

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-2yl] -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 17β -estradiol (E_2) 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 E_2 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 (Ca^{2+}) 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.

The diagram illustrates the signaling pathways involving GPR30 and EGFR. The cell membrane is shown at the top, with various receptors and signaling molecules. The cytoplasm contains several signaling proteins, and the nucleus is at the bottom.

Receptors and Ligands:

- EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor):** A transmembrane receptor that binds HB-EGF (Heparin-Binding Epidermal Growth Factor).
- GPR30 (G Protein-Coupled Receptor 30):** A transmembrane receptor that binds Estrogen, Tamoxifen, ICI 182 780, and G-1.
- ER (Estrogen Receptor):** A nuclear receptor that binds Estrogen and is inhibited by Tamoxifen, ICI 182 780, and G-1.

Signaling Pathways:

- EGFR Pathway:** HB-EGF binding to EGFR activates SRC, PI3K/AKT, and MEK/Erk-1/-2.
- GPR30 Pathway:** Estrogen/Tamoxifen/ICI 182 780/G-1 binding to GPR30 activates Gα and Gβγ. Gα activates PLC, which produces IP3 and DAG. IP3 binds to the IP3 receptor on the endoplasmic reticulum, releasing Ca²⁺. Gβγ activates SRC, which in turn activates PI3K/AKT and MEK/Erk-1/-2.
- ER Pathway:** Estrogen/Tamoxifen/ICI 182 780/G-1 binding to ER leads to nuclear translocation and DNA binding.

Regulation and Inhibition:

- Estrogen and G-1 inhibit the ER.
- Tamoxifen and ICI 182 780 inhibit both GPR30 and the ER.
- Src family kinases (SRC) are involved in the regulation of MMP (Matrix Metalloproteinase).

Other Components:

- AC (Adenylate Cyclase):** Activated by Gα, producing cAMP, which activates PKA.
- PLC (Phospholipase C):** Activated by Gα, producing IP3 and DAG.
- PIP2 (Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate):** Produced by PLC, which activates PKC.
- DAG (Diacylglycerol):** Produced by PLC, which activates PKC.
- PKC (Protein Kinase C):** Activated by DAG and PIP2.
- Ca²⁺ (Calcium):** Released from the endoplasmic reticulum by IP3, which activates PKC.

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 transcricionais levam à promoção do ciclo celular e proliferação. Figura modificada por Wang das revisões de Prossnitz (PROSSNITZ; MAGGIOLINI, 2009; WANG et al., 2010)

17

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

Figura 2

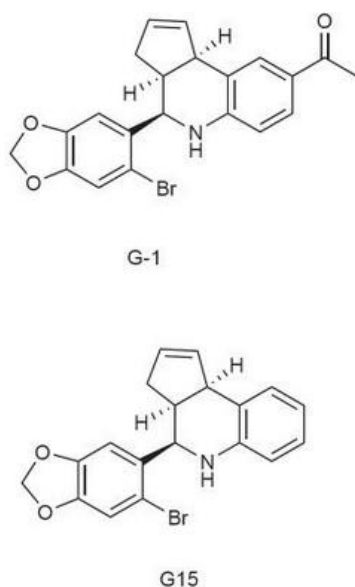


Figura 2: Representação das estruturas dos compostos G-1 e G-15, respectivamente agonista e antagonista do receptor GPER1 (DENNIS et al., 2009).

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.

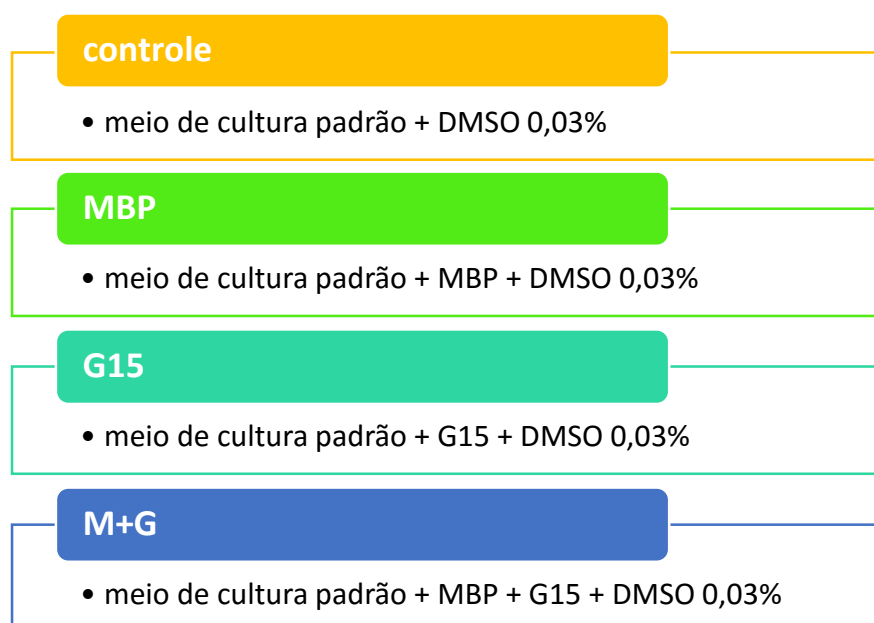
4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cultivo Celular e Tratamentos

Para o estudo, utilizou-se a linhagem celular epitelial prostática tumoral andrógeno dependente (LNCaP). Essa linhagem celular foi adquirida da empresa American Type Cell Culture - ATCC (Manassas, Virginia, USA) e mantida em meio RPMI 1640 (GIBCO/Invitrogen™, EUA) suplementado com soro fetal bovino (SFB) (Gibco/Invitrogen™, EUA) a 10%, 50 µg/ml penicilina, 50 µg/ml estreptomicina e 0,5 µg/ml anfotericina B (Gibco/Invitrogen™, EUA). Durante a expansão das células, os meios foram trocados a cada 2 dias e realizou-se o acompanhamento celular diário ao microscópio invertido (Zeiss Axiovert®, Alemanha).

