

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

EFEITOS TRANSFORMANTES DO BISFENOL-A E MEDROXIPROGESTERONA
EM CÉLULAS EPITELIAIS DA MAMA

LÍVIA DE PAULA PERES

UBERLÂNDIA
Outubro-2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

EFEITOS TRANSFORMANTES DO BISFENOL-A E MEDROXIPROGESTERONA
EM CÉLULAS EPITELIAIS DA MAMA

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre.

Mestranda: Lívia de Paula Peres

Orientador: Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

UBERLÂNDIA
Outubro-2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

P437e
2015

Peres, Lívia de Paula, 1985-
Efeitos transformantes do bisfenol-A e medroxiprogesterona em
células epiteliais da mama / Lívia de Paula Peres. - 2015.
62 f. : il.

Orientador: Marcelo José Barbosa Silva.

Coorientador: Luiz Ricardo Goulart Filho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Mamas - Câncer - Teses. 3. Hormônios -
Teses. 4. Células cancerosas - Teses. I. Silva, Marcelo José Barbosa. II.
Goulart Filho, Luiz Ricardo. III. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
IV. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas



Lívia de Paula Peres

“Efeitos transformantes do Bisfenol-A e Medroxiprogesterona em células epiteliais da mama”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 27 de outubro de 2015.

Prof. Dr. Martin Hernan Bonamino – INCA/RJ

Prof. Dr. Alberto da Silva Moraes – ICBIM/UFU

Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva – ICBIM/UFU (orientador)

*“Um sonho que se sonha só, é só um sonho que se sonha só, mas sonho que se sonha junto é
realidade...”*

Raul Seixas

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu professor orientador Dr. Marcelo José Barbosa Silva, que me aceitou mesmo sem saber como seria o meu desempenho, que diante de minhas dificuldades por nunca ter entrado em um laboratório, soube ter paciência e tranquilidade para me ensinar cada passo desse novo mundo. Você me mostrou a importância de trabalhar em grupo de verdade, respeitou meus momentos de cansaço, me apoiou e estimulou a conhecer a verdadeira pesquisa. Não foi fácil conciliar trabalho e estudo, realmente foi um desafio e você soube ter muito equilíbrio para lidar com essa situação. Obrigada por me entender sempre!!! Você é um exemplo como profissional e pessoa. Tenho certeza de que seu esforço e profissionalismo lhe trará muitas conquistas!

Agradeço muito aos amigos que fiz no Laboratório de Osteoimunologia e Imunologia dos Tumores. Obrigada por me ajudar e ensinar com paciência tudo que hoje sei, sem vocês essa conquista não seria possível. Muito obrigada Felipe pelas inúmeras vezes que você me ajudou com os experimentos, pela paciência em me acompanhar e ensinar também o funcionamento do laboratório. Sou imensamente grata a você! Muito obrigada Mariana por ter me incentivado a fazer a prova do mestrado e por ser essa amiga que sempre me dá força!! Bruna te agradeço por todas as vezes que você me ajudou, pela sua disposição e pela pessoa bondosa que você é! Ana Carolina, minha amiga de profissão e minha amiga de mestrado, obrigada por tudo!! Vamos vencer nossa batalha! Danielle, obrigada por sempre estar disposta por se empenhar em me ajudar sempre! Brunna, obrigada por ter paciência comigo e sempre me ajudar nas horas que precisei! Isadora minha parceira nas semanas de limpeza, obrigada pela amizade e momentos divertidos! Os momentos com vocês no laboratório sempre foram agradáveis! Obrigada por tudo!!

Agradeço a minha querida mãe e a meu pai, Valdelice e Adelaine, e a minha irmã, Viviane, que sempre estão ao meu lado, me dão apoio e força para seguir em frente! Sem vocês nenhuma das conquistas de minha vida seria possível. Obrigada pela educação, pelo amor e pela dedicação de anos para que eu pudesse ter a oportunidade de chegar até aqui! Agradeço ao meu namorado, Nícholas, pela paciência, por participar de cada momento, se dispor a me ajudar a entender os momentos difíceis, por sempre me apoiar e incentivar no que faço, por estudar até tarde para me fazer companhia. Você é muito especial e sabe disso! Obrigada por estar sempre presente.

Agradeço a equipe de Cuidados Paliativos do Hospital do Câncer de Uberlândia e demais profissionais deste local que me apoiaram e ajudaram nesses dois anos de estudo. Vocês foram meus parceiros, muito obrigada por tudo!

Agradeço ao professor Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, meu co-orientador, por ter aceito a co-orientação de imediato, por ter acreditado em mim, pela parceria essencial e pelo apoio de sua equipe, principalmente Larissa e Cláudia. Agradeço a Ana Cláudia Pajuaba, técnica do Laboratório de Imunologia por ter me ajudado tantas vezes na citometria e se dispor a retirar dúvidas sempre que precisei.

Agradeço ao Programa de Imunologia e Parasitologia Aplicadas, aos mestres que compõe esse programa, às secretárias, Lucélia e Lucileide, pela paciência e dedicação e, a todos os colegas de mestrado em especial, agradeço a Vanessa, Flávia e Eliéser. Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia por todo o conhecimento e experiência que adquiri. E aos órgãos FAPEMIG, CNPq e CAPES por financiar nossos projetos. Agradeço a Deus por ter me dado saúde, força e por ter colocado todas essas pessoas na minha vida que me ajudaram direta ou indiretamente no desenvolvimento desse trabalho.

LISTA DE ABREVIASÕES

- AHR: receptor Aryl Hidrocarbono
BV: brilliant stain buffer
BPA: bisfenol-A
cDNAs: ácido desoxirribonucleico complementar
CXCR4: receptor de quimiocina tipo 4
DMSO: Dimetil sulfoxide
DNA: ácido desoxirribonucleico
E2F1: fator de transcrição
ECM: matriz extracelular
EGF: fator de crescimento epidérmico
EGFR: receptor do fator de crescimento epidérmico
EMT: transição epitélio mesênquima
EPA: Agência de Proteção Ambiental
ER: receptor de estrógenos
GR: receptor de glicocorticóide
HER2: receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2
HRT: terapia de reposição hormonal
IRS-2: receptor de insulin substrato 2
Ki67: proteína de proliferação celular
MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno
mRNA: ácido ribonucleico mensageiro
MCF-10A: linhagem não tumoral de célula epitelial mamária
MMPs: metaloproteinases
MMP-2: metaloproteinase 2
MMP-9: metaloproteinase 9
MPA: acetato de medroxiprogesterona
mPR: receptor de progesterona na membrana
 μ M: micromolar
PBS: tampão fosfato salino
PR: receptor de progesterona
RNA: ácido ribonucleico
SDF-1 α : fator derivado do estroma 1 α

SFB: soro fetal bovino

PCNA: antígeno nuclear celular de proliferação

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação gráfica da mediana da intensidade de fluorescência (MIF) de CXCR2, γ-H2AX, Ki67 e CXCR4.....	34
Figura 2. Representação gráfica da mediana de intensidade de fluorescência de HER2, EGFR1	35
Figura 3. Gráficos da mediana de intensidade de fluorescência de E-caderina e N-caderina..	36
Figura 4. Reação de Cadeia Polimerase RT-PCR	38
Figura 5. Superexpressão de MMP-2 e MMP-9 nas MCF 10A	39
Figura 6. Migração e invasão de células MCF-10A após tratamento com BPA/MPA	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Marcadores e fluorocromos usados durante a citometria de fluxo.....	28
Tabela 2. Sequência de primers RT-PCR.....	30

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Câncer de mama.....	13
1.2 Transição epitélio-mesênquima	15
1.3 Modelos in vitro de transformação maligna	18
1.4 γ-H2AX e Ki67	20
1.5 CXCR2 e CXCR4.....	22
1.6 HER2 e EGFR1	23
1.7 E-caderina e N-caderina.....	23
1.8 MMP-2 e MMP-9	24
2 JUSTIFICATIVA	26
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 Drogas e Anticorpos	28
4.2 Linhagem celular	29
4.3 Ensaio de transformação maligna da MCF-10A.....	29
4.4 PCR em tempo real	29
4.5 Citometria de Fluxo	31
4.6 Ensaio de migração/invasão.....	31
4.7 Análise estatística	32
5 RESULTADOS	33
5.1 Expressão de proteínas relacionadas a proliferação e invasão celular.....	33
5.2 Alteração na expressão de HER2 e EGFR1.....	35
5.3 Redução da expressão da E-caderina e aumento da N-caderina.....	36
5.4 Expressão de genes associados a transição epitélio mesênquima.....	37
5.5 Aumento da expressão de MMP-2 e MMP-9	39
5.6 Aumento da migração/invasão das MCF-10A tratadas	40
6 DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	50

RESUMO

Bisfenol-A (BPA) e medroxiprogesterona (MPA) são disruptores hormonais e hormônios responsáveis por alterações na proliferação, apoptose, migração e invasão celular que contribuem para o desenvolvimento e progressão do câncer de mama. Células epiteliais da mama, MCF-10A, foram tratadas com BPA 1 µM ou 10 µM durante 12 dias. No 12º dia foi associado MPA durante 96 horas e as culturas de células analisadas por citometria de fluxo para verificar a presença de proteínas comuns ao câncer de mama. Para avaliar a capacidade de invasão das células tratadas com BPA e MPA foi realizado ensaio de invasão em Transwell com Matrigel® e SDF-1 α /CXCL12. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada e a expressão de alguns genes relacionados a transição epitélio mesênquima comprovadas. BPA 10 µM/MPA induziu a expressão de CXCR4 e de outros fatores relacionados com a invasão como as metaloproteinases 2 e 9 (MMPs). As células tratadas mostraram maior capacidade de invasão na presença do ligante SDF-1 α para o receptor CXCR4. No entanto, observou-se pequenas alterações dos receptores dos fatores de crescimento, como a diminuição de EGFR1 e aumento de HER2. O aumento da migração e invasão levanta a suspeita de perda das características epiteliais das MCF-10A. Sendo assim, investigou-se a expressão do marcador epitelial E-caderina e observou-se que o tratamento com BPA 10µM/MPA teve a maior redução da expressão dessa molécula de adesão. BPA/MPA tiveram a capacidade de alterar as MCF-10A, *in vitro*, conferindo propriedades tumorais, tais como: aumento da expressão de proteínas envolvidas em metástases, aumento da capacidade de migração, diminuição da regulação do gene *CDH1* marcador epitelial, aumento da expressão do gene *CDH2* considerado marcador mesenquimal e degradação da matriz extracelular pela expressão das MMP-2 e MMP-9.

Palavras-chave: câncer de mama, bisfenol-A, acetato de medroxiprogesterona, caracterização fenotípica, MCF-10A.

ABSTRACT

Bisphenol-A (BPA) and medroxyprogesterone acetate (MPA) are disruptor's hormone and hormone responsible for changes in proliferation, apoptosis, cell migration and invasion that contribute to the development and progression of breast cancer. Breast epithelial cells, MCF-10A, were treated with BPA 1 μ M or 10 μ M for 12 days. On the 12th day it was associated with MPA for 96 hours and cell cultures analyzed by flow cytometry to verify the presence of base to breast cancer proteins. To assess invasiveness of cells treated with BPA and MPA was performed in Transwell invasion assay with Matrigel® and SDF-1 α /CXCL12. Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed and expression of some genes related to epithelial mesenchymal transition proven. BPA 10 μ M/MPA induced the expression of CXCR4 and other factors related to invasion as metalloproteinases 2 and 9 (MMPs). The treated cells showed increased invasiveness in the presence of SDF-1 α ligand for CXCR4. However, there are small changes in growth factor receptors such as EGFR1 decreased and increased HER2. Increased migration and invasion raise suspicion loss of epithelial characteristics of MCF-10A. Therefore, we investigated whether the expression of the epithelial marker E-cadherin and it was observed that treatment with BPA 10 μ M/MPA had the greatest reduction in the expression of adhesion molecule. BPA/MPA had the ability to alter MCF-10A in vitro, conferring tumor properties, such as increased expression of proteins involved in metastasis, increased migration capacity, down-regulation of *CDH1* (epithelial marker gene), increased expression *CDH2* the gene considered mesenchymal marker and degradation of extracellular matrix by the expression of MMP-2 and MMP-9.

Keywords: breast cancer, bisphenol-A, medroxyprogesterone acetate, phenotype characterization, MCF-10A.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de mama

O câncer é um importante problema de saúde e uma das causas mais relevantes de morbidade e mortalidade mundial. É uma doença crônica que atinge uma grande parcela de pessoas mundialmente, sendo a segunda principal causa de morte em países em desenvolvimento e a principal causa de morte nos países economicamente desenvolvidos. Em 2012, houve 14,1 milhões de casos novos de câncer e 8,2 milhões de mortes ao redor do mundo. Mais da metade dos casos, 65% das mortes ocorreram em países menos desenvolvidos. Sendo que para o câncer de mama foram 1,7 milhões de casos novos e 521,900 mil mortes nesse mesmo ano (TORRE et al., 2015). No Brasil, estima-se que entre 2014 e 2015 serão cerca de 576 mil novos casos de câncer. Destes novos casos, 75 mil serão de mama feminina (FACINA, 2014; INCA, 2014).

O câncer de mama é o tipo mais comum entre as mulheres sendo a segunda maior causa de mortalidade para o sexo feminino em todo mundo e, está associado ao acúmulo de transformações pré e pós-traducionais ou mutações no genoma (BRAY; MCCARRON; PARKIN, 2004; ELLSWORTH et al., 2008). Apresenta uma etiologia variada, sendo influenciado tanto por fatores genéticos bem como ambientais (ELLSWORTH et al., 2010). Inicia-se como uma doença local ocorrendo metástases para órgãos distantes (GUPTA; MASSAGUE, 2006).

Para entendermos o processo de desenvolvimento do câncer de mama é necessário saber sobre o funcionamento da glândula mamária. A mama é um órgão complexo composto por múltiplos tipos celulares envolvidos pela matriz extracelular (ECM). As células epiteliais da mama representam uma unidade funcional da glândula e compreendem uma rede polarizada secretora formada por alvéolos. As glândulas do epitélio mamário estão envolvidas por um rico colágeno da matriz e desenvolvem anexos especializados para a membrana basal em torno. Importantes sinais mediados célula a célula e interações célula-matriz regulam aspectos como polaridade celular, proliferação, adesão e sobrevivência. Alterações ou aberrações nas interações entre o epitélio e o microambiente podem influenciar na progressão tumoral (SHAW; WROBEL; BRUGGE, 2004).

A progressão tumoral é uma sucessão de alterações genéticas que ocorre através da transformação de células normais em células neoplásicas. Estas células transformadas adquirem

a capacidade de proliferação descontrolada, conseguem evadir dos fatores de supressão de crescimento, sofrem perda de contato célula a célula, perda de características epiteliais e ganho de características mesenquimais, formam clones capazes de resistir a morte, se mantém em um microambiente rico em vasos sanguíneos e nutrientes que favorecem seu crescimento e aumentam a capacidade de invasão ou metástases (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Em tecidos saudáveis existe o controle da produção e liberação de sinais para a promoção do crescimento e divisão celular normal, enquanto que na célula tumoral estes sinais são desregulados e adquirem a capacidade de sustentar a proliferação e crescimento desordenado de células através do aumento de receptores e fatores de crescimento (BHOWMICK; NEILSON; MOSES, 2004; CHENG et al., 2008; HANAHAN; WEINBERG, 2011). Moléculas inibidoras do crescimento não são reconhecidas pelas células tumorais que, dessa forma, conseguem manter a sobrevivência, proliferam e escapam dos sinais anti-proliferativos (BURKHART; SAGE, 2008; HANAHAN; WEINBERG, 2011; SHERR; MCCORMICK, 2002).

O aumento da replicação em células tumorais é fundamental para o estabelecimento da progressão tumoral. Células pré-malignas precisam sobreviver e adquirir potencial replicativo ilimitado, além disso, precisam resistir à apoptose (HANAHAN; WEINBERG, 2000;2011). Um dos mecanismos mais comuns de resistência à apoptose é a mutação em genes supressores de tumores, como por exemplo a mutação no gene p53, o qual mantém a integridade do DNA e induz cascata apoptótica (HANAHAN; WEINBERG, 2000;2011).

