



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

**ESTUDOS *IN VITRO* DO BISFENOL A NA ALTERAÇÃO FENOTÍPICA EM  
TUMOR DE MAMA E POTENCIAL TRANSFORMANTE QUANDO  
ASSOCIADO AO ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA**

FELIPE ANDRÉS CORDERO DA LUZ

UBERLÂNDIA

Agosto -2016



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

**ESTUDOS *IN VITRO* DO BISFENOL A NA ALTERAÇÃO FENOTÍPICA EM  
TUMOR DE MAMA E POTENCIAL TRANSFORMANTE QUANDO  
ASSOCIADO AO ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA**

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.

Mestrando: Felipe Andrés Cordero da Luz

Orientador: Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva

UBERLÂNDIA

Agosto -2016

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

---

L979e Luz, Felipe Andrés Cordero da, 1993-  
2016 Estudos *in vitro* do bisfenol a na alteração fenotípica em tumor de  
mama e potencial transformante quando associado ao acetato de  
medroxiprogesterona / Felipe Andrés Cordero da Luz. - 2016.  
78 f. : il.

Orientador: Marcelo José Barbosa Silva.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.  
Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Câncer - Teses. 3. Acetato de  
Medroxiprogesterona - Teses. 4. Menopausa - Hormonoterapia - Teses.  
I. Silva, Marcelo José Barbosa. II. Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.  
III. Título.

CDU: 612.017

---



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

FELIPE ANDRÉS CORDERO DA LUZ

**ESTUDOS *IN VITRO* DO BISFENOL A NA ALTERAÇÃO FENOTÍPICA EM  
TUMOR DE MAMA E POTENCIAL TRANSFORMANTE QUANDO  
ASSOCIADO AO ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA**

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.

Área de concentração: Imunologia e  
Parasitologia Aplicadas

Banca Examinadora:

Uberlândia, 17 de Agosto de 2016.

---

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

---

Prof(a). Dr(a). Tarcília Aparecida da Silva - UFMG

---

Prof(a). Dr(a). Cláudio Vieira da Silva - UFU

*“Quando há comunicação, os planos são  
bem-sucedidos;  
Trave a sua guerra com orientação perita”*

*(Provérbio bíblico)*

Dedico este trabalho à minha mãe.

Dedico este trabalho à nação brasileira e à UFU como retribuição pela substancial investidura realizada na minha pessoa.

## AGRADECIMENTOS

Neste espaço especial, quero expressar minha gratidão àquelas pessoas que contribuíram no desenvolvimento deste trabalho.

Primeiramente, agradeço ao professor Carlos Ueira Vieira, o qual fez deste trabalho, quando ainda em fase embrionária, e, portanto, sem forma, apenas deslumbrando um pequeno *flash* daquilo que se tornaria, ajudou a conceber os pilares em que este trabalho se apoia. E ao professor Cláudio Viera da Silva, por ter me direcionado ao professor Marcelo, e por sua ajuda financeira nos primórdios dos experimentos.

Agradeço ao professor Marcelo José Barbosa Silva, meu orientador, que assumiu este projeto e me ajudou a concretizá-lo. Me ensinou a base daquilo que se tornaria meu *expertise* técnico-científico.

Agradeço aos professores Marcelo Emílio Beletti e Jonas Jäger Fernandes (*in memoriam*) por terem me dado a base da técnica que definiria o futuro deste trabalho.

Agradeço ao professor Tiago Wilson Patriarca Mineo pela grandiosa gentileza e ter flexibilizado a disponibilidade do laboratório de Imunoparasitologia para executar muitíssimos experimentos.

Agradeço ao professor Alberto da Silva Moraes, que contribuiu intelectualmente para definir processos celulares importantes a serem estudados, descartando aquilo que não era pertinente. Agradeço ao professor Luiz Ricardo Goulart por ter revisado intensivamente todos os pontos do projeto para que se tornasse exequível. Também por contribuir muito na escrita e revisar os textos.

Agradeço todos os autores envolvidos nas duas publicações que deste trabalho derivam, em especial à Lívia de Paula Peres, parceira de ombro e braço (e tempo) na bancada. Sua colaboração extrapola o esforço braçal, sendo contribuinte intelectual indispensável. Agradeço, também, a Aline Costa de Lúcio Prado pelo suporte e por me ensinar técnicas indispensáveis para executar este trabalho.

Agradeço ao funcionário Max Aor Marques pelo seu trabalho perito de fornecer materiais ao laboratório. Agradeço também às funcionárias da limpeza e a todos os que trabalham na UFU. Se eles não fizessem esses trabalhos importantes, teria de subtrair uma boa parcela do tempo dispendido neste trabalho àquelas funções.

Agradeço ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas por me instruir para obter o título de Mestre. Agradeço ao CNPq pela concessão de bolsa e pelo financiamento do projeto.

## LISTA DE ABREVIACÕES

μM: micromolar

AR: receptor androgênico

BPA: bisfenol A

cDNAs: ácido desoxirribonucleico complementar

CSC: células-tronco de câncer

CXCL12: quimiocina 12 de motivo C-X-C

CXCR2: receptor de quimiocina CXC tipo 2

CXCR4: receptor de quimiocina CXC tipo 4

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

ECM: matriz extracelular

EGF: fator de crescimento epidérmico

EGFR1: receptor do fator de crescimento epidérmico tipo 1

EMT: transição epitélio-mesênquima

EMT-TFs: fatores de transcrição reguladores da transição epitélio-mesênquima

ER: receptor de estrógenos

ESRP: proteínas regulatória de *splicing* epitelial

FSC: *forward scattering* (difração frontal)

FGF: fator de crescimento de fibroblastos

FGFR2: receptor de fator de crescimento de fibroblastos tipo 2

FGFR2 IIIb: isoforma IIIb do receptor de fator de crescimento de fibroblastos tipo 2

FGFR2 IIIc: isoforma IIIc do receptor de fator de crescimento de fibroblastos tipo 2

GR: receptor de glicocorticóide

HER2: receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2

hnRNP: ribonucleoproteínas heterogêneas nucleares

HRT: terapia de reposição hormonal

IOD: densidade óptica integrada

Ki67: proteína de proliferação celular

MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro

MET: transição mesênquima-epitélio



MIF: intensidade mediana da fluorescência

MMPs: metaloproteinases

MMP-2: metaloproteinase 2

MMP-9: metaloproteinase 9

MPA: acetato de medroxiprogesterona

mPR: receptor de progesterona na membrana

OD: densidade óptica

PBS: tampão fosfato salino

PR: receptor de progesterona

RNA: ácido ribonucleico

SFB: soro fetal bovino

snRNP: ribonucleoproteína pequena nuclear

SR: fator de *splicing* rico em serina/arginina

SSC: *side scattering* (difração lateral)

TGF- $\beta$ : fator de crescimento transformante beta

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> <i>BPA e MPA alteram a expressão de genes e o fenótipo para um perfil EMT</i> .....	35
<b>Figura 1.2</b> <i>Scratch assay</i> .....	39
<b>Figura 1.3</b> <i>Marcadores de fenótipo e de proliferação analisados por citometria de fluxo</i> .....	40
<b>Figura 1.4</b> <i>Alterações nucleares e parâmetros obtivos pela reação de Feulgen</i> .....	41
<b>Figura 1.5</b> <i>Scatterplot em 3D mostrando a correlação entre Mean, Contraste e IntDen/IOD</i> .....	41
<b>Figura 1.6</b> <i>Scatterplot em 3D mostrando a correlação entre Mean, Contraste e Entropia</i> .....	42
<b>Figura 1.7</b> <i>Ação hipotética de BPA e MPA e as vias moleculares em células MCF-10A</i> .....	50
<b>Figura 2.1</b> <i>Características citométrico morte celular de MCF-7</i> .....	53
<b>Figura 2.2</b> <i>Características citométrico morte celular de MDA-MB-231</i> .....	53
<b>Figura 2.3</b> <i>BPA aumenta características de agressividade em células de câncer de mama ER<sup>+</sup> e ER<sup>-</sup></i> .....	56
<b>Figura 2.4</b> <i>Expressão de EGFR1, HER 2 Ki67</i> .....	58
<b>Figura 2.5</b> <i>Sensibilidade das células MCF-7 ao tamoxifeno</i> .....	59

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Sequência dos primers para os genes alvos analisados pelo sistema SYBR.....	27
<b>Tabela 2</b> Número de catálogo dos primers para os genes alvos analisados pelo sistema TaqMan.....	29

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Bases moleculares do câncer .....	16
1.2 Metástase: nicho tumoral e EMT .....	16
1.2.1 Spliceossomo, splicing e dinâmica dos fatores de splicing.....	18
1.3 Bisfenol A, Medroxiprogesterona e seus efeitos .....	19
1.4 Câncer de mama.....	20
1.5 Justificativa do trabalho .....	20
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivos específicos .....	22
Primeira vertente .....	22
Segunda vertente .....	22
3 METODOLOGIA.....	24
3.1 Compostos químicos e reagentes .....	24
3.2 Cultura de células, procedimentos e tratamentos.....	24
3.3 Ensaio de MTT .....	25
3.4 Ensaio de morte celular.....	26
3.5 Extração de RNA e qPCR.....	26
3.6 Cálculo do <i>switch</i> de isoforma de <i>FGFR2</i> .....	30
3.7 Marcações por anticorpo e citometria de fluxo .....	30
3.8 Ensaio de invasão/ <i>transwell</i> .....	31
3.9 Ensaio de migração/ <i>scratch assay</i> .....	32
3.10 Reação de Feulgen .....	32
3.11 Análise estatística .....	33
4 CAPÍTULO 1: EFEITOS DO BPA ASSOCIADO AO MPA NA PROMOÇÃO TUMORAL DE CÉLULAS NÃO-TRANSFORMADAS.....	34
4.1 RESULTADOS .....	34
Citotoxicidade .....	34
BPA e MPA alteram a expressão de EMT-TFs .....	34
Impacto na via FGFR2 e no status epitelial/mesenquimal .....	35
Impacto na expressão gênica dos fatores de splicing .....	37
BPA/MPA confere um fenótipo invasivo .....	37
BPA/MPA confere um aumento duradouro da capacidade de migração celular....	38
Impacto na proliferação celular .....	39
Alterações na morfologia nuclear .....	40

BPA e MPA não alteram os marcadores moleculares de células MCF-10A .....	42
4.2 DISCUSSÃO .....	43
BPA e MPA alteram RBFOX2 e o splicing alternativo de FGFR2 .....	43
MPA potencializa os efeitos de BPA na EMT .....	44
BPA diminui a proliferação celular e MPA induz proliferação celular de MCF-10A .....	46
BPA age possivelmente via ER $\beta$ e BPA se intercepta com MPA em RBFOX2. ...	48
4.3 CONCLUSÃO .....	51
4.4 PERSPECTIVAS .....	51
5 CAPÍTULO 2: EFEITO DO BISFENOL A EM CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA: AUMENTO DAS CARACTERÍSTICAS AGRESSIVAS .....	52
5.1 RESULTADOS .....	52
Altas concentrações micromolares de BPA causam efeitos citotóxicos em células de câncer de mama ER <sup>+</sup> e ER <sup>-</sup> .....	52
As concentrações micromolares de BPA aumentam a agressividade mais nas células de câncer de mama ER <sup>+</sup> que nas ER <sup>-</sup> .....	54
Concentrações micromolares de alteram a via de FGFR2 e a expressão de fatores de splicing em células ER <sup>+</sup> .....	55
Altas concentrações micromolares de BPA diminuem EGFR1 e HER2 tanto em células ER <sup>+</sup> como ER <sup>-</sup> .....	57
BPA causa resistência duradoura ao tamoxifeno nas células MCF-7 .....	59
5.2 DISCUSSÃO .....	60
Concentrações micromolares de BPA promovem em células de câncer de mama ER <sup>+</sup> e ER <sup>-</sup> um perfil de EMT, mas com diferenças .....	60
Concentrações micromolares de BPA confere mais características de agressividade a células de câncer de mama ER <sup>+</sup> que ER <sup>-</sup> .....	61
BPA altera o splicing alternativo em células de cancer de mama ER <sup>+</sup> , mas não em ER <sup>-</sup> .....	62
Células MCF-7 pré-tratadas com BPA possuem sensibilidade reduzida ao tamoxifeno.....	63
BPA altera o status de EGFR1 e HER2 em células ER <sup>+</sup> e ER <sup>-</sup> provavelmente via ER $\beta$ .....	63
5.3 CONCLUSÃO .....	65
6 COMENTÁRIOS E PERSPECTIVAS GERAIS .....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	67

## RESUMO

O bisphenol A (BPA) é um composto químico com propriedades xenoestrogênicas, atuando como disruptor endócrino, e contribui na tumorigênese e progressão tumoral, e o acetato de medroxiprogesterona (MPA) é um hormônio amplamente utilizado em terapia de reposição hormonal e contraceptivos. Diversos estudos demonstraram a capacidade desses compostos induzir proliferação celular, resistência à apoptose, migração e invasão celulares, contribuindo para o desenvolvimento e progressão do câncer de mama. Ademais, estudos recentes mostraram que o BPA é capaz de desencadear a transição epitélio-mesênquima (EMT) em células receptor de estrogênio (ER)<sup>+</sup> e ER<sup>-</sup> por vias celulares diferentes. Neste estudo de duas vertentes, células epiteliais de mama triplo-negativas não-transformadas MCF-10A foram expostas cronicamente a concentrações micromolares de BPA associado, ou não, a exposição aguda ao MPA para analisar as propriedades tumorigênicas dessas duas drogas em associação (primeira vertente); duas linhagens de câncer de mama (MCF-7, ER<sup>+</sup>; MDA-MB-231, triplo-negativa) foram utilizadas para estudar o impacto de concentrações micromolares de BPA no EMT concomitantemente com *splicing* alternativo de *FGFR2*, quimiorreceptores (CXCR2 e CXCR4), células-tronco cancerígenas (CSCs), bem como a sensibilidade ao tamoxifeno nas células MCF-7 (segunda vertente). Na primeira vertente foi observado que a exposição a BPA e MPA induziu um fenótipo invasivo, com aumento de CXCR4 e modificação na expressão de fatores de *splicing*, e transição de características epiteliais para mesenquimais, mensurado pelo *switch* para isoforma IIIc de *FGFR2*, aumento de *VIM*, e um aumento prologando da migração, bem como mudanças na morfologia nuclear característico de cancerização; esta é a primeira demonstração da ação sinérgica do MPA em células pré-tratadas com BPA, levando células normais a adquirirem características malignas por ativar mecanismos celulares complementares associados com EMT, sugerindo que a exposição ambiental a tais compostos pode aumentar o risco de desenvolver câncer, especialmente em condições de uso de hormônios. Na segunda vertente foram observadas diferenças marcantes entre os processos desencadeados pela exposição a concentrações micromolares de BPA nas células cancerígenas utilizadas; embora o BPA tenha desencadeado EMT em ambas as linhagens, as células ER<sup>+</sup> adquiriram mais características envolvidas com agressividade e resistência, sugerindo que o BPA pode ter um papel fundamental na complicação de cânceres ER<sup>+</sup>.

**Palavras-chave:** BPA, MPA, transformação, EMT, *splicing*, agressividade.

## ABSTRACT

Bisphenol A (BPA) is a chemical compound with xenoestrogenic properties, acting as an endocrine disruptor, and contributes to tumorigenesis and tumor progression, and medroxyprogesterone acetate (MPA) is widely used in hormone replacement therapy and contraceptives. In several studies, these compounds were appointed as responsible for changes in proliferation, apoptosis resistance, cell migration and invasion, contributing to development and progression of breast cancer. In addition, recent studies observed that BPA can trigger epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in ER (estrogen receptor)<sup>+</sup> and ER<sup>-</sup> cells through different pathways. In this two-branched study, triple-negative non-transformed mammary epithelial cells MCF-10A were long-term treated with micromolar concentrations of BPA, associated, or not, with acute treatment with MPA to analyze the tumorigenic properties of these two drugs in association (first branch); two breast cancer cell lines (MCF-7, ER<sup>+</sup>; MDA-MB-231, triple-negative) were used to observe EMT concomitantly with alternative splicing of FGFR2, chemoreceptors (CXCR2 and CXCR4), cancer stem cell (CSC) population, as well as MCF-7 cells resistance/sensitivity to tamoxifen (second branch). In the first branch was observed that exposure to both BPA and MPA led to an invasive phenotype, with increased expression of CXCR4 and modification of splicing factors, and transition from epithelial to mesenchymal features, characterized by *FGFR2* IIIc switch, increased *VIM* expression, and long-term augmented migration, as well as nuclear morphology alterations typical of cancerous cells; this is the first demonstration of a synergistic action of MPA in BPA pre-treated cells, leading normal cells to acquire malignant features by activating complementary cellular events associated with epithelial-mesenchymal transition, suggesting that environmental exposure to chemicals may increase the risk of cancer development, especially under hormonal therapies. In the second branch was observed EMT concomitantly with alternative splicing of FGFR2, chemoreceptors (CXCR2 and CXCR4), cancer stem cell (CSC) population, as well as MCF-7 cells resistance/sensitivity to tamoxifen; results show striking differences between these cells: although BPA triggered EMT in the two cells, ER<sup>+</sup> cells acquired more features involved with aggressiveness and resistance, suggesting that BPA may exert complications in ERα<sup>+</sup> cancer.

**Key-words:** BPA, MPA, transformation, EMT, *splicing*, aggressiveness.

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 Bases moleculares do câncer**

Embora o câncer é classicamente conhecido por se derivar da acumulação de mutações no DNA, seja causado por agentes físicos ou químicos, ou em detrimento de alterações na sequência do DNA por falhas no reparo ou replicação do material genético (SATO; SAJI; TOI, 2015), o câncer pode resultar também de desordens epigenéticas, cujas consequências envolvem desregulação da expressão gênica a qualquer nível de regulação (pré-transcricional, co-transcricional, traducional e pós-traducional) (BERTRAM, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

As alterações observadas no câncer ocorrem geralmente em genes que controlam o ciclo celular ou ativando proto-oncogenes, que, por sua vez, se tornam oncogenes e ativam a progressão do ciclo celular, ou inativando genes supressores de tumor, que são associados com controle do ciclo celular, levando à ativação maligna de células normais, sendo, agora, chamadas células cancerígenas. Essas alterações atribuem características não-próprias das células, como resistência à apoptose, potencial proliferativo aumentado (imortalidade) na ausência de mitógenos, angiogênese (potencial de criar novos vasos sanguíneos), resistência a sinais inibitórios do desenvolvimento, invasividade, evasão imune, e, finalmente, metástase (BERTRAM, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

### **1.2 Metástase: nicho tumoral e EMT**

A metástase é a principal causa de morte em pacientes com câncer. Dentre as causas da metástase, a EMT é apontada como o principal mecanismo (FISCHER et al., 2015; GUAN, 2015; ZHENG et al., 2015).

Neste evento de reprogramação celular, as células epiteliais perdem suas características epiteliais e adquirem características mesenquimais e, consequentemente, podem se soltar do seu tecido e migrar a sítios distantes, onde podem se estabelecer e retornar a um estado epitelial (GUAN, 2015). A perda de E-caderina, uma integrina associada a junções célula-célula em tecido epitelial, e a aquisição de N-caderina, uma integrina associada a junções célula-célula em tecido mesenquimal, juntamente com a troca das proteínas intermediárias (citoqueratinas) por vimentina, são alterações clássicas da EMT. Estes processos iniciais da perda da condição epitelial e ganho de condição mesenquimal, com consequente soltura do tecido, é acompanhada pelo aumento da



expressão de proteínas envolvidas na degradação da matriz extracelular (ECM), como as metaloproteases MMP-2 e MMP-9 (CICHON; NELSON; RADISKY, 2015).

A repressão de *CDH1* (gene codificante da E-caderina), assim como outros genes epiteliais, é regulado por fatores de transcrição que regulam a EMT (EMT-TFs), como membros das famílias Snail, Twist e Zeb, que reconhecem principalmente sequências de DNA próximas aos promotores dos genes. Estes EMT-TFs também regulam a expressão de MMPs (CHOU; YANG, 2015). Após estas mudanças iniciais e intermediárias, as células malignas podem alcançar a circulação e migrar para outros tecidos. Este processo é facilitado por outro evento comum durante a progressão tumoral, que é a expressão de receptores de quimiona, como CXCR2 e CXCR4, que possibilitam a migração direcionada a tecidos específicos no processo de metástase por quimiotaxia (AZIM; KAMAL; AZIM, 2012; PAPACHRISTOU; BASDRA; PAPAVASSILIOU, 2012).

Neste contexto estão inseridas as células-tronco de câncer (CSCs). Estudos mostram que estas células têm o potencial de iniciar, manter um tumor e derivar heterogeneidade ao mesmo (CASTANO et al., 2012), sendo, na maioria dos casos, responsáveis por recidiva e resistência à quimioterapia. Quanto ao seu fenótipo, estas células são pouco diferenciadas e possuem marcadamente uma repgroamação celular típica de EMT (FISCHER et al., 2015; MCDERMOTT; WICHA, 2010; ZHENG et al., 2015), a qual está envolvida com agressividade tumoral e quimioresistência na maioria dos casos (FISCHER et al., 2015; GUAN, 2015; ZHENG et al., 2015). Importaneamente, estímulos que desencadeiam a EMT também podem expandir a população CSC (CASTANO et al., 2012).

Ademais das características clássicas da EMT, o *splicing* alternativo é outro processo que é modificado durante a EMT (BRAEUTIGAM et al., 2014; GERMANN et al., 2012; SHAPIRO et al., 2011; VENABLES et al., 2013). Um padrão aberrante de *splicing* é frequentemente observado em câncer (LIU; CHENG, 2013). Durante EMT, o *splicing* alternativo de *FGFR2* (receptor de fator de crescimento de fibroblasto do tipo 2) é bem estudado, sofrendo *switch* da isoforma IIIb, que é epitelial, para a IIIc, que é mesenquimal (HONG et al., 2013; HORIGUCHI et al., 2012; KATOH; KATOH, 2009; RANIERI; BELLEUDI; et al., 2015; SHIRAKIHARA et al., 2011; UEDA et al., 2014; WARZECHA et al., 2009). A inibição/*knockdown* de FGFR2-IIIc ou a depleção/inibição de FGF2 (fator de crescimento de fibroblasto tipo 2), o ligante de FGFR2-IIIc, anulam a EMT e reverte diversas características malignas (CHAFFER et al., 2006; ISHIWATA et al., 2012; MARUTA et al., 2002; MATSUDA et al., 2012; MATSUDA et al., 2011;

MATSUDA et al., 2014; RANIERI; BELLEUDI; et al., 2015; RANIERI; ROSATO; et al., 2015; SHIRAKIHARA et al., 2011; WU et al., 2010), mostrando, também, que a via FGF/FGFR2 possui um papel importante na EMT e agressividade.

### 1.2.1 Spliceossomo, *splicing* e dinâmica dos fatores de *splicing*

O *splicing* é um evento celular crítico que é executado pelo spliceossomo. O spliceossomo é um complexo que remove os *introns* (regiões intragênicas) do pré-mRNA (*splicing* constitutivo) e, geralmente, recombina os *exons* (regiões expressoras), de forma sequencial, no *splicing* alternativo, ampliando, assim, a quantidade de proteínas codificadas por um gene. Os *introns* podem, eventualmente, serem retidos no mRNA maduro de forma fisiológica, e não apenas de forma patológica, como observado no câncer (WAHL; WILL; LUHRMANN, 2009).

