

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Avaliação do papel do ER $\beta$  na proliferação de uma linhagem luminal (MCF-7) e na linhagem triplo negativa (MDA-MB-231) de câncer de mama

Fernanda Carvalho de Souza

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG

Julho – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Avaliação do papel do ER $\beta$  na proliferação de uma linhagem luminal (MCF-7) e na linhagem triplo negativa (MDA-MB-231) de câncer de mama

Fernanda Carvalho de Souza

Marcelo José Barbosa Silva – Orientador

Felipe Andrés Cordero da Luz – Co-orientador

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG

Julho – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Avaliação do papel do ER $\beta$  na proliferação de uma linhagem luminal (MCF-7) e na linhagem triplo negativa (MDA-MB-231) de câncer de mama

Fernanda Carvalho de Souza

Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva – Orientador

Felipe Andrés Cordero da Luz – Co-orientador

Instituto de Ciências Biomédicas

Homologado pela coordenação do Curso

de Biotecnologia em \_\_/\_\_/\_\_

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos

Uberlândia – MG

Julho – 2018

*“Me ensinaram a sonhar. Disseram que o mundo pode ser um melhor lugar e que tudo na vida é uma questão de acreditar, não pode desacreditar.”*

*Depois do Fim – Sattivus*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus. Tão importante quanto, aos meus pais que me deram a vida, muito apoio, palavras de carinho e abraços de aconchego por todo meu tempo de vida. Agradeço também aos meus irmãos, sobrinhos, cunhadas e cunhados. Especialmente à minha irmã Dani que amo incondicionalmente, obrigada por ser tão maravilhosa, pelos conselhos e ajudas no fim do mês, obrigada por existir na minha vida e ser minha irmã, eu amo vocês!

Aos meus amigos de vida que estiveram muito presentes em choros e comemorações desde quando fui aprovada. A Serena por me perseguir, por escolha, desde a terceira série, ao Vinícius que conheci na faculdade e hoje ser minha pedra esmeralda, e Felipe que também é tão importante quanto, amo vocês Vegas do meu coração. Bia e Létz, obrigada por todo carinho e amizade, sou muito grata por compartilhar parte dos meus dias com vocês, contem comigo sempre. Minhas Amadas!

Aos amigos que fiz no laboratório, Pultz, Pedro, Dani, Isadora, Bruna, que vou guardar para toda vida com muito carinho, obrigada por tanta ajuda, ensinamentos, cervejas, abraços, paciência com minha ansiedade e indecisões, foram momentos que contribuíram muito para meu crescimento, amo muito vocês!

A UFU e todos os professores por todo conhecimentos através de vocês. Especialmente ao professor Marcelo por aceitar me orientar, aguentar minhas crises há quase 3 anos de orientação, agradeço imensamente por todo apoio. Felipe, obrigada por existir e aceitar me co-orientar, me ensinar tanto e ouvir minha playlist arrasadora, ter muita paciência comigo, obrigada por tudo.

## RESUMO

O câncer de mama é o principal câncer causador de morte em mulheres no mundo. O receptor de estrógeno beta (ER $\beta$ ) é um dos receptores de estrógeno que pode ser encontrado na mama, mas que até então não é utilizado como um marcador preditivo de prognóstico. Alguns estudos mostram um papel dicotômico ainda por ser elucidado de ER $\beta$ , estes observam uma ação pró-tumoral e pró proliferativa e outros estudos mostram uma ação contrária. Culturas de células tumorais de mama, como a MCF-7 e MDA-MB-231 foram utilizadas neste trabalho com o objetivo avaliar o efeito dicotômico do ER $\beta$  frente aos modulares específicos DPN e PHTPP e não específico E2. Na linhagem MCF-7, os tratamentos com DPN diminuem a taxa proliferativa, aumenta a expressão de p21 e diminui de CCND1, o E2 aumenta a proliferação celular e na presença de DPN essa ação é antagonizada, fazendo com que ER $\beta$  se comporte de forma anti-proliferativa nessa linhagem. Na linhagem MDA-MB-231, DPN aumenta a proliferação celular e expressão de CCND1 e p21, explicando parcialmente o efeito proliferativo do DPN. Mas ainda são necessários outros estudos acerca do papel de ER $\beta$  na em células tumorais para melhor compreensão do papel dicotômico desse receptor a partir destes resultados.

**Palavras-chaves:** proliferação, ER $\beta$ , DPN

## LISTAS DE ABREVIATURAS

Akt – Proteína Quinase B

BSA – Albomina de Soro Bovino

CCND1 – Ciclina D1

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

CFSE - Carboxifluoresceína Succinimidil Éster

CO<sub>2</sub> – Gás carbônico

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPN – Diarilpropionitrilo

E<sub>2</sub> – 17 $\beta$  estradiol

ERK 1/2 – Quinases relacionadas ao sinal extracelular 1/2

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

HER2 – Receptor do fator de crescimento epidermal humano 2

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

NF-kB2 – Factor nuclear kappa B2

p21 – Proteína 21

p65 – Proteína 65

PBS – Tampão fosfato salino

PFA – Parafarmaldeído

PPD – P-fenilenodiamina

PR – Receptor de progesterona

PI3K – Fosfatidilinositol 3-quinase

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

SFB – Soro fetal bovino

UV – Ultra Violeta



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
<b>1.1 Justificativa .....</b>	<b>2</b>
2. OBJETIVOS .....	3
<b>2.1 Objetivos Gerais .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>3</b>
3. METODOLOGIA .....	3
<b>3.1 Cultura celular .....</b>	<b>3</b>
<b>3.2 Tratamento das células .....</b>	<b>4</b>
<b>3.3 Microscopia Confocal.....</b>	<b>4</b>
<b>3.4 Ensaio de MTT.....</b>	<b>5</b>
<b>3.5 Marcação por CFSE.....</b>	<b>6</b>
<b>3.6 Ciclo Celular .....</b>	<b>7</b>
<b>3.7 PCR em tempo real.....</b>	<b>7</b>
<b>3.8 Análises .....</b>	<b>8</b>
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	8
<b>4.1 Imunomarcção de ER<math>\beta</math> por microscopia confocal.....</b>	<b>8</b>
<b>4.2 Avaliação da proliferação na linhagem MCF-7.....</b>	<b>9</b>
<b>4.3 Ciclo celular e expressão gênica de p21 ciclina D1 na linhagem MCF-7.....</b>	<b>10</b>
<b>4.4 Avaliação da proliferação, ciclo celular e expressão gênica de p21 e ciclina D1 na linhagem MDA-MB-231.....</b>	<b>12</b>
5. CONCLUSÃO .....	14
6. REFERÊNCIAS.....	15