Para que estas células possam se estabelecer é necessário um microambiente favorável como a criação de um estroma de suporte, angiogênese, interações químicas entre epitélio-estroma que permitam a migração e invasão tumoral caracterizada como metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2011). O processo de invasão e metástase estão interligados e envolvem alterações físicas na ligação das células e seu microambiente, ativação de proteases extracelulares específicas responsáveis pela degradação da membrana basal e matriz extracelular, aumento ou diminuição da expressão de proteínas (CAVALLARO; CHRISTOFORI, 2004; MARTIN; JIANG, 2009).

O tumor é responsável por desordenar a estrutura da ECM composta por colágeno, integrinas, glicoproteínas e proteoglicanos e, desregular o crescimento celular. Células cancerígenas interagem de forma autócrina, parácrina e com os componentes da ECM (NYGA; CHEEMA; LOIZIDOU, 2011).

A ECM envolve as células em todos os tecidos dando suporte estrutural, caracterizando a forma e função dos tecidos. É composta por fibras colágenas e elásticas, e pode apresentar alterações fisiológicas importantes durante o desenvolvimento, diferenciação, migração celular e morte celular programada. Além disso, está envolvida em processos patológicos como o câncer que pode ocorrer durante a sua remodelação (COUSSENS; FINGLETON; MATRISIAN, 2002; PAGE-MCCAW; EWALD; WERB, 2007).

Em tumores de mama há uma grande atividade proteolítica que envolve as metaloproteinases (MMPs). A fragmentação da ECM é induzida pelas MMPs, estas incentivam a migração de células tumorais que se ligam a fatores de crescimento e a fragmentos das moléculas da ECM que são liberados na matriz durante a degradação e ficam livres para os receptores de células tumorais (FREITAS et al., 2007).

1.2 Transição epitélio-mesênquima

A conversão de tumores epiteliais tem sido associada com a ativação da transição epitélio-mesênquima (EMT), definida como alterações no fenótipo celular epitelial para um estado mesenquimal, que é um acontecimento fundamental e uma marca na tumorigênese (GUARINO; RUBINO; BALLABIO, 2007). A aquisição de propriedades mesenquimais através da EMT pode promover a separação de células do tumor primário e de facilitar a sua migração subsequente, permitindo, assim, o surgimento de metástases (BILL; CHRISTOFORI, 2015; THIERY; SLEEMAN, 2006; XU et al., 2012).

EMT ocorre durante diversos processos de desenvolvimento, tais como: a gastrulação, a migração da crista neural e durante a formação do coração, mas também, está associada a processos patológicos tais como fibrose e metástases (HAY, 1995; KALLURI; NEILSON, 2003).

Um importante conceito de transição epitélio-mesênquima (EMT), que tem sido reconhecido por várias décadas como um processo fundamental da embriogênese, é atualmente considerado um evento crucial na etapa inicial da cascata metastática que permite que as células adquiram potencial migratório, invasivo e tronco, como propriedades (BILL; CHRISTOFORI, 2015; COWIN; WELCH, 2007; WANG, Y.; ZHOU, 2013).

Durante EMT de células cancerígenas *in situ*, as camadas de células epiteliais perdem polaridade juntamente com contato célula-célula e, em seguida, são submetidas a uma remodelação dramática do citoesqueleto. A expressão de proteínas que promovem o contato

célula-célula, tal como E-caderina e γ -catenina, podem se perder, e as células podem adquirir marcadores mesenquimais, tais como vimentina, fibronectina, N-caderina, e as metaloproteinases MMP-2 e MMP-9, o que resulta em uma maior capacidade para a migração celular e invasão (MORENO-BUENO; PORTILLO; CANO, 2008). A indução da EMT é conduzida através da complexa interação entre as células cancerígenas e do microambiente tumoral. Os mecanismos incluem a ativação de vários repressores de transcrição como SLUG, SNAI1 e TWIST1, por meio de múltiplas vias de sinalização celular, como NF- κ B, Wnt e Hedgehog (VUORILUOTO et al., 2011).

Estudos mostram que os genes TWIST1 e SLUG suprimem a expressão de E-caderina e quando ativados induzem EMT. A expressão do gene SLUG está relacionada com a presença de metástases para linfonodos regionais no câncer de mama (BLANCO et al., 2002; LEE et al., 2006).

A diminuição da função da E-caderina é um evento da transição epitélio-mesênquima e das metástases. A perda da E-caderina pode vir acompanhada pelo aumento da expressão de isoformas alternativas de caderina que promovem alterações nos sinais de sobrevivência e aumento do fenótipo de malignidade (LOCHTER et al., 1997). A E-caderina regula a adesão celular e este processo é dependente de cálcio. Sua expressão diminui e fica praticamente ausente no câncer de mama avançado (WHEELOCK; JOHNSON, 2003).

Os tumores de células epiteliais se desenvolvem de forma simbiótica com o estroma circundante. No microambiente tumoral, as células de outros tipos celulares, incluindo as células mesenquimais (MSCs), podem desempenhar um papel importante na progressão do câncer (HU; POLYAK, 2008). As MSCs afetam a morfologia e a proliferação de células na sua proximidade, através de interações célula-célula, assim como através da secreção de diferentes fatores parácrinos como citocinas e quimiocinas (FIERRO et al., 2004; XU et al., 2012).

Evidências sugerem que as interações entre MSCs e células tumorais de mama podem afetar o fenótipo das células cancerígenas e promover o seu potencial metastático (MOLLOY et al., 2009). As MSCs podem recrutar localmente fibroblastos normais e outros tipos de células para constituir um nicho adequado para sofrer transição epitélio-mesênquima originando metástases (BOYLE et al., 2008). Além disso, as MSCs podem produzir (interleucina) IL-6 e estimular o crescimento do tumor por meio da produção parácrina de IL6. Ambos IL-6 e (interleucina) IL-8 têm sido implicados na regulação de células-tronco tumorais (LANDI et al., 2003).

A migração das células de uma área para outra, geralmente em resposta a um sinal químico, é fundamental para funções tais como: a cicatrização de feridas, a diferenciação celular, o desenvolvimento embrionário e a realização de metástase de tumores. A invasão celular é semelhante, mas requer que a célula migre através da matriz extracelular (ECM) ou membrana basal (MB), primeira barreira para ser degradada enzimaticamente (SHERMAN et al., 2013).

No estudo realizado por BATULLA et al. (2010) foi observado que a indução da EMT dota células epiteliais da mama com características de células-tronco e que as células derivadas da EMT mostram semelhança às células-tronco mesenquimais (MSCs), com a capacidade de se diferenciar em várias linhagens celulares. Descobriu-se que as células derivadas de EMT e MSC partilham de muitas propriedades, incluindo o perfil imunofenotípico típico das MSCs, isto é, CD44⁺ CD24⁻, e CD45⁻ (BATTULA et al., 2010).

Outro importante evento observado durante a carcinogênese é o EMT parcial. Sabe-se que nem todas as células sofrem EMT completa, ou seja, perda das junções e adesões células-células e ganho de características migratórias. A maioria das células sofrem EMT parcial ou híbrida, com alguns tipos de adesão célula-célula e traços de migração mantendo um fenótipo híbrido, ou seja, fenótipo epitelial/mesenquimal capaz de promover migração celular coletiva um importante fenômeno durante a invasão de células tumorais (JOLLY et al., 2015).

Muitos tipos celulares durante o desenvolvimento em organismos adultos exibem características mesenquimais como a perda da polaridade ápico-basal, e aumento da motilidade em resposta a sinais extracelulares. Esse processo é denominado de EMT parcial por apresentar mudanças na plasticidade epitelial que podem estar relacionadas a alterações normais como ocorre na morfogênese da glândula mamária e durante a cicatrização de feridas ou ainda, patológicas como na inflamação crônica e câncer. A EMT completa pode ser o resultado de várias etapas sequenciais, e no caso da EMT parcial, haveria apenas algumas dessas sequências (GRUNERT; JECHLINGER; BEUG, 2003; HUBER; KRAUT; BEUG, 2005; LEROY; MOSTOV, 2007).

A transição de estruturas epiteliais para estruturas mesenquimais pode exigir uma reorganização ou mudança parcial do epitélio em questão (NAKAYA; SHENG, 2013). Na EMT parcial há envolvimento do miR-200 que está superexpresso, enquanto que ZEB encontra-se com diminuição da expressão (JOLLY et al., 2015). miR-200 é uma pequena molécula de RNA que está envolvida no processo de metástases em diversos tipos de câncer incluindo o de mama. Seu papel é reprimir a expressão de E-caderina e ZEB1 aumentando a capacidade de

motilidade celular (PARK et al., 2008). ZEB é um fator de transcrição, gene importante que também está envolvido no processo de transição epitélio mesênquima parcial, e nesse caso, sua expressão é reduzida pela expressão do miR-200.

Células que sofreram EMT parcial apresentam características específicas como a capacidade de migração passiva de células tumorais em resposta a sinais quimiotáticos, associados a expressão de E-caderina e aumento da agressividade tumoral (BILL; CHRISTOFORI, 2015); possuem plasticidade suficiente para alterar células de seu microambiente; susceptibilidade para se agrupar na corrente sanguínea permitindo eficiente metástase para órgãos distantes; podem ser resistentes ou tolerantes a quimioterápicos e enriquecidas pela inflamação e radiação; possuem um número muito maior de iniciadores de tumores com relação as células que sofrem EMT completa e podem formar aglomerados de células tumorais circulantes (CTCs) com leucócitos e fibroblastos mantendo sua eficiência na circulação (JOLLY et al., 2015). Portanto, células que sofrem EMT parcial ou híbrida possuem muitas estratégias de sobrevivência e maior capacidade de desenvolver doenças malignas (LU et al., 2013).

1.3 Modelos *in vitro* de transformação maligna

As células MCF-10A pertencem a linhagem de células imortalizadas e não mostra características tumorais invasivas. São derivadas de uma mulher de 36 anos de idade, diagnosticada com doença fibrocística da mama. É considerada uma célula epitelial da mama não maligna, com características normais, usada em estudos *in vitro* devida a possibilidade de caracterização de importantes eventos associados a morfogênese e alterações fenotípicas (SOULE et al., 1990).

A MCF-10A não expressa receptor de estrógeno α (ER), receptor de progesterona (PR) e HER-2, mas expressa EGFR (SUBIK et al., 2010), receptores de progesterona na membrana (mPR) e receptores de estrógeno β (ERb) (TREECK et al., 2010; VARES et al., 2015). O desenvolvimento do câncer de mama envolve complexas alterações fenotípicas nas células epiteliais da mama e do microambiente em questão. Essas transformações são estudadas em modelos que investigam aspectos do processo celular associado com o desenvolvimento e progressão tumoral (SHAW et al., 2004).

As culturas de células de maneira geral são amplamente utilizadas para o estudo da transformação maligna de células normais e progressão tumoral. Porém, várias características

típicas da organização das unidades funcionais são perdidas. Vale relembrar que a glândula mamária é composta por várias unidades acinares (compostas por subunidades lobulares e ductos), e estas são compostas por células epiteliais com morfologia polarizada, contatos célula-célula especializados e adesão à membrana basal. As culturas convencionais têm perda de várias características da carcinogênese primária e precoce que são de muito interesse para estudo (BISSELL; RADISKY, 2001). Existem poucos modelos de transformação *in vitro* que consigam reproduzir com maior fidelidade o que acontece *in vivo*. Alguns são realizados com o uso de hormônios (promotor de câncer) e algum iniciador de câncer, que causa dano ao DNA (BILIR et al., 2011; HOFSETH et al., 1999; SCHRAMEK et al., 2010).

O Bisfenol-A (BPA) é um composto difenil, material sintético industrial (GAO et al., 2015) usado na fabricação de polímeros como policarbonatos, resinas epóxi e outros tipos de plásticos. O policarbonato e resinas epóxi estão presentes em óculos de sol, papéis térmicos, materiais médicos e odontológicos. Acredita-se que uma das maiores exposições do homem ao BPA ocorra através das embalagens dos alimentos contendo a substância (GEENS et al., 2012; REZG et al., 2014).

Vários estudos mostram que o BPA tem influência no desenvolvimento do câncer de mama sendo, portanto, um fator de risco para esta doença. Além disso, mesmo em baixas doses seu efeito é acumulativo no organismo (WENG et al., 2010). Baixas doses de BPA aceleraram a tumorogênese mamária e metástases em camundongos transgênicos que expressam HER2 (JENKINS et al., 2011). Além disso, a exposição perinatal de camundongos a baixas doses de BPA causou alterações aberrantes na morfogênese e transformação de células da glândula mamária (WANG, D. et al., 2014).

BPA ativa os receptores de estrógenos (ER) α e β levando a mudanças na proliferação celular, apoptose, migração contribuindo para o desenvolvimento e progressão do câncer (GAO et al., 2015). A exposição crônica a esse composto induz a proliferação de células da mama o que aumenta o risco do desenvolvimento do câncer de mama (BETANCOURT et al., 2010). O contato com o BPA é algo difícil de controlar porque essa substância se encontra em diversos produtos feitos de plásticos, desde garrafas de mamadeiras, fios-dentais até CDs e DVDs (FIEGE et al., 2000). O BPA e seus metabólitos são capazes de formar complexos com uma molécula biológica, como o DNA, causando danos ao mesmo.

Outro importante composto, conhecido como medroxiprogesterona (MPA) tem sido relacionado com o desenvolvimento do câncer de mama (KRAMER et al., 2006). MPA é um

derivado da 17 α -hidroxiprogesterona usado atualmente em terapia de reposição hormonal ou em contraceptivos orais (GHATGE et al., 2005).

Estudos *in vitro* mostram que o MPA é capaz de realizar de forma eficaz o crescimento de células induzidas pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em células MCF-7 (KRAMER et al., 2005), e que pode aumentar a taxa mitótica das células epiteliais normais da mama, na presença de fatores de crescimento. Portanto, pode aumentar a probabilidade de falhas na replicação do DNA, quando utilizado a longo prazo. Observou-se também, um aumento no índice de PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) e Ki67 (HOFSETH et al., 1999).

Após a menopausa, a produção de estrógeno e progesterona dos ovários cessa, e o aumento das taxas de incidência do câncer de mama diminuem com a idade em comparação com as mulheres na pré-menopausa. Isto sugere uma implicação significativa de hormônios na etiologia e desenvolvimento do câncer de mama. Experiências *in vitro* têm demonstrado que o estrógeno aumenta a proliferação das células da mama, e experiências *in vivo* em animais, demonstraram que o estrógeno aumenta o risco do desenvolvimento de tumores de mama. Outros elementos fortalecem a associação entre esteroides sexuais endógenos e o câncer de mama: a menarca precoce, a menopausa tardia e a terapia de reposição hormonal (TRH) em mulheres na pós-menopausa tem sido repetidamente associados com um aumento no risco do câncer de mama (BOYLE; LEVIN, 2008; KEY; VERKASALO; BANKS, 2001).

1.4 γ -H2AX e Ki67

As histonas são proteínas altamente básicas que formam complexos com o DNA para formar a cromatina. A histona H2AX possui peso molecular ~ 15 kDa é um membro da família histona H2A.

Quebras das cadeias duplas do DNA são causadas por erros de replicação, apoptose, ou outros processos fisiológicos. Danos ao DNA causados por radiação, luz UV, ou agentes citotóxicos ionizantes levam a fosforilação de H2AX na serina 139. H2AX (pS139) também é referido como H2AX (pS140) quando o N-terminal metionina é excisado normalmente. A Fosforilação de H2AX (também denominada, gamma-H2AX) tem como funções recrutar e localizar proteínas de reparo do DNA ou fatores de ponto de verificação do ciclo celular para o local do DNA danificado (CHEN et al., 2013).

