” do RE $\alpha$  representa a seqüência de 185 a 263 dos aminoácidos. Esta região, ao contrário da anterior, foi conservada entre as espécies e é responsável pela ligação específica junto ao estrógeno e contribui ainda para a dimerização e transativação (Kumar *et al.*, 1987 e Green & Chambon, 1987).

A “D” situa-se próximo ao radical carboxila, indo da seqüência do 264 ao 302 de aminoácidos. Devido à flexibilidade desta estrutura, acredita-se estar envolvida nas mudanças conformacionais da molécula receptora durante a ativação (Kumar *et al.*, 1988).

A região “E” do RE $\alpha$  corresponde à sequência do 303 ao 553 de aminoácidos, foi conservada entre as espécies, e está localizada junto ao radical carboxila (COOH). É esta região que contém o domínio da Função Ativadora 2, que por sua vez está envolvida na transativação da Função Ativadora 1 (Tasset *et al.*, 1990; Webster *et al.*, 1988; Danielian *et al.*, 1992; Lees *et al.*, 1989; Seielstad *et al.*, 1995).

A “F” corresponde à sequência do 554 a 595 de aminoácidos que desempenham o papel de distinguir entre os agonistas e antagonistas do estrógeno (Montano *et al.*, 1995).

Em 1995, um novo receptor de estrógeno, distinto do RE $\alpha$  denominado de receptor de estrógeno  $\beta$  (RE $\beta$ ), foi clonado em rato (Kuiper *et al.*, 1996 e Enmark *et al.*, 1997), e subsequentemente clonado em humanos (Mosselman *et al.*, 1996 e Enmark *et al.*, 1997), camundongo (Tremblay *et al.*, 1997), e em várias outras espécies (Todo *et al.*, 1996 e Lakaye *et al.*, 1998). O gene do RE $\beta$  foi mapeado e localizado no braço longo do cromossomo 14 no loco 2 entre os sublocos 2 e 4 (14q22-24) (Enmark *et al.*, 1997 e Enmark & Gustafsson, 1999).

Mosselman *et al.* (1996) relataram, pela primeira vez, o seqüenciamento do cDNA RE $\beta$  de humanos, anunciando uma proteína de 477 aminoácidos. Moore *et al.* (1998) e Ogawa *et al.* (1998) clonaram o cDNA e encontraram 53 aminoácidos adicionais na região terminal amino (NH<sub>2</sub>) do RE $\beta$ . Recentes estudos confirmam a expressão do comprimento total da proteína RE $\beta$ , contendo 530 aminoácidos. Moore *et al.* (1998) e Ogawa *et al.*, (1998) relataram isoformas da função C-terminal. A variação do RE $\beta$  também tem sido observada em ratos (Maruyama *et al.*, 1998).



Estudos estruturais do RE $\beta$  demonstraram que o domínio específico do DNA do RE $\beta$  e do RE $\alpha$  são extremamente homólogos em aproximadamente 96% e o domínio específico ligante demonstrou apenas 59% de homologia. O terminal amino e o domínio A/B, a região que altera a conformação e o domínio F, são distintos no seqüenciamento do RE $\alpha$  e RE $\beta$ . O RE $\beta$  exibe algumas similaridades com o RE $\alpha$ , contendo uma região de Função Ativadora 2, localizada no Domínio Específico de Ligação. Vários relatos (Tremblay *et al.*, 1997) demonstram que o RE $\beta$  apresenta uma Função Ativadora 1 localizada na região do Domínio A/B. Entretanto, Hall & McDonnell (1999) relataram que o RE $\beta$  não contém uma forte Função Ativadora 1. A região de ativação junto ao terminal-amino (NH<sub>2</sub>), exibe um domínio repressor que exerce uma interrupção sobre toda atividade de transcrição do receptor.

Baseando-se nas análises do RNAm, o RE $\beta$  é encontrado em vários tecidos, incluindo o sistema nervoso central, sistema cardiovascular, sistema imune, trato urogenital, trato gastrointestinal, rins e pulmões (Enmark *et al.*, 1997; Arts *et al.*, 1997 e Gustafsson, 1999). A detecção do RE $\beta$  nestes sítios tem sido limitada à expressão do RNAm devido à falta da especificidade e da sensibilidade dos anticorpos que detectam a proteína RE $\beta$  no tecido normal. Os autores relatam que não se compreende muito a função da proteína RE $\beta$ , que requer maiores investigações através do uso de sondas moleculares e biológicas (Pavao & Traish, 2000).

O RE $\alpha$  é predominantemente expresso em tecidos específicos, como a mama, útero e vagina, estando envolvido na regulação da reprodução (Clark *et al.*, 1992; Korach, 1994; Enmark & Gustafsson, 1999; Kuiper & Gustafsson, 1997; Gustafsson, 1999). Entretanto o RE $\beta$ , expressa em vários outros tecidos, inclusive nos mesmos

em que o RE $\alpha$  está presente (Enmark & Gustafsson, 1999; Kuiper & Gustafsson, 1997; Gustafsson, 1999). O RE $\beta$  parece ligar-se predominante aos hormônios naturais, como o estradiol, que também tem afinidade para o RE $\alpha$  (Kuiper *et al.* 1997; Kuiper *et al.*, 1998a.; Kuiper *et al.*, 1998b). Entretanto já foi documentada a existência destas duas isoformas do receptor tendo diferentes atividades biológicas inerentes, pelas suas distribuições diversas e ausência de similaridade estrutural (Kuiper *et al.*, 1996; Enmark *et al.*, 1997; Enmark & Gustafsson, 1999; Kuiper, & Gustafsson, 1997; Gustafsson, 1999).

Em geral, o mecanismo de ação do RE $\beta$ , embora sendo similar ao RE $\alpha$ , o hormônio específico de inativação do RE $\beta$  monomérico, resulta na ativação e transativação conduzindo para dimerização. A transativação do RE $\beta$  dimer conduz avidamente para a especificidade do RE localizada na região promotora do gene responsável pelo estrógeno. Contudo, o RE $\beta$  pode formar heterodímero com o RE $\alpha$ , expressando junto à célula alvo, ambas isoformas (Ogawa *et al.*, 1998; Pettersson *et al.*, 1997; Pace *et al.*, 1997).

Não se sabe se o RE $\alpha$  e RE $\beta$  têm habilidade para interagir junto ao gene em 3 diferentes complexos: RE $\alpha$ / RE $\alpha$  homodímero, RE $\beta$ / RE $\alpha$  homodímero e RE $\alpha$ /RE $\beta$  heterodímero. Pelo fato de haver evidências que o RE $\alpha$  e RE $\beta$  podem obter diferentes respostas biológicas, envolvendo sinalizações com transativações em locos alternativos, novos conceitos foram separados dos atribuídos ao clássico RE específico (Pavao & Traish, 2001).

Paech *et al.* (1997) examinaram a proteína de transativação do RE $\alpha$  e do RE $\beta$  utilizando uma variabilidade de ligantes, para avaliar a ativação genética. O RE $\alpha$  e o RE $\beta$  demonstraram que a sinalização era oposta quando o estradiol estava ativado. O

estradiol ligados ao RE $\alpha$  induziu à transativação e, junto ao RE $\beta$ , inibiu a transativação (Paech *et al.*, 1997). Além do que, os antagonistas do estrógeno, como o Tamoxifem, Reloxifene e ICI 164384, foram potentes estimuladores de transcrições quando ligado ao RE $\beta$ , porém inibiram a transcrição junto ao RE $\alpha$  (Paech *et al.*, 1997).

Conclui-se então que estas duas isoformas sinalizam em diferentes caminhos, dependendo do ligante e do elemento resposta, sugerindo que os RE $\alpha$  e RE $\beta$  podem ter diferentes papéis na regulação e expressão genética (Paech *et al.*, 1997).

Ainda não se compreende por completo as causas relacionadas às alterações bucais durante a menopausa, embora o desconforto, xerostomia e a atrofia da mucosa, tenham sido clinicamente descritas em mulheres na menopausa e pós-menopausa (Amar & Chung, 1994 e Bem Aryeh *et al.*, 1996).

A menopausa é o período no qual a função ovariana cíclica manifesta-se pela cessação da menstruação. Ocorre aproximadamente aos 50 anos de idade, mas pode normalmente manifestar-se em mulheres a partir de 40 anos de idade. Os sinais da menopausa são principalmente relacionados a concentrações decrescentes do estrogênio circulante (Berkow, 1995).

Entretanto, um envolvimento da boca poderia atribuir-se ao estrógeno circulante, causando proliferação e maturação do epitélio, de acordo com os estudos *in vitro*. Aparentemente o estrógeno apresenta um efeito maior em dois tipos de população celular: nos fibroblastos gengivais e nos queratinócitos (Mariotti, 1991). Baseando-se em observações clínicas, Kaufman (1969) sugere que o efeito estrogênico na mucosa bucal é relacionado, aparentemente, à resposta inflamatória

do tecido periodontal, incluindo a gengivite e a periodontite. Entretanto, as lesões descamativas gengivais também são comuns nos homens.

Dimery *et al.* (1987) pesquisaram a possível dependência hormonal, utilizando 19 amostras de tecido de glândula salivar normal e 14 amostras de neoplasias de glândula salivar, entre elas o adenoma pleomórfico. Os autores realizaram análise quantitativas do RE, localizado no citosol das células estudadas. Estabelecendo que quando a concentração da proteína receptora é maior ou igual a 1fmol/mg das proteínas do citosol, as células são consideradas positivas. Dez (77%) de treze amostras normais histológicas e 4 (80%) de 5 amostras de neoplasias obtidas de pacientes masculinos continha RE por este critério. 5 (83%) de 6 amostras normais e oito (88%) de 9 amostras neoplásicas foram obtidas em pacientes femininos e constataram que a concentração do RE nos pacientes femininos é maior em relação a amostras derivadas de pacientes masculinos. Os achados indicam que as neoplasias de glândulas salivares podem ser hormônios dependentes, e entre elas inclui-se o AP. Em carcinoma de mama, quando o valor da concentração excede a 10 fmol/mg de RE no citosol das células neoplásicas, este é considerado hormônio dependente. Dois adenomas pleomórficos de parótidas de pacientes do sexo feminino obtiveram os seguintes valores: 10,22 e 12,37 fmol/mg de RE por mg de citosol. É válido ressaltar neste estudo que um adenocarcinoma de parótida obteve a concentração de 62,3 fmol/mg de RE por mg de citosol.

Seus resultados estão expressos nas tabelas 2.2 e 2.3.

Tabela 2.2 - Pacientes do sexo masculino: níveis de receptor de estrógeno em tecido normal e neoplásias de glândulas salivares (Dimery *et al.*, 1987)

Paciente Nº/idade (ano)	Características histológicas		Nível proteico do receptor (fmol/mg)
	local		
1/33	Glândula submandibular	Normal	<1
2/48	Glândula submandibular	Normal	1,10 ± 0,04
3/53	Glândula submandibular	Normal	1,3 ± 0,10
4/61	Glândula submandibular	Normal	<1
5/69	Glândula submandibular	Normal	1,9 ± 0,07
6/48	Glândula parótida	Normal	3,93 ± 0,75
7/49	Glândula parótida	Normal	2,12 ± 0,38
8/50	Glândula parótida	Normal	3,68 ± 0,05
9/51	Glândula parótida	Normal	<1
10/58	Glândula parótida	Normal	3,53 ± 0,04
11/63	Glândula parótida	Normal	3,25 ± 0,75
12/75	Glândula parótida	Normal	1,35 ± 0,01
13/75	Glândula parótida	Normal	4,00 ± 0,07
14/31	Glândula parótida	Mucoepidermóide	1,44 ± 0,05
15/40	Glândula parótida	<b>Adenoma pleomórfico</b>	<b>7,11 ± 0,09</b>
16/50	Glândula parótida	<b>Adenoma pleomórfico</b>	<b>5,70 ± 0,03</b>
17/53	Língua	Mucoepidermóide	<1
18/62	Mucosa bucal	Adenóide cístico	7,5 ± 0,88

Tabela 2.3 - Pacientes do sexo feminino: níveis de receptor de estrógeno em tecido normal e neoplásias de glândulas salivares (Dimery *et al.*, 1987)

Paciente Nº/idade (ano)	Características histológicas		Nível proteicos do receptor (fmol/mg)
	Local		
1/48	Glândula submandibular	Normal	1,00 ± 0,1
2/50	Glândula submandibular	Normal	3,06 ± 0,10
3/65	Glândula submandibular	Normal	6,07 ± 0,27
4/75	Glândula submandibular	Normal	7,5 ± 2,5
5/14	Glândula parótida	Normal	3,25 ± 0,24
6/58	Glândula parótida	Normal	<1
7/48	Seio maxilar	Adenóide cístico	<1
8/50	Glândula parótida	<b>Adenoma pleomórfico</b>	<b>10,22 ± 1,54</b>
9/53	Seio maxilar	Adenóide cístico	6,27 ± 0,49
10/53	Glândula parótida	<b>Adenocarcinoma</b>	<b>62,30 ± 4,02</b>
11/55	Glândula parótida	<b>Adenoma pleomórfico</b>	<b>12,37 ± 2,72</b>
12/57	Glândula parótida	Adenocarcinoma	1,46 ± 0,004
13/61	Mucosa bucal	<b>Adenocarcinoma</b>	<b>14,76 ± 0,27</b>
14/64	Glândula parótida	Adenóide cístico	5,02 ± 0,48
15/72	Glândula parótida	Adenocarcinoma (pouco diferenciado)	1,36 ± 0,01

### 2.3.3 Progesterona e seus receptores

Dos hormônios esteróides, a progesterona representa a chave do equilíbrio que regula a atividade reprodutiva feminina. Funciona como um regulador essencial dos eventos associados à estabilidade e à manutenção da gravidez, incluindo a ovulação, desenvolvimento uterino e das glândulas mamárias, além de distúrbios comportamentais associados ao ciclo menstrual (Clarke & Sutherland, 1990 e Lydon *et al.*, 1995).

Fármacos antagonistas à progesterona ou moduladores do RP, pertencem a uma nova categoria de agentes hormonais utilizados no tratamento de neoplasias de mama. Mefepredistone é um exemplo de moduladores do RP usado para inibir o efeito do estrógeno em tecidos susceptíveis a sua ação (Klijn *et al.*, 2000).

Os principais papéis fisiológicos atribuídos à progesterona nos mamíferos são: 1) no útero e ovário: realiza a maturação dos óvulos, facilita sua implantação, promove a manutenção da gravidez, proporcionando o crescimento uterino e posteriormente a contratibilidade do miométrio; 2) na glândula mamária: promove o desenvolvimento lobulo-alveolar preparando-a para a secreção do leite e após o parto participa da síntese protéica do leite; 3) no cérebro: é um mediador de sinais requeridos pelos comportamentos responsáveis pela sexualidade (Graham & Clarke, 1997).

Outras evidências, através de descrições em modelos experimentais em camundongos, mostram que há um papel de modulação da massa óssea pela progesterona (Lydon *et al.*, 1995). Estes tipos de estudos *in vivo* também serviram para responder vários questionamentos do complexo da ação da progesterona,

obtendo diversas confirmações importantes para a reprodução e desenvolvimento feminino (Graham & Clarke, 1997).

O ovário é o local que mais sintetiza e secreta a progesterona e o estrógeno nos mamíferos, conseguindo elevar o nível destes hormônios na circulação em uma flutuação cíclica (Norman & Litwack, 1987 citado por Granham. & Clarke, 1997).

Os efeitos da progesterona são mediados por duas isoformas da proteína RP (receptor de progesterona), denominadas de receptor de progesterona A (RPA) apresentando 114kD e receptor de progesterona B (RPB) exibindo 94kD. Ambas são originárias da expressão de um único gene (Lessey *et al.*, 1983). O RPA humano é uma forma interrompida do RPB humano, no qual constata a ausência de 164 aminoácidos no terminal amino. Ambas isoformas são identificadas na maioria das espécies, com exceção dos coelhos, nos quais constatou-se apenas a expressão do RPB (Loosfelt *et al.*, 1984 e Savouret *et al.*, 1991).

Estruturalmente o RPA é composto por dois fatores de ativação (fator de ativação 1 e 2): um domínio específico para se ligar ao hormônio, localizado na extremidade e junto ao fator de ativação 2 e um domínio ligado ao DNA, localizado entre o fator de ativação 1 e 2. O RPB apresenta esta mesma estrutura, com a adição de mais um fator de ligação, denominado fator de ligação 3, localizado na periferia (O'Malley & Conneely, 1992; Lessey *et al.*, 1983; Kastner *et al.*, 1990; Gronemeyer, 1991; DeMarzo *et al.*, 1991; Horwitz, 1992; Kraus *et al.*, 1993).

Os RPs são proteínas isomórficas, específicas e intercelulares, sendo fatores de transcrição como o RE, e também pertencente a superfamília dos receptores nucleares (Evans, 1988; Tsai & O'Malley, 1994; Mangelsdorf *et al.*, 1995; O'Malley & Conneely, 1992). A similaridade destas estruturas moleculares indica que o



mecanismo geral de ação do RP é semelhante aos outros membros da família dos receptores de esteróides (McDonnell & Goldman 1994).

A grande família dos receptores nucleares incluem os receptores dos hormônios e esteróides como os receptores do estrógeno, da progesterona, do retinóides, dos hormônios da tireóide e da vitamina D. Os genes caracterizados pela organização interna do domínio funcional específico são conservados entre as espécies e servem para diferenciar distintos graus dos membros familiares. A região mais conservada do gene responsável pela produção dos receptores é a região central (Evans, 1988). O hormônio progesterona liga-se especificamente ao domínio localizado no terminal carboxila, denominado domínio de ligação hormonal. A união entre o hormônio e seu domínio específico causa uma estímulo genético, que por sua vez provoca a modulação da transcrição de um gene (Gronemeyer, 1991; Tsai & O'Malley, 1994).

A seletividade do papel fisiológico destas duas proteínas isofórmicas são predestinadas por bases distintas de diferentes estruturas e propriedades funcionais específicas para cada proteína. O RPB em relação ao RPA contém uma quantidade maior de aminoácidos localizados no terminal amino, podendo variar de 128 à 165 aminoácidos dependendo da espécie (Giangrande & McDonnell, 1999 e Horwitz, 1992).

Evidências acumuladas demonstram que o RPA e o RPB são proteínas de diferentes funções. Uma das evidências é que as células cultivadas que expressam individualmente o RPA e o RPB, mostram diferentes propriedades de transativação, promovidas junto ao gene, e específicas para cada tipo celular (Tora *et al.*, 1988; Meyer *et al.*, 1992; Giangrande & McDonnell, 1999; Vegeto *et al.*, 1993).

Individualmente, o RPB demonstrou ter função como um forte ativador de transcrição de vários promotores dependentes do RP em diversos tipos celulares. O RPA é um inativador. Os estudos sugerem que o RPA e o RPB podem regular diferentes atividades fisiológicas frente a resposta do gene à progesterona. Cada proteína pode mostrar diferentes capacidades de transativação nos diversos tipos de tecido (Giangrande & McDonnell, 1999).

Alguns estudos demonstram que o RPB apresenta uma função adicional de transativação específica, com um papel essencial junto ao gene, que pode ser ativada pelo RPB e não pelo RPA. Embora o domínio inibitório esteja contido em ambas isoformas do RP, esta atividade se manifesta apenas no RPA (Giangrande & McDonnell, 1999 e Horwitz, 1992).

As proteínas RPA e RPB podem formar dímeros e ligarem-se ao DNA de 3 maneiras diferentes: RPA/RPA, RPB/RPB formando os homodímeros e RPA/RPB formando um heterodímero. Os mecanismos dos efeitos regulatórios da progesterona dependem da constituição específica de cada um destes dímeros. Vale lembrar que o RPB apresenta uma região de transativação específica não existente no RPA (DeMarzo *et al.*, 1991).

Sabe-se que a proteína receptora que se liga especificamente à progesterona é induzida pelo estrógeno. Esta propriedade foi inicialmente investigada no útero e no ducto ovariano da galinha por volta de 1970 (Milgrom & Baulieu, 1970; Milgrom. *et al.*, 1970; Leavitt & Blaha 1972; Leavitt *et al.*, 1974; Leavitt *et al.*, 1977; Sherman *et al.*, 1970). Demonstraram no ducto ovariano da galinha que o RP era um composto dímero, formado por duas proteínas RP, o RPA e o RPB. Em carcinoma de mama, as proteínas RPA e RPB foram caracterizadas *in vitro* inicialmente por Lessey *et al.*

(1983), e *in vivo* por Horwitz & Alexander (1999), que detectaram inicialmente uma massa molecular de aproximadamente 81 kD e 115 kD, respectivamente. Estas duas proteínas RPs são codificadas por um único gene sobre o controle de distintos promotores. Cada um destes consegue dar origem a um distinto subgrupo do RNAm do RP (Kastner *et al.*, 1990).

A expressão das isoformas do RP por um único gene é resultado da promoção induzida pelo estrógeno, onde se pode ter a transcrição de dois promotores alternativos, resultando na translocação e inibição de dois diferentes códons (Kastner *et al.*, 1990; Gronemeyer, 1991; Kraus *et al.*, 1993).

Inúmeros caminhos de ação promovidos pela progesterona ainda não estão muito bem definidos, assim como a sua distribuição e suas ações diretas e indiretas. Além disso, como o efeito da progesterona é mediado pelo RP e induzido pelo estrógeno na maioria das células alvos, não está claro se a delineação do específico efeito da progesterona é distinta ou similar à ação do estrógeno. Numerosas revisões têm sido feitas, descrevendo o mecanismo de ação da progesterona (Clarke, 1993 citados por Graham & Clarke, 1997; Gronemeyer, 1991; Tsai & O'Malley, 1994), e o seu efeito na proliferação celular e de seus antagonistas (Clarke & Sutherland, 1990; Horwitz, 1992), além da regulação da concentração dos RPs (Savouret *et al.*, 1988 e Savouret *et al.*, 1990).

Existe uma diferença relativa na expressão do RPA e do RPB em tecidos normais. A expressão aproximadamente equimolar do RPA e do RPB é observada no ducto ovariano da galinha (Schrader & O'Malley, 1972), no útero humano (Feil *et al.*, 1988), e uma similar razão desta expressão é vista em linhagens celulares derivadas de neoplasias de mama (Lessey *et al.*, 1983). Nos roedores, a expressão do

RPA se dá predominantemente em relação à alteração da expressão do RPB, demonstrando uma razão de 3:1 (Ilenchuk & Walters, 1987 e Schneider *et al.*, 1991). Alterações das razões em relação aos tipos do RP no ducto ovariano da galinha durante o inverno ou em animais velhos resultaram em uma diminuição mensurável da atividade funcional do RP (Boyd & Spelsberg, 1979; Boyd-Leinen *et al.*, 1982).

