

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Estudo da ação dicotômica do receptor de estrógeno beta (ER $\beta$ ) na indução da transição  
epitélio- mesênquima em células tumorais de mama da linhagem MCF-7**

Danielle Pereira Silva

UBERLÂNDIA, MG  
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Estudo da ação dicotômica do receptor de estrógeno beta (ER $\beta$ ) na indução da transição  
epitélio- mesênquima em células tumorais de mama da linhagem MCF-7**

Dissertação apresentada ao Colegiado do  
Programa de Pós-graduação em  
Imunologia e Parasitologia Aplicadas  
como parte de obtenção do título de  
Mestre.

**Danielle Pereira Silva**  
Orientador: Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva

UBERLÂNDIA, MG  
2017

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

---

S587e  
2017

Silva, Danielle Pereira, 1990  
Estudo da ação dicotômica do receptor de estrógeno beta (ER $\beta$ ) na indução da transição epitélio- mesênquima em células tumorais de mama da linhagem MCF-7 / Danielle Pereira Silva. - 2017.  
36 p. : il.

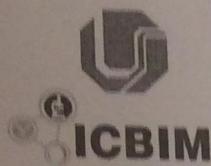
Orientador: Marcelo José Barbosa Silva.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.  
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.56>  
Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Mamas - Câncer - Teses. 3. Receptores hormonais - Teses. 4. Mamas - Doenças - 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

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



**Danielle Pereira Silva**

“Estudo da ação dicotômica do receptor de estrógeno beta (ERb) no câncer de mama: papel na proliferação celular e transição epitélio-mesênquima (EMT) na linhagem de câncer de mama luminal MCF-7”

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

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 30 de outubro de 2017.

Prof. Dr. Alvaro Ferreira Junior - UNIUBE

Profa. Dra. Daniele Lisboa Ribeiro - ICBIM/UFU

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

“[...] verteu lágrimas, rangeu dentes, mas  
gestou-se, MAJESTOU-SE [...].”

**(Aurora – Tim e Vanessa)**

Dedico esse trabalho ao meu avô Osmar, que neste momento se encontra no Plano Espiritual, mas que eu sei que hoje e sempre foi o meu maior incentivador. O meu muito obrigada.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu agradeço a Deus e a seus mensageiros por todo amparo, proteção e estímulo em minha vida toda. Aos meus pais por terem me dado a oportunidade da vida, por serem responsáveis pela minha caminhada, por terem sido peças primordiais na manutenção do ensino que tive ao longo da minha vida até chegar no dia de hoje.

Agradeço aos meus familiares, tias e avós principalmente. Por terem sido a conversa necessária em tantos momentos e também o incentivo quando eu mais precisava. Tia Regina, tia Ildamar, vô Garcia e tia Lúcia muito obrigada. Meus avós eu agradeço imensamente de coração pois são definitivamente meus maiores incentivadores e acreditadores do meu potencial.

Agradeço ao meu irmão Alvaro Bruno, pelas chatices de todo dia que fizeram tudo isso parecer mais leve.

À todos amigos da Casa de Amparo Nossa Lar e o Grupo Irmão Áureo que me conhecem a tantos anos e estiveram comigo em todas as vitórias, em todos os processos difíceis ou não. Agradeço ao meu orientador Marcelo José Barbosa Silva pela amizade e por ter proporcionado o advento desse trabalho.

À todos amigos do laboratório LABIOT, que certamente sem eles nada teria sido concluído. Isadora pelas inúmeras ajudas e conversas. Pedro pelas ajudas e pelo enjoamento. Brunna que sempre me ajudou independente do horário e pelas caronas. Bruninha pela sua risada animadora, ajuda e companheirismo. Laisa, minha nega preferida, pela amizade, pelo carinho, pela parceria. Fernandinha pelos inúmeros experimentos feitos no fim de semana, pelos plaqueamentos, que quase sempre não deram certo, pela amizade. Mari pelas conversas, saídas, pensamentos. Lívia pela amizade, pelo compartilhamento de ideias. Ieda pelas matérias que fizemos juntas, pela oportunidade de te conhecer mais propriamente Ieda que médica. Annelise pelos apuros dos experimentos e companhia. E principalmente agradeço ao meu amigo Felipe. Agradeço pela sua disponibilidade, por sua ajuda imensa, pelos telefonemas, por conta das ideias e apuros, agradeço pela ideia dos experimentos, pela sua co- orientação, pela sua amizade. Muito obrigada mesmo.

Agradeço aos amigos do 2A, pelo incentivo e ajuda no momento da escrita, por dividir comigo esses momentos de colocar no papel algumas vivências em forma científica.

Agradeço aos amigos da graduação, especialmente Ingrid, Nana, Rafa por terem seguido comigo esse caminho e por estarem esses dois anos compartilhando dos momentos mais penosos e menos penosos.

Agradeço pela disponibilidade do Laboratório de Imunoparasitologia, pois muitos dos resultados aqui obtidos só foram possíveis pela ajuda dos membros desse laboratório.

Aos professores das disciplinas que cursei durante todo o mestrado.

À Capes, pela bolsa e incentivo.

À todos que de alguma forma acreditaram em mim.

## **LISTA DE ABREVIASÕES**

- ALDH – Aldeído desidrogenase
- BCSC – Célula tronco cancerígena da mama
- BMP – Proteína morfogenética do osso
- CCND1 – Ciclina D1
- CD24 – *Cluster* de diferenciação 24
- CD44 – *Cluster* de diferenciação 44
- CD49f – *Cluster* de diferenciação 49f
- cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar
- CO2 – Gás carbônico
- CSCs – Célula tronco cancerígena
- CTM – Células-tronco tumorais da mama
- DLU – Diluente
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- DPN – Diarilpropionitrilo
- E2 – Estradiol
- EMT – Transição Epitélio-mesenquimal
- EpCAM – Molécula de adesão celular epitelial
- ER – Receptor de estrógeno
- ER $\alpha$  – Receptor de estrógeno alfa
- ER $\beta$  – Receptor de estrógeno beta
- ER $\beta$ 1 – Receptor de estrógeno beta 1
- ER $\beta$ 2 – Receptor de estrógeno beta 2
- ER $\beta$ 3 – Receptor de estrógeno beta 3

ER $\beta$ 4 – Receptor de estrógeno beta 4

ER $\beta$ 5 – Receptor de estrógeno beta 5

ESR1 – Gene codificante do receptor de estrógeno (alfa)

ESR2 – Gene codificante do receptor de estrógeno 2 (beta)

ESR2 2 – Gene codificante do receptor de estrógeno 2 (beta) isoforma 2

ESR2 5 – Gene codificante do receptor de estrógeno 2 (beta) isoforma 5

FOX – Fatores de transcrição Forkhead

HER2 – Receptor do fator de crescimento epidermal humano 2

Ki67 – proteína de proliferação celular

MET – Transição epitélio-mesenquimal

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

NF-kB – Factor nuclear kappa B

p21 – Proteína 21

p53 – Proteína 53

p65 – Proteína 65

PBS – Tampão fosfato salino

PCNA – Antígeno nuclear de proliferação celular

PgR – Receptor progesterona

RT-PCR (qPCR) – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

SFB – Soro fetal bovino

TGF- $\beta$  – Fator de crescimento transformante beta

TNBC – Câncer de mama triplo negativo

TPN – Triplo negativo

VIM – Vimentina

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	10
1.1 Câncer de mama .....	10
1.2 Receptores de estrógeno na mama .....	11
1.3 Receptor de estrógeno beta (ER $\beta$ ).....	12
1.4 Marcadores de Transição epitélio- mesênquima (EMT) e Células- tronco cancerígenas (CSCs) .....	12
2 JUSTIFICATIVA .....	14
3 OBJETIVOS .....	15
3.1 Objetivo Geral .....	15
3.2 Objetivos Específicos .....	15
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1 Cultura Celular .....	16
4.2 Tratamentos.....	16
4.4 PCR em tempo real.....	17
4.5 Citometria de fluxo.....	17
5 RESULTADOS .....	20
5.1 Marcadores de EMT .....	20
5.2. Ciclo celular e proliferação .....	22
5.3 Expressão gênica de <i>ESR1</i> e <i>ESR2</i> .....	22
5.4 Fenótipo de células luminais da mama: Marcação de CSCs .....	23
6 DISCUSSÃO .....	25
7 CONCLUSÃO .....	28
REFERÊNCIAS .....	29