Desta forma, H2AX fosforilada promove a reparação do DNA genômico e mantém a estabilidade e, assim, ajuda a evitar transformações oncogênicas. Testes que permitam analisar

a presença e a extensão destas quebras podem auxiliar na detecção de células pré-cancerígenas, avaliar estágios do câncer, monitorar a eficácia dos tratamentos anticâncer e o desenvolvimento de novas drogas que evitem a ocorrência de DNA *double - strand breaks* (DSB) (KUO; YANG, 2008; REDON et al., 2010). A quebra da cadeia dupla do DNA promove uma grande instabilidade genômica e esse mecanismo é observado no desenvolvimento do câncer. Apesar das DSBs estarem relacionadas ao possível desenvolvimento do câncer sabe-se que a incorporação de γ -H2AX é fundamental para o tratamento e monitoramento da progressão do câncer (BONNER et al., 2008).

A atividade proliferativa de um tumor ou de um tecido é determinada pelo número de células no ciclo e o tempo necessário para completar o ciclo celular. Existe uma forte correlação entre a taxa de proliferação de células tumorais e o desfecho clínico (BAISCH; GERDES, 1990; GERDES, 1990). Uma elevada taxa de proliferação é associada com um elevado grau de agressividade tumoral. Consequentemente, a medição da proliferação celular pode fornecer informações úteis sobre o prognóstico do tumor e pode auxiliar no diagnóstico, especialmente para linfomas de baixo grau não-Hodgkin.

Ki67 é uma proteína nuclear com massas moleculares de 345 e 395 kDa que não é expressa em G0 e que tem um aumento linear durante o ciclo celular atingindo o pico máximo em G2M. Caracteriza a fração de crescimento na maior parte das neoplasias. Está presente durante as fases G1, S, G2 e M do ciclo celular. Altas taxas de Ki67 estão associadas ao aumento da agressividade tumoral e diminuição da sobrevida (QUINN; WRIGHT, 1990).

Seu nível crescente e contínua expressão ao longo do ciclo celular junto a sua ampla conservação evolutiva em ambos os tecidos, neoplásico e normal a partir de muitas espécies além do homem, pode indicar que a proteína tem um papel importante na regulação da proliferação celular. No entanto, este ponto de vista não é suportado por observações de que algumas linhas de células em proliferação carecem de Ki67, isto é, pode não ser essencial para a proliferação celular. Devido à natureza do antígeno Ki67, a avaliação da sua expressão em tecidos normais, e tecidos neoplásicos é importante. Anticorpos que reagem especificamente com Ki67, são ferramentas úteis na detecção e localização desse marcador de proliferação (GERDES et al., 1983).

1.5 CXCR2 e CXCR4

As quimiocinas são pequenas proteínas, citocinas quimiotáticas de peso molecular de 8 kDa a 14 kDa, que estão implicadas em uma série de processos biológicos, principalmente aqueles relacionados à movimentação dos leucócitos e sua migração do sangue para os tecidos, sítios de inflamação ou lesões, a partir da ativação dos receptores de quimiocina (LUSTER; SIMEONOVA, 1998; MURPHY, 2001). As quimiocinas podem apresentar múltiplos papéis no crescimento do tumor, invasão e metástase através da indução da transformação celular, angiogênese e secreção de proteases (MURPHY, 2001).

CXCR2 é um receptor de quimiocinas da família CXC que se liga a IL-8 (interleucina 8)/CXCL8, uma quimiocina ELR⁺ (Presença da sequência glutamato-leucina-arginina na quimiocina), com a função de atrair leucócitos polimorfonucleares para os locais de inflamação aguda. Ativam monócitos e podem direcionar estas células para lesões vasculares, incentivando a proliferação de células endoteliais. Quando ocorre esse acoplamento entre IL-8/CXCL8 ao receptor CXCR2 várias vias são ativadas regulando de maneira importante o microambiente tumoral (CHARO; RANSOHOFF, 2006; VAN DAMME; STRUYF; OPDENAKKER, 2004).

CXCR4 assim como CXCR2 também é um receptor de quimiocina da família CXCR, que se liga a CXCL12 (SDF-1 α /fator derivado de estroma-1). Está envolvido no processo de invasão e metástase em diversos tipos de câncer incluindo o câncer de mama alvo de nosso estudo. A ligação entre o CXCR4 e a quimiocina SDF-1 α /CXCL12 induz mudança na conformação deste receptor e ativação da proteína G. Ativação da proteína G produz mensageiros lipídicos secundários, como o fosfatidilinositol trifosfato e diacilglicerol, desencadeia o aumento transiente da concentração de cálcio citosólico e a ativação de proteínas quinases, respectivamente. As quinases fosforilam moléculas efetoras, como as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e ativam, na maioria dos casos, a via ERK1/2. No câncer de mama, CXCR4 está relacionado a metástases ósseas e pulmonares (PENG et al., 2005).

Tanto CXCR2 quanto CXCR4 podem ser expressos em células normais, porém o aumento de suas expressões pode sugerir a presença de um processo inflamatório ou o desenvolvimento de doenças crônicas como o câncer. Analisar a expressão dessas proteínas permite caracterizar o grau de agressividade da doença em questão.

1.6 HER2 e EGFR1

HER2/erbB2 e HER1/EGFR1 são oncogenes receptores tirosina quinase, de peso molecular 185 kDa, representantes da família EGFR (IQBAL; IQBAL, 2014). erbB2 é responsável pelo controle fisiológico da proliferação, diferenciação, adesão e motilidade celular, progressão tumoral, metástases regionais ou a distância, angiogênese e redução de apoptose. Está envolvido na comunicação célula-célula e célula-estroma pelo processo de transdução de sinal. Na transdução de sinal fatores externos de crescimento, ou ligantes, afetam a transcrição de vários genes através da fosforilação e desfosforilação de proteínas transmembranas e de sinalizadores intermediários intracelulares (ROSS, 2009). O aumento de sua expressão induz atividade constitutiva, e o gene amplificado ou superexpresso em 30% dos cânceres são correlacionados a uma diminuição da sobrevida e mau prognóstico no câncer de mama. O anticorpo Herceptin® ou trastuzumab foi aprovado para o tratamento do câncer de mama metastático HER2⁺ (WOLFF et al., 2013;2014).

EGFR1 está envolvido na morfogênese de órgãos e manutenção dos tecidos, mas quando superexpresso está associado com a progressão tumoral. Os efeitos oncongênicos de EGFR incluem síntese de DNA, aumento do crescimento celular, invasão e metástase (HIRSCH; VARELLA-GARCIA; CAPPUZZO, 2009).

Anulação de EGFR resulta em interrupção do ciclo celular, apoptose ou desdiferenciação de células tumorais, sugerindo que o EGFR pode ser um alvo terapêutico eficaz (TOOTS; KEL'VE; SAARMA, 1988). Porém, estudos mostram que no câncer de mama avançado os níveis séricos de EGFR1 (sEGFR1) podem diminuir (PULTZ et al., 2015).

1.7 E-caderina e N-caderina

As caderinas são glicoproteínas transmembrana localizadas na zônula de adesão que medeia a adesão célula-célula dependente de cálcio (KNUDSEN; WHEELOCK, 2005). São moléculas que promovem a manutenção da arquitetura tecidual normal. As caderinas clássicas são conhecidas como caderina E (epitelial), P (placentária) e N (neural) (ROWLANDS et al., 2000).

A E-caderina, possui peso molecular de 120 kDa, é codificada pelo gene *CDH1* e conhecida por desempenhar um papel importante na adesão intercelular dos tecidos epiteliais. Além disso, é a principal componente na junção de aderência transmembrana de células

epiteliais da mama e dos demais órgãos. Tem como função manter a integridade epitelial e a redução de sua expressão aumenta o risco de progressão tumoral, invasão e metástase. Esta proteína está relacionada ao desenvolvimento tumoral e durante EMT podem iniciar expressão aumentada de N-caderina (CAVALLARO; SCHAFFHAUSER; CHRISTOFORI, 2002). Perda da expressão de E-caderina é caracterizada como um dos primeiros eventos na EMT em células tumorais.

N-caderina possui peso molecular de 99,7 kDa. A expressão de N-caderina acelera a sinalização via tirosina quinase (HAZAN et al., 2000), aumenta migração e invasão celular e, a E-caderina, pode estar pouco expressa ou ausente nesse caso, auxiliando o processo de metástase (QIAN et al., 2014). Além disso, a N-caderina tem a capacidade de ativar receptores do fator de crescimento fetal (FGF-2) envolvendo interações entre receptor (FGF-2) e domínio extracelular das moléculas de N-caderina (HAZAN et al., 2000). No câncer de mama a N-caderina pode influenciar o aumento da MMP-9 conferindo capacidade de invasão celular (HAZAN et al., 2000; NIEMAN et al., 1999) e estudos mostram que esta caderina pode induzir células a desenvolver fenótipo mesenquimal (ISLAM et al., 1996). Avaliar o aumento da expressão de N-caderina nos permite afirmar a sequência dos eventos descritos.

1.8 MMP-2 e MMP-9

Metaloproteinases compreendem uma família de proteínas capazes de degradar componentes da ECM (PAGE-MCCAW et al., 2007). Estão envolvidas em importantes funções fisiológicas como o remodelamento tecidual e ósseo, angiogênese, desenvolvimento de órgãos e apoptose (HUA et al., 2011). Mas também, podem estimular proteólise, favorecendo a migração celular, sendo relacionadas a processos patológicos como a inflamação e o câncer (GRASSO; BONNET, 2014).

As MMPs regulam processos fisiológicos e de sinalização e tem como importante função manter a interação molecular entre o tumor e estroma (KESSENROCK; PLAKS; WERB, 2010). Avaliar e controlar a expressão das proteases torna-se um importante evento para evitar danos teciduais indesejáveis.

MMP-2 e MMP-9 se diferem pela inserção de três repetições cabeça-cauda ricas em cisteína em seus domínios catalíticos (KESSENROCK et al., 2010). Esses domínios são importantes para localizar eventos de proteólise na superfície celular (STERNLICHT; WERB, 2001).

MMP-2 tem peso molecular de 72 kDa capaz de degradar o colágeno tipo IV encontrado na ECM. MMP-9 é considerada uma das maiores metaloproteinases, com peso molecular de 92 kDa e é responsável pela degradação do colágeno tipo V da ECM (WOESSNER; NAGASE, 2000).

A degradação da ECM incentivada pela ação das metaloproteinases é um importante evento na EMT, pois permite com que ocorra a migração celular observada também no desenvolvimento do câncer. Avaliar a presença dessas gelatinases no câncer nos permite entender melhor os mecanismos de migração e invasão celular que poderão dar origem a metástases.

2 JUSTIFICATIVA

Entender os mecanismos pelos quais o câncer de mama surge permite o desenvolvimento de novas técnicas de controle e diagnóstico desta doença. A exposição aos hormônios sexuais sintéticos e endógenos constitui um importante fator de risco (DUMITRESCU; COTARLA, 2005). Além do consumo de hormônios sintéticos existe também, a exposição a substâncias contaminantes da água e alimentos que são capazes de provocar mutações no DNA e aumentar a capacidade do desenvolvimento do câncer de mama (VANDENBERG et al., 2007). O acúmulo dessas substâncias, no caso BPA e MPA podem incentivar uma cascata de alterações celulares permitindo o desenvolvimento do câncer (GENUIS et al., 2012; VARES et al., 2015; VOM SAAL; WELSHONS, 2006).

MPA comumente usada durante a TRH na menopausa pode aumentar a taxa mitótica de células epiteliais da mama e promover falhas de replicação do DNA quando usada por longos períodos (DAI et al., 2008). Aumenta os riscos para o desenvolvimento do câncer de mama e promove mutações (GHATGE et al., 2005; HOFSETH et al., 1999).

BPA possui uma estrutura homóloga ao 17β -estradiol (E2), propriedades comuns ao estrógeno sendo considerado um disruptor endócrino (GAO et al., 2015; PFEIFER; CHUNG; HU, 2015). Exposição a esse composto promove alterações da síntese do estradiol e testosterona tendo uma grande relação com o desenvolvimento do câncer de mama. BPA tem efeitos acumulativos que podem resultar em danos ao DNA, aumento da proliferação, migração, invasão e apoptose permitindo a progressão do câncer (GAO et al., 2015; GENUIS et al., 2012).

Estimular a linhagem epitelial da mama, MCF- 10A, com drogas hormônio-dependente e hormônio-independente pode estabelecer características tumorais e invasivas como observado no câncer de mama? Esse é o nosso principal questionamento. Caso ocorra transformações desencadeadas pelo uso do BPA e MPA seria possível o desenvolvimento de modelos de transformação celular com essas drogas que contribuam para o estudo dos processos envolvidos em metástases no câncer de mama? Além disso, investigar o comportamento dinâmico das MCF-10A após o tratamento com BPA e MPA nos fará entender se essas células, mesmo na ausência de receptores nucleares para progesterona e estrógeno têm a capacidade de se transformar em células mesenquimais, aumentar a proliferação, migração/invasão e aumentar a expressão de proteínas comuns no câncer de mama.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar os possíveis efeitos carcinogênicos em células MCF-10A após o tratamento com BPA associado ou não ao hormônio MPA.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o dano ao DNA (γ -H2AX), o índice proliferativo (Ki67), o potencial metastático pela expressão de CXCR2, CXCR4, MMP-2 e MMP-9.
- Avaliar a capacidade de invasão das células MCF-10A tratadas com BPA associadas ou não ao MPA através de teste de invasão em Transwell.
- Avaliar a possível transformação mesenquimal das MCF-10A após o tratamento com BPA associado ou não ao MPA analisando a expressão de *CDH1*, *CDH2*, *VIM*, *TWIST1*, *SLUG*, *SNAIL* e *ZEB1*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Drogas e Anticorpos

Fator de crescimento epidérmico (EGF-1 $\mu\text{g/mL}$), insulina de pâncreas bovino (10 $\mu\text{g/mL}$), bisfenol-A (BPA 99%), 17-acetato de medroxiprogesterona (MPA 97%), anfotericina-B (250 $\mu\text{g/mL}$), tripsina 1X, clorofórmio (99,5%), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 mg/mL) foram obtidos de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA. BPA foi diluído em Dimetilsulfóxido (DMSO, Amresco/Enterprise) e MPA foi diluído em Clorofórmio (99,5%). Os anticorpos: CXCR4, CXCR2, γ -H2AX, Ki67, HER2, EGFR, E-caderina e N-caderina foram obtidos de BD Bioscience (San José, CA, EUA).

MARCADORES E FLUOROCROMOS				
PAINEL	MARCADOR	FINALIDADE	FLUOROCROMO	CLONE
PAINEL 1	CXCR4	Avaliar potencial metastático	BV421	12G5 (RUO)
	CXCR2	Avaliar potencial metastático	PE-Cy5	6C6 (RUO)
	γ-H2AX	Avaliar dano ao DNA	AlexaFluor 647	N1-431
	Ki67	Avaliar aumento da proliferação	BV786	B56
PAINEL 2	HER2	Avaliar presença de oncoproteína	APC	Neu 24.7
	EGFR1	Avaliar presença de oncoproteína	BV421	EGFR.1
PAINEL 3	E-caderina	Avaliar perda de marcadores epiteliais	AlexaFluor 647	67A4 (RUO)
	N-caderina	Avaliar ganho de marcadores mesenquimais	AlexaFluor 488	3B9

Tabela 1. Marcadores e fluorocromos usados durante a citometria de fluxo.

4.2 Linhagem celular

Para a realização do estudo usamos a linhagem celular humana, MCF-10A, célula epitelial da mama não transformada. MCF-10A (ATCC® CRL-10317™) foi obtida do banco de células do Rio de Janeiro, Brasil. MCF-10A foi mantida em meio Dulbecco's modificado *Eagle's/Ham's Nutrient Mixture* F12 (DMEM/F12, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com fator de crescimento epidérmico (EGF, 20 ng/mL), insulina de pâncreas bovino (10 µg/mL) e 5% de soro fetal bovino (SFB) (Nutricell, Campinas, Brasil), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL). As culturas de células foram mantidas incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ e repicadas antes de atingirem a confluência.