Todas as células foram expandidas em frascos de cultura celular de poliestireno de 25cm² e 75cm² e mantidas em estufa com 5% de CO₂ em atmosfera úmida a 37°C. Quando atingiram 80% de confluência, as células foram submetidas à tripsina (Gibco/Invitrogen™, EUA) 0,25% e transferidas para placas de cultura de 6 poços especiais (Millipore Corp, Billerica, MA, USA) para a execução dos experimentos subsequentes.

As células LNCaP foram submetidas por 15 minutos, 45 minutos, 3 horas e 12 horas aos seguintes tratamentos:



Assim como para a expansão, o meio de cultivo, adicionado ou não com os agentes químicos, foi trocado durante o tratamento a cada 2 dias.

A exposição a cada tratamento foi realizada em triplicatas. Os pellets celulares obtidos foram divididos em alíquotas contendo aproximadamente 1×10^6 células, que foram submetidas posteriormente às extrações de RNA e proteínas. O mono-butil-ftalato (MBP) metabólito ativo produto da biotransformação do di-n-butil-ftalato, foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, USA) e diluído em DMSO estéril para o tratamento. A concentração final de DMSO no meio de cultura foi de 0,03%. Já a concentração para o tratamento com MBP para a linhagem LNCaP (grupos MBP e M+G) foi de $10 \mu\text{M}$, valor obtido após a determinação da citotoxicidade desse composto pela metodologia do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), como descrito por Mosmann (MOSMANN, 1983). O antagonista de receptores GPER1, o G15, foi adquirido da Cayman (Cayman Chemical®, Ann Arbor MI, USA). A concentração utilizada para o tratamento com G15 nos grupos G15 e M+G foi de $8 \mu\text{M}$, concentração descrita pelo fornecedor como suficiente para que se tenha efeitos antagônicos sem apresentar afinidade pelos outros receptores de estrógenos. Uma vez que o antagonismo do GPER1 pelo G15 é do tipo competitivo o grupo M+G foi exposto primeiramente ao G15 e somente após 30 minutos o MBP foi adicionado ao meio. Com essa prévia exposição ao antagonista espera-se que ao adicionar-se o MBP ao meio os receptores GPER1 já estejam ocupados pelo G15.

Com fins de inferir se o cultivo celular estava comprometido por contaminantes fizemos um teste para detecção de micoplasma. O kit utilizado para a detecção de micoplasma foi o Venor™ GeM (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MI, USA) e se baseia em um PCR com oligonucleotídeos degenerados, capaz de detectar, pelo menos, 32 cepas diferentes de micoplasma através do sobrenadante das amostras. O sobrenadante das células foi testado depois da realização dos tratamentos experimentais e posterior coleta do material celular. Para o teste extraiu-se o DNA do sobrenadante de 3 amostras e realizou-se um PCR com uma corrida em gel de agarose junto com um controle positivo e um negativo para micoplasma para comparar as amostras com o controle. Dessa maneira é possível saber se em algum momento do experimento houve contaminação por micoplasma.

4.2. Teste de citotoxicidade do MBP em LNCaP

Após o sucesso do cultivo celular, quando as células atingiram o estado de 80% de confluência, as mesmas foram expostas ao Mono-butil-ftalato (MBP, Sigma Aldrich Co. St. Louis, MO, USA) para a avaliação da citotoxicidade pelo teste do MTT, proposto por Mosmann (1983), em tempos pré-estabelecidos (12 e 72 horas). Para este teste, as células foram coletadas utilizando-se tripsina/EDTA 0,25%; expôs-se 1×10^6 células, contadas em câmara de Neubauer. A estimativa da viabilidade celular foi determinada pela exclusão do corante azul de Trypan.

Para o teste do MTT, as células foram semeadas em microplacas de 96 poços (aproximadamente 10.000 células por poço em 200uL de meio completo). Depois de aderidas (24 horas após o plaqueamento), as células foram expostas a 11 concentrações crescentes dos agentes tóxicos (seguindo uma progressão geométrica de $1 \mu\text{M}$ a $20000 \mu\text{M}$), por 12 e 72 horas a 37°C . Após os tratamentos, o meio foi aspirado e as células incubadas com solução de MTT ($0,5 \text{mg/ml}$ de meio de cultura) por 4 horas a 37°C . Ao final deste período aspirou-se cuidadosamente a mistura da reação e se acrescentou a cada poço $200 \mu\text{L}$ de DMSO. Após 10 minutos a análise foi realizada em microleitor de placa a 550nm .

4.3. Ensaio de Migração Celular- *Transwell*

O potencial de migração celular frente aos diferentes tratamentos foi investigado utilizando os Insertos de Migração ThinCerts™ (Greiner Bio-one™, Alemanha) translúcidos contendo em sua região inferior uma membrana com poros de 8µm que permitem a passagem de células e placas de cultivo de 24 poços (Millipore Corp., Billerica, MA, USA).

Em cada poço, foram adicionados 500µL de meio de cultivo RPMI1640 com 10% de SFB que, neste ensaio, desempenha um papel quimioatrativo em relação às células (**Figura 3**). A seguir, foi encaixado um inserto por poço e em cada um deles plaqueado um total de 1×10^5 células imersas em 300µL de meio RPMI isento de SFB, acrescido de um dos tratamentos do estudo. A linhagem celular foi exposta aos 4 tratamentos, sempre em triplicatas.

