

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 04/03/2018.

Caracterização dos efeitos celulares do Mono-N-butil-ftalato
(MBP) mediados pela via estrogênica não-genômica ativada por
GPER1 (GPR30) em células tumorais prostáticas humanas

André Rebelo Peixoto

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia Celular Estrutural e Funcional*.

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Caracterização dos efeitos celulares do Mono-N-butil-ftalato
(MBP) mediados pela via estrogênica não-genômica ativada por
GPER1 (GPR30) em células tumorais prostáticas humanas

André Rebelo Peixoto

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Câmpus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de Pós-Graduação
em Biologia Geral e Aplicada, Área de
concentração *Biologia Celular Estrutural
e Funcional*.

**BOTUCATU – SP
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Peixoto, André Rebelo.

Caracterização dos efeitos celulares do
Mono-N-butil-ftalato (MBP) mediados pela via estrogênica
não-genômica ativada por GPER1 (GPR30) em células tumorais
prostáticas humanas / André Rebelo Peixoto. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Wellerson Rodrigo Scarano

Capes: 20601000

1. Metabólitos. 2. Estrógenos - Receptores. 3. Proteínas
G. 4. Desreguladores endócrinos. 5. Próstata - Câncer. 6.
Linhagem (Genética).

Palavras-chave: GPER1; LNCaP; câncer de próstata;
desregulador endócrino; mono-butil-ftalato.

Aos anônimos que - mesmo que não consigam ler isso -
com seu suor contribuíram e possibilitaram
esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Eu sou grato a todos os benefícios –todos os que fui capaz de reconhecer-, na esperança de que essa gratidão seja o primeiro passo para retribuí-los.

Aos meus pais, por me conceberem curioso e nutrirem meu intelecto de todas as formas, o que me manteve nesse estado de inquieto desbunde pelos mistérios do mundo. Fica na conta de vocês a minha eterna angústia por respostas. Foram vocês que me fadaram ao sofrimento do conhecimento e me afastaram da benção profunda que é a ignorância. Com vosso feitiço tornaram este filho um eterno aluno à procura de iluminação, e por isso eu os agradeço.

Ao meu irmão, por me ensinar, quando pequeno, que a vida não é justa e que, por mais que abundem os motivos para alegrias, a tristeza e a dificuldade estão sempre à espreita. Com você aprendi a amar as adversidades e, ainda mais importante, a amar a quem nos causa sofrimento. Não é na facilidade que a plenitude existe. Certamente a minha vida não seria completa, muito menos divertida, sem te ter por perto.

Aos meus amigos agradeço pela companhia ubíqua. Por expandirem minha visão de mundo diminuíram minha solidão. As nossas diferenças me enriquecem como indivíduo e seu amor me torna menos obscuro para mim mesmo. Com vocês aprendi que são muitas caras-metades que fazem uma pessoa. Se eu sou feito de mais de uma metade é porque tenho vocês.

Aos meus colegas de laboratório, que transformaram as tardes de trabalho em momentos prazerosos e me motivaram a voltar no dia seguinte. O apoio e confiança que recebi de vocês foram imprescindíveis para que conseguisse dar vida às bizarras elucubrações concebidas pela minha mente.

Ao meu orientador - por quem falo a todos os professores que foram capazes de despertar em mim o prazer em saber -, por guiar meus primeiros passos na academia e por iluminar as trevas do meu raciocínio prolixo. Por ter mantido com seu pupilo uma amizade tão enriquecedora e produtiva. Sou grato pela liberdade que tive ao seu lado.

À FAPESP pelos anos de financiamento que viabilizaram esse projeto (Processo 2014/09191-6).

Que esse trabalho traga benefícios à sociedade que o aceitou, e que esses sejam a continuação da minha –infindável- retribuição a todos vocês.

Minha sincera gratidão

Sumário

1. Lista de abreviaturas.....	7
2. Resumo.....	9
3. Introdução	13
3.1. Câncer de próstata	13
3.2. Ação hormonal no câncer de próstata.....	13
3.3. Desreguladores endócrinos.....	14
3.4. Os ftalatos.....	15
3.5. O GPER1.....	16
3.6. Justificativas do estudo.....	19
3.7. Objetivo geral	20
3.8. Objetivos específicos.....	20
4. Materiais e métodos.....	21
4.1. Cultivo Celular e Tratamentos.....	21
4.2. Teste de citotoxicidade do MBP em LNCaP	23
4.3. Ensaio de migração celular - <i>transwell</i>	24
4.4. <i>Western Blotting</i>	26
4.5. Avaliação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR)	28
5. Resultados	30
5.1. Teste do micoplasma	30
5.2. Teste de citotoxicidade do MBP em LNCaP	31
5.3. Ensaio de migração celular - <i>transwell</i>	32
5.4. Avaliação da expressão gênica (RT-qPCR) e da expressão proteica (<i>Western Blotting</i>)	34
5.4.1. Avaliação tempo-resposta da via do GPER1.....	35
5.4.2. Avaliação dos efeitos tardios sobre a transcrição gênica e ativação de proteínas da via do GPER1	42
5.4.3. Avaliação de proteínas relacionadas à progressão tumoral.....	50
6. Discussão	54
7. Conclusão.....	60
8. Anexos	61
8.1. Anexo 1.....	61
8.2. Anexo 2.....	62
9. Referências bibliográficas	63

1. LISTA DE ABREVIATURAS

AKT1 – proteína quinase B 1
AR – receptor de andrógenos
B2M – gene da beta 2 microglobulina
BBP – benzo-butil-ftalato
BSA – albumina do soro bovino
cAMP – adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
c-Fos – proto-oncogene c-Fos
CT – *cycle threshold*
DAPI - 4'6'-diamidino-2-fenilindol
DBP - di-n-butil-ftalato
DDT - 1,1,1-tricloro-2,2-di(4-clorofenil)etano
DEHP – di(etil-hexil)ftalato
DMSO - dimetilsulfóxido
DNA – ácido desoxirribonucleico
E₂ – 17β-estradiol
EGFR – receptor de fator de crescimento epidermal
ER – receptor de estrógenos
EREs – elementos responsivos esteroidais
EROs – espécies reativas de oxigênio
ERK – quinases reguladas por sinais extracelulares (i.e. MAPK)
G1 – agonista de GPER1
G15 – antagonista de GPER1
GPER1 - receptor estrogênico acoplado à proteína G 1
HPRT1 – gene que codifica a hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase 1
HUGO – *Human Genome Organisation*
IARC – *International Agency for Research on Cancer*
INCA – Instituto Nacional de Câncer
IPCS – Programa Nacional em Segurança Química
LNCaP - células de câncer de próstata humana andrógeno-dependentes
MAPK – proteína-quinases ativadas por mitógenos