## RESUMO

O câncer de mama é a neoplasia que mais acomete mulheres no mundo. Dentre os fatores prognósticos levados em consideração estão os receptores hormonais. O receptor de estrógeno beta (ER $\beta$ ) é um dos receptores hormonais que pode ser encontrado na mama, mas que até então não é utilizado como um marcador preditivo de prognóstico tumoral por conta da sua ação paradoxal. Células tumorais de mama da linhagem MCF-7 foram utilizadas neste trabalho para averiguar a função dicotômica do ER $\beta$  no processo tumoral. De tal forma que foi avaliado alguns dos processos que são observados nas etapas do desenvolvimento do câncer de mama, como proliferação, transição epitélio-mesênquima (EMT) e investigação das células-tronco cancerosas (CSCs). Para isso, foram utilizados o agonista de ER $\beta$ , Diarilpropionitrilo (DPN), o agonista ambíguo (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ) estradiol (E2) e o fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ), indutor de EMT. As células que receberam tratamento com DPN obtiveram maior número de CSCs comparadas às que não foram cultivadas com esse agonista, resultado encontrado pela técnica de citometria de fluxo. As células que tiveram um tratamento prévio com TGF- $\beta$  demonstraram menor taxa de proliferação e aumento na expressão de p21, uma proteína com ação bloqueadora de ciclina D1, cuja expressão ficou inalterada nos tratamentos com TGF- $\beta$  e agonista de ER $\beta$ . A respeito dos genes relacionados a EMT (SLUG, SNAIL, VIMENTINA, ZEB1, TWIST1, RBFOX2, CICLINAD1 e p21), ER $\beta$  inibiu a expressão dos mesmos, sugerindo que esse receptor induza o fenômeno denominado transição mesenquimal epitelial (MET). Nesse cenário, DPN causou a diminuição da expressão de SLUG, SNAIL, TWIST, contrastando com a expressão obtida no tratamento com TGF- $\beta$  que, além desses genes, também demonstrou aumento na expressão de ZEB1, RBFOX2 e vimentina. O efeito do TGF- $\beta$  na EMT foi revertido ao associá-lo com DPN. Os dados corroboram com a literatura acerca do possível papel pró tumoral de ER $\beta$  no aumento da proliferação celular e da geração das células-tronco cancerígenas de mama (BSCs), além de ir ao encontro do fenótipo relacionado a MET nos tratamentos com DPN sozinho ou associado ao TGF- $\beta$ . Com esses resultados, torna-se claro no nosso trabalho que dependendo o que é avaliado em relação a ação do ER $\beta$ , previamente tratado ou não com TGF- $\beta$ , o seu efeito dicotômico ainda é observado.

**Palavras-chave:** Câncer de mama. MCF-7. Receptor de estrógeno beta (ER- $\beta$ ).

## ABSTRACT

Breast cancer is the most common neoplasm of women in the world. Among the prognostic factors taken into consideration are the hormonal receptors. The estrogen receptor beta (ER $\beta$ ) is one of the hormone receptors that can be found in the breast, but is not used as a predictive marker of tumor prognosis due to its paradoxical action. Tumor cells of the MCF-7 lineage were used in this work to ascertain the dichotomous function of ER $\beta$  in the tumor process. Thus, we evaluated some of the processes that are observed in the stages of breast cancer development, such as proliferation, epithelial-mesenchymal transition (EMT) and cancer stem cell research (CSCs). For this, ER $\beta$  agonist Diarilpropionitrile (DPN), ambiguous agonist (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) estradiol (E2) and transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ), inducer of EMT, were used. Cells receiving TGF-  $\beta$  treatment obtained a higher number of CSCs compared to those that were not cultured with this agonist, a result found by the flow cytometry technique. Cells that were pretreated with TGF- $\beta$  demonstrated a lower rate of proliferation and increased expression of p21, a protein with cyclin D1 blocking action, whose expression was unchanged in TGF- $\beta$  and ER $\beta$  agonist treatments. Regarding the EMT-related genes (SLUG, SNAIL, VIMENTINA, ZEB1, TWIST1, RBFOX2, CYCLINAD1 and p21), ER $\beta$  inhibited their expression, suggesting that this receptor induces the phenomenon called epithelial mesenchymal transition (MET). In this scenario, DPN caused a decrease in the expression of SLUG, SNAIL, TWIST, in contrast to TGF- $\beta$  expression, which, in addition to these genes, also showed increased expression of ZEB1, RBFOX2 and VIMENTIN. The effect of TGF- $\beta$  on EMT was reversed by associating it with DPN. The data corroborate with the literature about the possible ER $\beta$  pro-tumor role in increasing cell proliferation and the generation of breast cancer stem cells (BSCs), in addition to the MET related phenotype in treatments with DPN alone or associated to TGF- $\beta$ . With these results, it becomes clear in our work that depending on what is evaluated in relation to the action of ER $\beta$ , previously treated or not with TGF- $\beta$ , its dichotomous effect is still observed.

**Key- words:** Breast cancer. MCF-7. Estrogen receptor beta (ER $\beta$ ).

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Câncer de mama

O tipo de câncer que mais acomete a população feminina é o de mama. No Brasil, as estimativas para o biênio de 2016-2017 apontam a ocorrência de aproximadamente 58 mil novos casos da doença, reforçando a magnitude do problema no país (CÂNCER, 2016 ).

O câncer de mama é uma doença na qual pacientes com mesmo diagnóstico podem apresentar diferentes resultados clínicos. As alterações que ocorrem no processo carcinogênico atribuem características não-próprias das células, como resistência à apoptose, proliferação aumentada (imortalidade) na ausência de mitógenos, angiogênese, invasividade, evasão imune, e, finalmente, metástase(BERTRAM, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Apesar da diversidade genética e epigenética que há no câncer de mama, ele pode ser dividido em quatro subtipos moleculares principais: luminal A, luminal B, HER2 positivo e triplô negativo (TPN) (DAI; CHEN; BAI, 2014).

Tumores luminais são caracterizados por expressarem receptores de estrógeno e apresentar um perfil similar ao das células luminais do epitélio da mama normal. (SOTIRIOU et al., 2003). Este subtipo foi ainda subdividido em três grupos, sendo que dois deles são: luminal A e B, por apresentarem diferentes comportamentos clínicos e expressão gênica.

Os tumores luminais A apresentam alta expressão de ER e/ou PR e baixos índices de proliferação celular, baixa expressão de Ki-67. Já o subtipo luminal B exibe, em sua maioria, receptores hormonais, embora por vezes sejam expressos em baixos níveis. No entanto, suas características marcantes são a expressão de genes associados a superexpressão de HER2 e de genes relacionados ao ciclo celular e proliferação, como Ki-67, e, portanto, maiores taxas de proliferação celular (SORLIE et al., 2001; SORLIE et al., 2003).

Os tumores que não expressam ER são agrupados em dois subgrupos distintos. Um subgrupo compreende tumores com superexpressão da proteína Her-2/neu e o outro abrange tumores com fenótipo basal. Tumores Her-2/neu positivo são caracterizados pela amplificação do gene HER-2 e negatividade para receptores hormonais (CIANFROCCA; GOLDSTEIN, 2004).

