

**Henrique Lima Couto**

**Expressão e Localização da Folistatina e FLRG (gene relacionado a folistatina) na mama humana normal e patológica.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Belo Horizonte – MG**

**2007**

**Henrique Lima Couto**

**Expressão e Localização da Folistatina e FLRG (gene relacionado a folistatina) na mama normal e patológica.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher, na área de concentração em ginecologia endócrina, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Fernando Marcos dos Reis

Co-orientador: Geovanni Dantas Cassali

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Belo Horizonte - MG**

**2007**

Este trabalho foi realizado sob orientação do  
Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis\*  
e sob co-orientação do  
Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali\*\* .

\* Laboratório de Reprodução Humana

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – Faculdade de Medicina – UFMG

Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo

Departamento de Fisiologia e Biofísica – ICB – UFMG

Fone: 3248-9484/3499-2929 FAX: 3248-9299

e-mail: [reis@medicina.ufmg.br](mailto:reis@medicina.ufmg.br)

\*\* Laboratório de Patologia Comparada

Departamento de Patologia Geral – ICB – UFMG

Fone: 3499-2891 FAX: 3499-2879

e-mail: [cassalig@icb.ufmg.br](mailto:cassalig@icb.ufmg.br)

**À todas as mulheres, mães da vida.**

## **AGRADECIMENTOS**

A minha mãe, Rosaura Pires Lima, pelo exemplo profissional.

Ao meu pai, Élvio Cançado Couto, pelo incentivo à busca do conhecimento.

Às minhas irmãs e ao meu irmão, pelo apoio e compreensão.

Ao Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis, pela presteza e dedicação ao me orientar.

Ao Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali, por ter me coorientado e permitido a utilização do seu laboratório sem o qual esse trabalho não seria possível.

A Profa. Dra. Adelina Martha dos Reis por ter me recebido em seu laboratório.

Ao Prof. Washington Cançado Amorim, pela amizade, incentivo e confiança.

Aos Prof. Henrique Vitor Leite e João Lúcio dos Santos, pela confiança depositada.

Ao Prof. Marcos Mendonça, por toda orientação inicial.

Ao Prof. Wylie Vale (Salk Institute, La Jolla, CA, USA) por ceder gentilmente os anticorpos anti  $\beta$ A, anti-FS, anti-ActRIB e anti-ActRIIA utilizados neste estudo.

Ao colega de pós graduação e colaborador, Enrico Bloise, sem o qual esse trabalho não seria possível.

## RESUMO

Ativinas agem através dos receptores ActRIB e ActRIIA e seus efeitos são antagonizados pela inibina, folistatina e FLRG. As ativinas estão relacionadas ao crescimento ductal mamário e à diferenciação lóbulo-alveolar de camundongos. As ativinas têm uma ação antiproliferativa em linhagens de células de câncer de mama in vitro. Em contra parte, a folistatina e a FLRG (gene relacionado a folistatina), são inibidoras das ativinas. Esse estudo teve como objetivo avaliar a expressão e localização da Folistatina e FLRG na mama humana normal e patológica. Foram utilizados fragmentos de tecido mamário de pacientes submetidas à mamoplastia redutora, tumorectomia, quadrantectomia e mastectomia. Os tecidos analisados foram obtidos no arquivo do Laboratório de Patologia Comparada do Departamento de Patologia Geral do ICB-UFMG. As amostras foram submetidas a estudo imunohistoquímico conjuntamente com grupos controle para coloração para folistatina e FLRG. As lâminas foram analisadas quanto a intensidade de coloração e a área de coloração. Os resultados foram submetidos a análise estatística descritiva e a comparação entre os grupos foi feita por análise de variância não paramétrica pelo teste Kruskal-Wallis. As diferenças com valor de  $p < 0,05$  foram consideradas significativas e submetidas ao teste Dunn de comparações múltiplas. A folistatina e a FLRG mostraram-se presentes na mama humana normal e patológica. A expressão de folistatina parece estar aumentada nas células estromais (citoplasma e núcleo) dos fibroadenomas em relação aos carcinomas ductais invasores. A expressão de FLRG parece estar aumentada nas células epiteliais (citoplasma e área) dos carcinomas ductais invasores quando comparados com os controles.

## ABSTRACT

Follistatin and FLRG expression and localization in normal and pathological breast. Activins are growth factors from the transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ) superfamily that act through type I (ActRI) and type II (ActRII) receptors and have their effects antagonized by inhibins and follistatin. Activins have been related to mammary ductal elongation and lobular-alveolar differentiation in mice. Activins inhibits the proliferation of breast cancer cell lines in vitro. By the other size, follistatina and FLRG (follistatina related gene) are activins inhibitors. This paper aims to analyse Follistatin and FLRG expression and localization in human normal and pathological breast. There were used samples of breast tissue obtained from patients submitted to mammoplasty, tumorectomy, quadrantectomy and mastectomy. The analysed samples were obtained from The Compared Pathology Laboratory files from ICB-UFMG. The samples were submitted to immunohistochemistry assay for follistatina and FLRG together with negative controls. The samples were analysed for colored intensity and colored area. The results were submitted to statistical descriptive analyses and were matched by Kruskal-Wallis test. Values of P less than 0,05 were taken as significance and submitted to Dunn test of multiple matches. Follistatin and FLRG showed being present at normal and pathological human breasts. Follistatin expression seems being increased in fibroadenomas stromal cells (cytoplasm and nucleus) compared with ductal invasive carcinoma. FLRG expression seems being increased in ductal invasive carcinoma epithelial cells (cytoplasm and area) compared with normal controls.



## **LISTA DE FIGURAS**

<b>1. Glândula mamária normal corada para folistatina por imunohistoquímica. Aumento de 20x.</b>	<b>3</b>
<b>2. Seqüência evolutiva embriológica da glândula mamária</b>	<b>4</b>
<b>3. Anatomia da glândula mamária.</b>	<b>5</b>
<b>4. Estágios evolutivos da mam na puberdade segundo Tanner</b>	<b>6</b>
<b>5. Hiperplasia ductal florida</b>	<b>9</b>
<b>6. Fibroadenoma: peça cirúrgica.</b>	<b>9</b>
<b>7. Fibroadenoma, microscopia.</b>	<b>10</b>
<b>8. Carcinoma ductal in situ</b>	<b>10</b>
<b>9. Carcinoma ductal invasor (pequeno aumento)</b>	<b>11</b>
<b>10. Carcinoma ductal invasor (grande aumento)</b>	<b>11</b>
<b>11. Coloração imunohistoquímica para folistatina</b>	<b>18</b>
<b>12. Coloração imunohistoquímica para FLRG</b>	<b>18</b>

## **LISTA DE TABELAS**

<b>1.</b> Protocolo utilizado para os diferentes ensaios imunohistoquímicos.	<b>18</b>
<b>2.</b> Escala de distribuição da intensidade de coloração dos tecidos imunocorados.	<b>19</b>
<b>3.</b> Escala de distribuição da área de coloração dos tecidos imunocorados.	<b>19</b>
<b>4.</b> Resultado da coloração dos tecidos imunocorados para folistatina (medianas).	<b>22</b>
<b>5.</b> Resultado do teste de Kruskal-Wallis para folistatina. Em negrito: achados significativos. .	<b>22</b>
<b>6.</b> Grupos estatisticamente significativos para folistatina.	<b>23</b>
<b>7.</b> Resultado da coloração dos tecidos imunocorados para FLRG (medianas).	<b>26</b>
<b>8.</b> Resultado do teste de Kruskal-Wallis para FLRG. Em negrito: achados significativos	<b>26</b>
<b>9.</b> Grupos estatisticamente significativos para FLRG	<b>27</b>

## **Lista de Gráficos**

<b>1</b>	<b>Coloração citoplasmática das células estromais para folistatina.</b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>Coloração nuclear das células estromais para folistatina.</b>	<b>24</b>
<b>3</b>	<b>Intensidade de coloração para FLRG do citoplasma das células epiteliais.</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>Intensidade da área epitelial de coloração para FLRG.</b>	<b>28</b>
<b>5</b>	<b>Intensidade de coloração para FLRG do núcleo das células epiteliais.</b>	<b>28</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>(-/-)</b>	animal Knock-out
<b>µg</b>	micro-grama
<b>µL</b>	micro-litro
<b>ActRIB</b>	receptor da ativina do tipo I
<b>ActRIIA</b>	receptor da ativina do tipo II
<b>BMP</b>	do inglês – Bone Morphogenetic Protein
<b>Cm</b>	centímetro
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucléico
<b>ERα</b>	receptor alpha do estradiol
<b>FLRG</b>	do inglês – Follistatin Related Gene
<b>FS</b>	folistatina
<b>FS288</b>	folistatina isoforma 288
<b>FS303</b>	folistatina isoforma 303
<b>FS315</b>	folistatina isoforma 315
<b>FSRP</b>	do inglês – Follistatin Related Protein
<b>GH</b>	do inglês – Growth Hormone
<b>HLP</b>	hormônio lactogênico placentário
<b>IGF-I/II</b>	do inglês – Insulin-Like Growth Hormone I/II
<b>IgG</b>	imunoglobulina G
<b>mL</b>	mililitro
<b>mm</b>	milímetro
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>PBS</b>	salina fosfatada tamponada
<b>PRL</b>	prolactina

**RNA** ácido ribonucléico  
**TDLUs** unidades lobulares ductais terminais  
**TEBs** botões terminais  
**TGF- $\beta$**  do inglês – Transforming Growth Factor –  $\beta$ .

# SUMÁRIO

<b>1. Introdução e revisão da literatura</b>	<b>1</b>
1.1 Introdução	1
1.2 Revisão de literatura	2
1.2.1 Morfologia da glândula mamária	2
1.2.2 Embriologia da Glândula mamária	3
1.2.3 Anatomia da mama	4
1.2.4. Fisiologia mamária	5
1.2.5 Patologia mamária	9
1.2.6 Ativinas, inibinas e folistatinas na glândula mamária	12
<b>2. Justificativa e objetivos</b>	<b>15</b>
2.1 Justificativa	15
2.2 Objetivo geral	15
2.3 Objetivos específicos	15
<b>3. Material e métodos</b>	<b>16</b>
3.1 Amostras	16
3.2 Considerações éticas	16
3.3 Métodos	16
3.3.1 Histologia, inclusão e corte	16
3.3.2 Imunohistoquímica	16
3.3.4 Coloração imunohistoquímica da folistatina e FLRG.	18
3.3.5 Leitura das lâminas	18
<b>4. Resultados</b>	<b>20</b>
4.1 Localização e identificação da folistatina na mama normal e patológica	20
4.2 Localização e identificação da FLRG na mama normal e patológica	24
<b>5. Discussão</b>	<b>29</b>

**6. Conclusões**

**32**

**7. Bibliografia.**

## 1. Introdução e revisão de literatura

### 1.1 Introdução

A mama constitui órgão fundamental para nossa identidade, afinal é por sua presença que somos classificados como mamíferos. Sua principal função é ligada à reprodução. É através da mama que o sustento da prole dos mamíferos se dá. Os filhotes de mamíferos dependem do leite como alimento único durante o início da sua vida. Entretanto, nos humanos a mama possui outras funções importantes. Ela tem papel fundamental na sexualidade, sendo a representatividade física da sensualidade e feminilidade.

Seu funcionamento e regulação bem como suas alterações e enfermidades há muito intrigam a humanidade. Esculturas e gravuras em paredes de cavernas, datadas de 2300 a.C., são os primeiros indícios do interesse do homem em entender os complexos processos relacionados à reprodução animal e à produção de leite (SVENNERSTEN-SJAUNJA & OLSSON, 2005). Muito foi elucidado no último século, com a descoberta dos hormônios sexuais (estrógeno e progesterona), prolactina, hormônio lactogênico placentário, ocitocina e eixo hipotálamo-hipófise-ovário.