No entanto, está claro que ambos RPs (RPA e RPB) ligam-se à progesterona e interagem com os REs, aumentando as evidências das suas diferenças funcionais. Estudando estas duas proteínas com diferentes habilidades de ativação, obtém-se diferentes respostas promovidas pela progesterona. Estas diferenças são promovidas em células específicas (Tora *et al.*, 1988; Meyer *et al.*, 1992; Tung *et al.*, 1993; Vegeto *et al.*, 1993) sugerindo que a resposta celular pode ser modulada dependendo de alterações da razão entre as expressões do RPA e RPB. A diferença funcional entre as duas proteínas RP demonstrada *in vivo* sugere que a relativa expressão do RPA e do RPB pode influenciar na resposta frente ao estímulo da progesterona (Graham & Clarke, 1997).

O RPB tende a ser um forte ativador junto ao gene e o RPA pode agir predominantemente reprimindo o RPB (Tung *et al.*, 1993 e Vegeto *et al.*, 1993), sugerindo que alta expressão do RPA pode resultar na redução da resposta à progesterona quando ligada aos RPA e RPB simultaneamente. O papel repressor do RPA se estende além da inibição ao RPB. Também foi demonstrada a diminuição da resposta estimulada por outros hormônios como os andrógenos, glucocorticóides, mineralocorticóides, e estrógeno (McDonnell *et al.*, 1994; McDonnell & Goldman, 1994; Wen *et al.*, 1994). Os RPA e RPB também respondem diferentemente aos antagonistas da progesterona (Giangrande & McDonnell, 1999).

Sobre a maioria das circunstâncias, o RPA e o RPB estão presentes nas células alvo em quantidades equimolares, entretanto, diferença da expressão do nível relativo destas duas isoformas também são observadas em alguns sistemas, especificamente no útero (Lessey *et al.*, 1983). A razão do RPA em relação ao RPB varia de 50:1 a 2:1 durante o ciclo menstrual, principalmente devido à variação do nível de expressão do RPB (Wiehle *et al.*, 1995). Também são detectadas alterações na razão das expressões em relação aos RPA e RPB em curto espaço de tempo em neoplasias de mama e neoplasias endometriais (Graham *et al.*, 1995b; Graham *et al.*, 1996; Kumar *et al.*, 1998). Uma prova evidente desta duas isoformas do RP é a existência de 3 distintos estados do RP: o RPA/RPA monodímero, RPA/RPB heterodímero, e o RPB/RPB monodímero, que podem estar presentes nas células (DeMarzo *et al.*, 1991 e DeMarzo *et al.*, 1992).

Em neoplasias de mama de humanos, a razão da expressão da proteína do RPA e do RPB é diferentemente marcante entre os pacientes (Graham *et al.*, 1995b). A importância biológica destas diferentes razões da expressão do RP não tem sido extensivamente explorada. Pouco se sabe sobre a relativa expressão da proteína do RPA e do RPB. Em pesquisas *in vivo* constatou-se positividade para o RP em neoplasias de mama e em linhagens celulares encontrou-se preferencialmente o RPB estimulado pelo estradiol, resultando em uma significativa diminuição do RPA em relação ao RPB (Graham *et al.*, 1995b).

Trabalhos iniciais feitos com propriedades bioquímicas das isoformas do RP humano indicaram que estes dois receptores têm a mesma afinidade de ligação específica ao DNA (Christensen *et al.*, 1991). Isto não foi útil para descobrir em qual parte do cDNA estes receptores foram clonados. Entretanto estas duas atividades de

transcrição são aparentemente diferentes, especialmente, em trabalhos feitos usando reconstruções do sistema respondendo a ação da progesterona em várias células de mamíferos, revelando que o RPA e o RPB são diferentes e específicos promotores (Vegeto *et al.*, 1993). Para adicionar, a atividade de transcrição destas duas isoformas também são demonstradas apresentando características de dissimilaridades e variância, dependendo da célula e o contexto da promoção (Tung *et al.*, 1993; Vegeto *et al.*, 1993; Wen *et al.*, 1994; Charlbous & Galtier, 1994; McDonnell *et al.*, 1994). Na maior parte do contexto examinado, o funcionamento do RPB age como um ativador contendo uma resposta genética clássica do RP, enquanto que demonstrações da proteína RPA atua como inativadoras de transcrições (Tung *et al.*, 1993 e Vegeto *et al.*, 1993).

Quando RPA e o RPB são co-expressores nas células cultivadas em laboratório, a promoção é contestada no interior das células, ou seja, quando o agonista liga-se ao RPA e o complexo é ativado pode agir como um domínio repressor à ação do RPB ativado. Os resultados sugerem que a proteína RPA tem habilidade para minimizar o efeito global provocado pela progesterona, junto ao gene específico de um tecido (Vegeto *et al.*, 1993 e Kraus *et al.*, 1995).

A expressão do RP é descrita principalmente em tecidos que sabidamente respondem à ação da progesterona, como o útero (Perrot-Applanat *et al.*, 1985; Clarke *et al.*, 1987; Garcia *et al.*, 1988; Lessey *et al.*, 1988; Press & Greene, 1988; Press, *et al.*, 1988), o miométrio (Press *et al.*, 1988 e Janne *et al.*, 1976), no ovário (Duffy, & Stouffer, 1995), nas células granulosas pré-ovulatórias (Parke-Sarge *et al.*, 1995) no ducto ovariano da galinha (Spelsberg *et al.*, 1972 citados por Graham & Clarke, 1997) e na bursa de fabricius (Ylikomi *et al.*, 1985). Com menos frequência

tem sido encontrada também em outros tecidos pertencentes aos órgãos reprodutivos como os testículos (Tener, 1977 citado por Graham & Clarke, 1997) e a vagina (Batra & Iosif, 1985). Os RPs também foram encontrados em neoplasias de mama (Pollow *et al.*, 1977; Horwitz & McGuire citados por Graham & Clarke, 1997; Perrot-Applanat *et al.*, 1987 e Perrot-Applanat *et al.*, 1989), e de glândulas salivares (Jeannom *et al.*, 1999 e Shick *et al.*, 1995).

A expressão da proteína RP e a sensibilidade à progesterona estão sob controle do estrógeno, que aumenta a quantidade da progesterona e diminui a expressão do RP na maioria dos tecidos alvos. A expressão da proteína é diminuída durante a administração do estrógeno no útero de mamífero (Janne *et al.*, 1976; Feil *et al.*, 1972; Milgrom *et al.*, 1972; Milgrom *et al.*, 1973; Rao *et al.*, 1973; Leavitt *et al.*, 1974; Leavitt *et al.*, 1977). Durante a segunda metade do ciclo, os níveis de progesterona aumentam o total do nível do RP no útero. Esta diminuição com o tratamento da progesterona pode causar um parto prematuro (Leavitt *et al.*, 1974). Além disso, o tratamento com a progesterona pode opor-se à expressão do RP induzido pelo estrógeno (Milgrom *et al.*, 1973).

O maior papel da progesterona no desenvolvimento da mama normal é postulado como a formação de estruturas lóbulos-alveolares durante a gravidez (Topper & Freeman, 1980). Esta hipótese está apoiada em observações feitas nas glândulas mamárias de ratos apresentando RP nulos. Foi observado o desenvolvimento de estruturas ductais que são relativamente similares, exceto pela falha constatada na estrutura do lóbulo-alveolar intraductal, isto sobre a exposição do estrógeno e da progesterona (Lydon *et al.*, 1995). A progesterona influencia no processo de proliferação mediada pela regulação do estrógeno através do ciclo genético da célula,

dos fatores de crescimento e dos respectivos receptores dos fatores de crescimento. A progesterona também exerce uma diferenciação nas células da mama, preparando-a para a lactação. O papel da progesterona, em diferentes funções e em outras ocasiões não é muito explorada (Graham & Clarke, 1997).

Comparado com o útero, conhece-se muito pouco do mecanismo que a progesterona exerce sobre a mama, principalmente, pela dificuldade de se obter tecido normal de mama. Neoplasias de mama são usadas com maior frequência para estudar os efeitos da progesterona mediados pela influência dos fatores de crescimento e de seus receptores. Entretanto, as limitações dos estudos referentes a sua regulação e à expressão genética em células malignas freqüentemente são feitas em lesões metastáticas. Assim, a dificuldade da exploração dos resultados não permite extrapolar muito para a mama normal (Graham & Clarke, 1997).

O estrógeno provoca um aumento da proliferação celular no epitélio de mama normal *in vitro*. Quando se usa a progesterona combinada com o estrógeno, os resultados obtidos são variados. O uso da progesterona aumenta a síntese do DNA em epitélio de mama normal e em cultivo celulares (Vam Bogaert, 1978). Entretanto, a diminuição da progesterona não manifestou efeito na proliferação do epitélio da mama de rato (Mcmanus & Welsch, 1984 e Laidkaw, *et al.*, 1995). Os efeitos do estrógeno e da progesterona na linhagem denominada R5020, derivada de células epiteliais de mama, são opostos. O estrógeno aumenta e a progesterona diminui a proliferação celular (Graham & Clarke, 1997).

Devido as dificuldades de reproduzir fenômenos fisiológicos *in vitro*, ainda não foi possível a comprovação de evidências demonstradas *in vivo* que atestam o papel da progesterona na proliferação de células epiteliais de mama. Uma



contribuição para o fato é a limitação inerente que tenta reproduzir o envolvimento fisiológico na mama, incluindo efeitos parácrinos ocorridos ao redor, no estroma das células epiteliais em proliferação (Graham & Clarke, 1997).

Outros estudos determinantes na proliferação celular da mama e que envolve hormônios ovarianos neste processo são requeridos para reconciliar a discrepância dos dados publicados no papel da progesterona na proliferação celular (Graham & Clarke, 1997).

Ensaio sobre o mecanismo do efeito da progesterona na proliferação celular em carcinomas de mama são feitos em laboratórios de cultivo celulares, utilizando-se da linhagem T- 47D, onde se observou um aumento do ciclo celular após a administração do hormônio progesterona (Wong & Murphy, 1991; Musgrofe *et al.*, 1991; Musgrofe *et al.*, 1993).

### **3 PROPOSIÇÃO**

O objetivo deste trabalho é pesquisar a presença dos receptores de estrógeno e da progesterona pela imuno-histoquímica em adenomas pleomórficos humanos e verificar, através de uma análise comparativa, se há modificação no índice de proliferação celular em duas linhagens celulares de adenomas pleomórficos humanos, sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol e da progesterona diluídos no meio de cultura.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

Tendo como meta atingir a proposição desta tese, utilizou-se da técnica de imuno-histoquímica para a pesquisa das proteínas RE e RP, em APs emblocados em parafina, e do método da imunofluorescência para duas linhagens cultivadas de APs humanos, sendo uma do sexo masculino e outra do sexo feminino, além da linhagem T-47D que foi utilizada como controle positivo. No meio de cultivo onde linhagens estudadas como: AP8, AP9, T-47D e HN30 cresciam, foram diluídos estrógeno e progesterona. Através de observações de seus índices de crescimento, na presença e ausência destes, pretendeu-se verificar a existência ou não da influência dos respectivos hormônios esteróides na proliferação das células.

### **4.1 Imuno-histoquímica**

Dez casos de APs de glândula salivar humano submetidos a biópsia com finalidade diagnóstica foram utilizados para pesquisa dos RE e RP, através da técnica de imuno-histoquímica pelo método da streptoavidina-biotina peroxidase.

Os dados clínicos colhidos do arquivo do Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSP, dos APs utilizados neste estudo, estão descritos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Casos clínicos dos APs que foram submetidos a pesquisa das proteínas RE e RP

Caso APn°	Sexo	Idade	raça	Local
32318	F	23	-	Sulco gengival superior esquerdo
32383/32833	F	41	leucoderma	Palato duro
33233	F	39	-	Palato mole
33856 (AP8)	M	23	leucoderma	Parótida
33881 (AP9)	F	29	-	Parótida
34040	F	49	melanoderma	plato duro/palato mole
34286	M	52	-	plato duro/palato mole
34648	M	-	-	-
35124	F	36	melanoderma	Palato duro
35195	M	15	leucoderma	Palato duro

Em todos os casos, fragmentos representativos foram fixados em solução de formol a 10% e encaminhados ao Laboratório de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP. Eles foram processados de acordo com os procedimentos de rotina para a inclusão em parafina. A seguir, executou-se cortes de 5µm de espessura corados pela hematoxilina-eosina (HE), para estudo histológico e determinação de seu diagnóstico. Após a identificação dos APs, estes foram submetidos a cortes de 3µm para realização da reação imuno-histoquímica, os quais necessitaram ser estendidos em lâminas de vidro previamente silanizadas, segundo protocolo: as lâminas de vidro foram lavadas com álcool absoluto, secas e mergulhadas por 2 minutos em solução de 3-aminopropyltriethoxy-silane (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), a 5% em álcool absoluto. Em seguida, passaram rapidamente por dois banhos em água destilada e permaneceram por 24 horas em estufa a 37°C.

Os cortes foram submetidos a desparafinização em xilol a 60°C por 30 minutos, e xilol à temperatura ambiente por 20 minutos. A seguir, a reidratação foi obtida através da série descendente de etanóis.

Com o objetivo de remover o pigmento formólico, os cortes foram imersos em solução de hidróxido de amônia a 10% e em etanol a 95% durante 10 minutos. Após a lavagem em água corrente por 10 minutos e duas passagens por água destilada, o material, antes de receber o anticorpo primário para identificar os receptores de estrógeno e progesterona, foi submetido a pré-tratamento com ácido-cítrico mono-hidratado 10mM-pH 6,0 em microondas, com potência de 700W por 15 minutos, verificando sempre se as lâminas estavam banhadas pelo ácido (Shi *et al.*, 1991). A finalidade deste passo é recuperar os sítios antigênicos dos receptores hormonais. Após atingir a temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas em água corrente e em água destilada passando por dois banhos de 5 minutos cada, em tampão tri-hidróxi-metil-aminometano (TRIS) pH 7,4.

Posteriormente, os cortes foram submetidos ao bloqueio da biotina endógena para evitar a marcação inespecífica e em seguida foram incubados juntamente ao anticorpo primário, o anticorpo contra o RE foi diluído em albumina bovina (BSA) a 1%, na concentração de 1:80 e incubado por um período de 2 horas em temperatura ambiente, o anticorpo contra RP foi utilizado na concentração de 1:100, junto ao BSA a 1%, deixando-o reagir também por 2 horas em temperatura ambiente. O BSA foi utilizado para bloquear os sítios inespecíficos, reduzindo a coloração inespecífica de fundo.

O anticorpo contra a proteína RE aplicado no presente estudo é um anticorpo monoclonal produzido em camundongo pela DAKO (DAKO Corporation, Carpinteira, CA., USA), e este tem a capacidade de reagir especificamente com o terminal amino do RE. O anticorpo contra o RE segundo informações do fabricante,

foi testado previamente em células epiteliais e mioepiteliais do útero e em células epiteliais de glândulas mamárias normais e hiperplasiadas.

O anticorpo específico para a proteína RP utilizada neste trabalho, é um anticorpo também monoclonal desenvolvido em camundongo pela DAKO (DAKO Corporation, Carpinteira, CA, USA), que tem a capacidade de reconhecer as duas isoformas da proteína RP, mais especificamente o terminal amino desta proteína, localizado entre os aminoácidos 1 e 164. Este foi previamente testado em uma linhagem celular de carcinoma ductal de mama humana, denominado de T-47D (informações do fabricante).

A seguir, os cortes foram lavados duas vezes em tampão TRIS pH 7,4, por um período de 5 minutos cada, e incubados por um período de 30 minutos com o anticorpo secundário (coelho anti-camundongo e cabra). Essa etapa foi realizada à temperatura ambiente e em câmara úmida. Após nova lavagem em tampão TRIS, foi incubado o complexo streptavidina-biotina BioGenex (BioGenex Laboratórios, Sam Ramon, Calif.) na diluição de 1:200, aplicado por 30 minutos à temperatura ambiente.

Para a revelação da reação, o cromógeno empregado foi a diaminobenzidina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), dissolvida em 100ml de TRIS pH 7,4, com a adição de 600µl de água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por 30 minutos. Os cortes foram então lavados em água corrente e água destilada, contracorados com hematoxilina de Mayer por 10 minutos e por último, foram desidratados em solução crescente de etanol, diafanizados em 3 banhos de xilol e montados em resina acrílica (Permout).

O controle positivo de cada reação foi feito através da incubação de cada anticorpo em cortes de tecido que sabidamente expressam o anticorpo estudado (neoplasias de mama e tecido uterino).

Os cortes histológicos corados por HE e submetidos ao procedimento imunohistoquímico foram analisados em microscópio de luz (Olympus Optical CO, LTD. Japan, 120 v, 0,24 A, 60 Hz) e fotografados em microscópio de luz (Zeiss, Germany).

#### **4.2 Estabelecimento das culturas celulares**

Foram utilizadas as linhagens de células AP8 e AP9. As células da linhagem AP8 são provenientes de um adenoma pleomórfico humano, originado da parótida de um paciente do sexo masculino, de 23 anos de idade. As células AP9 são derivadas de um adenoma pleomórfico humano, de parótida, de uma paciente do sexo feminino, de 29 anos de idade. As duas linhagens foram estabelecidas no laboratório de cultivo celular da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP. O diagnóstico anátomo-patológico de ambas também foi obtido no Laboratório de Patologia Cirúrgica da FOUSP, tendo como registo o número 32856 para o diagnóstico da neoplasia, correspondente à linhagem celular da AP8 e 33881 para a linhagem AP9.

Fotomicrografias destes cortes histológicos corados por HE, podem ser vistos na página seguinte (Figura 4.1 e Figura 4.2).

Utilizou-se o protocolo padrão para isolamento das células neoplásicas como descrito a seguir: fragmentos da neoplasia recentemente removida do paciente foram colocados em tubos de ensaio (Costar) de 50ml, contendo DMEM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), suplementados com 10% de soro fetal bovino (Cultilab,

Campinas, SP, Br), e 3% de solução antibiótica/antimicótica (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). No laboratório de cultivo celular e no interior da capela de fluxo laminar, colheu-se fragmentos da região mais central da peça cirúrgica, que foram lavados inicialmente em álcool 70% contido em uma Placa de Petri (60mm de diâmetro - Costar), e posteriormente em PBS (solução tampão fosfato-salina sem cálcio e sem magnésio - Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), também contido em placas de Petri (60ml de diâmetro – Costar). Estes foram seccionados em numerosas e minúsculas frações, denominadas explantes, através de cortes com lâminas de bisturi, e mecanicamente dissociados com movimentos sutis, utilizando-se da pipeta Pasteur. Estes explantes foram transferidos a subsequentes placas de Petri contendo PBS (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), com a finalidade de eliminar impurezas, até não se observar mais conteúdo hemorrágico ou material sanguinolento. Uma vez devidamente limpas, estas minúsculas porções de fragmento do adenoma pleomórfico, foram transferidas a 4 frascos plásticos de cultivo celular de 25cm<sup>2</sup> com 2ml de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), mais 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, Br) e 1% de solução antibiótica/antimicótica. Observadas diariamente e ao se perceber o clareamento do meio onde estavam sendo cultivadas, acrescentou-se 0,5ml da mesma, até atingir um volume de 5ml de DMEM complementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica/antimicótica. Subseqüentemente, o meio de cultivo celular foi trocado a cada 4 ou 5 dias, conforme o consumo deste pelas células. Isto foi cuidadosamente executado por um período de aproximadamente 3 a 4 meses, tempo necessário para que as células atingissem a confluência e o estabelecimento da cultura primária.



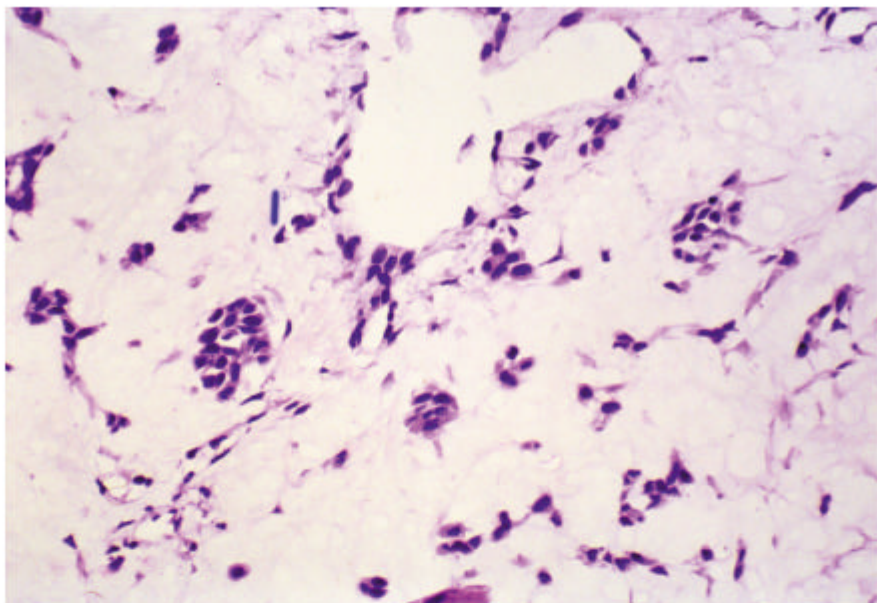


Figura 4.2 - Corte histológico do adenoma pleomórfico (AP) que deu origem a linhagem AP8 (HE, aumento original 100X).

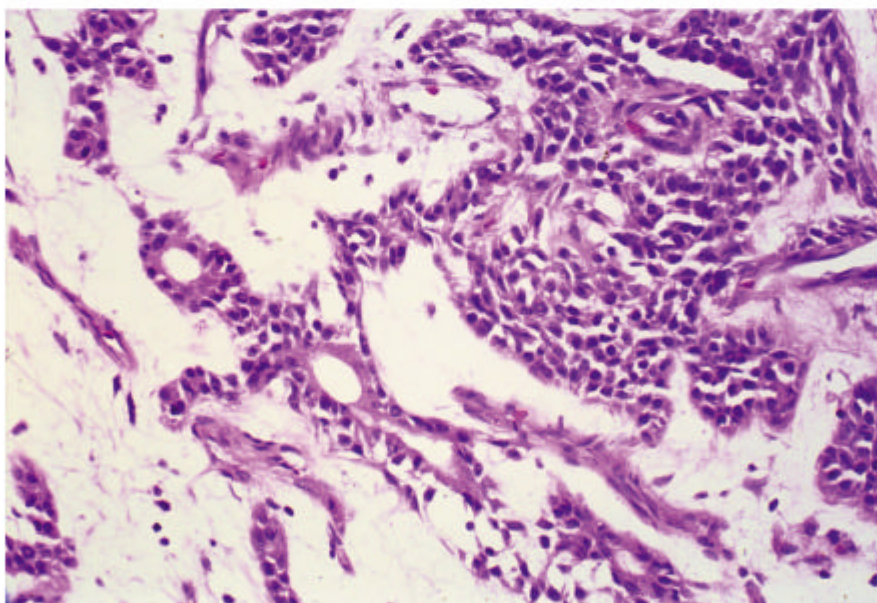


Figura 4.1 - Corte histológico do adenoma pleomórfico (AP) que deu origem a linhagem AP9 (HE, aumento original 100X).

### 4.3 Imunofluorescência

Uma vez estável e após a quarta passagem da linhagem celular AP9 e a sexta passagem da linhagem AP8, as células foram separadas em frascos, usando uma solução de tripsina a 0,25% (Gibico) e colocadas em placas de Petri (60mm de diâmetro-Costar), com lamínulas de vidro previamente lavadas e esterilizadas pela autoclave.