## 1. INTRODUÇÃO

Câncer é um termo aplicado a um grupo de doenças que tem como principal característica a proliferação celular descontrolada (FERNALD; KUROKAWA, 2013). O câncer de mama é o principal câncer causador de morte 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 (TORRE et al., 2015). A estimativa de novos casos para o ano de 2018 no Brasil é de 59.700 (INCA).

Clinicamente, esta doença é subdividida em três categorias terapêuticas básicas: positivo para o receptor de estrógeno, HER2/neu amplificado e o câncer de mama triplo-negativo (ER-, PR- e não superexpressão HER2/neu) (KOBOLDT et al., 2012).

O sistema de classificação por imunohistoquímica dos cânceres de mama levam em consideração apenas o receptor alfa de estrógeno ( $ER\alpha$ ) e desconsidera o receptor beta ( $ER\beta$ ), que até então não tinham suas funções muito bem conhecidas (GROSS; YEE, 2002). Outros estudos já mostraram que  $ER\alpha$  é um promotor tumoral e  $ER\beta$  é considerado seu antagonista atuando como supressor de tumor (SKLIRIS et al., 2008).

Em células com superexpressão ectópica de  $ER\beta$ , a ação de agonistas de  $ER\alpha$  só leva a proliferação celular na presença de um inibidor de  $ER\beta$ , demonstrando assim, a importância da proporção desses receptores ( $ER\alpha/ER\beta$ ) na célula (COVALEDA et al., 2008). Um estudo demonstrou que o agonista de ambos os receptores de estrógeno 17 $\beta$ -estradiol (E2), induziu a proliferação de células tumorais que expressam  $ER\alpha$ . No entanto, em células não tumorais que expressam níveis fisiológicos de  $ER\alpha$  e  $ER\beta$ , o E2 inibiu a proliferação celular, reforçando que a proporção  $ER\alpha/ER\beta$  é fundamental (COTRIM et al., 2012). O  $ER\beta$  tem um importante papel antitumoral em condições comuns do epitélio sadio, porém, autores já demonstraram atividade pró-tumoral do receptor, isso porque a função

antitumoral de ER $\beta$  não ocorre de forma esperada em células tumorais, ou essa função é impedida por outros fatores (THOMAS et al., 2012).

Muitos grupos reportaram a expressão das isoformas de ER $\beta$  em tecidos normais e também em carcinoma mamário. Como vários outros genes, *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 de ER $\beta$  (LEUNG et al., 2012; MURPHY; LEYGUE, 2012).

Em um estudo foi observado que ER $\beta$ 2, associado a ER $\alpha$ , está associado a um bom prognóstico e resposta à terapia endócrina (SHAABAN et al., 2008). Contrariamente, 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 sua associação com a fosforilação de c-Jun e da translocação nuclear da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B2, bem como por estar associado a invasão linfonodal e recidiva (CHANTZI et al., 2013). Também, foi observado que perda de ER $\beta$ 1 e presença de ER $\beta$ 2 no tumor primário se associa com alto risco de invasão linfonodal (ROSIN et al., 2014) e ER $\beta$ 1, por expressão ectópica, atua como supressor de tumor em células de câncer de mama triplo-negativo, como a MDA-MB-231, pelo aumento da degradação de fatores de crescimento que envolvem as vias ERK1/2 e PI3k/AKT (THOMAS et al., 2012).

## **1.1 Justificativa**

O ER $\beta$  foi primeiramente identificado como um elemento diminuído durante a progressão tumoral na mama, sendo sugerido uma ação anti-proliferativa e, possivelmente um candidato a abordagens terapêuticas. No entanto, estudos recentes mostram um papel dicotômico ainda por ser elucidado, pois estes observam uma ação pró-tumoral e pró-proliferativa, enquanto outros estudos mostram uma ação contrária, antitumoral e anti-

proliferativa. Em vista disso, são necessários mais estudos para esclarecer em quais circunstâncias o ER $\beta$  tem atividade anti ou pró-proliferativa.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos Gerais**

Avaliar o efeito dicotômico do ER $\beta$  frente a moduladores específicos (DPN: agonista; PHTPP:antagonista) e 17 $\beta$ -estradiol (E2) em uma linhagem de câncer de mama ER $\alpha^+$  (MCF-7) e em uma triplo-negativa (MDA-MB-231).

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a expressão de ER $\beta$  na linhagens estudadas;
- Avaliar a proliferação frente ao tratamentos;
- Analisar o ciclo celular frente aos tratamentos;
- Mensurar a expressão gênica de p21 e CCND1 frente aos tratamentos.

## **3. METODOLOGIA**

### **3.1 Cultura celular**

As células de linhagens MDA- MB-231 e MCF-7 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich Louis, Missouri, EUA) acrescido de HEPES, bicarbonato de sódio, penicilina/estreptomicina e suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) (Thermo Fischer, Waltham, Massachusetts, EUA). Para ensaios, o meio de cultivo não contém vermelho fenol, que é usado como indicador de pH, e 5% de SFB sem hormônio.

As duas 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 e antes dos plaqueamentos foram depletados os hormônios contidos do meio de cultivo para

posteriores experimentos por trocar o meio para RPMI 1640 sem vermelho fenol suplementado com SFB tratado com carvão ativado e dextran para depleção dos hormônios.