4.3 Ensaio de transformação maligna da MCF-10A

Células foram plaqueadas a uma densidade de 2,0 x 10⁵ células em placas petri de 12,5 x 37,8 mm, garrafas de cultura de 25 cm² ou placas de cultura com 24 poços e, incubadas a 37 °C, com atmosfera úmida e 5% de CO₂. O início dos tratamentos da cultura de células ocorreu antes de atingiram a confluência. O meio de ensaio usado foi DMEM/F12 suplementado com EGF a 5 ng/mL e 5% de SFB. O experimento foi dividido em células do controle (CT) e células tratadas com DMSO, MPA (231,9 µg, correspondente a 200 µM), BPA (0,68487 µg e 6,8487 µg, correspondente a 1 µM e 10 µM), BPA/MPA (1 µM e 10 µM). As células foram tratadas por 16 dias com BPA (1 µM e 10 µM) (FERNANDEZ; RUSSO, 2010). No 12º dia de tratamento associamos MPA (200 µM) ao BPA (1 µM e 10 µM) (BILIR et al., 2011). Clorofórmio foi usado nos tratamentos em que DMSO e BPA não estavam associados ao MPA. Os meios foram trocados a cada 4 dias e para a determinação do número de células foi feita a contagem utilizando câmara de Neubauer e a viabilidade das células foi determinada por exclusão pelo Azul de Tripan previamente a todos os experimentos.

4.4 PCR em tempo real

RNA total foi extraído das MCF-10A após realização dos tratamentos durante a cultura de células. Para a extração do RNA usamos o Kit Maxwell LEV 16 para células (Promega, Madison, EUA), e o procedimento foi realizado de acordo com as orientações do fabricante. cDNAs foram sintetizados e amplificados usando GoTaq qPCR Master Mix Kit (Promega) de

acordo com o manual. Foi realizado 1 experimento em triplicatas. Sequências de *primers* para E-caderina, Vimentina, N-caderina, Zeb-1, TWIST-1, Slug, Snail, MMP-2, MMP-9 foram obtidos. Os dados mostram mudanças das dobras, fold ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) com intervalo de confiança de 95% em comparação com o gene controle. Cada gene alvo foi normalizado para o gene controle, β-2 microglobulina. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão. Consideramos significativos os resultados com o valor de P< 0,05.

Gene	Sequência de <i>Primers</i>
β-2 microglobulina	FW: TAT CCA GCG TAC TCC AAA GA RV: GGA TGA AAC CCA GAC ACA TAG
E-caderina	FW: GTCATTGAGCCTGGCAATTAG RV: GTTGAGACTCCTCCATTCCCTTC
MMP-2	FW: CATA CAGGATCATTGGCTACAC RV: TCACATCGCTCCAGACTT
MMP-9	FW: AAGGACC GGTT CATTG RV: CCTCGTATA CCGC ATCAATC
N-caderina	FW: CAAGAGCTTGT CAGGATCAG RV: GGGTTCTCCACTTGATTTC
Slug	FW: CTC TCT CCT CTT TCC GGA TAC T RV: GCT TGG ACT GTA GTC TTT CCT C
Snail	FW: CCA CGA GGT GTG ACT AAC TAT G RV: ACC AAA CAG GAG GCT GAA ATA
TWIST-1	FW: CGG AGA CCT AGA TGT CAT TGT TT RV: ACG CCC TGT TTC TTT GAA TTT G
Vimentina	FW: ACTAGAGATGGACAGGTTATCA RV: GTAGGAGTGTGC GTT GTTAAG
Zeb-1	FW: CTC ACA TTC CTC ACT GCC TAA C RV: GAG AAC ATA GCT GAG CTC CAT AAA

FW: Forward; RV: Reverse

Tabela 2. Sequência de primers RT-PCR.

4.5 Citometria de Fluxo

MCF-10A foi plaqueada em placas *petri* de (12,5 x 37,8 mm) a 2.0×10^5 células/placa em DMEM/F12 com EGF 5 ng/mL, anfotericina-B 1 µg/mL, e 5% SFB. Células em pré-confluência foram tratadas conforme já citado na seção 4.3. No 16º dia, os sobrenadantes foram removidos e as células foram desaderidas com tripsina 1X. A suspensão de células foi inativada com SFB e lavadas 3 vezes com PBS 1X, sendo centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos entre as lavagens. A viabilidade celular foi analisada pela exclusão do Azul de Tripan e as células contadas em câmara de Neubauer. O *pellet* foi ressuspensionado em formaldeído a 4% por 10 minutos para fixação, centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos e permeabilização com Triton X-100 a 0,1%. Os anticorpos foram diluídos na proporção de 1:100 (fase realizada no escuro). BV (Brilliant Stain Buffer, BD Bioscience) foi usado de acordo com seu protocolo. Os tubos foram vortexados e incubados durante 60 minutos em temperatura ambiente e em local escuro. As células foram analisadas por citometria de fluxo em citômetro (FACSCANTO II, BD Company, San Diego, CA, EUA). E pelos programas FACSDiva V6.1.3 e FlowJo vX 0.7.

4.6 Ensaio de migração/invasão

O teste de invasão e migração celular foi realizado usando placas de Transwell (Costar, Corning, EUA), com moldes de inserções de membrana de policarbonato (tamanho do poro, 8 µm). Matrigel® (BD Bioscience) foi diluída em meio DMEM sem SFB a 1 mg/mL. 60 µL de Matrigel® a 1 mg/mL foi plaqueado em cada molde de inserção de uma placa de 24 poços. A placa com os moldes de inserção foi mantida a 37 °C durante uma hora para polimerizar o gel. MCF-10A do controle, DMSO e dos tratamentos foram ressuspensas em meio DMEM sem SFB na concentração de 1×10^5 cel/mL. Meio DMEM sem SDF-1α/CXCL12 e meio DMEM com SDF-1α/CXCL12 (20 ng/mL) foram preparados e, 500 µL destes meios com ou sem SDF-1α foram adicionados ao poço inferior da placa. Em cada molde foram colocados 200 µL de meio sem SFB com as células dos controles e tratamentos. O mesmo procedimento foi realizado para a linhagem tumoral MDA-MB-231, célula tumoral invasiva da mama triplo negativa, PR-, ER-, HER2- e EGFR+ que foi usada para comparar se as MCF-10A tratadas tinham a capacidade de migrar e invadir. A placa foi incubada por 24 horas a 37 °C. O meio do molde de inserção foi aspirado e a membrana com Matrigel® limpa com *swab* úmido para retirar as células que não invadiram. Os moldes de inserção foram transferidos para poços limpos

contendo 400 µL de cristal violeta (*Cell Stain Solution*) por 10 minutos. Depois, cada molde foi lavado 10 vezes em água destilada. Fotos da membrana dos moldes de inserção foram obtidas através do microscópio Leica ICC50 (Wetzlar, Germany), no aumento de 10X, pelo software Las Ez. A contagem de células foi realizada pelo ImageJ usando 10 campos aleatórios.

4.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando GraphPad Prism 5.0 (©GraphPad Software Inc., 2007, San Diego, CA, USA). Os dados foram expressos com média ± erro padrão de dois a três experimentos independentes realizados em triplicatas. Dados foram comparados usando os métodos One way ANOVA, Two way ANOVA e T de student, utilizando pós-teste de Tukey. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando P< 0,05 e P< 0,0001.

5 RESULTADOS

5.1 Expressão de proteínas relacionadas a proliferação e invasão celular

Através da análise por citometria de fluxo foi observado que as proteínas CXCR2 e γ-H2AX, não apresentaram alterações em suas medianas de intensidade de fluorescência (**Figura 1 A e B**), enquanto que aumento da expressão de Ki67 e CXCR4 foram obtidos no tratamento com BPA 10 μM/MPA (**Figura 1 B e C**). Em contraste a este resultado, observamos uma baixa expressão desse receptor de quimiocina nos grupos tratados com MPA, BPA 1μM, BPA 1μM/MPA e BPA 10 μM em comparação com os grupos do controle e DMSO (**Figura 1 D**).

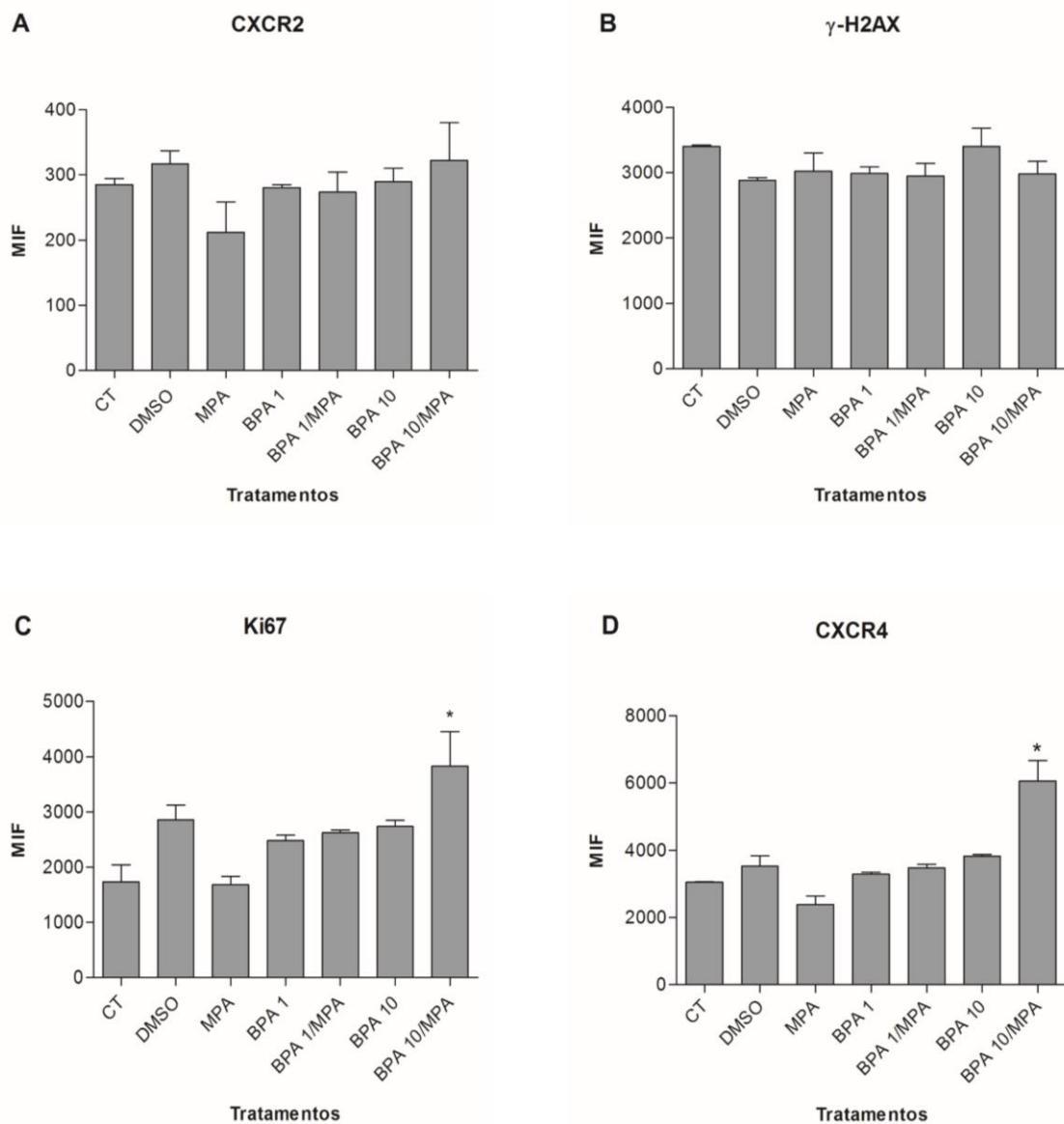


Figura 1. Representação gráfica da mediana da intensidade de fluorescência (MIF) de CXCR2, γ -H2AX, Ki67 e CXCR4. A. e B. CXCR2 e γ -H2AX não apresentaram alterações após tratamento com BPA/MPA nas concentrações de BPA 1 μ M e 10 μ M. C. e D. Ki67 e CXCR4 tiveram aumento da expressão após tratamento com BPA 10 μ M/MPA sugerindo aumento da proliferação e possível capacidade de invasão celular. Todos os dados foram comparados em relação ao grupo controle. A MIF foi obtida pela citometria de fluxo de três experimentos independentes (* $P<0,05$).

5.2 Alteração na expressão de HER2 e EGFR1

Através de análise da mediana de intensidade de fluorescência foi observado que HER2 apresentou aumento da expressão nos tratamentos com BPA 1 µM/MPA, BPA 10 µM e BPA 10 µM/MPA, sendo que houve redução dessa expressão quando estas células foram tratadas com BPA 1 µM (**Figura 2 A**). A expressão de EGFR1 reduziu nos tratamentos BPA 10 µM e BPA 10 µM/MPA (**Figura 2 B**).

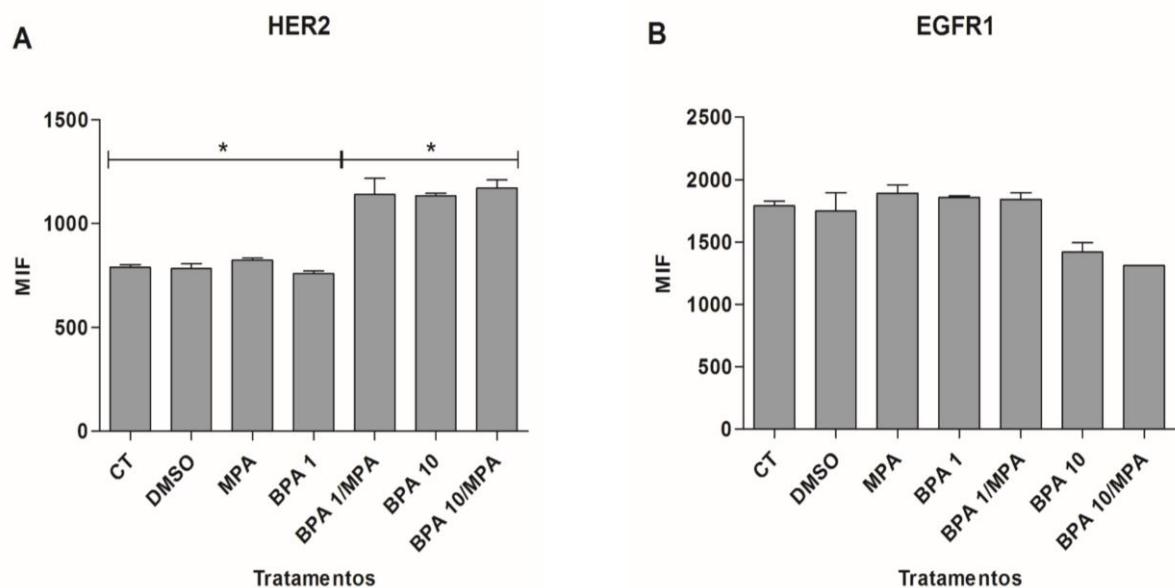


Figura 2. Representação gráfica da mediana de intensidade de fluorescência de HER2, EGFR1. A. HER2 apresenta redução da MIF no tratamento BPA 1 µM e aumento em BPA 1µM/MPA, BPA 10 µM e BPA 10 µM/MPA. B. EGFR1 reduz MIF quando tratado com BPA 10 µM e BPA 10 µM/MPA. Dados comparados em relação ao grupo controle e resultados obtidos pela realização de dois experimentos independentes (*P<0,05).

5.3 Redução da expressão da E-caderina e aumento da N-caderina

Com relação a análise de proteínas, observamos que houve redução da expressão de E-caderina no tratamento BPA 10 μ M em relação ao grupo controle, enquanto que N-caderina apresentou aumento de sua expressão no tratamento BPA 10/MPA. Esses dados nos permitem afirmar que os tratamentos com essas drogas influenciam o fenômeno EMT.