As células crescidas sobre as lamínulas de vidro foram fixadas em metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 6 minutos e submetidas à imunofluorescência para detecção de proteínas como: as citoqueratinas de alto e de baixo peso molecular, vimentina, actina de músculo liso, receptor de estrógeno e receptor de progesterona. Os anticorpos contra as citoqueratinas, vimentina e actina de músculo liso, têm a finalidade de caracterizar as linhagens celulares dos adenomas pleomórficos, demonstrando que a célula neoplásica mioepitelial é a proliferante, e não uma outra qualquer.

As citoqueratinas de alto e baixo peso molecular são proteínas presentes basicamente nas células epiteliais e também expressas nas células epiteliais e mioepiteliais do adenoma pleomórfico. Para a marcação desta, utilizou-se um anticorpo monoclonal denominado AE1/AE3, desenvolvido em camundongo pela BioGenex (BioGenex Laboratories, San Ramon, Calif.). Para a reação foi usada a diluição de 1/100 em BSA, durante 1 hora. A presença desta proteína foi constatada nas células pertencentes as linhagens AP8 e AP9.

A vimentina é uma proteína pertencente ao filamento intermediário de células de origem mesenquimal, e entre raras outras células, estando presente também nas células mioepiteliais. Para a pesquisa desta proteína foi empregado um anticorpo

monoclonal desenvolvido em camundongo na empresa DAKO (DAKO Corporation, Carpinteira, CA, USA), sob a diluição de 1/100 em BSA, no período de 1 hora. A positividade para esta proteína foi encontrada nas células derivadas das linhagens AP8 e AP9.

A actina de músculo liso é uma proteína presente nas células mioepiteliais do adenoma pleomórfico e foi marcada através de um anticorpo monoclonal, também desenvolvido em camundongo, pela DAKO (DAKO Corporation, Carpinteira, CA, USA), que por sua vez liga-se especificamente ao terminal amino da actina de músculo liso. Esta marcação também foi evidenciada nas células das linhagens AP8 e AP9.

As observações e as fotografias foram feitas com um microscópio de fluorescência da Zeiss Axiophot, usando as objetivas de 63x Plan Neofluor 1.4 NA e 100x Plan Apochromatic, 1.4 NA.

#### **4.4 Cultura celular**

As células foram cultivadas em DMEM<sup>®</sup> (Dulbecco's Modified Eagle's Meio, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), suplementada com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, Br), e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). As células foram mantidas em frascos plásticos de cultivo celular de 25cm<sup>2</sup> (Costar) a uma atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> no ar a 37°C.

Após algumas passagens das linhagens AP9 e AP8, algumas células foram congeladas em tubo de criogênio contendo 1ml de DMEM (Sigma Chemical Co., St.

Louis, MO, USA) e 0,1ml de Di-metil-sulfóxido-(DMSO- Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

Todos os procedimentos de cultivo foram realizados em capela de fluxo laminar, seguindo os protocolos para a manutenção da esterilidade dos materiais, suplementos e meio de cultura utilizados. As células foram monitorizadas diariamente em microscópio invertido de contraste de fase, sendo o meio de cultura trocado a cada 2 ou 3 dias, de acordo com o metabolismo celular.

#### **4.5 Descongelamento de linhagens celulares**

Quando necessário, algumas células da linhagem AP8, AP9, T-47D e HN30 foram descongeladas em banho Maria a 37°C por 2 minutos, transferidas para tubo de centrifugação contendo 10ml de DMEM (“Dulbelcco’s Modified Eable’s Médium”) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (cultilab, Campinas, SP, Br) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) (DMEM completo). Em seguida foram centrifugadas a 300g durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Após a aspiração do sobrenadante, o precipitado de células foi ressuspenseo com DMEM completo. A suspensão de células foi transferida para um frasco de 25cm<sup>2</sup> contendo 5ml de DMEM completo, em seguida mantida em estufa à temperatura de 37°C e atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **4.6 Subcultivo celular**

As células foram subcultivadas após ocuparem 70% da área cultivável do frasco, o que se denomina subconfluência. Para o subcultivo, o meio de cultura do

frasco foi removido e a monocamada celular lavada uma a duas vezes com solução tampão fosfato-salina sem cálcio e magnésio (PBS), pH 7,2. Em seguida, as células foram separadas entre si e do frasco de cultivo, utilizando 1ml de solução de tripsina Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) a 0,25% com ácido etilenodiaminotetracético 1mM (EDTA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), durante 5 minutos, a 37°C. A tripsina foi inativada com o meio de cultura contendo soro fetal bovino e as células em suspensão foram distribuídas em frascos de 25cm<sup>2</sup> contendo 5 ml de meio de cultivo. Os frascos foram mantidos em estufa à temperatura de 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Cada procedimento de subcultura deu origem a uma nova passagem da linhagem celular. As células foram subcultivadas até atingirem um número suficiente para se introduzir em 27 Placas de Petri uma quantia de aproximadamente  $1 \times 10^4$  de células, por Placas de Petri de 6 cm de diâmetro.

#### **4.7 Contagem das células**

A determinação do número de células viáveis foram realizadas em hemocítômetro sob microscópio de luz, utilizando-se a técnica da exclusão de células coradas pelo azul de Trypan, executando-se o seguinte procedimento: o meio de cultura dos frascos foi removido, a monocamada celular lavada duas vezes com solução tampão fosfato-salina, sem cálcio e magnésio (PBS), pH 7,2. Em seguida, as células foram separadas entre si e dos frascos de cultivo utilizando 2 ml de solução de tripsina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) a 0,25% com ácido etilenodiaminotetracético 1mM (EDTA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) para cada frasco, durante 5 minutos, a 37°C. A tripsina foi inativada com meio de

cultura contendo soro fetal bovino, e as células em suspensão transferidas para um tubo de centrifugação a 300g durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Após aspiração do sobrenadante, ressuspendeu-se o precipitado de células em 1 ml de solução tampão fosfato-salina, sem cálcio e magnésio (PBS), pH 7,2 e 1/10 (0,1ml) da alíquota dessa suspensão transferida para outro tubo de ensaio, e neste foi acrescido 0,8ml de (PBS) e 0,1ml de solução de azul de tripam (0,4%). O azul de tripam tem a finalidade de evidenciar as células mortas. Resuspenso novamente, utilizou-se uma pequena amostra para preencher a Câmara de Neubauer, que juntamente com o microscópio invertido de contraste de fase e uma fórmula matemática possibilitou obter o total das células contidas no tubo de ensaio.

Foram contadas somente as células vivas que ocupavam o interior dos 50 quadrados que dividem o centro da Câmara de Neubauer, e este número, juntamente com a fórmula matemática abaixo citada, teve o objetivo de obter o número total de células disponíveis, para serem distribuídas uniformemente, em uma quantia de  $1 \times 10^4$  de células por Placas de Petri.

$$TC = \frac{\text{n}^\circ \text{ de cel.} \times \text{diluição} \times 10^4}{\text{número de quadrados}}$$

onde:

TC = total de células

nº de cél. = número de células

Diluição = 10

número de quadrados = números de quadrados da Câmara de Neubauer utilizados para a contagem das células.

Uma vez obtido o total de células, este número foi multiplicado por 0,9, correspondente a 9/10 (nono décimo) das células que permaneceram no tubo de ensaio para serem redistribuídas nas Placas de Petri. Novamente esta suspensão foi centrifugada a 300g durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Aspirou-se o

sobrenadante e estas células foram novamente diluídas em meio de cultura, em uma diluição tal que fosse conseguido um total de  $1 \times 10^4$  de células em  $100 \mu\text{l}$  de meio, e assim foram distribuídas nas 27 placas. O restante das células foram colocadas em frasco de cultivo ou congeladas.

#### 4.8 Curva de crescimento

Uma vez obtidas 27 Placas de Petri de 6 cm de diâmetro com  $10^4$  de células neoplásicas mergulhadas em 5 ml de meio de cultivo, em 9 destas foi diluído no meio de cultivo o hormônio 17- $\beta$ -estradiol (solúvel em água, Sigma, USA), apresentando uma diluição final de  $10^{-4}$  mg/ml de 17- $\beta$ -estradiol por ml de meio de cultivo, em outras 9, foi diluído o hormônio progesterona (solúvel em água, Sigma, USA) chegando à diluição final também de  $10^{-4}$  mg/ml de progesterona por ml de meio, e as 9 restantes foram utilizadas como controle.

Foram contadas 9 placas por dia, 3 com 17- $\beta$ -estradiol (solúvel em água, Sigma, USA), diluído no meio de cultura, 3 com progesterona (solúvel em água, Sigma, USA), diluído no meio de cultura e 3 sem diluição de qualquer hormônio. Estas foram contadas nos próximos 3 dias, no 2º dia (24horas), 3º dia (48horas) e 4º dia (72horas), sempre no mesmo horário, horário também em que estas células foram distribuídas nas Placas de Petri e submetidas ao efeito dos hormônios estudados.

Para a obtenção da curva de crescimento e aplicação da análise estatística, as 27 placas de Petri foram divididas em 9 grupos distintos, conforme o tipo de hormônio diluído e do tempo de espera para serem submetidas à contagem das células.

1º grupo: composto por 3 placas de Petri, inicialmente com  $10^4$  células sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol que se encontrava diluído no meio de cultivo. Estas foram

sujeitas à contagem após um período de 24 horas da adição das células e do hormônio.

2º grupo: composto por 3 placas de Petri, inicialmente com  $10^4$  células sob a ação do progesterona que se encontrava diluído no meio de cultivo. Estas foram submetidas a contagem após um período de 24 horas da adição das células e do hormônio.

3º grupo: composto por 3 placas de Petri, inicialmente com  $10^4$  células. Estas foram contadas após um período de 24 horas da adição das células. (Grupo controle 24 horas)

4º grupo: composto por 3 placas de Petri, inicialmente com  $10^4$  células sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol que se encontrava diluído no meio de cultivo. Estas foram submetidas a contagem após um período de 48 horas da adição das células e do hormônio.

5º grupo: composto por 3 placas de Petri, inicialmente com  $10^4$  células sob a ação da progesterona que se encontrava diluído no meio de cultivo. Estas foram submetidas a contagem após um período de 48 horas da adição das células e do hormônio.

6º grupo: composto por 3 placas de Petri, inicialmente com  $10^4$  células. Sua quantidade foi verificada após um período de 48 horas da adição das células. (Grupo controle 48 horas)

7º grupo: composto por 3 placas de Petri, inicialmente com  $10^4$  células sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol que se encontrava diluído no meio de cultivo. Estas foram submetidas a contagem após um período de 72 horas da adição das células e do hormônio.



8º grupo: composto por 3 placas de Petri, inicialmente com  $10^4$  células sob a ação do progesterona que se encontrava diluído no meio de cultivo. Estas foram submetidas a contagem após um período de 72 horas da adição das células e do hormônio.

9º grupo: composto por 3 placas de Petri, inicialmente com  $10^4$  células. Estas foram submetidas a contagem após um período de 72 horas da adição das células.  
(Grupo controle 72 horas)

Cada ponto da curva de crescimento foi obtido através da média do total de células vivas contadas em cada uma das 3 placas de Petri de cada grupo e do tempo de espera para serem contadas (24 horas, 48 horas, 72 horas).

#### **4.9 Análise estatística**

Para a análise estatística dos valores obtidos utilizou-se o programa GMC, versão 8.1. Os testes empregados foram a análise de variância e o teste de Tukey, aplicados separadamente a cada experimento das diversas linhagens celulares estudadas, estes testes estão mais detalhados nos resultados descritos a seguir. O nível de significância considerada foi de 5%.

#### **4.10 Controle da curva de crescimento**

As diluições e o protocolo utilizado para o estabelecimento das curvas de crescimento deste estudo foram baseados na literatura pertinente e previamente testados empiricamente por diversas vezes nas linhagens AP8, AP9 linhagens de AP e T-47D, linhagem utilizada como controle positivo, derivada de um carcinoma ductal de mama humana largamente estudada na literatura e sabidamente positiva

para o RE e RP. A linhagem HN30, derivada de um carcinoma epidermóide humano, foi o controle negativo neste estudo.

## 5 RESULTADOS

Pela técnica imuno-histoquímica e pelo método streptoavidina-biotina peroxidase, encontrou-se a presença dos receptores de estrógeno e do progesterona no AP. Os anticorpos utilizados marcaram os núcleos de algumas células neoplásicas, como demonstrado nas Figuras 5.1 e 5.2.

Dos dez casos de APs utilizados para a pesquisa dos receptores de estrógeno e da progesterona, pôde-se observar o seguinte perfil, demonstrado na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Casos de AP emblocados em parafinas que foram submetidas à pesquisa das proteínas RE e RP

Caso AP nº	Sexo	Idade	RE	RP
32318	F	23	-	+
32383/32833	F	41	+	++
33233	F	39	++	++
33856 (AP8)	M	23	+	+
33881 (AP9)	F	29	++	++
34040	F	49	++	-
34286	M	52	++	++
34648	M		++	+
35124	F	36	-	-
35195	M	15	-	+

+ raras células marcadas

++ várias células marcadas

- nenhuma célula marcada

Pelas análises estatísticas comparando os diferentes grupos, sob influência hormonal e sem esta influência, pertencentes à linhagem AP9 (linhagem proveniente

de uma paciente do sexo feminino), constatou-se que existe uma diferença significativa no número de células a partir das primeiras 48 horas (48 horas e 72 horas), entre o controle e aquelas células submetidas à ação da progesterona sob a diluição de  $1 \times 10^{-4}$  mg/ml no DMEM. Já nas células submetidas à ação do 17- $\beta$ -estradiol sob a diluição de  $1 \times 10^{-4}$  mg/ml no DMEM, houve uma diferença significativa somente nas 72 horas subsequentes, esta mesma alteração expressiva não ocorreu entre as células expostas à ação do 17- $\beta$ -estradiol e as células sob o efeito da progesterona em nenhum dos dias (24 horas, 48 horas e 72 horas).

Através da análise estatística dos diferentes grupos derivados da linhagem AP8 (linhagem procedente de um paciente do sexo masculino) sob a influência hormonal e sem esta influência, constatou-se diferença expressiva somente nos grupos contados em 72 horas entre o controle e aquelas células submetida à ação do 17- $\beta$ -estradiol e da progesterona sob a diluição de  $1 \times 10^{-4}$  mg/ml no DMEM Também não houve diferença significativa entre as células expostas à ação do 17- $\beta$ -estradiol e as células sob efeito da progesterona em nenhum dos tempos (24 horas, 48 horas e 72 horas).

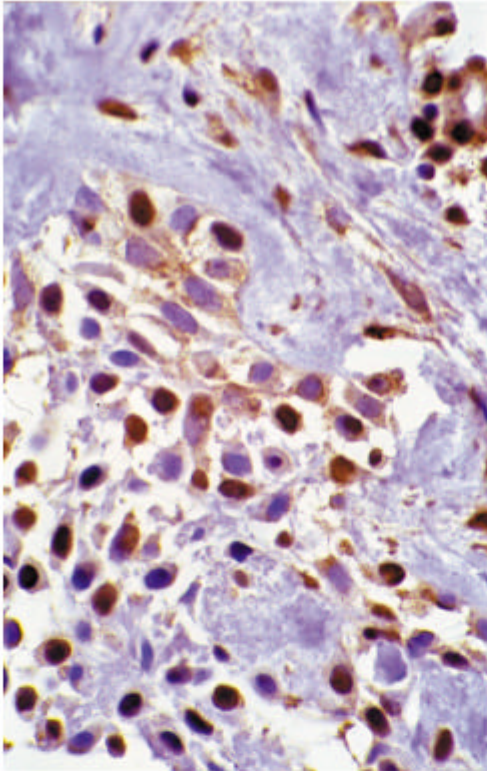


Figura 5.1-Adenoma pleomórfico (AP) exibindo positividade para o receptor de estrógeno (RE) (aumento original 100X).

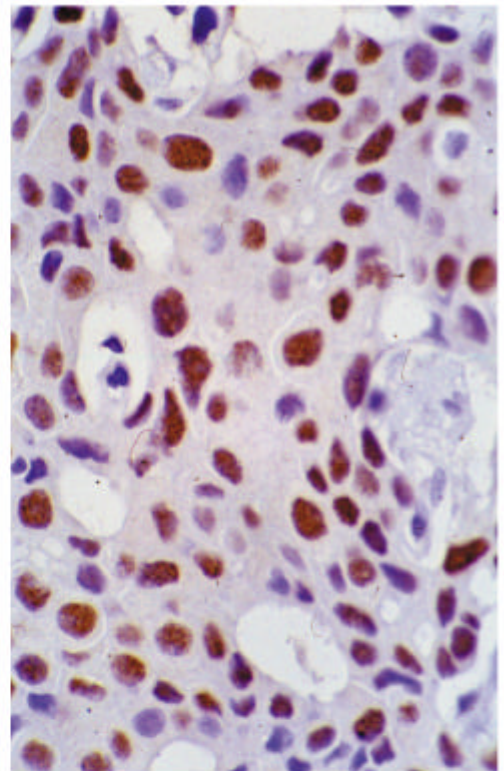


Figura 5.2-Tecido uterino utilizado como controle positivo para a marcação do Receptor de estrógeno (RE) (Aumento original 100X).

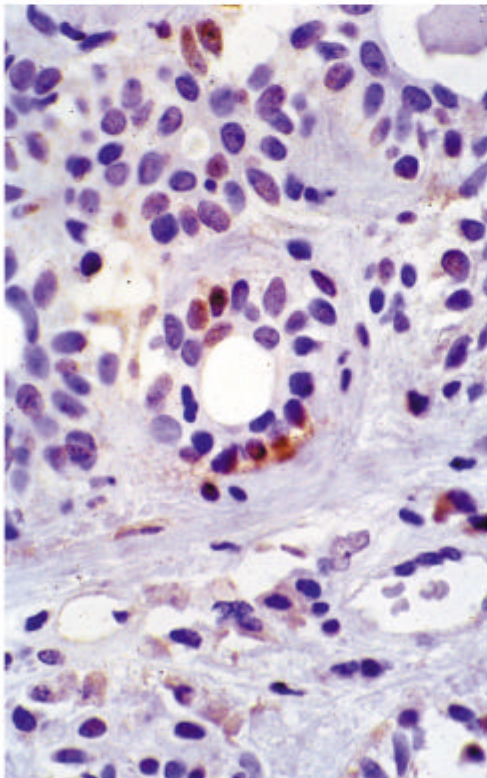


Figura 5.3-Adenoma pleomórfico (AP) exibindo positividade para o receptor de progesterona (RP) (aumento original 100X).

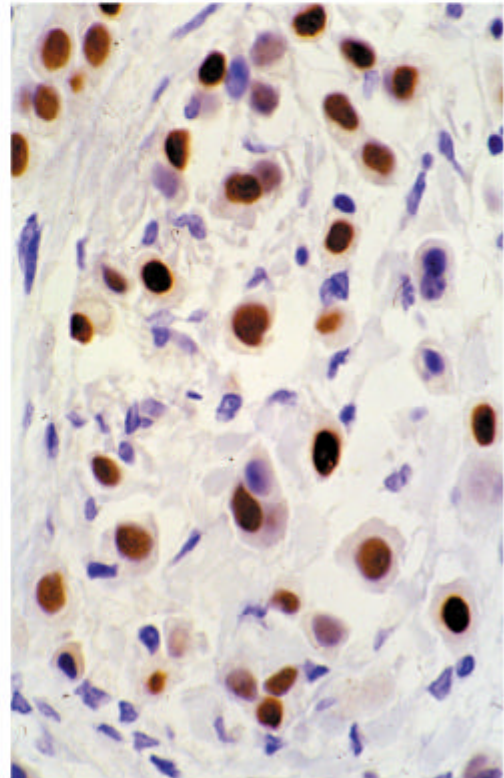


Figura 5.4-Tecido uterino utilizado como controle positivo para a marcação do Receptor de progesterona (RP) (Aumento original 100X).

### 5.1 Análise estatística da linhagem T-47D

Tabela 5.2 - Demonstração do número total de células pertencentes à linhagem T-47D contidas em cada Placa de Petri, submetidas e não submetidas à ação hormonal, além da média e do desvio padrão

<b>Hormônio</b>		<b>17-<math>\beta</math>-estradiol</b>	<b>Progesterona</b>	<b>Controle</b>
<b>Tempo</b>				
<b>24</b> <b>horas</b>	TC 1	$1,42 \times 10^4$	$1,28 \times 10^4$	$1,82 \times 10^4$
	TC 2	$1,4 \times 10^4$	$1,88 \times 10^4$	$1,48 \times 10^4$
	TC 3	$1,7 \times 10^4$	$1,42 \times 10^4$	$1,28 \times 10^4$
	<b>Média</b>	<b><math>1,5 \times 10^4</math></b>	<b><math>1,52 \times 10^4</math></b>	<b><math>1,52 \times 10^4</math></b>
	DP	0,16773	0,3139	0,273008
<b>48</b> <b>horas</b>	TC 1	$3 \times 10^4$	$3,26 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$
	TC 2	$3,04 \times 10^4$	$4,84 \times 10^4$	$2,56 \times 10^4$
	TC 3	$3,46 \times 10^4$	$3,78 \times 10^4$	$2,44 \times 10^4$
	<b>Média</b>	<b><math>3,16 \times 10^4</math></b>	<b><math>3,96 \times 10^4</math></b>	<b><math>2,4 \times 10^4</math></b>
	DP	0,780085	0,805233	0,183303
<b>72</b> <b>horas</b>	TC 1	$11,04 \times 10^4$	$14,38 \times 10^4$	$8,98 \times 10^4$
	TC 2	$13,5 \times 10^4$	$14,6 \times 10^4$	$6,52 \times 10^4$
	TC 3	$10,7 \times 10^4$	$12,18 \times 10^4$	$6,94 \times 10^4$
	<b>Média</b>	<b><math>11,74 \times 10^4</math></b>	<b><math>13,72 \times 10^4</math></b>	<b><math>7,48 \times 10^4</math></b>
	DP	1,527918	1,338208	1,315903

TC 1: total de células contidas na 1ª Placa de Petri do grupo 1, 2 e 3.

TC 2: total de células contidas na 2ª Placa de Petri do grupo 4, 5 e 6.

TC 3: total de células contidas na 3ª Placa de Petri do grupo 7, 8 e 9.

Média: média entre TC1, TC 2 e TC3.

DP.: Desvio padrão entre TC1, TC2 e TC3.

Tabela 5.3 - Valores originais da análise de variância do teste estatístico (linhagem T-47D)

<b>Fonte de variação</b>	<b>Soma de quadrantes</b>	<b>G.L.</b>	<b>Quadrantes médios</b>	<b>F</b>	<b>Probabilidade (HO)</b>
<b>Entre hormônios</b>	31,2463	2	15,6231	20,66	0,008% significante
<b>Entre Tempos</b>	459,6557	2	229,8279	303,96	0,000% significante
<b>Interação hormônio X Tempo</b>	33,4413	4	8,3603	11,06	0,023% significante
<b>Resíduo</b>	13,61	18	0,7561		
<b>Variação total</b>	537,9533	26			

**Valores originais das médias de amostragem calculadas (linhagem T-47D):**

Fator de variação: hormônio.