### **3.2 Tratamento das células**

Para avaliar a proliferação por MTT (Sigma) e CFSE (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), ciclo celular e marcadores de proliferação por PCR foi usado o agonista DPN (Sigma) e o antagonista PHTPP (4-[2-Phenyl-5,7-bis(trifluoromethyl) pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]phenol) (Sigma) do ER $\beta$ , ambos na concentração 10 nM, bem como o agonista de ER não específico 17 $\beta$ -estradiol (E2) (Sigma) a 10 nM. Em todos os tratamentos foi utilizado DMSO (Sigma) como veículo. Para cada experimento, após o plaqueamento foi dado o tempo de 24 horas para as células aderirem a placa e, após isso realizado os tratamentos. Todos os tratamentos foram realizados utilizando meio RPMI 1640 sem vermelho fenol e SFB sem hormônio. Decorridos 72 horas para os ensaios de MTT, CFSE e ciclo celular e 48 horas para expressão gênica, as células foram avaliadas de acordo como descrito posteriormente na metodologia deste trabalho.

### **3.3 Microscopia Confocal**

A expressão do receptor nas linhagens estudadas foram estudadas por microscopia confocal. Para este ensaio foi utilizada placa de 24 poços, foi colocado 1 lamínula circular (Zeiss LM 510 Meta; 40x) dentro de cada poço e posteriormente exposta a luz ultravioleta (UV) durante 15 minutos com a tampa removida. Após isso, foi colocado  $1 \times 10^5$  células por poço em meio RPMI 1640 sem vermelho fenol acrescido de 5% de SFB sem hormônio. Após 24 horas para as células aderirem às lamínulas, foi removido o meio de cultura e lavado duas vezes com PBS + BSA 1%, Tween-20 0,05%. A seguir, as lamínulas foram incubadas por 20 minutos com PBS + PFA 4% para fixação das células. Após o tempo, foi lavado duas vezes e

adicionado PBS + BSA 1% + saponina 0,1% por 20 minutos para permeabilização celular. A seguir, foi lavado duas vezes e incubado por 60 minutos com tampão de bloqueio PBS + BSA 4%.

Para marcação, as células foram lavadas duas vezes após o tempo de incubação e adicionado 200 uL de anticorpo primário anti-ER $\beta$  (clone 14C8, Novus Biologicals, Littleton, Colorado, EUA) em PBS + BSA 1% + saponina 0,1%, a placa foi lacrada e incubada por 24 horas a 4 °C. Posteriormente o sobrenadante foi retirado e as células lavadas duas vezes. Foi adicionado 200uL de anticorpo secundário anti-IgG de camundongo produzido em cabras 1:64 (Sigma) e marcadores (TO-PRO 1:500 Thermo Fischer, faloidina 1:300 Sigma) devidamente diluídos em PBS + BSA 1% + saponina 0,1% e incubado por 1 hora em câmara úmida e escura. Após a incubação as lamínulas foram cuidadosamente removidas da placa, lavadas e secadas por gravidade para não agredir as células aderidas. A face contendo as células foram colocadas em lâminas contendo uma gota de PPD (Sigma) Após este procedimento, as lâminas foram submetidas a leitura em microscópio invertido confocal (LSM 510 Meta, UFU-ICBIM).

### **3.4 Ensaio de MTT**

Para o ensaio de proliferação por MTT (3-[(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide]) (Sigma), foram semeadas em placa de 96 poços  $1 \times 10^4$  células por poço com meio RPMI 1640 sem vermelho fenol e 5% SBF sem hormônio. Dado o tempo para as células aderirem e o tempo dos tratamentos descritos anteriormente, o meio foi removido da cultura e incubado com solução contendo MTT. Para o preparo da solução, 5 mg da solução em pó MTT foi diluída em 1 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS). Foram adicionados 100  $\mu$ L de meio de RPMI 1640 sem vermelho fenol acrescido de 10% de SFB sem hormônio e 10% desta solução de MTT a cada poço e, em seguida incubado por 4

horas a 37° C. Após este período de incubação, 100 uL de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS), diluído em 50% água e 50% dimetilformamida, foram adicionados em cada poço da placa para que os cristais de formazan gerados pelo metabolismo mitocondrial das células fossem solubilizados.

A leitura da absorbância da solubilização dos cristais de formazan está relacionada à quantidade de células viáveis e indica proliferação celular dependendo do valor obtido em relação ao grupo controle. A leitura da absorbância foi feita utilizando um espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm utilizando o equipamento GloMax (Promega, Fitchburg, Wisconsin, EUA), os testes foram realizados em quintuplicata e foram obtidos valores de densidade óptica (OD) de cada poço.

### **3.5 Marcação por CFSE**

Para avaliação da proliferação por CFSE as células foram tripsinizadas das garrafas de cultura e lavadas com PBS. Posteriormente ressuspensas em meio RPMI 1640 sem vermelho fenol a uma concentração de  $5 \times 10^5$  células/mL. Foi adicionado CFSE a uma concentração final de 5  $\mu$ M. As células foram incubadas por 15 minutos a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub> em homogeneização constante. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e a incorporação do CFSE no tempo 0 horas foi avaliada por citometria no equipamento CytoFlex (Beckman Coulter, Brea, Califórnia EUA). Após a incorporação, foram semeadas  $5 \times 10^4$  por poço em placas de 12 poços, com meio RPMI 1640 sem vermelho fenol e 5% SFB sem hormônio. Após 24 horas, o meio foi trocado pelo meio contendo os diferentes tratamentos e as células foram cultivadas por 72 horas. Passado o tempo de tratamento, as células foram tripsinizadas e avaliado o decaimento da fluorescência do CFSE por citometria seguindo a avaliação inicial de 0 horas. Os dados foram interpretados com o programa FlowJo 10.0.7 (FlowJo, LLC, Ashland, Oregon, EUA)