MBP - mono-n-butil-ftalato

MCF-7 – linhagem celular humana de câncer de mama ER positiva

MEHP – mono-2-etilhexil-ftalato

MMP – metaloproteinases de matriz

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

P53 – proteína supressora de tumor P53

pAKT – proteína quinase B fosforilada

pAR – receptor de andrógenos fosforilado

PC3 – linhagem celular humana de câncer de próstata andrógeno-independente

PCR – reação em cadeia da polimerase

PDK - quinases dependentes de fosfatidilinositol

pERK – quinases reguladas por sinais extracelulares fosforiladas (i.e. pMAPK)

PI3K – fosfatidilinositol 3-quinase

PIK3CA – gene que codifica a subunidade catalítica alfa da proteína quinase fosfatidilinositol(4,5)-bisfosfato 3

PIP₃ – fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato

PKC – proteína quinase C

pMAPK – proteína-quinases ativadas por mitógenos fosforiladas

pP53 – proteína supressora de tumor P53 fosforilada

PRKCA – gene que codifica a proteína quinase C alfa

PVC – policloreto de vinila

Ras – proteína pequena ligadora de guanosina trifosfato intrínseca

RIN - *RNA Integrity Number*

RNA – ácido ribonucleico

RT-qPCR – reação em cadeia da polimerase em tempo real após transcrição reversa

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SFB – soro fetal bovino

SKBr3 – linhagem celular humana de câncer de mama ER negativa

SphK – esfingosina-quinase

SRC – proto-oncogene tirosina-quinase SRC

TBST - tampão Tris-HCl contendo 0,1% de Tween 20

2. RESUMO

O mono-n-butil-ftalato (MBP), metabólito ativo do di-n-butil-ftalato (DBP), plastificante usualmente utilizado em produtos industrializados, incluindo dispositivos médicos, plásticos flexíveis e cosméticos, tem sido descrito como um desregulador endócrino com função estrogênica e anti-androgênica dependendo da dose e do período de exposição, interferindo principalmente com o desenvolvimento do sistema genital masculino. Acredita-se que os efeitos de alguns desreguladores endócrinos sejam mediados pelo receptor estrogênico não clássico acoplado à proteína G - GPER1 (GPR30). Tendo em vista a problemática mundial com relação à degradação dos materiais plásticos e sua dispersão no meio ambiente e diante de evidências que mostraram que os ftalatos exercem efeitos sobre o desenvolvimento e maturação da próstata aumentando a incidência de lesões inflamatórias e displásicas em roedores, este estudo teve por objetivo avaliar a ação do MBP sobre células cancerígenas prostáticas dependentes de andrógeno (LNCaP), modulando a atividade do GPER1 (através de seu antagonista, G15). As células da linhagem LNCaP, mantidas em meio de cultura RPMI, foram expandidas e tratadas em estufa com 5% de CO² e atmosfera úmida a 37°C. A dose de MBP a ser utilizada foi de 10 µM, selecionada após o teste de citotoxicidade do MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2yl]-2,5-difenil brometo de tetrazolina). Dessa forma foram constituídos os seguintes protocolos de tratamento: Controle: RPMI + DMSO 0,03%; MBP: 10 µM de MBP diluído em DMSO (0,03%) + RPMI; G15: 8 µM de G15 diluído em DMSO (0,03%) + RPMI; M+G: 8 µM de G15 + 10 µM de MBP (diluídos em DMSO 0,03%) + RPMI. Para o tratamento conjunto de MBP com G15 (M+G) o antagonista de GPER1 foi acrescentado ao meio 30 minutos antes do MBP. As células foram incubadas segundo os tratamentos descritos em quatro tempos diferentes: 15 minutos, 45 minutos, 3 horas e 12 horas. Após a exposição, seguiu-se o processamento das células para extração de RNA e proteínas, destinadas às técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR) e *Western blot*, respectivamente. Em todos os tempos foram avaliados o perfil da expressão proteica para GPER1, pErk1/Erk2, PI3K e pAKT para a avaliação global do processo de ativação das vias mediadas por GPER1. Após essa etapa, e evidenciando um efeito rápido do MBP na ativação de GPER1, selecionamos o tempo de 12 horas para avaliar as possíveis repercussões tardias dos tratamentos sobre genes e proteínas relacionadas a via do GPER1 e outras vias importantes no processo de progressão tumoral. Utilizando os mesmos protocolos de