Além disso, o câncer de mama é hoje doença freqüente entre as mulheres de todo o mundo, em especial as ocidentais. É o segundo câncer mais freqüente no mundo e o mais freqüente entre as mulheres. A cada ano, representa cerca de 22% dos novos casos de câncer entre as mulheres. O número de casos novos de câncer de mama esperados para o Brasil em 2008 é de 49.400, com um risco estimado de 51 para cada 100 mil mulheres (Estimativa 2008/Incidência do Câncer no Brasil – INCA). Apesar dos recentes avanços no conhecimento da tumorigênese, prevenção, rastreamento, diagnóstico e tratamento do Câncer de mama, restam ainda lacunas.

Há muito a estudar e nem todos os aspectos de controle endócrino-metabólico da mama estão claros. Por exemplo, o papel das ativinas e inibinas no controle da reprodução celular mamária e na lactação não está totalmente estabelecido. Também não está claro o papel dessas substâncias na tumorigênese mamária.

Ativinas e inibinas são fatores de crescimento relacionado ao desenvolvimento da glândula mamária. Pertencem à superfamília de fatores de crescimento  $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$  - TGF-  $\beta$ ) e estão envolvidas no controle de funções reprodutivas e não reprodutivas (VALE W, 1988). Suas subunidades são expressas nas células epiteliais ductais e lobulares do tecido mamário de humanos, ratos e camundongos (ROBINSON & HENNINGHAUSEN, 1997; DI LORETO *et al.*, 1999; BUSSMANN *et al.*, 2004).

Essas moléculas agem em suas células-alvo através de complexos de receptores heteroméricos serino-treonina quinase do tipo II, (ActRIIA e ActRIIB) ou através de um receptor do tipo I, (ActRIA e ActRIB). Quando estimulados esses receptores ativam proteínas Smads responsáveis por regular a expressão gênica (VALE W, 1988; BERNARD *et al.*, 2001).

A Ativina A inibe a proliferação *in vitro* de linhagens de células de câncer de mama (Kalkhoven *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1996; Cocolakis *et al.*, 2001). Os mRNAs que codificam as três subunidades da ativina A são expressos em espécimes homogeneizados de Câncer de mama (Reis *et al.*, 2002). A expressão do gene da subunidade  $\beta A$  da ativina está aumentado em carcinomas de mama invasivos e com metástases ósseas quando comparado a mama normal



(Reinholz et al., 2002). A Ativina A dimérica é detectada em homogeneizados de cancer de mama em concentrações duas vezes maiores que em tecidos não neoplásicos (Reis et al., 2002). Mulheres pós-menopausadas com câncer de mama têm níveis séricos elevados de Ativina A que diminuem após mastectomia e quadrantectomia (Reis et al., 2002).

A folistatina (FS) é uma proteína monomérica que possui ação neutralizante sobre as ativinas e, em menor intensidade, sobre as demais proteínas da superfamília TGF- $\beta$  (SIDIS et al., 2002). Adicionalmente, uma isoforma da folistatina, a proteína relacionada à folistatina (FSRP) também conhecida como gene relacionado à folistatina (FLRG), se liga a ativina com a mesma afinidade e irreversibilidade que a FS (SAITO *et al.*, 2005).

A expressão da FS no tecido mamário foi caracterizada somente em uma espécie de roedores, possuindo um importante papel na regulação da morfogênese desta glândula durante a prenhez e a lactação em ratas (BUSSMANN *et al.*, 2004), não havendo descrição de sua expressão em tecido mamário humano. A FSRP não foi caracterizada no tecido mamário de nenhuma espécie.

O papel fisiológico destes fatores de crescimento no desenvolvimento da glândula mamária foi evidenciado pela utilização de fêmeas de camundongos geneticamente modificadas. Quando adultos esses animais apresentaram desenvolvimento ductal e diferenciação do epitélio alveolar limitado, além de não produzirem leite (ROBINSON & HENNINGHAUSEN, 1997).

O presente estudo tem como objetivo avaliar a localização e a intensidade da expressão da folistatina e da proteína relacionada ao gene da folistatina na glândula mamária normal e patológica.

## **1.2 Revisão da literatura**

### **1.2.1 Morfologia da glândula mamária**

O parênquima da glândula mamária é composto por estruturas epiteliais alveolares e ductais, que estão intimamente associadas a tecidos conectivos que compõem o estroma. O estroma da glândula mamária lactante é primariamente composto por entidades celulares e também por entidades não celulares que compõem os tecidos conectivos que circundam as estruturas epiteliais (SILBERSTEIN, 2001). Os componentes celulares do estroma incluem as células mioepiteliais, os fibroblastos, as células endoteliais associadas aos vasos sanguíneos e os leucócitos teciduais, enquanto os componentes não celulares incluem o colágeno e outras proteínas conectivas teciduais (DJONOV *et al.*, 2001). Em contraste com a glândula mamária lactante, existe uma quantidade considerável de tecido adiposo no tecido mamário de fetos em desenvolvimento e no tecido mamário de animais desde o nascimento até estágios avançados de gravidez (SILBERSTEIN, 2001) (Figura 1).

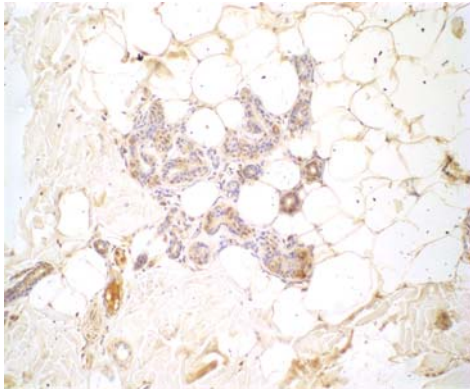


Figura 1: Glândula Mamária Normal corada para folistatina por imunohistoquímica. Aumento de 20x.

Nos humanos, a glândula mamária adulta é composta de 15 a 20 lobos de unidades túbuloalveolares ramificados. Os lobos são separados entre si por ligamentos de tecido fibroconectivo (ligamentos de Cooper). Nos espaços interlobulares, tecido adiposo abundante está presente associado a tecido fibroconectivo. O tecido conectivo intralobular é muito menos denso e contém pouco tecido adiposo. Cada lobo da glândula se abre num ducto lactífero e este por sua vez se abre no mamilo. Cada ducto lactífero possui uma dilatação retroareolar denominada seio lactífero. O epitélio ductal mostra uma transição gradual de duas camadas de células cuboidais no seio lactífero para uma simples camada de células colunares por todo o sistema ductal remanescente. Entre o epitélio e a membrana basal subjacente encontram-se células mioepiteliais de origem epidérmica (Bland & Copeland *The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Disorders*. 3ª Ed., St. Louis, Saunders, 2004).

A morfologia da porção secretora da glândula mamária varia enormemente com a idade, com a gravidez e a lactação. Na glândula inativa o componente glandular é esparso e consiste fundamentalmente de elementos ductais. Nessa situação as unidades secretoras são organizadas como ductulos e não como alvéolos. Durante a lactação os alvéolos começam a se desenvolver e no final da gestação o desenvolvimento alveolar passa a ser proeminente. Próximo ao final da gestação, a proliferação celular dá lugar ao intumescimento por acúmulo dos seus produtos secretores. A mama gestacional é marcada por uma diminuição da quantidade de tecido adiposo e conectivo com aumento da infiltração de células polimorfonucleares (Bland & Copeland *The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Disorders*. 3ª Ed., St. Louis, Saunders, 2004).

### 1.2.2 Embriologia da Glândula Mamária

As mamas são consideradas glândulas sudoríparas muito modificadas e especializadas (Bland & Copeland *The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Disorders*. 3ª Ed., St. Louis, Saunders, 2004). O primeiro estágio de desenvolvimento mamário ocorre com o surgimento de uma estrutura denominada “fita ou listra mamária” e continua com a formação da faixa mamária, da linha mamária, da crista mamária, da elevação mamária e finalmente do botão mamário (*mammary streak*, *mammary line*, *mammary crest*, *mammary hillock* and *mammary bud* respectivamente) (LARSON, 1985).

A mama do recém nascido humano é formada por 10 estágios fetais progressivos que se iniciam na sexta semana de desenvolvimento fetal (Figura 2). As glândulas mamárias se

originam das linhas mamárias, espessamentos ectodérmicos ventrais bilaterais que se estendem das axilas às regiões inguinais. O ectoderma sobre o tórax invagina-se no mesênquima com subsequente proliferação e desmembramentos. Durante a última parte da gestação esse epitélio canaliza-se e diferencia-se em vesículas de fundo cego vistas no recém-nascido. Ao nascimento a mama contém 6 a 19 ductos que se estendem ao mamilo. Esses ductos contêm uma camada de células de citoplasma vacuolado e uma camada de células mioepiteliais terminando em sacos dilatados de fundo cego. Esses são os denominados ductulos, precursores das futuras estruturas lóbulo-alveolares (Bland & Copeland *The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Disorders*. 3ª Ed., St. Louis, Saunders, 2004).

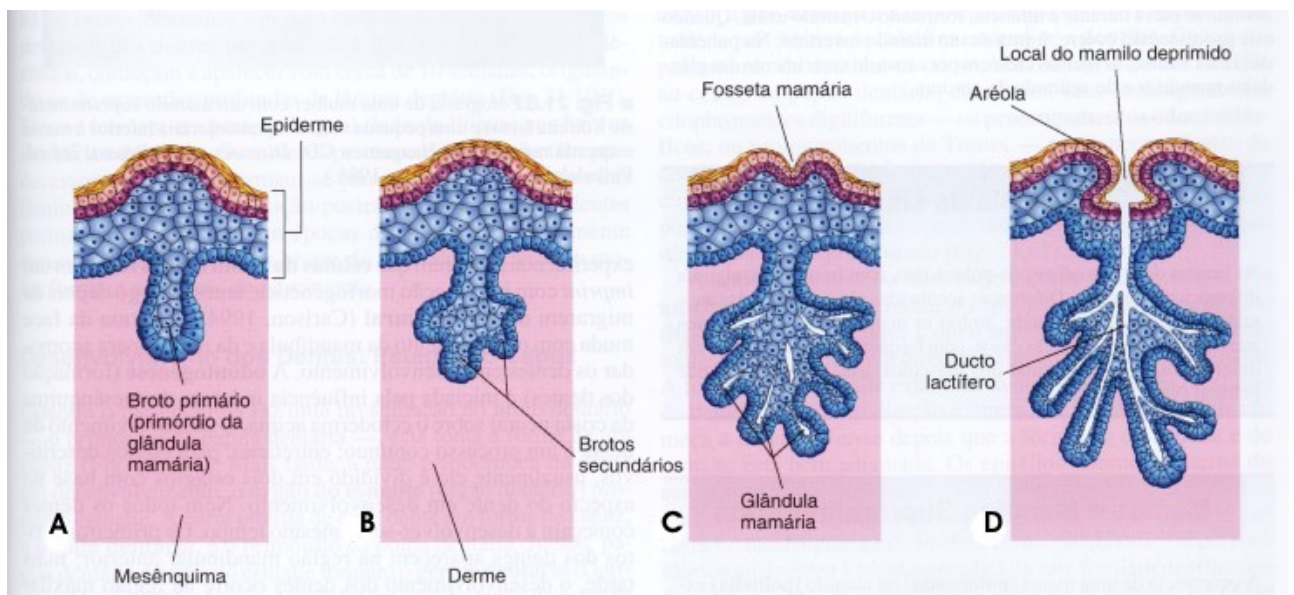


Figura 2: Sequência evolutiva embriológica da glândula mamária. Crista mamária na Figura A e os sucessivos estágios de desenvolvimento mamário.