### **3.6 Ciclo Celular**

Para avaliação do ciclo celular, foram semeadas em placa de 6 poços  $2 \times 10^5$  células por poço com meio RPMI 1640 sem vermelho fenol e 5% SBF sem hormônio. Dado o tempo para as células aderirem e o tempo dos tratamentos descritos anteriormente, as células foram tripsinizadas e retiradas da placa com seus respectivos tratamentos. Após este, estas foram lavadas com PBS e posteriormente FIXADA OU PERMEABILIZADA permeabilizadas com solução de NP-40 a 0,1% BSA, e incubadas por 30 minutos de 2 a 8 °C. Estas foram lavadas novamente com PBS e adicionados 100 µL de RNase (1 µg/mL) (Promega) seguido de 30 minutos de incubação de 2 a 8 °C, posteriormente foram adicionados 100 µL de iodeto de propídio (PI, 1µg/mL) (Sigma) e incubado por 30 minutos de 2 a 8 °C. As amostras foram lavadas e ressuspensas em 100µL de PBS e analisadas por citometria de fluxo no equipamento CytoFlex (Beckman Coulter, Brea, Califórnia, EUA). Os dados foram interpretados com o programa FlowJo 10.0.7 (FlowJo LLC, Ashland, Oregon, EUA).

### **3.7 PCR em tempo real**

As células da linhagem MCF-7 e MDA-MB-231 foram submetidas aos tratamentos descritos 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, após 48 horas de tratamento, foram removidas para extração de RNA total pelo kit de extração automático de Maxwell RSA simplyRNA (Promega, Fitchburg, Wisconsin, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA complementar (cDNA) foi obtido a partir do RNA total usando o kit de Transcrição Reversa GoScript™ (Promega), para um volume total de 20 µl, e a reação de PCR foi feita de acordo com o protocolo do kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Fitchburg, Wisconsin, EUA). A curva de eficiência foi realizada para todos os primers (CICLINA D1 e p21). 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>) (Anexo 1).

Foi utilizado 20 ng 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  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  utilizando a  $\beta$ -2 microglobulina como gene endógeno.

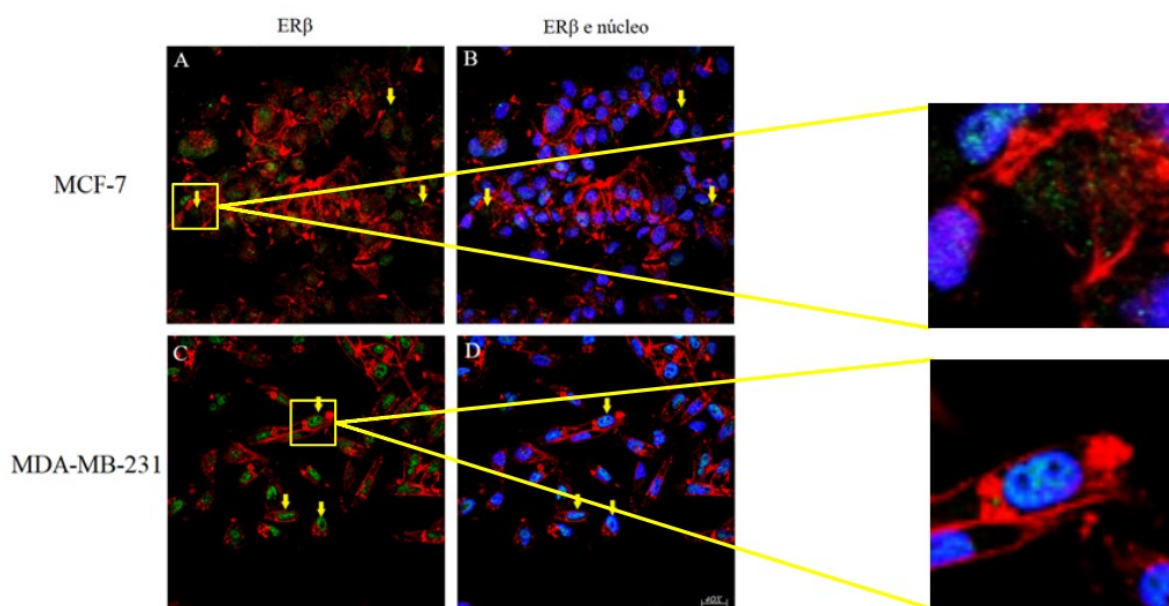
### **3.8 Análises**

As análises estatísticas foram realizadas com programa GraphPad Prism 6 (San Diego, Califórnia, EUA). O teste One-Way ANOVA, com *post hoc* de Tukey, foi aplicado, considerando diferença estatística o  $p < 0,05$ .

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Imunomarcação de ER $\beta$ por microscopia confocal**

As imagens de microscopia confocal mostram que as duas linhagens celulares estudadas neste trabalho expressam ER $\beta$  (Figuras 1 e 2). O clone do anticorpo utilizado (14C8) tem a capacidade de reconhecer as isoformas ER $\beta$ 1 e ER $\beta$  (FUQUA et al., 2003) o pode ser observado na Figura 1 (A e B), há uma distribuição nuclear e citoplasmático de ER $\beta$  na MCF-7 e predominantemente nuclear na MDA-MB-231 (Figura 1-C e D). Os próximos resultados mostram uma modulação diferente do receptor frente ao agonista de ER $\beta$  nessas duas linhagens estudadas, bem como o tratamento de E2+DPN na MCF-7 e PHTPP na MDA-MB-231. Logo, sugere-se que a atividade pró-proliferativa ou anti-proliferativa depende das isoformas dominantes de ER $\beta$  e bem como da expressão de ER $\alpha$ .