As placas foram incubadas em uma estufa a 5% de CO₂ em atmosfera úmida a 37°C durante 24h, de acordo com as instruções do fabricante, para posterior avaliação da migração. As células que não foram capazes de migrar através dos poros, se mantiveram na parte superior da membrana do inserto e foram delicadamente retiradas da peça através de raspagem feita com hastes flexíveis de algodão. Já as células que migraram através dos poros da membrana, atraídas pelo SFB presente no meio de cultivo adicionado a cada poço, foram fixadas em metanol 100% gelado por 10 minutos e, em seguida a membrana foi removida do inserto e posicionada em uma lâmina de vidro para a montagem com DAPI (4'6'-diamidino-2-fenilindol, da Sigma-Aldrich, Co.™, St. Louis, MO, USA) e posterior análise ao microscópio de fluorescência.

Usando um microscópio de fluorescência (Zeiss Axio Imager1®, Oberkochen, BW, Germany) foram fotografados 5 campos de cada inserto contendo as células migradas, possibilitando uma cobertura total da região da membrana da peça. As imagens foram, então, analisadas no software ImageJ® para contagem celular.

Figura 3

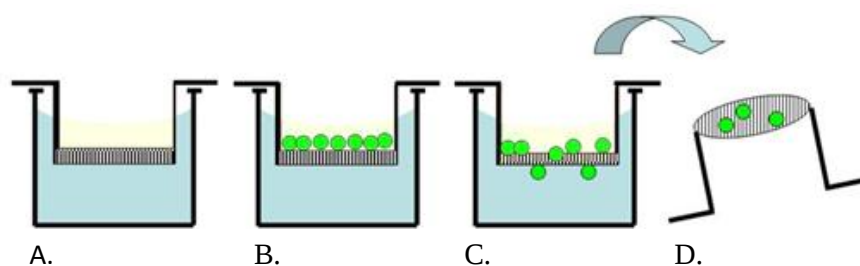


Figura 3: Esquematização do Ensaio de Migração Celular Transmembrana. Um inserto com membrana porosa é utilizado para estabelecer dois compartimentos em um poço (A). As células são adicionadas ao compartimento superior, acrescidas dos respectivos tratamentos (B) e migram através da membrana para o compartimento inferior, onde há SFB (C). A migração celular é medida pela contagem de células na face inferior da membrana (D). Adaptado de Hulkower & Herber (HULKOWER; HERBER, 2011).

4.4. Western blotting

Para a técnica de *Western blotting* as células foram expostas aos tratamentos por 15 minutos, 45 minutos, 3 horas e 12 horas. Uma vez tendo realizado os tratamentos, os produtos proteicos da cultura celular foram avaliados por *Western blotting*. Para isso, realizou-se a extração proteica com tampão RIPA (Millipore Corp, Billerica, MA, USA) na proporção de 1mL para 5×10^6 células, adicionado ao coquetel inibidor de proteases e de fosfatases (Sigma®, USA). As células foram transferidas para um tubo do tipo *ependorf* e mantidas no gelo por 5 minutos. Em seguida, as células foram homogeneizadas em vórtex e centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos, a 4° C, e o sobrenadante coletado. A quantificação das proteínas foi realizada em placas com 96 poços e leitura em microleitor de placa. As alíquotas (50µg de proteína) foram tratadas com solução tampão para corrida de gel (*Laemmli sample buffer* – Bio-rad®, USA) e β-mercaptoetanol (Bio-rad®, USA) a 95°C por 1 minuto. Em seguida, as proteínas foram separadas em SDS-PAGE e após a eletroforese, transferidas para a membrana de nitrocelulose. A ligação inespecífica de proteínas foi bloqueada através da incubação das membranas em leite desnatado 3% em tampão Tris-HCl contendo 0,1% de Tween 20 (TBST) por 45 minutos em temperatura ambiente, para proteínas fosforiladas utilizou-se como solução de bloqueio BSA 3% (albumina do soro bovino) em tampão Tris-HCl contendo 0,1% de Tween 20. As membranas foram subsequentemente incubadas com os anticorpos primários em BSA 3% diluído em Tris-HCl “*overnight*” (os anticorpos que foram utilizados para cada tempo de tratamento estão listados na **Tabela 1**). As proteínas escolhidas para serem avaliadas pelo *blotting* estão envolvidas com a via de ativação do GPER1 e seus efeitos não genômicos. Após lavagem, as membranas foram incubadas em anticorpo secundário específico diluído BSA 3% por 1 hora. Os componentes imunorreativos foram revelados pelo kit luminescente (luminol) ECL da Thermo Scientific®.

Tabela 1

	tempo de tratamento	
	15, 45 minutos e 3 horas	12 horas
anticorpo	GPB1	GPB1
	MAPK (ERK 1/2) fosforilada	ER-beta
	PI3K	EGFR
	AKT fosforilada	AR
		AR fosforilado
		MAPK (ERK 1/2)
		MAPK (ERK 1/2) fosforilada
		P53
		P53 fosforilada
		AKT
		AKT fosforilada
		PI3K

Tabela 1: Anticorpos específicos para a imunomarcacão das proteínas que foram investigadas por *Western blotting*

Primeiramente os experimentos foram realizados submetendo as células da linhagem LNCaP aos tratamentos pelos tempos de 15 minutos, 45 minutos e 3 horas para avaliação das proteínas GPB1, MAPK (ERK1/2) fosforiladas, PI3K e AKT fosforilada, para avaliação dos efeitos rápidos dos tratamentos nessas células. Após isso realizou-se a análise das repercussões tardias dos tratamentos por 12 horas, avaliando-se as expressões de GPB1, ER-beta, EGFR, PI3K, AR total e fosforilado, MAPK (ERKS 1/2) total e fosforilada, P53 total e fosforilada e AKT total e fosforilada.