### 1.2.3 Anatomia

A mama consiste de 15 a 20 lobos de tecido glandular túbulo-alveolar. O tecido conectivo subcutâneo envolve a glândula e estende-se como septo entre os lobos e lóbulos fornecendo suporte para os elementos glandulares sem formar uma cápsula típica. A camada profunda da fascia superficial envolve a mama posteriormente e repousa sobre a fascia peitoral no tórax. A bolsa retromamária é um espaço distinto que pode ser identificado cirurgicamente na parte posterior da mama entre a camada profunda da fascia superficial e a fascia peitoral. A bolsa retromamária contribui para mobilidade da mama na parede torácica. Ligamentos de Cooper são espessamentos fibrosos de tecido conectivo que se estendem da fascia superficial profunda (hipoderme) e se aderem à derme. Essas estruturas suspensórias permitem incrível mobilidade da mama enquanto provém suporte (Bland & Copeland *The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Disorders*. 3ª Ed., St. Louis, Saunders, 2004).

Na maturidade, a mama tem uma forma protuberante cônica única e distinta. A base desse cone é circular medindo de 10 a 12 cm de diâmetro com 5 a 7 cm de espessura. A mama estende-se para a axila como cauda axilar (Cauda de Spence). Existe uma tremenda variação

no tamanho das mamas. Tipicamente, uma mama não lactante pesa entre 150 e 225g embora a mama lactante possa pesar mais de 500g. A mama da nulípara tem tipicamente uma configuração hemisférica enquanto na múltípara a mama é normalmente maior e mais pêndula. Com o avançar da idade a mama normalmente diminui de volume, torna-se mais plana, pêndula e menos firme (Bland & Copeland *The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Disorders*. 3ª Ed., St. Louis, Saunders, 2004).

A mama feminina madura estende-se inferiormente do nível da 2ª a 3ª costelas ao sulco inframamário que se encontra no nível da 6ª ou 7ª costela e lateralmente da borda do esterno à linha axilar anterior ou à linha axilar média. Posteriormente a mama repousa nas fâscias do peitoral maior, denteado anterior, obliquo externo do abdome e bainha do reto abdominal (Figura 3) (Bland & Copeland *The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Disorders*. 3ª Ed., St. Louis, Saunders, 2004).

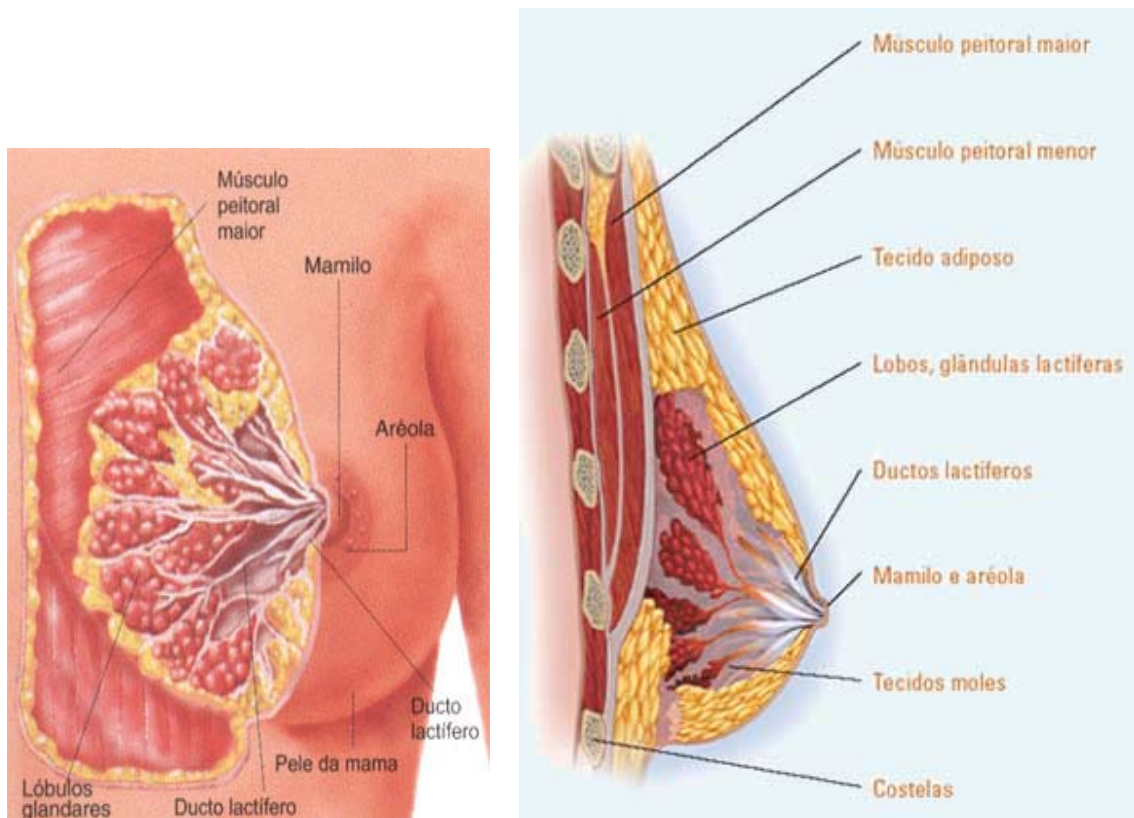


Figura 3: anatomia da glândula mamária.

#### 1.2.4 Fisiologia Mamária

A mama, como todo o aparelho reprodutor, é sensível aos hormônios sexuais. Nos recém nascidos de ambos os sexos a mama frequentemente mostra um aumento transitório podendo produzir uma secreção (leite de bruxa). Essa resposta transitória ocorre em resposta aos hormônios maternos que atravessam a placenta durante o desenvolvimento fetal. Ao

nascimento as mamas são similares em ambos os sexos, apresentando somente os ductos lactíferos principais (Bland & Copeland *The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Disorders*. 3ª Ed., St. Louis, Saunders).

As mamas permanecem subdesenvolvidas até a puberdade quando nas mulheres, por influência do estrógeno e da progesterona produzidos pelos ovários, as mamas aumentam rapidamente. A estimulação hormonal provoca proliferação do tecido glandular, adiposo e conectivo (Bland & Copeland *The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Disorders*. 3ª Ed., St. Louis, Saunders, 2004).

As alterações da puberdade são representadas por alterações do contorno, forma e histologia. A seqüência de alterações do contorno e forma das mamas foi descrita e classificada em 5 estágios por Tanner (Figura 4). Estágio 1 (M1- pré-adolescente): tênue elevação da papila. Estágio 2 (M2): elevação da mama e da papila bem como aumento da aréola. Estágio 3 (M3): Aumento maior ainda da mama. Estágio 4 (M4): a papila e a aréola formam um monte secundário além da mama. Estágio 5 (M5): a aréola retrocede e a mama toma seu contorno habitual da fase adulta (Bland & Copeland *The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Disorders*. 3ª Ed., St. Louis, Saunders, 2004).

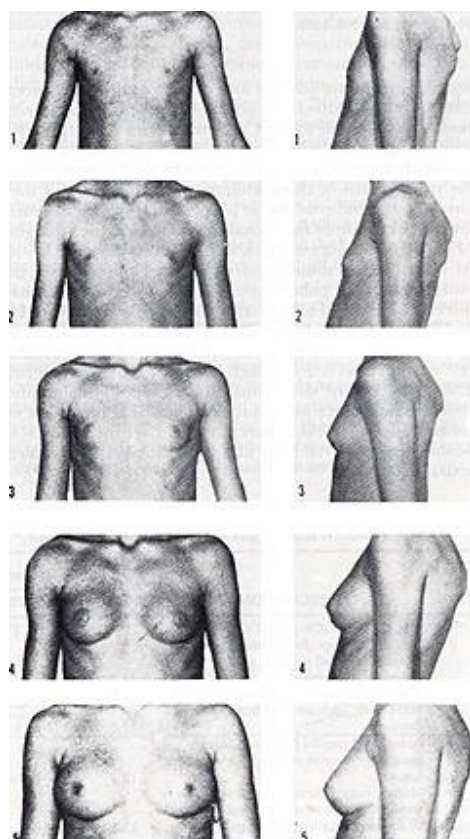


Figura 4: estágios evolutivos da mama na puberdade segundo Tanner.

O sistema ductal imaturo, antes da puberdade, segue uma seqüência progressiva de maturidade lóbulo-alveolar durante a puberdade. Inicia-se pela fase de crescimento ductal: os ductos se alongam, o epitélio se espessa e o conectivo periductal aumenta. Em seguida na fase lóbulo-alveolar os ductos dividem-se e formam-se alvéolos rudimentares. Esses alvéolos



terminam em estruturas chamadas de unidades túbulo-ductais terminais. No início da puberdade, a unidade túbulo-ductal terminal é chamada de lóbulo virginal ou lóbulo tipo 1. O lóbulo tipo 1 é o lóbulo predominantemente encontrado na puberdade. Ainda pela influência hormonal, alguns dos lóbulos tipo 1 vão se diferenciar em lóbulos do tipo 2. Nos lóbulos tipo 2 as proeminências alveolares tornam-se menores e mais numerosas. Nessa fase essas proeminências são denominadas ductulos ou alveoli. No entanto, a glândula permanece incompletamente desenvolvida até a gestação (Bland & Copeland *The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Disorders*. 3ª Ed., St. Louis, Saunders, 2004).

A imaturidade do eixo hipotálamo-hipófise no início da puberdade resulta em um período de 1 a 2 anos de ciclos anovulatórios. São 2 anos em que a mama é submetida à exposição estrogênica sem oposição. Essa exposição estrogênica é responsável pela fase de crescimento ductal. O estrogênio estimula a proliferação ductal, a deposição adiposa e contribui para as fases subsequentes. No entanto, o estrogênio é incapaz de agir sozinho. Uma combinação mínima de estrogênios, hormônio do crescimento e corticóides são necessários para induzir a proliferação ductal. A progesterona não parece ser essencial para a fase precoce de proliferação ductal. Com a presença de ciclos ovulatórios a exposição à progesterona induz a próxima fase, o crescimento túbulo-alveolar. No entanto, novamente, a progesterona somente não é capaz de induzir a maturidade da glândula. Prolactina, hormônio de crescimento, estrogênio e glicocorticóides são necessários para o desenvolvimento lóbulo-alveolar pleno. A prolactina é também essencial ao desenvolvimento lóbulo-alveolar. A prolactina age indiretamente facilitando as ações da progesterona na mama (Bland & Copeland *The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Disorders*. 3ª Ed., St. Louis, Saunders, 2004).