17- $\beta$ -estradiol: 5,47333

progesterona: 6,40222

controle: 3,80222

Fator de variação: tempo.

24 horas: 1,52

48 horas: 3,17556

72 horas: 10,98222

**Resultados do teste de Tukey aplicado na interação hormônio x tempo (linhagem T-47D).**

Dados:

Resíduo na análise de variância: 0,756099

Nível de probabilidade indicado: 5

Número de dados da amostra: 27

Número de médias comparadas: 9

Número de dados para cada média: 3

Grau de liberdade do resíduo: 18

Valor q tabelado, (ao nível de 5%), para 9 médias e 18 graus de liberdade: 4,960.

Resultado: Valor crítico de Tukey calculado:  $2,49006 \times 10^4$ .

Obs: a diferença entre as médias é significativa quando for maior que  $2,49 \times 10^4$ .



Tabela 5.4 - Demonstração dos resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem T-47D, sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol e às utilizadas como controle

<b>Hormônio</b>	<b>17-<math>\beta</math>-estradiol</b>	<b>Controle</b>	<b>Diferença das médias</b>	<b>Resultado da análise</b>
<b>24 horas</b>	1,5x10 <sup>4</sup>	1,52x10 <sup>4</sup>	<b>0,02x10<sup>4</sup></b>	NS
<b>48 horas</b>	3,16x10 <sup>4</sup>	2,4x10 <sup>4</sup>	<b>0,76x10<sup>4</sup></b>	NS
<b>72 horas</b>	11,74x10 <sup>4</sup>	7,48x10 <sup>4</sup>	<b>4,26x10<sup>4</sup></b>	S

NS: não significativa (diferença entre as médias < que 2,49x10<sup>4</sup>)

S: significativa (diferença entre as médias > que 2,49x10<sup>4</sup>)

Resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem T-47D, sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol e controle:

Somente após 72 horas de influência hormonal é que notou-se uma diferença significativa na proliferação das células que estavam sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol, em relação às usadas como controle

Não se notou diferença significativa da proliferação celular das que estavam sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol e as utilizadas como controle, após a decorrência 24 horas e 48 horas de influência hormonal.

Tabela 5.5 – Demonstração dos resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem T-47D, sob a ação da progesterona e às utilizadas como controle

<b>Hormônio</b>	<b>Progesterona</b>	<b>Controle</b>	<b>Diferença das médias</b>	<b>Resultado da análise</b>
<b>24 horas</b>	$1,52 \times 10^4$	$1,52 \times 10^4$	<b>0</b>	NS
<b>48 horas</b>	$3,96 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4$	<b><math>1,56 \times 10^4</math></b>	NS
<b>72 horas</b>	$13,72 \times 10^4$	$7,48 \times 10^4$	<b><math>6,24 \times 10^4</math></b>	S

NS: não significativa (diferença entre as médias < que  $2,49 \times 10^4$ )

S: significativa (diferença entre as médias > que  $2,49 \times 10^4$ )

Resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes a linhagem T-47D, sob a ação da progesterona e controle:

Apenas após 72 horas de influência hormonal è que foi notada uma diferença significativa da proliferação celular quando sob a ação da progesterona em relação às utilizadas como controle,.

Não se notou diferença significativa da proliferação celular das células sob a ação da progesterona e às utilizadas como controle, após a decorrência 24 horas e 48 horas de influência hormonal.

Tabela 5.6 - Demonstração dos resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem T-47D, sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol e da progesterona

Hormônio	17- $\beta$ -estradiol	Progesterona	Diferença das médias	Resultado da análise
Tempo				
24 horas	$1,5 \times 10^4$	$1,52 \times 10^4$	$0,02 \times 10^4$	NS
48 horas	$3,16 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4$	$0,76 \times 10^4$	NS
72 horas	$11,74 \times 10^4$	$7,48 \times 10^4$	$4,26 \times 10^4$	NS

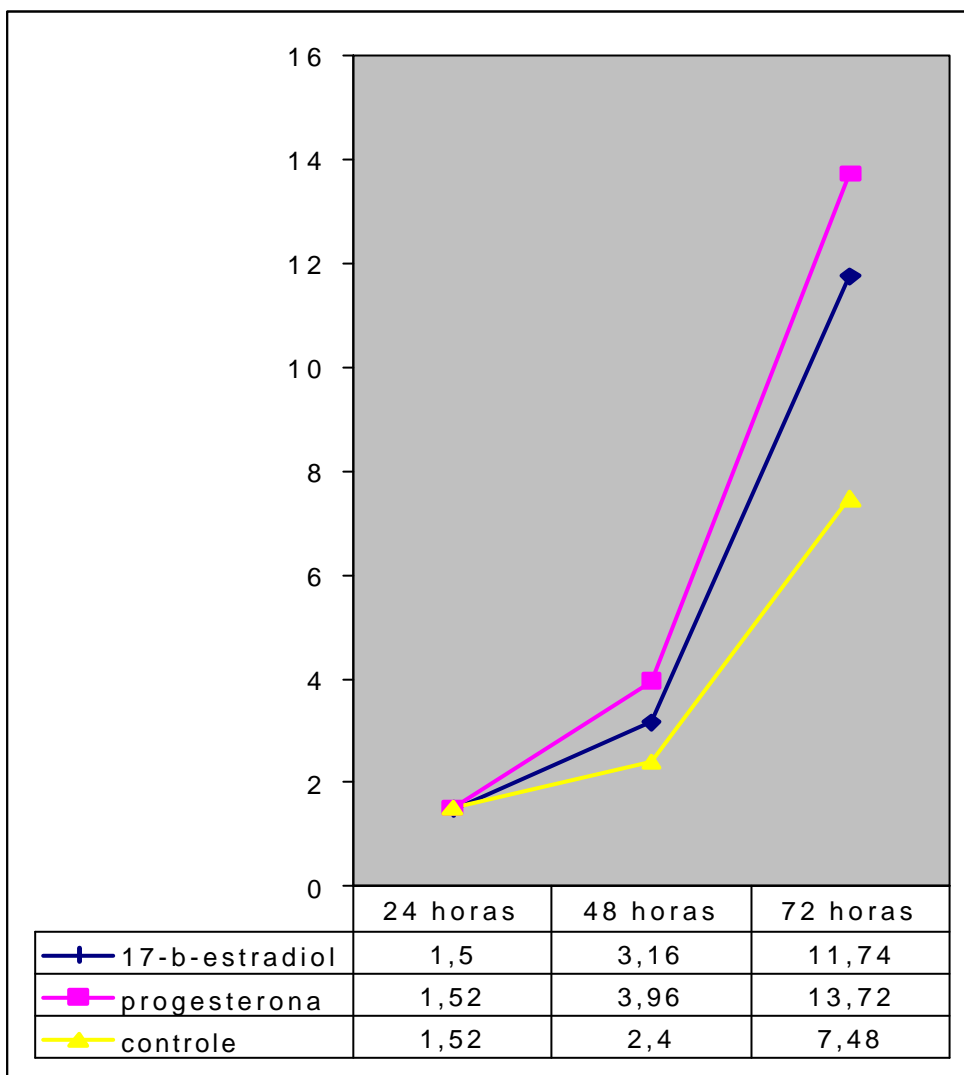
NS: não significante (diferença entre as médias < que  $2,49 \times 10^4$ )

S: significante (diferença entre as médias > que  $2,49 \times 10^4$ )

Resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem T-47D, sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol e da progesterona:

Em nenhum dos períodos em que as células foram submetidas a contagem não se notou diferença significativa da proliferação celular em relação àquelas sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol e sob a ação da progesterona.

Gráfico 5.1 - Representação da curva do crescimento da população celular da linhagem T-47D sob a influência do 17- $\beta$ -estradiol, da progesterona e das utilizadas como controle



## 5.2 Análise estatística da linhagem AP9

Tabela 5.7 - Demonstração do número total de células pertencentes à linhagem AP9 contidas em cada Placa de Petri, submetidas e não submetidas à ação hormonal, além da média e do desvio padrão

<b>Hormônio</b>		<b>17-<math>\beta</math>-estradiol</b>	<b>Progesterona</b>	<b>Controle</b>
<b>Tempo</b>				
<b>24</b> <b>horas</b>	TC 1	$1,08 \times 10^4$	$0,86 \times 10^4$	$1,18 \times 10^4$
	TC 2	$1,16 \times 10^4$	$1,08 \times 10^4$	$1,02 \times 10^4$
	TC 3	$1,4 \times 10^4$	$1,28 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$
	<b>Média</b>	<b><math>1,213 \times 10^4</math></b>	<b><math>1,04 \times 10^4</math></b>	<b><math>1,113 \times 10^4</math></b>
	DP	0,166533	0,163707	0,083267
<b>48</b> <b>horas</b>	TC 1	$3,14 \times 10^4$	$3,3 \times 10^4$	$2 \times 10^4$
	TC 2	$2,92 \times 10^4$	$3,82 \times 10^4$	$2,72 \times 10^4$
	TC 3	$3,38 \times 10^4$	$3,3 \times 10^4$	$2,54 \times 10^4$
	<b>Média</b>	<b><math>3,147 \times 10^4</math></b>	<b><math>3,473 \times 10^4</math></b>	<b><math>2,42 \times 10^4</math></b>
	DP	0,230072	0,300222	0,3747
<b>72</b> <b>horas</b>	TC 1	$5,8 \times 10^4$	$6,6 \times 10^4$	$5,14 \times 10^4$
	TC 2	$6,38 \times 10^4$	$6,78 \times 10^4$	$5,12 \times 10^4$
	TC 3	$6,72 \times 10^4$	$6,44 \times 10^4$	$5,2 \times 10^4$
	<b>Média</b>	<b><math>6,3 \times 10^4</math></b>	<b><math>6,607 \times 10^4</math></b>	<b><math>5,153 \times 10^4</math></b>
	DP	0,465188	0,170098	0,041633

TC 1: total de células contidas na 1ª Placa de Petri do grupo 1, 2 e 3.

TC 2: total de células contidas na 2ª Placa de Petri do grupo 4, 5 e 6.

TC 3: total de células contidas na 3ª Placa de Petri do grupo 7, 8 e 9.

Média: média entre TC1, TC 2 e TC3.

DP.: Desvio padrão entre TC1, TC2 e TC3.

Tabela 5.8 - Valores originais da análise de variância do teste estatístico (linhagem AP9)

<b>Fonte de variação</b>	<b>Soma de quadrantes</b>	<b>G.L.</b>	<b>Quadrantes médios</b>	<b>F</b>	<b>Probabilidade (HO)</b>
<b>Entre hormônios</b>	3,3423	2	1,6711	25,41	0,004% significante
<b>Entre Tempos</b>	109,8136	2	54,9068	834,72	0,000% significante
<b>Interação hormônio X Tempo</b>	1,9685	4	0,4921	7,48	0,126% significante
<b>Resíduo</b>	1,184	18	0,0658		
<b>Variação total</b>	116,3085	26			

**Valores originais das médias de amostragem calculadas (linhagem AP9):**

Fator de variação: hormônio.

17- $\beta$ -estradiol: 3,55333

progesterona: 3,70667

controle: 2,89556

Fator de variação: tempo.

24 horas: 1,12222

48 horas: 3,01333

72 horas: 6,02

**Resultados do teste de Tukey aplicado na interação hormônio x tempo (linhagem AP9).**

Dados:

Resíduo na análise de variância: 6,58

Nível de probabilidade indicado: 5

Número de dados da amostra: 27

Número de médias comparadas: 9

Número de dados para cada média: 3

Grau de liberdade do resíduo: 18

Valor q tabelado, (ao nível de 5%), para 9 médias e 18 graus de liberdade: 4,960.

Resultado: Valor crítico de tukey calculado:  $0,73457 \times 10^4$ .

Obs: a diferença entre as médias é significativa quando for maior que  $2,49 \times 10^4$ .

Tabela 5.9 - Demonstração dos resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem AP9, sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol e às utilizadas como controle

<b>Hormônio</b>	<b>17-<math>\beta</math>-estradiol</b>	<b>Controle</b>	<b>Diferença das médias</b>	<b>Resultado da análise</b>
<b>24 horas</b>	1,21x10 <sup>4</sup>	1,12x10 <sup>4</sup>	<b>0,09x10<sup>4</sup></b>	NS
<b>48 horas</b>	3,14x10 <sup>4</sup>	2,42x10 <sup>4</sup>	<b>0,72x10<sup>4</sup></b>	NS
<b>72 horas</b>	6,3x10 <sup>4</sup>	5,15x10 <sup>4</sup>	<b>1,15x10<sup>4</sup></b>	S

NS: não significativa (diferença entre as médias < que 0,73x10<sup>4</sup>)

S: significativa (diferença entre as médias > que 0,73x10<sup>4</sup>)

Resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem AP9, sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol e controle:

Notou-se uma diferença significativa da proliferação celular das células quando sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol em relação às utilizadas como controle, apenas após 72 horas de influência hormonal.

Já após 24 horas e 48 horas de influência hormonal não se notou uma diferença significativa da proliferação celular das células sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol e as utilizadas como controle.



Tabela 5.10 - Demonstração dos resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem AP9, sob a ação da progesterona e às utilizadas como controle

<b>Hormônio</b>	<b>Progesterona</b>	<b>Controle</b>	<b>Diferença das médias</b>	<b>Resultado da análise</b>
<b>24 horas</b>	$1,04 \times 10^4$	$1,12 \times 10^4$	<b>0,08</b>	NS
<b>48 horas</b>	$3,47 \times 10^4$	$2,42 \times 10^4$	<b><math>1,05 \times 10^4</math></b>	S
<b>72 horas</b>	$6,6 \times 10^4$	$5,15 \times 10^4$	<b><math>1,45 \times 10^4</math></b>	S

NS: não significativa (diferença entre as médias < que  $0,73 \times 10^4$ )

S: significativa (diferença entre as médias > que  $0,73 \times 10^4$ )

Resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem AP9 sob a ação da progesterona e controle:

Notou-se uma diferença significativa da proliferação celular quando sob a ação da progesterona em relação às utilizadas como controle, após a decorrência de 48 horas e 72 horas de influência hormonal.

Não se notou diferença significativa da proliferação das células quando sob a ação da progesterona e das utilizadas como controle após 24 horas de influência hormonal.

Tabela 5.11 - Demonstração dos resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem AP9, sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol e da progesterona

Hormônio	17- $\beta$ -estradiol	Progesterona	Diferença das médias	Resultado da análise
Tempo				
24 horas	1,21x10 <sup>4</sup>	1,04x10 <sup>4</sup>	<b>0,17x10<sup>4</sup></b>	NS
48 horas	3,14x10 <sup>4</sup>	3,47x10 <sup>4</sup>	<b>0,33x10<sup>4</sup></b>	NS
72 horas	6,3x10 <sup>4</sup>	6,6x10 <sup>4</sup>	<b>0,3x10<sup>4</sup></b>	NS

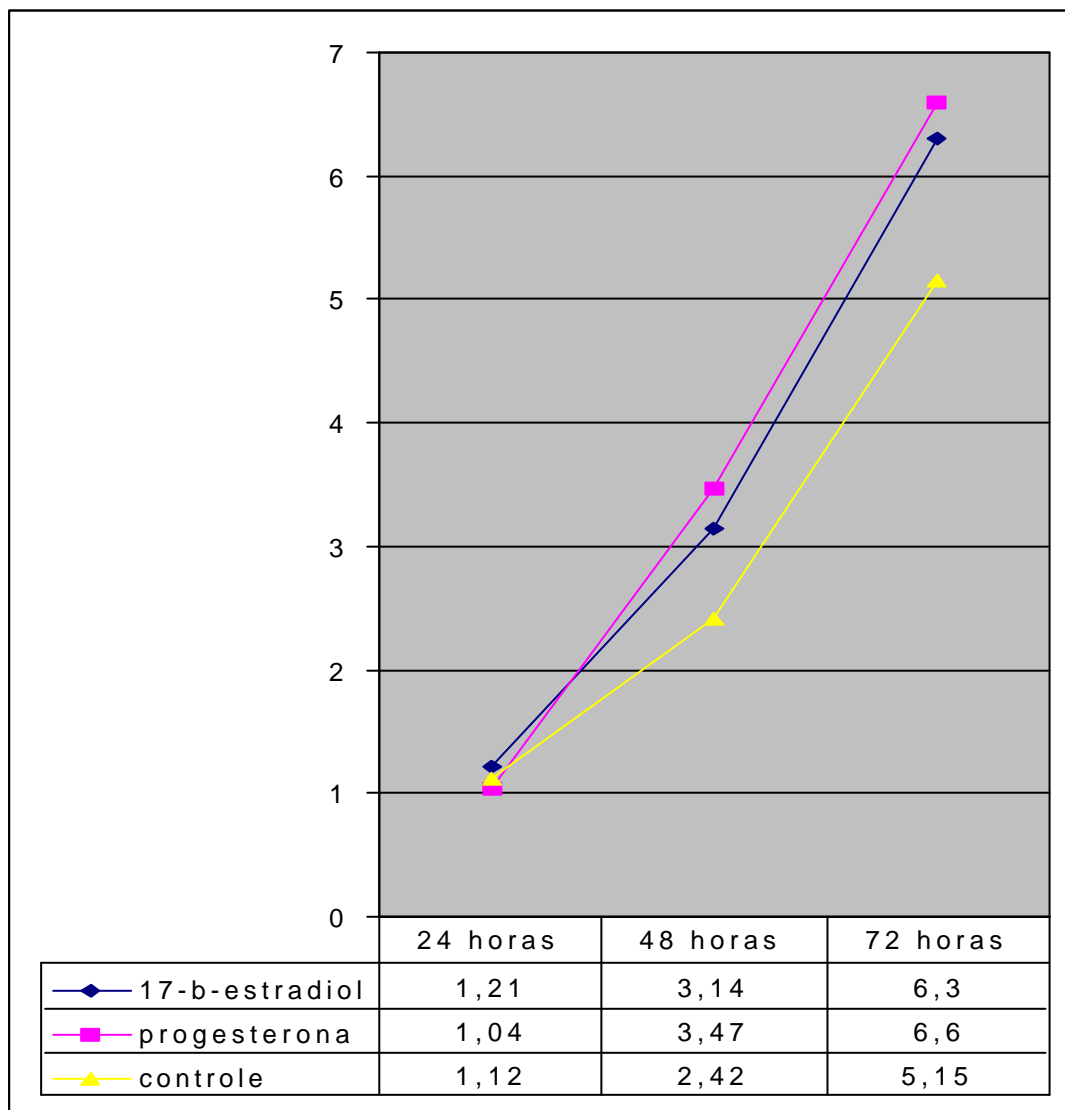
NS: não significante < que 0,73x10<sup>4</sup>

S: significante > que 2,49x10<sup>4</sup>

Resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem AP9, sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol e da progesterona:

Em nenhum dos períodos em que as células foram submetidas a contagem se notou uma diferença significativa em sua proliferação em relação àquelas sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol e sob a ação da progesterona.

Gráfico 5.2 - Representação da curva do crescimento da população celular da linhagem AP9 sob a influência do 17- $\beta$ -estradiol, da progesterona e das utilizadas como controle



### 5.3 Análise estatística da linhagem AP8

Tabela 5.12 - Demonstração do número total de células pertencentes à linhagem AP8 contidas em cada Placa de Petri, submetidas e não submetidas à ação hormonal, além da média e do desvio padrão

<b>Hormônio</b>		<b>17-<math>\beta</math>-estradiol</b>	<b>Progesterona</b>	<b>Controle</b>
<b>Tempo</b>				
<b>24</b> <b>horas</b>	TC 1	1,94x10 <sup>4</sup>	1,52x10 <sup>4</sup>	1,4x10 <sup>4</sup>
	TC 2	1,82x10 <sup>4</sup>	1,58x10 <sup>4</sup>	1,42x10 <sup>4</sup>
	TC 3	1,62x10 <sup>4</sup>	1,96x10 <sup>4</sup>	1,3x10 <sup>4</sup>
	<b>Média</b>	<b>1,69x10<sup>4</sup></b>	<b>1,68x10<sup>4</sup></b>	<b>1,37x10<sup>4</sup></b>
	DP	0,110151	0,238607	0,064291
<b>48</b> <b>horas</b>	TC 1	3,98x10 <sup>4</sup>	5,5x10 <sup>4</sup>	3,32x10 <sup>4</sup>
	TC 2	4,02x10 <sup>4</sup>	4,36x10 <sup>4</sup>	3,94x10 <sup>4</sup>
	TC 3	4,34x10 <sup>4</sup>	4,22x10 <sup>4</sup>	3,7x10 <sup>4</sup>
	<b>Média</b>	<b>4,11x10<sup>4</sup></b>	<b>4,69x10<sup>4</sup></b>	<b>3,65x10<sup>4</sup></b>
	DP	0,197315	0,702092	0,312623
<b>72</b> <b>horas</b>	TC 1	9,92x10 <sup>4</sup>	10,62x10 <sup>4</sup>	9,06x10 <sup>4</sup>
	TC 2	11,58x10 <sup>4</sup>	9,52x10 <sup>4</sup>	7,28x10 <sup>4</sup>
	TC 3	9,06x10 <sup>4</sup>	9,92x10 <sup>4</sup>	7,54x10 <sup>4</sup>
	<b>Média</b>	<b>9,85x10<sup>4</sup></b>	<b>13,72x10<sup>4</sup></b>	<b>7,96x10<sup>4</sup></b>
	DP	0,76219	0,556776	0,961457

TC 1: total de células contidas na 1<sup>a</sup> Placa de Petri do grupo 1, 2 e 3.

TC 2: total de células contidas na 2<sup>a</sup> Placa de Petri do grupo 4, 5 e 6.

TC 3: total de células contidas na 3<sup>a</sup> Placa de Petri do grupo 7, 8 e 9.

Média: média entre TC1, TC 2 e TC3.

DP.: Desvio padrão entre TC1, TC2 e TC3.

Tabela 5.13 - Valores originais da análise de variância do teste estatístico (linhagem AP8)

<b>Fonte de variação</b>	<b>Soma de quadrantes</b>	<b>G.L.</b>	<b>Quadrantes médios</b>	<b>F</b>	<b>Probabilidade (HO)</b>
<b>Entre hormônios</b>	6,0911	2	3,0455	10,5	0,123% significante
<b>Entre Tempos</b>	272,7333	2	136,3667	469,96	0,000% significante
<b>Interação hormônio X Tempo</b>	3,0371	4	0,7593	2,62	6,911% não significante
<b>Resíduo</b>	5,2230	18	0,2902		
<b>Variação total</b>	287,0845	26			

**Valores originais das médias de amostragem calculadas (linhagem AP8):**

Fator de variação: hormônio.

17- $\beta$ -estradiol: 5,22

progesterona: 5,42222

controle: 4,32889

Fator de variação: tempo.