Os tumores de fenótipo basal (*basal-like*) expressam genes e proteínas que são específicos das células basais do epitélio mamário, isto inclui a expressão de citoqueratinas e negatividade para ER, PR e HER-2. Este subtipo é o que apresenta comportamento clínico mais

agressivo quando comparado aos tumores pertencentes aos outros subgrupos moleculares (DAIRKEE et al., 1987; MALZAHN et al., 1998; RAKHA et al., 2006).

Há vários fatores prognósticos que são levados em consideração na rotina clínica do tratamento dessa doença. Entre eles estão o tamanho do tumor, envolvimento dos linfonodos, o marcador de proliferação celular ki67, a grade histológica e a expressão imunohistoquímica dos receptores de progesterona (PgR), o receptor do fator de crescimento humano epidermal 2 (HER2) e o receptor de estrógeno  $\alpha$  (ER  $\alpha$ ) (CHANTZI et al., 2013).

## 1.2 Receptores de estrógeno na mama

Ao que tange a saúde mamária, o hormônio estrógeno que está envolvido tanto no desenvolvimento das glândulas mamárias quanto no processo tumoral é destacado por seu papel na proliferação e progressão do câncer de mama. O sinal desse hormônio é mediado pelo seu receptor, que é um fator de transcrição pertencente a superfamília dos receptores de hormônios esteroides e localiza-se na membrana nuclear (KUIPER et al., 1996; OGAWA et al., 1998; OMOTO et al., 2003).

Clinicamente, a ação do ER alfa é o preditor efetivo mais conhecido na resposta a terapia hormonal no câncer de mama. Somente em 1996 foi descoberto o segundo receptor, ER $\beta$ . ER $\beta$ 1 foi associado a um papel antitumoral por estar subexpresso durante a tumorigênese mamária, embora não possa ser encontrado em todos os tipos de câncer de mama. (CAPPELLETTI et al., 2006; OGAWA et al., 1998).

Aproximadamente 50% dos tipos de câncer de mama luminais e 60% dos tumores triplo-negativos (TNBC) são ER $\beta$  $^+$  e há uma perda na expressão desse receptor ao longo da progressão tumoral. Entretanto, o critério utilizado para positividade do receptor de estrógeno é baseado na expressão somente de ER $\alpha$ , por ser claramente pró-tumoral. Além do mais, muitos estudos foram feitos para procurar fatores preditivos adicionais ou alternativos a esse, já que apenas 70% dos pacientes ER $\alpha$  $^+$  conseguem ser responsivos a terapia. (COTRIM et al., 2013).

Os dois receptores de estrógeno têm o 17 $\beta$ -estradiol (E2), um estrogênio endógeno, como agonista, sendo que ER $\beta$  tem quatro vezes menos afinidade ao E2 comparado ao ER $\alpha$ . A proporção ER $\alpha$  / ER $\beta$  parece ser fundamental na regulação celular, por estimular um processo conhecido como transição mesenquima-epitélio (MET) (efeito contrário ao EMT), além de regular a proliferação na ausência de ligante ou na presença do ligante ambíguo (E2, para os dois receptores de estrógeno) em linhagens positivas para esses receptores (COTRIM et al., 2013; HARTMAN et al., 2006; SOTOMAYOR et al., 2008).

### 1.3 Receptor de estrógeno beta (ER $\beta$ )

Muitos grupos reportaram a expressão das isoformas de ER $\beta$  em tecidos normais e também em carcinoma mamário. Como vários outros genes, ER $\beta$  (*ESR2*) é expresso em diferentes isoformas de RNA mensageiro. Além do ER $\beta$  ou ER $\beta$ 1, existe mais quatro isoformas que não se ligam a hormônios, ER $\beta$ 2, ER $\beta$ 3, ER $\beta$ 4 e ER $\beta$ 5. Todos os cinco são produtos de splicing alternativo do RNA mensageiro deste receptor (LEUNG et al., 2012; MURPHY; LEYGUE, 2012).

A função antiproliferativa de ER $\beta$  já é conhecida, mas muitos estudos observaram que esse receptor pode ter uma ação proliferativa/ pró-tumoral. Essa ação dicotômica pode ser verificada *in vivo*. Em células tumorais ER $\beta$ <sup>+</sup>, os agonistas desse receptor levam a uma diminuição da proliferação e apoptose *in vitro*. Entretanto, no mesmo estudo foi demonstrado que houve aumento do tumor induzido *in vivo* (KONTOS et al., 2011).

A expressão de ER $\beta$ 2 aumenta em tumores ER $\alpha$ <sup>-</sup>, induzindo pesquisadores a acreditar que essa isoforma facilita a carcinogênese e estaria associada com um pior prognóstico por conta da sua associação com a fosforilação de c-Jun fosforilada e da translocação nuclear da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B2 (CHANTZI et al., 2013).

Diferentemente, ER $\beta$  tem sido associado em alguns estudos com um aumento da taxa de sobrevivência em pacientes tratados com tamoxifeno (GRUVBERGER-SAAL et al., 2007; HONMA et al., 2008; MA et al., 2017; ROSIN et al., 2014).

### 1.4 Marcadores de Transição epitélio- mesênquima (EMT) e Células- tronco cancerígenas (CSCs)

Durante o processo de EMT, as células tumorais perdem a expressão de marcadores epiteliais específicos, incluindo E-caderina, EpCAM e adquirem a expressão de marcadores mesenquimais do citoesqueleto e proteínas de adesão, como a N- caderina e vimentina, além de regular positivamente quinases e fatores de crescimento incluindo c-MET, TGF- $\beta$ , WNT e FOX. Esse processo é controlado por uma família de genes, dentre eles SNAIL, TWIST e ZEB (KSIAZKIEWICZ; MARKIEWICZ; ZACZEK, 2012).

No contexto da EMT estão inseridas as células-tronco cancerosas (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 (FISCHER et al., 2015; MC DERMOTT et al., 2010; ZHENG, X. et al., 2015).

Células tronco de câncer de mama são altamente tumorigênicas, em ensaios de enxerto em camundongos comparadas a células cancerígenas diferenciadas. Quanto ao seu fenótipo, estas células são pouco diferenciadas e possuem marcadamente uma reprogramação celular típica de EMT (FISCHER et al., 2015; MC DERMOTT et al., 2010), a qual está envolvida com agressividade tumoral e quimioresistência na maioria dos casos (FISCHER et al., 2015; GUAN, 2015).

Ma e colaboradores (2017) mostraram que a maioria das mamoesferas que foram geradas a partir de células tronco tumorais de mama (CTM) (BSCs) são fenotipicamente CD24<sup>-</sup> CD44<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup> (MA et al., 2017).

Ao contrário das células de câncer diferenciadas, as CSCs não são inteiramente dependentes da respiração oxidativa mitocondrial. Dessa forma, a ação de ER $\beta$  como um fator de vulnerabilidade para as mitocôndrias pode se tornar benéfico para a manutenção das células tronco tumorais, aumentando o metabolismo glicolítico, já que como foi demonstrado por Ma e colaboradores que o agonista DPN reduziu a taxa do consumo de oxigênio, fato que pode ser revertido na presença do antagonista PHTPP(MA et al., 2017). Importantemente, estímulos que desencadeiam a EMT também podem expandir a população CSC (CASTANO et al., 2012).

## 2 JUSTIFICATIVA

Alguns cânceres de mama com invasão linfonodal possuem níveis substanciais de ER $\beta$  e simultaneamente altos níveis proliferativos (no linfonodo) (NOVELLI et al., 2008). Além disso, ER $\beta$  e ER $\beta 1$  foi associado com altos níveis proliferativos (Ki67) em TNBC, que marcam para células basais, sem aumento da apoptose dessas células (SKLIRIS et al., 2006). Enquanto também há evidências que ER $\beta$  pode estar envolvido no processo contrário a proliferação. Foi demonstrado que o *knockdown* do gene codificante de ER $\beta$  levou a um aumento da proliferação de células MCF-10A (células epiteliais triplo-negativas não-trasformadas de mama) e MCF-7, ambos na ausência de ligante (E2) (TREECK et al., 2010). Também, agonistas de ER $\beta$  diminuiram a proliferação celular nas MCF-10A, mas apenas em altíssimas concentrações (LATTRICH et al., 2013).