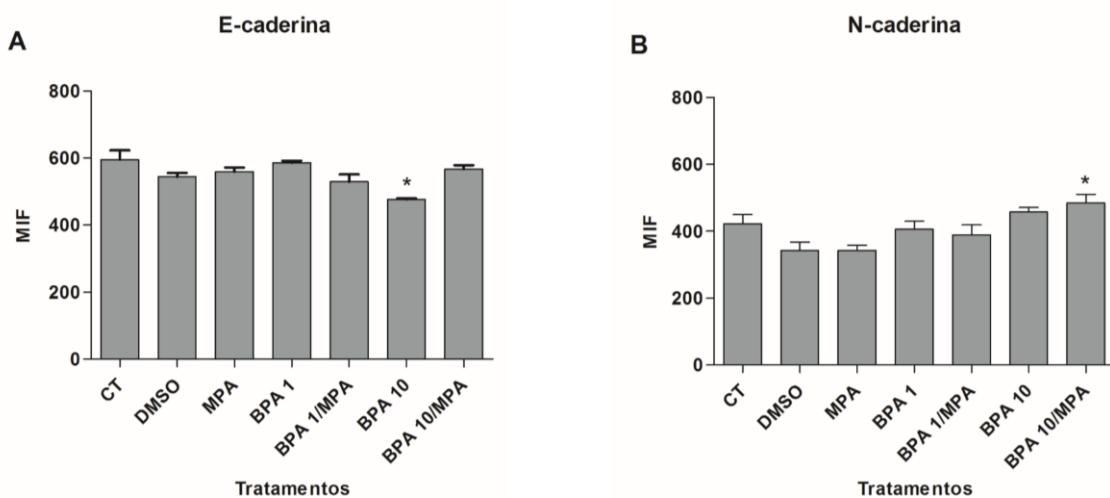


Figura 3. Gráficos da mediana de intensidade de fluorescência de E-caderina e N-caderina. A. E-caderina apresenta maior redução no tratamento com BPA 10 μ M. B. Nota-se aumento da expressão de N-caderina em BPA 10 μ M e BPA 10 μ M/MPA, sendo que houve maior significância neste último. Dados comparados em relação ao grupo controle obtidos de dois experimentos independentes (* $P<0,05$).

5.4 Expressão de genes associados a transição epitélio mesênquima

Dados da análise de expressão gênica mostram redução da expressão do gene *CDH1* nas MCF-10A tratadas com DMSO, MPA, BPA 10 µM e BPA 10 µM/MPA, enquanto que no tratamento com BPA 1 µM a expressão de *CDH1* manteve o mesmo parâmetro do controle. Isso sugere que a MPA quando associada ao BPA influencia na diminuição da expressão desse gene, principalmente quando é usada uma dose maior do BPA (**Figura 4 A**).

O gene *CDH2* apresentou aumento da expressão nos tratamentos com BPA 1 µM, BPA 1 µM/MPA e BPA 10 µM e redução nos demais tratamentos, sendo que nesse caso o aumento da expressão desse gene possa ser influenciado pela presença do BPA (**Figura 4 B**).

VIM apresentou aumento da expressão nos tratamentos BPA 1 µM/MPA, BPA 10 µM e BPA 10µM/MPA e redução no tratamento BPA 1 µM indicando que BPA/MPA ou BPA em altas doses possa alterar a expressão desse gene (**Figura 4 C**).

O gene *SLUG* apresentou aumento de sua expressão no tratamento com DMSO e redução nos tratamentos com MPA, BPA 1 µM/MPA, BPA 10 µM, BPA 10 µM/MPA sugerindo que a associação de BPA/MPA e o uso de BPA em altas concentrações possa influenciar na redução desse gene (**Figura 4 D**).

Aumento da expressão de *TWIST1* observado apenas nos tratamentos BPA 1 µM, BPA 1 µM/MPA e BPA 10 µM/MPA e redução da expressão em DMSO (**Figura 4 E**).

Não foi observada ativação do gene *ZEB1*, apenas é vista redução da expressão em DMSO e BPA 10 µM/MPA (**Figura 4 F**). Dados comparados em relação ao controle (*P<0,05).

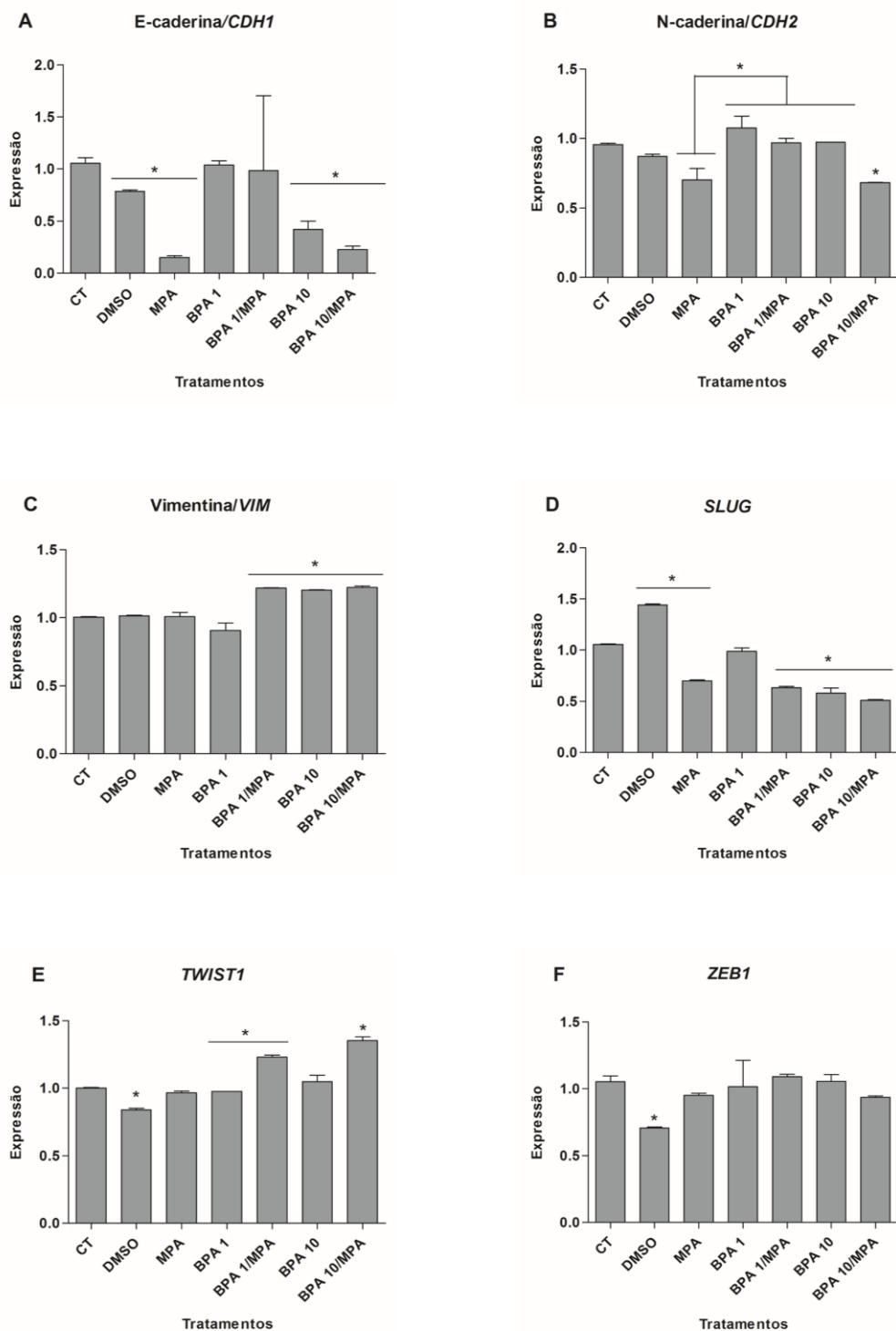


Figura 4. Reação de Cadeia Polimerase RT-PCR. A. Redução da expressão de *CDH1* ocorreu principalmente nos tratamentos DMSO, MPA, BPA 10 μ M e BPA 10 μ M/MPA. B. Aumento da expressão de *CDH2* em BPA 1 μ M, BPA 1 μ M/MPA e BPA 10 μ M e redução nos demais tratamentos (DMSO, MPA e BPA 10 μ M/MPA). C. *VIM* apresentou aumento da expressão nos tratamentos BPA 1 μ M/MPA, BPA 10 μ M e BPA 10 μ M/MPA e redução no

tratamento BPA 1 μ M. **D.** O gene *SLUG* apresentou aumento de sua expressão no tratamento com DMSO e redução nos tratamentos com MPA, BPA 1 μ M/MPA, BPA 10 μ M, BPA 10 μ M/MPA. **E.** Aumento da expressão de *TWIST1* apenas no tratamento BPA 1 μ M, BPA 1 μ M/MPA e BPA 10 μ M/MPA e redução da expressão em DMSO. **F.** Não foi observada ativação do gene *ZEB1*, apenas é vista redução da expressão em DMSO e BPA 10 μ M/MPA. Dados comparados em relação ao controle (* $P<0,05$).

5.5 Aumento da expressão de MMP-2 e MMP-9

Metaloproteinases mostram aumento da expressão na presença de BPA/MPA, sendo que o bisfenol parece ter uma maior influência com relação a este aumento de expressão. Quando observamos o tratamento apenas com MPA não são vistas alterações significativas.

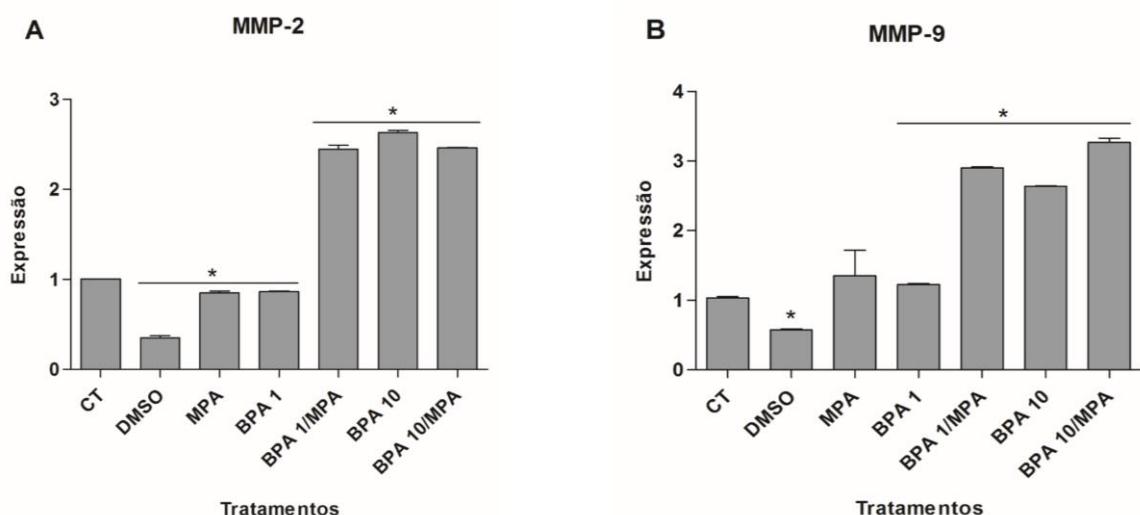
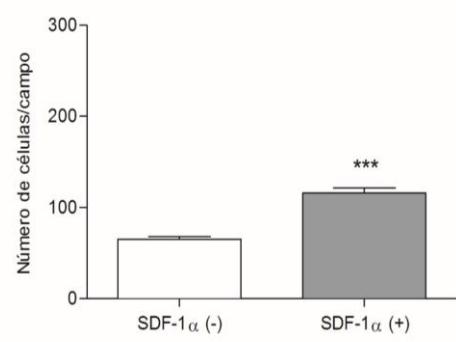


Figura 5. Superexpressão de MMP-2 e MMP-9 nas MCF 10A. **A.** Aumento da expressão de MMP-2 nos tratamentos com BPA 1 μ M/BPA, BPA 10 μ M e BPA 10 μ M/MPA. O tratamento com baixas doses de BPA não mostra alterações em **A** enquanto que em **B** já é observada pequeno aumento. Redução da expressão das MMPs no tratamento com DMSO foi vista tanto em **A** quanto em **B**. **B.** A expressão de MMP-9 também mostrou aumento nos mesmos tratamentos que da MMP-2. Porém, discreto aumento da expressão no tratamento MPA foi observado em **B**. Dados comparados em relação ao controle (* $P<0,05$).

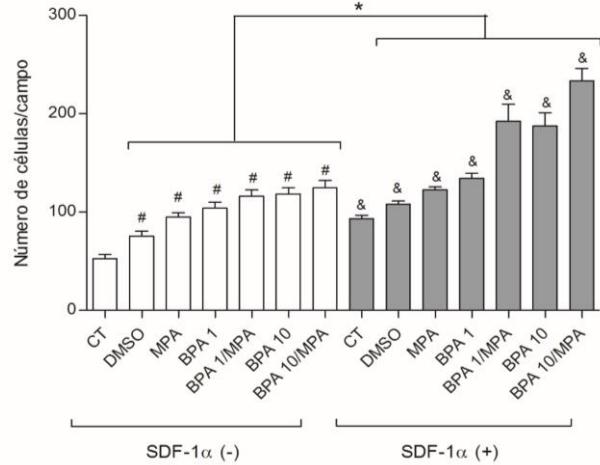
5.6 Aumento da migração/invasão das MCF-10A tratadas

MCF-10A dos diferentes tratamentos foram submetidas a teste de migração/invasão após observamos a alta expressão de Ki67 e CXCR4. SDF-1 α /CXCL12 foi escolhido para avaliar se as células que expressam CXCR4 têm a capacidade de se ligar e promover migração e invasão. Além disso, comparamos a capacidade de migração/invasão das MCF-10A tratadas com a linhagem tumoral da mama, MDA-MB-231, fenótipo triplo negativo e agressivo. Houve aumento da capacidade de migração/invasão nas MCF-10A nos tratamentos com BPA 1 μ M/MPA, BPA 10 μ M e principalmente no BPA 10 μ M/MPA na presença de SDF-1 α /CXCL12, sugerindo a participação do CXCR4. Os tratamentos DMSO, MPA e BPA 1 μ M mostraram a mesma capacidade de migração/invasão na ausência e na presença de SDF-1 α /CXCL12. Entre os tratamentos BPA 1 μ M/MPA, BPA 10 μ M e BPA 10 μ M/MPA, este último apresentou maior capacidade de migração/invasão.