Durante o ciclo menstrual, a mama, como todo o aparelho reprodutor feminino, é submetida a uma série de alterações cíclicas. Na fase folicular precoce, do primeiro ao sétimo dia do ciclo, os alveoli são compactos com lumens pouco definidos e se assentam sobre estroma denso. Nesse momento, observa-se somente um tipo de célula epitelial. Na fase folicular (8 -14 dias do ciclo), observa-se estratificação progressiva do epitélio em três tipos celulares: luminal, mioepitelial e intermediária. Fase lútea (15 – 29): aumento global no tamanho dos lóbulos, resultante da expansão luminal dos alveoli, aumento do número de alveoli, ingurgitamento das células mioepiteliais consequente ao ingurgitamento com glicogênio e diminuição do estroma. O tamanho máximo dos lóbulos e o maior número de alvéolos é atingido do 21º ao 27º dia. Nessa fase ocorre síntese ativa de proteínas e secreção apócrina pelas células epiteliais luminárias. O máximo de atividade mitótica ocorre entre o 22º e o 24º dia logo após o pico de progesterona e o segundo pico de estrogênio. A fase menstrual ocorre do 28º ao 32º dia, após a retirada do estrogênio e progesterona. Nessa última, diminui a secreção e os lóbulos diminuem em tamanho bem como os alvéolos em número. Cada ciclo menstrual estimula nova proliferação que ao final do ciclo nunca retorna ao seu nível basal. Essa proliferação positiva continua até meados da quarta década quando atinge uma estabilidade e então regride após a menopausa (Bland & Copeland *The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Disorders*. 3ª Ed., St. Louis, Saunders, 2004).

Na gestação ocorrem mais duas fases de desenvolvimento mamário. Precocemente na gestação ocorre a primeira fase: proliferação dos ductos distais a fim de criar mais lóbulos e alveoli. Essa proliferação induz a formação de lóbulos mais diferenciados: lóbulos tipo 3 e tipo 4. A partir da metade da gravidez inicia-se a diferenciação das estruturas lóbulo-

alveolares em unidades secretoras. Os alveoli diferenciam-se em ácinos. No último trimestre, as células epiteliais se enchem com gotículas de gordura. Os ácinos então se distendem com colostro (secreção eosinofílica e proteínica) e o tecido adiposo e conectivo está difusamente substituído por proliferação glandular. O aumento da mama nesse período é conseqüente à distensão dos ácinos e ao aumento da vascularização (Bland & Copeland *The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Disorders*. 3ª Ed., St. Louis, Saunders, 2004).

Na gestação, estrogênio, progesterona e prolactina agem em conjunto para preparar a mama para lactação. A prolactina continua tendo papel fundamental na diferenciação lobuloalveolar. A secreção de prolactina começa a aumentar a partir da 8ª semana e continua subindo até o pós-parto. Embora tenha menor bioatividade que a prolactina, o hormônio lactogênico placentário está presente no final da gestação em uma concentração 30 vezes maior que a prolactina. Isso sugere que o hormônio lactogênico placentário contribui para os efeitos da prolactina no desenvolvimento gestacional da mama (Bland & Copeland *The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Disorders*. 3ª Ed., St. Louis, Saunders, 2004).

O estrogênio aumenta na gestação e acredita-se ter um efeito direto e indireto na modulação da secreção de prolactina. O estrogênio induz a diferenciação dos lactotrofos da hipófise anterior, estimula a expressão gênica da prolactina e suprime a secreção do fator inibidor da prolactina (dopamina). Durante a gestação a lactogênese é inibida pelos esteróides sexuais, principalmente a progesterona (Bland & Copeland *The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Disorders*. 3ª Ed., St. Louis, Saunders, 2004).

A habilidade de sintetizar e secretar leite é denominada Lactogênese. A lactogênese é dividida em 2 fases: 1 e 2. A lactogênese 1 começa por volta da 15ª a 16ª semana e consiste na síntese aumentada de proteínas. Os alveoli distendem-se com colostro. A lactogênese 2 é a secreção significativa de leite após o parto. Inicia-se com o colostro (combinação de elementos nutricionais e imunidade passiva), passa por um leite transicional e acaba com um leite maduro composto de gordura e proteína numa solução de lactose. A gordura, a lactose e a proteína são secretadas de uma forma apócrina. A lactose e a proteína também são secretadas de uma forma merócrina (Bland & Copeland *The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Disorders*. 3ª Ed., St. Louis, Saunders, 2004).

Existem duas fases de involução pós lactacional. A primeira é reversível e está associada ao acúmulo de leite. A segunda fase é marcada por remodelamento e perda irreversível da diferenciação da glândula. Os lóbulos diminuem de tamanho com diminuição dos números de alveoli por lóbulo. Os ductos não são envolvidos em oposição à menopausa quando ambos os ductos e lóbulos reduzem em número (Bland & Copeland *The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Disorders*. 3ª Ed., St. Louis, Saunders, 2004).

A prolactina é o principal hormônio da manutenção da lactação e da síntese protéica do leite. Não ocorre secreção de caseína (principal proteína do leite) na ausência de prolactina. A ocitocina é responsável pela descida do leite. A ocitocina é secretada pela hipófise posterior a partir dos estímulos sensoriais da sucção do mamilo. A ocitocina estimula a contração das células mioepiteliais em torno dos ácinos e pequenos ductos resultando na liberação do leite (Bland & Copeland *The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Disorders*. 3ª Ed., St. Louis, Saunders, 2004).

Após a menopausa ocorre apoptose do epitélio glandular, regressão do estroma interlobular e substituição adiposa. O tecido intralobular é substituído por colágeno. A menopausa resulta na diminuição do número de ductos e lóbulos (Bland & Copeland *The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Disorders*. 3ª Ed., St. Louis, Saunders, 2004).

### 1.2.5 Patologia mamária.

Existe uma série de entidades histopatológicas que acometem a mama. Entretanto, cabe uma breve revisão das patologias abordadas no estudo.

Hiperplasia Ductal Florida sem Atipias: células proliferam além de três a quatro camadas e tendem a distender os espaços ou ductos envolvidos e cruzar estes espaços, formando pontes ou preenchendo-os parcial ou totalmente. Fendas ou espaços periféricos irregulares, de diferentes tamanhos e formatos, se formam devido à proliferação celular. Padrões arquiteturais e celulares variados caracterizam essas lesões. Os núcleos têm padrões variados, podendo ser ovais, arredondados ou alongados. A cromatina é fina e irregularmente distribuída. Mitoses são vistas ocasionalmente. Essas lesões possuem um risco subsequente para carcinoma invasor de 1,5 a 2 vezes (Lucena, Silva Júnior, *Barra Propedêutica em Mastologia*. 1ª Ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2005).

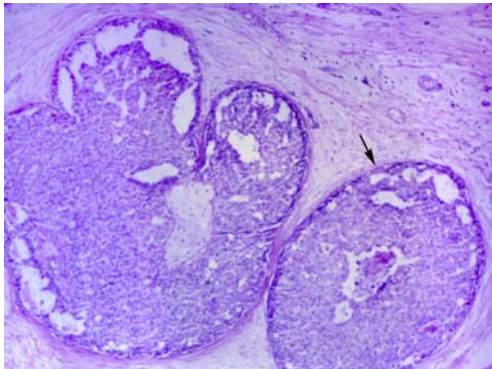


Figura 5: hiperplasia ductal florida.

Fibroadenoma: proliferação benigna de elementos estromais e epiteliais predominando tipicamente os elementos estromais. É o tumor benigno da mama mais freqüente. Mais comum em mulheres antes dos trinta anos e nulíparas. Pode ser único, múltiplo, uni ou bilateral e variar de tamanho (1 a 10 cm). Os elementos epiteliais são derivados dos lóbulos e o componente conjuntivo contém pequeno número de fibroblastos. Clinicamente manifesta-se como nódulo móvel, fibroelástico, bem delimitado e de contornos regulares. É encapsulado com forma arredondada ou ovalada, de superfície externa lobulada e consistência firme. Ao corte apresenta cor branca ou rósea (Bogliolo *Patologia*. 5ª Ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1994).





Figura 6: fibroadenoma, peça cirúrgica.

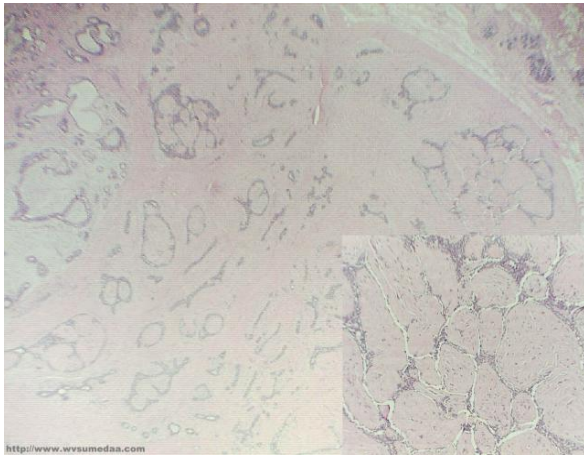


Figura 7: corte histológico de fibroadenoma,

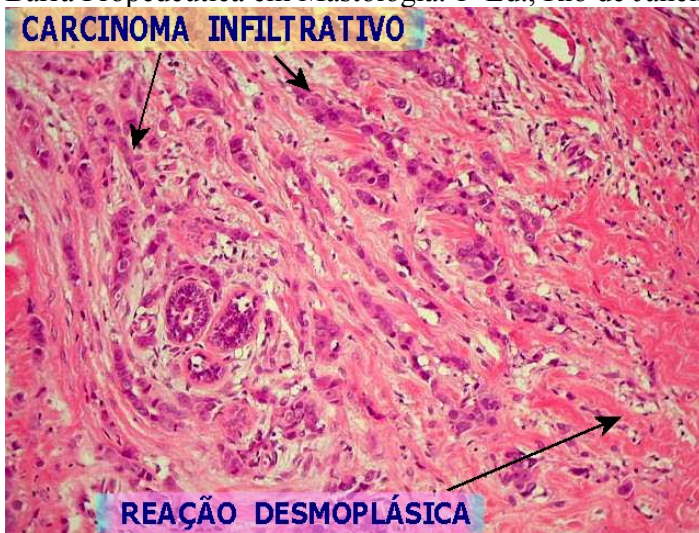
maior e menor aumento.

Carcinoma ductal in situ ou carcinoma intraductal: proliferação epitelial com crescimento limitado pela membrana basal do epitélio ductal ou lobular, ou seja, sem evidência de invasão do estroma. No entanto, pode evoluir para carcinoma invasor tendo como local de origem a unidade ductulo-lobular terminal. O termo ductal refere-se a padrões específicos de proliferação celular anormal associado a um proeminente envolvimento de ductos verdadeiros e um alto risco de recorrência local, sem tratamento adequado. O carcinoma ductal in situ compreende um grupo heterogêneo de proliferações neoplásicas não invasoras, com diferentes morfologias e risco subsequente de recorrência e transformação invasiva. Podem ser classificados morfologicamente nos seguintes tipos: comedo, cribriforme, papilar, sólido, micropapilar, apócrino, hipersecretor, endócrino e misto. Podem também ser graduados histologicamente em: alto grau, não alto grau com necrose e não alto grau sem necrose. Esse é o chamado sistema de Van Nuys ((Lucena, Silva Júnior, Barra Propedêutica em Mastologia. 1ª Ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2005).



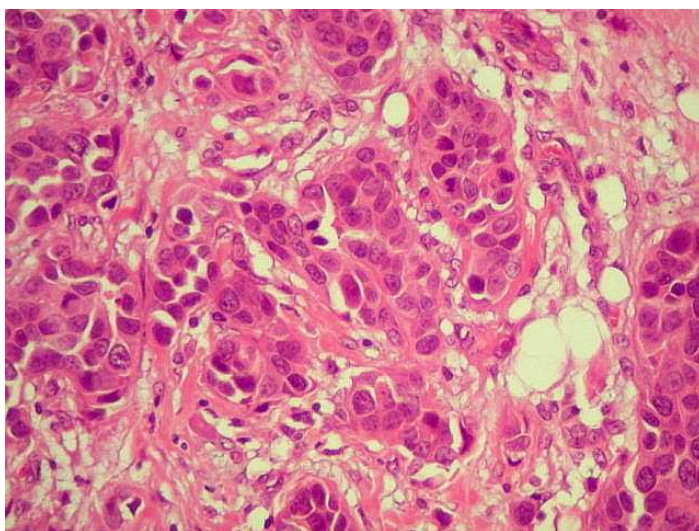
Figura 8: Carcinoma Ductal in Situ.