tratamento foi realizado o ensaio de migração *transwell* plaqueando 1×10^5 células em insertos translúcidos que foram posteriormente avaliados por microscopia de fluorescência para a quantificação das células que atravessaram os poros. O ensaio de migração celular *transwell* mostrou que o tratamento com o MBP foi capaz de aumentar a migração das células LNCaP, ao passo que os demais tratamentos foram semelhantes ao controle. Os dados iniciais mostraram que o MBP foi capaz de aumentar a expressão de GPER1, pERK1/2 após 45 minutos de exposição, mas não alterou a expressão de PI3K e pAKT. Após 3 horas de exposição houve um aumento na expressão de GPER1 e pERK1/2 no grupo tratado com o antagonista G15, e com 12 horas o nível dessas proteínas foi semelhante em todos os grupos. Esses dados nos levam a crer que o MBP ativa a via de GPER1 em um curto período de tempo aumentando preferencialmente a fosforilação de ERK1/2. Após a ativação rápida de GPER1 pelo MBP e inibição pelo G15 (45 minutos), parece que se estabelece um período em que as células que tiveram a via do GPER1 inibida (G15) e parcialmente inibida (M+G) e que, deixaram de fosforilar por essa via ERK1/2 e AKT, aumentam consideravelmente a expressão dessas proteínas fosforiladas para ativar vias essenciais de sobrevivência celular (3 horas). Após 12 horas de exposição, a expressão de genes como *GPER1*, *EGFR*, *AKT1*, *MAPK1* e *MAPK3* mostra-se diminuída no grupo MBP, o que pode sinalizar a tentativa de reequilíbrio dos níveis celulares das proteínas traduzidas a partir desses genes, o que se comprova pelos ensaios de *western blot*. Dessa forma conclui-se que o MBP, na dose estudada, é capaz de ativar a via do GPER1 por um curto período de tempo, principalmente fosforilando ERK1/2, inclusive aumentando a capacidade migratória dessas células, o que poderia ao longo do tempo e de exposições múltiplas aumentar a progressão tumoral; e que as células LNCaP por mecanismos de controle celular reduzem a resposta ao MBP ao longo do tempo, na tentativa de reequilibrar as vias de sobrevivência celular associadas ao GPER1.

ABSTRACT

The mono-n-butyl phthalate (MBP) is the active metabolite of di-n-butyl phthalate (DBP), a plasticizer commonly used for industrial products, including medical devices, flexible plastics and cosmetics, has been described as an endocrine disruptor with estrogenic and anti-androgenic function, depending on the dose and the exposure period, particularly by interfering with the development of the male reproductive system. It is believed that some of the effects of endocrine disruptors are mediated by the non-classical estrogen G protein-coupled receptor - GPER1 (GPR30). In view of the worldwide problems regarding to degradation of plastics and their dispersion in the environment, and earlier evidences showed that phthalates have effects on the development and maturation of the prostate increasing the incidence of inflammatory and dysplastic lesions in rodents, this study aimed to evaluate the effect of MBP on androgen dependent prostate cancer cells (LNCaP) by modulating the activity of GPER1 (through its antagonist, G15). The LNCaP cells, maintained in RPMI culture, were expanded and treated in an incubator with 5% CO₂ humid atmosphere at 37 ° C. The MBP dose to be used was 10 uM, selected from the following MTT cytotoxicity test (3- [4.5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyl tetrazolium bromide). Thus were established the following treatment protocols: control: RPMI + 0.03% DMSO; MBP: 10 uM of MBP diluted in DMSO (0.03%) + RPMI; G15: 8 uM of G15 diluted in DMSO (0.03%) + RPMI; M+G: 8 uM of G15 + 10 uM of MBP (diluted in 0.03% DMSO) + RPMI. For the treatment of MBP together with G15 (M+G), the GPER1 antagonist was added to the medium 30 minutes prior to MBP. Cells were incubated under the described treatments at four different times: 15 minutes 45 minutes, 3 hours and 12 hours. After exposure, the cells were processed for RNA and protein extraction, techniques designed to Reaction Polymerase Chain Real Time After reverse transcription (RT-qPCR) and Western blotting, respectively. At all times it was evaluated the profile of protein expression for GPER1, pErk1 / Erk2, PI3K and pAKT to the overall assessment of the activation process of pathways mediated by GPER1. After this step, and showing a rapid effect of MBP in GPER1 activation, we selected the 12-hour time to assess possible late effects of treatment on genes and related proteins via the GPER1 and other key pathways in tumor progression process. Using the same treatment protocol was performed an transwell migration assay by plating 1x10⁵ cells into translucent inserts were subsequently assessed by fluorescence microscopy for the quantification of the cells that passed through the pores. The transwell cell migration assay showed that treatment

with MBP was able to increase the migration of LNCaP cells, whereas the other treatments were similar to control. Initial data showed that the MBP was able to increase the expression of GPER1, pERK-1/-2 after 45 minutes of exposure, but did not alter the expression of PI3K and pAKT. After 3 hours of exposure was an increase in the expression of GPER1 and pERK-1/-2 in the group treated with G15 antagonist for 12 hours and levels of these proteins were similar in all groups. These data lead us to believe that active GPER1 MBP to route in a short period of time preferably increasing the phosphorylation of ERK1/-2. After the rapid activation of GPER1 by MBP and inhibition by G15 (45 minutes), it seems that establishes a period in which the cells had the pathway inhibited GPER1 (G15) and partially inhibited (M+G) and ceased to in this way phosphorylate ERK-1/-2 and AKT, considerably increases the expression of these phosphorylated proteins essential to activate cell survival pathways (3 hours). After 12 hours exposure, the expression of genes as *GPER1*, *EGFR*, *AKT1*, *MAPK1* and *MAPK3* is shown decreased in MBP group, which may indicate an attempt to rebalance the cellular levels of protein translated from those genes, which evidenced by western blot assays. Thus it is concluded that MBP, at the dose studied is able to activate the pathway of GPER1 for a short period of time, especially phosphorylating ERK-1/-2, including increasing the migration ability of these cells, which could, after over time, and multiple exposures, increase tumor progression; and that LNCaP cells are able, by cellular control mechanisms, to reduce the response to MBP over time in an attempt to restore the balance of cell survival pathways associated with GPER1.

3. INTRODUÇÃO

3.1.Câncer de próstata

De acordo com dados divulgados através do último GLOBOCAN pela *International Agency for Research on Cancer (IARC)* o câncer de Próstata é o segundo câncer mais comum em homens – totalizando cerca de 15% do número de casos de câncer diagnosticados no sexo masculino - e o quarto quando considerado ambos os sexos em todo o mundo (BRAY et al., 2013). Com uma estimativa de 307.000 mortes em 2012, o câncer de próstata é a quinta maior causa de morte por câncer em homens em todo o mundo. Já no Brasil estimativas feitas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) apontam para que em 2016 surjam no país 61.200 novos casos de câncer de próstata, doença que apenas em 2013 matou 13.772 brasileiros. As últimas estatísticas feitas pelo mesmo instituto classificam o câncer de próstata como o mais incidente entre os homens em todas as regiões do país, quando não se considera os tumores de pele não melanoma (INCA, 2016). Frente a esses importantes números, a caracterização etiológica dessa doença se tornou uma das grandes preocupações de diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo. Apesar dos grandes esforços na tentativa de se compreender melhor o processo de carcinogênese prostática o que se sabe é que o envelhecimento, histórico familiar, hormônios esteroides, dieta e exposição a agentes ambientais são fatores de risco para o desenvolvimento da doença (BOSTWICK et al., 2004). Ainda há muitos eventos que ocorrem durante a promoção e progressão tumoral prostática que permanecem obscuros.