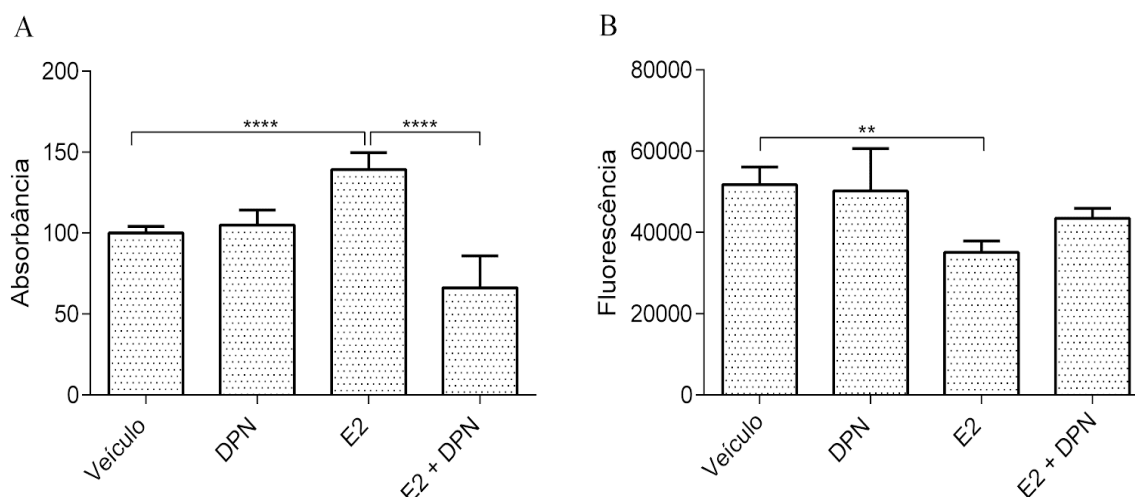


**Figura 1:** Em verde, ER $\beta$  (clone 14C8), em vermelho actina e em azul núcleo. Imagens A e C sem o canal do núcleo e B e D. Expressão citoplasmática na linhagem MCF-7 e predominantemente nuclear na linhagem MDA-MB-231.

#### 4.2 Avaliação da proliferação na linhagem MCF-7

Na linhagem luminal MCF-7 observamos alteração por MTT (Figura 2-A) apenas nos tratamentos com E2 ou E2 + DPN, estes resultados mostram que o E2 aumenta a proliferação celular nessa linhagem e quando tratado com E2 + DPN a ação proliferativa do E2 é diminuída. Ao avaliar a proliferação por marcação com CFSE, o E2 leva ao decaimento do CFSE em relação ao grupo controle, indicando maior taxa proliferativa (Figura 2-B) e aumento da expressão de ciclina D1 (CCND1) (Figura 3-D). Os resultados aqui apresentados corroboram com dados da literatura, uma vez que esta linhagem é ER $\alpha$ <sup>+</sup> e este receptor é bem descrito como pró-proliferativo, sendo E2 um modulador de ER não seletivo, este aumenta a proliferação celular via ER $\alpha$  (TREECK et al., 2010). Apesar dos dados apresentados por CFSE não serem significativos no tratamento com E2 + DPN em relação ao grupo controle, ao que se refere o agonista diminuir a atividade proliferativa do E2, foi visto na proliferação avaliada por MTT que DPN antagoniza a ação do E2. De acordo com Leung et al. 2012, em

linhagens que expressam ER $\alpha$ , a atividade proliferativa causada por este receptor é antagonizada na presença de ER $\beta$ . Isso ocorre porque ER $\beta$  tem a capacidade de dimerizar com ER $\alpha$ , funcionando como um dominante negativo da indução mediada por ER $\alpha$  de genes promotores de crescimento, como a CCND1 (LIU et al., 2002).