O spliceossomo é formado por cinco subcomplexos de snRNPs (ribonucleoproteínas pequenas nucleares), chamadas U1, U2, U4/5, and U6 (U de ricas em uracila), e participam de diferentes etapas durante o *splicing*. Diversas proteínas associados ao spliceossomo, chamadas fatores de *splicing*, coordenam o *splicing* constitutivo e alternativo (WAHL et al., 2009).

O *splicing* constitutivo e alternativo operam pela combinação de sinais positivos e negativos presentes no pré-mRNA que são reconhecidos por fatores de *splicing*. Os fatores mais estudados são da família de proteínas ricas em serina/arginina (SRs) e da família de ribonucleoproteínas heterogêneas nucleares (hnRNPs). Esses dois tipos de proteínas possuem motivos de reconhecimento de RNA e domínios que permitem interações proteína-proteína durante o *splicing* (WAHL et al., 2009).

Vários fatores de *splicing* estão envolvidos no *splicing* alternativo de um mesmo pré-mRNA. Por exemplo, o pré-mRNA de *FGFR2* possui a sequência UGCAUG no *exon* IIIc; esta sequência é reconhecida pelo fator de *splicing* RBFOX2, que impede a inclusão do *exon* IIIc, mas, *upstream* ao *exon* IIIc existe outra sequência, CUGGGA, que é reconhecida pelo fator SRSF1, que promove a inclusão do *exon* IIIc. A interação entre esses dois fatores ditará a isoforma resultante: se IIIc ou IIIb. No entanto, os fatores hnRNP H/F reconhecem a sequência GGG que está dentro da sequência reconhecida por SRSF1 (CUGGGGA) e também impedem a inclusão do *exon* IIIc. Ademais, RBFOX2 interage com hnRNP H/F. Assim, uma rede interativa é formada por esses quatro fatores de *splicing*. O que ditará qual isoforma será produzida é a estequiometria da reação, isto é, a disponibilidade de cada um desses quatro fatores (MAUGER; LIN; GARCIA-

BLANCO, 2008). Não apenas a estequiometria é importante, mas a localização também é crítica: quando a rede RBFOX2-hnRNP H/F se associa *downstream* ao *exon IIIc*, os fatores atuam a favor da inclusão de *IIIc*, mas eles reprimem a inclusão de *IIIc* quando se localizam *upstream* ao *exon IIIc* (MAUGER et al., 2008).

### 1.3 Bisfenol A, Medroxiprogesterona e seus efeitos

Como citado, o câncer pode ser causado por agentes químicos. Entre esses, está o Bisfenol A (BPA). O BPA é um difenol com propriedades hormonais semelhante ao 17 $\beta$ -estradiol (E2) (xenoestrógeno) (GAO et al., 2015; PFEIFER; CHUNG; HU, 2015b), que é utilizado na produção de polímeros como policarbonatos e resinas epóxi, sendo, assim, um componente presente em óculos de sol, papéis termais, CDs e DVDs, materiais médicos e dentais, embalagens de alimentos e garrafas plásticas (GEENS et al., 2012; GEENS; GOEYENS; COVACI, 2011; REZG et al., 2014). Por ser um xenoestrógeno muito presente em diversos produtos de uso comum, ele é muito estudado no contexto de promoção e progressão de câncer de mama.

O BPA atua como disruptor endócrino, ativando os receptores ER $\alpha$  e  $\beta$ , contribuindo para o desenvolvimento e progressão de células cancerígenas (CHEN, Z. J. et al., 2015; GAO et al., 2015; ZHANG, X. L. et al., 2015). Ademais, os metabólitos de BPA formam complexos com biomoléculas presentes na célula, causando dano a estas, como acontece com o DNA (FERNANDEZ et al., 2012; GAO et al., 2015). A exposição crônica a BPA aumenta a proliferação celular em células mamárias, aumentando o risco ao câncer de mama (BETANCOURT et al., 2010). A exposição pré-natal (fetal) a BPA aumenta a incidência de câncer de mama na vida adulta (YANG, L. et al., 2013). A exposição de BPA em animais leva a severas má-formações e aumenta o risco de desenvolvimento de tumores hormônio-dependentes (DURANDO et al., 2007; MUNOZ-DE-TORO et al., 2005; WANG, D. et al., 2014; WEBER LOZADA; KERI, 2011).

Outro composto químico envolvido com o aumento do risco de câncer de mama é o acetato de medroxiprogesterona (MPA) (DAI et al., 2008). O MPA, um derivado da 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona, é comumente utilizado na terapia de reposição hormonal pós-menopausa em mulheres e em contraceptivos (GHATGE et al., 2005). Estudos *in vitro* mostraram que o MPA aumenta a taxa proliferativa de células epiteliais mamárias, associado com o aumento em falhas na replicação do DNA após administração crônica (HOFSETH et al., 1999).

Ademais dos efeitos supracitados, o BPA pode desencadear a transição epitélio-mesênquima (EMT). Apesar de ser um xenoestrógeno, o BPA desencadeia EMT tanto em células ER<sup>+</sup> com em células ER<sup>-</sup> por diferentes vias (CHEN, Z. J. et al., 2015; CHEVALIER; PAUL-BELLON; FENICHEL, 2015; DENNIS et al., 2011; PUPO et al., 2012; ZHANG, X. L. et al., 2015)

#### **1.4 Câncer de mama**

Câncer é um termo aplicado para um grupo de doenças cuja principal característica é a proliferação celular descontrolada (FERNALD; KUROKAWA, 2013).

O câncer de mama é o câncer mais frequentemente diagnosticado e o principal causante de mortes em mulheres no mundo, com um número estimado de 1,7 milhões de casos e 512.000 mortes em 2012, representando 25% de todos os casos de câncer e 15% de mortes em função de câncer nas mulheres (TORRE et al., 2015).

Clinicamente, esta doença heterogênea é dividida em três categorias terapêuticas básicas: positivo para receptor de estrógeno (ER<sup>+</sup>), o mais comum e com diversos testes prognósticos para pacientes tratadas com terapias hormonais; HER2/neu<sup>+</sup> ou ERBB2, que são os que superexpressam este receptor; e o câncer de mama triplo-negativo (ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup> e não superexpressam HER2/neu), conhecido como tipo basal. Este último é o mais agressivo e seu tratamento só é possível com a uso de quimioterápicos. Uma quarta categoria, recentemente classificada, foi denominada *caludin-low*, que também é triplo-negativa, mas que possui baixa expressão de proteínas de junções do tipo célula-célula, especialmente as zonas de oclusão, tornando-o um tumor altamente infiltrante (NETWORK, 2012).

#### **1.5 Justificativa do trabalho**

A exposição voluntária e planejada ao MPA, o principal ingrediente ativo de contraceptivos e drogas de HTR, em muitas mulheres se deve a fatores já mencionados e tencionadas em cada uma das terapias. Porém, a exposição a BPA é involuntária e residual. Não existem estudos que analisaram o efeito em conjunto destas drogas em modelos experimentais. Reproduzir esta condição torna-se importante para alertar quanto aos riscos desta associação.

Também, uma vez dado o diagnóstico de câncer de mama, fármacos a base de hormônios, incluindo o MPA, são suspensos, mas a exposição a BPA continua. Embora

vários estudos mostraram a ação de BPA em células cancerígenas, incluindo de mama, não analisaram o impacto na população de CSC, resistência a droga e outras características.

## 2 OBJETIVOS

Analisar o potencial tumorigênico, *in vitro*, do BPA associado ao MPA, em células epiteliais de mama não-transformadas (MCF-10A). Analisar o efeito de BPA em células cancerígenas de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) quanto à mudança do seu fenótipo.

### 2.1 Objetivos específicos

*Primeira vertente:*

1. Induzir a transformação de células MCF-10A, *in vitro*, com BPA associado a MPA;
2. Frente ao tratamento de BPA associado ou não ao MPA, analisar:
  - a) Avaliar a expressão de genes envolvidos na transição epitélio-mesênquima (*CDH1*, *CDH2*, *TWIST1*, *SNAI1*, *SNAI2*, *ZEB1*);
  - b) Avaliar a expressão gênica de marcadores específicos relacionados com a invasividade (*MMP-2* e *MMP-9*);
  - c) Avaliar a expressão de receptores de quimiocinas relacionadas com a migração celular (*CXCR2* e *CXCR4*);
  - d) Avaliar a expressão dos receptores de fator de crescimento HER-2 e EGFR1 e o indicador de proliferação celular Ki67;
  - e) Avaliar o fenótipo da célula quanto aos marcadores CD24, CD44, para fenotipagem de *cancer stem cells* (CSC), e CD49f e EpCAM;
  - f) Analisar o potencial de invasão e migração;
  - g) Avaliar alterações nucleares;
  - h) Avaliar a expressão gênica dos fatores de splicing *ESRP1*, *ESRP2*, *hnRNP A1*, *hnRNP F*, *hnRNP H1*, *RBFOX2*, *SF3B1* e *SRSF1*;
  - i) Avaliar o eixo de *loop* autócrino FGF2/FGFR2 e possível *switch* para isoforma IIIc de *FGFR2*;

*Segunda vertente:*

1. Tratar as linhagens celulares de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 com concentrações micromolares crescentes de BPA;
2. Frente ao tratamento de BPA, analisar:

- a) Avaliar a expressão gênica dos fatores de splicing *ESRP1*, *ESRP2*, *hnRNP A1*, *hnRNP F*, *hnRNP H1*, *RBFOX2*, *SF3B1* e *SRSF1*;
- b) Avaliar o eixo de *loop* autócrino FGF2/FGFR2 e possível *switch* para isoforma IIIc de *FGFR2*;
- c) Avaliar o fenótipo das células (CD24, CD44, para fenotipagem de CSC, e CD49f e EpCAM, para fenotipagem de célula de mama) e a expressão de proteínas envolvidas com migração e proliferação celular (CXCR2 e CXCR4, e EGFR1, HER2 e Ki67, respectivamente);
- d) Avaliar a sensibilidade ao citrato de tamoxifeno em células tumorais de mama da linhagem MCF-7.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Compostos químicos e reagentes

DMSO ( $\geq 99\%$ , FG), clorofórmio ( $\geq 99\%$ ), BPA ( $\geq 99\%$ ), MPA ( $\geq 97\%$ ; HPLC) e MTT foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA). O citrato de tamoxifeno foi adquirido da Fagron (Rotterdam, Netherlands). BPA e tamoxifeno foram dissolvidos em DMSO, e o MPA em clorofórmio.

DMEM/F12, HEPES, EGF, insulina bovina e hidrocortisona também foram adquiridos da Sigma.

#### 3.2 Cultura de células, procedimentos e tratamentos

As células MCF-10A foram cultivadas em meio DMEM/F12, acrescido de bicarbonato de sódio e penicilina/estrepomicina, suplementado com EGF (20 ng/ml), insulina bovina (10  $\mu\text{g/ml}$ ), hidrocortisona (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) e 5% soro fetal bovino (SFB) (meio de cultivo). Para ensaios, o mesmo meio de cultivo, ajustado a 5 ng/ml de EGF e 2,5% de SFB, foi utilizado (meio de ensaio). Para ensaios de migração/*transwell*, o mesmo meio de cultivo, sem EGF e SFB, foi utilizado (meio de migração).

As células MCF-7 e MDA-MB-231 foram cultivadas em meio RPMI 1640, acrescido de HEPES, bicarbonato de sódio e penicilina/estrepomicina e suplementado com 10% SFB.

As três linhagens celulares foram cultivadas em ambiente úmido, a 37 °C com 5% CO<sub>2</sub>. Os ensaios com todas as células aconteceram antes de atingirem 80% de confluência. Foram utilizadas células de até a quinta passagem de subcultura.

Para procedimento de subcultura/repique e plaqueamento, o descolamento das células foi realizado com solução de tripsina/EDTA, para MCF-10A e MCF-7, e apenas EDTA para MDA-MB-231, por cinco minutos, e a tripsina foi inativada com SFB, quando pertinente, e as células foram recolhidas e lavadas três vezes em solução salin PBS.

Os tratamentos foram como segue:

MCF-10A: tratamento com BPA 1  $\mu\text{M}$  ou 10  $\mu\text{M}$  (volume/volume 1:1000) (FERNANDEZ; RUSSO, 2010), associado ou não a 200  $\mu\text{M}$  MPA (v/v 1:1000). O tratamento ocorreu por 16 dias. Nos grupos tratados com MPA, a adição deste ocorreu no 12º dia (BILIR et al., 2011). O meio foi trocado a cada quatro dias. Um grupo sem reagentes (grupo não-tratado) e outro apenas com veículo (grupo veículo; DMSO v/v



1:1000) foram formados. Os grupos que não receberam MPA receberam clorofórmio (v/v 1:1000), com exceção do grupo branco, mas incluindo o grupo veículo, no 12º dia. O tempo de tratamento para os diversos ensaios foi o mesmo.

MCF-7 e MDA-MB-231: tratamento com BPA 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M ou 100  $\mu$ M (v/v 1:1000). Um grupo sem reagentes (não-tratado) e outro apenas com veículo (grupo veículo; DMSO v/v 1:1000) foram formados. O tratamento para análise de expressão gênica ocorreu por 24 horas, enquanto que para citometria ocorreu por 64 horas.

Para análise da expressão gênica, foram plaqueadas  $2 \times 10^5$  cells/poço, em placas de 24 poços, e tratadas após 24 horas do plaqueamento, foram tratadas conforme os tratamentos supracitados. O volume final foi de 500  $\mu$ l por poço.

Para análise por citometria,  $1 \times 10^6$  células foram cultivadas em garrafas de 25  $\text{cm}^2$  e tratadas conforme os supracitado. O volume final de meio foi de 2,5 mL por garrafa.

Para ensaio de migração/*transwell* das células MCF-10A, foram plaqueadas  $1 \times 10^5$  por câmara *transwell* após os tratamentos.

Para ensaio de invasão/*scratch assay* das células MCF-10A, após os tratamentos, células foram plaqueadas em placas *petri* 12,5 x 37,8 mm e cultivadas, em meio de cultivo, por 20 dias.

Para ensaios de sensibilidade a tamoxifeno (MCF-7), foram plaqueads  $1 \times 10^5$  células por poço, em placas de 24 poços, e foram tratadas, conforme descrito, por 24 e 64 horas. Após os tratamentos, as células foram lavadas três vezes com meio, seguido da incubação por três horas de meio, lavadas e tratadas com tamoxifeno (12,5  $\mu$ M – o volume final foi calculado levando em conta a morte celular provocada por cada tratamento). Um sexto grupo de células MCF-7 foi elaborado para análise de tamoxifeno. Como as células tratadas com 100  $\mu$ M de BPA (64 horas) descolam, com uma morte celular de aproximadamente 80%, as células que permaneceram aderidas foram lavadas e plaqueadas em garrafas de 25  $\text{cm}^2$ , expandidas por 72 horas, posteriormente plaqueadas em placas de 24 poços ( $2 \times 10^5$  cells/poço), e posteriormente tratadas com tamoxifeno (12,5  $\mu$ M) durante 24 horas para ensaios de morte celular (grupo BPA 100 R1).

### 3.3 Ensaio de MTT

Para determinar a citotoxicidade dos tratamentos, concentração inibitória mediana ( $\text{IC}_{50}$ ) e citotoxicidade do tamoxifeno, o ensaio colorimétrico de MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)] foi realizado. Após tratamentos, as células foram lavadas três vezes com meio e o MTT foi adicionado a uma

concentração final de 1 mg/mL. Após quatro horas, foi adicionado 10% SDS em 50% de dimetilformamida (v/v 1:1) e incubado por 16-18 horas. A absorbância (540 nm) foi analisada com o equipamento GloMax (Promega, Fitchburg, WI, USA).

### **3.4 Ensaio de morte celular**

Para análise de morte celular, o Kit FITC Annexin V Apoptosis Detection kit (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) foi utilizado. Células ( $1 \times 10^5$ ) foram descoladas e tratadas, seguindo as recomendações do fabricante. A análise foi realizada em um citômetro FACSCanto II (BD). Os dados foram analisados utilizando o programa FlowJo vX 0.7 (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA).

### **3.5 Extração de RNA e qPCR**

O RNA total foi extraído das células utilizando o Kit de extração automático Maxwell 16 LEV para células (Promega), seguindo as instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado com o GoTaq Reverse Transcription System (Promega). O qPCR dos alvos na Tabela 1 foi realizada utilizando o sistema SYBR do kit GoTaq qPCR Master Mix Kit (Promega). A sequência dos primers foram desenhados com a ferramenta Primer Quest tool (IDTDNA) e analisadas com BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

**Tabela 1** Sequência dos primers para os genes alvos analisados pelo sistema SYBR

Gene	Locus	Sequência do primer	Função	Referência
$\beta$ -2 microglobulin	NM_004048	FW: 5'-TAT CCA GCG TAC TCC AAA GA -3' RV: 5'- GGA TGA AAC CCA GAC ACA TAG - 3'	Gene para controle endógeno	
<i>CDH1</i>	NM_001317184	FW: 5'- GTC ATT GAG CCT GGC AAT TTA G - 3' RV: 5'- GTT GAG ACT CCT CCA TTC CTT C - 3'	Medeia adesão entre células epiteliais.	(CHEN, A. et al., 2014)
<i>CDH2</i>	NM_001308176	FW: 5'- CAA GAG CTT GTC AGG ATC AG -3' RV: 5'- GGG TTC TCC ACT TGA TTT CC -3'	Medeia adesão entre células mesenquimais.	(DRASIN; ROBIN; FORD, 2011)
<i>ESRP1</i>	NM_001034915	FW 5'- CCC ATC AGG AGA TGC CTT TAT C - 3' RV 5'-CCT CAG CTG AAC ACT GAA AGA-3'	Regula diversos eventos de <i>splicing</i> alternative durante a transição epitlêio-mesênquima.	(ISHII et al., 2014; WARZECHA et al., 2009)
<i>ESRP2</i>	NM_024939	FW 5'- TGG GAA GTC AAG ACA ATG GTA G-3' RV 5'- CCC GTC TCG TAT TTC TGC TTT A - 3'	Regula diversos eventos de <i>splicing</i> alternative durante a transição epitlêio-mesênquima.	(ISHII et al., 2014)
<i>HNRNPA1</i>	NM_002136	FW 5'- CAA CCC TGT GAC AGT CCA TAT T - 3' RV 5'- ATA GCT GCC ACA GCT TCT TC- 3'	Envolvido com o empacotamento de pre- mRNA em partículas hnRNP, transporte de mRNA polyA do núcleo para o citoplasma e pode modular a seleção de sítio de <i>splicing</i>	(JEAN- PHILIPPE; PAZ; CAPUTI, 2013; LOH et al., 2015)
<i>HNRNPF</i>	NM_001098204	FW 5'- GCG ACC GAG AAC GAC ATT TA- 3' RV 5'- GCA AAC TCA ACA TCT GCT TCA C - 3'	Associado com <i>splicing</i> alternativo.	(GEUENS; BOUHY; TIMMERMAN, 2016)
<i>HNRNPH1</i>	NM_001257293	FW 5'- ATG ATG TTG GGC AGG AA- 3' RV 5'- CTA TGC AAT GTT TGA TTG- 3'	Associado com <i>splicing</i> alternativo.	(GEUENS et al., 2016)
<i>MMP2</i>	NM_001127891	FW: 5'- CAT ACA GGA TCA TTG GCT ACA C - 3' RV: 5'- TCA CAT CGC TCC AGA CTT - 3'	Envolvido na degradação de matriz extracelular.	(LU, P. et al., 2011; SONG et al., 2016).
<i>MMP9</i>	NM_004994	FW: 5'- AAG GAC CGG TTC ATT TGG - 3' RV: 5'- CCT CGT ATA CCG CAT CAA TC -3'	Envolvido na degradação de matriz extracelular.	(YOUSEF et al., 2014)

**Tabela 1** Sequência dos primers para os genes alvos analisados pelo sistema SYBR  
(continuação)

Gene	Locus	Sequência do primer	Função	Referência
<i>RBFOX2</i>	NM_001031695	FW 5'-CGA TGG CAA GGG TCT ATA TC -3' RV 5'- ACA CTC CCT CCT ACC TTG ATA A- 3'	Importante regulador de <i>splicing</i> alternativo mesenquimal tecido-específico em células normais e cancerígenas.	(VENABLES et al., 2013)
<i>SF3B1</i>	NM_001005526	FW 5'- GGT GGA GAC AGC AGA TT- 3' RV 5'- CTG ACC AAG CAA ACT CGT AGA T- 3'	Codifica a subunidade I do complex 3B de <i>splicing</i> consutivo.	(WILL; LUHRMANN, 2011)
<i>SNAI1</i>	NM_005985	FW: 5'- CCA CGA GGT GTG ACT AAC TAT G -3' RV: 5'- ACC AAA CAG GAG GCT GAA ATA -3'	Inibe a expressão de E-caderina e regula a transição epitélio-mesênquima.	(DE HERREROS et al., 2010; GUAN, 2015)
<i>SNAI2</i>	NM_003068	FW: 5'- CTC TCT CCT CTT TCC GGA TAC T -3' RV: 5'- GCT TGG ACT GTA GTC TTT CCT C -3'	Inibe a expressão de E-caderina e regula a transição epitélio-mesênquima.	(GUAN, 2015; PAN, Y. et al., 2016)
<i>SRSF1</i>	NM_001078166	FW 5'- AAG CCC TTC TCC AAC CAT AAG -3' RV 5'- GGG CTG TC GTA GAC AAA TAC A -3'	Codifica uma proteína ubíqua que estimula proliferação celular e diferenciação; está envolvido com <i>splicing</i> alternativo e exportação de mRNA e tradução.	(FENG et al., 2013; LI, X.; MANLEY, 2005)
<i>TWIST1</i>	NM_000474	FW: 5'- CGG AGA CCT AGA TGT CAT TGT TT -3' RV: 5'- ACG CCC TGT TTC TTT GAA TTT G -3'	Relacionado com a determinação de linhagem celular e diferenciação; regula a transição epitélio-mesênquima.	(GUAN, 2015; PALUMBO-ZERR et al., 2016)
<i>VIM</i>	NM_003380	FW: 5'- ACTAGAGATGGACAGGTTATCA - 3' RV: 5'- GTAGGAGTGTGCGTTGTTAAG -3'	Ancoramento e organização de organelas no citosol.	(KIDD; SHUMAKER; RIDGE, 2014)
<i>ZEB1</i>	NM_001128128	FW: 5'- CTC ACA TTC CTC ACT GCC TAA C -3' RV: 5'- GAG AAC ATA GCT GAG CTC CAT AAA -3'	Inibe a expressão de E-caderina e regula a transição epitélio-mesênquima.	(GUAN, 2015; WANG, J. et al., 2009)

O qPCR dos alvos na Tabela 2 foi realizada utilizando o sistema TaqMan (Promega). Os primers foram obtidos da empresa IDTDNA (Síntese Biotecnologia, Brazil).