3.2.Ação hormonal no câncer de próstata

Por ser uma glândula sexual masculina, a estimulação por andrógenos é absolutamente necessária para o desenvolvimento da próstata (CUNHA et al., 1987), assim como para seu processo neoplásico, quando uma produção desregulada de andrógenos e/ou uma ativação anormal de receptores de andrógenos (AR) promove a proliferação celular descontrolada, levando à carcinogênese (DONDI et al., 2010). Quando essa proliferação descontrolada se associa a uma falha nos mecanismos de reparos do DNA (e.g. pela P53) pode-se instaurar um processo de carcinogênese (SINGH; MATANHELIA; MARTIN, 2008). Porém, não somente os andrógenos são responsáveis pela homeostasia e pela evolução das doenças prostáticas. Estudos recentes sugerem que os estrógenos também poderiam ser mediadores importante atuando, sozinhos ou sinergicamente com andrógenos, no crescimento anormal e transformação neoplásica da

próstata (BOSLAND, 1999; HO, 2004; HO et al., 2011; RICKE; WANG; CUNHA, 2007; TAPLIN; HO, 2001).

Uma via metabólica relevante para a carcinogênese estrogênica seria a produção *in situ* de estrógenos através de andrógenos pela enzima aromatase (ELLEM; RISBRIDGER, 2006). Essa enzima e sua atividade foram descritas em amostras de câncer de próstata e hiperplasia prostática benigna (HIRAMATSU et al., 1997). Inclusive já foram relatados testes clínicos em que se testou a eficácia de inibidores da aromatase no tratamento desses dois quadros clínicos (ITO et al., 2000; KRUIT; STOTER; KLIJN, 2004), ainda que a principal terapia utilizada seja a privação androgênica.

Classicamente, acredita-se que as ações estrogênicas sejam mediadas por dois tipos de receptores de estrógenos (ER) - ER α e ER β - que apesar de semelhantes em relação à sua estrutura e a domínios de ligação ao DNA (NILSSON et al., 2001) apresentam diferenças significativas quanto à função (HALL; COUSE; KORACH, 2001). Na próstata humana normal espera-se encontrar receptores ER β no compartimento basal do epitélio, enquanto os ER α são encontrados quase que exclusivamente no estroma da glândula (LEAV et al., 2001). Já é bem estabelecido que o ER β estaria associado a um efeito anti-proliferativo no epitélio prostático (DONDI et al., 2010; LEUNG et al., 2006; MCPHERSON et al., 2010) e à inibição da transição epitélio-mesenquimal (MAK et al., 2010), enquanto o ER α pode contribuir para a patogênese do câncer de próstata (HAQQ et al., 2005). No entanto, existem trabalhos que mostram também que outro receptor estaria envolvido com respostas estrogênicas mediadas pela ativação de uma via não genômica, denominado GPER1 (REVANKAR et al., 2005).

3.3.Desreguladores endócrinos

Sabe-se que o ambiente e a dieta são prováveis responsáveis em induzir significativas mudanças na concentração e no metabolismo dos hormônios esteroides sexuais, o que pode contribuir para o desenvolvimento do câncer de próstata (TSUDA et al., 2003). Com base nisso, os hormônios e as vias de interação hormônio-célula podem ser considerados intermediadores dos fatores exógenos, como o ambiente ou a nutrição, e os alvos moleculares do processo de iniciação, promoção e progressão do câncer (CARRUBA, 2006).

Tendo em vista a importância dos hormônios, tanto no funcionamento fisiológico quanto no estabelecimento de doenças em órgãos hormônio-dependentes

como a próstata, os desreguladores endócrinos ganham cada vez mais atenção. Dados britânicos divulgados em 2011 (*Cancer Research UK*, 2011, <http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/>) afirmam que de 1978 a 2007 a incidência total de câncer aumentou 25%, um aumento de 14% em homens e de 32% em mulheres no Reino Unido. Ainda de acordo com esses dados as incidências dos cânceres de mama e próstata foram as que mais aumentaram. A incidência do câncer de próstata quase triplicou de 33 em 1975 para 97 a cada 100.000 habitantes em 2007, enquanto a incidência de câncer de mama em mulheres aumentou em 57%, de 77 em 1978 para 120 por 100.000 em 2007. Sendo que uma das possíveis justificativas para esse aumento nas incidências de cânceres em todo o mundo é a grande exposição à inúmeros desreguladores endócrinos.

Por serem compostos capazes de alterar a função do sistema endócrino e estarem presentes em inúmeros produtos e processos industriais, os desreguladores endócrinos são alvo de estudos desde a descoberta do DDT (1,1,1-tricloro-2,2-di[4-clorofenil]etano) em 1939 (MELLANBY, 1992). O grupo de moléculas identificadas como desreguladores endócrinos é extremamente heterogêneo e inclui compostos químicos sintéticos utilizados como solventes industriais, compostos plásticos, plastificantes, pesticidas, agentes farmacológicos e metais pesados (KAVLOCK, 1999). Muitas dessas substâncias apresentam propriedades estrogênicas, androgênicas, antiestrogênicas ou antiandrogênicas. Exemplos de xenoestrógenos sintéticos são compostos da família dos ftalatos, alquilfenóis e o bisfenol A.