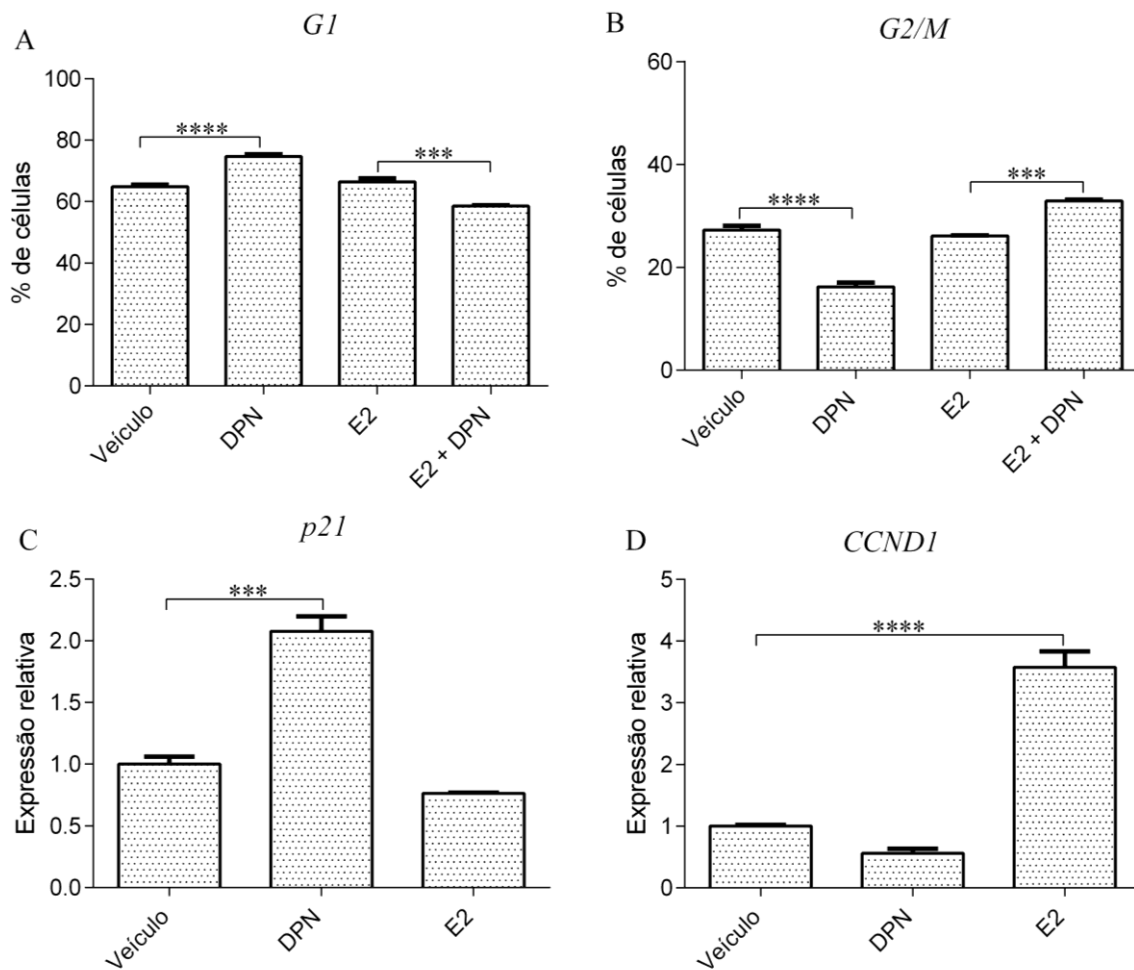


**Figura 2:** Proliferação detectada por MTT (A), proliferação detectada com CFSE (B) na linhagem MCF-7. Os tratamentos ocorreram por 72 horas nas concentrações de DPN 10nM, E2 10nM e PHTPP 10nM. As análises foram feitas usando o teste de Tukey. As barras representam média  $\pm$  SEM ( $n=5$ ) para MTT e ( $n=6$ ) para CFSE. No gráfico A e B o tratamento com E2 aumenta a proliferação celular e no tratamento com DPN + E2 a proliferação foi diminuída, indicando que DPN foi capaz de diminuir a atividade proliferativa do E2.

### 4.3 Ciclo celular e expressão gênica de p21 ciclina D1 na linhagem MCF-7

Na análise do ciclo celular foi observado que o tratamento com DPN na MCF-7 aumenta a porcentagem de células na fase G1 no ciclo celular (Figura 3-A) e diminui em G2/M após este tratamento, juntamente com o aumento da expressão de p21 (Figura 3-C), proteína que inibe a transição da fase G1 para fase S do ciclo celular (CARROLL et al., 2002). No tratamento com o E2, na fase G1 não há diferença significativa em relação ao grupo controle de forma a diminuir a porcentagem de células nessa fase. Entretanto, no

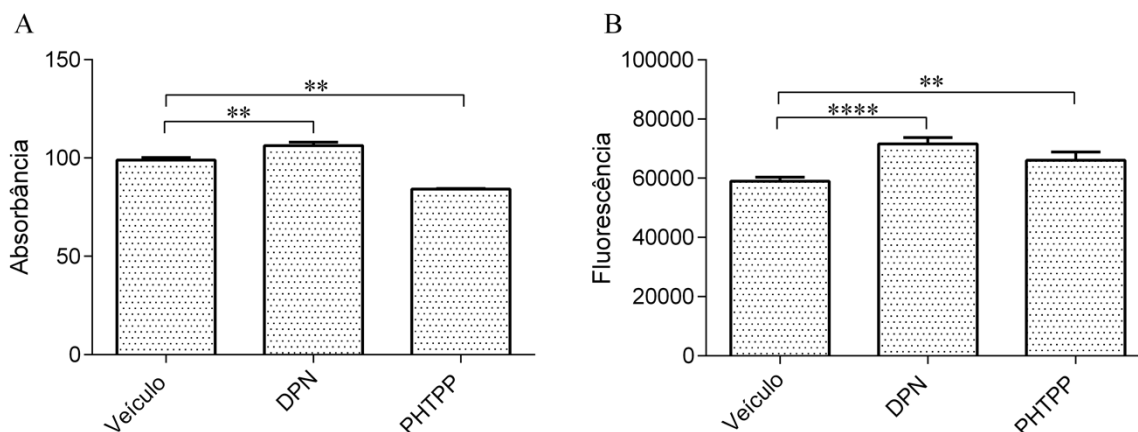
tratamento com E2 + DPN, há diminuição de células em G1 e aumento em G2/M, resultados que não foram como esperados de acordo com a literatura estudada e os resultados obtidos anteriormente.