**Tabela 2** Número de catálogo dos primers para os genes alvos analisados pelo sistema TaqMan

Gene (exon lapping)	Locus	Catalog number	Function	Reference
$\beta$ -2 microglobulin (exons 2-3)	NM_004048	Hs.PT.39a.222114845	Gene de controle endógeno.	
<i>GAPDH</i> (exons 2-3)	NM_001256799	Hs.PT.39a.22214836	Funções da via da glicólise e funções antiapoptóticas; contribui para proliferação e proteção de células tumorais, promovendo tumorigênese.	(COLELL; GREEN; RICCI, 2009)
<i>FGF2</i> (exons 1-2)	NM_002006	Hs.PT.56a.24613308	Estimula proliferação de células vasculares e mesenquimais; envolvido no desenvolvimento tumoral.	(SCOTET; HOUSSAINT, 1998; XU et al., 2015; YAN et al., 1993)
<i>FGFR2</i> (exons 18-19)	NM_000141	Hs.PT.58.2098032	Envolvido no desenvolvimento embrionário e reparao tecidual.	(SU; JIN; CHEN, 2014)
<i>FGFR2</i> (exons 8-8)	IIIb NM_022970	Hs.PT.58.40356754.g	Isoforma alternative de FGFR2 envolvida em síndromes de craniossinossitose e câncer; isoforma alternative de FGFR2 abundante em células epiteliais.	(SHIRAKIHARA et al., 2011; WARZECHA et al., 2009; WESCHE; HAGLUND; HAUGSTEN, 2011)
<i>FGFR2</i> (exons 9-9)	IIIc NM_001144913	Hs.PT.58.2697036.g	Isoforma alternative de FGFR2 envolvida em síndromes de craniossinossitose e câncer; isoforma alternative de FGFR2 abundante em células mesenquimais.	(GALLO et al., 2015; SHIRAKIHARA et al., 2011; WARZECHA et al., 2009)

Para ambos os sistemas, 100ng of cDNA por reação, em um total de 40 ciclos por reação, foi utilizado. Os parâmetros das reações foram conforme as instruções do

fabricante. A expressão semiquantitativa foi determinada pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  utilizando a  $\beta$ -2 microglobulina como gene endógeno. Os dados foram representados em *heatmap*, onde a média do resultado dos grupos não-tratados foram subtraídos dos resultados das expressões obtidas dos grupos veículo e tratamentos.

### 3.6 Cálculo do *switch* de isoforma de *FGFR2*

O cálculo foi realizado utilizando a proporção *FGFR2-IIIc/FGFR2-IIIb*, baseado em Zhao e colaboradores (2013) Para tal, a seguinte equação foi realizada, sendo  $x$  o resultado da proporção.

$$(x): \frac{FGFR2IIIc}{FGFR2IIIb} = \frac{2^{\Delta CT \text{ } FGFR2IIIc}}{2^{\Delta CT \text{ } FGFR2IIIb}}$$

A proporção isoforma/FGFR foi utilizada para validar a equação anterior. Para tal cálculo, a seguinte equação foi utilizada, sendo  $y$  o resultado conforme a isoforma:

$$(yIIIc): \frac{FGFR2IIIc}{FGFR2total} = \frac{2^{\Delta CT \text{ } FGFR2IIIc}}{2^{\Delta CT \text{ } FGFR2total}}$$

$$(yIIIb): \frac{FGFR2IIIb}{FGFR2total} = \frac{2^{\Delta CT \text{ } FGFR2IIIb}}{2^{\Delta CT \text{ } FGFR2total}}$$

Finalmente, as proporções das duas isoformas foram somadas, cujo resultado deve ser aproximadamente igual a 1:

$$yIIIc + yIIIb \cong 1$$

### 3.7 Marcações por anticorpo e citometria de fluxo

Para análise de proteínas, a marcação com anticorpos e análise por citometria de fluxo foram utilizados. As células foram descoladas, lavadas três vezes com PBS acrescido de 5% SFB, e centrifugadas a 400 g por 5 minutos a temperatura ambiente. A viabilidade celular foi analisada pela coloração excludente de azul de Tripan a 0,4% (Sigma) e contadas em um câmara de Neubauer melhorada. Posteriormente, as células foram fixadas com 4% de formaldeído durante 10 minutos, lavadas com PBS acrescido de 5% SFB e centrifugadas a 800 g por 5 minutos a 4°C. Quando pertinente, as células

foram permeabilizadas com 0.01% Triton X-100 por 10 minutos, lavadas com PBS acrescido de 5% SFB e centrifugadas a 800 g por 5 minutos a 4°C.

Após a preparação das células, os anticorpos conjugados foram adicionadas a aproximadamente  $5 \times 10^5$  células. A concentração final dos anticorpos foi de 1:100, realizado em fase escura. Os anticorpos anti-CD24 (catálogo nº 555427), anti-CD44 (catálogo nº 562991), anti-CD49f (catálogo nº 562473), anti-CD182 (CXCR2; catálogo nº 551125), anti-CD184 (CXCR4; catálogo nº 562448), anti-E-caderina (catálogo nº 560062), anti-EpCAM (catálogo nº 563180), anti-EGFR1 (catálogo nº 563343), anti-HER2/neu (catálogo nº 340554), anti-Ki67 (catálogo nº 563756), anti-N-caderina (catálogo nº 562119), todos anti-humano, foram adquiridos da BD. O tampão BD Brilliant Stain Buffer (catálogo nº 563794) foi acrescentado quando necessário. As células foram analisadas no citômetro FACanto II (BD). Células de cada grupo sem as marcações (brancos) foram analisadas para detecção de auto-fluorescência.

A quantificação das proteínas foi realizada utilizando a intensidade mediana da fluorescência (MIF). A análise dos dados foi realizada utilizando o programa FlowJo vX 0.7 (Tree Star Inc.).

### 3.8 Ensaio de invasão/*transwell*

O ensaio de invasão foi realizado em câmaras de *transwell* de polycarbonato, com poros de 8 µm, em placas de 24 poços (Costar, Corning, EUA). Growth-reduced Matrigel® (BD) foi diluído e adicionado ao ensaio de invasão a uma concentração final de 1 mg/mL. Sessenta microlitros da solução foram colocados nas câmaras e posteriormente incubado a 37°C por 30 minutos para polimerização. Após isso, as células MCF-10A tratadas foram plaqueadas e meio de migração (200 µl) foi adicionado sobre estas. Meio de migração foi adicionado às placas (500 µl). Por cada grupo experimental, dois subgrupos foram formados: um acrescido de CXCL12 (20 ng/ml final) ao meio da placa, e outro sem CXCL12. Células MDA-MB-231 foram utilizadas como controle positivo da migração. Após 24 horas, o meio das câmaras foram aspiradas e as membranas de polycarbonato foram limpas com um *swab* úmido para remover as células suspensa, posteriormente transferidas para serem limpas com 400 µl de Cell Stain Solution e incubadas por 10 minutos. Após isso, as câmaras foram lavas 10 vezes em águas destilada.

Fotomicrografias das membranas foram obtidas com o microscópio Leica DM500 (Wetzlar, Germany), na ampliação de 10 vezes, utilizando o programa Las Ez. As células de 10 campos aleatórios, por grupo, foram contadas utilizando o programa ImageJ.

### 3.9 Ensaio de migração/*scratch assay*

As células MCF-10A foram manipuladas como descrito no segundo tópico desta seção. Após atingirem confluências, uma ponteira de 200 µl foi utilizado para formar um risco (ferida) para permitir as células migrarem. As imagens foram capturadas utilizando um microscópio invertido EVOS (AMG), até o fechamento da ferida em qualquer um dos grupos. As fotomicrografias foram analisadas com o programa ImageJ.

### 3.10 Reação de Feulgen

Células MCF-10A dos grupos não-tratado, veículo, BPA 10 µM e BPA 10 µM/MPA tiveram seus núcleos analisados pela reação de Feulgen. As células foram fixadas em solução de etanol absoluto/ácido acético (volume/volume 3:1) por 1 minuto, enxaguadas em etanol a 70% por 5 minutos e secadas a ar a temperatura ambiente. As células foram submetidas à reação de Feulgen, com hidrólise realizada a 4 M HCl a 25° C por 45 minutos, seguida de coloração com reagente de Schiff a temperatura ambiente. Lamelas lavadas com água sulfurosa e água destilada foram secadas a ar, clarificadas em xileno e montadas em lâminas histológicas em baslamo Canadá.

Para captura de imagens e análise, o equipamento Leica e os programas Leica e ImageJ foram utilizados, respectivamente. Imagens foram obtidas com um microscópio Leica DM500 equipado com uma objetiva planar 100/1,25, com um condensador pré-focado e pré-centralizado, iluminação LED (3 W, 6,000 K temp); a iluminação foi mantida sempre no máximo e o diafragma do condensador foi colocado na posição 100x. As condições de iluminação, incluindo as do ambiente, foram mantidas constantes no ato da análise. As imagens a serem processadas foram transferidas do microscópio para um Desktop Intel Core i7 através da câmera Leica ICC50 HD High Definition Digital Microscope Camera, utilizando o programa Leica LAS EZ capture software (v 1.8.1, Leica Microsystems Limited, Switzerland). As condições de captura foram: exposição 22,0 ms, ganho 2,1x, gamma 1,00 e saturação a 100,00. Nessas condições, 1mm corresponde a 15,9 pixels. O programa ImageJ providenciou informação quantitativa da área nuclear (em milímetros quadrados) e valor de cinza médio por núcleo que foi convertido em densidade óptica (OD - absorbância). A conversão dos valores de cinza médio para absorbância foi realizado utilizando o programa “Optical Density Calibration” tool, baseado em Kodak No. 3 Calibrated Step Tablet. A OD integrada (IOD, neste caso valores de Feulgen-DNA) foram obtidos pela integração da absorbância pela área dos núcleos. Contraste e entropia, características texturais baseados na Matriz de



Correlação dos Níveis de Cinza (GLCM) foram estimados. Contraste é uma medida de contraste ou a quantidade de variação local presente em uma imagem (HARALICK; SHANMUGAM; DINSTEN, 1973), e reflete a variabilidade no grau de empacotamento de cromatina por núcleo. A entropia mede o nível de desordem espacial dos níveis de cinza na GLCM, e reflete que tão heterogêneo um núcleo, corado pela reação de Feulgen, pode ser. Aproximadamente 100 núcleos por imagem foram selecionados, de forma aleatória, por imagem, que não foram limitadas a poucas áreas dos borrões.

### 3.11 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com os programas GraphPad Prism 6.0© (GraphPad Software Inc., 2007, San Diego, CA, USA) e Minitab 14 (Statistics package, 1972, Pennsylvania State University). One-way ANOVA, com análise *post hoc* de Tukey, Two-way ANOVA, com análise *post hoc* de Sidak, e teste t de Student, foram realizadas considerando significância estatística quando alfa era menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ). As diferenças estatísticas estão representadas por letras: letras diferentes representam diferenças estatísticas; letras idênticas representam semelhança estatística. Os gráficos estão representados como médias  $\pm$  desvio de erro padrão (SEM).

## 4 CAPÍTULO 1: EFEITOS DO BPA ASSOCIADO AO MPA NA PROMOÇÃO TUMORAL DE CÉLULAS NÃO-TRANSFORMADAS

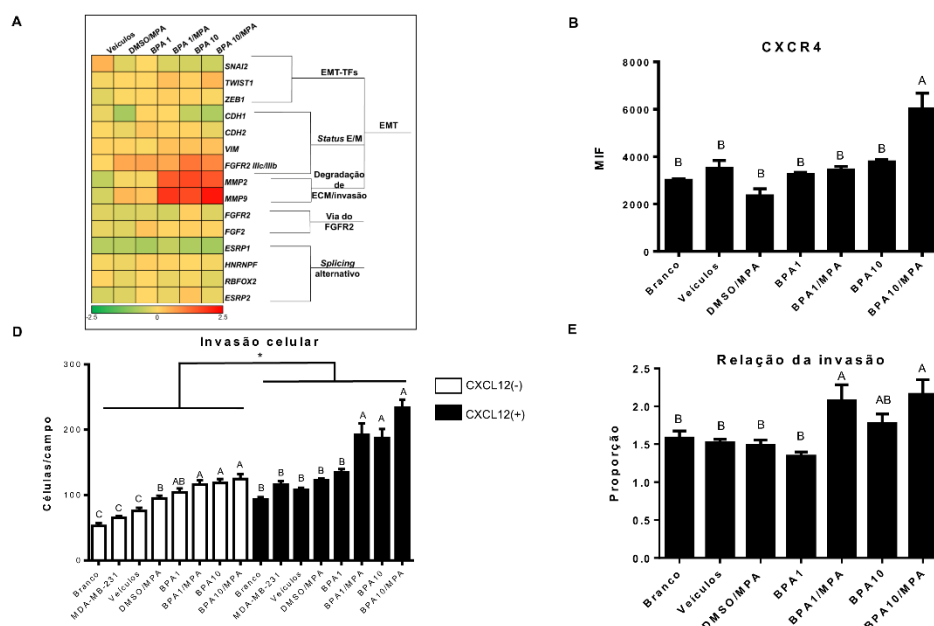
### 4.1 RESULTADOS

#### *Citotoxicidade*

Primeiramente, a citotoxicidade das drogas nas diversas concentrações foi testado pelo ensaio de MTT. Não houve citotoxicidade significativa (dados não mostrados).

#### *BPA e MPA alteram a expressão de EMT-TFs*

Após tratamentos, a expressão de *SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1* e *ZEB1* foram analisados. Não houve diferença significativa na expressão de *SNAI1* em função dos tratamentos. Interessantemente, o grupo veículo teve expressão aumentada de *SNAI2*, em relação ao não-tratado, enquanto que BPA e MPA diminuíram a expressão de *SNAI2*. Ademais, o veículo DMSO diminui a expressão de *TWIST1* e *ZEB1*. No entanto, houve aumento na expressão de *TWIST1* e *ZEB1* em função dos tratamentos, quando comparado ao grupo veículo ( $p < 0,05$ ); BPA 1  $\mu$ M/MPA e BPA 10  $\mu$ M/MPA também aumentaram a expressão de *TWIST1* comparado ao grupo não-tratado ( $p < 0,05$ ). É importante destacar que o MPA parece ter agido sinergicamente com BPA na regulação de *TWIST1*, pois se observou um pequeno, porém equivalente, aumento nos grupos tratados com DMSO/MPA e BPA 1  $\mu$ M, quando comparado ao grupo veículo, e uma expressão ainda maior de *TWIST1* na presença de BPA e MPA ( $p < 0,05$ ). Embora o DMSO causou efeitos pronunciados na expressão de alguns genes, os efeitos de BPA e MPA ou são opostos, ou somatórios, o que significa que o DMSO não afetou os resultados obtidos com MPA e BPA. Provavelmente o grupo tratado com DMSO/MPA teria efeitos mais destacados no aumento, ou diminuição, da expressão de alguns genes, se o efeito do DMSO fosse subtraído, o que mostra a importância do grupo controle. Como o DMSO diminui a expressão de genes e os efeitos do tratamento com DMSO/MPA não diferem do grupo não-tratado, é possível que o MPA teria atingido efeitos maiores, resultando em uma discrepância maior com o grupo não tratado. Os dados estão representados na Figura 1.1A.



### Impacto na via *FGFR2* e no status epitelial/mesênquimal

Uma grande diminuição na expressão de *FGFR2* é observada em todos os grupos, quando comparado com o grupo não-tratado, a exceção do grupo tratado com BPA 10  $\mu$ M ( $p < 0,05$ ). No entanto, como DMSO estava presente em todos os tratamentos, é possível que a diminuição da expressão de *FGFR2* foi causada pelo seu efeito, mas é difícil de afirmar tal fato, pois o tratamento crônico com BPA a 10  $\mu$ M, que também possui DMSO, restabeleceu os níveis de expressão de *FGFR2*, porém, quando acrescentado MPA, os níveis caíram novamente ( $p < 0,05$ ). Parece que, de alguma forma, o MPA agiu de forma similar, talvez de forma competitiva e excludente, ao DMSO nesta questão. Os dados estão representados na Figura 1.1A.

Embora a diminuição da expressão de *FGFR2* é nítida, a proporção de isoforma IIIc/IIIb foi mantida no grupo controla a aproximadamente 0,4, similar ao grupo não-tratado. Os grupos tratados com BPA a 1  $\mu$ M, com ou sem MPA, tiveram um aumento da

proporção a aproximadamente 0,95, e esta ultrapassou a proporção 1:1 quando os tratamentos crônicos com BPA foi de 10  $\mu$ M, embora a presença de MPA diminuiu levemente esta proporção ( $p < 0,05$ ). Isto implica que tanto o BPA como o MPA induziram o *switch* de isoforma de *FGFR2* da variante epitelial (IIIb) para a mesenquimal (IIIc), e, em relação à concentração de 10  $\mu$ M de BPA, este efeito foi mais pronunciado, sendo, porém, um pouco contrabalanceado pela administração de MPA ( $p < 0,05$ ). Os dados estão representados na Figura 1.1A.

A expressão gênica de *FGF2* também foi analisada para avaliar a participação deste fator de crescimento no *switch* de isoforma de *FGFR2*. Interessantemente, houve diminuição da expressão de *FGF2* nos grupos veículo e DMSO/MPA, e um aumento, comparado ao controle, nos grupos com BPA ( $p < 0,05$ ). Infelizmente, uma grande variabilidade foi observada nos grupos tratados com BPA/MPA, tornando impossível de inferir a participação de *FGF2* no contexto das duas drogas ( $p > 0,05$ ). No entanto, novamente, DMSO alterou a expressão de *FGF2* para baixo, e o MPA parece ser inefetivo na regulação deste gene, mesmo quando associado a BPA, embora o tratamento de BPA, associado ou não a MPA, provavelmente teria aumentado a expressão de *FGF2* em relação ao grupo não-tratado, se não fosse pelos efeitos de fundo do DMSO. Os dados estão representados na Figura 1.1A.

Enquanto que o *switch* de isoforma de *FGFR2* para a isoforma IIIc é nítida, outros marcadores clássicos de EMT (*CDH1* – gene codificante da E-caderina -, *CDH2* – gene codificante da N-caderina -, e *VIM* – gene codificante de Vimentina) não foram alterados de forma tradicionalmente observada na EMT. O gene *CDH1* teve sua expressão diminuída em função do DMSO, mas MPA diminuiu ainda mais sua expressão ( $p < 0,05$ ). No entanto, BPA 1  $\mu$ M aumentou a expressão, mas BPA 10  $\mu$ M diminuiu, quando comparados ao grupo veículo ( $p < 0,05$ ), o que mostra uma ação antagonista dose-dependente do BPA. Ademais, no grupo tratado com BPA 10  $\mu$ M houve uma diminuição na porcentagem de células E-caderina<sup>+</sup> ( $p < 0,05$ ) (Figura 1.3A). O gene *CDH2* teve sua expressão diminuída pelo tratamento com MPA, e não houve alteração significativa em função de BPA (Figura 1.1A). Observou-se aumento da expressão de *VIM* nos tratamentos com BPA 1  $\mu$ M/MPA, BPA 10  $\mu$ M e BPA 10  $\mu$ M/MPA ( $p < 0,05$ ), e uma pequena diminuição da sua expressão no tratamento com BPA 1  $\mu$ M ( $p < 0,05$ ), configurando uma ação sinérgica desses dois compostos nesta questão, considerando que o MPA, sozinho, não alterou a expressão de *VIM*. No caso de *VIM*, sua expressão não foi afetada pelo DMSO. Os dados estão representados na Figura 1.1A.

### *Impacto na expressão gênica dos fatores de splicing*

Neste foi observado diferença estatística na expressão de *ESRP1* no grupo veículo ( $p>0,05$ ), em relação ao não tratado, e diminuição nos grupos BPA 1  $\mu\text{M}$  e BPA 10  $\mu\text{M}$ /MPA em relação aos demais ( $p>0,05$ ). A expressão de *ESRP2* foi diminuída principalmente pela presença de DMSO, que contrabalanceou um possível aumento causado por MPA, sozinho, ou na presença de BPA de forma mais drástica que o aumento claro causado por BPA sozinho ( $p<0,05$ ). Houve diminuição da expressão de *RBFOX2* pela presença de MPA e BPA 10  $\mu\text{M}$ , sendo menor no tratamento com BPA 10  $\mu\text{M}$ /MPA ( $p<0,05$ ). Os demais fatores de *splicing* não tiveram sua expressão gênica alterada pelos tratamentos. É interessante destacar que não houve alteração significativa na expressão gênica dos outros fatores de *splicing* analisados em função das concentrações micromolares de BPA, exceto *HNRNPF*, que teve sua expressão aumentado com BPA 1  $\mu\text{M}$ , quando comparado ao grupo veículo ( $p<0,05$ ), e BPA restabeleceu a diminuição causada por MPA ( $p<0,05$ ). Os dados estão representados na Figura 1.1A.

### *BPA/MPA confere um fenótipo invasivo*

Para avaliar se o tratamento com BPA/MPA eficientemente causa EMT, genes envolvidos com a invasão e migração, bem como a própria invasão e migração, foram testados.

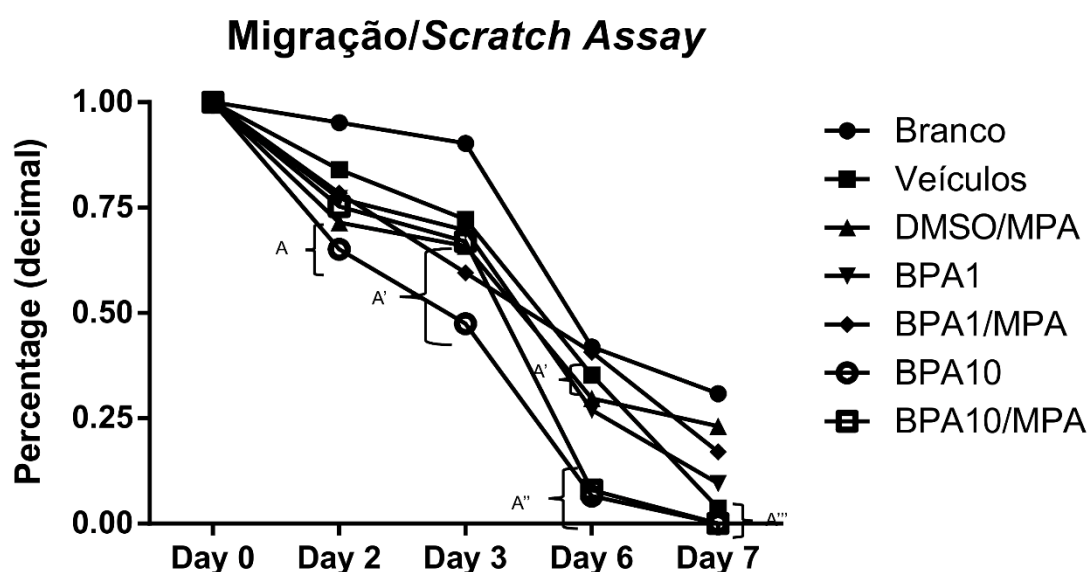
Primeiramente, a expressão de *MMP2* e *MMP9* foram analisados. Houve diminuição da expressão destes dois genes no grupo veículo ( $p<0,05$ ), e MPA sozinho ou BPA a 1  $\mu\text{M}$  restabeleceram suas expressões ( $p<0,05$ ). Um grande aumento da expressão por BPA, de forma dose-dependente, foi observado ( $p<0,05$ ). Interessantemente, um maior aumento na expressão de *MMP9* foi observado na presença de BPA/MPA quando comparado a suas compartimentos de apenas BPA ( $p<0,05$ ). Como o tratamento BPA 10  $\mu\text{M}$ /MPA aumentou a expressão de *MMP9* mais do que o tratamento com apenas BPA 10  $\mu\text{M}$ , se pode inferir uma ação sinérgica do MPA ao BPA nesta questão. Portanto, os tratamentos com BPA/MPA, ou altas concentrações de BPA, causaram aumento na expressão de genes cujo produto está associado ao fenótipo de EMT. Os dados estão representados na Figura 1.1A.