Os resultados obtidos serão apresentados seguindo essa mesma ordem, com exceção das expressões de GPB1 e PI3K em 12 horas, que serão apresentadas juntamente com as dos outros tempos para facilitar a compreensão e discussão dos resultados.

4.5. Avaliação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR)

Foi avaliada a expressão de genes expressos pelas células prostáticas por RT-qPCR. Após o término dos tratamentos as células foram coletadas utilizando-se TRIzol™ (Ambion, EUA) para a extração de RNA. Após extraído, o RNA foi quantificado por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoVue™ (GE Healthcare Life Sciences, EUA). As amostras de RNA foram tratadas com DNA-free Kit™ (Ambion, EUA) para remover a contaminação com DNA genômico. A análise da qualidade do RNA foi obtida por uma corrida em gel de agarose e pelo número da integridade do RNA, RIN (RNA Integrity Number), a partir da análise dos RNAs ribossomais baseadas em microfluidos, utilizando o sistema 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA - EUA) (FLEIGE; PFAFFL, 2006).

A Reação de Transcrição Reversa dos mRNAs foi realizada utilizando o kit High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix™ (Life Technologies, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Para a reação utilizou-se 4µL de Master Mix para a transcrição reversa ao qual se adicionou 1µg de RNA e o volume completado para 20µL com água ultrapura livre de nucleases. A mistura foi incubada nas seguintes condições: 25°C por 5 min., 42°C por 30 min. seguido da inativação da transcriptase reversa a 85°C por 5 min. Para cada reação de RT-qPCR para mRNAs empregou-se 10µL de GoTaq® qPCR Master Mix, baseado na química SYBR Green (Promega, EUA), 5µL da reação de RT e 1µL de *primers* “sense” e “anti-sense” a 10µM e o volume completado para 20µL com água livre de nucleases. Os oligonucleotídeos iniciadores para os genes foram desenhados utilizando-se o programa Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

A termociclagem foi executada no equipamento Quant Studio (Life Technologies, EUA), obedecendo as seguintes condições: GoTag *Hot Start Polymerase* ativação por 2 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, por fim, curva de dissociação no intervalo de 60-95°C. Para cada amostra foi plotado um gráfico de amplificação mostrando um aumento do *reporter dye fluorescent* (ΔR_n) em cada ciclo da PCR. A partir desse gráfico, será determinado o ciclo onde a reação cruza o limiar de detecção (*cycle threshold* - CT). Realizou-se a quantificação relativa de cada gene utilizando o método de *Fold Change* de acordo com Livak e

Schmittgen (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os valores obtidos para todas as amostras foram normalizados pela razão obtida entre os genes alvo e o gene endógeno. Para a eleição do melhor gene endógeno comparou-se os candidatos quanto à variação entre as amostras utilizando o *software* DataAssist V3.01TM (Thermo Fischer Scientific). Os genes alvo utilizados nas análises constam na tabela abaixo.

Tabela 2

Genes alvo	Sequência de referência
<i>GPB1</i>	NM_001039966.1
<i>EGFR</i>	NM_005228.3
<i>AKT</i>	NM_001014431.1
<i>MAPK 1 (ERK2)</i>	NM_002745.4
<i>MAPK 3 (ERK1)</i>	NM_002746.2
<i>PI3K</i>	NM_006218.2
<i>B2M*</i>	NM_004048.2
<i>Hprt1*</i>	XM_003752155.1

Tabela 2: Genes alvo e controles endógenos* que foram utilizados na RT-qPCR.

4.6. Testes estatísticos

Os testes estatísticos e os gráficos foram feitos no *software* Prism® (GraphPad). Utilizou-se o teste de Mann-Whitney, onde os grupos experimentais foram comparados dois a dois, sendo considerados estatisticamente diferentes as comparações onde $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Teste do micoplasma

Após a extração do DNA de 3 amostras da cultura celular prosseguiu-se para o PCR com oligonucleotídeos degenerados capazes de detectar cepas de micoplasma. Posteriormente correu-se um gel de agarose junto com um controle positivo e um negativo para micoplasma para comparar as amostras com o controle (**Figura 4**). As bandas correspondentes às amostras das células batem com as do controle negativo fornecido pelo kit, demonstrando que as células LNCaP utilizadas no experimento estavam livres de contaminação por micoplasma.

Figura 4

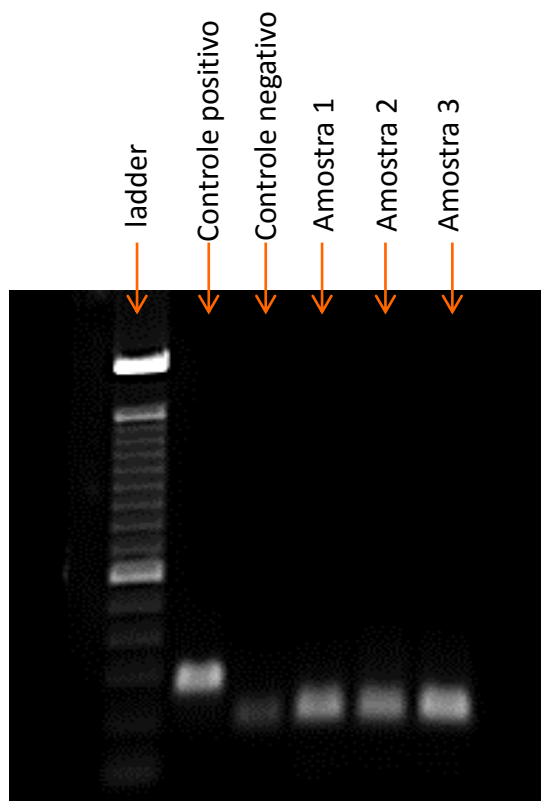


Figura 4: Imagem do gel de agarose resultado do PCR para detecção de micoplasma.