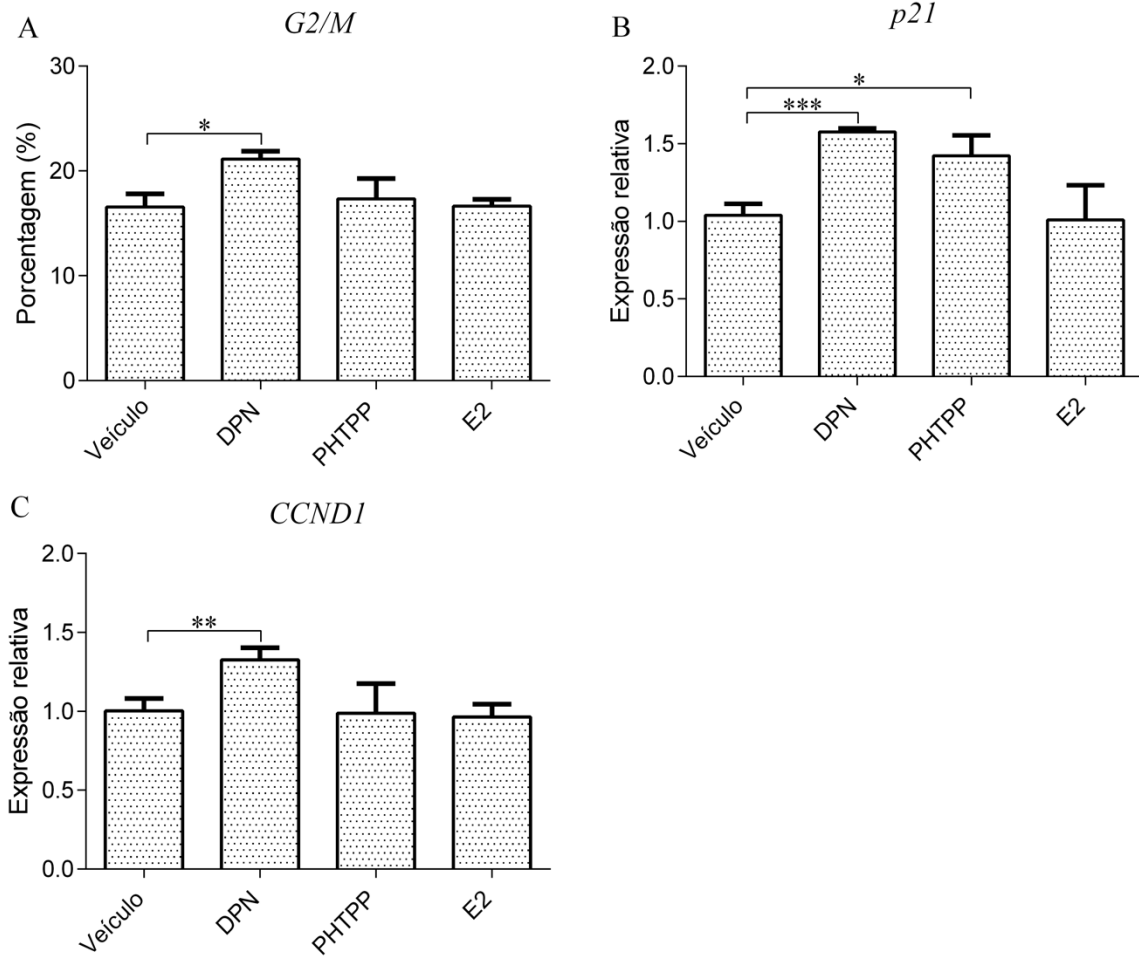
**Figura 3:** Ciclo celular após modulação de ER $\beta$  fase G1 (A) e G2/M (B), expressão gênica de p21 (C) e ciclina D1 (D) na linhagem MCF-7. Os tratamentos ocorreram por 72 e 48 horas, para ciclo celular e expressão gênica respectivamente, nas concentrações de DPN 10nM, E2 10nM e PHTPP 10nM. As barras representam média  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). Há aumento e diminuição de células no tratamento com DPN nas fases G1 e G2/M, gráficos A e B, respectivamente. Concordantemente, aumento da expressão de p21 no mesmo tratamento no gráfico C. Aumento da expressão de CCND1 no tratamento com E2, gráfico D.

#### 4.4 Avaliação da proliferação, ciclo celular e expressão gênica de p21 e ciclina D1 na linhagem MDA-MB-231

Na linhagem MDA-MB-231, observamos aumento da proliferação celular em relação ao grupo controle no tratamento com DPN e o contrário com PHTPP no experimento de proliferação com MTT (Figura 4-A). Os resultados nos ensaios de proliferação por CFSE com essa linhagem correlacionam esses resultados (Figura 4-B), uma vez que o DPN leva ao decaimento de CFSE e PHTPP ao contrário, como em MTT. Estudos descrevem que ER $\beta$ 2 em linhagens de câncer de mama triplo-negativo e em linhagens de câncer de próstata é associado a um prognóstico ruim (CHANTZI et al., 2013; DEY et al., 2012) e, que existe uma correlação positiva entre a superexpressão de ER $\beta$  em linhagens triplo-negativas e elevada proliferação (JENSEN et al., 2001; O'NEILL et al., 2004). Foi observado que em câncer de mama triplo-negativo há predomínio das isoformas ER $\beta$ 2 e ER $\beta$ 5 (SONG et al., 2017). Essa característica, associada à ausência de ER $\alpha$ , pode levar a um comportamento diferente dos moduladores farmacológicos de ER $\beta$ . Apesar de se observar aumento da expressão gênica de p21, houve aumento da expressão de ciclina D1 por DPN, enquanto que por PHTPP houve apenas aumento de expressão de p21 (Figura B-C). Esses dados explicam parcialmente o efeito de DPN e PHTPP na proliferação desta linhagem celular.



**Figura 4:** Proliferação detectada por MTT (A), proliferação detectada com CFSE (B) na linhagem MDA-MB-231. Os tratamentos ocorreram por 72 horas nas concentrações de DPN 10nM e PHTPP 10nM. As análises foram feitas usando o teste de Tukey. As barras representam média  $\pm$  SEM ( $n=5$ ) para MTT e ( $n=6$ ) para CFSE. O gráfico A mostra aumento na proliferação quando as células são tratadas com DPN, o mesmo não é visto no gráfico B. No tratamento com PHTPP há diminuição da proliferação, gráficos A e B.



**Figura 6:** Ciclo celular após modulação de ER $\beta$  fase G2/M (A), expressão gênica de p21 (B) e ciclina D1 (C) na linhagem MDA-MB-231. Os tratamentos ocorreram por 72 e 48 horas, para ciclo celular e expressão gênica respectivamente, nas concentrações de DPN 10nM, E2 10nM e PHTPP 10nM. As barras representam média  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). Houve aumento de células na fase G2/M no tratamento com DPN, gráfico A. Aumento na expressão de p21 e CCND1 quando tratado com DPN, gráficos B e C, respectivamente. No tratamento com PHTPP também aumentou a expressão de p21, gráfico B.

## 5. CONCLUSÃO

Através da modulação farmacológica, é evidente o papel dicotômico de ER $\beta$  quando analisamos a proliferação celular, pois a proliferação ocorreu de forma diferente dependendo do tipo da linhagem celular. Contudo, a partir destes resultados vimos que para a linhagem MCF-7 (ER $\alpha^+$ ), o ER $\beta$  se comporta de forma anti-proliferativa e para a linhagem MDA-MB-231 (ER $\alpha^-$ ), o ER $\beta$  se comporta de forma pro-proliferativa quando moduladas pelo agonista DPN.