Adicional ao aumento de *MMPs*, foi observado aumento de CXCR4 no tratamento com BPA 10  $\mu\text{M}$ /MPA, avaliado pelo MIF (Figura 1.1B). Todos os resultados apontaram para o estímulo do fenótipo EMT nas células MCF-10A como resposta aos tratamentos.

O impacto dos tratamentos no comportamento invasivo foi testado com o ensaio de invasão/*transwell*. As células MDA-MB-231 foram utilizadas como controle positivo, as quais tiveram alta invasividade, e ainda maior na presença de CXCL12 (Figura 1.1C). Todos os tratamentos aumentaram a invasão das células (Figura 1.1D). Para testar a participação de CXCR4 no processo, o mesmo ensaio, mas na presença de CXCL12 foi realizado (Figura 1.1D, direita), com uma evidente exacerbação dos efeitos da alta concentração de BPA, associado ou não a MPA. Embora a invasão notoriamente aumentou, a diferença da invasão observada entre os grupos tratados, quando comparados os ensaios (presença/ausência de CXCL12), não aumentou, com exceção do grupo tratado com BPA 10 $\mu$ M/MPA (Figura 1.1E).

*BPA/MPA confere um aumento duradouro da capacidade de migração celular*

O ensaio de *scratch assay* foi realizado após os vinte dias do término dos tratamentos e, mesmo após este tempo, as células tiveram a habilidade de manter características similares de migração celular. O gráfico mostra o processo de fechamento da ferida provocada para o ensaio e demonstra que os tratamentos com BPA 10  $\mu$ M e BPA 10  $\mu$ M/MPA induzem um fechamento mais rápido que o grupo não-tratado, sugerindo que essas drogas influenciaram o aumento de fatores relacionado com a migração celular (Figura 1.2). Esses dados são similares aos de invasão celular (compare com a Figura 1.1D).



**Figura 1.2** Scratch assay. O ensaio de migração/scratch assay foi realizado após 20 dias do término dos tratamentos ( $n=3$ ). Uma grande diferença estatística nas duas variáveis (tratamento e tempo) foi encontrada ( $p<0,05$ ). Um rápido fechamento da ferida é observado nos grupos que foram tratados com BPA 1  $\mu$ M, BPA 10  $\mu$ M e BPA 10  $\mu$ M/MPA, comparado com os grupos não-tratado e veículo. Porém, um efeito de fundo em função do veículo também é observado: o grupo controle fechou mais rápido que o branco. No entanto, os grupos tratados tiveram um fechamento mais rápido em vários momentos. A diferença estatística ( $p<0,05$ ) está representada por letras diferentes; letras iguais representam semelhança estatística ( $p>0,05$ ).

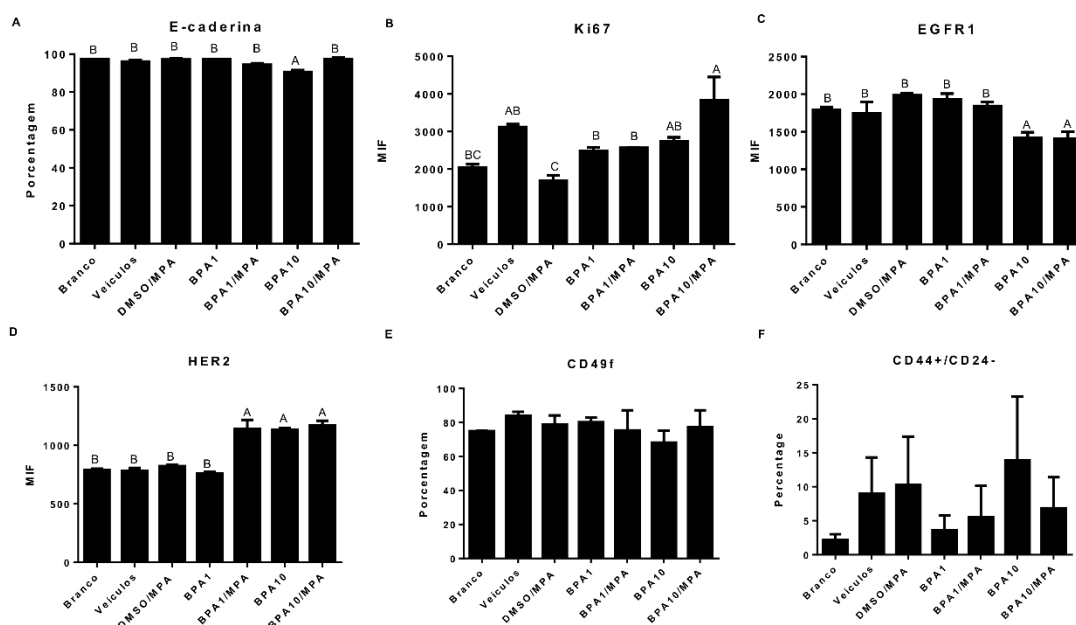
### *Impacto na proliferação celular*

Interessantemente, no momento de descolar as células para os ensaios, sempre se observou uma contagem celular reduzida, por exclusão de azul de Tripán, em função dos tratamentos com BPA, de forma dose-dependente. Porém, os tratamentos com MPA sempre aumentaram a contagem celular nos tratamentos (dados não mostrados).

Por mensurar os níveis de Ki67, um indicador de proliferação celular, é possível concluir que DMSO é capaz de estimular a proliferação celular, que é fortemente revertido pelo tratamento com MPA a níveis menores que o do próprio grupo não-tratado, ou é fracamente revertido pelo tratamento com BPA, independentemente da concentração e da presença, ou não, de MPA (Figura 1.3B). Isto implica que tanto BPA como MPA revertem o aumento da proliferação induzido pelo DMSO, efeitos que seriam mais pronunciados em ensaios livres do veículo DMSO. É importante destacar que o MPA associado à maior concentração de BPA, embora não foi estatisticamente significativo, teve uma tendência a estimular a proliferação celular.

Adicionalmente, dois receptores associados a proliferação celular de células epiteliais (EGFR1 e HER2) foram quantificados. Com relação ao EGFR1, somente os grupos BPA 10  $\mu$ M e BPA 10  $\mu$ M/MPA difeririam dos demais, tendo menor quantidade de EGFR1 (Figura 1.3C). A expressão de HER2 aumentou em função dos tratamentos

com BPA 1 $\mu$ M/MPA, BPA 10 $\mu$ M e BPA 10 $\mu$ M/MPA (Figura 1.3D). Os efeitos parecem ser sinérgicos de alguma forma, mas não somatórios, uma vez que BPA 10 $\mu$ M aumentou HER2 aos níveis similares que BPA 1 $\mu$ M/MPA, e não houve aumento de HER2 em função de tratamento com BPA 1 $\mu$ M, quando comparado aos grupos não-tratado e veículo.



**Figura 1.3** Marcadores de fenótipo e de proliferação analisados por citometria de fluxo. Como alguns marcadores estão envolvidos com fenótipo celular e proliferação celular, alguns marcadores epiteliais (E-caderina, A), proliferação (Ki67, B), receptores de fatores de crescimento (EGFR1 e HER2; C e D, respectivamente), e fenótipo de célula de mama (CD49f e CD44/CD24; E e F, respectivamente) foram analisados. Os tratamentos foram capazes de alterar o levemente fenótipo epitelial (A) e aspectos de proliferação (B-D), mas não o fenótipo de célula de mama. A diferença estatística ( $p < 0,05$ ) está representada por letras diferentes; letras iguais representam semelhança estatística ( $p > 0,05$ ). As barras de desvio representam SEM ( $n = 6-9$ ).

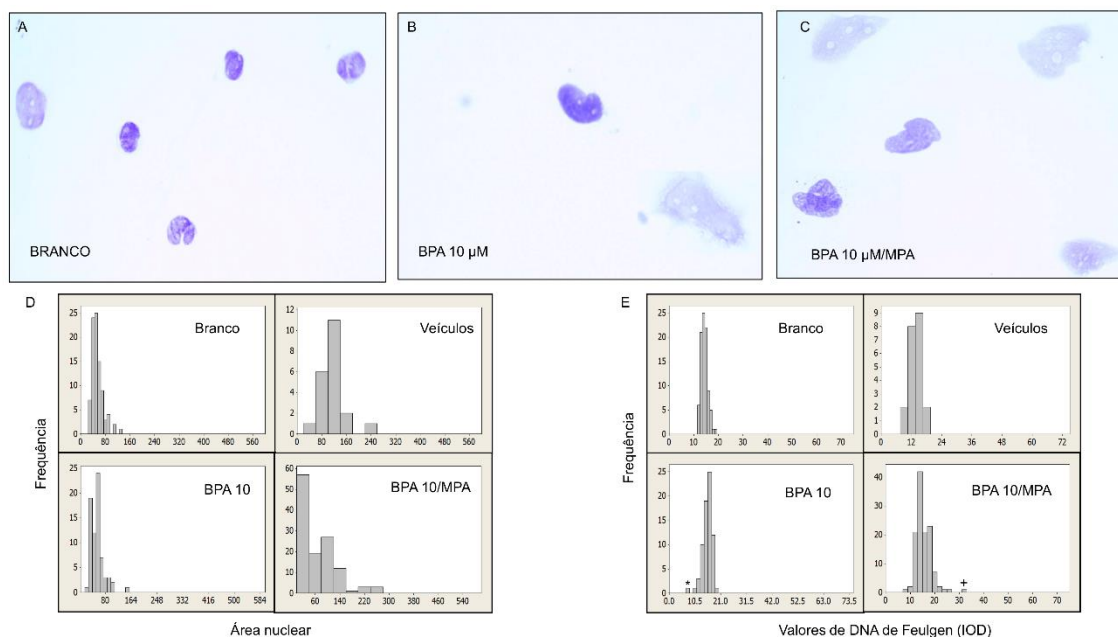
### Alterações na morfologia nuclear

Como os tratamentos com BPA 10  $\mu$ M e BPA 10  $\mu$ M/MPA causaram as maiores alterações na migração e invasão, essas células foram submetidas à reação de Feulgen para avaliação morfológica das características nucleares. O resultado mais evidente foi o aumento no número de núcleos com áreas maiores em todos os tratamentos (Figura 1.4A-E), porém mais pronunciado no tratamento com BPA 10  $\mu$ M. No entanto, a quantidade de DNA (IOD) desses núcleos não foram diferentes dos grupos não-tratado ou veículo, evidenciando que foram submetidos a uma forte descompactação da cromatina.

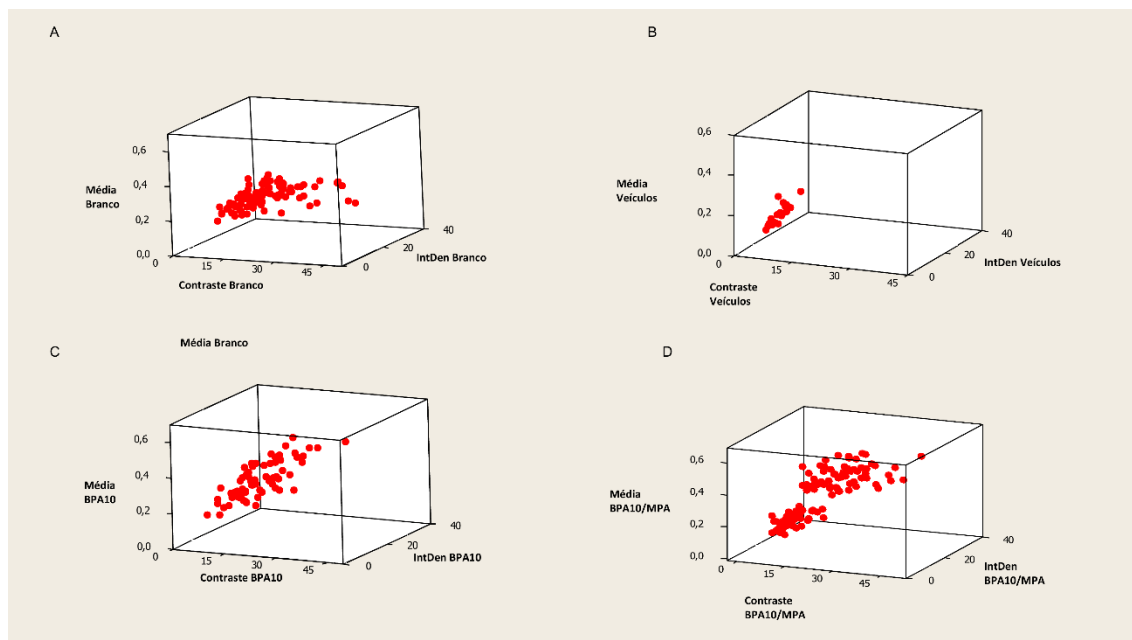
Embora há uma forte descompactação nos núcleos grandes, o tratamento com BPA 10  $\mu$ M também induziu compactação cromatínica em aproximadamente 25% dos núcleos, o que ocorreu principalmente em regiões previamente condensadas (aumento nos valores de contraste, Figura 1.5C), mas, também, em novas regiões (aumento da



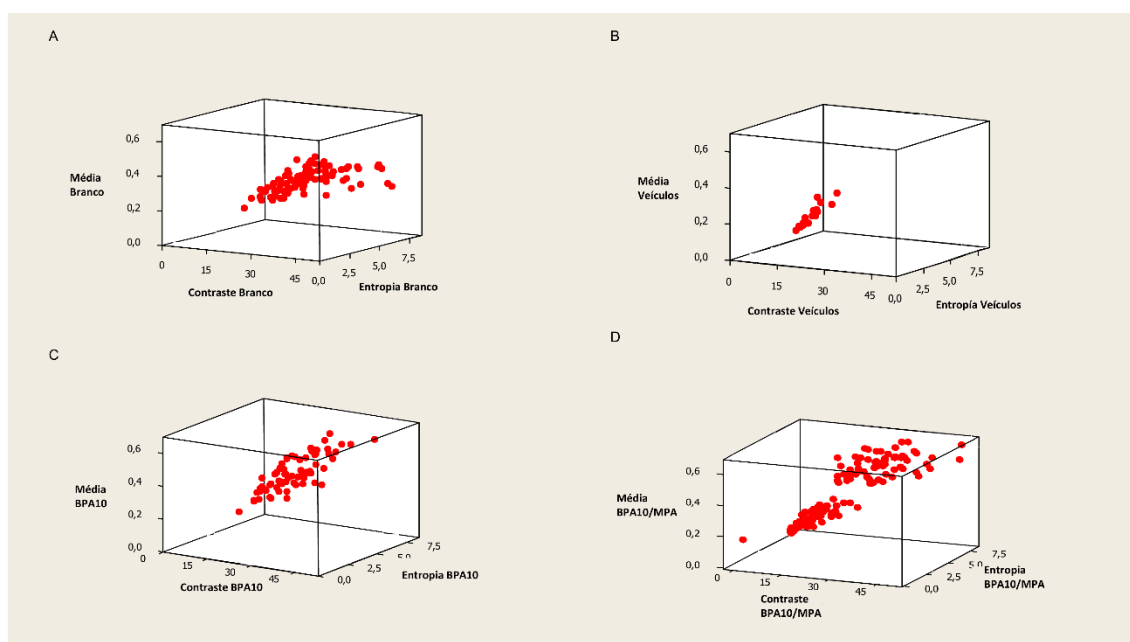
entropia, Figura 1.6C). O mesmo fenômeno aconteceu no tratamento com BPA 10  $\mu$ M/MPA, mas em 40% dos núcleos (Figuras 1.5D e 1.6D).



**Figura 1.4** Alterações nucleares e parâmetros obtidos pela reação de Feulgen. Os grupos com as alterações mais marcadas nos outros ensaios foram submetidos à reação de Feulgen. Núcleos corados dos grupos branco (A), BPA 10  $\mu$ M (B) e BPA 10  $\mu$ M/MPA (C). As características nucleares indicam compactação ou decompactação do material genético. Os gráficos representam a distribuição das áreas nucleares e os valores de DNA-Feulgen. Esses parâmetros indicam compactação nuclear e o conteúdo de DNA (D e E, respectivamente).



**Figura 1.5** Scatterplot em 3D mostrando a correlação entre Mean, Contrast e IntDen/IOD. As imagens mostram a correlação entre Mean (OD), que indica grau de compactação; IntDEN (IOD), que estima conteúdo genético (DNA) e Contrast, que mede a diferença entre as regiões compactadas e as não-compactadas. Não-tratados (A), Veículo (B), BPA 10  $\mu$ M (C) e BPA 10  $\mu$ M/MPA (D).



**Figura 1.6** Scatterplot em 3D mostrando a correlação entre Mean, Contraste e Entropia. As imagens mostram a correlação entre Mean (OD), que indica grau de compactação; Contraste, que mede a diferença entre as regiões compactadas e as não-compactadas, e Entropia, que indica o grau de heterogeneidade da compactação na área total. Não-tratados (A), Veículo (B), BPA 10µM (C) e BPA 10µM/MPA (D).

### *BPA e MPA não alteram os marcadores moleculares de células MCF-10A*

O fenótipo de CSC foi analisado pela expressão de CD24, CD44, o fenótipo de células de mama por CD49f e EpCAM, utilizando citometria de fluxo. Primeiramente, quase todas as células, grupos não-tratado, veículo ou tratamentos, são EpCAM<sup>low/-</sup> (dado não mostrado) e entre 70%-80% são CD49f<sup>+</sup> (Figura 1.3E), embora sejam CD49f<sup>low</sup> (dado não mostrado). Isto configura o fenótipo típico de células mioepiteliais de mama, como as MCF-10A de fato são.

Todas as células são CD44<sup>high</sup> (dado não mostrado) e aproximadamente 90% são CD24<sup>+</sup>, embora sejam CD24<sup>low</sup> (dados não mostrados). O status de CD24 variou com as passagens. Portanto, a porcentagem de células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> variou com as passagens. Não houve diferença estatística nesses marcadores em função de tratamentos (Figura 1.3F).

## 4.2 DISCUSSÃO

### *BPA e MPA alteram RBFOX2 e o splicing alternativo de FGFR2*

Os fatores de *splicing* possuem um papel muito importante na progressão tumoral e tumorigênese. Aumento de RBFOX2, SRSF1, SF3B1, hnRNP A1, hnRNP F, hnRNP H, e diminuição de ESRPs são envolvidos com aumento da agressividade tumoral (ANCZUKOW et al., 2012; DAVID; MANLEY, 2010; HE et al., 2005; HONORE; BAANDRUP; VORUM, 2004; HSU et al., 2015; LI, S. et al., 2009; SHAPIRO et al., 2011; VENABLES et al., 2013). Neste estudo não se observou diferença estatística na expressão dos genes desses fatores de *splicing* em função da exposição crônica de BPA, exceto *ESRP1*. Interessantemente, concentrações micromolares de BPA tampouco alteraram a expressão desses genes de fatores de *splicing* em células MDA-MB-231 (ER<sup>-</sup>), embora a análise tenha ocorrido após 24 horas de exposição. Porém, alterações foram observadas em células MCF-7 (ER<sup>+</sup>) (dados do capítulo 2). A diminuição de *ESRP2* foi observada principalmente por DMSO, com aumento provocado por BPA e MPA. Foi observado que a diminuição de *ESRP2* impacta na expressão de E-caderina por aumentar a expressão de fatores da família Zeb, assim reprimindo a expressão de *CDH1* (ISHII et al., 2014). No entanto, neste estudo foi observado aumento de *ZEB1* em grupos que tiveram também aumento de *ESRP2* (compare na Figura 1.1A). Esses dados contrastantes sugerem vias pleiotrópicas e colaterais que regulam esses genes.

Um dos eventos analisados na EMT é o *switch* de *FGFR2*. Portanto, elementos envolvidos neste fenômeno foram analisados. Interessantemente, a expressão de *FGFR2* diminui, mas principalmente pela presença do veículo, com restabelecimento apenas com tratamento de BPA 10 µM. Uma explicação para o *switch* de isoforma seria a expressão de *FGF2*, pois FGF2, ligante de FGFR2 IIIc, pode induzir *switch* de isoforma de *FGFR2* para IIIc, criando um *loop* autócrino (MAREK et al., 2009; SCOTET; HOUSSAINT, 1998; YAN et al., 1993). O veículo também diminuiu a expressão de *FGF2*, mas houve aumento de *FGF2* apenas nos tratamentos com BPA. Isso poderia explicar o *switch* de isoforma de *FGFR2* nesses grupos.

O *splicing* alternativo do pré-mRNA de *FGFR2* é governado pelos fatores analisados (*ESRP1*, *HNRPN1*, *HNRNPF*, *HNRNPH1*, *RBFOX2* e *SRSF1*), exceto por *SF3B1* e *ESRP2* (BARANIAK; CHEN; GARCIA-BLANCO, 2006; MAUGER et al., 2008; WARZECHA et al., 2010). No entanto, não houve alterações na expressão dos fatores de *splicing* que pudesse explicar o *switch* de isoforma de *FGFR2*, exceto a

diminuição de *RBFOX2* nos grupos tratados com MPA e em BPA  $\mu\text{M}$ . Este é o segundo estudo a analisar o impacto do BPA na expressão de fatores de *splicing* e *splicing* alternativo no contexto da tumorigênese de mama (WILLIAMS et al., 2016).

Embora foram observados algumas alterações nos fatores de *splicing* analisados, estas alterações não são relevantes no contexto de progressão tumoral. O *splicing* alternativo observado (*switch* para *FGFR2 IIIc*) está de acordo com EMT. O fator de *splicing* mais relevante que sofreu alteração foi *RBFOX2*. Porém, a principal participação de *RBFOX2* nos fenômenos observados parece ser outra, como será discutido posteriormente.

#### *MPA potencializa os efeitos de BPA na EMT*

A EMT provocada por BPA foi relatada em vários estudos, tanto em células  $\text{ER}^+$  ou  $\text{ER}^-$ , elicitado por vias diferentes, resultando em diferentes fatores de transição de EMT governando o EMT de acordo com o status de ER da célula e a concentração de BPA, se nanomolar ou micromolar. Vários desses estudos mostraram eficientemente a EMT por aumento de migração e fatores de invasão (CASTILLO SANCHEZ; GOMEZ; PEREZ SALAZAR, 2016; CHEN, Z. J. et al., 2015; DONG; TERASAKA; KIYAMA, 2011; KIM et al., 2015; SHI et al., 2014; ZHANG, K. S. et al., 2014; ZHANG, X. L. et al., 2015). Embora esses estudos foram realizados em linhagens celulares diferentes, com status de ER diferentes e concentrações diferentes de BPA, eles têm em comum um protocolo de exposição de 24-72 horas de BPA, enquanto que neste estudo foram 16 dias de exposição. A exposição prolongada a concentrações micromolares de BPA certamente elicitaram os efeitos observados por outras vias ainda não estudadas. Também, o EMT causado por BPA neste estudo levou eficientemente a um perfil de EMT pelo aumento de invasão, aumento de *TWIST1* e *ZEB1*, com aumento de *MMPs*. Embora houve um efeito de fundo provocado pelo veículo utilizado (DMSO), que causou aumento de *SNAI2*, não aumentou a invasão dessas células e não comprometeu a ação de BPA nestes aspectos. No entanto, os fenômenos observados aconteceram na maior concentração testada de BPA (10  $\mu\text{M}$ ).