3.4.Os ftalatos

Os ftalatos são ésteres utilizados na fabricação de plásticos transparentes maleáveis empregados na indústria, como o PVC (policloreto de vinila), utilizado na fabricação de bolsas de sangue, de soro e de soluções intravenosas, cateteres, e em embalagens plásticas de mamadeiras, brinquedos, garrafas de refrigerante e outros, tornando-os grandes contaminantes do ambiente (Programa Internacional em Segurança Química [IPCS], 1992, 1997) e expondo a população a altos níveis de diversos tipos de ftalatos (BLOUNT et al., 2000). De acordo com a IARC, o Di(2-etilhexil)-ftalato é considerado como possível carcinógeno para humanos, enquanto outros ftalatos ainda não foram avaliados (<http://monographs.iarc.fr>). Além de serem considerados agentes antiandrogênicos, por estarem associados à diminuição na produção intratesticular de

testosterona (LEHMANN et al., 2004), os ftalatos poderiam ter um efeito estrogênico atuando em vias estrogênicas alternativas (e.g. ativando receptores estrogênicos acoplados à proteína G, denominados GPER). A ativação de GPER1 foi relatada para diversos xenoestrógenos tais como bisfenol A, genisteína e zearalenona (THOMAS; DONG, 2006). Uma vez que esse receptor é expresso em uma grande variedade de tecidos, como cérebro, placenta, ovários, próstata, testículos e mama, há importância em saber se outros xenoestrógenos, como o ftalato, seriam capazes de ativar receptores GPER1 e qual o seu envolvimento na carcinogênese de órgãos hormônio-dependentes.

3.5.O GPER1

O receptor estrogênico acoplado à proteína G GPER1 (nomenclatura recomendada pela *HUGO Gene Nomenclature Committee*, mas ainda encontra-se na literatura quem utilize a abreviação antiga GPR30) é uma proteína transmembrana que atravessa a camada fosfolipídica da membrana sete vezes. Identificado como uma nova proteína ligante ao 17 β -estradiol (E₂) é estruturalmente distinta dos receptores estrogênicos clássicos α e β (PROSSNITZ et al., 2008). Além de diferenças estruturais essa proteína desempenha funções diferentes dos receptores anteriormente descritos. Quando ligado ao E₂ o GPER1 é capaz de mediar rápidos eventos de sinalização não genômicos – com efeitos em questão de segundos ou minutos. Esses eventos incluem estimulação de adenilato ciclase, via transativação de receptores de fator de crescimento epidermal (EGFR), indução da mobilização de cálcio intracelular (Ca²⁺) e ativação de vias de sinalização da MAPK (ERK1/2) e do fosfatidil inositol 3-quinase (PI3K), como representado na **Figura 1** (PROSSNITZ; MAGGIOLINI, 2009; PROSSNITZ et al., 2008). Dessa forma, o GPER1 desempenha papel chave na modulação de respostas estrogênicas e no desenvolvimento e/ou progressão de cânceres hormônio-responsivos.

Figura 1

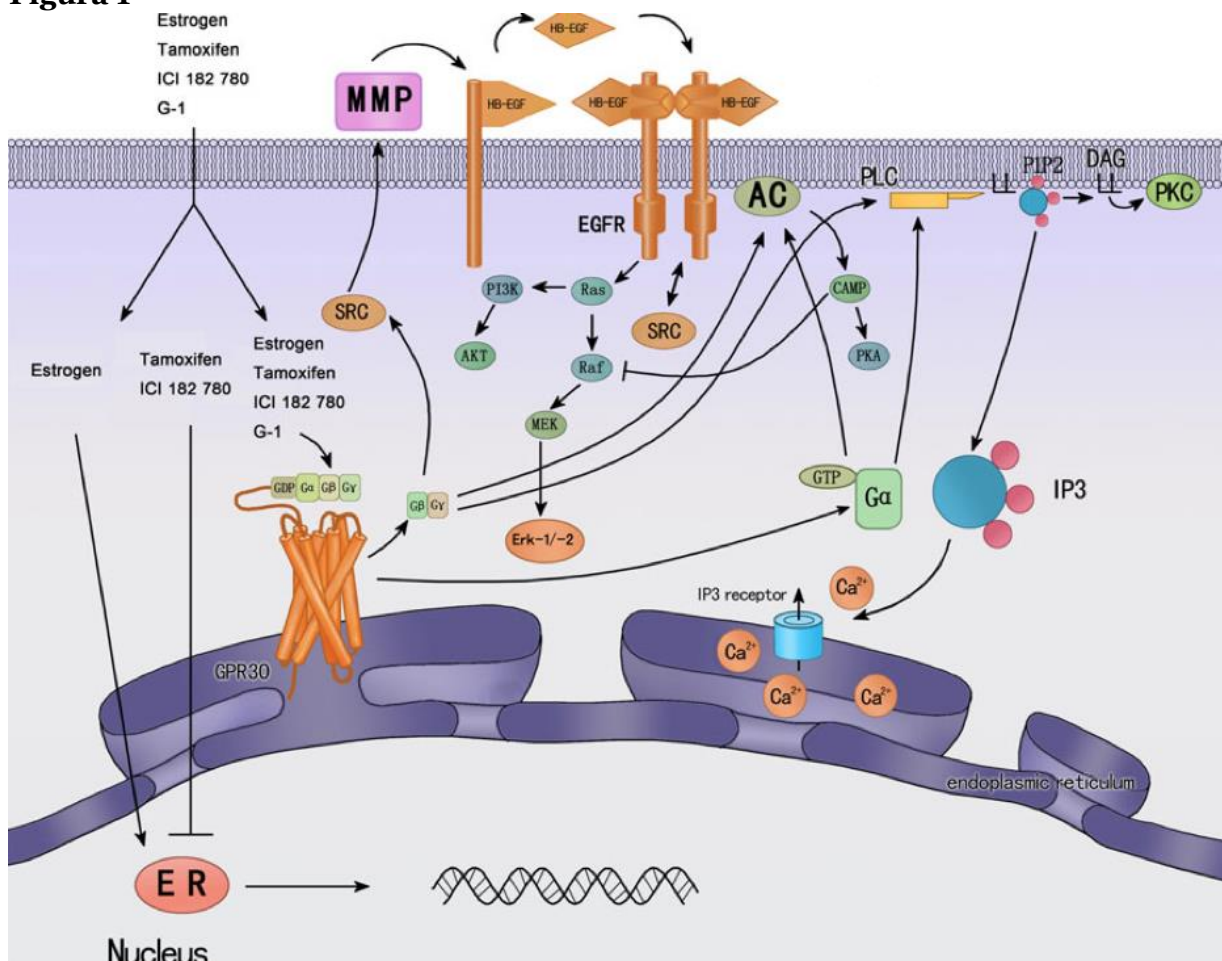


Figura 1: Vias de sinalização ativadas pelo GPER1 e por receptores clássicos de estrógenos.