5.2. Teste de citotoxicidade do MBP em LNCaP

Para decidir qual dose de MBP a ser utilizada na cultura celular optou-se por realizar o teste de citotoxicidade do MTT (recomendado pela ISO 10993-5 de 2009 para avaliação de citotoxicidade *in vitro*) com 11 doses. Realizou-se o teste do MTT em duplicata para cada tempo experimental e para cada dose um total de 7 réplicas. As doses de MBP escolhidas pro MTT foram de: 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 10000 e 20000 μM . Para cada tempo os resultados estão demonstrados no gráfico a seguir e a partir dele conseguiu-se perceber que as doses menores não se comportam como citotóxicas para as células LNCaP, diferentemente das maiores (superiores a 1000 μM). Frente a esses resultados decidiu-se utilizar a dose de 10 μM para os tratamentos, por não ser uma dose com uma citotoxicidade importante nesses tempos, com uma atividade metabólica em torno de 90% quando comparado ao controle (**Figura 5**).

Figura 5

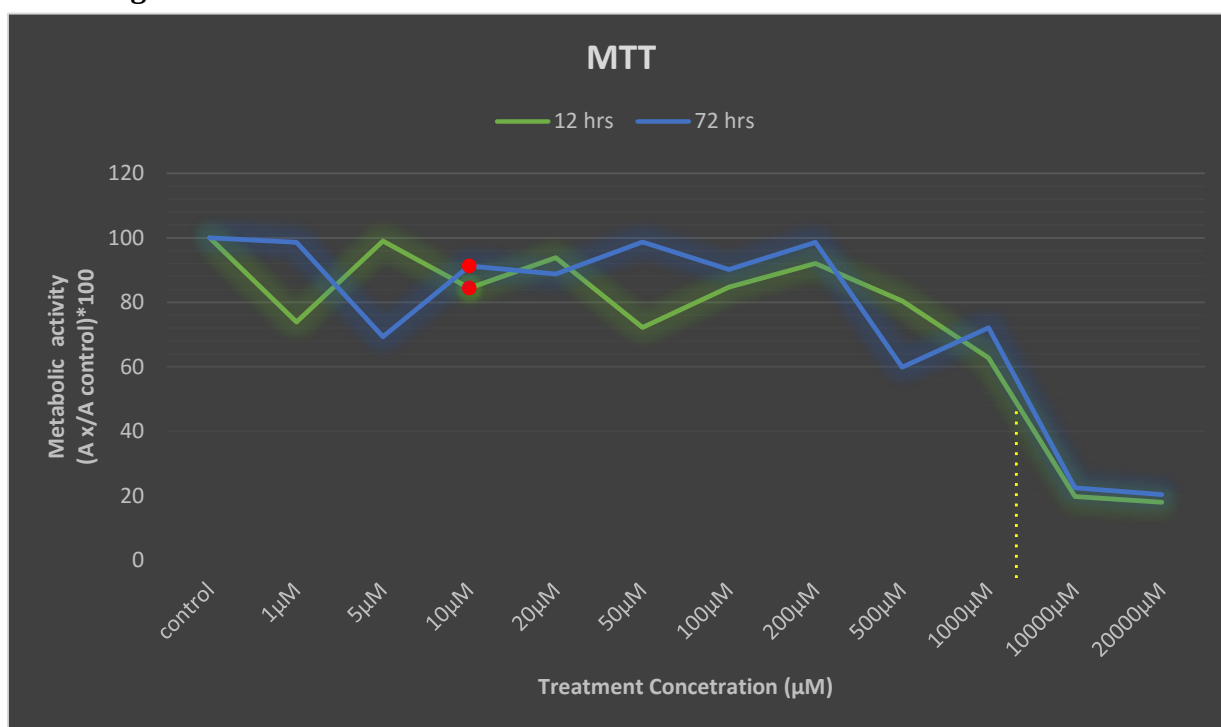


Figura 5: Representação da atividade metabólica das células LNCaP expostas a diferentes doses de MBP nos tempos de 12 e 72 horas quando comparadas ao grupo controle. Resultados obtidos através do teste de MTT. Em vermelho destaca-se a dose escolhida para o experimento. O traçado amarelo representa a dose IC_{50} (concentração capaz de induzir a metade do efeito máximo inibitório) do MBP em LNCaP, entre 1000 e 10000 μM .

5.3. Ensaio de migração celular- *Transwell*

O ensaio revelou que as células do grupo tratado apenas com o MBP apresentaram um aumento na sua taxa de migração quando comparadas às dos outros grupos. No grupo tratado apenas com G15 não se observou aumento ou diminuição da migração, tal qual no grupo em que se combinou o MBP com G15, em relação ao controle. (**Figuras 6 e 7**).