Concentrações nanomolares de MPA inibiram EMT em células de linhagem de câncer endometrial que expressam ectopicamente o receptor de progesterona (PR) (VAN DER HORST et al., 2012) e concentrações micromolres de MPA induzem MET durante a decidualização *in vitro* de células estromais uterinas (ZHANG, X. H. et al., 2013). No entanto, a perda de PR está associado com mau prognóstico, e EMT, em câncer

endometrial (COLAS et al., 2012; THIGPEN et al., 1999). Neste estudo, os ensaios foram realizados com a célula triplo-negativa MCF-10A. Isto pode explicar os dados contrastantes. Embora o MPA sozinho não elicitou efeitos notórios, é interessante o fato de potencializar alguns efeitos observados em células pré-tratadas cronicamente com BPA, principalmente com a menor concentração testada (1  $\mu$ M). Na maior concentração de BPA (10  $\mu$ M), o MPA não alterou significativamente nenhum dos aspectos observados relacionados a EMT e invasão. Parece que MPA regula as vias pelas quais BPA atua, mas seu efeito é redundante ao da maior concentração testada de BPA (note na Figura 1.1A referente a *TWIST1* e *MMPs*, bem como na Figura 1.1D referente ao aumento da invasão).

Os fatores da família Snail (Snail1 e Snail2 – ou Slug), são responsáveis pelo EMT parcial, e seu aumento é observado na fase inicial do processo. Já o aumento Twist1 e Zeb1 no EMT total e são observados na fase final do processo (TRAN et al., 2011; ZHANG, J. et al., 2014). É possível observar que MPA potencializa os efeitos de BPA no que se refere a *TWIST1*, e é possível observar que o comportamento da expressão das *MMPs* segue o padrão de expressão de *TWIST1* (compare na Figura 1.1A). Esses dados evidenciam que BPA/MPA atua pela via TWIST1/c-fos/MMP (YU et al., 2012). Interessantemente, o aumento de *TWIST1*, *MMP2* e *MMP9* é correlacionado com metástase linfodonal e aumento dos valores tumor-linfono-metástase em câncer de mama (ZHAO, M. et al., 2013).

O EMT pela via TWIST/MMP permite que a célula preserve características epiteliais e é mais plástico, facilitando o MET uma vez chegado no sítio secundário no contexto da metástase (JOLLY et al., 2015; SHAMIR et al., 2014). Isso pode explicar os dados contrastantes observados na expressão de *CDH1* e *CDH2*, os quais não se comportaram da forma esperada (diminuição e aumento, respectivamente, de forma dose-dependente). No entanto, *VIM* se comportou de forma esperada e, novamente, MPA potencializou o efeito apenas da menor concentração de BPA. O outro indicador de status epitelial/mesenquimal observado, a proporção IIIc/IIIb, se comportou de forma esperada, de forma dose-dependente, mas com alguns efeitos peliotrópicos no tratamento BPA10  $\mu$ M /MPA.

O fenótipo celular foi analisado pelo ensaio de invasão/*transwell* na presença ou ausência de CXCL12. O eixo CXCL12/CXCR4 possui um papel muito importante no câncer de mama e metástase (WEIDLE et al., 2016). Neste estudo não foi observada uma participação significativa do eixo CXCL12/CXCR4. No entanto, somente no grupo

tratado com BPA 10  $\mu$ M /MPA houve aumento de CXCR4 com uma contribuição, embora não grande, no processo de invasão.

#### *BPA diminui a proliferação celular e MPA induz proliferação celular de MCF-10A*

O primeiro indicativo do impacto de BPA na proliferação celular foi a contagem reduzida de células de forma dose-dependente. Em outros estudos foi observado aumento da proliferação celular com concentrações nanomolares a micromolares, até 10  $\mu$ M, de BPA, com alta citotoxicidade em concentrações maiores de 10  $\mu$ M. Porém, os protocolos desses estudos consistem em 24 a 72 horas de exposição a BPA e a maioria desses estudos foi realizado com células MCF-7, que é uma linhagem de célula de câncer de mama estrógeno-positivo (LU, Z. X. et al., 2014; SAMUELSEN et al., 2001; ZHANG, W. et al., 2012). O único grupo que fez análises semelhantes em células de mama triplo-negativas, embora malignas, não observou diferença na proliferação celular (ZHANG, W. et al., 2012), semelhante a outros resultados do nosso grupo (dados do capítulo 2). Neste estudo foi utilizado um tempo de exposição de 16 dias.

Porém, o MPA sempre aumentou a contagem celular, mesmo na presença de BPA, neste estudo (dados não mostrados). Até certo ponto, o MPA reverteu as propriedades anti-proliferativas do BPA. A proliferação foi corroborada com a análise de núcleos que mostraram alguns núcleos com o dobro de material genético no tratamento com BPA 10  $\mu$ M/MPA ou um deslocamento para a fase S no tratamento com BPA 10  $\mu$ M. Assim, MPA aumenta a proliferação celular. Esses dados são contrastantes com os dados obtidos de Ki67, um indicativo de proliferação celular. Estudos observaram que MPA estimula a proliferação de MCF-10A via MAPK (KRAMER et al., 2006), e que a própria progesterona, bem como outras progestinas, induz proliferação celular na MCF-10A pelo aumento da atividade mitocondrial e diminui a apoptose via FasL (BEHERA et al., 2009).

Em resumo, neste estudo foram observadas propriedades anti-proliferativas por parte do BPA e propriedades proliferativas por parte do MPA em células MCF-10A. Porém, um estudo observou propriedades proliferativas por parte do BPA (PFEIFER; CHUNG; HU, 2015a).

#### *BPA diminui EGFR1 e aumenta HER2*

Enquanto alguma informação a respeito da proliferação celular está disponível na literatura, nenhuma informação a respeito da expressão de receptores de fatores de crescimento está disponível frente a tratamento de BPA e MPA. Os tratamentos com

maiores concentrações testadas de BPA, associado ou não a MPA, alteraram a quantidade desses receptores analisados em células MCF-10A, sendo dados novos.

*BPA e MPA alteram a morfologia nuclear, mas não o fenótipo de célula de mama nas MCF-10A*

Os tratamentos com BPA 10  $\mu$ M e BPA10  $\mu$ M/MPA induziram compactação de cromatina em algumas células, enquanto que descompactação de cromatina, que é geralmente associada com instabilidade genômica, foi observado em alguns núcleos, principalmente do último grupo (BPA 10 $\mu$ M/MPA). Barbisan e colaboradores (1999) identificaram esta mesma compactação de cromatina em núcleos de células MCF-10F após a transformação com benzo[a]pyreno (linhagem celular BP1), e essa compactação foi ainda maior e distribuída áreas mais amplas da cromatina na linhagem tumoral BP1-E1. Esse evento foi observado também em células BP1 transfectadas com o oncogene *H-ras*, que gera uma linhagem tumoral extramamente agressiva (MELLO; DE CAMPOS VIDAL; RUSSO, 1999). Portanto, a compactação de cromatina em células transformadas ou tumorais se mostra como uma característica distintiva, que pode ser observada em algumas células após os tratamentos realizados neste estudo. Embora não mensurado, eventos epigenéticos podem ser a causa de tais mudanças na estrutura da cromatina, pois já foi observado que BPA e MPA induzem profundas alterações epigenéticas, principalmente metilação de DNA (DYSON et al., 2015; KUNDAKOVIC; CHAMPAGNE, 2011; SINGH; LI, 2012).

As células MCF-10A são, na sua maioria (70-80%) basais/mioepiteliais (EpCAM<sup>low/-</sup>CD49f<sup>low</sup>), com uma pequena fração de células progenitoras luminiais (EpCAM<sup>+</sup>CD49f<sup>+</sup>; dados não mostrados) (KELLER et al., 2010; MCDERMOTT; WICHA, 2010). Ademais, elas são CD44<sup>high</sup> e quase todas são CD24<sup>low</sup>, embora variando entre as passagens, atestando que elas possuem um fenótipo do tipo CSC (KELLER et al., 2010; MCDERMOTT; WICHA, 2010). Em um estudo foi observado uma população com fenótipo CSC (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>) em cultura de células MCF-10A, também com variações entre as passagens e com alterações em função do soro presente no meio (SHERIDAN et al., 2006). Não houve impacto no fenótipo de *cancer stem cells* (CSC), neste quesito, em função dos tratamentos.

*BPA age possivelmente via ER $\beta$  e BPA se intercepta com MPA em RBFOX2.*

As células MCF-10A são triplo-negativas e tampouco expressam AR (GARAY et al., 2012; SUBIK et al., 2010), mas expressam GR (KULASINGAM; DIAMANDIS, 2007). É importante destacar que as MCF-10A, embora consideradas ER<sup>-</sup>, expressam ER $\beta$  (LATTRICH et al., 2013; YUSUF; FRENKEL, 2010).

O ER $\beta$  é um conhecido antagonista de ER $\alpha$ , e atua como supressor de tumor (HARTMAN et al., 2006; SKLIRIS et al., 2003). Interessantemente, o *knockdown* de ER $\beta$  levou a um aumento da proliferação de células MCF-10A (TREECK et al., 2010). Também, agonistas de ER $\beta$  diminuíram a proliferação celular nas MCF-10A (LATTRICH et al., 2013). Parabenos, xenoestrógenos como o BPA, o próprio estradiol (WROBEL; GREGORASZCZUK, 2014) e fitoestrógenos (CHEN, F. P.; CHIEN, 2014) induziram a expressão de ER $\beta$  em MCF-10A; também o BPA induziu a expressão de ER $\beta$  em células ER<sup>+</sup> (SHI et al., 2014). Essas informações da literatura nos fazem hipotetizar que o BPA diminuiu a proliferação celular de MCF-10A pelo aumento e ativação de ER $\beta$  (Figura 1.7A).

Alguns estudos mostraram que células ER<sup>-</sup> (ER $\alpha$ <sup>-</sup>) sofreram EMT após exposição de BPA pela ativação de GPER/EGFR/ERK1/2 (DONG et al., 2011; ZHANG, K. S. et al., 2014) e pela fosforilação das vias ERK1/2, p38-MAPK e Akt, resultando na diminuição de FOXA1 (ZHANG, X. L. et al., 2015). Também foi observado que BPA ativa GPER em células triplo-negativas, que leva a EMT pela transativação de EGFR, e pelo aumento de AP-1 e da atividade de NF $\kappa$ B dependente da sinalização de Src e ERK2 (CASTILLO SANCHEZ et al., 2016). No entanto, foi observado que o ER $\beta$  aumenta a degradação de EGFR1 e a fosforilação de ERK1/2 em células de câncer de mama triplo-negativas (THOMAS et al., 2012). Em células de câncer de mama ER-negativo, o tratamento com estradiol levou à migração e invasão por dois mecanismos diferentes. Células com uma proporção GPER/ER $\beta$  elevado levou a este fenômeno pela via ERK1/2/Akt e fosforilação de ezrina dependente de GPER, em células que superexpressa HER2, mas, em células com proporção GPER/ER $\beta$  baixa (MDA-MB-231), este fenômeno aconteceu via ER $\beta$ /PI3K/Akt. A ativação de GPER nesta última impede a ação de ER $\beta$  nesta questão (ZHOU et al., 2016). Também, Shi *et al* (2014) observou que concentrações nanomolares de BPA aumentaram a migração de células de linhagem de epitélio da mucosa de cólon humano (ER<sup>+</sup>) pelo aumento de ER $\beta$ , que leva à ativação da via Integrina $\beta$ 1/MMP-9 dependente de ER $\beta$ . Estas informações da literatura nos levam a hipotetizar que, em um primeiro momento (fase precoce; Figura 1.7A), o

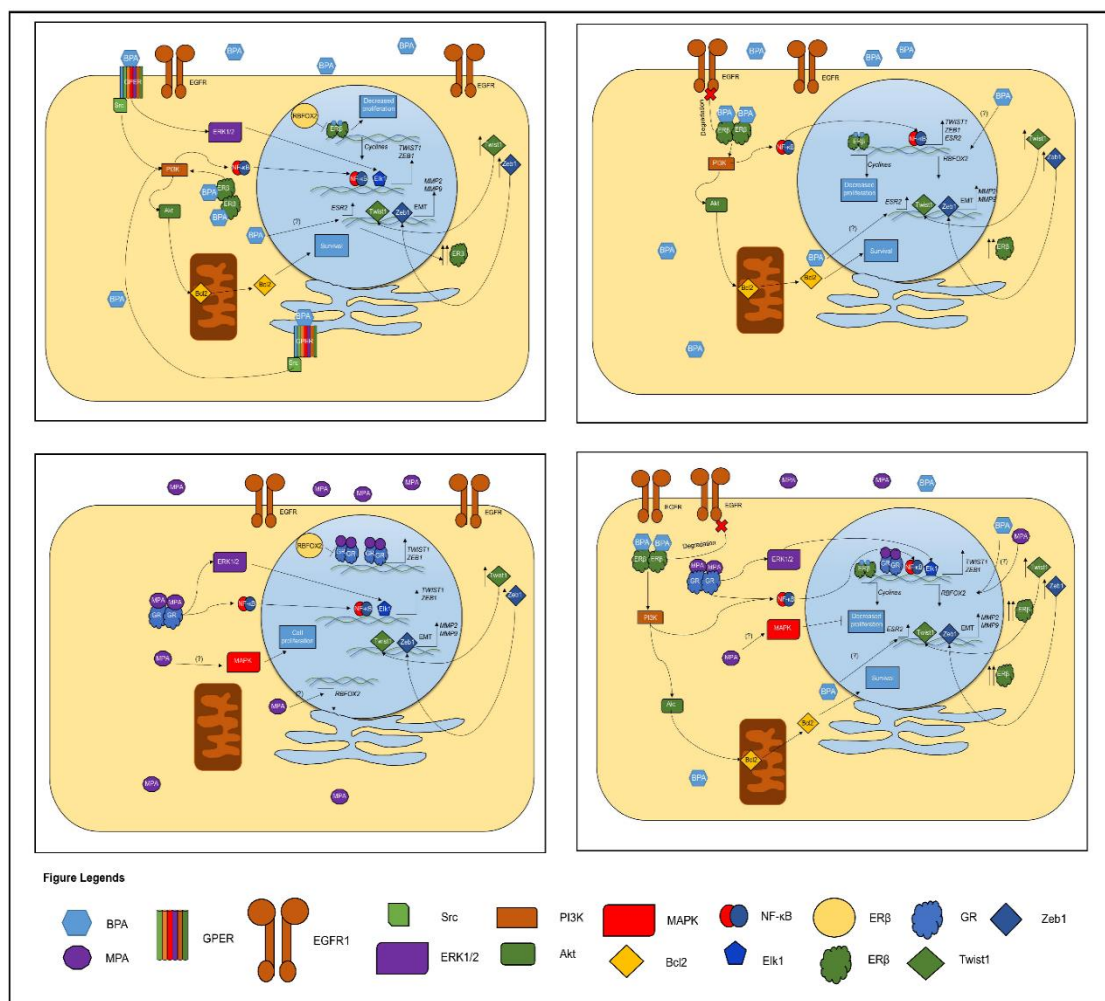


BPA induz EMT via GPER ERK1/2 e Akt, mas aumenta ER $\beta$ , o qual é responsável por induzir EMT e degradar EGFR1 em um segundo momento (fase tardia; Figura 1.7B).

O MPA, ademais de ser agonista de PR, é um conhecido agonista do receptor de glicorticóide (GR) (BUCHANAN et al., 2005; COURTIN et al., 2012). Interessantemente, a ativação do GR levou a EMT (PAN, D.; KOCHERGINSKY; CONZEN, 2011) e sobrevivência (MIKOSZ et al., 2001) em células MCF-10A. A ausência de PR nas MCF-10A, somado a esses dados, permite hipotetizar que a principal via pela qual MPA está induzindo EMT é via GR, enquanto a proliferação é via MAPK, como previamente discutido (Figura 1.7C).

Como o grupo de células MCF-10A pré-tratado com BPA que sofreu ação sinérgica do MPA sempre foi o de menor concentração testada, nós hipotetizamos que o efeito sinérgico seja provocado pela saturação das vias PI3K/Akt e ERK1/2, e a utilização de concentrações maiores de BPA já saturariam tais vias. No entanto, há algo a ser notado: a diminuição de *RBFOX2*. *RBFOX2* está associado com a repressão transcricional de receptores nucleares de esteróides, incluindo GR e ER $\beta$  (NORRIS et al., 2002). Assim, a diminuição de *RBFOX2* permitiria uma ação mais potente do GR. No entanto, sempre que adicionado MPA, há diminuição da expressão de *RBFOX2*, o que, neste trabalho, não contribuiria na ação sinérgica e, ainda, permitiria uma ação transcrinional maior de ER $\beta$ , o que permitira sua ação antitumoral no contexto (Figura 1.7D). Interessantemente, a maior concentração testada de BPA também levou à diminuição da expressão de *RBFOX2*, o que pode ser um mecanismo de *feedback* negativo normal em células sadias para impedir a promoção tumoral. Assim, em conjunto, a ação de MPA aboliria parcialmente a ação antitumoral de ER $\beta$  nas células MCF-10A dependente de GR e outras vias não elucidadas.

Estudos posteriores para demonstrar a interação entre MPA e BPA, via ER $\beta$  e *RBFOX2*, bem como análises para demonstrar como *RBFOX2* é afetada, são de grande importância. Também, compreender o papel de *RBFOX2* na regulação dos receptores de estrógeno podem responder perguntas importantes relacionadas com progressão tumoral e falha terapêutica em câncer de mama ER( $\alpha$ )<sup>+</sup> e ER( $\alpha$ )<sup>-</sup>.



**Figura 1.7** Ação hipotética de BPA e MPA e as vias moleculares em células MCF-10A. (A) Em um primeiro momento, BPA desencadearia EMT e sobrevivência celular pelas vias PI3K/Akt, NF-κB e ERK1/2, dependentes de GPER, e a ação transcrricional, se houver, de ERβ seria bloqueada por RBFOX2. Um aumento de ERβ (expressão de *ESR2*) começaria a acontecer nesta etapa inicial. De alguma forma, concentrações elevadas de BPA diminuem a expressão de *RBFOX2*. (B) Em um momento tardio, ERβ se encontraria muito aumentado e BPA desencadearia EMT e sobrevivência celular pelas vias PI3K/Akt e NF-κB, mas dependentes de ERβ; o aumento de ERβ seria responsável por diminuir a proliferação celular, principalmente por sua atividade transcrricional. Em um contexto de alta concentração de BPA, a baixa quantidade de RBFOX2 permite uma atividade transcrricional maior de ERβ e também há degradação de EGFR1. (C) MPA induz EMT via ERK1/2 e NF-κB, dependente de GR, e proliferação celular via MAPK. De alguma forma MPA diminui a expressão de *RBFOX2*. (D) Células pré-tratadas com BPA se beneficiam do efeito provocado pelo MPA. Os efeitos do momento tardio de BPA se somam ao de MPA. A proliferação celular provocada por MPA faz um contra-balanço à redução da proliferação causado por BPA via ERβ. Em um contexto de baixas concentrações de BPA, a diminuição de *RBFOX2*, causada pelo MPA, permite que o aumento mais discreto de ERβ exerça uma ação tão potente quanto a elicitada por concentrações maiores de BPA.

### 4.3 CONCLUSÃO

A exposição crônica ao BPA associado com exposição aguda ao MPA tem uma ação sinergista nas células epiteliais de mama triplo-negativas não-transformadas (MCF-10A), conferindo diversas características como proliferação celular, invasão e migração. Esses compostos são capazes de aumentar proteínas envolvidas na migração celular (CXCR4), aumentar a expressão de genes de EMT-TFs e de genes de degradação de matriz extracelular, diminuir as características epiteliais, aumentar as características mesenquimais, como *switch* para *FGFR2 IIIc*, por EMT parcial, e alterar os níveis de material genético e sua compactação. Também, o MPA consegue abolir os efeitos deletérios do BPA referente a diminuição da proliferação e sobrevivência celular.

### 4.4 PERSPECTIVAS

Estudos posteriores utilizando concentrações menores de BPA e MPA ( $10^{-9}$  M) devem ser realizados para reproduzir um ambiente mais próximo das condições fisiológicas para analisar os possíveis efeitos transformantes destas duas drogas de forma sinérgica, bem como estudos que demonstrem o elo molecular entre as vias elicítadas pelas duas drogas. Também, estudos visando descrever o que acontece durante o processo de exposição, não apenas no final, ajudarão a elucidar o comportamento de tais fatores ao longo do tempo para compreender a biologia por trás do processo tumoral de forma mais detalhada.

## 5 CAPÍTULO 2: EFEITO DO BISFENOL A EM CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA: AUMENTO DAS CARACTERÍSTICAS AGRESSIVAS

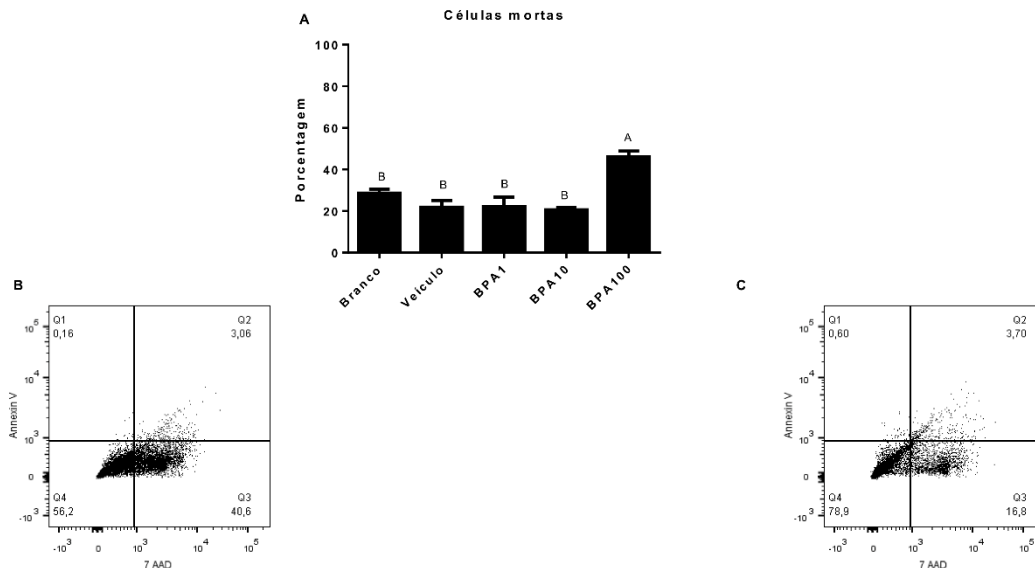
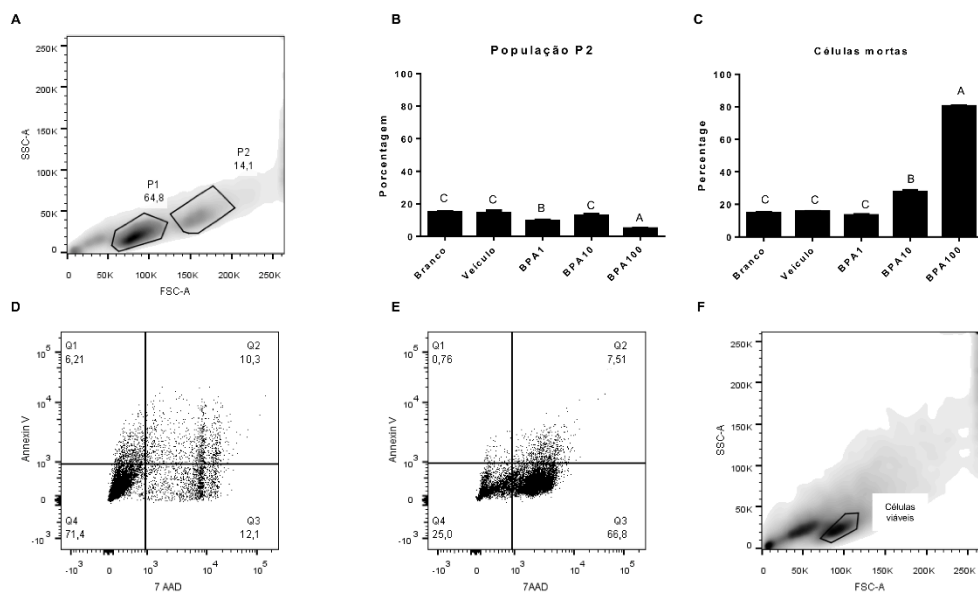
### 5.1 RESULTADOS

*Altas concentrações micromolares de BPA causam efeitos citotóxicos em células de câncer de mama ER<sup>+</sup> e ER<sup>-</sup>*

A caracterização por citometria de fluxo de ambas as células foi realizado antes dos experimentos. As células MCF-7 formam duas populações separadas (P1 e P2) (Figura 2.1A). Após fenotipagem, foi observado que as populações de P1 e P2 possuem fenótipos diferentes (Figura 2.1B). Todos os ensaios citométricos das células MCF-7 foram realizados na população P1, pois nesta população se encontram as CSCs. Tais fenômenos não foram observados nas células MDA-MB-23.