Esse processo paradoxal também é encontrado em células que superexpressam ER $\beta$ , nesse caso, a ação de agonistas de ER $\alpha$  só leva à proliferação quando ER $\beta$  é inibido (SOTOMA et al., 2008). As informações acima demonstram que o ER $\beta$  possui um caráter dicotômico, algumas vezes favorecendo a proliferação das células tumorais e em outras dificultando o mesmo processo.

Para chegarmos mais próximo do que acontece a nível da ação de receptores no microambiente tumoral, avaliamos o papel do receptor ER $\beta$ , reavaliando sua ação em células luminais positivas tumorais de mama durante a transição epitelio-mesênquima induzida por TGF- $\beta$ .

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Investigar a influência do receptor de estrógeno beta (ER $\beta$ ) de células tumorais de mama do tipo luminal MCF-7 durante a transição epitélio-mesênquima.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar a expressão dos genes relacionados com a transição epitélio-mesênquima frente o tratamento ou não com o agonista DPN específico para o ER $\beta$ .
- Analisar o efeito do DPN na proliferação celular da MCF-7 sozinho e frente a EMT induzido por TGF- $\beta$ .
- Avaliar a expressão de ER $\alpha$  e ER $\beta$  em células MCF-7 durante o EMT induzido pelo TGF- $\beta$ .
- Averiguar o fenótipo das MCF-7 frente o estímulo com o agonista específico para o ER $\beta$ .

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Cultura Celular

As células MCF-7 e MDA-MB-231 foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cultivadas em meio RPMI 1640 contendo HEPES, bicarbonato de sódio, penicilina / estreptomicina e 10% de soro bovino fetal (SFB) (meio de cultura). Para ensaios, utilizou-se RPMI sem vermelho fenol, com os mesmos suplementos, a 5% de SFB tratado com carvão ativado e dextran para retirada de hormônios. Células foram cultivadas em um ambiente úmido a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Todos os ensaios foram realizados antes das células atingirem 80% de confluência.

### 4.2 Reagentes e Tratamentos

Os reagentes DPN, E2 e PHTPP foram adquiridos da SIGMA (St. Louis, MO, USA) e o TGF-β da PeproTech (Ribeirão Preto, SP. Brasil).

Os tratamentos foram feitos com a linhagem celular de câncer de mama MCF-7. As células foram submetidas a 24 horas de depleção hormonal com meio RPMI sem vermelho fenol e soro fetal bovino (5%) sem hormônios (protocolo de retirada de hormônios baseado em Dembinski, TC, Leung, CK, Shiu, RP (1985)). Após 24 horas, nos grupos TGF-β, foi adicionado o fator na concentração de 10 ng/mL e após 48hs o meio contendo TGF-β foi retirado e substituído por meio contendo DPN(1uM ou 10nM), E2(1uM) e TGF-β novamente, nas suas concentrações (grupo agonista + TGF-β). Nos grupos que não continham a citocina, foi realizado o mesmo protocolo, sem a adição de TGF-β. Após as 48hs finais, atingido o total de 96hs, as células foram utilizadas para os testes subsequentes (citometria de fluxo, MTT e RT-PCR).

### 4.3 Ensaio de proliferação/viabilidade

Para o ensaio de proliferação, as células com os respectivos tratamentos foram incubadas com uma solução contendo MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil

tetrazolium). Para preparar esta solução, 5 mg de MTT (SIGMA) foram diluídos em 1 ml de PBS, após a remoção do meio de tratamento foram adicionados 10  $\mu$ l desta solução a 5 mg/ mL e 90  $\mu$ l de meio contendo 10% de SFB. As células foram incubadas durante 4 horas a 37°C na ausência de luz para uma concentração final de 0,5 mg/mL. Para solubilização dos cristais de formazan, a solução de MTT foi retirada e foram adicionados 100  $\mu$ l de DMSO puro. A leitura de absorbância dos cristais de formazan, diretamente proporcional ao número de células viáveis, foi feita usando um espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm. Os testes foram realizados em triplicata.

#### 4.4 PCR em tempo real

As células da linhagem MCF-7 e MDA-MB-231 foram tratadas como descrito acima. O RNA total foi isolado e a expressão gênica dos alvos propostos foi avaliada por PCR em tempo real (qPCR). Para a expressão gênica, as células foram cultivadas em placas de 48 poços e subsequentemente, a reação qPCR foi realizada. O RNA total foi primeiro extraído usando o kit do Sistema de Isolamento de RNA SV Total (Promega, Fitchburg, WI, EUA) e o DNA complementar (cDNA) foi obtido a partir do RNA total usando o kit de Transcrição Reversa GoScript™ System (Promega), para um volume total de 20  $\mu$ l, e a reação de PCR foi feita de acordo com o protocolo do kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Fitchburg, WI, EUA). A curva de eficiência foi realizada para todos os primers : SLUG (ID: 395065), SNAIL (ID: 6615), VIMENTINA (ID: 103186320), ZEB1 (ID: 6935), TWIST1 (ID: 7291), RBFOX2 (ID: 23543), CICLINA D1 (ID: 595) e p21 (ID: 1026). A sequência dos primers foram desenhados com a feramenta Primer Quest tool (IDTDNA) e analisadas com BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Tabela 1).

Foi utilizado 100ng de cDNA por reação, em um total de 40 ciclos por reação. Os parâmetros das reações foram selecionados conforme as instruções do fabricante. A expressão semiquantitativa foi determinada pelo método 2- $\Delta\Delta Ct$  utilizando a  $\beta$ -2 microglobulina como gene endógeno.

#### 4.5 Citometria de fluxo

As células foram pré-tratadas como descrito no item 4.2 e foram plaqueadas  $1 \times 10^6$  células/poço em placa de cultura celular de 6 poços. Adicionou-se DPN (1  $\mu$ M), E2 (1 nM) e E2 associado

com DPN em triplicata, nos grupos necessários. Após 96 horas de tratamento, as células foram tripsinizadas e colocadas na estufa por 10 minutos. Elas foram então lavadas com meio RPMI e centrifugados durante 5 minutos a 2000 rpm. Após este passo, 5 µL dos anticorpos mouse anti-CD24 conjugado com FITC(catálogo nº 555427), e rat anti-CD49f conjugado com Alexa fluor 647(catálogo nº 562473) , todos anti-humano, foram adquiridos da BD Biosciences. As células foram analisadas no citômetro CytoFLEX( Beckman Coulter). Células de cada grupo sem as marcações (brancos) foram analisadas para detecção de auto-fluorescência. As amostras foram incubadas durante 30 minutos no escuro e lidas no citômetro. A quantificação das proteínas foi realizada utilizando o número de células em porcentagem de CD24(-) e CD49f(+). A análise dos dados foi realizada utilizando o programa Kaluza (Beckman Coulter, Inc.)

#### **4.6 Análise Estatística**

As análises estatísticas foram realizadas com os programas GraphPad Prism 6.0© (GraphPad Software Inc., 2007, San Diego, CA, USA). Para a comparação de mais de um grupo, foi utilizado o One-way ANOVA, com análise post hoc de Tukey e para comparação entre dois grupos, foi utilizado o teste t Student. O nível de significância estatística foi considerado se o alfa foi menor do que 0,05 ( $p<0,05$ ). Os gráficos estão representados como médias  $\pm$  erro padrão da média (SEM).