Estrógeno, tamoxifeno, G-1 e compostos relacionados são permeáveis e conseguem alcançar os receptores de estrógenos localizados intracelularmente (ER e/ou GPER1). A ligação entre esses compostos aos ER clássicos desencadeia a ativação transcricional direta (ação genômica). Estimulação de GPER1 ativa proteínas G, que desencadeiam múltiplos efeitos, resultando em AMP cíclico (cAMP) produção também de SRC e ativação de esfingosina-cinase (SphK). A ativação de metaloproteinases de matriz (MMPs) pelo SRC leva à liberação de HB-EGF que pode transativar receptores de fator de crescimento epidermal (EGFRs). A ativação de EGFR provoca múltiplos eventos incluindo ativação de MAPKs e PI3Ks, o que resulta na expressão de fatores de transcrição, como c-fos. Como resultado, a estimulação estrogênica pode acarretar a expressão de genes alvo cujos promotores não possuem os elementos responsivos esteroidais (EREs). Os efeitos combinados dessa sinalização e dos eventos transcpcionais levam à promoção do ciclo celular e proliferação. Figura modificada por Wang das revisões de Prossnitz (PROSSNITZ; MAGGIOLINI, 2009; WANG et al., 2010)

Em 2006, Bologna et al. descreveram um agonista seletivo de GPER1, em um esforço para identificar ligantes específicos para esse receptor. Denominado de G-1, esse composto se mostrou inativo contra receptores clássicos de estrógenos (BOLOGA et al., 2006). Esse mesmo grupo em 2009 divulgou o achado de um antagonista de GPER1,

também sem atividade sobre os receptores estrogênicos clássicos, composto denominado G-15, **Figura 2** (DENNIS et al., 2009).

Figura 2

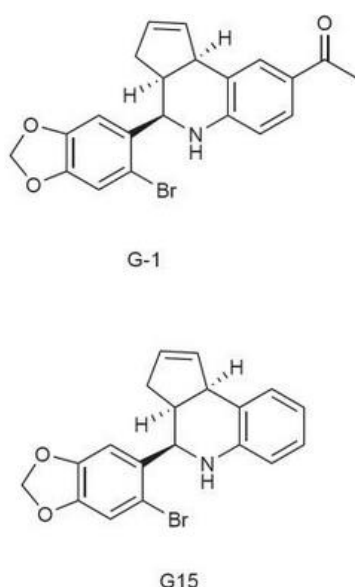


Figura 2: Representação das estruturas dos compostos G-1 e G-15, respectivamente agonista e antagonista do receptor GPER1 (DENNIS et al., 2009).

Com a descoberta desses compostos iniciou-se os estudos que visavam por detalhar a atuação dos receptores GPER1 em diversos órgãos e cenários patológicos. Neste sentido, foi demonstrado que o GPER1 é capaz de mediar efeitos estrogênicos proliferativos na tireoide (VIVACQUA et al., 2006), câncer de endométrio (LIN et al., 2009), câncer de ovário (ALBANITO et al., 2007) e em linhagens celulares de câncer de mama ER-negativas - SKBr3 (ALBANITO et al., 2008). Porém nem todos os achados apontam para que a ativação de GPER1 induza somente a proliferação celular. Em células cancerosas de mama da linhagem MCF-7, positiva para ER, Ahola e colaboradores reportaram uma diminuição de marcadores de proliferação (AHOLA et al., 2002), efeito semelhante ocorreu com o tratamento de células de câncer de próstata PC3 com o agonista G-1 (CHAN et al., 2010). O que poderia indicar uma possível utilização terapêutica desses agonistas de GPER1 em determinados cenários neoplásicos.

Tendo em vista essas possíveis funções antagônicas do GPER1 (i.e., indução ou diminuição de proliferação celular) há a necessidade de se avaliar em quais cenários neoplásicos a ativação desses receptores auxiliaria ou não a progressão tumoral.

3.6.JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Os estrógenos apresentam papel importante na fisiopatologia da próstata e a exposição a compostos ambientais com atividade estrogênica torna-se uma preocupação mundial já que vários compostos sintéticos utilizados nos processos industriais são caracterizados e encontrados em altas concentrações no meio ambiente. Com isso, torna-se necessário conhecer os efeitos desses compostos sobre o ambiente tumoral prostático tal qual elucidar os mecanismos pelos quais eles atuam.

Apesar do crescente número de trabalhos que abordam os receptores GPER1, nenhum explora a sua atividade por meio dos desreguladores da família dos ftalatos e sua implicação no câncer de próstata. Visto que esses receptores apresentam afinidade e são ativados por outros xenoestrógenos, e ainda, que apresentam importância clínica em diversos processos patológicos, tal estudo mostra-se altamente importante.

3.7.OBJETIVO GERAL

Correlacionar a ação do mono-butil-ftalato (MBP) sobre células de câncer de próstata humana dependentes de andrógeno (LNCaP) e seus possíveis efeitos em vias de sobrevivência e morte celular, com ênfase na via ativada pelos receptores estrogênicos não clássicos GPER1.

3.8.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar, em diferentes tempos de exposição, a possível ativação de GPER1 e das principais proteínas quinases envolvidas em processos de sobrevivência e morte celular moduladas por ele, com intuito de se estabelecer um panorama tempo-resposta;
2. Correlacionar a atividade de transcrição gênica e a expressão das principais proteínas da via do GPER1 após a determinação do panorama tempo-resposta, para a avaliação dos efeitos prolongados dessa exposição;
3. Observar em vias celulares que envolvem ativação genômica se o MBP é capaz de modular outras proteínas envolvidas no processo de progressão tumoral.