Os efeitos citotóxicos foram analisados para prosseguir os experimentos. O primeiro fenômeno observado foi o descolamento de ambas linhagens do fundo das garrafas quando tratadas com 100  $\mu$ M de BPA por 64 horas (dado não mostrado). A viabilidade celular foi testada para ensaios posteriores. O BPA não foi tóxico às células MCF-7 durante 24 horas (dado não mostrado). Após 64 horas, as concentrações de 10 e 100  $\mu$ M de BPA causaram morte celular considerável (Figura 2.1C-E). Como 100  $\mu$ M de BPA foi o mais citotóxico, apenas as células viáveis foram analisadas nos demais ensaios citométricos (Figura 2.1F).

As células MDA-MB-231 tiveram poucos danos pela exposição a BPA, sendo considerável apenas na concentração de 100  $\mu$ M de BPA por 64 horas (Figuras 2.2 A-C). As linhagens de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) foram cultivadas na presença de concentrações micromolares, crescentes, de BPA por 64 horas para ensaios de citometria de fluxo. O primeiro fenômeno observado foi o descolamento quando tratadas com 100  $\mu$ M de BPA, após 64 horas, em ambas as linhagens.



*As concentrações micromolares de BPA aumentam a agressividade mais nas células de câncer de mama ER<sup>+</sup> que nas ER<sup>-</sup>*

O principal objetivo desta vertente foi analisar se o BPA aumenta características agressivas importantes envolvidas com progressão tumoral. Nós analisamos receptores de quimicinas (CXCR2 e CXCR4), bem como a população CSC (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>). A molécula EpCAM, envolvida com metástase, também foi analisada neste context.

Como a maioria dos estudos observam que BPA desencadeia EMT, tanto E-caderina como N-caderina foram analisados por citometria de fluxo. Durante a EMT, o *splicing* alternativo se desloca para um padrão mesenquimal. Portanto, foi analisado se *FGFR2* sofria *splicing* alternativo para a isoforma IIIc, que está envolvida com agressividade durante a EMT.

Primeiramente, dois genes de controle endógeno foram testados ( $\beta$ 2-microglobulina e GAPDH). No entanto, a expressão de GAPDH variou muito entre os grupos de tratamento nas células MCF-7 (Figura 2.3A) enquanto que a expressão de  $\beta$ 2-microglobulina não variou. Portanto,  $\beta$ 2-microglobulina foi utilizado como controle endógeno nos ensaios de qPCR.

Nas células MCF-7 foi observado diminuição de *FGFR2* nos tratamentos, sendo mais acentuado na concentração de 10  $\mu$ M (Figure 2.3A). Mas a proporção *FGFR2* IIIc/IIIb aumentou nos grupos tratados com 1 a 100  $\mu$ M de BPA ( $p < 0.05$ ), principalmente neste último ( $p < 0.05$ ), mas diminuiu com 10  $\mu$ M de BPA ( $p < 0.05$ ) (Figure 2.3A). Importaneamente, a quantidade de E-caderina diminuiu juntamente com aumento de células EpCAM<sup>+</sup>, N-caderina<sup>+</sup> e CXCR2<sup>+</sup> (Figuras 2.3B, 2.3C, 2.3D e 2.3E, respectivamente) após 64 horas de exposição a 100  $\mu$ M de BPA, mas a expressão de *VIM* aumentou apenas a 1  $\mu$ M de BPA ( $p < 0.05$ ) e diminuiu com as demais concentrações de BPA ( $p < 0.05$ ) (Figura 2.3A). Intrigantemente, aumentou a quantidade de E-caderina, juntamente com diminuição das células N-caderina<sup>+</sup>, no grupo tratado com 10  $\mu$ M de BPA. Outro marcante resultado foi o aumento da população de CSCs em todos os tratamentos, especialmente com 100  $\mu$ M de BPA (Figure 2.3F).

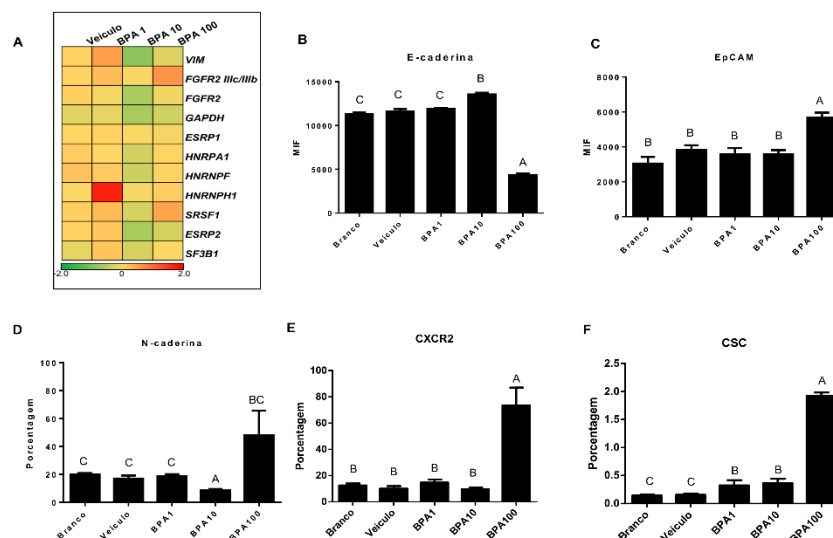
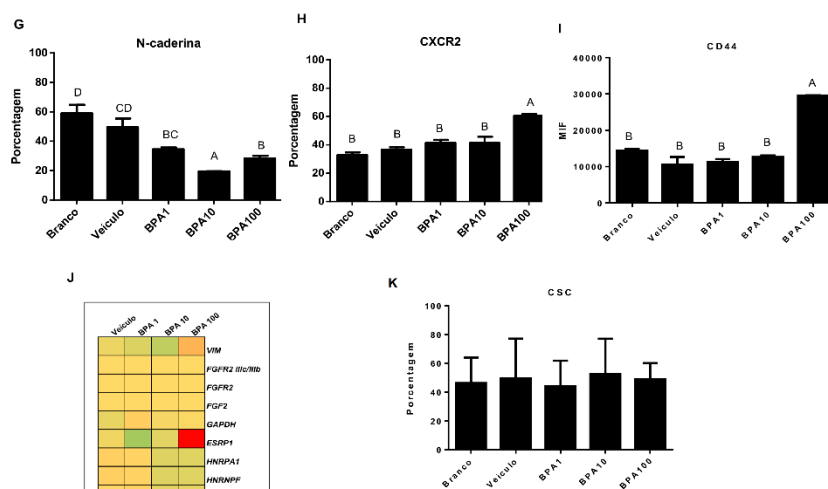
Nas células MDA-MB-231, a contagem de células N-caderina<sup>+</sup> diminuiu com todos os tratamentos, principalmente com 10  $\mu$ M de BPA (Figura 2.3G). No entanto, houve aumento de CD44 e de células CXCR2<sup>+</sup> cells no tratamento com 100  $\mu$ M de BPA (Figuras 2.3H e 2.3I, respectivamente). Os tratamentos provocaram diminuição da expressão de *VIM* ( $p < 0.05$ ), exceto 100  $\mu$ M de BPA, que aumentou ( $p < 0.05$ ) (Figura 2.3J). Não foram observadas alterações na população (Figura 2.3K).

*Concentrações micromolares de alteram a via de FGFR2 e a expressão de fatores de splicing em células ER<sup>+</sup>*

Para explicar o *splicing* alternativo de *FGFR2*, a expressão de alguns fatores de *splicing* (*ESRP1*, *hnRNPA1*, *hnRNPF*, *hnRNPH1*, *RBFOX2* e *SRSF1*), envolvidos com o *splicing* alternativo de *FGFR2*, foram analisados. Ademais, a expressão de *FGF2* foi analisado para testar se o *splicing* alternative se deve aos fatores de *splicing* ou a estímulo de ligantes.

Reguladores da via do FGFR2 e fatores de *splicing* envolvidos com o o *splicing* alternativo de *FGFR2* e outros envolvidos com agressividade tumoral foram analisados nas células MCF-7. Não foi detectada expressão de *FGF2*. Houve diminuição da expressão de *ESRP1* no grupo tratado com 100  $\mu$ M de BPA ( $p < 0.05$ ), bem como diminuição da expressão de *ESRP2* nos grupos tratados com 10 e 100  $\mu$ M de BPA. Não foi observada diferença estatística na expressão de *RBFOX2*. Foi observado diminuição da expressão de *SF3B1* no grupo veículo ( $p < 0.05$ ), com aumento a 1  $\mu$ M ( $p < 0.05$ ) e diminuição a 10  $\mu$ M ( $p < 0.05$ ) de BPA. Houve aumento na expressão de *SRSF1* com 1 e 100  $\mu$ M de BPA ( $p < 0.05$ ), e diminuição a 10  $\mu$ M de BPA ( $p < 0.05$ ). foi observado diminuição na expressão de *HNRNPA1*, *HNRNPF* e *HNRNPH1* com 10  $\mu$ M de BPA ( $p < 0.05$ ), Houve aumento na expressão de *HNRNPH1* no grupo tratado com 1  $\mu$ M de BPA ( $p < 0.05$ ). Os dados estão na Figura 2.3A.

No entanto, nas células MDA-MB-231 não foi observado expressão de *FGFR2* nem *FGF2*, bem como não houve alteração na expressão dos fatores de *splicing* ( $p > 0,005$ ) (Figura 2.3J).

**MCF-7****MDA-MB-231**

**Figura 2.3 BPA aumenta características de agressividade em células de câncer de mama  $ER^+$  e  $ER^-$ .** (A-F) MCF-7. (A) *Heatmap* da expressão dos genes com diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) ( $n = 9$ ). Os tratamentos não alteraram a expressão dos genes de expectativa segundo uma transição epitélio-mesênquima convencional. Por exemplo, é possível ver aumento da expressão de *VIM* apenas com BPA 1 BPA 1  $\mu M$ , mas houve aumento da proporção *FGFR2* IIIc/IIIb, embora houve diminuição da expressão de *FGFR2*; os fatores de *splicing* representados sofreram alterações significativas ( $p < 0,05$ ) em comparação com o grupo não-tratado, sendo a alteração da expressão de *SRSF1* o mais relevante a ser observado neste estudo. As células também foram marcadas para análise, por citometria de fluxo, de marcadores de fenótipo celular, status epitelial e receptores de fatores de crescimento celular ( $n = 6-9$ ) (B) Contagem de células EGFR1<sup>+</sup>. (C) Contagem de células HER2<sup>+</sup>. (D) Quantificação de E-cadherina. (E) Quantificação de EpCAM. (F) Contagem de células N-cadherina<sup>+</sup>. (G) Contagem de células CXCR2<sup>+</sup>. (H) População CSC. (G-K) MDA-MB-231. (G) Contagem de células N-cadherina<sup>+</sup>. (H) Contagem de células CXCR2<sup>+</sup>. (I) Quantificação de CD44, analisada por MIF. (J) *Heatmap* da expressão gênica. Embora algumas representações indiquem variação, apenas a expressão de *VIM* foi alterada estatisticamente ( $p < 0,05$ ), e houve uma tendência de aumento da expressão de *RBFOX2* nos tratamentos com 1  $\mu M$  e 10  $\mu M$  de BPA ( $p = 0,053$ ). (K) População CSC. A diferença estatística ( $p < 0,05$ ) está representada por letras diferentes; letras iguais representam semelhança estatística ( $p > 0,05$ ). As barras de desvio representam SEM. As cores no *heatmap* representam diferenças na expressão gênica em vezes, em relação ao grupo não-tratado: quanto mais à esquerda (verde), menor a expressão; quanto mais à direita (vermelho), maior a expressão.



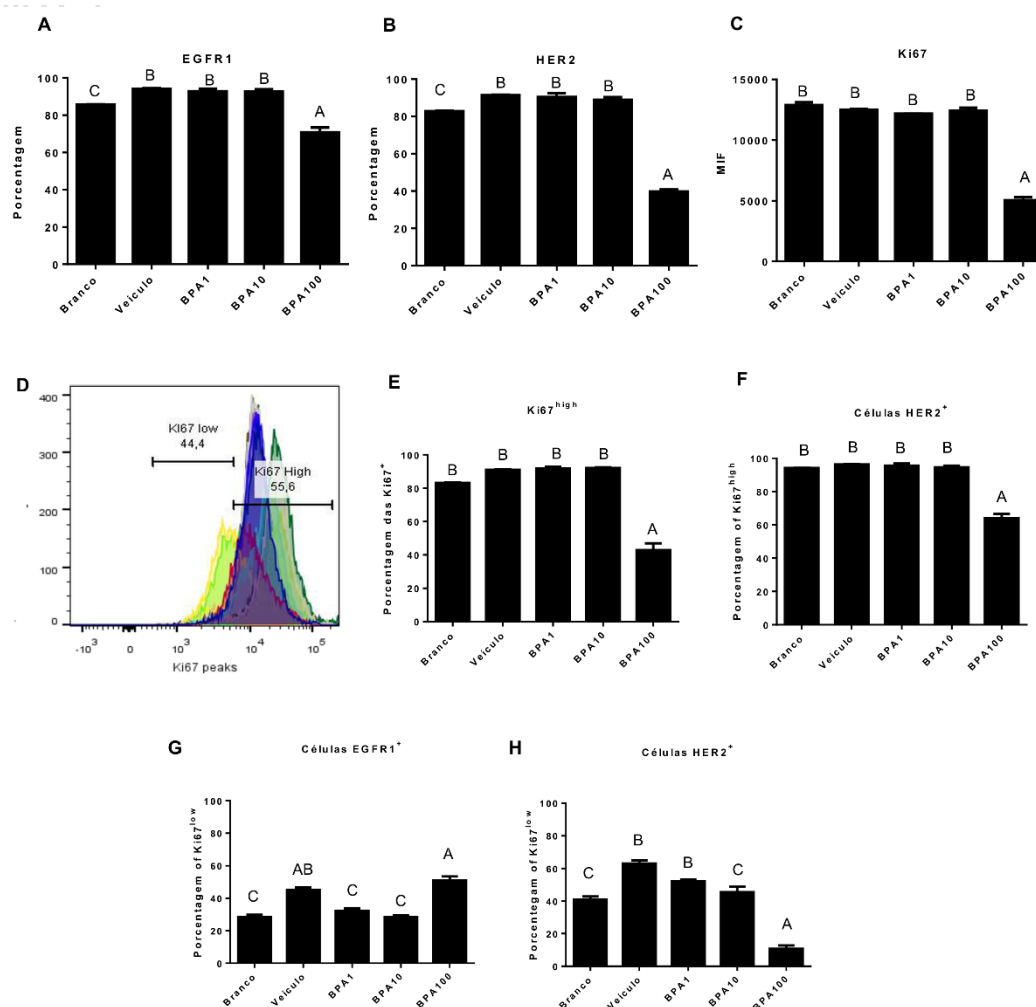
*Altas concentrações micromolares de BPA diminuem EGFR1 e HER2 tanto em células ER<sup>+</sup> como ER<sup>-</sup>*

EGFR1 e HER2 possuem um papel importante na progressão tumoral. Eles são receptores envolvidos com proliferação celular. Sendo assim, estes receptores foram analisados por citometria de fluxo, bem como o indicador de proliferação celular Ki67.

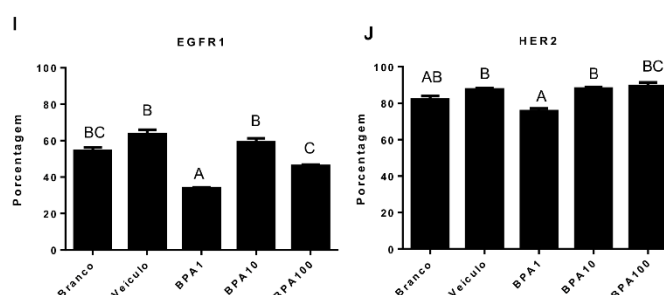
Nas células MCF-7, o número de células EGFR1<sup>+</sup> e HER2<sup>+</sup> diminuíram após 64 de incubação com 100 µM de BPA (Figuras 2.4A e 2.4B, respectivamente). Nas células MDA-MB-231 também foi observado diminuição das células EGFR1<sup>+</sup> (1 e 100 µM) e HER2<sup>+</sup> (1 µM) (Figuras 2.4I e 2.4J, respectivamente).

O número de células Ki67<sup>+</sup> foi reduzido nas células tratadas com 100 µM de BPA (Figura 2.4C). Duas subpopulações, conforme os níveis de Ki67, foram definidos: um Ki67<sup>high</sup> (Figura 2.4D e 2.4E) e outra Ki67<sup>low</sup> (dado não mostrado). Interessantemente, todas as células Ki67<sup>high</sup> são EGFR1<sup>+</sup> (dado não mostrado), mas apenas a contagem de células HER2<sup>+</sup>, em função do tratamento com 100 µM de BPA, foi observado (Figura 2.7D). A subpopulação de células Ki67<sup>low</sup> teve contagem maior de células EGFR1<sup>+</sup> e HER2<sup>+</sup> no grupo veículo, e tratamentos de 1 e 10 µM de BPA diminuíram a contagem de células EGFR1<sup>+</sup> e HER2<sup>+</sup> nesta subpopulação, comparado com o grupo veículo, e as tratadas com 100 µM de BPA tiveram aumento de células EGFR1<sup>+</sup> e diminuição da contagem de células HER2<sup>+</sup> nesta subpopulação (Figura 2.4F e 2.4G, respectivamente).

## MCF-7



## MDA-MB-231

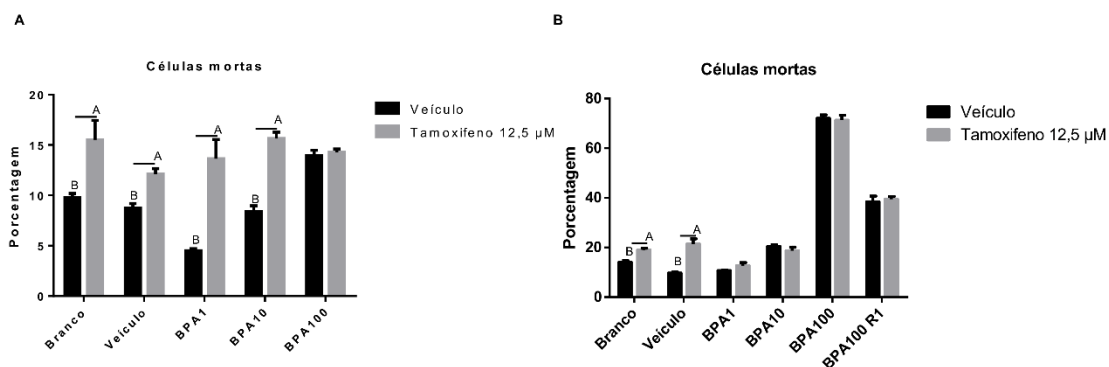


**Figura 2.4** Expressão de EGFR1, HER2 e Ki67. A positividade para EGFR1 e HER2 foi analisado nos dois picos de marcação de Ki67 nas células MCF-7 ( $n=9$ ). (A-H) MCF-7. (A) Quantificação de Ki67, analisado por MIF. (B) Histograma da expressão de Ki67. O eixo x representa a intensidade da marcação e o eixo y representa a contagem de células. É possível observar dois pico de expressão de Ki67. Cada pico foi analisado separadamente no que se refere à positividade de EGFR1 e HER2. (C) Porcentagem de células Ki67<sup>high</sup>. (D) Contagem de células. Todas estas células são positivas para EGFR1. (E) Contagem de células Ki67<sup>low</sup>EGFR1<sup>+</sup>. (F) Contagem de células Ki67<sup>low</sup>HER2<sup>+</sup>. Todas estas células são positivas para EGFR1. (I e J) MDA-MB-231 cells. (I) Contagem de células EGFR1<sup>+</sup> cell count. (J) Contagem de células HER2<sup>+</sup>. A diferença estatística ( $p<0,05$ ) está representada por letras diferentes; letras iguais representam semelhança estatística ( $p>0,05$ ). As barras de desvio representam SEM.

### *BPA causa resistência duradoura ao tamoxifeno nas células MCF-7*

Como o tratamento com BPA causou maiores alterações na célula MCF-7, a resistência a terapia foi testada apenas nesta linhagem celular. O tamoxifeno foi escolhido porque o BPA interage com o ER, o alvo do tamoxifeno. Primeiramente, foi feita uma curva dose-resposta para determinar o  $IC_{50}$ , o qual foi de  $12.5 \mu M$  de tamoxifeno na exposição de 24 horas (dados não mostrados).

Após 24 horas de tratamento com BPA, o tamoxifeno induziu morte celular nos grupos tratados com BPA, exceto no trato com  $100 \mu M$  de BPA (Figura 2.5A). Interessantemente, os grupos tratados com BPA por 64 horas, independentemente da concentração, adquiriram resistência à morte induzida por tamoxifeno (Figura 2.5B). Adicionalmente, esse efeito parece ser duradouro, pois o grupo tratado com  $100 \mu M$  por 64 horas, mas que teve o BPA depletado do meio por 3 dias (BPA 100 R1) tampouco teve aumento na morte celular por tamoxifeno.