**Tabela 1:** Sequência dos primers para os genes alvos analisados por qPCR

GENE	LOCUS	SEQUÊNCIA DO PRIMER
RBFOX2	NM_001031695	FW 5'-CGA TGG CAA GGG TCT ATA TC -3' RV 5'-ACA CTC CCT CCT ACC TTG ATA A-3'
SNAI1	NM_005985	FW: 5'-CCA CGA GGT GTG ACT AAC TAT G-3' RV: 5'-ACC AAA CAG GAG GCT GAA ATA-3'
SNAI2	NM_003068	FW: 5'-CTC TCT CCT CTT TCC GGA TAC T-3' RV: 5'-GCT TGG ACT GTA GTC TTT CCT C -3'
TWIST1	NM_000474	FW: 5'-CGG AGA CCT AGA TGT CAT TGT TT-3' RV: 5'-ACG CCC TGT TTC TTT GAA TTT G-3'
VIM	NM_003380	FW: 5'-ACT AGA GAT GGA CAG GTT ATC A-3' RV: 5'- GTA GGA GTG TGC GTT GTT AAG-3'
ZEB1	NM_001128128	FW: 5'-CTC ACA TTC CTC ACT GCC TAA C -3' RV: 5'-GAG AAC ATA GCT GAG CTC CAT AAA-3'
B2-MICROGLOBULIN	NM_004048	FW: 5'-TAT CCA GCG TAC TCC AAA GA-3' RV: 5'-GGA TGA AAC CCA GAC ACA TAG-3' FW: 5' -TCACGCTTACCTC-3' RV: 5'-CTCTCGATAACACACAAACATCCA- 3'
CICLINA D1	NM_053056.2	FW: 5' -TCACGCTTACCTC-3' RV: 5'-CTCTCGATAACACACAAACATCCA- 3'
P21	NM_001291549.1	FW: 5'-CCAGCCTCTGGCATTAGAATTA-3' RV: 5'- CGGGATGAGGAGGCTTAAATA -3'

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Marcadores de EMT

Após tratamentos, foram avaliados alguns marcadores relacionados a EMT, dentre eles: *SLUG*, *SNAIL*, *TWIST1*, *ZEB1*, *VIM* e *RBFOX2*, este que é um fator de *splicing* altamente expresso em EMT e com atividade co-repressora de ERs. Os dados são apresentados em forma de expressão gênica desses marcadores pelo método  $2^{-\Delta\Delta ct}$ .

Pôde-se considerar que o tratamento com TGF-β aumentou todos os genes relacionados ao EMT nas MCF-7 (Figura 1). Observou-se também que o agonista de ERβ (DPN) reduziu a expressão gênica, independente do tratamento do TGF-β, de *SLUG*, *SNAIL* e *TWIST1*. No entanto, DPN aumentou a expressão gênica de ZEB 1 (Figura 1). Os transcritos de *RBFOX2* e *VIM* aumentaram após o tratamento com TGF-β, mas DPN reduziu a expressão dos mesmos apenas nas células estimuladas com TGF-β (Figura 1).

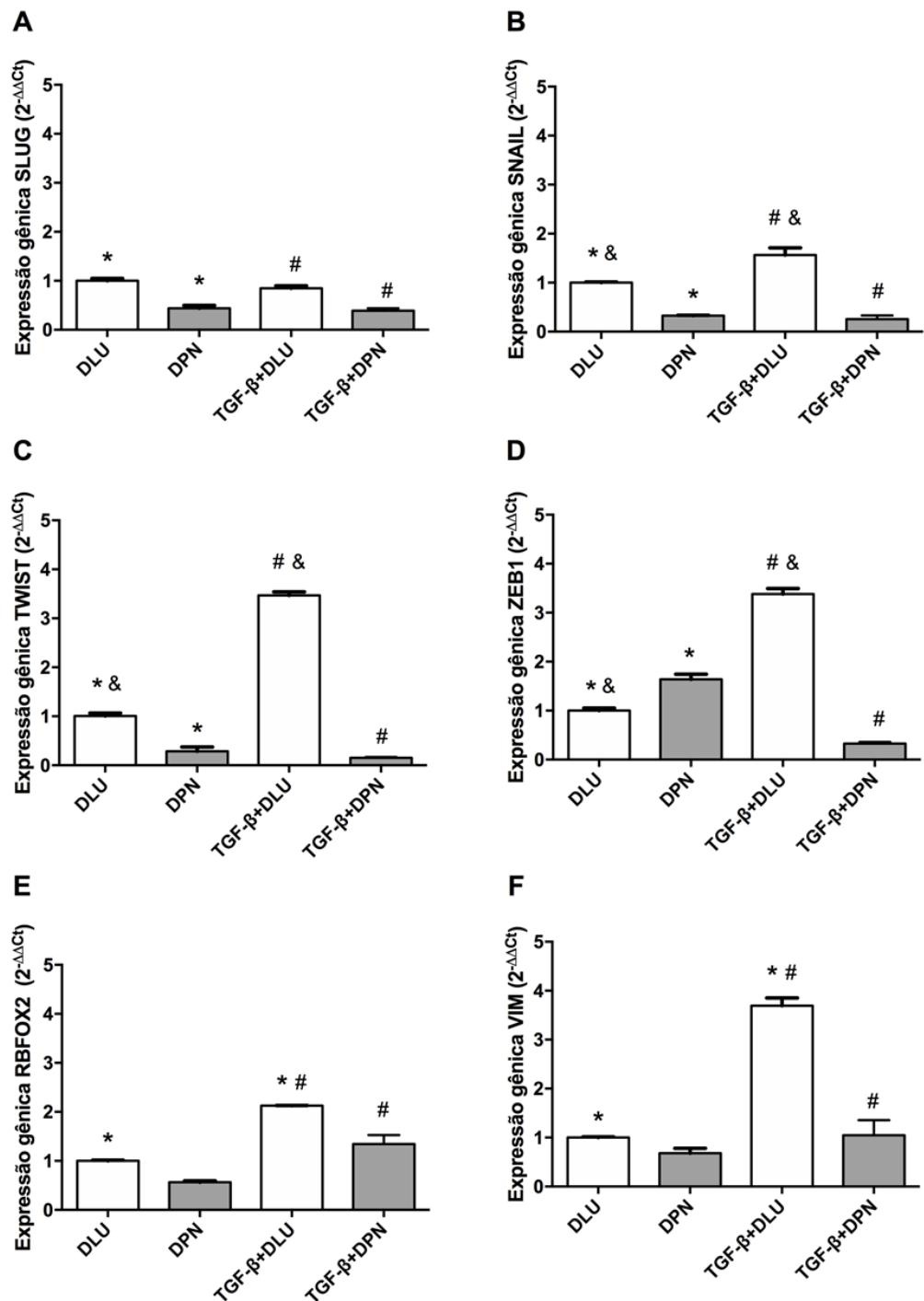


Figura 1 – Avaliação da expressão média da produção do transcrito dos genes SLUG (A), SNAIL (B), TWIST (C), ZEB1 (D), RBFOX2(E) e VIM (F) relacionados à transição epitélio mesênquima das MCF-7 tratadas ou não com 10ng/mL de TGF- $\beta$ b e 1 uM de DPN durante 96 horas. Os símbolos \*, #, e & representam diferença estatística ( $p<0,05$ ) entre os grupos correspondentes. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Vimentina (VIM).

## 5.2. Ciclo celular e proliferação

Após tratamentos, as células foram submetidas ao ensaio de MTT para que pudéssemos avaliar o efeito da ativação do ER $\beta$  na proliferação celular. A princípio, pôde-se observar que o TGF- $\beta$  diminui a proliferação celular e o DPN interfere parcialmente na diminuição da proliferação (Figura 2A).