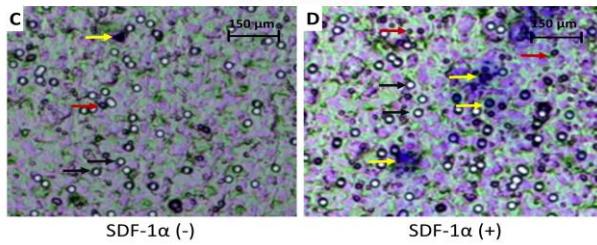
A Ensaio de Migração/Invasão MDA-MB-231



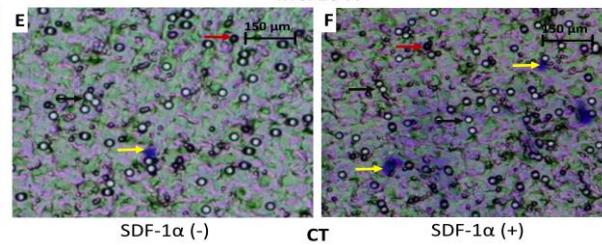
B Ensaio de Migração/Invasão MCF-10A



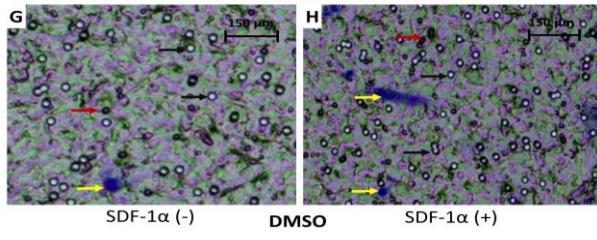
MDA-MB-231



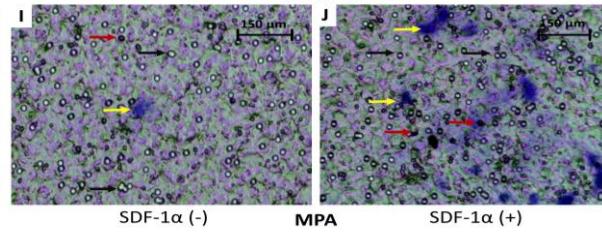
MCF10-A



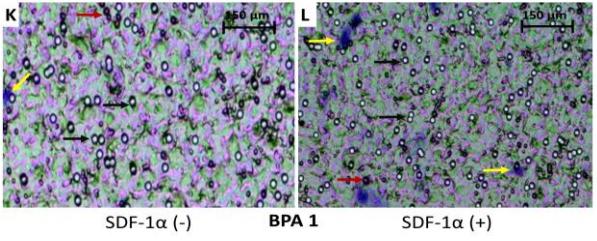
MCF10-A



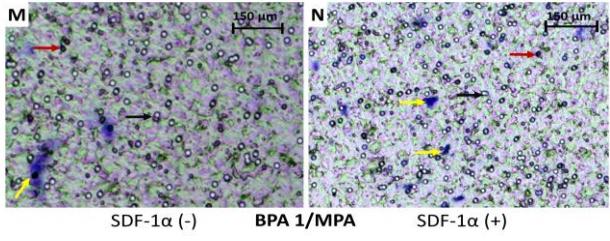
MCF10-A



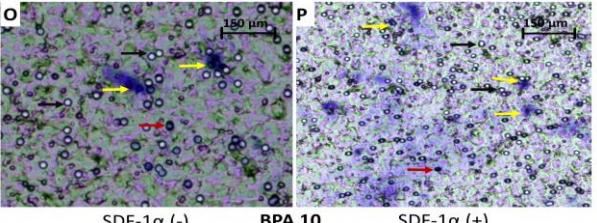
MCF-10A



MCF-10A



MCF-10A



MCF-10A

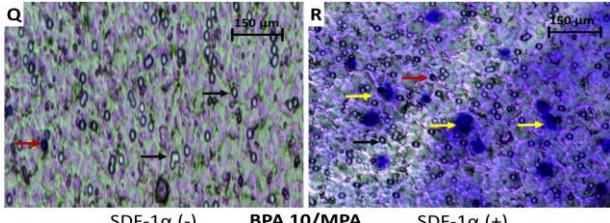


Figura 6. Migração e invasão de células MCF-10A após tratamento com BPA/MPA. **A.** Representação gráfica da migração/invasão da MDA-MB-231. MDA-MB-231 mostra alta capacidade de invasão na presença ou ausência de SDF-1 α /CXCL12, sendo que com SDF-1 α /CXCL12 observamos um aumento ainda maior desse fenômeno, possivelmente pela expressão de CXCR4 (**P< 0,0001). **B.** Representação gráfica da migração das MCF-10A tratadas. A linhagem epitelial da mama MCF-10A após tratamento com BPA/MPA comporta-se de maneira semelhante à MDA-MB-231 (*P< 0,05). **C a R. Ensaio de migração em Transwell.** As fotos **C** e **D** representam o processo de migração e invasão da linhagem tumoral MDA-MB-231 na ausência e presença de SDF-1 α /CXCL12. **R.** MCF-10A tratada com BPA 10 μ M/MPA migram/invadem mais na presença de SDF-1 α /CXCL12. Houve migração/invasão nos demais tratamentos porém, em menor quantidade com relação ao BPA 10 μ M/MPA. As setas pretas indicam os poros do Transwell, as setas vermelhas as células que migraram e as setas amarelas as células que invadiram. Fotos retiradas em microscópio de captura no aumento de 10X, obtidas de dois experimentos independentes.

6 DISCUSSÃO

Estudos recentes mostraram a relação entre o desenvolvimento do câncer de mama e a exposição ao MPA usado na terapia de reposição hormonal durante a menopausa e presente em contraceptivos orais (AEDO et al., 2015). Além disso, um composto conhecido como BPA, amplamente utilizado na fabricação de plásticos tem sido associado ao aumento da incidência do câncer de mama (KONIECZNA; RUTKOWSKA; RACHON, 2015). A Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA) calculou uma dose oral para referência do BPA sendo, 50 µg BPA/kg de peso corporal/dia (WELSHONS et al., 2003).

BPA tem efeitos estrogênicos que alteram a expressão de fatores de crescimento e provoca desregulação do ciclo celular. A utilização do BPA durante a gravidez altera a morfogênese da glândula mamária do feto uma vez que este xenoestrógeno aumenta a sensibilidade da glândula mamária aos hormônios ovarianos (PAULOSE et al., 2015). Pesquisas mostram que estes compostos podem aumentar de forma independente o risco do câncer de mama (QIN et al., 2012; SEEGER; RAKOV; MUECK, 2005), mas ainda, não foram testados em conjunto para avaliar transformações em linhagem celular de mama não tumoral.

Nosso estudo mostra que BPA associado ao MPA em células MCF-10A tiveram efeitos transformantes. Observou-se aumento da expressão de CXCR4, migração e invasão. Além disso, houve redução da expressão da proteína E-caderina e aumento da proteína N-caderina. Com relação aos genes da EMT houve redução da expressão de E-caderina/*CDH1*, *SLUG* e *ZEB1* e aumento da expressão dos genes N-caderina/*CDH2*, Vimentina/*VIM* e *TIWST1*. O gene *CDH1* variou principalmente nos tratamentos em que BPA foi associado ao MPA. Isso mostra que a progesterona pode potencializar a perda da expressão desse gene quando o tratamento está associado ao BPA. Em contrapartida o gene *CDH1* teve redução da expressão no tratamento com BPA 10 µM. A EMT é um evento que precede o processo de invasão e metástase de células tumorais e pode ocorrer independentemente das alterações na proliferação. Perda de E-caderina reduz adesão célula-célula e implica na invasão tumoral e metástase. As células originadas da EMT adquirem a capacidade de migração e invasão local e a progesterona pode ser envolvida neste processo porque a EMT regula os genes do receptor da insulina substrato 2, IRS-2 (gene regulado PR-B) aumentando CXCR4 e a motilidade celular (LANGE, 2008; VARES et al., 2015; WENDEL et al., 2012).

Com relação ao gene *CDH2*, houve alteração nos tratamentos com BPA 1 µM, BPA 1 µM/MPA e BPA 10 µM que mostra aumento de sua expressão, enquanto que os demais

mostraram redução das expressões em relação ao grupo controle. Enquanto que N-caderina mostrou maior expressão no tratamento BPA 10 µM/MPA. O aumento da expressão de N-caderina é observado no fenômeno EMT e traduz um importante evento no câncer. N-caderina é um marcador mesenquimal envolvido no processo de migração e invasão tumoral (MORENO-BUENO et al., 2008).

O gene *VIM* apresentou aumento da expressão nos tratamentos BPA 1 µM/MPA, BPA 1 µM e BPA 10 µM/MPA enquanto que *TWIST1* mostrou redução da expressão nos tratamentos com DMSO e BPA 10 µM e aumento em BPA 1 µM, BPA 1 µM/MPA e BPA 10 µM/MPA. O aumento da expressão dos genes *VIM* e *TWIST1* indicam que BPA/MPA têm a capacidade de alterar células e fazer com que estas ganhem marcadores mesenquimais observados na transição epitélio mesênquima (GARG, 2013). Além disso, a repressão de E-caderina e aumento de N-caderina podem ser incentivados pela expressão de *TWIST1* (FU; QIN; et al., 2011). Apesar disso, observamos redução da expressão de *SLUG* e *ZEB1* na maior parte dos tratamentos. Lembrando que inibição de ZEB1 por miR-200 na EMT parcial induz fenótipo mesenquimal-epitelial em vários tipos de câncer (SANCHEZ-TILLO et al., 2012).

Tem sido demonstrada que a desregulação da expressão do complexo E-caderina/β-catenina também é responsável pela invasão e metástase no câncer colo-rectal (CRC) (CHOI et al., 2009; LI et al., 2010), indicando que o eixo CXCR4/SDF-1α está correlacionado com a expressão do complexo E-caderina/β-catenina na invasão e metástase no CRC (WANG, L. et al., 2011). O eixo CXCR4/SDF-1α estimula a fosforilação de PI3K/AKT e β-catenina. A diminuição da regulação de β-catenina pode ser induzida pela diminuição da expressão de mRNA de β-catenina e aumento da fosforilação de PI3K/AKT. O inibidor de PI3K, LY294002, pode inibir a fosforilação induzida por SDF-1α de PI3K/AKT e β-catenina (WANG, L. et al., 2011).

No presente estudo não houve EMT típico, mas observou-se redução da expressão de E-caderina e ganho de fenótipo invasivo. Não houve aumento considerável da regulação de todos os repressores de E-caderina, que são fatores de transcrições envolvidos em EMT, apesar de outros marcadores de EMT prototípico, tais como N-caderina e Vimentina apresentarem aumento não podemos assumir que estas células foram submetidas a um EMT típico. A perda de marcadores epiteliais envolvidas na adesão celular é necessária para a invasão e a motilidade e, por conseguinte, metástases (RODRIGUEZ; LEWIS-TUFFIN; ANASTASIADIS, 2012). No entanto, alguns trabalhos observaram que os fenômenos prototípicos envolvidos na formação do tumor secundário é um EMT parcial, isto é, uma célula que sofre um EMT sem perder a

capacidade para retornar o fenótipo epitelial (JIA et al., 2015). Como outros fatores de transcrição e alguns microRNAs estão envolvidos nesse EMT parcial, também conhecido como EMT híbrido, e nós abordamos os fatores de transcrição tradicionais na EMT (SLUG, SNAIL, TWIST1 e ZEB1), assumimos que a perda de E-caderina, ganho de N-caderina e Vimentina, além das MMPs e a regulação positiva de CXCR4, foram fundamentais para ganhar a capacidade de invasão (SARRIO et al., 2008).

CXCR4 é um receptor de quimiocina associado ao crescimento tumoral, invasão e metástase através de indução da transformação celular, angiogênese e secreção de proteases, relacionadas com as metástases ósseas no câncer da mama (DEWAN et al., 2006; KINGSLEY et al., 2007; NGUYEN; BOS; MASSAGUE, 2009). Observou-se aumento da mediana da intensidade de fluorescência (MIF) da proteína CXCR4 em células MCF-10A tratadas com o protocolo BPA 10 µM/MPA. Provavelmente, esse fenômeno está relacionado com o efeito glicocorticoide da MPA. Este composto pode se ligar ao receptor de glicocorticoides (GR) com uma afinidade elevada e atua como um agonista parcial para o GR (TOMASICCHIO et al., 2013). A ativação de GR pela MPA, influencia o aumento da expressão de CXCR4. Outra explicação sobre o aumento de CXCR4 reside no fato de que MCF-10A expressa o receptor de progesterona na membrana, capaz de ser ativado pelo MPA. Isto poderia explicar como as células epiteliais tratadas com progestinas, usadas nas TRH, aumentam a expressão de CXCR4 (SHIAH et al., 2015).

Receptores de progesterona na membrana (mPRs) podem iniciar múltiplas vias de sinalização associadas com a ativação da proteína G. Estudos recentes têm demonstrado que ativação de mPR pode resultar na ativação ou repressão da via PI3K/AKT. Ativação de mPR por MPA via PI3K/AKT/NFκβ pode promover a progressão pré-neoplásica em mama normal, estimula a proliferação de células tumorais em estágios iniciais da doença, mas suprime a invasão tumoral e metástases no câncer de mama avançado, prevenindo EMT (VARES et al., 2015). Isso explicaria a via usada para sinalização da progesterona em células MCF-10A que não possuem receptores nucleares para progesterona. No caso seria ativado os receptores de membrana plasmática como PGRC1 e receptores da família (α - ϵ) (COOKE et al., 2013).

Porém, no estudo realizado por MOLINA-ORTIZ et al., (2009) foi observado que a expressão da E-caderina pode estar aumentada no melanoma avançado e que este fato reduziria o potencial metastático dessas células. Apesar do melanoma expressar CXCR4 e apresentar invasividade na presença de seu ligante SDF-1 α /CXCL12 em estágios iniciais da doença, o

aumento da expressão de E-caderina pela inibição da proteína p190RhoGAP-Rho-A garante a redução da invasão (MOLINA-ORTIZ et al., 2009).

Em nosso estudo BPA/MPA estão preparando as células MCF-10A para um processo de invasão que envolve a perda parcial de marcadores epiteliais e ganho de marcadores mesenquimais. BPA atua como o estrógeno e em associação ao MPA, que atua como a progesterona, têm a capacidade de aumentar a proliferação celular, reduzir E-caderina, aumentar expressão de CXCR4 e MMPs. No desenvolvimento da mama normal é necessária a atuação conjunta do ER e PR, ambos, ativam os receptores de fatores de crescimento (GRAHAM et al., 2009).

Estudos mostram que a inibição de CXCR4 pela molécula AMD3100 induz a expressão do gene *CDH1* e inibe a expressão do gene *CDH2* em células MDA-MB-361 (RHODES; BRATTON; et al., 2011). O silenciamento de CXCR4 em células do câncer de próstata diminui a expressão de VEGF e MMP-9, inibindo a proliferação e metástase (WANG, Q. et al., 2011). Em nosso estudo observamos que a redução da expressão de *CDH1*, aumento de *CDH2*, *VIM* e *TWIST1* e aumento da expressão de CXCR4 foram relacionados ao aumento das MMP-2 e MMP-9.

Além disso, nosso estudo mostra que o aumento da expressão de CXCR4 foi associado com o aumento da migração/invasão. MCF-10A tratadas com o protocolo BPA/MPA aumentaram a sua capacidade de migração/invasão em comparação com o protocolo BPA, sob a estimulação de SDF-1 α /CXCL12 (ligante específico de CXCR4). É importante ressaltar que os pacientes com câncer de mama ER $^+$ e CXCR4 $^+$ presentes tem sobrevida global menor em comparação com ER $^-$ e CXCR4 $^+$, devido ao aumento de metástases (SAHA ROY; VADLAMUDI, 2012). CXCR4 ativa a transcrição de genes mediada por ER via fosforilação do ER β pelos membros da família da MAPK. Este *cross-talk* ER-CXCR4 é independente da necessidade de estrógeno, iniciando um mecanismo autócrino de crescimento (RHODES; SHORT; et al., 2011).

Portanto, o tratamento das MCF-10A com BPA/MPA ativa importantes vias no processo de invasão e progressão tumoral, sendo a via do CXCR4 uma destas. Isso foi comprovado pelo ensaio de invasão com a presença de SDF-1 α /CXCL12 ligante de CXCR4. As células tratadas em diferentes concentrações destes compostos têm receptor CXCR4 ativo comprovado pelo aumento da invasão na presença de SDF-1 α , mostrando a capacidade de transformação *in vitro* de células epiteliais da mama da linhagem não-tumoral.

No entanto, não observamos alterações na expressão de γ -H2AX após o tratamento das MCF-10A, mas por este fato apenas não podemos afirmar que essas células não estejam sofrendo algum tipo de dano ao DNA. A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi sugerida como explicação para a toxicidade do BPA ao DNA celular (KOVACIC, 2010). A expressão de CXCR2 não sofreu grandes alterações. Com relação aos marcadores do fator de crescimento epidérmico associados ao aumento da agressividade tumoral, foi observado que HER2 apresentou aumento nos tratamentos com BPA 1 μ M/BPA, BPA 10 μ M, BPA 10 μ M/MPA e EGFR1, reduziu sua expressão.