**Figura 2.5** Sensibilidade das células MCF-7 ao tamoxifeno. Após a exposição às concentrações de BPA por 24 horas (A) e 64 horas (B), as células foram tratadas com citrato de tamoxifeno ( $12,5 \mu M$ ), ou veículo (DMS), por 24 horas. Posteriormente, a morte celular foi analisada por citometria de fluxo ( $n=6$ ). A diferença estatística ( $p<0,05$ ) está representada por letras diferentes; letras iguais representam semelhança estatística ( $p>0,05$ ). As barras de desvio representam SEM.

## 5.2 DISCUSSÃO

Diversos estudos têm descrito o efeito do BPA em ativar EMT em células cancerígenas ER<sup>+</sup> e ER<sup>-</sup> cancer cells, focando em descrever os mecanismos e vias celulares envolvidas neste assunto. Porém, poucos analisaram outras características envolvidas com agressividade tumoral e progressão tumoral (CASTILLO SANCHEZ et al., 2016; CHEN, Z. J. et al., 2015; DONG et al., 2011; KIM et al., 2015; SHI et al., 2014; ZHANG, K. S. et al., 2014; ZHANG, X. L. et al., 2015). Esta vertente do estudo focou em analisar características envolvidas com a agressividade tumoral que geralmente ocorrem concomitantemente com EMT, como aumento de quimiorreceptores, expansão da população CSC e mudança no programa de *splicing* alternativo (ISHIWATA, 2016; YANG, F. et al., 2016). Para tal objetivo, as células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 foram utilizadas para analisar tais características após exposição a concentrações micromolares de BPA.

### *Concentrações micromolares de BPA promovem em células de câncer de mama ER<sup>+</sup> e ER<sup>-</sup> um perfil de EMT, mas com diferenças*

Embora em algumas condições o BPA causou citotoxicidade marcante, e apenas após 64 horas de exposição, as análises foram realizadas apenas em células viáveis, resolvendo este problema.

A EMT foi desencadeada e ambas as células cancerígenas ER<sup>+</sup> e ER<sup>-</sup>, mas com contrastes em relação à literatura. Os marcadores analisados (*VIM*, E-caderina e N-caderina) nem sempre se comportaram como esperado. Nas células MCF-7 houve diminuição de E-caderina concomitante a aumento de N-caderina apenas com 100 µM de BPA, mas com diminuição na expressão de *VIM*, sugerindo uma EMT não-tradicional (JOLLY et al., 2015). Interessantemente, o tratamento com 10 µM de BPA conferiu às MCF-7 um fenótipo que está de acordo com a transição mesênquima-epitélio (MET), pelo aumento de E-caderina com diminuição de N-caderina. Porém, houve aumento da isoforma IIIc de *FGFR2* nos grupos com características de ET, corroborando a EMT (HORIGUCHI et al., 2012; SHIRAKIHARA et al., 2011; UEDA et al., 2014; WARZECHA et al., 2010). Esses dados são contrastantes com a literatura, pois outros estudos relataram diminuição de E-caderina com aumento de N-caderina e Vimentina de forma dose-dependente em células ER<sup>+</sup> tratadas com BPA (CHEN, Z. J. et al., 2015; KIM et al., 2015). Provavelmente a diferença nas metodologias aplicadas explique parcialmente estas diferenças.

Nas células MDA-MB-231 cells houve diminuição da expressão de *VIM* com os tratamentos de 1 e 10 $\mu$ M of BPA, bem como diminuição das células N-caderina<sup>+</sup> por todos os tratamentos. Esses dados são contrastantes com a literatura. Porém, o único estudo que descreveu bem a EMT (tradicional) em células de câncer de mama ER<sup>-</sup> utilizou concentrações nanomolares de BPA (ZHANG, X. L. et al., 2015).

*Concentrações micromolares de BPA confere mais características de agressividade a células de câncer de mama ER<sup>+</sup> que ER<sup>-</sup>*

Com exceção de algumas diferenças, a EMT foi desencadeada em ambas as linhagens celulares. No entanto, o BA aumentou as características de agressividade mais nas células ER<sup>+</sup>.

A linhagem MCF-7 possui uma pequena população de CSCs (até 0.5%), enquanto que quase todas as células MDA-MB-231 são CSC (KELLER et al., 2010). Um estudo observou que pequenas concentrações de estradiol (1 nM) são capazes de expandir a pequena população de CSC na cultura de MCF-7 (FILLMORE et al., 2010), mas não foi observado expansão em um estudo que utilizou estradiol a 10 nM (VARES et al., 2013). Assim, é possível entender porque o aumento de CSC dependente de BPA nas MCF-7 não se comportou de forma dose-dependente.

Como as CSCs da linhagem MDA-MB-231 não variaram com os tratamentos, é muito provável que este fenômeno se dê em função da presença de ER. Foi observado que as CSCs são indiretamente dependente de estrógeno, visto que o estradiol aumenta a produção de FGF9, assim ativando o receptor FGFR3 das CSCs, estimulando-as a proliferarem pela via de sinalização FGF/FGFR/Tbx3 (FILLMORE et al., 2010). Como o BPA é um xenoestrógeno, isso explicaria porque as células CSCs da linhagem MCF-7 (ER<sup>+</sup>) CSCs, mas não da linhagem MDA-MB-231 (ER<sup>-</sup>), se expandiram.

Outras moléculas estão envolvidas com agressividade tumoral, como CD44 e EpCAM, ambas as duas envolvidas com motilidade celular (MAETZEL et al., 2009; MCDERMOTT; WICHA, 2010). Ademais, as CSCs EpCAM<sup>+</sup> são capazes de formar um tumor com menos células comparada à contraparte EpCAM<sup>-</sup> (AL-HAJJ et al., 2003), e EpCAM antagoniza a ação de E-caderina, contribuindo com EMT (MAETZEL et al., 2009). Alguns quimiorreceptores estão envolvidos com metástase no câncer de mama, principalmente CXCR2 e CXCR4 (ISHIWATA, 2016; YANG, F. et al., 2016).

Nas células MCF-7, apenas nas tratadas com BPA 100  $\mu$ M de BPA por 64 horas houve aumento de células CXCR2<sup>+</sup> bem como de EpCAM, embora sem diferença na

quantidade de células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>/EpCAM<sup>+</sup> (dados não mostrados). Não houve alteração de CXCR4 (dados não mostrados). Este é o primeiro estudo a observar que o BPA aumenta as características de agressividade e expande a população de CSCs em células de cancer de mama ER<sup>+</sup>.

Nas células MDA-MB-231 também só houve aumento em algumas características quando tratadas com 100 µM de BPA por 64 horas, que foi o aumento de células CXCR2<sup>+</sup> e aumento de CD44. Estes dados também são novos na literatura.

Esses dados mostram diferenças marcantes no efeito exercido pelo BPA em células de câncer de mama ER<sup>+</sup> e ER<sup>-</sup>. Diferentes mecanismos estão envolvidos com a progressão tumoral, o a presença de ER deve ser o determinante neste quesito.

*BPA altera o splicing alternativo em células de cancer de mama ER<sup>+</sup>, mas não em ER<sup>-</sup>*

O *splicing* alternativo é um evento celular importante e é afetado durante EMT. Como observado, *FGFR2* sofreu uma mudança no *splicing* a favorecer a isoforma mesenquimal (IIIc). Para explicar este fenômeno, a expressão de *FGFR2* em si e de *FGF2*, um regulador desta via, foram analisados (MAREK et al., 2009; SCOTET; HOUSSAINT, 1998; YAN et al., 1993), bem como a expressão de fatores de *splicing* envolvidos com o *splicing* alternativo de *FGFR2* (*ESRP1*, *hnRNPA1*, *hnRNPF*, *hnRNPH1*, *RBFOX2*, *SRSF1*) (BARANIAK et al., 2006; MAUGER et al., 2008; WARZECHA et al., 2010). Ademais, os fatores de *splicing* foram analisados sob a perspectiva de contribuidores da agressividade tumoral em câncer de mama (ANCZUKOW et al., 2012; DAVID; MANLEY, 2010; HE et al., 2005; HONORE et al., 2004; HSU et al., 2015; LI, S. et al., 2009; SHAPIRO et al., 2011; VENABLES et al., 2013).

Não houve diferença na expressão dos fatores de *splicing* analisados nas células MDA-MB-231 em função dos tratamentos. Tampouco foi detectada expressão de *FGFR2* ou *FGF2*, semelhante a alguns estudos (KORAH, R. et al., 2004; KORAH, R. M. et al., 2000; LUQMANI; GRAHAM; COOMBES, 1992).

Interessantemente, não foi detectada expressão de *FGF2* nas células MCF-7, semelhante a um estudo (LUQMANI et al., 1992), sendo descartado como possível explicação para o aumento de *FGFR2* IIIc. No entanto, diversas alterações foram observadas na expressão dos fatores de *splicing* estudados. É razoável afirmar que a mudança de isoforma, neste caso, está sendo governada pelo aumento de *SRSF1*: os grupos tratadas com 1 e 100 µM de BPA tiveram aumento de *SRSF1* e de forma coerente ao

aumento da proporção *FGFR2* IIIc/IIIb. Ademais, a diminuição de *ESRP1* no tratamento com 100  $\mu$ M de BPA pode cooperar neste assunto.

É interessante relatar que apenas as células de cancer de mama ER<sup>+</sup> tiveram alteração na expressão dos fatores de *splicing* analisados. Isto provavelmente se deva também à presença de ER.

#### *Células MCF-7 pré-tratadas com BPA possuem sensibilidade reduzida ao tamoxifeno*

Como as células MCF-7 tiveram aumento da agressividade, a sensibilidade ao tamoxifeno, um antagonista do ER amplamente utilizado para tratar câncer de ER<sup>+</sup> (RONDON-LAGOS et al., 2016), foi testado. Neste estudo foi observado uma diminuição à sensibilidade ao tamoxifeno de forma dose- e tempo-dependentes. Ademais, esta diminuição à sensibilidade ao tamoxifeno foi duradoura, visto que o grupo BPA 100 R1 também apresentou resistência ao tamoxifeno. Em um estudo *in vivo*, o BPA foi capaz de estabelecer um tumor de MCF-7 em camundongos fêmeas ovariectomizadas, e o tamoxifeno foi capaz de abolir o crescimento dos tumores causado pelo BPA (WEBER LOZADA; KERI, 2011). Esse contrite com nossos resultados pode ser explicado pela diferença nos ensaios, bem como a biodisponibilidade do tamoxifeno *in vivo*.

Os dados adquiridos nos nossos ensaios nos levou a hipotetizar que este efeito não é exercido por ocupação estérica, mas provavelmente por alterações metabólicas ou diminuição de ER. Ademais, o BPA aumentou a viabilidade celular após 24 horas, mas o mesmo não foi observado após 64 horas (dados não mostrados). Um estudo demonstrou que houve diminuição de ER $\alpha$  em células ER<sup>+</sup> após tratamento com BPA sem afetar a expressão de ER $\beta$  (SHI et al., 2014). Estes dados da literatura podem explicar porque o BPA diminui a sensibilidade ao tamoxifeno no nosso estudo.

#### *BPA altera o status de EGFR1 e HER2 em células ER<sup>+</sup> e ER<sup>-</sup> provavelmente via ER $\beta$*

Os resultados de EGFR1 e HER a respeito de proliferação celular não são relevantes neste estudo, mas as alterações de EGFR1 e HER2 observadas em ambas as células de câncer de mama ER<sup>+</sup> e ER<sup>-</sup> foram intrigantes, embora não todas as concentrações testadas alteraram estas proteínas. Um estudo observou que o estradiol desencadeou EMT e degradação de EGFR1 via ER $\beta$ 1 nas células MDA-MB-231 (THOMAS et al., 2012). Nós observamos resultados semelhantes, inclusive na MCF-7 cells. Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a observar estas alterações por BPA.

Como citado no anterior subtópico, é capaz do BPA exercer algumas ações via ER $\beta$ . Vários xenoestrógenos (WROBEL; GREGORASZCZUK, 2014), incluindo o BPA (SHI et al., 2014), e fitoestrógenos (CHEN, F. P.; CHIEN, 2014) aumentam ER $\beta$ , o qual é um inibidor da proliferação celular (KOEHLER et al., 2005; SOTOCA et al., 2008; TREECK et al., 2010) e antagonista de ER $\alpha$  (VOUTSADAKIS, 2016). ER $\beta$  também induz a degradação de EGFR1 (THOMAS et al., 2012). Nas MCF-7, existe diminuição da proliferação, de forma tempo-dependente na exposição de BPA, e a diminuição de EGFR1 poderiam ser explicados pelo aumento de ER $\beta$ . No caso das MDA-MB-231, o aumento de ER $\beta$  poderia explicar a diminuição de EGFR1, e o aumento de *RBFOX2* ( $p=0,0531$ ), que é um inibidor da atividade de receptores nucleares de estróide, incluindo de ER $\beta$  (NORRIS et al., 2002), poderia explicar porque estas células não possuem alteração na taxa proliferativa, embora apenas nas concentrações menores. Estudos posteriores visando elucidar o papel de RBFOX2 neste assunto são importantes, pois poderiam responder respostas relacionadas com resistência a terapias em câncer de mama ER $^{+}$  e ER $^{-}$ . A Figura 1.7A, ademais de representar o processo nas células MCF-10A, também consegue representar de forma fidedigna por que as células MDA-MB-231 conseguem se beneficiar da ação pró-tumoral do ER $\beta$ , mas não há ação antitumoral, em função do aumento de RBFOX2 que estas células realizam durante EMT.



### 5.3 CONCLUSÃO

Concentrações micromolares de BPA são capazes de aumentar as características agressivas tanto em células de câncer de mama ER<sup>+</sup> e ER<sup>+</sup>, mas com diferenças consideráveis. Em células ER<sup>+</sup>, diversas características de EMT tradicional foram observados juntamente com o aumento de diversas características de agressividades, como aumento de CSCs e diminuição da sensibilidade ao tamoxifeno, enquanto que nas células ER<sup>-</sup> diversas características de EMT não-tradicional foram observados, acompanhado do aumento de poucas características agressivas. Esses dados demonstram que a exposição ao BPA pode ter um papel importante na progressão de câncer de mama, principalmente ER<sup>+</sup>. Estudos posteriores utilizando concentrações ajustadas de BPA devem ser conduzidos para investigar tais características de agressividade envolvidas com manutenção tumoral, resistência a terapias e metástase em modelos de câncer de mama e descrever os papéis de ER $\alpha$  e ER $\beta$  neste contexto.

## 6 COMENTÁRIOS E PERSPECTIVAS GERAIS

A exposição a BPA e MPA evidentemente é algo prejudicial. Em um contexto em que se leva em consideração a mama como um todo, as células basais/mioepiteliais, representadas pelas células MCF-10A, podem sofrer efeitos transformantes significativos. Visto que qualquer terapia de reposição hormonal ou contraceptivo à base de estrógenos é suspensa uma vez que o câncer de mama é diagnosticado, a exposição persistente a BPA é algo a ser considerado neste contexto, representado pelas células MCF-7 e MDA-MB-231, o qual pode promover a progressão tumoral e aumento da agressividade. Embora neste estudo foram realizados ensaios *in vitro* e as concentrações superam aquelas de condições normalmente encontrados em pessoas, este estudo já demonstra fatos preocupantes referentes à exposição a essas drogas nos contextos delineados e os atuais resultados justificam estudos posteriores com concentrações na ordem de nanomolares e por tempo mais prolongado, apoiando-se na ideia dos protocolos deste estudo, para analisar o efeito perigoso destas duas drogas associadas na tumorigênese de mama e do efeito persistente do BPA no câncer de mama estabelecido. Também, os dados deste estudo sugerem um papel diferente da proteína RBFOX2 referente à regulação da atividade dos receptores de estrógeno, e não simplesmente como fator de *splicing*, durante promoção e progressão tumoral que deve ser estudado mais detalhadamente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-HAJJ, M. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington DC, v. 100, n. 7, p. 3983-8, Apr 1 2003.

ANCZUKOW, O. et al. The splicing factor SRSF1 regulates apoptosis and proliferation to promote mammary epithelial cell transformation. **Nat Struct Mol Biol**, New York, v. 19, n. 2, p. 220-8, Feb 2012.

AZIM, H. A.; KAMAL, N. S.; AZIM, H. A., JR. Bone metastasis in breast cancer: the story of RANK-ligand. **J Egypt Natl Canc Inst**, Cairo, v. 24, n. 3, p. 107-14, Sep 2012.

BARANIAK, A. P.; CHEN, J. R.; GARCIA-BLANCO, M. A. Fox-2 mediates epithelial cell-specific fibroblast growth factor receptor 2 exon choice. **Mol Cell Biol**, Washington DC, v. 26, n. 4, p. 1209-22, Feb 2006.

BARBISAN, L. F. et al. Apoptosis and catastrophic cell death in benzo[a]pyrene-transformed human breast epithelial cells. **Mutat Res**, Amsterdam, v. 431, n. 1, p. 133-9, Dec 16 1999.

BEHERA, M. A. et al. Progesterone stimulates mitochondrial activity with subsequent inhibition of apoptosis in MCF-10A benign breast epithelial cells. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, Bethesda, v. 297, n. 5, p. E1089-96, Nov 2009.

BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. **Mol Aspects Med**, Oxford, v. 21, n. 6, p. 167-223, Dec 2000.

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

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**, Seoul, v. 22, n. 4, p. 225-32, Dec 2011.

BRAEUTIGAM, C. et al. The RNA-binding protein Rbfox2: an essential regulator of EMT-driven alternative splicing and a mediator of cellular invasion. **Oncogene**, Basingstoke, v. 33, n. 9, p. 1082-92, Feb 27 2014.

BUCHANAN, G. et al. Decreased androgen receptor levels and receptor function in breast cancer contribute to the failure of response to medroxyprogesterone acetate. **Cancer Res**, Baltimore, v. 65, n. 18, p. 8487-96, Sep 15 2005.

CASTANO, Z. et al. The bed and the bugs: interactions between the tumor microenvironment and cancer stem cells. **Semin Cancer Biol**, London, v. 22, n. 5-6, p. 462-70, Oct 2012.

CASTILLO SANCHEZ, R.; GOMEZ, R.; PEREZ SALAZAR, E. Bisphenol A Induces Migration through a GPER-, FAK-, Src-, and ERK2-Dependent Pathway in MDA-MB-

231 Breast Cancer Cells. **Chem Res Toxicol**, Washington DC, v. 29, n. 3, p. 285-95, Mar 21 2016.

CHAFFER, C. L. et al. Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: role of fibroblast growth factor receptor-2. **Cancer Res**, Baltimore, v. 66, n. 23, p. 11271-8, Dec 1 2006.

CHEN, A. et al. E-cadherin loss alters cytoskeletal organization and adhesion in non-malignant breast cells but is insufficient to induce an epithelial-mesenchymal transition. **BMC Cancer**, London, v. 14, p. 552, 2014.

CHEN, F. P.; CHIEN, M. H. Phytoestrogens induce differential effects on both normal and malignant human breast cells in vitro. **Climacteric**, London, v. 17, n. 6, p. 682-91, Dec 2014.

CHEN, Z. J. et al. Bisphenol A modulates colorectal cancer protein profile and promotes the metastasis via induction of epithelial to mesenchymal transitions. **Arch Toxicol**, Berlin, New York, v. 89, n. 8, p. 1371-81, Aug 2015.

CHEVALIER, N.; PAUL-BELLON, R.; FENICHEL, P. A commentary on "Involvement of activating ERK1/2 through G protein coupled receptor 30 and estrogen receptor alpha/beta in low doses of bisphenol A promoting growth of Sertoli TM4 cells". **Toxicol Lett**, Amsterdam, v. 237, n. 2, p. 165-6, Sep 2 2015.

CHOU, Y. S.; YANG, M. H. Epithelial-mesenchymal transition-related factors in solid tumor and hematological malignancy. **J Chin Med Assoc**, Taipei, v. 78, n. 8, p. 438-45, Aug 2015.

CICHON, M. A.; NELSON, C. M.; RADISKY, D. C. Regulation of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells by cell contact and adhesion. **Cancer Inform**, Auckland, v. 14, n. Suppl 3, p. 1-13, 2015.Ta

COLAS, E. et al. The EMT signaling pathways in endometrial carcinoma. **Clin Transl Oncol**, Milan, v. 14, n. 10, p. 715-20, Oct 2012.

COLELL, A.; GREEN, D. R.; RICCI, J. E. Novel roles for GAPDH in cell death and carcinogenesis. **Cell Death Differ**, London, v. 16, n. 12, p. 1573-81, Dec 2009.

COURTIN, A. et al. Glucocorticoid receptor activity discriminates between progesterone and medroxyprogesterone acetate effects in breast cells. **Breast Cancer Res Treat**, Dordrecht, v. 131, n. 1, p. 49-63, Jan 2012.

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**, Amsterdam, v. 17, n. 2, p. 172-9, Apr 2008.

DAVID, C. J.; MANLEY, J. L. Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: pathways and programs unhinged. **Genes Dev**, Cold Spring Harbor, v. 24, n. 21, p. 2343-64, Nov 1 2010.

DE HERREROS, A. G. et al. Snail family regulation and epithelial mesenchymal transitions in breast cancer progression. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, New York, v. 15, n. 2, p. 135-47, Jun 2010.

DENNIS, M. K. et al. Identification of a GPER/GPR30 antagonist with improved estrogen receptor counterselectivity. **J Steroid Biochem Mol Biol**, Oxford, v. 127, n. 3-5, p. 358-66, Nov 2011.

DONG, S.; TERASAKA, S.; KIYAMA, R. Bisphenol A induces a rapid activation of Erk1/2 through GPR30 in human breast cancer cells. **Environ Pollut**, Barking, v. 159, n. 1, p. 212-8, Jan 2011.

DRASIN, D. J.; ROBIN, T. P.; FORD, H. L. Breast cancer epithelial-to-mesenchymal transition: examining the functional consequences of plasticity. **Breast Cancer Res**, London, v. 13, n. 6, p. 226, 2011.

DURANDO, M. et al. Prenatal bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in Wistar rats. **Environ Health Perspect**, Research Triangle Park, v. 115, n. 1, p. 80-6, Jan 2007.

DYSON, M. T. et al. Aberrant expression and localization of deoxyribonucleic acid methyltransferase 3B in endometriotic stromal cells. **Fertil Steril**, New York, v. 104, n. 4, p. 953-963 e2, Oct 2015.

FENG, Y. et al. DNA homologous recombination factor SFR1 physically and functionally interacts with estrogen receptor alpha. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 7, p. e68075, 2013.

FERNALD, K.; KUROKAWA, M. Evading apoptosis in cancer. **Trends Cell Biol**, Cambridge, v. 23, n. 12, p. 620-33, Dec 2013.

FERNANDEZ, S. V. et al. Expression and DNA methylation changes in human breast epithelial cells after bisphenol A exposure. **Int J Oncol**, Athens, v. 41, n. 1, p. 369-77, Jul 2012.

FERNANDEZ, S. V.; RUSSO, J. Estrogen and xenoestrogens in breast cancer. **Toxicol Pathol**, Thousands Oaks, v. 38, n. 1, p. 110-22, Jan 2010.

FILLMORE, C. M. et al. Estrogen expands breast cancer stem-like cells through paracrine FGF/Tbx3 signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington DC, v. 107, n. 50, p. 21737-42, Dec 14 2010.