Para entender como a ativação do ER $\beta$  influencia no ciclo celular, uma vez que ele alterou a proliferação das MCF-7 tratadas com TGF- $\beta$ , dois controladores de ciclo celular foram analisados. Sendo assim, pode-se observar que a expressão gênica de CCND1 diminuiu e P21 aumentou frente a DPN (Figuras 2B e 2C). Por outro lado, observou-se que TGF $\beta$  induz a expressão de p21 e quando as MCF-7 são submetidas ao tratamento com DPN, ela inibe completamente o efeito do aumento da expressão da p21 induzida pelo TGF $\beta$ , bem como aumenta a expressão de CCND1 (Figuras 2B e 2C).

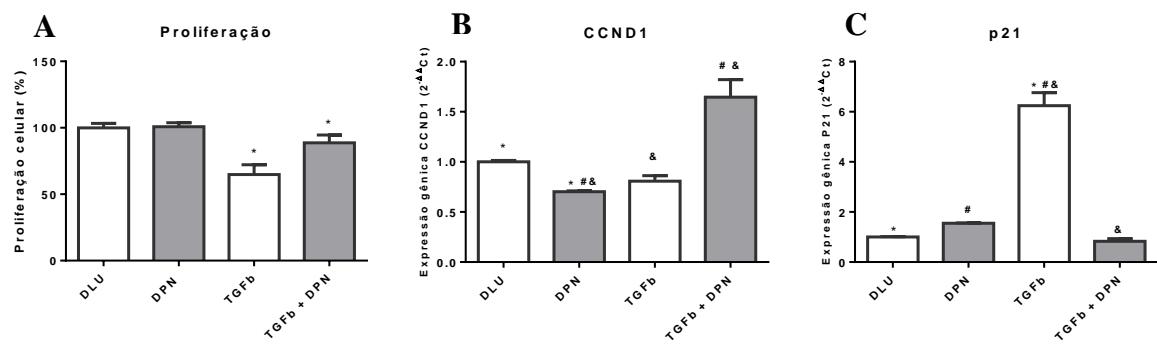


Figura 2 - Avaliação da proliferação por MTT(A) e expressão média da produção do transcrito dos genes CCND1 (B) e p21 (C) relacionados ao controle do ciclo celular das MCF-7 tratadas ou não com 10ng/ml de TGF- $\beta$  e 1uM de DPN durante 96 horas. Os símbolos \* e # representam diferença estatística ( $p<0,05$ ) entre os grupos correspondentes. Barras representam a médias  $\pm$  erro padrão da média (SEM).

## 5.3 Expressão gênica de *ESR1* e *ESR2*

Após tratamento com TGF- $\beta$ , foi observado um grande aumento na expressão de *ESR1*, sem alterar a expressão de *ESR2* (Figura 3A e 3B, respectivamente). Como controle da especificidade do primer utilizado nesse experimento, utilizou-se uma linhagem triplo negativa

denominada MDA-MB-231. Como esperado, essa célula não apresentou expressão de ESR1 enquanto que a mesma apresenta mensagem gênica do ESR2 (Figura 3C).

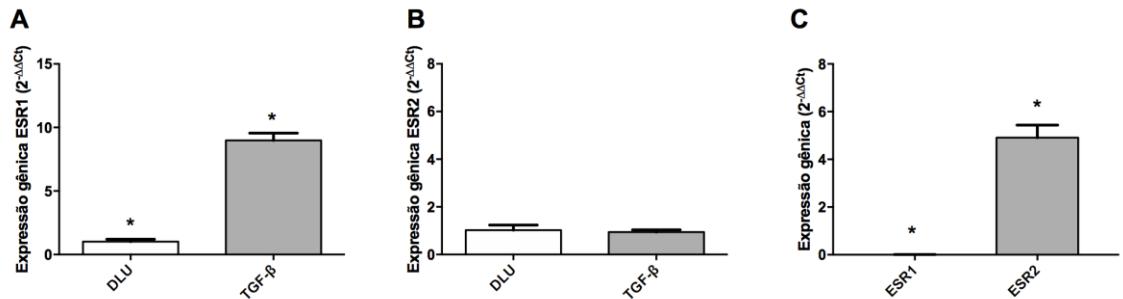


Figura 3 - Avaliação da expressão média da produção do transcrito dos genes ESR1(A) e ESR2 (B) relacionados ao controle do ciclo celular das MCF-7 tratadas ou não com 10ng/ml de TGF- $\beta$  durante 96 horas. MDA-MB-231 foi utilizada como controle da especificidade do primer utilizado (C). Os símbolos \* representam diferença estatística ( $p<0,05$ ) entre os grupos correspondentes. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão da média (SEM).

#### 5.4 Fenótipo de células luminais da mama: Marcação de CSCs

O fenótipo de CSCs de células da mama foi analisado pela marcação dos anticorpos CD24 e CD49f utilizando citometria de fluxo. Observou-se que o estradiol, não altera a porcentagem de CSC na cultura da MCF-7 (Figura 4), comportamento bem diferente quando a ação do ER $\beta$  é verificada quando é colocado seu agonista. Nesse cenário, há um aumento de aproximadamente 4 vezes o número de CSCs presentes entre as MCF-7 (Figura 4). Além disso, esse mesmo dado comprova que o E2 não interfere no aumento de CSCs induzida pelo DPN.

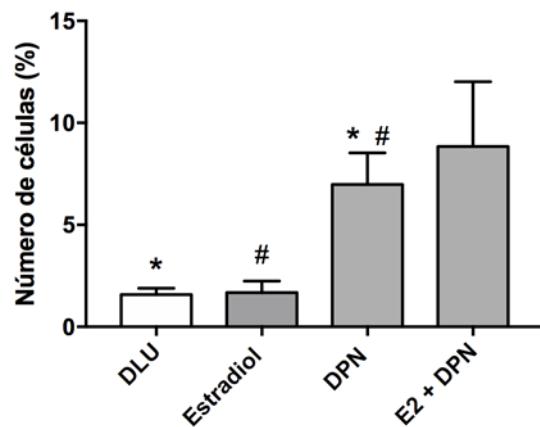


Figura 4 - Avaliação do número de células CD24-CD49f+ na população das MCF-7 tratadas ou não com DPN(1uM) e estradiol(1nM) por 96 horas. Os símbolos \* e # representam diferença estatística ( $p<0,05$ ) entre os grupos correspondentes. Barras médias  $\pm$  erro padrão da média (SEM).

## 6 DISCUSSÃO

O receptor de estrógeno beta (ER $\beta$ ) foi primeiramente identificado como um elemento que está diminuído durante a progressão tumoral no câncer de mama, sendo sugerido a ele uma ação anti-proliferativa, dessa forma, sendo um possível candidato para abordagens terapêuticas. No entanto, estudos recentes mostram um papel dicotômico ainda por ser elucidado: alguns estudos observam uma ação pró-tumoral e pró-proliferativa, enquanto outros, uma ação antitumoral e anti-proliferativa(KARAMOUZIS et al., 2016). Por isso, o estudo sistemático dos efeitos de ER $\beta$  são necessários para determinar em quais condições ele é um potencial alvo terapêutico, ou como ele pode ser modulado (agonismo/antagonismo) dependendo do tipo de tumor em questão.

A ação antiproliferativa de ER $\beta$  foi estudada e o silenciamento do gene codificante para esse receptor leva a um aumento na proliferação em células da linhagem MCF-10 A (células epiteliais de mama triplo negativas não transformadas) e em MCF-7, as duas na ausência do ligante E2 (MALLEPELL et al., 2006). Também, os agonistas de ER $\beta$  diminuem a proliferação celular em MCF-10 A, na presença de E2, mas somente em concentrações muito altas(PAECH et al., 1997). Ma e colaboradores também demonstraram que DPN não afetou a proliferação de células das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231(MA et al., 2017)

Neste estudo foi observado que a ação do agonista DPN levou de forma semelhante à literatura ao fenômeno conhecido como MET e contrariamente à literatura, não alterou a proliferação. Quando analisado os genes envolvidos no ciclo celular, foi demonstrado que há um contexto de inibição da proliferação. Em linhagens de câncer luminal, como a MCF-7, é observada uma ação anti-proliferativa e anti-tumoral, como por exemplo, promover MET(ZHENG, N. et al., 2016) (SOTOCA et al., 2008) (MAK et al., 2013; VOUTSADAKIS, 2016).