Figura 6

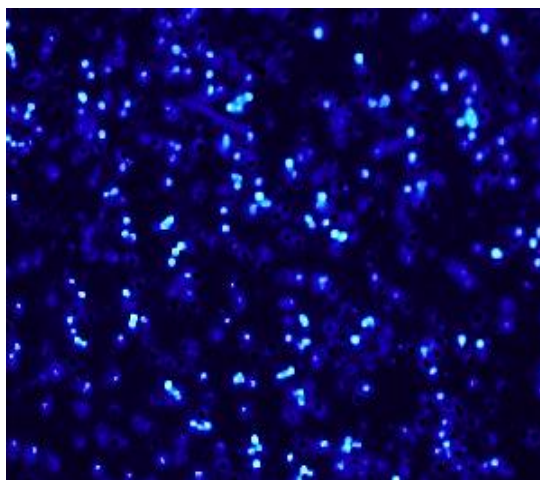


Figura 6: Figura representativa em microscopia de fluorescência do ensaio transwell de migração. A marcação com DAPI possibilitou a contagem das células que migraram para o lado inferior da membrana porosa do inserto. Aumento: 400x.

Figura 7

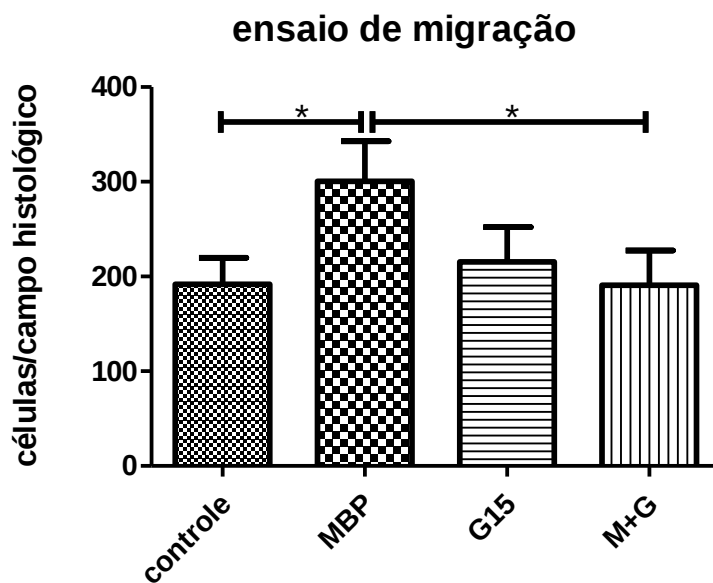


Figura 7: O gráfico representa a quantidade de células que migrou por campo histológico analisado no ensaio de migração, frente aos diferentes tratamentos por 24 horas. Cada barra representa a média seguida pelo erro padrão referente às triplicatas experimentais. * $p \leq 0,05$.

5.4. Avaliação da expressão gênica (RT-PCR) e da expressão proteica (Western Blotting)

Os resultados para expressão gênica e proteica nos diferentes tempos estudados, e para os diferentes grupos de exposição serão apresentados da seguinte forma:

1. Avaliação em todos os tempos de exposição de proteínas-chave da via de GPER1 para a avaliação tempo-resposta;
2. Avaliação de genes e proteínas envolvidas com a via do GPER1 no tempo de 12 horas para a observação dos efeitos tardios
3. Avaliação de proteínas relacionadas à progressão tumoral prostática com ativação e controle genômico após 12 horas de exposição.

5.4.1. Avaliação tempo-resposta da via do GPER1

Para avaliação tempo-resposta dos efeitos do MBP via GPER1 foram investigadas as expressões proteicas dos receptores GPER1, MAPK fosforiladas (as ERKs investigadas foram a 1 e a 2), PI3K e AKT fosforilada frente a exposições de 15 minutos, 45 minutos, 3 horas e 12 horas aos diferentes tratamentos.

GPER1

Para a expressão de GPER1, após 15 minutos de exposição não houve diferença estatística entre os tratamentos. Após a exposição de 45 minutos, observou-se aumento na expressão de GPER1 em MBP em relação ao grupo controle. Após 3 horas de exposição, o grupo G15 apresentou um aumento na expressão de GPER1 em relação aos grupos controle e M+G. Já com de 12 horas de exposição os grupos MBP e G15 apresentaram aumento na expressão da proteína em relação ao grupo M+G (**Figura 8**).