FISCHER, K. R. et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. **Nature**, Basingstoke, v. 527, n. 7579, p. 472-6, Nov 26 2015.

GALLO, L. H. et al. Functions of Fibroblast Growth Factor Receptors in cancer defined by novel translocations and mutations. **Cytokine Growth Factor Rev**, Oxford, v. 26, n. 4, p. 425-49, Aug 2015.

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

GARAY, J. P. et al. The growth response to androgen receptor signaling in ERalpha-negative human breast cells is dependent on p21 and mediated by MAPK activation. **Breast Cancer Res**, London, v. 14, n. 1, p. R27, 2012.

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

GEENS, T.; GOEYENS, L.; COVACI, A. Are potential sources for human exposure to bisphenol-A overlooked? **Int J Hyg Environ Health**, Jena, v. 214, n. 5, p. 339-47, Sep 2011.

GERMANN, S. et al. Splicing programs and cancer. **J Nucleic Acids**, New York, v. 2012, p. 269570, 2012.

GEUENS, T.; BOUHY, D.; TIMMERMAN, V. The hnRNP family: insights into their role in health and disease. **Hum Genet, Berlin**, May 23 2016.

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**, London, v. 7, n. 6, p. R1036-50, 2005.

GUAN, X. Cancer metastases: challenges and opportunities. **Acta Pharm Sin B**, Amsterdam, v. 5, n. 5, p. 402-18, Sep 2015.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, Cambridge, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 4 2011.

HARALICK, R. M.; SHANMUGAM, K.; DINSTEN, I. Textural Features for Image Classification. **IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics**, New York, v. SMC-3, n. No 6, p. 610-621, 1973.

HARTMAN, J. et al. Estrogen receptor beta inhibits angiogenesis and growth of T47D breast cancer xenografts. **Cancer Res**, Baltimore, v. 66, n. 23, p. 11207-13, Dec 1 2006.

HE, Y. et al. Roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A and B in cell proliferation. **J Cell Sci**, Cambridge, v. 118, n. Pt 14, p. 3173-83, Jul 15 2005.

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**, Chevy Chase, v. 84, n. 12, p. 4559-65, Dec 1999.

HONG, L. et al. Fibroblast growth factor receptor 2: a therapeutic target in gastric cancer. **Expert Rev Gastroenterol Hepatol**, Abindgon, v. 7, n. 8, p. 759-65, Nov 2013.

HONORE, B.; BAANDRUP, U.; VORUM, H. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins F and H/H' show differential expression in normal and selected cancer tissues. **Exp Cell Res**, Orlando, v. 294, n. 1, p. 199-209, Mar 10 2004.

HORIGUCHI, K. et al. TGF-beta drives epithelial-mesenchymal transition through deltaEF1-mediated downregulation of ESRP. **Oncogene**, Basingstoke, v. 31, n. 26, p. 3190-201, Jun 28 2012.

HSU, T. Y. et al. The spliceosome is a therapeutic vulnerability in MYC-driven cancer. **Nature**, Basingstoke, v. 525, n. 7569, p. 384-8, Sep 17 2015.

ISHII, H. et al. Epithelial splicing regulatory proteins 1 (ESRP1) and 2 (ESRP2) suppress cancer cell motility via different mechanisms. **J Biol Chem**, Berlin, v. 289, n. 40, p. 27386-99, Oct 3 2014.

ISHIWATA, T. Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: Novel therapeutic targets for cancer. **Pathol Int**, Carlton South, Aug 10 2016.

ISHIWATA, T. et al. Enhanced expression of fibroblast growth factor receptor 2 IIIc promotes human pancreatic cancer cell proliferation. **Am J Pathol**, New York, v. 180, n. 5, p. 1928-41, May 2012.

JEAN-PHILIPPE, J.; PAZ, S.; CAPUTI, M. hnRNP A1: the Swiss army knife of gene expression. **Int J Mol Sci**, Basel, v. 14, n. 9, p. 18999-9024, 2013.

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

KATOH, Y.; KATOH, M. FGFR2-related pathogenesis and FGFR2-targeted therapeutics (Review). **Int J Mol Med**, Athens, v. 23, n. 3, p. 307-11, Mar 2009.

KELLER, P. J. et al. Mapping the cellular and molecular heterogeneity of normal and malignant breast tissues and cultured cell lines. **Breast Cancer Res**, London, v. 12, n. 5, p. R87, 2010.

KIDD, M. E.; SHUMAKER, D. K.; RIDGE, K. M. The role of vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer. **Am J Respir Cell Mol Biol**, New York, v. 50, n. 1, p. 1-6, Jan 2014.

KIM, Y. S. et al. Bisphenol A and nonylphenol have the potential to stimulate the migration of ovarian cancer cells by inducing epithelial-mesenchymal transition via an estrogen receptor dependent pathway. **Chem Res Toxicol**, Washington DC, v. 28, n. 4, p. 662-71, Apr 20 2015.

KOEHLER, K. F. et al. Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta. **Endocr Rev**, Chevy Chase, v. 26, n. 3, p. 465-78, May 2005.

KORAH, R. et al. Expression of FGF-2 alters focal adhesion dynamics in migration-restricted MDA-MB-231 breast cancer cells. **Breast Cancer Res Treat**, Dordrecht, v. 88, n. 1, p. 17-28, Nov 2004.

KORAH, R. M. et al. Basic fibroblast growth factor confers a less malignant phenotype in MDA-MB-231 human breast cancer cells. **Cancer Res**, Baltimore, v. 60, n. 3, p. 733-40, Feb 1 2000.

KRAMER, E. A. et al. 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**, Oxford, v. 98, n. 2-3, p. 174-8, Feb 2006.

KULASINGAM, V.; DIAMANDIS, E. P. Glucocorticoid receptor-mediated expression of kallikrein 10 in human breast cancer cell lines. **Biol Chem**, Berlin, v. 388, n. 10, p. 1113-9, Oct 2007.

KUNDAKOVIC, M.; CHAMPAGNE, F. A. Epigenetic perspective on the developmental effects of bisphenol A. **Brain Behav Immun**, Amsterdam, v. 25, n. 6, p. 1084-93, Aug 2011.

LATTRICH, C. et al. Estrogen receptor beta agonists affect growth and gene expression of human breast cancer cell lines. **Steroids**, New York, v. 78, n. 2, p. 195-202, Feb 2013.

LI, S. et al. Identification of an aptamer targeting hnRNP A1 by tissue slide-based SELEX. **J Pathol**, Chichester, v. 218, n. 3, p. 327-36, Jul 2009.

LI, X.; MANLEY, J. L. Inactivation of the SR protein splicing factor ASF/SF2 results in genomic instability. **Cell**, Cambridge, v. 122, n. 3, p. 365-78, Aug 12 2005.

LIU, S.; CHENG, C. Alternative RNA splicing and cancer. **Wiley Interdiscip Rev RNA**, Hoboken, v. 4, n. 5, p. 547-66, Sep-Oct 2013.

LOH, T. J. et al. CD44 alternative splicing and hnRNP A1 expression are associated with the metastasis of breast cancer. **Oncol Rep**, v. 34, n. 3, p. 1231-8, Sep 2015.

LU, P. et al. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, Athens, v. 3, n. 12, Dec 2011.

LU, Z. X. et al. Transcriptome-wide Landscape of Pre-mRNA Alternative Splicing Associated with Metastatic Colonization. **Mol Cancer Res**, Philadelphia, Oct 1 2014.

LUQMANI, Y. A.; GRAHAM, M.; COOMBES, R. C. Expression of basic fibroblast growth factor, FGFR1 and FGFR2 in normal and malignant human breast, and comparison with other normal tissues. **Br J Cancer**, London, v. 66, n. 2, p. 273-80, Aug 1992.

MAETZEL, D. et al. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. **Nat Cell Biol**, London, v. 11, n. 2, p. 162-71, Feb 2009.

MAREK, L. et al. Fibroblast growth factor (FGF) and FGF receptor-mediated autocrine signaling in non-small-cell lung cancer cells. **Mol Pharmacol**, Bethesda, v. 75, n. 1, p. 196-207, Jan 2009.



MARUTA, F. et al. Identification of FGF receptor-binding peptides for cancer gene therapy. **Cancer Gene Ther**, London, v. 9, n. 6, p. 543-52, Jun 2002.

MATSUDA, Y. et al. Fibroblast growth factor receptor 2 IIIc as a therapeutic target for colorectal cancer cells. **Mol Cancer Ther**, Philadelphia, v. 11, n. 9, p. 2010-20, Sep 2012.

MATSUDA, Y. et al. Overexpressed fibroblast growth factor receptor 2 in the invasive front of colorectal cancer: a potential therapeutic target in colorectal cancer. **Cancer Lett**, Limerick, v. 309, n. 2, p. 209-19, Oct 28 2011.

MATSUDA, Y. et al. Inhibition of fibroblast growth factor receptor 2 attenuates proliferation and invasion of pancreatic cancer. **Cancer Sci**, Oxford, v. 105, n. 9, p. 1212-9, Sep 2014.

MAUGER, D. M.; LIN, C.; GARCIA-BLANCO, M. A. hnRNP H and hnRNP F complex with Fox2 to silence fibroblast growth factor receptor 2 exon IIIc. **Mol Cell Biol**, Washington DC, v. 28, n. 17, p. 5403-19, Sep 2008.

MCDERMOTT, S. P.; WICHA, M. S. Targeting breast cancer stem cells. **Mol Oncol**, Hoboken, v. 4, n. 5, p. 404-19, Oct 2010.

MELLO, M. L.; DE CAMPOS VIDAL, B.; RUSSO, J. Ha-ras oncogene effect on DNA content and chromatin supraorganization in benzo[a]pyrene-transformed human breast epithelial cells. **Anal Cell Pathol**, Amsterdam, v. 19, n. 2, p. 73-9, 1999.

MIKOSZ, C. A. et al. Glucocorticoid receptor-mediated protection from apoptosis is associated with induction of the serine/threonine survival kinase gene, sgk-1. **J Biol Chem**, Berlin, v. 276, n. 20, p. 16649-54, May 18 2001.

MUNOZ-DE-TORO, M. et al. Perinatal exposure to bisphenol-A alters peripubertal mammary gland development in mice. **Endocrinology**, Chevy Chase, v. 146, n. 9, p. 4138-47, Sep 2005.

NETWORK, T. C. G. A. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, Basingstoke, v. 490, n. 7418, p. 61-70, Oct 4 2012.

NORRIS, J. D. et al. A negative coregulator for the human ER. **Mol Endocrinol**, Chevy Chase, v. 16, n. 3, p. 459-68, Mar 2002.

PALUMBO-ZERR, K. et al. Composition of TWIST1 dimers regulates fibroblast activation and tissue fibrosis. **Ann Rheum Dis**, London, Apr 25 2016.

PAN, D.; KOCHERGINSKY, M.; CONZEN, S. D. Activation of the glucocorticoid receptor is associated with poor prognosis in estrogen receptor-negative breast cancer. **Cancer Res**, Baltimore, v. 71, n. 20, p. 6360-70, Oct 15 2011.

PAN, Y. et al. Slug-upregulated miR-221 promotes breast cancer progression through suppressing E-cadherin expression. **Sci Rep**, London, v. 6, p. 25798, 2016.

PAPACHRISTOU, D. J.; BASDRA, E. K.; PAPAVASSILIOU, A. G. Bone metastases: molecular mechanisms and novel therapeutic interventions. **Med Res Rev**, New York, v. 32, n. 3, p. 611-36, May 2012.

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**, Research Triangle Park, v. 123, n. 12, p. 1271-9, Dec 2015a.

\_\_\_\_\_. Effects of Low-Dose Bisphenol A on DNA Damage and Proliferation of Breast Cells: The Role of c-Myc. **Environ Health Perspect**, Research Triangle Park, May 1 2015b.

PUPO, M. et al. Bisphenol A induces gene expression changes and proliferative effects through GPER in breast cancer cells and cancer-associated fibroblasts. **Environ Health Perspect**, Research Triangle Park, v. 120, n. 8, p. 1177-82, Aug 2012.

RANIERI, D. et al. HPV16 E5 expression induces switching from FGFR2b to FGFR2c and epithelial-mesenchymal transition. **Int J Cancer**, New York, v. 137, n. 1, p. 61-72, Jul 1 2015.

RANIERI, D. et al. Expression of the FGFR2 mesenchymal splicing variant in epithelial cells drives epithelial-mesenchymal transition. **Oncotarget**, Albany, Dec 21 2015.

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

RONDON-LAGOS, M. et al. Tamoxifen Resistance: Emerging Molecular Targets. **Int J Mol Sci**, Basel, v. 17, n. 8, 2016.

SAMUELSEN, M. et al. Estrogen-like properties of brominated analogs of bisphenol A in the MCF-7 human breast cancer cell line. **Cell Biol Toxicol**, Dordrecht, v. 17, n. 3, p. 139-51, 2001.

SATO, F.; SAJI, S.; TOI, M. Genomic tumor evolution of breast cancer. **Breast Cancer**, Tokyo, May 22 2015.

SCOTET, E.; HOUSSAINT, E. Exon III splicing switch of fibroblast growth factor (FGF) receptor-2 and -3 can be induced by FGF-1 or FGF-2. **Oncogene**, Basingstoke, v. 17, n. 1, p. 67-76, Jul 9 1998.

SHAMIR, E. R. et al. Twist1-induced dissemination preserves epithelial identity and requires E-cadherin. **J Cell Biol**, New York, v. 204, n. 5, p. 839-56, Mar 3 2014.

SHAPIRO, I. M. et al. An EMT-driven alternative splicing program occurs in human breast cancer and modulates cellular phenotype. **PLoS Genet**, San Francisco, v. 7, n. 8, p. e1002218, Aug 2011.

- SHERIDAN, C. et al. CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. **Breast Cancer Res**, London, v. 8, n. 5, p. R59, 2006.
- SHI, T. et al. Bisphenol a exposure promotes the migration of NCM460 cells via estrogen receptor-mediated integrin beta1/MMP-9 pathway. **Environ Toxicol**, New York, Dec 23 2014.
- SHIRAKIHARA, T. et al. TGF-beta regulates isoform switching of FGF receptors and epithelial-mesenchymal transition. **EMBO J**, London, v. 30, n. 4, p. 783-95, Feb 16 2011.
- SINGH, S.; LI, S. S. Epigenetic effects of environmental chemicals bisphenol A and phthalates. **Int J Mol Sci**, Basel, v. 13, n. 8, p. 10143-53, 2012.
- SKLIRIS, G. P. et al. Reduced expression of oestrogen receptor beta in invasive breast cancer and its re-expression using DNA methyl transferase inhibitors in a cell line model. **J Pathol**, Chichester, v. 201, n. 2, p. 213-20, Oct 2003.
- SONG, H. et al. Release of Matrix Metalloproteinases-2 and 9 by S-Nitrosylated Caveolin-1 Contributes to Degradation of Extracellular Matrix in tPA-Treated Hypoxic Endothelial Cells. **PLoS One**, San Francisco, v. 11, n. 2, p. e0149269, 2016.
- SOTOCA, A. M. et al. Influence of cellular ERalpha/ERbeta ratio on the ERalpha-agonist induced proliferation of human T47D breast cancer cells. **Toxicol Sci**, Cary, v. 105, n. 2, p. 303-11, Oct 2008.
- SU, N.; JIN, M.; CHEN, L. Role of FGF/FGFR signaling in skeletal development and homeostasis: learning from mouse models. **Bone Res**, Chengdu, v. 2, p. 14003, 2014.
- 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)**, Auckland, v. 4, p. 35-41, 2010.
- THIGPEN, J. T. et al. Oral medroxyprogesterone acetate in the treatment of advanced or recurrent endometrial carcinoma: a dose-response study by the Gynecologic Oncology Group. **J Clin Oncol**, Alexandria, v. 17, n. 6, p. 1736-44, Jun 1999.
- THOMAS, C. et al. ERbeta1 represses basal breast cancer epithelial to mesenchymal transition by destabilizing EGFR. **Breast Cancer Res**, London, v. 14, n. 6, p. R148, 2012.
- TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin**, Hoboken, v. 65, n. 2, p. 87-108, Mar 2015.
- TRAN, D. D. et al. Temporal and spatial cooperation of Snail1 and Twist1 during epithelial-mesenchymal transition predicts for human breast cancer recurrence. **Mol Cancer Res**, Baltimore, v. 9, n. 12, p. 1644-57, Dec 2011.

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

UEDA, J. et al. Epithelial splicing regulatory protein 1 is a favorable prognostic factor in pancreatic cancer that attenuates pancreatic metastases. **Oncogene**, Basingstoke, v. 33, n. 36, p. 4485-95, Sep 4 2014.

VAN DER HORST, P. H. et al. Progesterone inhibits epithelial-to-mesenchymal transition in endometrial cancer. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 1, p. e30840, 2012.

VARES, G. et al. Generation of breast cancer stem cells by steroid hormones in irradiated human mammary cell lines. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 10, p. e77124, 2013.

VENABLES, J. P. et al. RBFOX2 is an important regulator of mesenchymal tissue-specific splicing in both normal and cancer tissues. **Mol Cell Biol**, Washington DC, v. 33, n. 2, p. 396-405, Jan 2013.

VOUTSADAKIS, I. A. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and Regulation of EMT Factors by Steroid Nuclear Receptors in Breast Cancer: A Review and in Silico Investigation. **J Clin Med**, Basel, v. 5, n. 1, 2016.

WAHL, M. C.; WILL, C. L.; LUHRMANN, R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. **Cell**, Cambridge, v. 136, n. 4, p. 701-18, Feb 20 2009.

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)**, Philadelphia, v. 7, n. 4, p. 445-55, Apr 2014.

WANG, J. et al. The transcription repressor, ZEB1, cooperates with CtBP2 and HDAC1 to suppress IL-2 gene activation in T cells. **Int Immunol**, Oxford, v. 21, n. 3, p. 227-35, Mar 2009.

WARZECHA, C. C. et al. An ESRP-regulated splicing programme is abrogated during the epithelial-mesenchymal transition. **EMBO J**, London, v. 29, n. 19, p. 3286-300, Oct 6 2010.

WARZECHA, C. C. et al. The epithelial splicing factors ESRP1 and ESRP2 positively and negatively regulate diverse types of alternative splicing events. **RNA Biol**, Philadelphia, v. 6, n. 5, p. 546-62, Nov-Dec 2009.

WEBER LOZADA, K.; KERI, R. A. Bisphenol A increases mammary cancer risk in two distinct mouse models of breast cancer. **Biol Reprod**, Madison, v. 85, n. 3, p. 490-7, Sep 2011.

WEIDLE, U. H. et al. Molecular Mechanisms of Bone Metastasis. **Cancer Genomics Proteomics**, Kapandriti, v. 13, n. 1, p. 1-12, 01-02 2016.

WESCHE, J.; HAGLUND, K.; HAUGSTEN, E. M. Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. **Biochem J**, London, v. 437, n. 2, p. 199-213, Jul 15 2011.

WILL, C. L.; LUHRMANN, R. Spliceosome structure and function. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, Woodbury, v. 3, n. 7, Jul 2011.

WILLIAMS, K. E. et al. Quantitative proteomic analyses of mammary organoids reveals distinct signatures after exposure to environmental chemicals. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington DC, Feb 22 2016.

WROBEL, A. M.; GREGORASZCZUK, E. L. Actions of methyl-, propyl- and butylparaben on estrogen receptor-alpha and -beta and the progesterone receptor in MCF-7 cancer cells and non-cancerous MCF-10A cells. **Toxicol Lett**, Amsterdam, v. 230, n. 3, p. 375-81, Nov 4 2014.

WU, X. et al. Isolation of a novel basic FGF-binding peptide with potent antiangiogenic activity. **J Cell Mol Med**, Oxford, v. 14, n. 1-2, p. 351-6, Jan 2010.

XU, M. et al. miR-203 inhibition of renal cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting of FGF2. **Diagn Pathol**, London, v. 10, p. 24, 2015.

YAN, G. et al. Exon switching and activation of stromal and embryonic fibroblast growth factor (FGF)-FGF receptor genes in prostate epithelial cells accompany stromal independence and malignancy. **Mol Cell Biol**, Washington DC, v. 13, n. 8, p. 4513-22, Aug 1993.

YANG, F. et al. Breast cancer stem cell: the roles and therapeutic implications. **Cell Mol Life Sci**, Basel, Aug 16 2016.

YANG, L. et al. Effect of low dose bisphenol A on the early differentiation of human embryonic stem cells into mammary epithelial cells. **Toxicol Lett**, Amsterdam, v. 218, n. 3, p. 187-93, Apr 26 2013.

YOUSEF, E. M. et al. MMP-9 expression varies according to molecular subtypes of breast cancer. **BMC Cancer**, London, v. 14, p. 609, 2014.

YU, L. et al. TWIST expression in hypopharyngeal cancer and the mechanism of TWIST-induced promotion of metastasis. **Oncol Rep**, Athens, v. 27, n. 2, p. 416-22, Feb 2012.

YUSUF, R.; FRENKEL, K. Morphologic transformation of human breast epithelial cells MCF-10A: dependence on an oxidative microenvironment and estrogen/epidermal growth factor receptors. **Cancer Cell Int**, London, v. 10, p. 30, 2010.

ZHANG, J. et al. TGF-beta-induced epithelial-to-mesenchymal transition proceeds through stepwise activation of multiple feedback loops. **Sci Signal**, Washington DC, v. 7, n. 345, p. ra91, Sep 30 2014.

ZHANG, K. S. et al. Bisphenol A stimulates human lung cancer cell migration via upregulation of matrix metalloproteinases by GPER/EGFR/ERK1/2 signal pathway. **Biomed Pharmacother**, Paris, v. 68, n. 8, p. 1037-43, Oct 2014.

ZHANG, W. et al. Effect of bisphenol A on the EGFR-STAT3 pathway in MCF-7 breast cancer cells. **Mol Med Rep**, Athens, v. 5, n. 1, p. 41-7, Jan 2012.

ZHANG, X. H. et al. The mesenchymal-epithelial transition during in vitro decidualization. **Reprod Sci**, Thousand Oaks, v. 20, n. 4, p. 354-60, Apr 2013.

ZHANG, X. L. et al. Bisphenol A stimulates the epithelial mesenchymal transition of estrogen negative breast cancer cells via FOXA1 signals. **Arch Biochem Biophys**, San Diego, v. 585, p. 10-6, Nov 1 2015.

ZHAO, M. et al. Expression and correlation of Twist and gelatinases in breast cancer. **Exp Ther Med**, Athens, v. 6, n. 1, p. 97-100, Jul 2013.

ZHAO, Q. et al. Tumor-specific isoform switch of the fibroblast growth factor receptor 2 underlies the mesenchymal and malignant phenotypes of clear cell renal cell carcinomas. **Clin Cancer Res**, Denville, v. 19, n. 9, p. 2460-72, May 1 2013.

ZHENG, X. et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. **Nature**, Basingstoke, v. 527, n. 7579, p. 525-30, Nov 26 2015.

ZHOU, K. et al. Estrogen stimulated migration and invasion of estrogen receptor-negative breast cancer cells involves an ezrin-dependent crosstalk between G protein-coupled receptor 30 and estrogen receptor beta signaling. **Steroids**, New York, Feb 2 2016.