Apesar dos aparentes efeitos inibitórios de DPN na indução da EMT, logo na progressão tumoral, causada pelo TGF- $\beta$ , esse composto reverte o efeito anti- proliferativo causado por essa citocina. No câncer de mama, o TGF $\beta$  também possui uma ação dicotômica: em fases iniciais no câncer do tipo luminal, bem como pré-câncer, ele age como um potente fator antitumoral com base na sua ação citostática (aumento de inibidores da proliferação celular), mas em fases avançadas, bem como em câncer triplo-negativo, favorece a progressão e induz EMT(ZARZYNSKA, 2014). Nos ensaios deste trabalho, foi observado eficientemente que o TGF $\beta$  exerceu efeito citoestático, o que está de acordo com a literatura (GUERRIN et al., 1992;

SUN et al., 1994). Intrigantemente, foi observado aumento da proliferação na adição de DPN aos grupos tratados com TGF $\beta$ , sendo esse um dado novo na literatura. Dado contrastante pelo fato de que ER $\beta$  regula os componentes da via do TGF-beta, resultando na supressão de EMT, que é um fenômeno pró- proliferativo, pela regulação positiva de proteínas morfogenética do osso (BMP), especificamente a proteína BMP7(CHANG et al., 2006; VOUTSADAKIS, 2016).

Nos tratamentos com TGF- $\beta$  houve uma maior expressão da proteína p21(proteína do ciclo celular que previne a progressão do ciclo), enquanto que quando associado com DPN a expressão da proteína diminuía. Liao e colaboradores, reportaram que o ER $\alpha$  regula o ciclo celular pela supressão de p53/p21 e regula positivamente o antígeno relacionado a proliferação Ki-67 para promover proliferação em células luminais MCF-7 (LIAO et al., 2014), mecanismo de ação que possivelmente pode ser utilizado também por ER $\beta$ .

A linhagem MCF-7 é uma linhagem fenotipicamente heterogênea(NUGOLI et al., 2003), sendo composta por três compartimentos (subpopulações): células luminais maduras, células progenitoras luminais e CSCs, sendo as duas primeiras as mais abundantes. Diferentemente da literatura, não foi observado aumento de CSCs na presença de E2 (FILLMORE et al., 2010), somente quando adicionado ao DPN ou nos grupos DPN por si só, corroborando com a literatura (MA et al., 2017). Apesar de que o número de células BSCs podem ser expandidas por meio da incubação com estradiol(ASSELIN-LABAT et al., 2010; RUSSO et al., 2010), mesmo sendo considerados ER- $\alpha$  negativas, fato que pode ser explicado por estimulação parácrina(FILLMORE et al., 2010; MALLEPELL et al., 2006), esse efeito não foi visto nos nossos resultados , visto que no tratamento com estradiol , não foi visto aumento dessa população de células comparadas ao controle (diluente).

Durante a progressão de carcinoma de mama *in situ* para invasivo, há uma grande perda de ER $\alpha$  (ALLRED; BROWN; MEDINA, 2004) e como citado anteriormente, células altamente invasivas (alto índice de EMT) que invadem linfonodo possuem níveis elevados de ER $\beta$  e simultaneamente altos níveis proliferativos (NOVELLI et al., 2008). Interessantemente, a atividade pró-tumoral e pró-proliferativa de ER $\beta$  é observada principalmente no caso de linhagens de câncer de mama triplo-negativo, nas quais foi descoberto que ER $\beta$  é capaz de ativar as vias MEK/ERK e levar a EMT (PIPERIGKOU et al., 2017). As CSCs de MCF-7 possuem um fenótipo de célula triplo-negativa (FILLMORE et al., 2010), além de que essas células tronco cancerígenas são marcadas pelo EMT (MAY et al., 2011), possuindo portanto um fenótipo mesenquimal. Essas informações sugerem que a seleção e expansão de CSCs se

associam com a progressão e a um mau prognóstico, já que EMT é um processo antecedente a metástase, e a ativação de ER $\beta$  mostrou um aumento subtipo-específico de CSCs na linhagem estudada, dado que não é compatível com o que foi encontrado na avaliação dos marcadores de EMT na qPCR.

## 7 CONCLUSÃO

O ER $\beta$  possui um papel dicotômico na linhagem MCF-7, sendo um inibidor da EMT, ação que não vai de encontro ao desenvolvimento do tumor e, ao mesmo tempo induz o aparecimento de CSCs, células que sabidamente podem estar associadas com a falha terapêutica, remissão e mudança no fenótipo do tumor dificultando seu tratamento.

## REFERÊNCIAS

ALLRED, D. C.; BROWN, P.; MEDINA, D. The origins of estrogen receptor alpha-positive and estrogen receptor alpha-negative human breast cancer. **Breast Cancer Res**, v. 6, n. 6, p. 240-5, 2004. <https://doi.org/10.1186/bcr938>

ASSELIN-LABAT, M. L. et al. Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling. **Nature**, v. 465, n. 7299, p. 798-802, Jun 10 2010. <https://doi.org/10.1038/nature09027>

BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. **Mol Aspects Med**, v. 21, n. 6, p. 167-223, Dec 2000. [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(00\)00007-8](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(00)00007-8)

CÂNCER, I. N. D. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil 2016**

CAPPELLETTI, V. et al. Modulation of estrogen receptor-beta isoforms by phytoestrogens in breast cancer cells. **Int J Oncol**, v. 28, n. 5, p. 1185-91, May 2006.

CASTANO, Z. et al. The bed and the bugs: interactions between the tumor microenvironment and cancer stem cells. **Semin Cancer Biol**, v. 22, n. 5-6, p. 462-70, Oct 2012. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2012.04.006>

CHANG, E. C. et al. Impact of estrogen receptor beta on gene networks regulated by estrogen receptor alpha in breast cancer cells. **Endocrinology**, v. 147, n. 10, p. 4831-42, Oct 2006. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0563>

CHANTZI, N. I. et al. Estrogen receptor beta 2 is associated with poor prognosis in estrogen receptor alpha-negative breast carcinoma. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 139, n. 9, p. 1489-98, Sep 2013. <https://doi.org/10.1007/s00432-013-1467-4>

CIANFROCCA, M.; GOLDSTEIN, L. J. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. **Oncologist**, v. 9, n. 6, p. 606-16, 2004. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.9-6-606>

COTRIM, C. Z. et al. Estrogen receptor beta growth-inhibitory effects are repressed through activation of MAPK and PI3K signalling in mammary epithelial and breast cancer cells. **Oncogene**, v. 32, n. 19, p. 2390-402, May 09 2013. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.261>

DAI, X.; CHEN, A.; BAI, Z. Integrative investigation on breast cancer in ER, PR and HER2-defined subgroups using mRNA and miRNA expression profiling. **Sci Rep**, v. 4, p. 6566, Oct 23 2014. <https://doi.org/10.1038/srep06566>

DAIRKEE, S. H. et al. Monoclonal marker that predicts early recurrence of breast cancer. **Lancet**, v. 1, n. 8531, p. 514, Feb 28 1987. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(87\)92129-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(87)92129-5)

FILLMORE, C. M. et al. Estrogen expands breast cancer stem-like cells through paracrine FGF/Tbx3 signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 50, p. 21737-42, Dec 14 2010. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007863107>

FISCHER, K. R. et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. **Nature**, v. 527, n. 7579, p. 472-6, Nov 26 2015. <https://doi.org/10.1038/nature15748>

GRUVBERGER-SAAL, S. K. et al. Estrogen receptor beta expression is associated with tamoxifen response in ERalpha-negative breast carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 7, p. 1987-94, Apr 01 2007. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1823>