7. CONCLUSÃO

O MBP, na dose estudada, ativa a via do GPER1 por um curto período de tempo, fosforilando ERK-1/-2, e aumenta a capacidade migratória das células LNCaP, o que poderia ao longo do tempo e de exposições múltiplas aumentar a progressão tumoral. Além disso, as células LNCaP, por mecanismos de controle celular, reduzem a resposta ao MBP ao longo do tempo, na tentativa de reequilibrar as vias de sobrevivência celular associadas ao GPER1, no entanto, sofrem influência desse composto por outras vias, diminuindo a fosforilação da P53, o que pode contribuir para a vulnerabilidade celular e o agravamento do processo carcinogênico.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHOLA, T. M. et al. G protein-coupled receptor 30 is critical for a progestin-induced growth inhibition in MCF-7 breast cancer cells. **Endocrinology**, v. 143, n. 9, p. 3376–84, set. 2002.
- ALBANITO, L. et al. G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17beta-estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells. **Cancer research**, v. 67, n. 4, p. 1859–66, 15 fev. 2007.
- ALBANITO, L. et al. Epidermal growth factor induces G protein-coupled receptor 30 expression in estrogen receptor-negative breast cancer cells. **Endocrinology**, v. 149, n. 8, p. 3799–808, ago. 2008.
- ASHCROFT, M.; KUBBUTAT, M. H.; VOUSDEN, K. H. Regulation of p53 function and stability by phosphorylation. **Molecular and cellular biology**, v. 19, n. 3, p. 1751–8, 1999.
- BLOUNT, B. C. et al. Levels of seven urinary phthalate metabolites in a human reference population. **Environmental health perspectives**, v. 108, n. 10, p. 979–82, out. 2000.
- BOLOGA, C. G. et al. Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. **Nature chemical biology**, v. 2, n. 4, p. 207–12, abr. 2006.
- BOSLAND, M. C. Use of animal models in defining efficacy of chemoprevention agents against prostate cancer. **European urology**, v. 35, n. 5-6, p. 459–63, jan. 1999.
- BOSTWICK, D. G. et al. Human prostate cancer risk factors. **Cancer**, v. 101, n. 10 Suppl, p. 2371–490, 15 nov. 2004.
- BRAY, F. et al. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 132, n. 5, p. 1133–45, 1 mar. 2013.
- CARRUBA, G. Estrogens and mechanisms of prostate cancer progression. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1089, p. 201–17, nov. 2006.
- CAUNT, C. J. et al. Seven-transmembrane receptor signalling and ERK compartmentalization. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 17, n. 7, p. 276–83, set. 2006.
- CHAN, Q. K. Y. et al. Activation of GPR30 inhibits the growth of prostate cancer cells through sustained activation of Erk1/2, c-jun/c-fos-dependent upregulation of p21, and induction of G(2) cell-cycle arrest. **Cell death and differentiation**, v. 17, n. 9, p. 1511–1523, 2010.
- COMEGLIO, P. et al. Opposite effects of tamoxifen on metabolic syndrome-induced bladder and prostate alterations: a role for GPR30/GPER? **The Prostate**, v. 74, n. 1, p. 10–28, jan. 2014.
- COOPER, L. A.; PAGE, S. T. Androgens and prostate disease. **Asian journal of andrology**, v. 16, n. 2, p. 248–55, jan. .
- CUNHA, G. R. et al. The endocrinology and developmental biology of the prostate. **Endocrine reviews**, v. 8, n. 3, p. 338–62, ago. 1987.
- DENNIS, M. K. et al. In vivo effects of a GPR30 antagonist. **Nature chemical biology**, v. 5, n. 6, p. 421–7, jun. 2009.
- DONDI, D. et al. Estrogen receptor beta and the progression of prostate cancer: role of 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol. **Endocrine-related cancer**, v. 17, n. 3, p. 731–42, 28 set. 2010.
- ELLEM, S. J.; RISBRIDGER, G. P. Aromatase and prostate cancer. **Minerva endocrinologica**, v. 31, n. 1, p. 1–12, mar. 2006.
- ERKEKOĞLU, P. et al. Induction of ROS, p53, p21 in DEHP- and MEHP-exposed LNCaP cells-protection by selenium compounds. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 49, n. 7, p. 1565–71, jul. 2011.
- FELDMAN, B. J.; FELDMAN, D. The development of androgen-independent prostate cancer.

Nature reviews. Cancer, v. 1, n. 1, p. 34–45, out. 2001.

FILARDO, E. J. et al. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 14, n. 10, p. 1649–60, out. 2000.

FLEIGE, S.; PFAFFL, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **Molecular aspects of medicine**, v. 27, n. 2-3, p. 126–39, jan. 2006.

FOSTER, P. M. D. Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. **International journal of andrology**, v. 29, n. 1, p. 140–7; discussion 181–5, fev. 2006.

HALL, J. M.; COUSE, J. F.; KORACH, K. S. The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 40, p. 36869–36872, 17 jul. 2001.

HAQQ, C. et al. Ethnic and racial differences in prostate stromal estrogen receptor alpha. **The Prostate**, v. 65, n. 2, p. 101–9, 1 out. 2005.

HIRAMATSU, M. et al. Aromatase in hyperplasia and carcinoma of the human prostate. **The Prostate**, v. 31, n. 2, p. 118–24, 1 maio 1997.

HO, S.-M. Estrogens and anti-estrogens: key mediators of prostate carcinogenesis and new therapeutic candidates. **Journal of cellular biochemistry**, v. 91, n. 3, p. 491–503, 15 fev. 2004.

HO, S.-M. et al. Estrogens and prostate cancer: etiology, mediators, prevention, and management. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, v. 40, n. 3, p. 591–614, ix, set. 2011.

HU, Y. et al. Monobutyl phthalate induces the expression change of G-protein-coupled receptor 30 in rat testicular sertoli cells. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 51, n. 1, p. 18–24, 2013.