## 6. REFERÊNCIAS

CARROLL, J. S. et al. Mechanisms of growth arrest by c-myc antisense oligonucleotides in MCF-7 breast cancer cells: implications for the antiproliferative effects of antiestrogens. **Cancer research**, v. 62, n. 11, p. 3126-31, 6 jun. 2002.

CHANTZI, N. et al. Estrogen receptor beta 2 is associated with poor prognosis in estrogen receptor alpha-negative breast carcinoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 139, n. 9, p. 1489-98, 2013.

COTRIM, C. 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. 2390-2402, 2012.

COVALEDA, A. et al. Influence of Cellular ER $\alpha$ /ER $\beta$  Ratio on the ER $\alpha$ -Agonist Induced Proliferation of Human T47D Breast Cancer Cells. **Toxicological Sciences**, v. 105, n. 2, p. 303-311, 2008.

DEY, P. et al. Estrogen receptors 1 and 2 have opposing roles in regulating proliferation and bone metastasis genes in the prostate cancer cell line PC3. **Molecular endocrinology**, v. 26, n. 12, p. 1991-2003, 2012.

FERNALD, K.; KUROKAWA, M. Evading apoptosis in cancer. **Trends in Cell Biology**, v. 23, n. 12, p. 620-633, 2013.

FUQUA, S. A. et al. Estrogen receptor protein in human breast cancer: correlation with clinical tumor parameters. **Cancer research**, v. 63, n. 10, p. 2434-2439, 2003.

GROSS, J.; YEE, D. How does the estrogen receptor work? **Breast Cancer Research**, v. 4, n. 2, p. 62, 2002.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativas para o ano de 2018 das taxas brutas e ajustadas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária. Rio de Janeiro, 2018.



JENSEN, E. et al. Estrogen receptors and proliferation markers in primary and recurrent breast cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 26, p. 15197-15202, 2001.

KOBOLDT, D. et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 61-70, 2012.

LEUNG, Y.-K. et al. Estrogen receptor-beta and breast cancer: Translating biology into clinical practice. **Steroids**, v. 77, n. 7, p. 727-737, 2012.

LIU, M.-M. et al. Opposing Action of Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$  on Cyclin D1 Gene Expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 27, p. 24353-24360, 2002.

MURPHY, L.; LEYGUE, E. The Role of Estrogen Receptor- $\beta$  in Breast Cancer. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 30, n. 01, p. 05-13, 2012.

O'NEILL, P. et al. Wild-type oestrogen receptor beta (ER $\beta$ 1) mRNA and protein expression in Tamoxifen-treated post-menopausal breast cancers. **British Journal of Cancer**, v. 91, n. 9, p. 6602183, 2004.

ROSIN, G. et al. Oestrogen receptors  $\beta$ 1 and  $\beta$ cx have divergent roles in breast cancer survival and lymph node metastasis. **British Journal of Cancer**, v. 111, n. 5, p. 918, 2014.

SHAABAN, A. et al. Nuclear and Cytoplasmic Expression of ER $\beta$ 1, ER $\beta$ 2, and ER $\beta$ 5 Identifies Distinct Prognostic Outcome for Breast Cancer Patients. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 16, p. 5228-5235, 2008.

SKLIRIS, G. et al. Estrogen receptor alpha negative breast cancer patients: Estrogen receptor beta as a therapeutic target. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 109, n. 1-2, p. 1-10, 2008.

SONG, W et al. ER $\beta$ 1 inhibits metastasis of androgen receptor-positive triple-negative breast cancer by suppressing ZEB1. ... of **Experimental & ...**, 2017.

THOMAS, C. et al. ER $\beta$ 1 represses basal-like breast cancer epithelial to mesenchymal transition by destabilizing EGFR. **Breast Cancer Research**, v. 14, n. 6, p. 1-15, 2012.

TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87-108, mar. 2015.

TREECK, O. et al. Estrogen receptor beta exerts growth-inhibitory effects on human mammary epithelial cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 120, n. 3, p. 557-565, 2010.

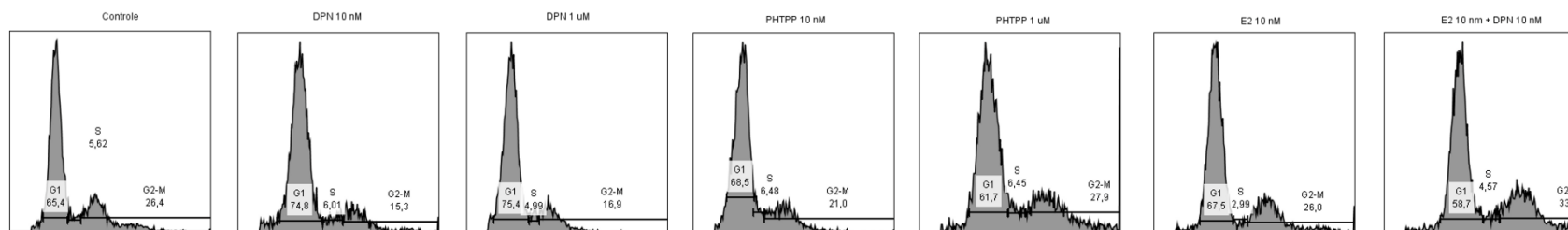
## ANEXOS

### Anexo 1. Sequência dos primers para os genes alvos analisados por qPCR

Gene	Sequência do primer
Ciclina D1	FW: 5' -TCACGCTTACCTC-3' RV: 5'-CTCTCGATACACACAACATCCA- 3'
p21	FW: 5'-CCAGCCTCTGGCATTAGAATTA-3' RV: 5'- CGGGATGAGGAGGCTTTAAATA -3'

## Anexo 2: Gráficos do ciclo celular após tratamentos em MCF-7 e MDA-MB-231

### MCF-7



### MDA-MB-231