Carcinoma Ductal invasor: neoplasia maligna caracterizada pela proliferação de células epiteliais atípicas, que após romperem o epitélio da unidade ductulo-lobular, invadem o estroma fibroso ou fibroadiposo da mama e, conseqüentemente, possuem a capacidade de metastatizar. Pode ser classificado morfológicamente em vários tipos sendo o mais freqüente o carcinoma ductal invasor sem outras especificações. O carcinoma ductal invasor pode ser também classificado de acordo com o grau histológico. O sistema de classificação mais usado nesse sentido é o sistema de Bloom and Richardson. Também conhecido como graduação histológica combinada, esse sistema é composto de grau de formação glandular, pleomorfismo nuclear, e atividade mitótica. Cada um desses parâmetros recebe uma pontuação baseada em critérios específicos. Conforme o somatório final dos pontos obtidos nos três parâmetros o tumor pode ser classificado em grau I (baixo), grau II (intermediário) e grau III (alto) (Lucena, Silva Júnior, Barra Propedêutica em Mastologia. 1ª Ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2005).



menor aumento.

Figura 9: Carcinoma Ductal Invasor em



em maior aumento.

Figura 10: Carcinoma Ductal Invasor

### 1.2.6 Ativinas, inibinas e folistatinas.

Estruturalmente relacionadas à superfamília de fatores de crescimento TGF- $\beta$ , as ativinas e inibinas são dímeros protéicos que controlam diversos processos celulares como respostas imunes, funções endócrinas, diferenciação, proliferação e morte celular (HARRINSON *et al.*, 2005). A atividade desregulada desses fatores está frequentemente associada a estados patológicos decorrente da diferenciação celular e de processos metabólicos desordenados (MASSAGUE *et al.*, 2000).

As ativinas são secretadas como homo ou heterodímeros de subunidades  $\beta$ . Embora quatro diferentes genes transcrevam as subunidades  $\beta$  em humanos ( $\beta A$ ,  $\beta B$ ,  $\beta C$  e  $\beta E$ ), somente dímeros de  $\beta A$  e  $\beta A$  (ativina A),  $\beta B$  e  $\beta B$  (ativina B) e  $\beta A$  e  $\beta B$  (ativina AB) se mostram biologicamente ativos. As subunidades  $\beta A$  e  $\beta B$  da ativina podem se ligar à subunidade  $\alpha$  da inibina e formar heterodímeros, como a inibina A ( $\beta A$  e  $\alpha$ ) ou a inibina B ( $\beta B$  e  $\alpha$ ) (HARRINSON *et al.*, 2005).

Gaddy Kurten e colaboradores, em 1995 demonstraram que as ativinas sinalizam através de interações com dois receptores transmembrânicos serino/treonina quinase, os receptores do tipo I e do tipo II. A ativina se liga inicialmente ao seu receptor do tipo II, ActRIIA e ActRIIB. Tal ligação recruta, fosforila e conseqüentemente ativa o receptor do tipo I, ActRIA e ActRIB. Durante a ativação, o receptor do tipo I se liga a um subconjunto de proteínas, as Smads, reguladas por receptor (R-Smads), responsáveis por regular a expressão gênica (DERYNCK *et al.*, 1998). As inibinas se ligam aos receptores do tipo II, ActRIIA e ActRIIB, antagonizando competitivamente a sinalização da ativina, inibindo o recrutamento do receptor do tipo I. Entretanto, tal antagonismo requer a presença de um co-receptor, o betaglicano, que se liga à inibina com alta afinidade (MATHEWS & VALE, 1991; LEWIS *et al.*, 2000). Os receptores ActRIIB são passíveis de serem ligados por outros membros da superfamília TGF- $\beta$ . Dentre eles podemos citar as TGF- $\beta$ s e as BMPs (Bone Morphogenetic Proteins). O complexo ligante-ActRIIB se liga ao receptor ActRIA. Esses dois últimos receptores apresentam, portanto, um padrão promíscuo de ligação com outros membros da superfamília TGF- $\beta$ , enquanto os receptores ActRIIA e ActRIB são ligados principalmente pelas ativinas e pelo complexo ativina-ActRIIA, respectivamente (HARRINSON *et al.*, 2005; LIN *et al.*, 2006; KOMATSU *et al.*, 2007).

A folistatina é uma proteína monomérica que possui ação neutralizante sobre as ativinas e em menor intensidade sobre as demais proteínas da superfamília TGF- $\beta$ , como a miostatina. Ela se liga a ativina, com alta afinidade, formando complexos inativos (HILL *et al.*, 2002; SIDIS *et al.*, 2002). Em tecidos e fluídos humanos, a folistatina está presente em pelo menos três isoformas: a) a FS315, que é caracterizada como a isoforma que possui o maior comprimento; b) a FS303 que presumivelmente é derivada de processos proteolíticos e c) a FS288 que é produto de *splicing* alternativo. Curiosamente, suas habilidades de se ligarem a proteoglicanos da camada superficial celular são diferentes, sugerindo diferentes propriedades bioquímicas e, conseqüentemente, distintas funções entre as isoformas. (ALAN *et al.*, 2004).

O gene relacionado à folistatina (FLRG), também conhecida como proteína relacionada a folistatina (FSRP), é um membro da família das folistatinas, recentemente caracterizada, que se liga a ativina com alta afinidade, neutralizando seus efeitos (HARRINSON *et al.*, 2005). Curiosamente, estudos de regulação da expressão gênica demonstraram que a FSRP não se

liga aos proteoglicanos da camada superficial celular e possui um padrão de expressão nuclear, ao contrário da FS que se liga aos proteoglicanos e possui um padrão de expressão citoplasmático (SAITO *et al.*, 2005). Adicionalmente, a FSRP é altamente expressa na placenta, no testículo, na pele e no tecido cardíaco, enquanto a expressão da FS é consideravelmente maior no ovário e na pituitária (WELT *et al.*, 2002.) Esses dados sugerem que ambas as folistatinas não sejam homólogos funcionais, possuindo distintas funções entre os tecidos.

### 1.2.7 Ativinas, inibinas e folistatina na glândula mamária.

Apesar do grande número de estudos que investigam a biologia das ativinas, análises que visam a caracterizar a sua expressão e elucidar sua função na glândula mamária *in vivo* são muito poucas. Relatos demonstraram que as células epiteliais lobulares e ductais humanas foram imunorreativas a anticorpos anti- $\alpha$ ,  $\beta$ A e  $\beta$ B, demonstrando sua expressão na mama de mulheres (DI LORETO *et al.*, 1999). Recentemente, foi descrita a presença das subunidades  $\beta$ -ativina/inibina, dos seus receptores e das SMADS na glândula mamária de camundongos e de ratos (JERUSS *et al.*, 2003; BUSSMANN *et al.*, 2004).

O papel fisiológico da ativina B no desenvolvimento da glândula mamária foi evidenciado pela utilização de camundongos fêmea geneticamente modificadas. Quando adultas, elas apresentaram desenvolvimento ductal e diferenciação do epitélio alveolar limitado e não produziram leite (ROBINSON & HENNINGHAUSEN, 1997). Com relação ao papel da ativina A, estudos utilizando camundongos *knock-out* para a subunidade  $\beta$ A não puderam relacionar essa proteína com o desenvolvimento da glândula mamária, pois os animais (-/-) nasciam com malformações no palato, levando-os à morte antes que o tecido mamário pudesse se desenvolver (MATZUK *et al.*, 1995).

Inúmeras evidências indicam que há síntese de RNA mensageiro, subunidades protéicas e dímeros de ativina e inibina em carcinoma mamário humano (REIS *et al.*, 2004), além de o nível de expressão do RNA mensageiro da cadeia  $\beta$ A ser maior em carcinoma mamário que em tecido mamário hígido (REIS *et al.*, 2002).

Similarmente aos fatores TGF- $\beta$ , a ativina possui um efeito antiproliferativo sobre as células epiteliais mamárias. Tal efeito pôde ser observado ao se adicionar ativinas A e B a culturas de células mamárias cancerígenas T47D. Esse efeito foi causado pela fosforilação da SMAD 3, que reorganizou o ciclo celular de forma a mantê-lo entre as fases G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>, impedindo, conseqüentemente, que a célula entrasse em mitose e, portanto, não permitindo a proliferação celular (LIU *et al.*, 1996; BURDETTE *et al.*, 2005). Adicionalmente, estudos com ácinos mamários em diferentes estágios de desenvolvimento, isolados em cultura e tratados com ativina A e B, apresentaram uma menor taxa de proliferação celular quando comparados aos seus controles (BUSSMANN *et al.*, 2004).

Recentemente, a regulação do estradiol sobre a expressão da ativina B pelas células epiteliais mamárias foi descrita utilizando culturas celulares T47D. Foi relatado que o tratamento dessas células com estradiol diminuiu as concentrações de mRNA da cadeia  $\beta$ B. Demonstrou-se também que o complexo estradiol-ER $\alpha$  se liga a SMAD 3 fosforilada, impedindo que a mesma se dirija ao núcleo e regule a transcrição gênica. Por outro lado, a ativina reprimiu um fator de transcrição estradiol dependente, o *trefoil factor 1*, bloqueando dessa maneira um clássico efeito do estradiol (BURDETTE & WOODRUFF, 2007). Estes

dados sugerem uma importante interação entre esses dois hormônios sobre células epiteliais mamárias.

Em relação à folistatina, ela foi caracterizada somente na glândula mamária de ratas. Análises quantitativas de mRNA extraído de ácinos isolados demonstraram um alto nível de expressão de folistatina nesta parte da glândula (BUSSMANN *et al.*, 2004). A expressão da FSRP não foi descrita no tecido mamário de nenhuma espécie até a presente data.

Como não existem trabalhos demonstrando a presença da Folistatina e da FLRG (Gene Relacionado à Folistatina) na glândula mamária, o presente trabalho procura determinar a presença dessas proteínas na mama humana e sua relação em distintas condições patológicas.

## **2. Justificativa e objetivos**

### **2.1 Justificativa**

Dado o papel importante que as ativinas exercem sobre o desenvolvimento mamário e conseqüentemente sobre a lactação, e partindo da hipótese da ativina A presente na mama poder atuar como limitador endógeno do crescimento tumoral faz-se necessário estudar a expressão dos seus antagonistas naturais: Folistatina e FLRG. Embora não haja relatos publicados sobre a expressão de FS e FLRG no tecido mamário humano, sua importância para a regulação da atividade das ativinas já foi demonstrada em outros tecidos (SIDIS ET al, 2002). Sua presença na glândula mamária somente foi demonstrada em ácinos isolados de ratas (BUSSMANN et al., 2004), portanto decidimos avaliar sua expressão (folistatina e FLRG) no tecido mamário humano normal e patológico.

### **2.2 Objetivo geral**

Verificar a expressão das cadeias de folistatina e FLRG na glândula mamária humana normal e patológica.

### **2.3 Objetivos específicos**

Caracterizar, através de imunistoquímica, a distribuição das cadeias de folistatina e FLRG na glândula mamária humana normal e patológica.