24 horas: 1,58444

48 horas: 4,15333

72 horas: 9,23333

**Resultados do teste de Tukey aplicado na interação hormônio x tempo (linhagem AP8).**

Dados:

Resíduo na análise de variância: 0,290199

Nível de probabilidade indicado: 5

Número de dados da amostra: 27

Número de médias comparadas: 9

Número de dados para cada média: 3

Grau de liberdade do resíduo: 18

Valor q tabelado, (ao nível de 5%), para 9 médias e 18 graus de liberdade: 4,960.

Resultado: Valor crítico de tukey calculado:  $1,54266 \times 10^4$ .

Obs: uma diferença entre as médias maior que  $1,54 \times 10^4$  é significativa.

Tabela 5.14 - Demonstração dos resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem AP8, sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol e às utilizadas como controle

Hormônio	17- $\beta$ -estradiol	Controle	Diferença das médias	Resultado da análise
24 horas	$1,69 \times 10^4$	$1,37 \times 10^4$	<b><math>0,32 \times 10^4</math></b>	NS
48 horas	$4,11 \times 10^4$	$3,65 \times 10^4$	<b><math>0,46 \times 10^4</math></b>	NS
72 horas	$9,85 \times 10^4$	$7,96 \times 10^4$	<b><math>1,89 \times 10^4</math></b>	S

NS: não significativa (diferença entre as médias < que  $1,54 \times 10^4$ )

S: significativa (diferença entre as médias > que  $1,54 \times 10^4$ )

Resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem AP8, sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol e controle:

Notou-se uma diferença significativa na proliferação celular quando sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol em relação às utilizadas como controle somente após 72 horas de influência hormonal.

Não se notou diferença significativa na proliferação das células sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol e as utilizadas como controle após 24 horas e 48 horas de influência hormonal.

Tabela 5.15 - Demonstração dos resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem AP8, sob a ação da progesterona e às utilizadas como controle

<b>Hormônio</b>	<b>Progesterona</b>	<b>Controle</b>	<b>Diferença das médias</b>	<b>Resultado da análise</b>
<b>24 horas</b>	$1,68 \times 10^4$	$1,37 \times 10^4$	<b><math>0,31 \times 10^4</math></b>	NS
<b>48 horas</b>	$4,69 \times 10^4$	$3,65 \times 10^4$	<b><math>1,04 \times 10^4</math></b>	NS
<b>72 horas</b>	$10,02 \times 10^4$	$7,96 \times 10^4$	<b><math>2,06 \times 10^4</math></b>	S

NS: não significativa (diferença entre as médias < que  $1,54 \times 10^4$ )  
 S: significativa (diferença entre as médias > que  $1,54 \times 10^4$ )

Resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem AP8, sob a ação da progesterona e controle:

Notou-se uma diferença significativa na proliferação celular quando sob a ação da progesterona em relação às utilizadas como controle apenas após 72 horas de influência hormonal.

Não se notou diferença significativa na proliferação celular quando sob a ação da progesterona e às utilizadas como controle após 24 horas e 48 horas de influência hormonal.



Tabela 5.16 - Demonstração dos resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem AP8, sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol e da progesterona

Hormônio	17- $\beta$ -estradiol	Progesterona	Diferença das médias	Resultado da análise
Tempo				
24 horas	1,69x10 <sup>4</sup>	1,68x10 <sup>4</sup>	<b>0,01x10<sup>4</sup></b>	NS
48 horas	4,11x10 <sup>4</sup>	4,69x10 <sup>4</sup>	<b>0,58x10<sup>4</sup></b>	NS
72 horas	9,85x10 <sup>4</sup>	10,02x10 <sup>4</sup>	<b>0,17x10<sup>4</sup></b>	NS

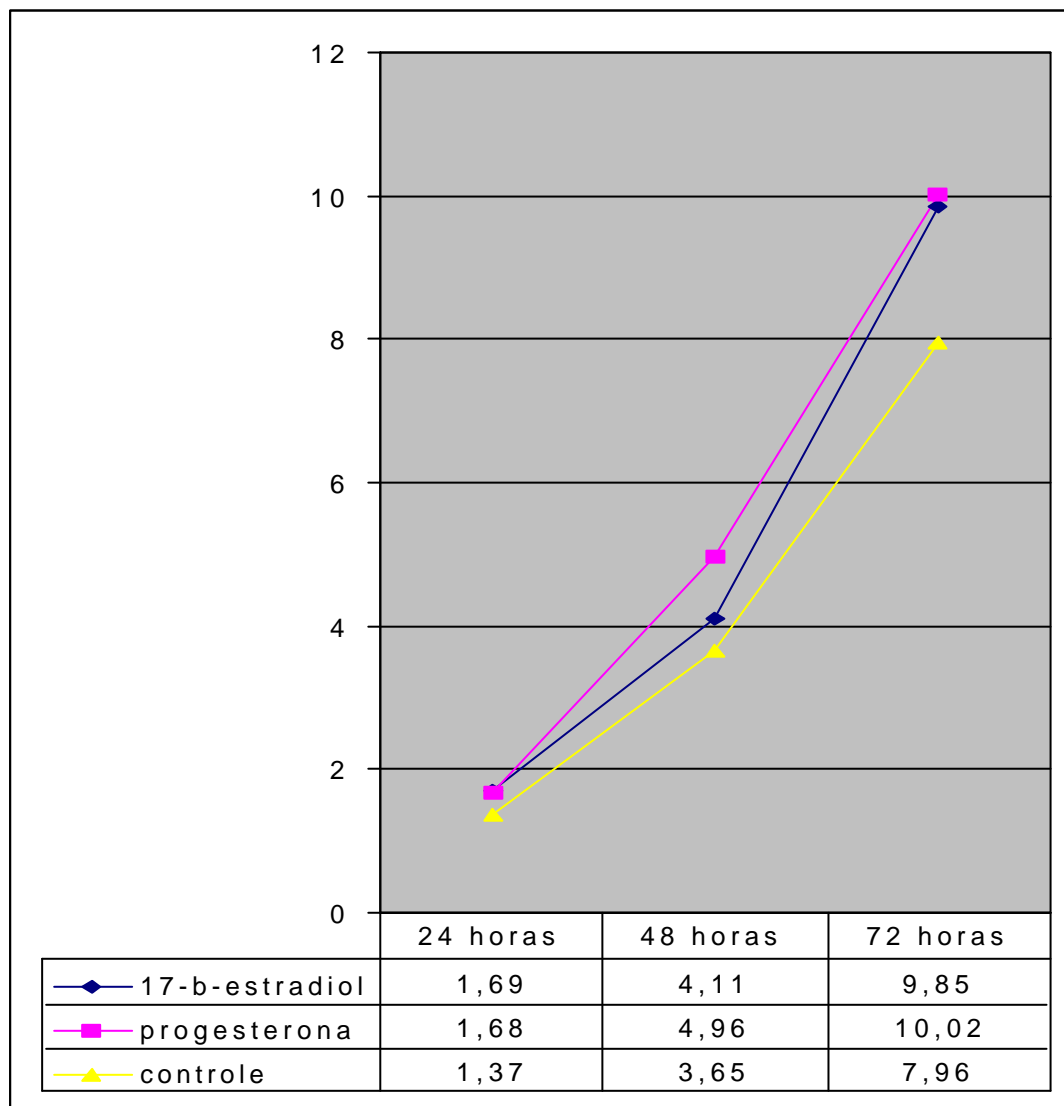
NS: não significante < que 1,54x10<sup>4</sup>

S: significante > que 1,54x10<sup>4</sup>

Resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem AP8, sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol e da progesterona:

Em nenhum dos períodos em que as células foram submetidas a contagem se notou uma diferença significativa em sua proliferação em relação àquelas sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol e sob a ação da progesterona.

Gráfico 5.3 - Representação da curva do crescimento da população celular da linhagem AP8 sob a influência do 17- $\beta$ -estradiol, da progesterona e das utilizadas como controle



#### 5.4 Análise estatística da linhagem HN30

Tabela 5.17 - Demonstração do número total de células pertencentes à linhagem HN30 contidas em cada Placa de Petri, submetidas e não submetidas à ação hormonal, além da média e do desvio padrão

<b>Hormônio</b>		<b>17-<math>\beta</math>-estradiol</b>	<b>Progesterona</b>	<b>Controle</b>
<b>Tempo</b>				
<b>24</b> <b>horas</b>	TC 1	$1,42 \times 10^4$	$1,58 \times 10^4$	$1,02 \times 10^4$
	TC 2	$1,32 \times 10^4$	$0,94 \times 10^4$	$1,22 \times 10^4$
	TC 3	$0,94 \times 10^4$	$1,80 \times 10^4$	$1,24 \times 10^4$
	<b>Média</b>	<b><math>1,22 \times 10^4</math></b>	<b><math>1,44 \times 10^4</math></b>	<b><math>1,16 \times 10^4</math></b>
	DP	0,253246	0,446766	0,121655
<b>48</b> <b>horas</b>	TC 1	$3,68 \times 10^4$	$3,96 \times 10^4$	$2,98 \times 10^4$
	TC 2	$3,68 \times 10^4$	$3,64 \times 10^4$	$4,08 \times 10^4$
	TC 3	$3,16 \times 10^4$	$3,64 \times 10^4$	$3,82 \times 10^4$
	<b>Média</b>	<b><math>3,50 \times 10^4</math></b>	<b><math>3,74 \times 10^4</math></b>	<b><math>3,62 \times 10^4</math></b>
	DP	0,300222	0,184752	0,57492
<b>72</b> <b>horas</b>	TC 1	$7,46 \times 10^4$	$3,46 \times 10^4$	$8,14 \times 10^4$
	TC 2	$7 \times 10^4$	$5,22 \times 10^4$	$6,62 \times 10^4$
	TC 3	$6,48 \times 10^4$	$7,32 \times 10^4$	$7,2 \times 10^4$
	<b>Média</b>	<b><math>6,98 \times 10^4</math></b>	<b><math>6,66 \times 10^4</math></b>	<b><math>7,32 \times 10^4</math></b>
	DP	0,490306	1,932494	0,767072

TC 1: total de células contidas na 1ª Placa de Petri do grupo 1, 2 e 3.

TC 2: total de células contidas na 2ª Placa de Petri do grupo 4, 5 e 6.

TC 3: total de células contidas na 3ª Placa de Petri do grupo 7, 8 e 9.

Média: média entre TC1, TC 2 e TC3.

DP.: Desvio padrão entre TC1, TC2 e TC3.

Tabela 5.18 - Valores originais da análise de variância do teste estatístico (linhagem HN30)

<b>Fonte de variação</b>	<b>Soma de quadrantes</b>	<b>G.l.</b>	<b>Quadrantes médios</b>	<b>F</b>	<b>Probabilidade (HO)</b>
<b>Entre hormônios</b>	0,0795	2	0,0398	0,11	10,759% não significativa
<b>Entre Tempos</b>	148,4234	2	74,2117	212,93	0,000% significante
<b>Interação hormônio X Tempo</b>	0,7758	4	0,1940	0,56	30,049% não significativa
<b>Resíduo</b>	6,22733	18	0,3484		
<b>Variação total</b>	155,5521	26			

**Valores originais das médias de amostragem calculadas (linhagem HN30):**

Fator de variação: hormônio.

17- $\beta$ -estradiol: 3,90444

progesterona: 3,95111

controle: 4,03556

Fator de variação: tempo.

24 horas: 1,27556

48 horas: 3,62667

72 horas: 6,98889

**Resultados do teste de Tukey aplicado na interação hormônio x tempo (linhagem HN30).**

Dados:

Resíduo na análise de variância: 0,3485

Nível de probabilidade indicado: 5

Número de dados da amostra: 27

Número de médias comparadas: 9

Número de dados para cada média: 3

Grau de liberdade do resíduo: 18

Valor q tabelado, (ao nível de 5%), para 9 médias e 18 graus de liberdade: 4,960.

Resultado: Valor crítico de tukey calculado:  $1,69053 \times 10^4$ .

Obs: diferença entre as médias é significativa quando for maior que  $1,69 \times 10^4$ .

Tabela 5.19 - Demonstração dos resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem HN30, sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol e às utilizadas como controle

<b>Hormônio</b>	<b>17-<math>\beta</math>-estradiol</b>	<b>Controle</b>	<b>Diferença das médias</b>	<b>Resultado da análise</b>
<b>24 horas</b>	1,22x10 <sup>4</sup>	1,16x10 <sup>4</sup>	<b>0,06x10<sup>4</sup></b>	NS
<b>48 horas</b>	3,5x10 <sup>4</sup>	3,62x10 <sup>4</sup>	<b>0,12x10<sup>4</sup></b>	NS
<b>72 horas</b>	6,98x10 <sup>4</sup>	7,32x10 <sup>4</sup>	<b>0,34x10<sup>4</sup></b>	NS

NS: não significativa (diferença entre as médias < que 1,69x10<sup>4</sup>)

S: significativa (diferença entre as médias > que 1,69x10<sup>4</sup>)

Resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem HN30, sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol e as utilizadas como controle:

Em nenhum dos períodos em que as células foram submetidas à contagem se notou diferença significativa em sua proliferação em relação àquelas sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol e às utilizadas como controle.

Tabela 5.20 - Demonstração dos resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem HN30, sob a ação da progesterona e às utilizadas como controle

<b>Hormônio</b>	<b>Progesterona</b>	<b>Controle</b>	<b>Diferença das médias</b>	<b>Resultado da análise</b>
<b>24 horas</b>	$1,44 \times 10^4$	$1,16 \times 10^4$	<b><math>0,28 \times 10^4</math></b>	NS
<b>48 horas</b>	$3,74 \times 10^4$	$3,62 \times 10^4$	<b><math>0,12 \times 10^4</math></b>	NS
<b>72 horas</b>	$6,66 \times 10^4$	$7,32 \times 10^4$	<b><math>0,66 \times 10^4</math></b>	NS

NS: não significativa (diferença entre as médias < que  $1,69 \times 10^4$ )

S: significativa (diferença entre as médias > que  $1,69 \times 10^4$ )

Resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem HN30, sob a ação da progesterona e as utilizadas como controle:

Em nenhum dos períodos em que foram submetidas à contagem se notou diferença significativa na proliferação celular em relação àquelas sob a ação da progesterona em relação às utilizadas como controle.

Tabela 5.21 - Demonstração dos resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem HN30, sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol e da progesterona

Hormônio	17- $\beta$ -estradiol	Progesterona	Diferença das médias	Resultado da análise
Tempo				
24 horas	1,22x10 <sup>4</sup>	1,44x10 <sup>4</sup>	<b>0,22x10<sup>4</sup></b>	NS
48 horas	3,5x10 <sup>4</sup>	3,74x10 <sup>4</sup>	<b>0,24 x10<sup>4</sup></b>	NS
72 horas	6,98x10 <sup>4</sup>	6,66x10 <sup>4</sup>	<b>0,32 x10<sup>4</sup></b>	NS

NS: não significativa (diferença entre as médias < que 1,69x10<sup>4</sup>)

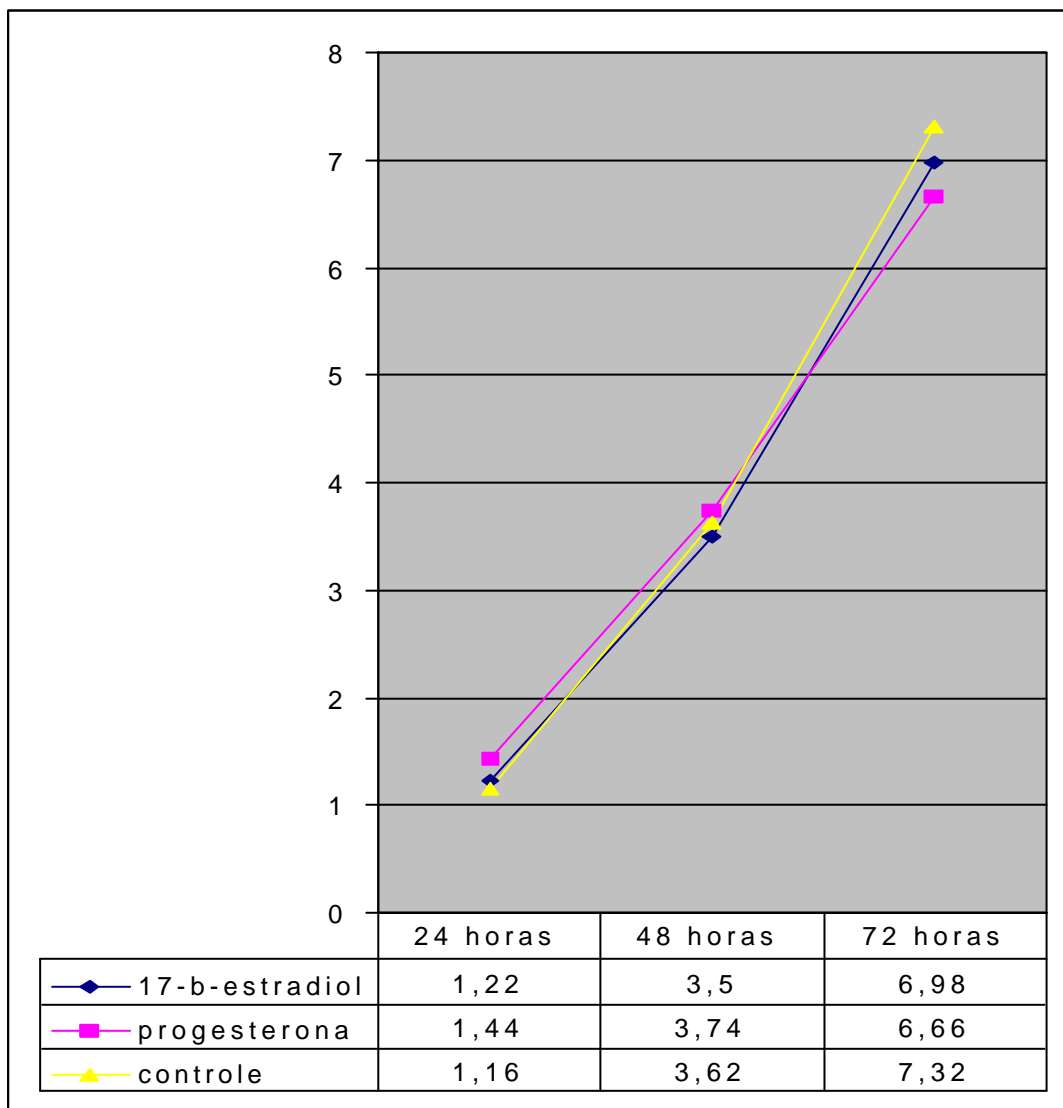
S: significativa (diferença entre as médias > que 1,69x10<sup>4</sup>)

Resultados do teste de Tukey em relação às células pertencentes à linhagem HN30, sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol e da progesterona:

Não se notou diferença significativa na proliferação celular em relação àquelas sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol e sob a ação da progesterona em nenhum dos períodos em que as células foram submetidas à contagem.



Gráfico 5.4 - Representação da curva do crescimento da população celular da linhagem HN30 sob a influência do 17- $\beta$ -estradiol, da progesterona e das utilizadas como controle



## 6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, a abordagem clínica do tratamento de diversas neoplasias mudou drasticamente. Estas mudanças têm sido largamente atribuídas a estudos que detectam a possibilidade de inibição de um determinado fator ou da sua via de sinalização por drogas específicas que podem ser decisivas no controle da proliferação neoplásica.

Quando pesquisas básicas relataram que a proteína denominada RE estava presente em algumas células neoplásicas de mama, acreditou-se que estas células poderiam ser alvo da ação estrogênica, possibilitando assim o desenvolvimento da terapia hormonal. Hoje, este tipo de terapia proporciona melhores condições de vida para pacientes que apresentam neoplasias de mama hormônios dependentes (Osborne *et al.*, 1980).

Atualmente, os hormônios reprodutivos que circulam na mulher, em distintas fases da vida, são apontados como promotores neoplásicos, que ajudam a aumentar a população celular suscetível ao estímulo destes hormônios esteróides, principalmente o estrógeno e a progesterona (Alberts *et al.*, 1994).

É conhecida a analogia entre a glândula mamária e a glândula salivar. Assim, demonstrou-se que as estruturas acinares e ductais de ambas as glândulas são similares, e uma grande quantidade de relatos mostra a coexistência de neoplasias de

mama e de glândula salivar (Abbey, *et al.*, 1984; Lawrence & Mazur, 1982; Makek & vom Hochstetter, 1980). Tais analogias guiaram numerosos estudos a determinar a expressão dos RE e RP em neoplasias de glândulas salivares.

Os hormônios estudados, o 17- $\beta$ -estradiol e a progesterona não agem somente como promotores neoplásicos. Algumas pesquisas em animais sugerem a existência de uma relação entre os hormônios sexuais e alterações estruturais da mucosa bucal (Vittek *et al.*, 1978, citados por Farabosco *et al.*, 1992). A hipofunção salivar e mucosa bucal atrófica, entre outras características, foram descritos através de observações clínicas em mulheres na peri e pós-menopausa. Até os dias atuais não se compreende os fatores relacionados a mudanças que envolvem os tecidos bucais durante a menopausa (Wardrop *et al.*, 1989; Amar & Chung, 1994; Bem Aryeh. *et al.*, 1996). Bercovici *et al.* (1985) discordaram dos autores anteriores concluindo que o desconforto bucal é independente das alterações hormonais.

Farabosco *et al.* (1992) também pesquisaram sobre o assunto através de exames clínicos em pacientes com desconforto bucal. Incluíram como um dos sintomas a xerostomia. Depois da reposição hormonal, constataram uma consistente diminuição dos sintomas. Estas alterações acima descritas podem ter como causa múltiplas razões de etiologias multifatoriais. A influência do estado hormonal é pouco valorizada na mucosa bucal, aventando-se também que o RE seria quantitativamente muito baixo para se obter a imunodeteccção.

Outra possibilidade seria que o anticorpo usado poderia, não necessariamente, detectar o epitopo do RE presente na mucosa bucal. Leimola-Vitranen *et al.* (1997) pesquisaram o RE através da imuno-histoquímica em tecido fresco e em tecido fixado em formalina e embebido em parafina, ressaltando a não detecção desta

proteína nos tecidos bucais. Anos mais tarde, utilizando-se de técnicas mais sensíveis para detecção de proteínas, Leimola-Vitranen *et al.* (2000) na análise de amostras de mucosa bucal e de glândulas salivares, obtiveram resultados positivos. As técnicas utilizadas foram o PCR-RT e análises pelo Western blot, que demonstraram a presença da proteína RE na mucosa bucal e nas glândulas salivares. Apesar da porcentagem encontrada do RNAm do RE ter sido baixa tanto em mulheres na pós-menopausa como em mulheres jovens, os autores, sugeriram que o RE exerce um papel biológico importante na mucosa bucal e nas glândulas salivares.

Dimery *et al.* (1987) em uma amostra de 14 neoplasias e 19 controles, encontraram níveis significativos da proteína RE em tecido de glândula salivar normal e em diversas neoplasias, originadas deste mesmo tecido, como o AP, quando comparada com o controle, estes resultados foram constatados em ambos os sexos. Relataram que as neoplasias de glândulas salivares podem ser hormônios dependentes. Entretanto, outros autores como Lamey *et al.* e Milher *et al.* citados por Jeannom *et al.* (1999) utilizando-se da mesma técnica não obtiveram o mesmo resultado.