Figura 8

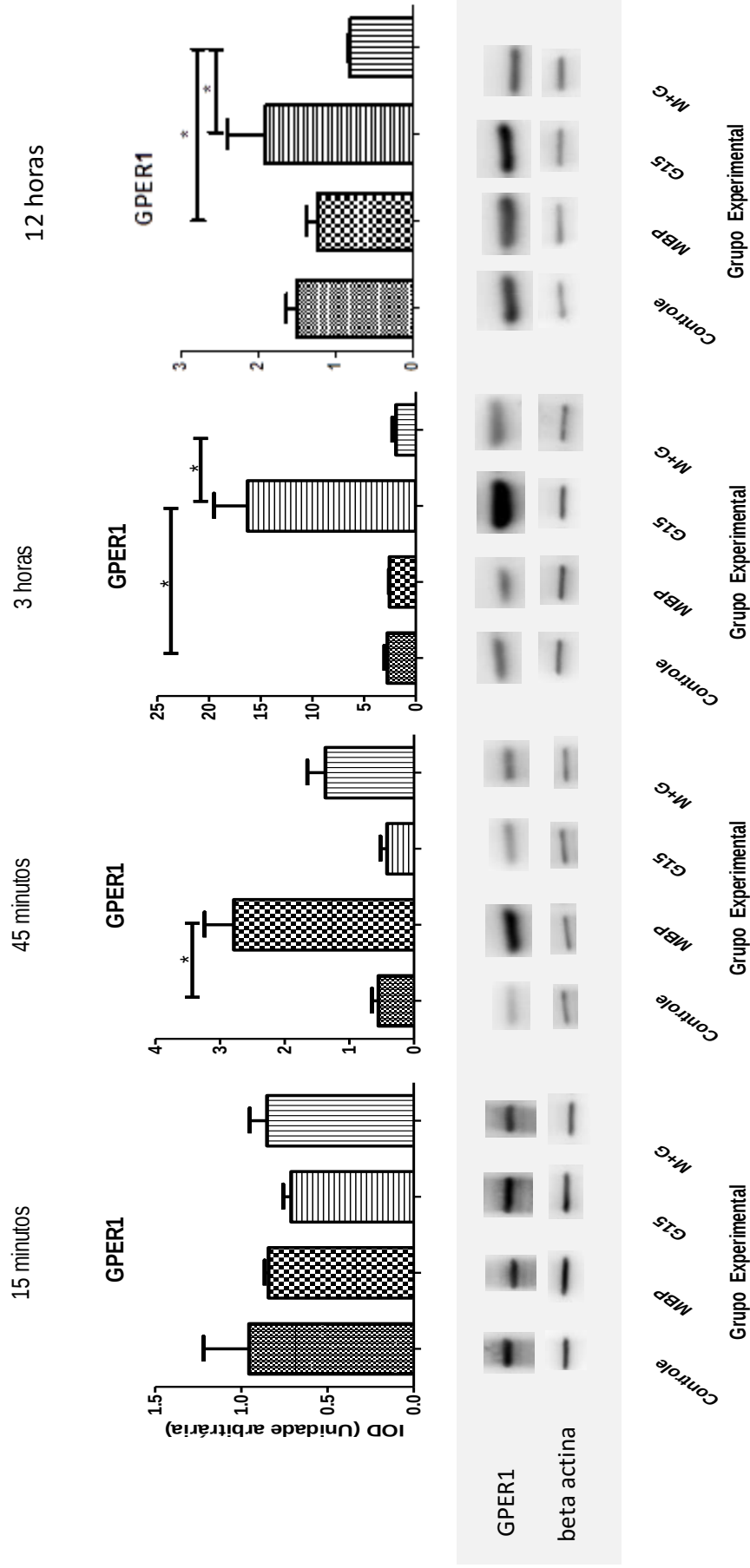


Figura 8: O gráfico representa a expressão relativa de GPER1 (IOD – densidade óptica integrada) normalizada pela β -actina; e as bandas (abaixo) referem-se a análise por Western Blot das proteínas GPER1 e β -Actina em células LNCaP dos grupos experimentais. Cada linha representa um pool de 3 amostras de um mesmo grupo. * $p < 0,05$.

MAPK fosforilada (pERK1/2)

Os gráficos das expressões das MAPK (pERK1/2) fosforiladas mostraram diferença nos tempos de 45 minutos e 3 horas de exposição. Após 45 minutos de exposição, houve um aumento de pERK1/2 no grupo MBP quando comparado ao grupo controle. Após 3 horas de exposição, o tratamento com o G15 foi capaz de aumentar a expressão de pERK1/2 em relação aos grupos controle e M+G. No tratamento de 12 horas não houve diferença entre os grupos para a expressão da forma fosforilada dessas proteínas (**Figura 9**).