### 3. Material e métodos

#### 3.1 Amostra

Foram utilizados fragmentos de tecido mamário de pacientes submetidas à mamoplastia redutora, tumorectomia, quadrantectomia e mastectomia. Os tecidos analisados foram obtidos no arquivo do Laboratório de Patologia Comparada do Departamento de Patologia Geral do ICB-UFMG. A amostra ficou assim constituída: 8 casos de controle (mama normal) obtidos a partir de mamoplastia redutora, 17 casos de fibroadenomas, 10 casos de carcinoma ductal in situ (carcinoma intraductal), 15 casos de carcinomas ductais invasores, 16 casos de hiperplasia ductal florida sem atipias para folistatina e 7 casos de controle (mama normal) obtidos a partir de mamoplastia redutora, 17 casos de fibroadenomas, 10 casos de carcinoma ductal in situ (carcinoma intraductal), 15 casos de carcinomas ductais invasores, 17 casos de hiperplasia ductal florida sem atipias para FLRG.

#### 3.2 Considerações éticas.

Projeto de pesquisada aprovado pelo departamento de Ginecologia e pela Comissão de ética em Pesquisa da UFMG.

##### 3.3 Métodos

##### 3.3.1 Histologia e imunoistoquímica

##### 3.3.2 Inclusão e corte

As amostras de tecido mamário incluídas em parafina foram recuperadas do arquivo do laboratório de Patologia Comparada do Departamento de Patologia Geral do ICB-UFMG e seccionadas em cortes de 4µm de espessura. Os cortes foram desparafinizados em xilol e reidratados.

##### 3.3.3 Imunoistoquímica

A técnica de imunoistoquímica utilizada foi a da avidina-biotina-peroxidase, através do *kit Vectastain (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA)*. A avidina é uma glicoproteína de alto peso molecular que apresenta grande afinidade com a biotina (vitamina que pode ser conjugada a enzimas, anticorpos e substâncias fluorescentes). Após a incubação do tecido com o anticorpo primário (mono ou policlonal) específico para a proteína ou peptídeo em estudo, aplica-se o anticorpo secundário (que se liga ao anticorpo primário) previamente ligado a uma molécula de biotina. A avidina amplifica o efeito da biotina, pois cada molécula que se acopla à biotina do anticorpo secundário liga-se simultaneamente a três outras moléculas de biotina conjugadas a peroxidase. Esta age sobre um corante especial e os sítios antigênicos ficam corados de forma estável, geralmente em tonalidade amarronzada. Adaptações e particularidades do nosso protocolo para cada antígeno estudado são apresentadas na TAB. 1.

As lâminas com os cortes de tecido foram desparanifizadas em xilol (duas incubações de 10 minutos) e reidratadas em concentrações decrescentes de etanol que variaram de 90% a 50% (uma incubação de cinco minutos em cada solução) e,

finalmente, foram imersas em água destilada por 5 minutos. A segunda etapa foi constituída pelo bloqueio da peroxidase endógena, com imersão das lâminas em uma solução preparada a partir de 87 ml de metanol e 3 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% por 30 minutos. A seguir, as lâminas foram lavadas por imersão em uma solução de PBS. Seguiu-se uma incubação dos cortes durante 60 minutos com soro normal de cavalo ou de coelho, dependendo do anticorpo primário utilizado, com o objetivo de ocupar os sítios antigênicos inespecíficos e favorecer a ligação do anticorpo secundário biotilado ao seu antígeno alvo, o anticorpo primário.

A quarta etapa foi a incubação dos cortes com o anticorpo primário específico para o antígeno pesquisado, no caso a folistatina e a FLRG. O anticorpo foi diluído em solução de PBS com albumina a 0,1% numa proporção ajustada para o protocolo da folistatina e da FLRG. Nessa etapa, os cortes foram cobertos com aproximadamente 50µl da solução do anticorpo. Para evitar a evaporação ou ressecamento dos cortes, essa incubação foi feita com as lâminas dispostas em uma câmara úmida e a duração do período de incubação para todos os anticorpos utilizados foi de 24 horas com temperatura de 4<sup>o</sup>C. A câmara utilizada consistiu de uma caixa plástica retangular rasa contendo água destilada no seu fundo. Terminado o tempo de incubação com o anticorpo primário, removia-se o excedente mergulhando as lâminas em PBS por 10 minutos e passava-se à quinta etapa, incubação com o anticorpo secundário.

Foram empregados os anticorpos biotilados antiimunoglobulina G (antiIgG) de coelho feito em cavalo (Vector Laboratories, Burlingame CA, EUA) para os anticorpos primários anti-FS e anti FLRG de cabra feito em coelho (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz CA, EUA). Diluiu-se o anticorpo secundário em solução de PBS na proporção de 1:200 e aplicaram-se 50µl da solução sobre os cortes, que permaneceram em temperatura ambiente por 30 minutos. Terminada a incubação, foi removido o excedente de anticorpo secundário, após imersão das lâminas durante 10 minutos na solução de PBS, e iniciou-se a sexta etapa, que consistiu em uma incubação dos cortes por 30 minutos com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vectastain). As soluções de avidina (solução A) e biotina + peroxidase (solução B) foram associadas e diluídas em PBS (1:200) cerca de 30 minutos antes da incubação. Após nova incubação de 10 minutos em PBS, os cortes foram finalmente corados por uma solução de cromógeno DAB [3,3'-diaminobenzina] (Sigma Chem. CO, St Louis, MO, USA) preparada minutos antes e mantida ao abrigo da luz. Uma alíquota da solução de estoque da DAB (5mg/ml) era diluída na proporção de 1:4 em PBS e acrescida de 10µl de peróxido de hidrogênio a 30%. Os cortes foram cobertos com 50µl da solução de DAB, em média por três minutos, e imediatamente imersos em água destilada para remover-se o corante excedente.

Concluída a imunocoloração, os cortes foram submetidos a uma contracoloração com hematoxilina e desidratados em concentrações crescentes de etanol, variando de 50% a 90%, sendo, finalmente, imersos em xilol (duas incubações de 10 minutos) e montados com lamínula e entelan.

Controles negativos foram realizados em todos os ensaios, substituindo-se os anticorpos primários anti-FS e anti FLRG por soro de coelho normal. Todos os



anticorpos utilizados no presente experimento foram confeccionados a partir de antígenos humanos.

### 3.3.4 Coloração imunoistoquímica da Folistina e FLRG.

Os anticorpos policlonais, IgG anti-FS e anti-FLRG produzidos em coelhos, foram gentilmente doados pelo Dr. Wylie Vale, do Salk Institute, (La Jolla, CA, USA), na forma de soro integral liofilizado.

TABELA 1

Protocolo utilizado para os diferentes ensaios imunoistoquímicos

<b>Antígeno</b>	<b>Soro normal para bloqueio</b>	<b>Anticorpo Primário</b>	<b>Anticorpo Secundário</b>	<b>Controle Negativo</b>
<b><math>\beta</math>A Ativina</b>	Cavalo 1:30	Policlonal feito em coelho (1:400)	Anti-IgG de coelho feito em cavalo (1:200)	Soro normal de coelho (1:400)
<b><math>\beta</math>B Ativina</b>	Coelho 1:30	Policlonal feito em cabra (1:200)	Anti-IgG de cabra feito em coelho (1:200)	Soro normal de cabra (1:200)
<b>ActRIB</b>	Cavalo 1:30	Policlonal feito em coelho (1:200)	Anti-IgG de coelho feito em cavalo (1:200)	Soro normal de coelho (1:200)
<b>ActRIIA</b>	Cavalo 1:30	Policlonal feito em coelho (1:200)	Anti-IgG de coelho feito em cavalo (1:200)	Soro normal de coelho (1:200)
<b><math>\alpha</math> Inibina</b>	Coelho 1:30	Policlonal feito em cabra (1:200)	Anti-IgG de cabra feito em coelho (1:200)	Soro normal de cabra (1:200)
<b>Folistatina</b>	Cavalo 1:30	Policlonal feito em coelho (1:200)	Anti-IgG de coelho feito em cavalo (1:200)	Soro normal de coelho (1:200)
<b>FLRG</b>	Cavalo 1:30	Policlonal feito em coelho (1:200)	Anti-IgG de coelho feito em cavalo (1:200)	Soro normal de coelho (1:200)

#### 3.2.2.5 Leitura das lâminas

As lâminas foram examinadas com aumento de 20x, 40x e 60x, sempre no mesmo microscópio (Laboratório de Patologia Geral, ICB-UFMG), procurando manter-se a

mesma intensidade de luz. Foram atribuídos valores às intensidades de coloração conforme descrito na tabela 2. Foi então avaliado a intensidade de coloração para folistatina e FLRG no citoplasma e no núcleo das células epiteliais (ductais) e no citoplasma e no núcleo das células estromais. Os controles negativos foram usados para revelar a coloração inespecífica, que foi desconsiderada.

Também foi avaliada a área de coloração do tecido epitelial da lâmina em relação à folistatina e ao FLRG. A escala para avaliação da área está descrita na tabela 3.

Os dados das análises imunoistoquímicas foram submetidos à análise descritiva. A comparação entre os grupos foi feita por análise de variância não paramétrica pelo teste Kruskal-Wallis. As diferenças com valor de  $p < 0,05$  foram consideradas significativas e submetidas ao teste Dunn de comparações múltiplas.

TABELA 2

Escala de distribuição da intensidade de coloração dos tecidos imunocorados.

<b>Intensidade de Coloração</b>	<b>Pontuação</b>
Ausente	0 (0)
Fraca	1 (+)
Moderada	2 (++)
Intensa	3 (+++)

TABELA 3

Escala de distribuição de área de coloração dos tecidos epiteliais imunocorados.

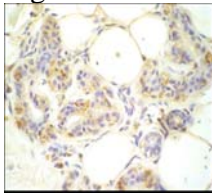
<b>Área de Coloração dos tecidos epiteliais</b>	<b>Pontuação</b>
Ausente	0 (0)
Fraca	1 (até 25%)
Moderada	2 (de 25% a 75%)
Intensa	3 (maior que 75%)

## 4. Resultados

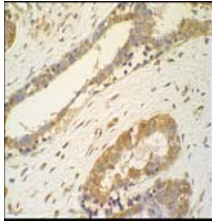
### 4.1 Localização e Identificação da Folistatina na Mama Normal e Patológica.

Foram analisados, para folistatina, 8 casos de amostras teciduais de mamas normais (sem achados patológicos) obtidos a partir de mamoplastias redutoras, 17 casos de fibroadenomas, 16 casos de hiperplasia ductal florida sem atipias, 10 casos de carcinoma ductal in situ e 15 casos de carcinoma ductal invasor. A folistatina foi analisada em relação à intensidade de coloração do citoplasma e do núcleo das células epiteliais e também em relação à intensidade de coloração do citoplasma e núcleo das células estromais, além da área epitelial de sua distribuição (figura 1). Os dados quanto à intensidade e área de coloração para Folistatina foram analisados descritivamente (tabela 1) e então submetidos à análise de variância não paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis (tabela 2). Os grupos foram comparados entre si. As diferenças com valor de  $p < 0,05$  foram consideradas significativas (tabela 2) e submetidas ao teste de Dunn de comparações múltiplas. Foram também identificados os grupos específicos com significância estatística para cada variável (tabela 3). Ocorreu significância estatística na análise da intensidade de coloração do citoplasma das células estromais e na intensidade de coloração do núcleo das células estromais (tabela 3). Especificamente, os citoplasmas e núcleos das células estromais dos fibroadenomas coram-se mais intensamente para folistatina que nos casos de carcinoma ductal invasor (Gráfico 1 e 2).

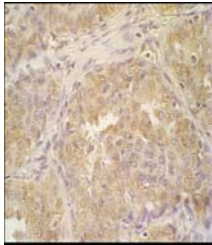
Figura 1: Coloração imunohistoquímica para folistatina.