Alguns dos resultados foram inconclusivos, outros conflitantes, devido em parte, ao pequeno número de casos envolvidos em alguns estudos e da variação das técnicas de pesquisas utilizadas. Entretanto, com o desenvolvimento da tecnologia de produção de anticorpos monoclonais, foi possível a melhoria da identificação e localização dos receptores hormonais em cortes parafinados (Jeannom *et al.*, 1999).

Com bases nestas assertivas, este trabalho se propôs a analisar a presença do RE e RP pela imuno-histoquímica em casos de AP, bem como verificar a influência

do 17- $\beta$ -estradiol e da progesterona na proliferação celular das linhagens AP8 e AP9 derivadas de APs humanos (masculino/feminino).

O anticorpo empregado contra a proteína RE, neste estudo, é um anticorpo monoclonal que detecta o epitopo equivalente ao terminal amino do RE, abrangendo o reconhecimento tanto para o RE $\alpha$ ; como para o RE $\beta$ ; impossibilitando assim a distinção do tipo de RE encontrado nos APs estudados.

O anticorpo específico para a proteína RP, utilizado neste trabalho, é também monoclonal, desenvolvido em camundongo, que tem a capacidade de reconhecer as duas isoformas da proteína RP. Reconhece especificamente o terminal amino desta proteína.

Cuidados especiais devem ser tomados quando se utiliza a técnica da imuno-histoquímica para a pesquisa do RE e RP em neoplasias de glândulas salivares emblocadas em parafina. É necessária a realização do bloqueio da biotina endógena. Resultados da pesquisa realizada pela técnica imuno-histoquímica e pelo método streptoavidina-biotina peroxidase só foram confiáveis após a execução desta manobra antes da incubação dos anticorpos primários. Nos tecidos utilizados como controles, o bloqueio da biotina endógena não influenciou no padrão de marcação.

Neste trabalho, dez casos de APs foram submetidos à pesquisa do RE e do RP, sendo 4 casos do sexo masculino e 6 do sexo feminino. Foi encontrada a expressão do RE em 7 casos, 4 do sexo feminino e 3 do sexo masculino, o RP em 8 casos, 4 do sexo feminino e 4 do sexo masculino. A expressão das proteínas RE e RP, na maioria dos casos de APs estudado, nos permite supor uma possível influência hormonal nos APs, levando-nos a concordar com os relatos: de Abbey *et al.* (1984); Jeannom *et al.* (1999); Leiomola-Virtanen *et al.*, (2000); Shick *et al.*

(1995) que entre outros, defendem a dependência hormonal em neoplasias de glândulas salivares. Dimery *et al.* (1987) além de atestarem a dependência hormonal nas neoplasias de glândulas salivares enfatizaram o AP, pois constataram as maiores concentrações das proteínas RE nos APs e no carcinoma ex-adenoma pleomórfico em relação a outras neoplasias das glândulas salivares. Por outro lado, a não imunomarcagem destes receptores não invalida a influência hormonal, pois respostas à terapia hormonal, mesmo sem a detecção do RE e do RP, são constatadas em neoplasias de mama, explicação para este fato é que estes receptores podem estar mutados, impossibilitando a ligação específica com o anticorpo utilizado na sua pesquisa. Se acreditarmos que estes receptores estejam realmente ausentes ou mutados, a existência de um grupo de receptores denominados receptores órfãos, pertencentes à superfamília dos hormônios esteróides, os quais apresentam ligações ainda não bem definidas (Mangelsdorf *et al.*, 1995), poderá esclarecer, através de estudos futuros, a resposta hormonal na ausência dos respectivos receptores específicos.

Em dois dos casos (AP nº 35195 sexo M, 15 anos de idade e AP nº 32218 sexo F, 23 anos de idade), foi encontrada apenas a expressão do RP. Não se tem explicações plausíveis para este fato, lembrando que a expressão do RP é estimulada pelo RE. Pode ter ocorrido um resultado falso negativo para o RE ou um falso positivo para o RP, o que poderia ser decorrente da falha da técnica da imunohistoquímica. Outra possibilidade, seguindo o raciocínio anteriormente citado, seria uma modificação genética das células neoplásicas, que possibilitaria a expressão do RP sem o RE, ou mesmo que os receptores órfãos pudessem fornecer outra via de sinalização. Sem maiores elucidaciones, a única semelhança entre os casos que

expressaram o RP sem a detecção dos RE foi a baixa faixa etária, para ambos os sexos.

Resultados semelhantes já haviam sido anteriormente encontrados por Shick *et al.* (1995) que demonstraram uma significativa percentagem de carcinomas adenóide cístico de glândula salivar, que mesmo sem a identificação do RE expressaram o RP. Osborne *et al.* (1980) pesquisaram a resposta hormonal em neoplasias de mama e encontraram vários casos que expressavam o RP sem a constatação do RE e que responderam à terapia hormonal, sugerindo que o RP poderia ser um melhor marcador para determinar a dependência hormonal do que o RE. Naquele tempo, o fato de os anticorpos não serem tão sofisticados como hoje, e de não se conhecer o RE $\beta$ , pôde ter dificultado a obtenção de maiores conclusões.

O problema da expressão do RP sem a constatação do RE ainda permanece desconhecida.

O receptor de estrógeno (RE) é um fator de transativação mediada através da ligação com o hormônio esteróide 17- $\beta$ -estradiol, isto em ambos os sexos, masculino e feminino; e o estrógeno é um hormônio esteróide que tem profundos efeitos no sistema reprodutivo de ambos os sexos (Enmark *et al.*, 1997). As células endócrinas especializadas na síntese de esteróides de ação hormonal são encontradas em vários órgãos, como por exemplo: testículo, ovário e glândulas adrenais (Junqueira & Carneiro, 1997). Estas constatações justificam a presença do RE em 3 dos 4 casos de APs do sexo masculino e a presença do RP em todos os 4 casos de APs do sexo masculino.

Para subsidiar ainda mais a influência hormonal nos APs, lançamos mão de experimentos *in vitro*, com as linhagens celulares AP8 (sexo masculino), AP9 (sexo feminino), e como controle, a linhagem T-47D.

Vale a pena lembrar que os cortes histológicos referentes à linhagem AP8 (AP n.º 33856) e AP9 (AP n.º 33881), demonstraram serem positivos para ambas proteínas pesquisadas.

Com este resultado preliminar, supondo uma possível influência destes hormônios na gênese do AP, pretendeu-se estipular um protocolo para avaliar a influência do 17- $\beta$ -estradiol e da progesterona nestas linhagens celulares. Alguns comentários devem ser feitos com relação à metodologia empregada para testar a influência dos hormônios estudados sobre estas linhagens AP9 e AP8.

O protocolo descrito no material e método se baseou na literatura pertinente e em inúmeros testes utilizados nas linhagens AP9, AP8, e na linhagem T-47D, derivada de um carcinoma ductal de mama, largamente estudado e sabidamente positiva para o RE e RP. Em relatos anteriores, as células T-47D responderam com uma maior taxa proliferativa frente ao estímulo do 17- $\beta$ -estradiol e da progesterona (Graham *et al.*, 1995; Musgrove, *et al.*, 1993; Wong *et al.*, 1991).

Além da linhagem T-47D ser um controle confiável, há disponibilidade de um grande número de células, devido à sua rápida proliferação e adaptabilidade ao meio, possibilitando a utilização em diversos experimentos pilotos, economizando passagens das linhagens celulares AP8 e AP9. Distintas contagens também foram executadas com as linhagens AP8 e AP9, confirmando a eficiência do protocolo selecionado.



Com relação à diluição, é sabido que altas concentrações destes hormônios esteróides exercem um efeito tóxico e não proliferativo, como foi constatado em várias destas contagens. Devido a este fato, utilizou-se diversas concentrações, variando de  $1 \times 10^{-2}$  mg/ml a  $1 \times 10^{-5}$  mg/ml do produto, contendo 17- $\beta$ -estradiol ou progesterona por ml de meio de cultivo. Sob a ação hormonal em diversas concentrações, células contidas em 27 placas de Petri foram submetidas à contagem em um período de 72 horas, como descrito em materiais e métodos.

Com a finalidade de averiguar estas diferentes concentrações, chegou-se a contar 36 placas de Petri plaqueadas inicialmente com  $10^{-4}$  de células, nas quais 12 placas encontrava-se diluído o 17- $\beta$ -estradiol (solúvel em água, Sigma, USA) e em outras 12 a progesterona (solúvel em água, Sigma, USA), e as 12 restantes eram controles. A contagem do número de células em cada placa de Petri foi feita no 2º dia (24 horas), 4º dia (48 horas), 6º dia (96 horas) e 8º dia (144 horas), manuseando 9 placas em cada um destes dias, 3 sob a ação do 17- $\beta$ -estradiol (solúvel em água, Sigma, USA), 3 sob o efeito da progesterona (solúvel em água, Sigma, USA) e 3 sem diluição de qualquer hormônio. Nas placas de Petri restantes, que futuramente seriam submetidas à contagem, foram realizadas trocas do meio de cultivo e rediluição hormonal, nestes mesmos dias.

Pensou-se a princípio, que à medida que os hormônios fossem metabolizados pelas células, perderiam a sua ação. Entretanto, constatou-se que com as rediluições chegava-se a uma concentração tóxica, mesmo utilizando-se de dosagens mínimas como  $1 \times 10^{-5}$  do produto por ml de meio. Por essa razão, optou-se por diluir os hormônios somente no primeiro dia, ou seja, no mesmo dia em que as células eram plaqueadas nas placas de Petri.

Uma diferente questão enfrentada foi o aumento do consumo de meio à medida que a população celular crescia, impossibilitando experimentos duradouros que necessitariam a permanência do mesmo meio por um período maior do que 4 dias, pois o estímulo hormonal provoca uma maior proliferação e consequente aumento do metabolismo celular, necessitando a troca do meio, para não originar danos às células. Em decorrência disso, a proliferação celular ficaria prejudicada e o real efeito hormonal certamente seria mascarado.

Outra questão que merece discussão é o número de células adicionadas nas placas de Petri. Um total de mais ou menos  $1 \times 10^4$  de células foram plaqueadas em cada placa de Petri, que seriam subsequentemente contadas nos dias pré-determinados, a fim de avaliar sua proliferação ao longo do tempo. Esta quantidade de células é utilizada largamente em pesquisas com metodologias semelhantes a outras linhagens celulares para plaquear a placa de Petri com 6mm de diâmetro. Quando adicionado um número muito pequeno de células não se observou uma proliferação efetiva das mesmas, seja em condições normais ou sob a influência hormonal. Da mesma forma, um número muito maior de células atingiu a confluência mais rapidamente do que o esperado, prejudicando o resultado. Contagens celulares com poucas e muitas células foram feitas no projeto piloto, confirmando assim como as experiências anteriores a eficácia de se utilizar inicialmente  $1 \times 10^4$  de células por placas de Petri de 6mm de diâmetro.

Uma vez constatada que o 17- $\beta$ -estradiol e a progesterona, apresentam-se como agentes de efeito proliferativo para a linhagem T-47D, quando utilizados sob a diluição de  $1 \times 10^{-4}$  mg/ml do meio, diluindo-os no mesmo dia em que as células foram

plaqueadas, elegeu-se este protocolo como o mais viável para responder à proposição deste trabalho.

O protocolo elegido foi a execução da curva de crescimento em um período de 72 horas, sem a substituição do meio e sem a rediluição dos hormônios no percurso do experimento. As células foram contadas nos períodos de 24 horas, 48 horas e 72 horas, após o adição de  $1 \times 10^4$  de células em cada placa de Petri e diluição hormonal.

Uma linhagem de carcinoma epidermóide humano, denominado HN30, foi utilizada como controle negativo e submetida a uma curva de crescimento por um período de 72 horas, seguindo os mesmos passos descritos nos materiais e métodos, sob a concentração de  $1 \times 10^{-4}$  mg/ml do produto, tanto do 17- $\beta$ -estradiol (solúvel em água, Sigma, USA), como da progesterona (solúvel em água, Sigma, USA). A análise estatística desta curva de crescimento revelou que a divisão destas células seria independente da ação dos hormônios estudados, como é demonstrado nos resultados a partir da página 76.

As curvas de crescimento, referentes à linhagem AP9 (sexo feminino) como a da AP8 (sexo masculino), reforçaram a hipótese da dependência hormonal desta neoplasia, constatando a existência de uma diferença significativa na proliferação celular da linhagem AP9 entre o controle e as células submetidas à ação da progesterona a partir das 48 horas; já entre o controle e as células sob a influência do 17- $\beta$ -estradiol só foi detectada uma diferença significativa nas 72 horas (resultados página 62).

Já a análise estatística, referente à linhagem AP8, constatou-se uma diferença significativa no índice proliferativo entre o controle e aquelas células submetidas à

ação do 17- $\beta$ -estradiol e da progesterona somente nas últimas 72 horas (resultados página 69).

A expressão dos RE e RP nos tecidos e a resposta celular *in vitro* observada nas duas linhagens frente à exposição hormonal, sugerem uma dependência hormonal nos APs em ambos os sexos.

Recordando que o RE é um fator de transativação mediada pela ligação com o hormônio esteróide 17- $\beta$ -estradiol, isto em ambos os sexos, (Enmark *et al.*, 1997), e o RP pela progesterona, justifica-se a proliferação de ambas linhagens, independente do sexo.

Schmitt *et al.* (1980) citados por Shick *et al.* (1995) sabendo que o carcinoma adenóide cístico de glândula salivar é histologicamente idêntico ao de mama, e que seus estudos revelaram uma maior agressividade nos carcinomas adenóides císticos de glândulas salivares de mulheres grávidas, sugeriram que esta porção da glândula salivar responsável pela origem deste carcinoma poderia expressar o RE e o RP.

Partindo da premissa que o adenoma pleomórfico, embora benigno, está intimamente relacionado ao carcinoma adenóide cístico, em especial devido ao quadro morfológico e à participação das células mioepiteliais, que participam da gênese e crescimento de inúmeras neoplasias de glândula salivar que mimetizam o ducto intercalar (Reguezi & Sciubba, 1999; Araújo *et al.*, 1994; Araújo *et al.* 1999; Araújo *et al.*, 2000), supõe-se que referências aos carcinomas adenóides císticos talvez possam se estender ao AP.

Estudos como os de Berg *et al.* (1968); Moertel & Elverback (1969); Dunn *et al.* (1972); Prior & Waterhouse (1977) citados por Abbey *et al.* (1994) indicaram uma coexistência entre neoplasias de glândulas salivares e neoplasias mamárias. Este

achado, somado à semelhança estrutural, fisiológica, entre as glândulas mamárias e as salivares, reforça a hipótese da dependência hormonal em neoplasias de glândulas salivares, guiando numerosos estudos, inclusive o nosso, para esclarecer o inconclusivo enigma da influência hormonal em neoplasias de glândulas salivares.

A dependência hormonal não é estudada exclusivamente em neoplasias de mama e de glândulas salivares. Relatos demonstram uma grande variedade de neoplasias que expressam o RE e RP como carcinoma endometrial, sarcoma estromal de baixo grau, adenocarcinoma cervical, carcinomas foliculares de tireóide, adenocarcinoma de cólon, carcinomas de células renais, carcinomas pancreáticos, melanoma maligno, gliomas, além dos carcinomas de glândulas salivares e de mama (Narbone *et al.*, 1989; Ruder *et al.*, 1989, citados por Shick *et al.*, 1995). Em algumas destas neoplasias, como o AP, apesar de expressarem o RE e o RP, o papel do 17- $\beta$ -estradiol e da progesterona, como prováveis agentes promotores não está certo, assim como a associação da constatação destes receptores com o prognóstico. Em várias destas neoplasias, a expressão do RE e do RP estão associadas a um melhor prognóstico e maiores sobrevidas (Narbone *et al.*, 1989; Ruder *et al.*, 1989 citados por Shick *et al.*, 1995), justificando assim alguns trabalhos, como o do Dimery *et al.* (1987) que encontraram maiores concentrações do RE em AP do que nos carcinomas adenóides císticos.

Shick *et al.* (1995) sugeriram que o RP é um possível indicador de prognóstico para o carcinoma adenóide cístico de glândula salivar. Nosso trabalho não se ateve à associação da expressão do RE e do RP com o prognóstico do AP, primeiramente por não haver dados clínicos suficientes e pelo fato do AP ser uma neoplasia benigna. Estudos futuros a respeito, utilizando outras neoplasias de

glândulas salivares, certamente ajudarão a solucionar este dilema da influência hormonal em neoplasias de glândulas salivares.

Mesmo que estudos futuros cheguem a confirmar a dependência hormonal nos APs, isso não deverá indicar a terapia anti-estrogênica de imediato, pois o adenoma pleomórfico é uma neoplasia benigna e ainda não há quem garanta que os efeitos colaterais causados por esta terapia em outros tecidos, pode ser mais agressivo do que uma intervenção cirúrgica de uma neoplasia benigna.

Shadaba *et al.* (1997) mesmo ainda com pouca informação para considerar uma possível manipulação estrogênica no manejo de neoplasias de glândulas salivares em humanos, constataram uma parcial resposta seguindo o tratamento com tamoxifen em uma paciente com carcinoma adenóide cístico avançado de glândula parótida inoperável, apresentando recorrência local e o desenvolvimento de metástase. Os autores obtiveram o controle da doença por 18 meses com uma dose de 20mg, duas vezes por dia. Infelizmente, este relato não pôde ser incluído em uma avaliação da importância do estrogênio nesta neoplasia; apesar de afirmarem que neste período promoveram uma melhora no quadro clínico da paciente, a mesma veio a falecer. Mesmo assim fortaleceram a sugestão da importância do RE em neoplasias de glândulas salivares.

Apesar dos nossos achados, das evidências clínicas e dos levantamentos epidemiológicos, entre outros, indicarem uma dependência hormonal no desenvolvimento do AP, sabe-se da complexidade de se compreender as possíveis respostas geradas pelos distintos REs e RPs, pois os genes que respondem aos estímulos destes receptores são diferentes conforme o tipo da célula-alvo.

A seletividade do papel fisiológico destas proteínas receptoras, que são induzidas por distintas bases, proporcionando diferentes ações guiadas por cada tipo de REs e RPs, e a capacidade que cada uma delas tem de formar dímeros e ligar-se de três maneiras distintas ao DNA, podendo originar diversas respostas. O conhecimento destas características fisiológicas dificultou ainda mais a interpretação dos resultados constatados através da imuno-histoquímica, juntamente com as linhagens celulares AP8 e AP9, pois podem surpreender manifestando papéis não esperados, tanto nos experimentos como em tratamento neoplásico.

Os receptores RE $\alpha$  e RE $\beta$  são expressos no tecido de mama humana. Já nas neoplasias de mama esta expressão é variável, e sabendo-se que estas duas isoformas do RE podem sinalizar a indução de respostas distintas, assim como a formação de dímeros (RE $\alpha$ RE $\alpha$ , RE $\beta$ RE $\beta$ , RE $\alpha$ RE $\beta$ ), supõem-se então a possibilidade de terem papéis diferentes, seja no tratamento de diversas neoplasias, seja em estudos *in vitro*, como o nosso.

O RE $\beta$ , embora similar ao RE $\alpha$ , na maioria das vezes inibe a transativação, e o RE $\alpha$  induz à transativação. Uma variação na concentração destes no tecido, poderia conduzir a respostas com intensidades variáveis ou até alternadas.

Alterações quantitativas da proteína RE presente no tecido, nas diversas fases da vida e do ciclo menstrual, foram aventadas com a hipótese de que a proporção da expressão do RE em células epiteliais de tecido de mama muda durante o ciclo menstrual, acreditando na ocorrência de concentrações mais baixas durante a quarta semana (Williams *et al.*, 1991). Alterações similares já haviam sido constatadas com os RPs.

Se o RE $\beta$  estiver mais expresso do que o RE $\alpha$  em células de algumas linhagens derivadas do AP, poderá este hormônio inibir a proliferação celular desta linhagem em especial, e conseqüentemente, obter um resultado exatamente oposto ao nosso, isto se realmente a função do RE $\alpha$  e RE $\beta$  nos APs for semelhante à maioria dos tecidos já estudados.

No entanto existem resultados controversos, demonstrando que o RNAm do RE não é afetado nas diferentes fases do ciclo menstrual (Ree *et al.*, 1989). Estudos, com a técnica da imuno-histoquímica em tecidos da mucosa bucal de mulheres na pós-menopausa, não confirmaram os estudos anteriores descritos por Williams *et al.* (1991).

Caso haja realmente uma variação quantitativa dos REs durante a vida celular. Em experimentos *in vitro* como o nosso, ou que as células derivadas do AP cresceram em um meio padrão, sem estímulo do meio intersticial, não expressam o real efeito hormonal nestas neoplasias, podendo ter *in vivo* uma resposta não esperada sobre a questão da influência hormonal.

A função do RPA na biologia do RP foi durante muito tempo um grande enigma. Entretanto, neste caso, a biologia nos deu uma lição de como pode haver grandes formas de sistemas ainda não compreendidos. Realmente uma revisão desta literatura indica que o RPA e o RPB são como vários outros exemplos de duas formas de transcrição; fator existente na célula alvo como uma consequência de alternativas de iniciação da transcrição ou translocação (Descombes & Schibler, 1991; Rentoumis *et al.*; Dobrzanski, *et al.*, 1991; Foulkes & Sassone-Corsi, 1992 citados por Giangrande, 1999).



Pesquisas demonstraram que o RPA e o RPB, como os REs, podem formar dímeros e se ligar ao DNA de três modos distintos, formando os homodímeros (RPA/RPA e RPB/RPB) e um heterodímero. Vale a pena lembrar que, como ocorre com o estrógeno, o efeito da progesterona depende da constituição específica de cada um destes dímeros, pois o RPB revelou uma ativação junto ao DNA e o RPA numa função repressora.

A diferença relativa na expressão do RPA em relação ao RPB foi constatada, durante o ciclo menstrual (Schrader & O'Malley, 1972; Feil *et al.*, 1988; Ilenchuk & Walters, 1987; Schneider *et al.*, 1991; Boyd & Spelsberg, 1979; Boyd-Leinen *et al.*, 1982), variando na razão de 50:1 a 2:1 (Wiehle *et al.*, 1995). Também foram detectadas alterações desta razão em neoplasias de mama (Lessey *et al.*, 1983).

Assim, do mesmo modo que a expressão do tipo do RE pode provocar respostas distintas, o aumento da quantidade de RPA em relação ao RPB em linhagens celulares poderá também determinar uma resposta inversa à nossa.

Como se não bastasse os inúmeros caminhos de ações estimuladas pela progesterona, o RP foi demonstrado como um inibidor do estrógeno, do glucacorticóide e do mineralocorticóide. Além da expressão dos RPs ser induzido pelo estrógeno, as RPA e RPB também respondem diferentemente aos antagonistas da progesterona (Giangrande & McDonnell, 1999), complicando ainda mais a extrapolação de nossos resultados e interpretações, para predizer seu efeito *in vivo*, no AP.