Além disso, foi confirmada a expressão de Ki67, uma proteína nuclear relacionada com a proliferação celular. A expressão de Ki67 foi maior no tratamento com BPA 10 μ M/MPA, mostrando que o MPA tem a capacidade de estimular crescimento celular em células epiteliais PR⁺ possivelmente pela ativação da via da MAP quinases subsequente a ativação do substrato PI3K (KRAMER et al., 2006). Porém, este fato depende da ação do BPA que neste caso, influenciou o aumento quando na concentração de 10 μ M. BPA tem efeito acumulativo podendo ser detectado na urina, sangue, leite materno e tecido adiposo da mama (FENICHEL; CHEVALIER; BRUCKER-DAVIS, 2013; LASSEN et al., 2014; PERETZ et al., 2014; YI et al., 2013) e mesmo em baixas doses pode incentivar o aumento da proliferação celular (PFEIFER et al., 2015) como observado em nossos resultados.

Quanto aos efeitos invasivos e da EMT parcial induzida pelo protocolo BPA/MPA, as células alteraram a capacidade de proliferação. Este fato pode ter auxiliado o processo de migração e invasão dessas células. A migração e invasão celular estão envolvidos em um complexo conjunto de alterações morfológicas celulares, incluindo principalmente a reorganização do citoesqueleto de actina responsável pela geração de capacidade de locomoção celular (MERDAD et al., 2014; TUCCI et al., 2007).

Outro fato associado com invasividade foi observado. MMP-2 e MMP-9 foram mais expressas em tratamentos com BPA 10 μ M e BPA 10 μ M/MPA. A secreção de MMP-2 e MMP-9 e a estimulação das integrinas na matriz extracelular facilita a motilidade e a proliferação celular por degradação de colágeno tipo IV na membrana basal e podem aumentar a biodisponibilidade dos fatores de crescimento (BAUVOIS, 2012; DAVIES, 2014; JEZIERSKA; MOTYL, 2009).

BPA afeta a ativação do Aryl Hidrocarbono (AH) e não demonstrou efeitos agonistas significativos (KRUGER; LONG; BONEFELD-JORGENSEN, 2008; SAFE; LEE; JIN, 2013). Estudos mostraram que baixas doses, 100 μ M - 438 μ M, de BPA têm a capacidade de mediar

efeitos tóxicos no receptor conhecido como Major Hydrocarbono Aryl (AHR) expressos em vários tecidos e órgãos (ZIV-GAL et al., 2013). AHR é expresso em várias linhas celulares tumorais e bloqueio de AHR resultou na diminuição da proliferação, migração celular e invasão (SAFE et al., 2013). Testes com MDA-MB-231, linhagem tumoral do câncer de mama e ER⁻ sugeriu que a resposta AHR é dependente da expressão de ER- α (WANG, X. et al., 1995). AHR-Rb medeia a repressão de E2F1, induz a diferenciação de marcadores, inibe a invasão celular diminuindo a regulação de CXCR4 em células MCF-7, ER⁺ e em MDA-MB-231, ER⁻ e outros tipos celulares (BARHOOVER et al., 2010). O receptor AHR é ativo nas MCF-10A pré-confluentes pelo fato da presença dos citocromos P450 (CYP1A1 e CYP1S1) responsáveis por ativar a transcrição desse receptor (RIVERA; SAARIKOSKI; HANKINSON, 2002), enquanto que, nas MCF-10A confluentes, AHR é inativo devida ausência desses citocromos (FU; FANG; et al., 2011; THOMAS et al., 2006).

O BPA quando associado ao MPA influenciou no aumento de fatores relacionados ao fenótipo agressivo em células epiteliais da mama, o que chama a nossa atenção para um maior controle sobre o uso dessa categoria de hormônio e exposição a materiais que possuem difenol em sua composição.

7 CONCLUSÃO

Com esses resultados comprovamos que BPA associado ao MPA:

- Têm a capacidade de alterar as células epiteliais mamárias não-transformadas *in vitro*;
- Conferem várias propriedades típicas no câncer, como o aumento da proliferação celular, aumento da expressão de proteínas envolvidas em metástases, aumento da regulação de genes envolvidos na EMT parcial com diminuição da regulação dos marcadores epiteliais;
- Este é o primeiro estudo que analisou a interação do MPA, um hormônio amplamente utilizado na TRH e em contraceptivos orais, em associação ao BPA, um xenoestrógeno presente em diversos objetos plásticos;
- A caracterização fenotípica deve ser realizada para provar que o BPA e MPA induz EMT parcial;
- Nosso estudo prova que BPA associado ao MPA tem efeitos transformantes, o que nos incentiva a tomar medidas de controle da exposição e uso desses compostos em nosso país.

REFERÊNCIAS

AEDO, S. et al. Women's Health Initiative estrogen plus progestin clinical trial: a study that does not allow establishing relevant clinical risks. **Menopause**, May 11 2015.

BAISCH, H.; GERDES, J. Identification of proliferating cells by Ki-67 antibody. **Methods Cell Biol**, v. 33, p. 217-26, 1990.

BARHOOVER, M. A. et al. Aryl hydrocarbon receptor regulates cell cycle progression in human breast cancer cells via a functional interaction with cyclin-dependent kinase 4. **Mol Pharmacol**, v. 77, n. 2, p. 195-201, Feb 2010.

BATTULA, V. L. et al. Epithelial-mesenchymal transition-derived cells exhibit multilineage differentiation potential similar to mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 28, n. 8, p. 1435-45, Aug 2010.

BAUVOIS, B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. **Biochim Biophys Acta**, v. 1825, n. 1, p. 29-36, Jan 2012.

BETANCOURT, A. M. et al. Proteomic analysis in mammary glands of rat offspring exposed in utero to bisphenol A. **J Proteomics**, v. 73, n. 6, p. 1241-53, Apr 18 2010.

BHOWMICK, N. A.; NEILSON, E. G.; MOSES, H. L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 332-7, Nov 18 2004.

BILIR, A. et al. Combination of imatinib mesylate with lithium chloride and medroxyprogesterone acetate is highly active in Ishikawa endometrial carcinoma in vitro. **J Gynecol Oncol**, v. 22, n. 4, p. 225-32, Dec 2011.

BILL, R.; CHRISTOFORI, G. The relevance of EMT in breast cancer metastasis: Correlation or causality? **FEBS Lett**, v. 589, n. 14, p. 1577-87, Jun 22 2015.

BISSELL, M. J.; RADISKY, D. Putting tumours in context. **Nat Rev Cancer**, v. 1, n. 1, p. 46-54, Oct 2001.

BLANCO, M. J. et al. Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. **Oncogene**, v. 21, n. 20, p. 3241-6, May 9 2002.

BONNER, W. M. et al. GammaH2AX and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 8, n. 12, p. 957-67, Dec 2008.

BOYLE, P.; LEVIN, B. **World cancer report 2008.** Word Health Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC) 2008.

BRAY, F.; MCCARRON, P.; PARKIN, D. M. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. **Breast Cancer Res**, v. 6, n. 6, p. 229-39, 2004.

BURKHART, D. L.; SAGE, J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. **Nat Rev Cancer**, v. 8, n. 9, p. 671-82, Sep 2008.

CAVALLARO, U.; CHRISTOFORI, G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 2, p. 118-32, Feb 2004.

CAVALLARO, U.; SCHAFFHAUSER, B.; CHRISTOFORI, G. Cadherins and the tumour progression: is it all in a switch? **Cancer Lett**, v. 176, n. 2, p. 123-8, Feb 25 2002.

CHARO, I. F.; RANSOHOFF, R. M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. **N Engl J Med**, v. 354, n. 6, p. 610-21, Feb 9 2006.

CHEN, W. T. et al. Systematic identification of functional residues in mammalian histone H2AX. **Mol Cell Biol**, v. 33, n. 1, p. 111-26, Jan 2013.

CHENG, N. et al. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. **Mol Cancer Res**, v. 6, n. 10, p. 1521-33, Oct 2008.

CHOI, H. N. et al. Serum response factor enhances liver metastasis of colorectal carcinoma via alteration of the E-cadherin/beta-catenin complex. **Oncol Rep**, v. 21, n. 1, p. 57-63, Jan 2009.

COOKE, P. S. et al. Therapeutic effects of progesterone and its metabolites in traumatic brain injury may involve non-classical signaling mechanisms. **Front Neurosci**, v. 7, p. 108, 2013.

COUSSENS, L. M.; FINGLETON, B.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. **Science**, v. 295, n. 5564, p. 2387-92, Mar 29 2002.

COWIN, P.; WELCH, D. R. Breast cancer progression: controversies and consensus in the molecular mechanisms of metastasis and EMT. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 12, n. 2-3, p. 99-102, Sep 2007.

DAI, J. et al. Roles of hormone replacement therapy and iron in proliferation of breast epithelial cells with different estrogen and progesterone receptor status. **Breast**, v. 17, n. 2, p. 172-9, Apr 2008.

- DAVIES, K. J. The Complex Interaction of Matrix Metalloproteinases in the Migration of Cancer Cells through Breast Tissue Stroma. **Int J Breast Cancer**, v. 2014, p. 839094, 2014.
- DEWAN, M. Z. et al. Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 receptor interaction in tumor growth and metastasis of breast cancer. **Biomed Pharmacother**, v. 60, n. 6, p. 273-6, Jul 2006.
- DUMITRESCU, R. G.; COTARLA, I. Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? **J Cell Mol Med**, v. 9, n. 1, p. 208-21, Jan-Mar 2005.
- ELLSWORTH, R. E. et al. Breast cancer in the personal genomics era. **Curr Genomics**, v. 11, n. 3, p. 146-61, May 2010.
- ELLSWORTH, R. E. et al. Chromosomal alterations associated with the transition from in situ to invasive breast cancer. **Ann Surg Oncol**, v. 15, n. 9, p. 2519-25, Sep 2008.
- FACINA, T. Estimativa 2014 - Incidência do Câncer no Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 60, n. 1, p. 63, 2014.
- FENICHEL, P.; CHEVALIER, N.; BRUCKER-DAVIS, F. Bisphenol A: an endocrine and metabolic disruptor. **Ann Endocrinol (Paris)**, v. 74, n. 3, p. 211-20, Jul 2013.
- FERNANDEZ, S. V.; RUSSO, J. Estrogen and xenoestrogens in breast cancer. **Toxicol Pathol**, v. 38, n. 1, p. 110-22, Jan 2010.
- FIEGE, H. et al. **Phenol Derivatives, In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 2000.
- FIERRO, F. A. et al. Marrow-derived mesenchymal stem cells: role in epithelial tumor cell determination. **Clin Exp Metastasis**, v. 21, n. 4, p. 313-9, 2004.
- FREITAS, V. M. et al. SIKVAV, a laminin alpha1-derived peptide, interacts with integrins and increases protease activity of a human salivary gland adenoid cystic carcinoma cell line through the ERK 1/2 signaling pathway. **Am J Pathol**, v. 171, n. 1, p. 124-38, Jul 2007.
- FU, J. et al. Regulation of estrogen sulfotransferase expression by confluence of MCF10A breast epithelial cells: role of the aryl hydrocarbon receptor. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 339, n. 2, p. 597-606, Nov 2011.
- FU, J. et al. The TWIST/Mi2/NuRD protein complex and its essential role in cancer metastasis. **Cell Res**, v. 21, n. 2, p. 275-89, Feb 2011.

GAO, H. et al. Bisphenol A and hormone-associated cancers: current progress and perspectives. **Medicine (Baltimore)**, v. 94, n. 1, p. e211, Jan 2015.

GARG, M. Epithelial-mesenchymal transition - activating transcription factors - multifunctional regulators in cancer. **World J Stem Cells**, v. 5, n. 4, p. 188-95, Oct 26 2013.

GEENS, T. et al. A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. **Food Chem Toxicol**, v. 50, n. 10, p. 3725-40, Oct 2012.

GENUIS, S. J. et al. Human excretion of bisphenol A: blood, urine, and sweat (BUS) study. **J Environ Public Health**, v. 2012, p. 185731, 2012.

GERDES, J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. **Semin Cancer Biol**, v. 1, n. 3, p. 199-206, Jun 1990.

GERDES, J. et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **Int J Cancer**, v. 31, n. 1, p. 13-20, Jan 15 1983.

GHATGE, R. P. et al. The progestational and androgenic properties of medroxyprogesterone acetate: gene regulatory overlap with dihydrotestosterone in breast cancer cells. **Breast Cancer Res**, v. 7, n. 6, p. R1036-50, 2005.

GRAHAM, J. D. et al. DNA replication licensing and progenitor numbers are increased by progesterone in normal human breast. **Endocrinology**, v. 150, n. 7, p. 3318-26, Jul 2009.

GRASSO, G.; BONNET, S. Metal complexes and metalloproteases: targeting conformational diseases. **Metallomics**, v. 6, n. 8, p. 1346-57, Aug 2014.

GRUNERT, S.; JECHLINGER, M.; BEUG, H. Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 4, n. 8, p. 657-65, Aug 2003.

GUARINO, M.; RUBINO, B.; BALLABIO, G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. **Pathology**, v. 39, n. 3, p. 305-18, Jun 2007.

GUPTA, G. P.; MASSAGUE, J. Cancer metastasis: building a framework. **Cell**, v. 127, n. 4, p. 679-95, Nov 17 2006.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 7 2000.

_____. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 4 2011.

HAY, E. D. An overview of epithelial-mesenchymal transformation. **Acta Anat (Basel)**, v. 154, n. 1, p. 8-20, 1995.

HAZAN, R. B. et al. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. **J Cell Biol**, v. 148, n. 4, p. 779-90, Feb 21 2000.

HIRSCH, F. R.; VARELLA-GARCIA, M.; CAPPUZZO, F. Predictive value of EGFR and HER2 overexpression in advanced non-small-cell lung cancer. **Oncogene**, v. 28 Suppl 1, p. S32-7, Aug 2009.

HOFSETH, L. J. et al. Hormone replacement therapy with estrogen or estrogen plus medroxyprogesterone acetate is associated with increased epithelial proliferation in the normal postmenopausal breast. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 84, n. 12, p. 4559-65, Dec 1999.

HU, M.; POLYAK, K. Molecular characterisation of the tumour microenvironment in breast cancer. **Eur J Cancer**, v. 44, n. 18, p. 2760-5, Dec 2008.

HUA, H. et al. Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm. **Cell Mol Life Sci**, v. 68, n. 23, p. 3853-68, Dec 2011.

HUBER, M. A.; KRAUT, N.; BEUG, H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. **Curr Opin Cell Biol**, v. 17, n. 5, p. 548-58, Oct 2005.

INCA, I. N. D. C. Incidência de Câncer no Brasil. 2014.

IQBAL, N.; IQBAL, N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. **Mol Biol Int**, v. 2014, p. 852748, 2014.

ISLAM, S. et al. Expression of N-cadherin by human squamous carcinoma cells induces a scattered fibroblastic phenotype with disrupted cell-cell adhesion. **J Cell Biol**, v. 135, n. 6 Pt 1, p. 1643-54, Dec 1996.

JENKINS, S. et al. Chronic oral exposure to bisphenol A results in a nonmonotonic dose response in mammary carcinogenesis and metastasis in MMTV-erbB2 mice. **Environ Health Perspect**, v. 119, n. 11, p. 1604-9, Nov 2011.

JEZIERSKA, A.; MOTYL, T. Matrix metalloproteinase-2 involvement in breast cancer progression: a mini-review. **Med Sci Monit**, v. 15, n. 2, p. RA32-40, Feb 2009.

JIA, D. et al. OVOL guides the epithelial-hybrid-mesenchymal transition. **Oncotarget**, v. 6, n. 17, p. 15436-48, Jun 20 2015.

JOLLY, M. K. et al. Implications of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotype in Metastasis. **Front Oncol**, v. 5, p. 155, 2015.

KALLURI, R.; NEILSON, E. G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. **J Clin Invest**, v. 112, n. 12, p. 1776-84, Dec 2003.

KESSEN BROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 52-67, Apr 2 2010.

KEY, T. J.; VERKASALO, P. K.; BANKS, E. Epidemiology of breast cancer. **Lancet Oncol**, v. 2, n. 3, p. 133-40, Mar 2001.

KINGSLEY, L. A. et al. Molecular biology of bone metastasis. **Mol Cancer Ther**, v. 6, n. 10, p. 2609-17, Oct 2007.