HULKOWER, K. I.; HERBER, R. L. Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery. **Pharmaceutics**, v. 3, n. 1, p. 107–24, jan. 2011.

ITO, K. et al. Effects of a new steroidal aromatase inhibitor, TZA-2237, and/or chlormadinone acetate on hormone-induced and spontaneous canine benign prostatic hyperplasia. **European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies**, v. 143, n. 4, p. 543–54, out. 2000.

KAVLOCK, R. J. Overview of endocrine disruptor research activity in the United States. **Chemosphere**, v. 39, n. 8, p. 1227–36, out. 1999.

KAWASHIMA, H.; NAKATANI, T. Involvement of estrogen receptors in prostatic diseases. **International journal of urology: official journal of the Japanese Urological Association**, v. 19, n. 6, p. 512–22; author reply 522–3, jun. 2012.

KRUIT, W. H. J.; STOTER, G.; KLIJN, J. G. M. Effect of combination therapy with aminoglutethimide and hydrocortisone on prostate-specific antigen response in metastatic prostate cancer refractory to standard endocrine therapy. **Anti-cancer drugs**, v. 15, n. 9, p. 843–7, out. 2004.

KUIPER, G. G. et al. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 12, p. 5925–30, 11 jun. 1996.

LEAV, I. et al. Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. **The American journal of pathology**, v. 159, n. 1, p. 79–92, jul. 2001.

LEHMANN, K. P. et al. Dose-dependent alterations in gene expression and testosterone synthesis in the fetal testes of male rats exposed to di (n-butyl) phthalate. **Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology**, v. 81, n. 1, p. 60–8, set.

2004.

LEUNG, Y.-K. et al. Estrogen receptor (ER)-beta isoforms: a key to understanding ER-beta signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 35, p. 13162-7, 29 ago. 2006.

LIN, B. C. et al. Stimulating the GPR30 estrogen receptor with a novel tamoxifen analogue activates SF-1 and promotes endometrial cell proliferation. **Cancer research**, v. 69, n. 13, p. 5415-23, 1 jul. 2009.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402-8, dez. 2001.

MAGGIOLINI, M.; PICARD, D. The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor. **The Journal of endocrinology**, v. 204, n. 2, p. 105-14, fev. 2010.

MAK, P. et al. ERbeta impedes prostate cancer EMT by destabilizing HIF-1alpha and inhibiting VEGF-mediated snail nuclear localization: implications for Gleason grading. **Cancer cell**, v. 17, n. 4, p. 319-32, 13 abr. 2010.

MCPHERSON, S. J. et al. Estrogen receptor-beta activated apoptosis in benign hyperplasia and cancer of the prostate is androgen independent and TNFalpha mediated. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 7, p. 3123-8, 16 fev. 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 16 dez. 1983.

NELSON, A. W. et al. Estrogen receptor beta in prostate cancer: friend or foe? **Endocrine-related cancer**, v. 21, n. 4, p. T219-34, ago. 2014.

NILSSON, S. et al. Mechanisms of estrogen action. **Physiological reviews**, v. 81, n. 4, p. 1535-65, out. 2001.

PRINS, G. S.; KORACH, K. S. The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. **Steroids**, v. 73, n. 3, p. 233-44, mar. 2008.

PROSSNITZ, E. R. et al. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. **Annual review of physiology**, v. 70, p. 165-90, jan. 2008.

PROSSNITZ, E. R.; MAGGIOLINI, M. Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 308, n. 1-2, p. 32-8, 24 set. 2009.

REVANKAR, C. M. et al. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. **Science (New York, N.Y.)**, v. 307, n. 5715, p. 1625-30, 11 mar. 2005.

RICKE, W. A.; WANG, Y.; CUNHA, G. R. Steroid hormones and carcinogenesis of the prostate: the role of estrogens. **Differentiation; research in biological diversity**, v. 75, n. 9, p. 871-82, nov. 2007.

SHILOH, Y.; ZIV, Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 14, n. 4, p. 197-210, abr. 2013.

SINGH, P. B.; MATANHELIA, S. S.; MARTIN, F. L. A potential paradox in prostate adenocarcinoma progression: oestrogen as the initiating driver. **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)**, v. 44, n. 7, p. 928-36, maio 2008.

SUGIYAMA, N. et al. ERbeta: recent understanding of estrogen signaling. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 21, n. 9, p. 545-52, set. 2010.

TAPLIN, M. E.; HO, S.-M. The Endocrinology of Prostate Cancer. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 8, p. 3467-3477, ago. 2001.

THOMAS, P.; DONG, J. Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: A potential novel mechanism of endocrine disruption. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 102, n. 1-5 SPEC.

ISS., p. 175–179, 2006.

TSAI, C.-F. et al. Benzyl butyl phthalate induces migration, invasion, and angiogenesis of Huh7 hepatocellular carcinoma cells through nongenomic AhR/G-protein signaling. **BMC cancer**, v. 14, n. 1, p. 556, 1 jan. 2014.

TSAI, C.-L. et al. Estradiol and tamoxifen induce cell migration through GPR30 and activation of focal adhesion kinase (FAK) in endometrial cancers with low or without nuclear estrogen receptor α (ER α). **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e72999, 9 jan. 2013.

TSUDA, H. et al. Carcinogenesis and its modification by environmental endocrine disruptors: in vivo experimental and epidemiological findings. **Japanese journal of clinical oncology**, v. 33, n. 6, p. 259–70, jun. 2003.

VIVACQUA, A. et al. 17 β -estradiol, genistein, and 4-hydroxytamoxifen induce the proliferation of thyroid cancer cells through the G protein-coupled receptor GPR30. **Molecular pharmacology**, v. 70, n. 4, p. 1414–23, out. 2006.

WANG, D. et al. G protein-coupled receptor 30 in tumor development. **Endocrine**, v. 38, n. 1, p. 29–37, 2010.

YAO, P.-L.; LIN, Y.-C.; RICHBURG, J. H. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) promotes invasion and migration of human testicular embryonal carcinoma cells. **Biology of reproduction**, v. 86, n. 5, p. 160, 1–10, maio 2012.