Pesquisas em carcinomas de mama com antagonistas do estrógeno como o Tamixifem, Reloxifene e ICI, provocaram grande estimulação quando ligados ao RE $\beta$ , porém inibiram a transativação ao se ligarem ao RE $\alpha$  (Paech *et al.*, 1997).

O desvendamento das expressões destes subtipos de RE nas neoplasias de glândulas salivares, e análise das possíveis respostas genéticas dadas através destas relações, provavelmente, guiarão para tratamentos alternativos das neoplasias de glândulas salivares. Tratamentos mais conservadores, para obtenção desta meta almejada poderão surgir, mesmo se tratando do AP que é uma neoplasia benigna.

Em neoplasias de mama, ensaios quantitativos do RE e RP, são métodos empregados para aumentar a precisão da seletividade de pacientes indicados à terapia hormonal. Acreditamos que mais estudos devam ser feitos para indicar a terapia hormonal no tratamento de neoplasias de glândulas salivares.

A revisão da literatura pertinente, os levantamentos epidemiológicos, os resultados imuno-histoquímicos, bem como comportamento das linhagens celulares sob a ação hormonal, sugerem que os hormônios estudados são possíveis agentes promotores neoplásicos para o AP.

## 7 CONCLUSÕES

- 7.1 Foram constatadas a imuno-marcação para o RE em 7 dos 10 APs estudados
- 7.2 O RP foram detectados em 8 dos 10 APs estudados
- 7.3 A análise estatística de uma curva de crescimento da linhagem AP9, linhagem de uma AP derivada do sexo feminino, evidenciou a existência de uma diferença significativa entre o controle e as células sob a influência do hormônio progesterona a partir das 48 horas. Já no controle das células submetidas ao efeito do 17- $\beta$ -estradiol a diferença significativa foi observada somente nas 72 horas.
- 7.4 A análise estatística de uma curva de crescimento da linhagem AP8, linhagem de uma AP derivada do sexo masculino, evidenciou a existência de uma diferença significativa entre o controle e as células submetidas a ação de ambos os hormônios, o 17- $\beta$ -estradiol e a progesterona, somente nas 72 horas.
- 7.5 Entre as células estimuladas pelo hormônio 17- $\beta$ -estradiol e as estimuladas pelo hormônio progesterona, não foram encontradas diferenças significativas em nenhum dos tempos, isto em ambas linhagens estudadas.
- 7.6 Uma proliferação celular discretamente maior, sem um significado constatado pela análise estatística, foi observadas nas células estimuladas pela progesterona, tanto para a linhagem AP8 como para a AP9.

## REFERÊNCIAS

- ABBEY, L. M.; WITORSCH, R. J.; VA, R. Prolactin binding in normal human minor salivary gland tissue: An immunohistochemical study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 58, n. 6, p. 682–687, Dec. 1984.
- ABBEY, L. M.; SCHWAB, B. H.; LANDAU, G. C.; PERKINS, E. R. Incidence of second primary breast cancer among patients with a first primary salivary gland tumor. **Cancer**, Philadelphia, v. 54, n. 7, p. 1439-1442, Oct. 1984.
- ABIOSE, B. O.; OYEJIDE, O.; OGUMNIYI, J. Salivary gland tumours in Ibadam, Nigeria: a study of 295 cases. **Afr J Med Sci**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 195-199, Sept. 1990.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS., K.; WATSON, J. D. **Biologia molecular da célula**. Tradução Diógenes Santiago Santos e Arnaldo Zaha. 3<sup>rd</sup> ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1994. p. 1255- 1294.
- AMAR, S.; CHUNG, K. M. Influence of hormonal variation on the periodontium in women. **Periodontol 2000** , Copenhagen, v. 6, p. 79-87, Oct. 1994.
- ARAÚJO, V. C.; CARVALHO Y. R.; ARAÚJO, N. S. Actin versus vimentin in myoepithelial cell of salivary gland tumors: a comparative study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 77, n. 4, p. 387-391, Apr. 1994.
- ARAÚJO, V. C.; SOUSA, S. O.; CARVALHO, Y. R.; ARAÚJO, N. S. Application of immunohistochemistry to the diagnosis of salivary tumors. **Appl Immunohistochem Molecul Morphol**, v. 8, n. 3, p. 195-202, Sept. 2000.
- ARAÚJO, V. C.; SOUSA, S.; JAEGER, M.; LOYOLA, A.; CRIVELINI, M.; ARAÚJO, N. Characterization of the cellular component of polymorphous low-grade adenocarcinoma by immunohistochemistry and electron microscopy. **Oral Oncol**, London, v. 35, n. 2, p. 164-172, Mar. 1999.
- ARTS, J.; KUIPER, G. G. J. M.; JASSEN, J. M. M. F.; GUSTAFSSON, J. A.; LÖWIK, C. W. G. M.; POLS, H. A. P.; VAN LEEUWEN, J. P. T. M. Differential expression of estrogen receptors alpha and beta mRNA during differentiation of

human osteoblast SV-HFO cell. **Endocrinology**, Baltimore, v. 138, n. 11, p. 5067-5070, Nov. 1997.

BATRA, S.; IOSIF, S. Progesterone receptor in human vaginal tissue. **Am J Obstet Gynecol**, St. Louis, v. 153, n. 5, p. 524-528, Nov. 1985.

BEATO, M. Gene regulation by steroid hormones. **Cell**, Cambridge, v. 56, n. 10 p. 335-344, Feb. 1989.

BEM ARYEH, H; GOTTLIEB, I.; ISH-SHALOM, S.; DAVID, A.; SZARGEL, H. LAUFER, D. Oral complaints to menopause. **Maturitas**, Amsterdam, v. 24, n. 3, p. 185-189, July 1996.

BERCOVICI, B.; GRON, S.; PISANTY, S. Vaginal and oral cytology of the menopause. **Acta Cytol**, Chicago, v. 29, n. 5, p. 805-809, Sept./Oct., 1985.

BERKOW, R. **Manual Merk de medicina**, 16<sup>a</sup> ed. Tradução Ruth Moreira Leite. São Paulo: Roca, 1995. seção 14, p. 1737-1892.

BOYD, P. A.; SPELSBERG, T. C. Seasonal changes in the molecular species and nuclear binding of chick oviduct progesterone receptor. **Biochemistry**, London, v. 18, n. 17, p. 3685-3690, Aug. 1979.

BOYD-LEINEN, P. A.; FOURNIER, D.; SPELSBERG, T. C. Nonfunctioning progesterone receptors in the developed oviducts from estrogen-withdrawn immature chicks and aged nonlaving hens. **Endocrinology**, Baltimore, v. 111, n. 1, p. 30-36, July 1982.

CARSON-JURICA, M. A.; SCHRADER, W. T.; O'MALLEY, B. W. Steroid receptor family: structural and functions. **Endocr Rev**, Baltimore, v. 11, n. 2, p. 201-220, May 1990.

CHALBOUS, D.; GALTIER, F. J. Differential effect of forms A and B of human progesterone receptor on estradiol-dependent transcription. **Biol Chem**, Baltimore, v. 269, n. 37, p. 23007-23012, Sept. 1994.

CHRISTENSEN, K.; ESTES, P. A.; OÑATE, S. A., BECK, C. A.; DEMARZO, A.; ALTMAN, M.; LIBERMAN, B. A.; ST JOHN, J.; NORDEEN, S. K. EDWARDS, D. E. Characterization and functional properties of the A and B forms of human progesterone receptors synthesized in a baculovirus system. **Mol Endocrinol**, Baltimore, v. 5, n. 11, p. 1755-1770, Nov. 1991.

CLARK, J. H.; SCHRADER, W. T.; O'MALLEY, B. W. In: WILSON J.D. FOSTER D.W. (Eds). **Textbook of endocrinology**. New York: W.B. Saunders, 1992. p. 35-90.

CLARKE, C. L.; SUTHERLAND, R. L. Progestin regulation of cellular proliferation. **Endocr Rev**, Baltimore, v. 11, n. 2, p. 266-301, May 1990.

CLARKE, C. L.; ZANIO, R. L.; FEIL, P. D.; MILLER, J. V.; STECK, M. E.; OHLSSON-WIHELM, B. M.; SATYASWAROOP, P. G. Monoclonal antibodies to human progesterone receptor characterization by biochemical and immunohistochemical techniques. **Endocrinology**, Baltimore, v. 121, n. 3, p. 1123-1132, Sept. 1987.

DALEY, T. D.; DARDICK, I. An unusual parotid tumor with histogenetic implications for salivary gland neoplasms. **Oral Surg Oral Med Oral Path**, St. Louis, v. 55, n. 4, p. 374-381, Apr. 1983.

DANIELIAN, P. S.; WHITE, R.; LEES, J. A.; PARKER, M. G. Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by hormone receptors. **EMBO J**, Oxford, v. 11, n. 3, p. 102510-33, 1992.

DARDICK, I.; van NOSTRAND, A. W. P.; PHILLIPS, M. J. Histogenesis of salivary gland pleomorphic adenoma (mixed tumor) with an evaluation of the role of the myoepithelial cell. **Hum Pathol**, Philadelphia, v. 13, n. 1, p. 62-75, Jan. 1982.

DEMARZO, A. M.; OÑATE, S. A.; NORDEEN, S. K.; EDWARDS, D. P. Dimerization of mammalian progesterone receptors occurs in the absence of DNA and is related to the release of the 90-kDa heat shock protein. **Proc Natl Acad Sci USA**, Allahabad, v.88, n. 1, p. 72-76, Jan. 1991.

DEMARZO, A. M.; OÑATE, S. A.; NORDEEN, S. K.; EDWARDS, D. P. Effects of steroid antagonist RU 486 on dimerization of the human progesterone receptor. **Biochemistry**, London, v.31, n. 43, p. 10491-10501, Nov. 1992.

DESCOMBES, P.; SCHIBLER, U. A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. **Cell**, Cambridge, v. 67, n. 3, p. 569-579, Nov. 1991.

DIMERY, I. W.; JONES, L. A.; VERJAN, R. P.; RAYMOND, A. K.; GEOPFERT, H.; KI HONG, W. Estrogen receptors in normal salivary gland and salivary gland carcinoma. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, Chicago, v. 113, n. 10, p. 1082-1085, Oct. 1987.

DUFFY, D. M.; STOUFFER, R. L. Progesterone receptors messenger acid in the primate corpus luteum during the menstrual cycle: possible regulation by progesterone. **Endocrinology**, Baltimore, v. 136, n. 5, p. 1869-1876, May 1995.

ELLIS, G. L.; AUCLAIR, P. L. **Tumor of the salivary glands**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1996. p. 164-165.

ENEROTH, C. M. Salivary gland tumors in the parotid gland, submandibular gland, and the palate region. **Cancer**, Philadelphia, v. 27, n. 6, p. 1415-1418, June 1971.

ENMARK, E.; PLETO-HUIKKO, M.; GRANDIEN, K.; LAGERCRANTZ, S.; LAGERCRANTZ, J. G.; NORDENSKJOLD, M.; GUSTAFSSON, J. A. Human

estrogen receptor b-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. **J Clin Endocrinol Metab**, Philadelphia, v. 82, n. 12, p. 4258-4265, Dec. 1997.

ENMARK, E.; GUSTAFSSON, J. A. Oestrogen receptors-an overview. **J Int Med**, Northampton, v. 246, n. 2, p. 133-138, Aug. 1999.

EVANS, R. M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. **Science**, Washington, v. 240, n. 4854, p. 889-895, May 1988.

EVERSON, J. W.; CAWSON, R. A. Salivary gland tumors. A review of 2410 cases with particular reference to histological types, site, age and sex distribution. **J Pathol**, Edinburgh, v. 146, n. 1, p. 51-58, May 1985.

FARABOSCO, A.; CRISCUOLO, M.; COUKOS, G.; UCCELLI, E.; WEINSTEIN, R.; SPINATO, S.; BOTTICELLI, A.; VOLPE, A. Efficacy of hormone replacement therapy in postmenopausal women with oral discomfort. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 73, n. 5, p. 570-574, May 1992.

FEIL, P. D.; CLARKE, C. L.; SATYASWAROOP, P. G. Progesterone mediated changes in progesterone receptor forms in the normal human endometrium. **Endocrinology**, Baltimore, v. 123, n. 5, p. 2506-2513, Nov. 1988.

FEIL, P. D.; GLASSER, S. R.; TOFT, D. O.; O'MALLEY, B. W. Progesterone binding in the mouse and rat uterus. **Endocrinology**, Baltimore, v. 91, n. 3, p. 738-746, Sept. 1972.

GARCIA, E.; BOUCHARD, P. DE BRUX, J. BERDAH, J. FRYDMAN, R. SCHAISON, G. MILGROM, E. PERROT-APPLANAT, M. Use of immunocytochemistry of progesterone and estrogen receptors for endocrinological dating. **J Clin Endocrinol Metab**, Philadelphia, v. 67, n. 1, p. 80-87, July 1988.

GIANGRANDE, P. H.; McDONNELL, D. P. The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. **Recent Prog Horm Res**, New York, v. 54, n. 291, p. 291-341, 1999.

GOMPEL SAMAI, S.; CHAOUAT, M.; KAZEM, A.; KLOOSTERBOER, H. J.; BEUSMAN, P.; MIMOUN, M.; ROSTENE, W. Hormonal regulation of apoptosis in breast cells and tissues. **Steroids**, San Francisco, v. 65, n. 10/11, p. 593-598, Oct. 2000.

GRAHAM, J. D.; CLARKE, C. L. Physiological action of progesterone in target tissue. **Endocr Rev**, Baltimore, v. 18, n. 4, p. 502-519, Aug. 1997.

GRAHAM, J. D.; ROMAN, S. D.; MCGOWAN, E.; SUTHERLAND, R. L.; CLARKE, C. L. Preferential stimulation of human progesterone receptor B expression by estrogen in T-47D human breast cancer cell. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 270, n. 15, p. 30693-30700, Dec. 1995a.

GRAHAM, J. D.; YEATS, C.; BALLEINE, R. L.; HARVEY, S. S.; MILLIKEN, J. S.; BILOUS, A. M., CLARKE, C. L. Characterization of progesterone receptors A and B expression in human breast cancer. **Cancer Res**, Baltimore, v. 55, n. 21, p. 5063-5068, Nov. 1995b.

GRAHAM, J. D.; YEATS, C.; BALLEINE, R. L.; HARVEY, S. S.; MILLIKEN, J. S.; BILOUS, A. M., CLARKE, C. L. Progesterone receptor A and B protein expression in human breast cancer. **J Steroid Biochem Molec**, Oxford, v. 56, n. 1-6, p. 93-98, Jan. 1996.

GREEN, S.; CHAMBON, P. Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. **Trends Genet**, Cambridge, v. 4, n. 11, p. 309-314, Nov. 1988.

GREEN, S.; CHAMBON, P. Oestradiol induction of a glucocorticoid-responsive gene by a chimaeric receptor. **Nature**, London, v. 325, n. 6099, p. 75-78, Jan. 1987.

GREEN, S.; WATER, P.; KUMAR, V.; KRUST, A.; BORNERT, J. M.; ARGOS, P., CHAMBON, P. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. **Nature**, London, v. 320, n. 6058, p. 134-139, Mar. 1986.

GREENE, G. L.; GILNA, P.; WATERFIELD, M.; BAKER, A.; HORT, Y.; SHINE, J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. **Science**, Washington v. 231, n. 4742, p. 1150-1154, Mar. 1986.

GRONEMEYER, H. Transcription activation by estrogen and progesterone receptors. **Annu Reviews Genet**, Palo Alto, v. 25, p. 89-123, 1991.

GUSTAFSSON, J. A. Estrogen receptor beta-a new dimension in estrogen mechanism of action. **J Endocrinol**, London, v. 163, n. 3, p. 379-383, Dec. 1999.

HALL, J. M.; McDONNELL, D. P. The estrogen receptor  $\beta$ -isoform (Erbeta) of the human estrogen receptor modulates ER $\alpha$  transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. **Endocrinology**, Baltimore, v. 140, n.12, p. 5566-5578, Dec. 1999.

HORWITZ, K. B.; ALEXANDER, P. S. In situ photolinked nuclear progesterone receptors of human breast cancer cells: subunit molecular weights after transformation and translocation. **Endocrinology**, Baltimore, v. 113, n. 6, p. 2195-2201, Dec. 1999.

HORWITZ, K. B. The molecular biology of RU486. Is There a role for antiprogestins in the treatment of breast cancer? **Endocr Rev**, Baltimore, v. 13, n. 12, p. 146-163, May 1992.



ILENCHUK, T. T.; WALTERS, M. R. Rat uterine progesterone receptor analyzed by [<sup>3</sup>H]R5020 photoaffinity labeling: evidence that the A and B subunit are not equimolar. **Endocrinology**, Baltimore, v. 120, n. 4, p. 1449-1456, Apr. 1987.

JANNE, O.; KONTULA, K.; VIHKO, R. Progestin receptor in human tissues: concentration and binding kinetics. **J Steroid Biochem**, Oxford, v. 7, n. 11/12, p. 1061-1068, Nov./Dec. 1976.

JAEGER, M. M. M.; ARAÚJO, V. C.; KACHAR, B.; JAEGER, R. G. Effect of spatial arrangement of the basement membrane on culture pleomorphic adenoma cells. Study by immunocytochemistry and electron and confocal microscopy **Virchows Arch**, Berlin, v. 430, n. 6, p. 467-477, June 1997.

JEANNOM, J.-P.; SOAMES, J. V.; BELL, H.; WILSON, J. A. Immunohistochemical detection of oestrogen and progesterone receptors in salivary tumours. **Clin Otolaryngol**, Oxford, v. 24, n. 1, p. 52-54, Feb. 1999.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 109-214.

KATZENELLENBOGEN, B. S.; KORACH, K. S. A new actor in the estrogen receptor drama-enter ER-beta. **Endocrinology**, Baltimore, v. 138, n. 3, p. 861-862, Mar. 1997.

KASTNER, P.; KRUST, A.; TURCOTTE, B.; STROPP, U.; TORA, L.; GRONAMEYER, H.; CHAMBON, P. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcript encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. **EMBO J**, Oxford, v. 9, n. 5, p. 1603-1614, May 1990.

KAUFMAN, A. Y. An oral contraceptive as an etiologic factor in producing hyperplastic gingivitis and a neoplasm of the pregnancy tumor type. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis v. 28, n. 5, p. 666-670, Nov. 1969.

KLIJN, J. G. M.; SETYONO-HAM, B.; FOEKENS, J. A. Progesterone antagonists and progesterone receptor modulators in the treatment of breast cancer. **Steroids**, San Francisco, v. 65, n. 10-11, p. 825-830, Oct. 2000.

KORACH, K. S. Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. **Science**, Washington, v. 266, n. 5190, p. 1524-1527, Dec. 1994.

KRAUS, W. L.; MONTANO, M. M.; KATZENELLENBOGEN, B. S. Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters. **Mol Endocrinol**, Bethesda, v. 7, n. 12, p. 1603-1616, Dec. 1993.

KRAUS, W. L.; WEIS, K. E.; KATZENELLENBOGEN, B. S. Inhibitory cross-talk between steroid hormone receptors: differential targeting of estrogen receptor in the repression of its transcriptional activity by agonist- and antagonist-occupied

progesterin receptors. **Mol Cell Biol**, Washington, v. 15, n. 4, p. 1847-1857, Apr. 1995.

KRUST, A.; GREEN, S.; ARGOS, P.; KUMAR, V.; WALTER, P.; BORNERT, J. M.; CAMBON, P. The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. **EMBO J**, Oxford, v. 5, n. 5, p. 891-897, May 1986.

KUIPER, G. G.; GUSTAFSSON, J. A. The novel estrogen receptor- $\beta$  subtype: potential role in the cell- and promoter- specific actions of estrogens and anti-estrogens. **FEBS Lett**, Amsterdam, v. 410, n. 1, p. 87-90, June 1997.

KUIPER, G. G.; ENMARK, E.; PELTO-HUIKKO, M.; NILSSON, S. GUSTAFSSON, J. A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 93, n. 12, p. 5925-5930, June 1996.

KUIPER, G. G. J. M.; CARSSON, B. O.; GRANDIEN, K. A. J.; ENMARK, E.; HÄGGBLAD, J.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J. A. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. **Endocrinology**, Baltimore, v. 138, n. 3, p. 863-870, Mar. 1998.

KUIPER, G. G.; LEMMEN, J. G.; CARLSSON CORTON, B. C. J. C.; SAFE, S. H.; SAAG, P. T.; van der BURG, B.; van der, GUSTAFSSON, J. A. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. **Endocrinology**, Baltimore, v. 139, n. 10, p. 4252-4263, Oct. 1998.

KUMAR, V.; CHAMBON P. The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. **Cell**, Cambridge, v. 55, n. 1, p. 145-156, Oct. 1988.

KUMAR, V.; GREEN, S.; STACK, G.; BERRY, M.; JIN, J. R.; CHAMBON, P. Functional domains of the human estrogen receptor. **Cell**, Cambridge, v. 51, n. 6, p. 941-951, Dec. 1987.

KUMAR, N. S.; RICICHER, J.; OWEN, G.; LITMAN, E.; HORWITZ, K. B.; LESLIE, K. K. Selective down-regulation of progesterone receptor isoform B in poorly differentiated human endometrial cancer cell: implications for unopposed estrogen action. **Cancer Res**, Baltimore, v. 58, n. 9, p. 1860-1865, May 1998.

LAIKAW, I. J.; CLARKE, R. B.; HOWELL, A.; OWEN A. W. M. C.; POTTEN, C. S.; ANDERSON, E. The proliferation of normal human breast tissue implanted into athymic nude mice is stimulated by estrogen but not progesterone. **Endocrinology**, Baltimore, v. 136, n. 1, p. 164-171, Jan. 1995.

LAKAYE, B.; FOIDART, A.; GRISAR, T.; BALTHAZART, J. Partial cloning and distribution of estrogen receptor beta in the avian brain. **Neuroreport**, Oxford, v. 9, n. 12, p. 2743-2748, Aug. 1998.

LAUDET, V.; HANNI, C.; COLL, J.; CATZEFLIS, F.; STEHELIN, D. Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. **EMBO J**, Oxford, v. 11, n. 3, p. 1003-1013, Mar. 1992.

LAWRENCE, J. B.; MAZUR, M. T. Adenoide cystic carcinoma: a comparative pathologic study of tumors in salivary gland, breast, lung and cervix. **Hum Pathol**, Philadelphia, v. 13, n. 10, p. 916-924, Oct. 1982.

LEAVITT, W. W.; BLAHA, G. C. An estrogen-stimulated, progesterone-binding system in the hamster uterus and vagina. **Steroids**, San Francisco, v. 19, n. 2, p. 263-274, Feb. 1972

LEAVITT, W. W.; CHEN, T. J.; ALLEN, T. C. Regulation of progesterone receptor formation by estrogen action. **Ann NY Acad Sci**, New York, v. 286, n. 11, p. 210-225, Mar. 1977.

LEAVITT, W. W.; TOFT, D. O.; STROTT, C. A.; O'MALLEY, B. W. A specific progesterone receptor in the hamster uterus: physiologic properties and regulation during the estrous cycle. **Endocrinology**, Baltimore, v. 94, n. 4, p. 1041-1053, Apr. 1974.