KNUDSEN, K. A.; WHEELOCK, M. J. Cadherins and the mammary gland. **J Cell Biochem**, v. 95, n. 3, p. 488-96, Jun 1 2005.

KONIECZNA, A.; RUTKOWSKA, A.; RACHON, D. Health risk of exposure to Bisphenol A (BPA). **Rocznik Panstw Zakl Hig**, v. 66, n. 1, p. 5-11, 2015.

KOVACIC, P. How safe is bisphenol A? Fundamentals of toxicity: metabolism, electron transfer and oxidative stress. **Med Hypotheses**, v. 75, n. 1, p. 1-4, Jul 2010.

KRAMER, E. A. et al. The effects of progesterone, medroxyprogesterone acetate, and norethisterone on growth factor- and estradiol-treated human cancerous and noncancerous breast cells. **Menopause**, v. 12, n. 4, p. 468-74, Jul-Aug 2005.

_____. Characterization of the stimulatory effect of medroxyprogesterone acetate and chlormadinone acetate on growth factor treated normal human breast epithelial cells. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 98, n. 2-3, p. 174-8, Feb 2006.

KRUGER, T.; LONG, M.; BONEFELD-JORGENSEN, E. C. Plastic components affect the activation of the aryl hydrocarbon and the androgen receptor. **Toxicology**, v. 246, n. 2-3, p. 112-23, Apr 18 2008.

KUO, L. J.; YANG, L. X. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. **In Vivo**, v. 22, n. 3, p. 305-9, May-Jun 2008.

LANDI, S. et al. Association of common polymorphisms in inflammatory genes interleukin (IL)6, IL8, tumor necrosis factor alpha, NFKB1, and peroxisome proliferator-activated receptor gamma with colorectal cancer. **Cancer Res**, v. 63, n. 13, p. 3560-6, Jul 1 2003.

LANGE, C. A. Challenges to defining a role for progesterone in breast cancer. **Steroids**, v. 73, n. 9-10, p. 914-21, Oct 2008.

LASSEN, T. H. et al. Urinary bisphenol A levels in young men: association with reproductive hormones and semen quality. **Environ Health Perspect**, v. 122, n. 5, p. 478-84, May 2014.

LEE, J. M. et al. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. **J Cell Biol**, v. 172, n. 7, p. 973-81, Mar 27 2006.

LEROY, P.; MOSTOV, K. E. Slug is required for cell survival during partial epithelial-mesenchymal transition of HGF-induced tubulogenesis. **Mol Biol Cell**, v. 18, n. 5, p. 1943-52, May 2007.

LI, J. N. et al. [Effects of K-ras gene mutation on colon cancer cell line Caco-2 metastasis by regulating E-cadherin/beta-catenin/p120 protein complex formation and RhoA protein activity]. **Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao**, v. 32, n. 1, p. 46-50, Feb 2010.

LOCHTER, A. et al. Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. **J Cell Biol**, v. 139, n. 7, p. 1861-72, Dec 29 1997.

LU, M. et al. MicroRNA-based regulation of epithelial-hybrid-mesenchymal fate determination. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 45, p. 18144-9, Nov 5 2013.

LUSTER, M. I.; SIMEONOVA, P. P. Asbestos induces inflammatory cytokines in the lung through redox sensitive transcription factors. **Toxicol Lett**, v. 102-103, p. 271-5, Dec 28 1998.

MARTIN, T. A.; JIANG, W. G. Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1788, n. 4, p. 872-91, Apr 2009.

MERDAD, A. et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer: MMP-9 as a potential biomarker for cancer invasion and metastasis. **Anticancer Res**, v. 34, n. 3, p. 1355-66, Mar 2014.

MOLINA-ORTIZ, I. et al. Overexpression of E-cadherin on melanoma cells inhibits chemokine-promoted invasion involving p190RhoGAP/p120ctn-dependent inactivation of RhoA. **J Biol Chem**, v. 284, n. 22, p. 15147-57, May 29 2009.

MOLLOY, A. P. et al. Mesenchymal stem cell secretion of chemokines during differentiation into osteoblasts, and their potential role in mediating interactions with breast cancer cells. **Int J Cancer**, v. 124, n. 2, p. 326-32, Jan 15 2009.

MORENO-BUENO, G.; PORTILLO, F.; CANO, A. Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. **Oncogene**, v. 27, n. 55, p. 6958-69, Nov 24 2008.

MURPHY, P. M. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. **N Engl J Med**, v. 345, n. 11, p. 833-5, Sep 13 2001.

NAKAYA, Y.; SHENG, G. EMT in developmental morphogenesis. **Cancer Lett**, v. 341, n. 1, p. 9-15, Nov 28 2013.

NGUYEN, D. X.; BOS, P. D.; MASSAGUE, J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 4, p. 274-84, Apr 2009.

NIEMAN, M. T. et al. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. **J Cell Biol**, v. 147, n. 3, p. 631-44, Nov 1 1999.

NYGA, A.; CHEEMA, U.; LOIZIDOU, M. 3D tumour models: novel in vitro approaches to cancer studies. **J Cell Commun Signal**, v. 5, n. 3, p. 239-48, Aug 2011.

PAGE-MCCAUGHEY, A.; EWALD, A. J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 3, p. 221-33, Mar 2007.

PARK, S. M. et al. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. **Genes Dev**, v. 22, n. 7, p. 894-907, Apr 1 2008.

PAULOSE, T. et al. Estrogens in the wrong place at the wrong time: Fetal BPA exposure and mammary cancer. **Reprod Toxicol**, v. 54, p. 58-65, Jul 2015.

PENG, S. B. et al. Akt activation, but not extracellular signal-regulated kinase activation, is required for SDF-1alpha/CXCR4-mediated migration of epitheloid carcinoma cells. **Mol Cancer Res**, v. 3, n. 4, p. 227-36, Apr 2005.

PERETZ, J. et al. Bisphenol a and reproductive health: update of experimental and human evidence, 2007-2013. **Environ Health Perspect**, v. 122, n. 8, p. 775-86, Aug 2014.

PFEIFER, D.; CHUNG, Y. M.; HU, M. C. Effects of Low-Dose Bisphenol A on DNA Damage and Proliferation of Breast Cells: The Role of c-Myc. **Environ Health Perspect**, May 1 2015.

PULTZ, B. A. et al. **Investigação dos níveis séricos de EGFR1, HER2, TSP-1 e RANKL em pacientes com câncer de mama inicial e avançado.** 2015. Universidade Federal de Uberlândia

QIAN, X. et al. N-cadherin/FGFR promotes metastasis through epithelial-to-mesenchymal transition and stem/progenitor cell-like properties. **Oncogene**, v. 33, n. 26, p. 3411-21, Jun 26 2014.

QIN, X. Y. et al. Effects of bisphenol A exposure on the proliferation and senescence of normal human mammary epithelial cells. **Cancer Biol Ther**, v. 13, n. 5, p. 296-306, Mar 2012.

QUINN, C. M.; WRIGHT, N. A. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and applications as prognostic variables. **J Pathol**, v. 160, n. 2, p. 93-102, Feb 1990.

REDON, C. E. et al. Histone gammaH2AX and poly(ADP-ribose) as clinical pharmacodynamic biomarkers. **Clin Cancer Res**, v. 16, n. 18, p. 4532-42, Sep 15 2010.

REZG, R. et al. Bisphenol A and human chronic diseases: current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. **Environ Int**, v. 64, p. 83-90, Mar 2014.

RHODES, L. V. et al. Effects of SDF-1-CXCR4 signaling on microRNA expression and tumorigenesis in estrogen receptor-alpha (ER-alpha)-positive breast cancer cells. **Exp Cell Res**, v. 317, n. 18, p. 2573-81, Nov 1 2011.

RHODES, L. V. et al. Cytokine receptor CXCR4 mediates estrogen-independent tumorigenesis, metastasis, and resistance to endocrine therapy in human breast cancer. **Cancer Res**, v. 71, n. 2, p. 603-13, Jan 15 2011.

RIVERA, S. P.; SAARIKOSKI, S. T.; HANKINSON, O. Identification of a novel dioxin-inducible cytochrome P450. **Mol Pharmacol**, v. 61, n. 2, p. 255-9, Feb 2002.

RODRIGUEZ, F. J.; LEWIS-TUFFIN, L. J.; ANASTASIADIS, P. Z. E-cadherin's dark side: possible role in tumor progression. **Biochim Biophys Acta**, v. 1826, n. 1, p. 23-31, Aug 2012.

ROSS, J. S. Breast cancer biomarkers and HER2 testing after 10 years of anti-HER2 therapy. **Drug News Perspect**, v. 22, n. 2, p. 93-106, Mar 2009.

ROWLANDS, T. M. et al. Cadherins: crucial regulators of structure and function in reproductive tissues. **Rev Reprod**, v. 5, n. 1, p. 53-61, Jan 2000.

SAFE, S.; LEE, S. O.; JIN, U. H. Role of the aryl hydrocarbon receptor in carcinogenesis and potential as a drug target. **Toxicol Sci**, v. 135, n. 1, p. 1-16, Sep 2013.

SAHA ROY, S.; VADLAMUDI, R. K. Role of estrogen receptor signaling in breast cancer metastasis. **Int J Breast Cancer**, v. 2012, p. 654698, 2012.

SANCHEZ-TILLO, E. et al. EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness. **Cell Mol Life Sci**, v. 69, n. 20, p. 3429-56, Oct 2012.

SARRIO, D. et al. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. **Cancer Res**, v. 68, n. 4, p. 989-97, Feb 15 2008.

SCHRAMEK, D. et al. Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progestin-driven mammary cancer. **Nature**, v. 468, n. 7320, p. 98-102, Nov 4 2010.

SEEGER, H.; RAKOV, V.; MUECK, A. O. Dose-dependent changes of the ratio of apoptosis to proliferation by norethisterone and medroxyprogesterone acetate in human breast epithelial cells. **Horm Metab Res**, v. 37, n. 8, p. 468-73, Aug 2005.

SHAW, K. R.; WROBEL, C. N.; BRUGGE, J. S. Use of three-dimensional basement membrane cultures to model oncogene-induced changes in mammary epithelial morphogenesis. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 9, n. 4, p. 297-310, Oct 2004.

SHERMAN, H. et al. Cell migration, chemotaxis and invasion assay protocol. Corning Life Science. www.corning.com/lifesciences, 2013.

SHERR, C. J.; MCCORMICK, F. The RB and p53 pathways in cancer. **Cancer Cell**, v. 2, n. 2, p. 103-12, Aug 2002.

SHIAH, Y. J. et al. A progesterone-CXCR4 axis controls mammary progenitor cell fate in the adult gland. **Stem Cell Reports**, v. 4, n. 3, p. 313-22, Mar 10 2015.

SOULE, H. D. et al. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. **Cancer Res**, v. 50, n. 18, p. 6075-86, Sep 15 1990.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 17, p. 463-516, 2001.

SUBIK, K. et al. The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. **Breast Cancer (Auckl)**, v. 4, p. 35-41, 2010.

THIERY, J. P.; SLEEMAN, J. P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 7, n. 2, p. 131-42, Feb 2006.

THOMAS, R. D. et al. Cytochrome P450 expression and metabolic activation of cooked food mutagen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in MCF10A breast epithelial cells. **Chem Biol Interact**, v. 160, n. 3, p. 204-16, Apr 15 2006.

TOMASICCHIO, M. et al. The progestin-only contraceptive medroxyprogesterone acetate, but not norethisterone acetate, enhances HIV-1 Vpr-mediated apoptosis in human CD4+ T cells through the glucocorticoid receptor. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e62895, 2013.

TOOTS, U. E.; KEL'VE, M. B.; SAARMA, M. [Degradation of messenger RNA, ribosomal RNA and 2-5A-dependent inhibition of protein biosynthesis]. **Mol Biol (Mosk)**, v. 22, n. 6, p. 1473-81, Nov-Dec 1988.

TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin**, v. 65, n. 2, p. 87-108, Mar 2015.

TREECK, O. et al. Estrogen receptor beta exerts growth-inhibitory effects on human mammary epithelial cells. **Breast Cancer Res Treat**, v. 120, n. 3, p. 557-65, Apr 2010.

TUCCI, M. G. et al. Involvement of E-cadherin, beta-catenin, Cdc42 and CXCR4 in the progression and prognosis of cutaneous melanoma. **Br J Dermatol**, v. 157, n. 6, p. 1212-6, Dec 2007.

VAN DAMME, J.; STRUYF, S.; OPDENAKKER, G. Chemokine-protease interactions in cancer. **Semin Cancer Biol**, v. 14, n. 3, p. 201-8, Jun 2004.

VANDENBERG, L. N. et al. Human exposure to bisphenol A (BPA). **Reprod Toxicol**, v. 24, n. 2, p. 139-77, Aug-Sep 2007.

VARES, G. et al. Progesterone generates cancer stem cells through membrane progesterone receptor-triggered signaling in basal-like human mammary cells. **Cancer Lett**, v. 362, n. 2, p. 167-73, Jul 1 2015.

VOM SAAL, F. S.; WELSHONS, W. V. Large effects from small exposures. II. The importance of positive controls in low-dose research on bisphenol A. **Environ Res**, v. 100, n. 1, p. 50-76, Jan 2006.

VUORILUOTO, K. et al. Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. **Oncogene**, v. 30, n. 12, p. 1436-48, Mar 24 2011.

WANG, D. et al. Pubertal bisphenol A exposure alters murine mammary stem cell function leading to early neoplasia in regenerated glands. **Cancer Prev Res (Phila)**, v. 7, n. 4, p. 445-55, Apr 2014.

WANG, L. et al. Influence of CXCR4/SDF-1 axis on E-cadherin/beta-catenin complex expression in HT29 colon cancer cells. **World J Gastroenterol**, v. 17, n. 5, p. 625-32, Feb 7 2011.

WANG, Q. et al. Regulation of VEGF, MMP-9 and metastasis by CXCR4 in a prostate cancer cell line. **Cell Biol Int**, v. 35, n. 9, p. 897-904, Sep 2011.

WANG, X. et al. Comparative properties of the nuclear aryl hydrocarbon (Ah) receptor complex from several human cell lines. **Eur J Pharmacol**, v. 293, n. 3, p. 191-205, Oct 6 1995.

WANG, Y.; ZHOU, B. P. Epithelial-mesenchymal Transition---A Hallmark of Breast Cancer Metastasis. **Cancer Hallm**, v. 1, n. 1, p. 38-49, Mar 2013.

WELSHONS, W. V. et al. Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. **Environ Health Perspect**, v. 111, n. 8, p. 994-1006, Jun 2003.

WENDEL, C. et al. CXCR4/CXCL12 participate in extravasation of metastasizing breast cancer cells within the liver in a rat model. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e30046, 2012.

WENG, Y. I. et al. Epigenetic influences of low-dose bisphenol A in primary human breast epithelial cells. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 248, n. 2, p. 111-21, Oct 15 2010.

WHEELOCK, M. J.; JOHNSON, K. R. Cadherins as modulators of cellular phenotype. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 19, p. 207-35, 2003.

WOESSNER, J. F.; NAGASE, H. **Matrix Metalloproteinases and TIMPs**. Protein Profile: 238 pages p. 2000.

WOLFF, A. C. et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. **J Clin Oncol**, v. 31, n. 31, p. 3997-4013, Nov 1 2013.

_____. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. **Arch Pathol Lab Med**, v. 138, n. 2, p. 241-56, Feb 2014.

XU, Q. et al. Mesenchymal stem cells play a potential role in regulating the establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition in MCF7 human breast cancer cells by paracrine and induced autocrine TGF-beta. **Int J Oncol**, v. 41, n. 3, p. 959-68, Sep 2012.

YI, B. et al. Association between Endocrine Disrupting Phenols in Colostrums and Maternal and Infant Health. **Int J Endocrinol**, v. 2013, p. 282381, 2013.

ZIV-GAL, A. et al. Bisphenol A inhibits cultured mouse ovarian follicle growth partially via the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway. **Reprod Toxicol**, v. 42, p. 58-67, Dec 2013.