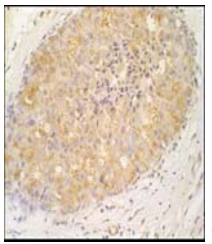
Mama normal ( controle/mamoplastia).



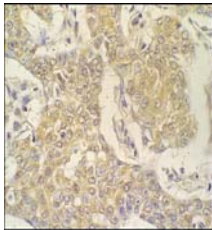
Fibroadenoma.



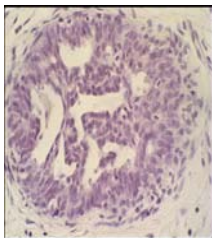
Hiperplasia ductal florida sem atipias.



Carcinoma ductal in situ.



Carcinoma ductal invasor.



Controle negativo (hematoxilina/eosina).

## Resultados

Tabela 1: resultado da coloração dos tecidos imunocorados para Folistatina (medianas).

Folistatina	Citoplasma	Núcleo	Área	Citoplasma	Núcleo
	Epitelial	Epitelial	Epitelial	Estromal	Estroma
	Mediana	Mediana	Mediana	Mediana	Mediana
Controle (mama normal/ mamoplastia redutora).	1	1	2	0	0
Fibroadenomas	2	1	2	1	1
Hiperplasia ductal florida sem atipias	1	1	2,5	0	0
Carcinoma ductal in situ	2	2	3	0	0
Carcinoma ductal invasor	2	1	3	0	0

Tabela 2: resultado do teste de Kruskal-Wallis para folistatina. Em negrito: achados significativos.

Resultado Avaliado	Valor de P
Folistatina Intensidade do citoplasma das Células Epiteliais (ductais).	0,1064
Folistatina Intensidade do núcleo das células Epiteliais (ductais).	0,3485
<b>Folistatina Intensidade do citoplasma das células estromais</b>	<b>0,0007</b>
<b>Folistatina intensidade do núcleo das células estromais.</b>	<b>0,0006</b>
Folistatina Área.	0,2508

Tabela 3: grupos estatisticamente significativos para folistatina.

Grupo 1	Grupo 2	P
Folistatina : Intensidade do citoplasma das células estromais nos Fibroadenomas.	Folistatina: Intensidade do citoplasma das células estromais nos Carcinomas Ductais Invasivos.	<0,05
Folistatina: Intensidade de coloração do núcleo das células estromais nos Fibroadenomas.	Folistatina: Intensidade de coloração do núcleo das células estromais nos Carcinomas Ductais Invasivos.	<0,05

Gráfico 1: coloração citoplasmática das células estromais para folistatina.

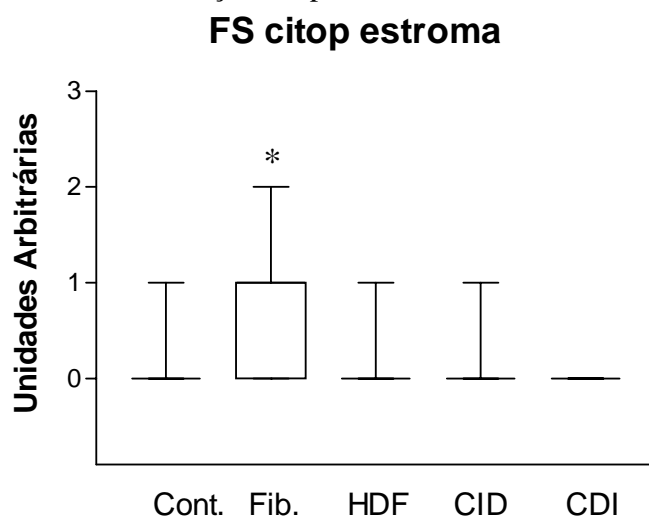
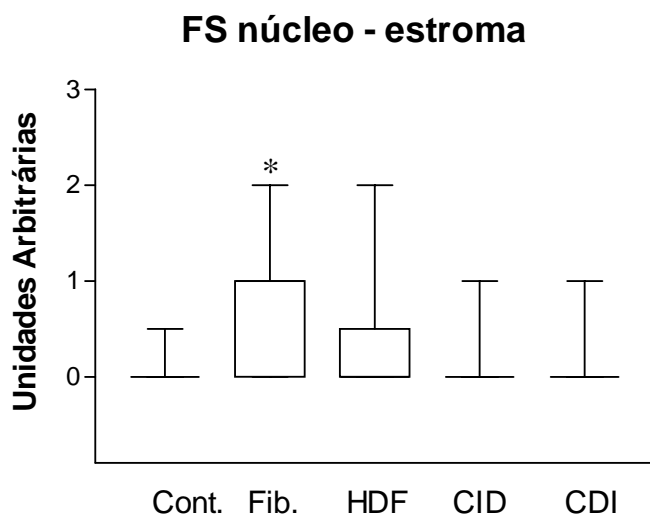


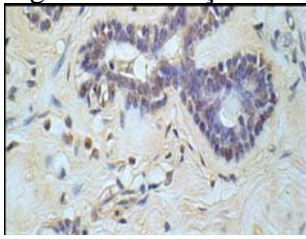
Gráfico 2: coloração nuclear das células estromais para folistatina.



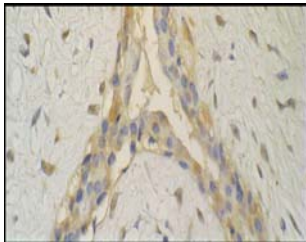
#### 4.2 Localização e Identificação da FLRG na Mama Normal e Patológica

Foram analisados, para FLRG, 7 casos de amostras teciduais de mamas normais (sem achados patológicos) obtidos a partir de mamoplastias redutoras, 17 casos de fibroadenomas, 17 casos de hiperplasia ductal florida sem atipias, 10 casos de carcinoma ductal in situ e 15 casos de carcinoma ductal invasor. A FLRG foi analisada em relação à intensidade de coloração do citoplasma e do núcleo das células epiteliais e também em relação à intensidade de coloração do citoplasma e núcleo das células estromais, além da área epitelial de sua distribuição (figura 2). Os dados quanto à intensidade e área de coloração para FLRG foram analisados descritivamente (tabela 4) e então submetidos à análise de variância não paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis (tabela 5). Os grupos foram comparados entre si. As diferenças com valor de  $p < 0,05$  foram consideradas significativas (tabela 5) e submetidas ao teste de Dunn de comparações múltiplas. Foram também identificados os grupos específicos com significância estatística para cada variável (tabela 6). Ocorreu significância estatística na análise da intensidade de coloração do citoplasma das células epiteliais e na intensidade de coloração do núcleo das células epiteliais além da área epitelial de coloração (tabela 6). Especificamente, os citoplasmas das células epiteliais e a área dos carcinomas ductais invasores coram-se mais intensamente para FLRG que nos casos controle (Gráfico 3 e 4). A intensidade de coloração para FLRG do núcleo das células epiteliais ductais foi estatisticamente significativa no global, porém analisando-se os grupos separadamente aos pares não observamos nenhum grupo especificamente com  $P < 0,05$  (gráfico 5).

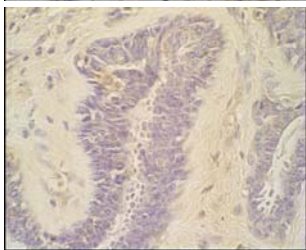
Figura 2: coloração imunohistoquímica para FLRG.



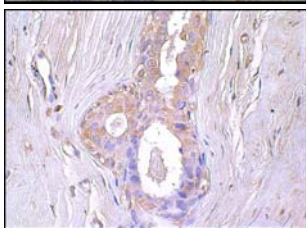
Mama normal (controle/mamoplastia redutora).



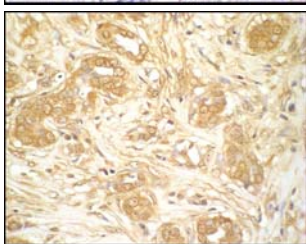
Fibroadenomas.



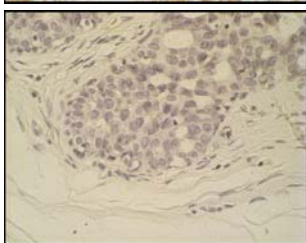
Hiperplasia Ductal florida sem atipias.



Carcinoma ductal in situ.



Carcinoma Ductal Invasor.



Controle negativo (hematoxilina/eosina).



## Resultados

Tabela 4: resultado da coloração dos tecidos imunocorados para FLRG (medianas).

FLRG	Citoplasma	Núcleo	Área	Citoplasma	Núcleo
	Epitelial	Epitelial	Epitelial	Estromal	Estroma
	Mediana	Mediana	Mediana	Mediana	Mediana
Controle (mama normal/ mamoplastia redutora).	1	0	1	0	0
Fibroadenomas	2	1	3	0	0
Hiperplasia ductal florida sem atipias	1	0	3	0	0
Carcinoma ductal in situ	2	1	3	0	0
Carcinoma ductal invasor	2	1	3	0	0

Tabela 5: resultado do teste de Kruskal-Wallis para FLRG. Em negrito: achados significativos.

Resultado avaliado	Valor de P
<b>FLRG Intensidade do citoplasma das Células Epiteliais (ductais)</b>	<b>0,0087</b>
<b>FLRG Intensidade do núcleo das Células Epiteliais (ductais)</b>	<b>0,0428</b>
FLRG Intensidade do citoplasma das Células Epiteliais (ductais)	0,2597
FLRG Intensidade do citoplasma das Células Epiteliais (ductais)	0,3169
<b>FLRG Área.</b>	<b>0,0017</b>

Tabela 6: grupos estatisticamente significativos para FLRG.

FLRG: Intensidade de coloração do citoplasma das células epiteliais nos controles	FLRG: Intensidade de coloração do citoplasma das células epiteliais nos Carcinomas Ductais Invasores.	<0,05
FLRG: Intensidade de coloração em relação à área da lâmina de controles	FLRG: Intensidade de coloração em relação à área da lâmina de Carcinomas Ductais Invasores	<0,05

Gráfico 3: intensidade de coloração para FLRG do citoplasma das células epiteliais.

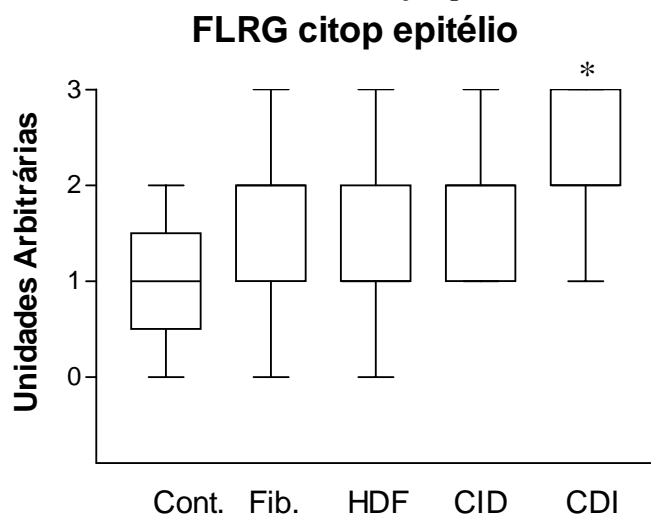


Gráfico 4: intensidade da área epitelial de coloração para FLRG.