LEEGAARD, T.; LINDEMAN, H. Salivary-gland tumours. Clinical picture and treatment. **Acta Otolaryngol Suppl**, Stockholm, v. 263, p. 155-159, 1969.

LEES, J. A.; FAWELL, S. E.; PARKER, M. G. Identification of two transactivation domains in the mouse oestrogen receptors. **Nucleic Acids Res**, London, v. 17, n. 14, p. 5477-5488, July 1989.

LEID, M.; KASTNER, P.; CHAMBON, P. Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. **Trends Biochem Sci**, Cambridge, v. 17, n. 10, p. 427-433, Oct. 1992.

LEIMOLA-VIRTANEN, R.; PENNANEN, R.; SYRJANEN, K.; SYRJANEN, S. Estrogen response in bucal mucosa-a cytological and immunohistochemical assay. **Maturitas**, Amsterdam, v. 27, n. 1, p. 41-45, May 1997.

LEIMOLA-VIRTANEN, R.; SALO, T.; TOIKKANEN, S.; PULKKINEN, J.; SYRJANEN, S. Expression of estrogen receptor (ER) in oral mucosa and salivary gland. **Maturitas**, Amsterdam, v. 36, n. 2, p. 131-137, Aug. 2000.

LESSEY, B. A.; ALEXANDER, P. S.; HORWITZ, K. B. The subunit structure of human breast cancer progesterone receptors: characterization by chromatography and photoaffinity labeling. **Endocrinology**, Baltimore, v. 112, n. 4, p. 1267-1274, Apr. 1983.

LESSEY, B. A.; KILLAM, A. P.; METZGER, D. A.; HANEY, A. F.; GREENE, G. L.; MCCARTY, K. S. J. Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen

and progesterone receptors throughout the menstrual cycle. **J Clin Endocrinol Metab**, Philadelphia, v. 67, n. 2, p. 334-340, Aug. 1988.

LOOSFELT, H.; LOGEAT, F.; VU HAI, M. T.; MILGROM, E. The rabbit progesterone receptor. Evidence for a single steroid-binding subunit and characterization of receptor mRNA. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 259, n. 22, p. 14196-14202, Nov. 1984.

LOYOLA, A. M.; ARAÚJO, V. C.; SOUSA, S. O. M.; ARAÚJO, N.S. Minor salivary gland tumor. A retrospective study of 164 cases in a Brazilian Population. **Oral Oncology**, London, v. 31B, n. 3, p. 197-201, May 1995

LYDON, J. P.; DEMAYO, F. J.; FUNK, C. R.; MANI, S. K.; HUGHES, A. R.; MONTGOMERY Jr. C. A.; SHYAMALA, G. CONNEELY, O. M.; O'MALLEY, B. W. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. **Genes Dev**, New York, v. 9, n. 18, p. 2266-2278, Sept. 1995.

MCDONNELL, D. P.; SHAHBAZ, M. M.; VEGETO, E.; GOLDMAN, M. E. The human progesterone receptor A-form functions as a transcriptional modulator of mineralocorticoid receptor transcriptional activity. **J Steroid Biochem Mol Biol**, Oxford, v.48, n. 5/6, p. 425-432, Apr. 1994.

MCDONNELL, D. P.; GOLDMAN, M. E. RU486 exerts antiestrogenic activities through a novel progesterone receptor A form-mediated mechanism. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 269, n. 16, p. 11945-11949, Apr. 1994.

MCMANUS, M. J.; WELSCH, C. W. The effect of estrogen, progesterone, thyroxine, and human placental lactogen on DNA synthesis of human breast ductal epithelium maintained in athymic nude mice. **Cancer**, Philadelphia, v. 54, n. 9, p. 1920-1927, Nov. 1984.

MAKEK, M.; vom HOCHSTETTER, A. R. Pleomorphic adenoma of the human breast. **J Surg Oncol**, New York, v. 14, n. 3, p. 281-286, 1980.

MANGELSDORF, D. F.; THUMMEL, C.; BEATO, M.; HERRLICH, P.; SCHUTZ, G.; UMESONO BLUMBERG, B.; KASTNER, P.; MARK, M.; CHAMBON, P. *et al.* The nuclear receptor superfamily: the second decade. **Cell**, Cambridge, v. 83, n. 6, p. 835-839, Dec. 1995.

MARIOTTI, A. The effects of estrogen on gingival fibroblast proliferation. **J Dent Res**, Chicago, v. 70, p. 352, 1991.

MARUYAMA, K.; ENDOH, H.; SASAKI-IWAOKA, H.; KANOU, H.; SHIMAYA, E.; HASHIMOTO, S.; KATO, S.; KAWASHIMA, H. A novel isoform of rat estrogen receptor beta with 18 amino acid insertion in the ligand binding domain as a putative dominant negative regulator of estrogen action. **Biochem Biophys Res Commun**, New York, v. 246, n. 1, p. 142-147, May 1998.

MEYER, M. E.; QUIRIN-STRICKER, C.; LEROUG, T.; BOCQUEL., M. T.; GRONEMEYER, H. A limiting factor mediates the differential activation of promoters by the human progesterone receptor isoforme. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 267, n. 25, p. 10882-10887, May 1992.

MILGROM, E.; BAULIEU, E-E. Progesterone in uterus and plasma. I. Binding in rat uterus 105,000g supernatant. **Endocrinology**, Baltimore, v. 87, n. 2, p. 276-286, Aug. 1970.

MILGROM, E.; ATGER, M.; BAULIEU, E-E. Progesterone in uterus and plasma. I V – Progesterone receptor(s) in guinea pig uterus. **Steroids**, San Francisco, v. 16, n. 6, p. 741-754, Dec. 1970.

MILGROM, E.; ATGER, M., PERROT, M.; BAULIEU, E-E. Progesterone in uterus and plasma. VI. Uterus progesterone receptors during the estrus cycle and implantation if the guinea pig. **Endocrinology**, Baltimore, v. 90, n. 4, p. 1071-1078, Apr. 1972.

MILGROM, E.; THI, L.; ATGER, M. BAULIEU, E-E. Mecanisms regulating the concentration and the conformation of progesterone receptor(s) in the uterus. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 248, n. 18, p. 6366-6374, Sept. 1973.

MOLTENI, A.; WARPEHA, R. L.; BRIZIO-MOLTENI, L.; FROS, E. M. Estradiol receptor-binding protein in head and neck neoplastic and normal tissue **Arch Surg**, Chicago, v. 116, n. 2, p. 207-210, Feb. 1981.

MONTANO, M. M.; MULLER, V.; TROBAUGH, A.; KATZENELLENBOGEN B. S. The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. **Mol Endocrinol**, Bethesda, v. 9, n. 7, p. 814-825, July 1995.

MOORE, J. T.; MCKEE, D. D.; SLENTZ-KESLER, K.; MOORE, L. B.; JONES, S. A.; HORNES, E. L.; SU, J. L.; KLIEWER, S. A.; LEHAMANN, J. M.; WILSON, T. M. Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. **Biochem Biophys Res Commun**, New York, v. 247, n. 1, p. 75-78, June 1998.

MOSELMAN, S.; POLMAN, J.; DIJKEMA, R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. **FEBS Lett**, Amsterdam, v. 392, n. 1, p. 49-53, Aug. 1996.

MUSGROFE, E. A.; LEE, C. S.; SUTHERLAND, R. L. Progesterone both stimulate and inhibit breast cancer cell cycle progression while increasing expression of transforming growth factor  $\alpha$ , epidermal growth factor receptor, c-fos, and myc genes. **Mol Cell Biol**, Washington, v. 11, n. 10, p. 5032-5043, Oct. 1991.

MUSGROVE, E. A.; HAMILTON, J. A.; LEE, C. S.; SWEENEY, K. J.; WATTS, C. K.; SUTHERLAND, R. L. Growth factor, steroid and antagonist regulation of

cyclin gene expression associated with changes in T-47D human Breast cancer cell cycle progression. **Mol Cell Biol**, Washington, v. 13, n. 6, p. 3577-3587, July 1993.

OGAWA, S.; IOUE, S.; WATANABE, T.; HIROI, H.; ORIMO, A.; HOSOI, T.; OUCHI, Y.; MURAMATSU, M. The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. **Biochim Biophys Res Commun**, New York, v. 243, n. 1, p. 122-126, Feb. 1998.

O'MALLEY, B. W.; CONNEELY, O. M. Orphan receptor: in search of a unifying hypothesis for activation. **Mol Endocrinol**, Bethesda, v. 6, n. 9, p. 1359-1361, Sept. 1992.

OSBORNE, C. K.; YOCHMOWITZ, M. G.; KNIGHT, M. A. W.; MCGUIRE, W. The value of estrogen and progesterone receptor in the treatment of breast cancer. **Cancer**, Philadelphia, v. 46, n. 12, p. 2884-2888, Dec. 1980.

PACE, P.; TAYLOR, J.; SUTHARALINGAM, S.; COOMBES, R. C. Human estrogen receptor beta binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor alpha. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 272, n. 41, p. 25832-25838, Oct. 1997.

PAECH, K.; WEBB, P.; KUIPER, G. G. J. M.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J. A.; KUSHNER, P. J.; SCANLAN, T. S. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 site. **Science**, Washington, v. 277, n. 5, p. 1508-1510, Sept. 1997.

PARKE-SARGE, O-K.; PARMER, T. G.; GU, Y.; GIBORI, G. Does the rat corpus luteum express the progesterone receptor gene? **Endocrinology**, Baltimore, v. 136, n. 4, p. 1537-1543, Apr. 1995.

PAVAO, M.; TRAISH, A. M. Estrogen receptor antibodies: specificity and utility in detection, localization and analyses of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$ . **Steroids**, San Francisco, v. 66, n. 1, p. 1-16, Jan. 2000.

PERROT-APPLANAT, M.; LOGEAT, F.; GROYER, P. M.; MILGROM, E. Immunocytochemical study of mammalian progesterone receptor using monoclonal antibodies. **Endocrinology**, Baltimore, v. 116, n. 4, p. 1473-1484, Apr. 1985.

PERROT-APPLANAT, M.; GROYER-PICARD, M.; VU HAI, M. T.; PALLUD, C.; SPYRATOS, F.; MILGROM, E. Immunohistochemical staining of progesterone receptor in paraffin section of human breast cancer. **Am J Pathol**, Edinburgh, v. 135, n. 3, p. 457-468, Sept. 1989.

PERROT-APPLANAT, M.; GROYER-PICARD, M.; LORENZO, F.; JOLIVET, A.; VU HAI, M. T.; PALLUD, C.; SPYRATOS, F.; MILGROM, E. Immunohistochemical study with monoclonal antibodies to progesterone receptor in human breast tumors. **Cancer Res**, Baltimore, v. 47, n. 10, p. 2652-2661, May 1987.

PETTERSSON, K.; GRANDIEN, K.; KUIPER, G. G.; GUSTAFSSON, J. A. Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response elements-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. **Mol Endocrinol**, Bethesda, v. 11, n.10, p. 1986-1996, Sept. 1997.

PRESS, M. F.; GREENE, G. L. Localization of progesterone receptor with monoclonal antibodies to the human progestin receptor. **Endocrinology**, Baltimore, v. 122, n. 3, p. 1165-1175, Mar. 1988.

PRESS, M. F.; UDOVE, J. A.; GREENE, G. L. Progesterone receptor distribution in the human endometrium. **Am J Pathol**, Edinburgh, v. 131, n. 1, p. 112-124, Apr. 1988.

RAO, B. R.; WIEST, W. G.; ALLEN, W. M. Progesterone "receptor" in rabbit uterus. I. Characterization and estradiol-17 $\beta$  augmentation. **Endocrinology**, Baltimore, v. 92 n. 4, p. 1229-1240, Apr. 1973.

REE, A. H.; LANDMARK, B. F.; ESKILD, W. Autologous downregulation of messenger ribonucleic acid and protein levels for estrogen receptors in MCF-7 cells: an inverse correlation to progesterone receptor levels. **Endocrinology**, Baltimore, v. 124, n. 5, p. 2577-2583, May 1989.

REGEZI, J. A.; SCIUBBA J. J **Patologia bucal correlações clinicopatológicas**. 3<sup>a</sup>. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 214.

SAVOURET, J. F.; BAILLY, A.; MISRAHI, M.; RAUCH, C.; REDEUILH, G.; CHAUCHEREAU, A; MILGROM, E. Characterization of the hormone responsive element involved in the regulation of the progesterone receptor gene. **EMBO J**, Oxford, v.10, n. 7, p. 1875-1883, July 1991.

SAVOURET, J. F.; MISRAHI, M.; MILGROM, E. Molecular action of progesterone. **Int J Biochem**, Bristol, v. 22, n. 6, p. 579-594, 1990.

SAVOURET, J. F.; MISRAHI, M.; MILGROM, E. Molecular action of progesterone. **Oxf Rev Reprod Biol**, v. 10, p. 293-374, 1988.

SCHNEIDER, W.; RAMACHANDRAN, C.; SATYASWSROOP, P. G.; SHYAMALA, G. Murine progesterone receptor exists predominantly as the 83-kilodalton 'A' form. **J Steroid Biochem Mol Biol**, Oxford, v. 38, n. 3, p. 285-291, Mar. 1991.

SCHRADER, W. T.; O'MALLEY, B. W. Progesterone-binding components of chick oviduct IV. Characterization of purified subunits. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 247, n. 1, p. 51-59, Mar. 1972.

SEIELSTAD, D. A.; CARLSON, K. E.; KUSHNER, P. J.; GREENE, G. L. KATZENELLENBOGEN, J. A. Analysis of the structural core of the human estrogen

receptor ligand binding domain by selective proteolysis/mass spectrometric analysis. **Biochemistry**, London, v. 34, n. 39, p. 12605-12615, Oct. 1995.

SEIFERT, G.; LANGROCK, I.; DONATH, K. A pathological classification of pleomorphic adenoma of the salivary glands. **HNO**, v. 24, n. 12, p. 415-426, Dec. 1976.

SEIFERT, G.; OKABE, H.; GASELITZ, J. Epithelial salivary gland tumor in children and adolescents. Analysis of 80 cases (Salivary Gland Register 1965-1984). **ORL J Otorhinolaryngol Related Spec**, Basel, v. 48, n. 3, p. 137-149, 1986.

SHADABA, A.; GAZE, M. N.; GRANT, H. R. The response of adenoide cystic carcinoma to tamoxifen. **J Laryngol Otol**, Ashford Kent, v. 111, n. 12, p. 1186-1189, Dec. 1997.

SHERMAN, M. R.; CORVOL, P. L.; O'MALLEY, B.W. Progesterin-binding components of chick oviduct, I. Preliminary characterization of components. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 245, n. 22, p. 6085-6096, Nov. 1970.

SHI, S. R.; KEY, M. E.; KALRA, K. L. Antigen retrieval is formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical based staining on microwave oven heating of tissue sections. **J Histochem Histochem**, Baltimore, v. 39, n. 6 p. 741-748, June 1991.

SHICK, P. C.; RIORDAN, P.; FOSS, R. D. Estrogen and progesterone receptors in salivary gland adenoide cystic carcinoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis v. 80, n. 4, p. 440-444, Oct. 1995.

SHIRASUNA, K.; SATO, M.; MIYIAZAKI, T. A myoepithelial cell line established from a human pleomorphic adenoma arising in minor salivary gland. **Cancer**, Philadelphia, v. 45, n. 2, p. 297-305, Jan. 1980.

SOUSA, S. C. O. M. **Estudo morfológico e imuno-histoquímico do adenoma pleomórfico de glândula salivar menor**. 1990. 65 f. Tese (Doutorado em Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SPIRO, R. H. Salivary neoplasms: overview of a 35-years experience with 2,807 patients. **Head Neck Surg**, Boston, v. 8, n. 33, p. 177-184, Jan/Feb. 1986.

SPIRO, R. H.; KOSS, L. G.; HAJDU, S. I.; STRONG, E. W. Tumors of minor salivary origin. A clinico-pathologic of 492 cases. **Cancer**, Philadelphia, v. 31, n. 1, p. 117-129, Jan. 1973.

STEDMAN, K. E.; MOORE G. E.; MORGAN, R. T. Estrogen receptor protein in diverse human tumors. **Arch Surg**, Chicago, v. 115, n. 3, p. 244-248, Sept. 1980.



- SUGANO, I.; KOICHI, N.; OSAMU, M.; GENSHIRO, I., NAOJI, T. Immunohistochemical studies on mioepithelial changes in breast tumors. **Acta Pathol Jpn**, Tokyo, v. 31, n. 1, p. 35-44, Jan. 1981.
- TASSET, D.; TORA, L.; FROMENTAL, C.; SCHEER, E.; CHAMBON, P. Distinct classes of transcriptional activating domains functions by different mechanisms. **Cell**, Cambridge, v. 62, n. 6, p. 1177-1187, Sept. 1990.
- TODO, T.; ADACHI, S.; YAMAUCHI, K. Molecular cloning and characterization of Japanese cell estrogen receptor cDNA. **Mol Cell Endocrinol**, Linerick, v. 119, n. 1, p. 37-45, May 1996.
- TOPPER, Y. J.; FREEMAN, C. S. Multiple hormone interations in the developmental biology of the mammary gland. **Physiol Rev**, v. 60, n. 4, p. 1049-1106, Oct. 1980.
- TORA, L.; GRONEMEYER, H.; TURCOTTE, B.; GAUB, M. P.; CAMBON, P. The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation. **Nature**, London, v. 333, n. 6169, p. 185-188, May 1988.
- TREMBLAY, G. B.; TREMBLAY, A.; COPELAND, N. G.; GILBERT, D. J.; JENKINS, N. A.; LABRIE, F. Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. **Mol Endocrinol**, Bethesda, v. 11, n. 3, p. 353-365, Mar. 1997.
- TSAI, M.-J.; O'MALLEY, B. W. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. **Ann Rev Biochem**, Palo Alto, v. 63, p. 451-486, 1994.
- TUNG, L.; MOHAMED, M. K.; HOEFFLER, J. P.; TAKIMOTO, G. S., HORWITZ, K. B. Antagonist-occupied human progesterone B-receptors activate transcription without binding to progesterone response elements and are dominantly inhibited by A-receptors. **Mol Endocrinol**, Baltimore, v. 7, n. 10, p. 1256-1265, Oct. 1993.
- VAN BOGAERT, J. L. Effect of hormone on human mammary duct in vivo. **Horm Metab Res**, Stuttgart, v. 10, n. 4, p. 337-340, July 1978.
- VEGETO, E.; SHAHBAZ, M. M.; WEN, D. X.; GOLDMAN, M. E.; O'MALLEY B. W.; MCDONNELL, D. P. Human progesterone receptor A form is a cell – and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. **Mol Endocrinol**, Bethesda, v. 7, n. 10, p. 1244-1255, Oct. 1993.
- YLIKOMI, T.; GASC, J.-M.; ISOLA, J.; BAULIEU, E.-E, TUOHIMAA, P. Progesterone receptor in the chick bursa of Fabricius: characterization and immunohistochemical localization. **Endocrinology**, Baltimore, v. 117, n. 1, p. 155-160, July 1985.

WARDROP, R. W.; READE, P. C.; HAILES J.; BURGER H.G. Oral discomfort at menopause. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 67, n. 5, p. 511-515, May 1989.

WEBSTER, N.; JIN, J. R.; GREEN, S.; HILLIS, M.; CHAMBON, P. The yeast UASG is a transcriptional enhancer in human HeLa cells in the presence of the Gal4 trans-activator. **Cell**, Cambridge, v. 52, n. 2, p. 169-78, Jan. 1988.

WELSH, R. A.; MEYER, A. T. Mixed tumor of human salivary gland: histogenesis. **Arch Pathol**, Chicago, v. 85, n. 4, p. 433-447, Apr. 1968.

WEN, D. X.; XU, Y. F.; MAIS, D. E.; GOLDMAN, M. E. MCDONNELL, D. P. The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. **Molec Biol Cell**, Bethesda, v. 14, n. 12, p. 8356-8364, Dec. 1994.

WHITE, R.; LEES, J. A.; NEEDHAM, M.; HAM, J.; PARKER, M. Structural organizations and expression of the mouse estrogen receptor. **Mol Endocrinol**, Bethesda, v. 1, n. 10, p. 735-744, Oct. 1987.

WIEHLE, R. D.; RICHARDSON, M.; BESCH, N.; BESCH, P.; KIRSHON, B.; REITER, A.; HUTCHENS, T.W. Oral contraceptive (OCP) use increases proliferation and decreases oestrogen receptor content of epithelial cells in the normal human breast. **Exper Lung Res**, v. 21, n. 1, p. 17-39, Feb. 1995.

WILLIAMS, G.; ANDERSON, E.; HOEWELL, A.; WATSON, R.; COYNE, J.; ROBERTS, S. A.; POTTEN, C. S. Oral contraceptives and oestrogen receptor content of epithelial cells in the normal breast. **Int J Cancer**, New York, v. 48, n. 2, p. 206-210, May 1991.

WONG, M. S. J.; MURPHY, L. C. Differential regulation of c-myc by progestins and antiestrogens in T-47D human breast cancer cells. **J Steroid Biochem Mol Biol**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 39-44, July 1991.

## ***SUMARRY***

### **"*IN VIVO*" STUDY OF ESTROGEN (RE) AND PROGESTERONE (RP) RECEPTORS AND VERIFICATION OF THE "*IN VITRO*" EFFECT OF THESE HORMONES IN TWO PLEOMORPHIC ADENOMA CELL LINES**

It is well established the similarity between mammary and salivary glands especially between the acinic and ductile structures. These aspects, associated to the fact of coexistence of breast carcinomas and of salivary gland tumors been described, leaded studies in attempt to determine the importance of the ERs and Pr in pleomorphic adenomas (PA), the most frequent salivary gland tumor and with predilection for the females. Lately, the presence of ERs and of the PRs has been investigated in PA and other salivary gland tumors pointing out their hormonal dependency. The expression of hormone receptors in breast carcinomas is crucial to determine a presence for both receptors. These tumors exhibit better response to anti-estrogenic therapy than the negative ones. Basing on the pertinent scientific literature, the present study proposes to investigate the presence of the RE and of the RP in humans PA and connecting them with cellular proliferation *in vitro*, under the influence of these hormones. Immunohistochemistry technique was used for the detection of RE and RP in

paraffin embedded 10 PAs from the files of the Department of Oral Pathology, School of Dentistry, University of São Paulo, and two PA cell lines one from a male patient and other female. The culture media was supplied with, 17-b-estradiol and progesterone. A growth curve was performed (24 hours, 48 hours and 72 hours) to verify the influence of the respective hormones in the cellular proliferation. As a positive control T-47-D cells derived from a hormone dependent metastatic breast carcinoma were used, and as negative control HN30 cells, derived from a tongue squamous cell carcinoma. 7 of 10 PAs were positive (4 in men and 3 in women) for RP and 8 of 8 PAs (4 in women and 4 in men) for RE. The statistical analysis verified a significant difference in the proliferative index between the control cells and the ones submitted to the action of the 17-b-estradiol and of the progesterone: for male derived lineage a difference was only observed in the last 72 hours. In the other hand, for the female derived lineage a significant difference was verified starting from 48 hours, suggesting that PA can be influenced by hormonal action.