GUAN, X. Cancer metastases: challenges and opportunities. **Acta Pharm Sin B**, v. 5, n. 5, p. 402-18, Sep 2015. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.07.005>

GUERRIN, M. et al. Antiproliferative effect of phorbol esters on MCF-7 human breast adenocarcinoma cells: relationship with enhanced expression of transforming growth-factor-beta 1. **Biochim Biophys Acta**, v. 1137, n. 1, p. 116-20, Oct 06 1992. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(92\)90108-N](https://doi.org/10.1016/0167-4889(92)90108-N)

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 04 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

HARTMAN, J. et al. Estrogen receptor beta inhibits angiogenesis and growth of T47D breast cancer xenografts. **Cancer Res**, v. 66, n. 23, p. 11207-13, Dec 01 2006. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0017>

HONMA, N. et al. Clinical importance of estrogen receptor-beta evaluation in breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen therapy. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 22, p. 3727-34, Aug 01 2008. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.2968>

KARAMOUZIS, M. V. et al. Targeting Androgen/Estrogen Receptors Crosstalk in Cancer. **Trends Cancer**, v. 2, n. 1, p. 35-48, Jan 2016. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2015.12.001>

KONTOS, S. et al. Expression of ER $\beta$  and its co-regulators p300 and NCoR in human transitional cell bladder cancer. **Urologia internationalis**, v. 87, n. 2, p. 151-158, 2011. <https://doi.org/10.1159/000324262>

KSIAZKIEWICZ, M.; MARKIEWICZ, A.; ZACZEK, A. J. Epithelial-mesenchymal transition: a hallmark in metastasis formation linking circulating tumor cells and cancer stem cells. **Pathobiology**, v. 79, n. 4, p. 195-208, 2012. <https://doi.org/10.1159/000337106>

KUIPER, G. G. et al. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 12, p. 5925-30, Jun 11 1996. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.12.5925>

LATTRICH, C. et al. Estrogen receptor beta agonists affect growth and gene expression of human breast cancer cell lines. **Steroids**, v. 78, n. 2, p. 195-202, Feb 2013. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2012.10.014>

LEUNG, Y. K. et al. Estrogen receptor-beta and breast cancer: translating biology into clinical practice. **Steroids**, v. 77, n. 7, p. 727-37, Jun 2012. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2012.03.008>

LIAO, X. H. et al. Estrogen receptor alpha mediates proliferation of breast cancer MCF-7 cells via a p21/PCNA/E2F1-dependent pathway. **FEBS J**, v. 281, n. 3, p. 927-42, Feb 2014. <https://doi.org/10.1111/febs.12658>

MA, R. et al. Estrogen Receptor beta as a Therapeutic Target in Breast Cancer Stem Cells. **J Natl Cancer Inst**, v. 109, n. 3, p. 1-14, Mar 01 2017. <https://doi.org/10.1093/jnci/djw236>

MAK, P. et al. Estrogen receptor beta sustains epithelial differentiation by regulating prolyl hydroxylase 2 transcription. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 12, p. 4708-13, Mar 19 2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221654110>

MALLEPELL, S. et al. Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor alpha is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 7, p. 2196-201, Feb 14 2006. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510974103>

MALZAHN, K. et al. Biological and prognostic significance of stratified epithelial cytokeratins in infiltrating ductal breast carcinomas. **Virchows Arch**, v. 433, n. 2, p. 119-29, Aug 1998. <https://doi.org/10.1007/s004280050226>

MAY, C. D. et al. Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: a dangerously dynamic duo in breast cancer progression. **Breast Cancer Res**, v. 13, n. 1, p. 202, Feb 08 2011. <https://doi.org/10.1186/bcr2789>

MC DERMOTT, I. et al. Comparison of electromyographic recordings during labor in women with an anterior or posterior placenta. **Am J Perinatol**, v. 27, n. 4, p. 325-6, Apr 2010. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1241731>

MURPHY, L. C.; LEYGUE, E. The role of estrogen receptor-beta in breast cancer. **Semin Reprod Med**, v. 30, n. 1, p. 5-13, Jan 2012. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1299592>

NOVELLI, F. et al. A divergent role for estrogen receptor-beta in node-positive and node-negative breast cancer classified according to molecular subtypes: an observational prospective study. **Breast Cancer Res**, v. 10, n. 5, p. R74, 2008. <https://doi.org/10.1186/bcr2139>

NUGOLI, M. et al. Genetic variability in MCF-7 sublines: evidence of rapid genomic and RNA expression profile modifications. **BMC Cancer**, v. 3, p. 13, Apr 24 2003. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-3-13>

OGAWA, S. et al. The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 243, n. 1, p. 122-6, Feb 04 1998. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7893>

OMOTO, Y. et al. Estrogen receptor (ER) beta1 and ERbetacx/beta2 inhibit ERalpha function differently in breast cancer cell line MCF7. **Oncogene**, v. 22, n. 32, p. 5011-20, Aug 07 2003. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206787>

PAECH, K. et al. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. **Science**, v. 277, n. 5331, p. 1508-10, Sep 05 1997. <https://doi.org/10.1126/science.277.5331.1508>

PIPERIGKOU, Z. et al. Estrogen receptor beta as epigenetic mediator of miR-10b and miR-145 in mammary cancer. **Matrix Biol**, Aug 08 2017. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.08.002>

RAKHA, E. A. et al. Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. **J Pathol**, v. 208, n. 4, p. 495-506, Mar 2006. <https://doi.org/10.1002/path.1916>

ROSIN, G. et al. Oestrogen receptors beta1 and betacx have divergent roles in breast cancer survival and lymph node metastasis. **Br J Cancer**, v. 111, n. 5, p. 918-26, Aug 26 2014. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.398>

RUSSO, J. et al. Estrogen induced breast cancer is the result in the disruption of the asymmetric cell division of the stem cell. **Horm Mol Biol Clin Investig**, v. 1, n. 2, p. 53-65, Jan 01 2010. <https://doi.org/10.1515/hmbci.2010.011>

SKLIRIS, G. P. et al. Expression of oestrogen receptor-beta in oestrogen receptor-alpha negative human breast tumours. **Br J Cancer**, v. 95, n. 5, p. 616-26, Sep 4 2006. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603295>

SORLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 19, p. 10869-74, Sep 11 2001. <https://doi.org/10.1073/pnas.191367098>

SORLIE, T. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 14, p. 8418-23, Jul 08 2003. <https://doi.org/10.1073/pnas.0932692100>

SOTIRIOU, C. et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 18, p. 10393-8, Sep 02 2003. <https://doi.org/10.1073/pnas.1732912100>

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**, v. 105, n. 2, p. 303-11, Oct 2008. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn141>

SUN, L. et al. Expression of transforming growth factor beta type II receptor leads to reduced malignancy in human breast cancer MCF-7 cells. **J Biol Chem**, v. 269, n. 42, p. 26449-55, Oct 21 1994.

TREECK, O. et al. Estrogen receptor beta exerts growth-inhibitory effects on human mammary epithelial cells. **Breast Cancer Res Treat**, v. 120, n. 3, p. 557-65, Apr 2010. <https://doi.org/10.1007/s10549-009-0413-2>

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**, v. 5, n. 1, Jan 19 2016. <https://doi.org/10.3390/jcm5010011>

ZARZYNSKA, J. M. Two faces of TGF-beta1 in breast cancer. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 141747, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/141747>

ZHENG, N. et al. ERbeta up-regulation was involved in silibinin-induced growth inhibition of human breast cancer MCF-7 cells. **Arch Biochem Biophys**, v. 591, p. 141-9, Feb 01 2016. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.01.002>

ZHENG, X. et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. **Nature**, v. 527, n. 7579, p. 525-530, Nov 26 2015. <https://doi.org/10.1038/nature16064>