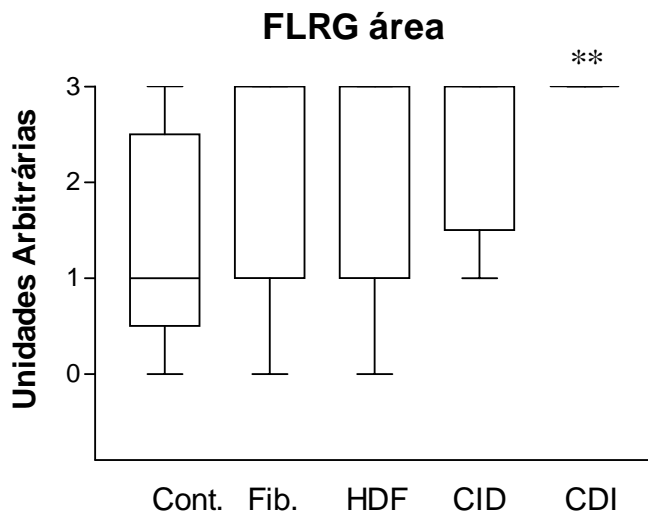
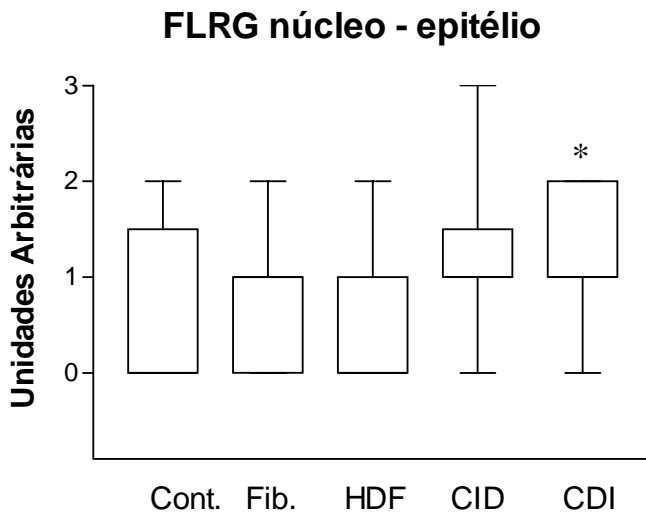


Gráfico 6: intensidade de coloração para FLRG do núcleo das células epiteliais.



## 5. Discussão

A expressão das subunidades e receptores de ativina/inibina e da folistatina foi previamente demonstrada em humanos, ratos e camundongos. Esses fatores de crescimento foram apontados como determinantes para o crescimento ductal e a produção de leite de camundongas (ROBINSON & HENNIGHAUSEN, 1997). Em mulheres, foi identificada uma perda da expressão das ativinas quando o grau de malignidade das neoplasias mamárias aumentava indicando que esses fatores de crescimento agem como supressores do crescimento tumoral (JERUSS *et al.*, 2003b). Estudos também demonstraram que as ativinas podem ser utilizadas como marcadores de tumores mamários em mulheres (REIS *et al.*, 2004). A folistatina foi unicamente caracterizada na glândula mamária de ratas, onde foi apontada como a única contra-reguladora das ações da ativina na glândula mamária desta espécie até o presente momento (BUSSMANN *et al.*, 2004).

Conforme a leitura das lâminas coradas por imunohistoquímica, sugere-se que tanto a folistatina quanto a FLRG estão presentes no tecido mamário humano normal e patológico. Esse fato poderia ser confirmado por análises de RNA e DNA.

Embora o local de síntese (células ductais ou células estromais) não possa ser definido com certeza pela imunohistoquímica, a fraca coloração das células estromais, tanto citoplasmática quanto nuclear, sugere que a Folistatina e a FLRG sejam tipicamente produtos das células ductais. A coloração mais intensa das células ductais, tanto citoplasmática quanto nuclear, sugere que elas sejam a principal fonte e local de ação da Folistatina e da FLRG.

As ativinas e inibinas já haviam sido identificadas na mama normal e no epitélio ductal. Glândulas mamárias normais expressam subunidades  $\alpha$ ,  $\beta A$ , e  $\beta B$  de inibina/ativina sem alterações por todo o ciclo menstrual, estando todas as três subunidades localizadas nas células epiteliais ductais e lobulares (Di Loreto *et al.*, 1999). As ativina A, inibina A, e inibina B em suas formas diméricas, foram detectadas na secreção de cistos nos casos de doença fibrocística (Di Loreto *et al.*, 1999). O mRNA de todas as subunidades de inibina/ativina foram identificados nos tecidos mamários e em células mamárias cultivadas. Assim, esperava-se também que a contra parte inibidora das ativinas, no caso a Folistatina e a FLRG, estivesse presente nas células epiteliais ductais e nelas exercessem sua função, como foi o caso.

O sistema inibina/ativina parece estar presente em algumas condições patológicas na mama. O mRNA codificando todas as três subunidades do sistema foi identificado em homogenados de Câncer de Mama (Reis *et al.*, 2002), a expressão gênica da subunidade  $\beta A$  está aumentada em tumores invasivos e com metástases ósseas quando comparada com tecido mamário normal (Reinholz *et al.*, 2002) e a ativina A dimérica é detectada em homogenados de tecidos com Câncer de mama em concentrações 2x maiores que nos tecidos normais ao redor dos tumores (Reis *et al.*, 2002). Além disso, mulheres pós-menopausa com câncer de mama têm em média níveis sorológicos de ativina A aumentados que caem abruptamente após mastectomia ou quadrantectomia sugerindo que a fonte principal foi removida (Reis *et al.*, 2002). A hipótese da produção aumentada da ativina A por células tumorais comparadas com células epiteliais ductais normais não foi confirmada por dados imunohistoquímicos (Di Loreto *et al.*, 1999). Ao contrário da ativina, os níveis de inibina não parecem significativamente elevados em mulheres com câncer de mama (Robertson *et al.*, 2002).

O sistema inibina/ativina pode ter um papel importante na proliferação celular das células ductais tumorais. A ativina A inibe a proliferação de linhagens de células de câncer de mama *in vitro* (Kalkhoven *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1996; Cocalakis *et al.*, 2001). A ativina A também

possui uma ação imunomoduladora. A ativina A afeta a imunidade celular modulando a quimiotaxia dos monócitos, a migração de monócitos e a produção de citocinas (Welt and Crowley, 1998; Petraglia et al., 1991; de Kretser et al., 1999; Keelan et al., 2000). Assim o efeito geral da ativina A seria de inibição do crescimento tumoral.

A folistatina é uma proteína monomérica que possui ação neutralizante sobre as ativinas e em menor intensidade sobre as demais proteínas da superfamília TGF- $\beta$ , como a miostatina. Ela se liga a ativina, com alta afinidade, formando complexos inativos (HILL *et al.*, 2002; SIDIS *et al.*, 2002). O gene relacionado à folistatina (FLRG), também conhecida como proteína relacionada à folistatina (FSRP), é um membro da família das folistatinas, recentemente caracterizada, que se liga a ativina com alta afinidade, neutralizando seus efeitos (HARRINSON *et al.*, 2005). Ou seja, em termos gerais, a folistatina e a FLRG são antagonistas da ativina A e conseqüentemente estimulam a proliferação celular das células epiteliais ductais. Dessa forma, não seria surpresa se sua expressão estivesse desregulada nos tumores mamários.

Na comparação da intensidade e área de coloração da folistatina, só houve significância estatística para a coloração do citoplasma ( $P=0,0007$ ) e núcleo ( $P=0,0006$ ) das células estromais. Essa significância estatística foi devido a um grupo específico de comparação. A comparação entre o grupo de fibroadenomas e o grupo de carcinoma ductal invasor revelou um aumento da intensidade da coloração das células estromais para folistatina, tanto para o citoplasma ( $P<0,5$ ) quanto para o núcleo ( $P<0,5$ ) (Gráficos 1 e 2), nos casos de fibroadenomas. A intensidade de coloração da folistatina nas células estromais de fibroadenomas foi significativamente maior que nos casos de carcinoma ductal invasor. Essa situação é condizente com a hipótese de que a folistatina é um estimulador/modulador da proliferação celular estando sua expressão alterada nas condições de aumento da proliferação e atividade celular. Fibroadenomas são tumores benignos com, muitas vezes, maior quantidade de material intercelular (colágeno). Existem também fibroadenomas com maior quantidade de fibroblastos (células estromais), esses são chamados de fibroadenomas hiperclulares. Nos carcinomas ductais invasores ocorre um predomínio e proliferação de células ductais epiteliais. Assim, era de se esperar que a folistatina pudesse estar aumentada nas células estromais dos fibroadenomas e não nas dos carcinomas ductais invasores. É interessante notar que essa diferença ocorreu nas células estromais e não nas células epiteliais ductais, supostamente principal fonte da folistatina. Isso pode sugerir que as células estromais tenham papel importante na modulação do crescimento tumoral de fibroadenomas e que uma das formas de modulação seja através da folistatina estando sua expressão alterada nas células estromais. Além disso, embora a folistatina seja um estimulador da proliferação celular e sua principal localização na mama seja o epitélio ductal, ela não parece ter sua expressão alterada nos casos de carcinoma ductal *in situ* e carcinoma ductal invasor.

Na comparação da intensidade e área de coloração para FLRG, houve significância estatística para a coloração do citoplasma ( $P=0,0087$ ), núcleo ( $P=0,0428$ ) e área ( $P=0,0017$ ) de coloração das células epiteliais. Essa significância estatística foi devido a um grupo específico de comparação. A comparação entre o grupo de controles e o grupo de carcinoma ductal invasor revelou um aumento da intensidade da coloração do citoplasma das células epiteliais ductais e da área de coloração para FLRG. Embora haja diferença estatística ( $P=0,0428$ ) em relação a intensidade de coloração do núcleo de células epiteliais ductais para FLRG, esse achado é global (na amostra como um todo) e não foi encontrado nenhum grupo específico onde também houvesse significância estatística (Figura 3, 4 e 5). Como a folistatina, a FLRG é também um inibidor da ativina. A FLRG liga-se a ativina com a mesma irreversibilidade e afinidade que a folistatina (Saito et al., 2005). Nessa situação sua expressão aumentada nas células epiteliais ductais de carcinomas invasores de mama sugere que nesses carcinomas ocorra uma desregulação

do sistema ativina/inibina favorecendo a ação da FLRG em estimular de forma indireta (inativação da ativina) a proliferação celular. É interessante notar também que nos carcinomas ductais invasores predominou um aumento da FLRG e não da folistatina sugerindo que no caso da mama humana, e especificamente em carcinomas invasores, a FLRG seja o antagonista da ativina de maior importância fisiopatológica.

A FLRG é de expressão predominantemente nuclear. O fato de sua expressão citoplasmática estar aumentada nos carcinomas ductais invasores sugere que esse comportamento aberrante possa ser consequência da expressão de uma FLRG modificada. Situações de expressão de proteínas e receptores modificados são comuns em células tumorais.

## 6. Conclusões

A Folistatina e a FLRG podem ser detectadas em tecido mamário humano normal ou patológico (fibroadenomas, hiperplasia ductal florida sem atípias, carcinoma intraductal e carcinoma ductal invasor) por imunohistoquímica.

A folistatina parece ser expressa predominantemente por células epiteliais ductais.

Nos fibroadenomas, embora a folistatina seja expressa predominantemente por células epiteliais ductais, a sua expressão está aumentada nas células estromais (tanto no citoplasma quanto no núcleo).

A FLRG tem sua expressão aumentada em carcinomas ductais invasores.

A FLRG, embora seja de predominância nuclear em condições normais, parece ter predominância citoplasmática em carcinomas ductais invasores.

A FLRG parece ser o antagonista da ativina de maior importância fisiopatológica em humanos.