Figura 9

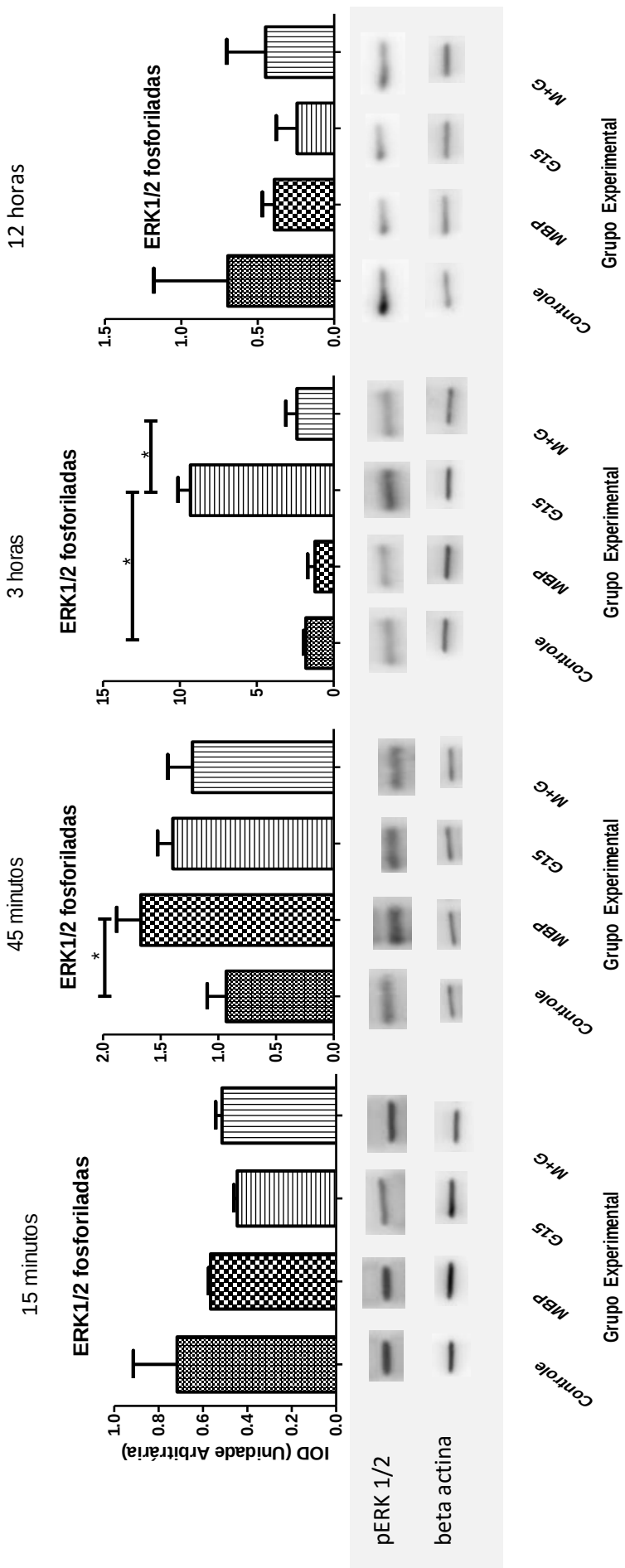


Figura 9: O gráfico representa a expressão relativa de pERK-1/-2 (IOD – densidade óptica integrada) normalizada pela β -actina; e as bandas (abaixo) referem-se a análise por Western Blot das proteínas pERK-1/-2 e β -Actina em células LNCaP dos grupos experimentais. Cada linha representa um pool de 3 amostras de um mesmo grupo. *p<0.05.

PI3K

A expressão de PI3K se mostrou invariável para os 4 tempos de tratamento. Não houve nenhuma diferença estatística entre os grupos para a expressão dessa proteína nos tempos estudados (**Figura 10**).

Figura 10

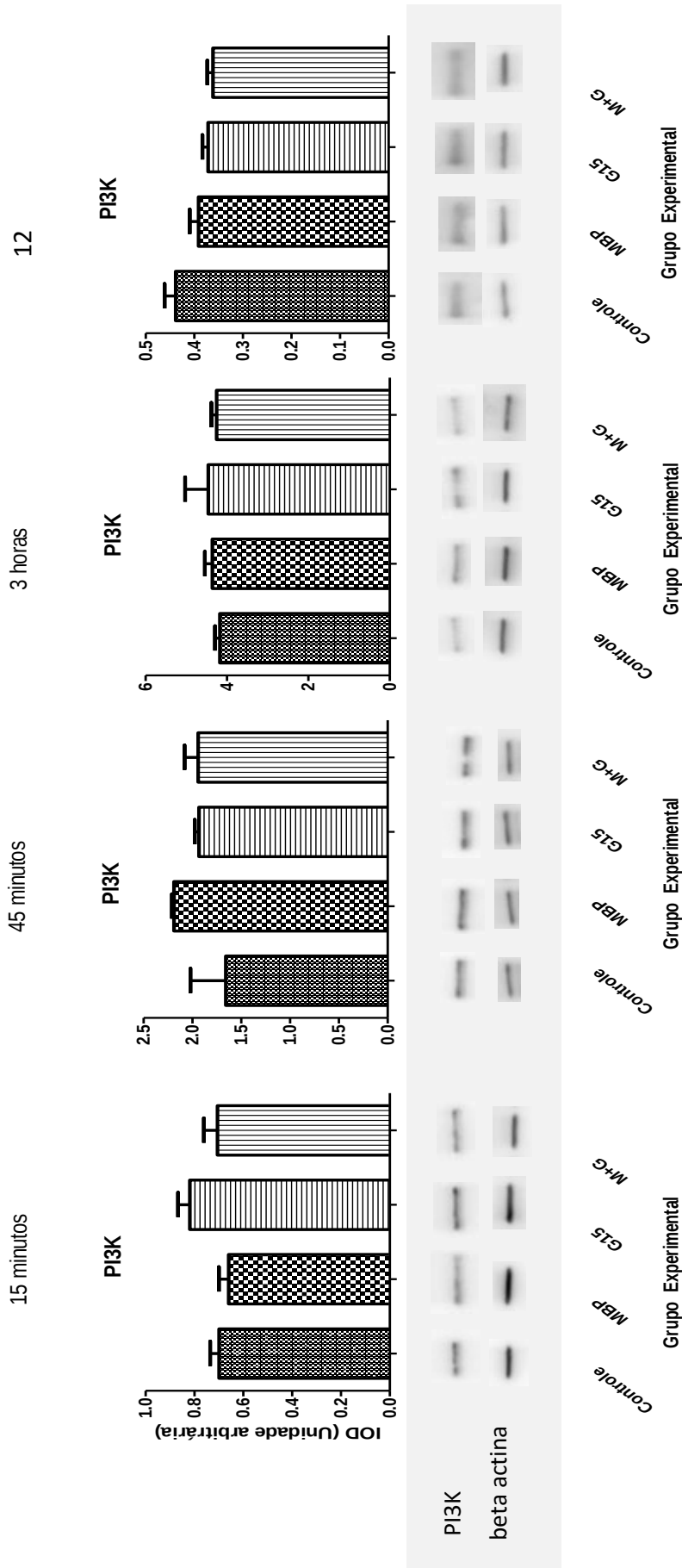


Figura 10: O gráfico representa a expressão relativa de PI3K (IOD – densidade óptica integrada) normalizada pela β -actina; e as bandas (abaixo) referem-se a análise por Western Blot das proteínas PI3K e β -Actina em células LNCaP dos grupos experimentais. Cada linha representa um pool de 3 amostras de um mesmo grupo.

pAKT

A expressão para pAKT também não sofreu variações de acordo com os diferentes tratamentos nos tempos testados. Assim como para PI3K, não houve diferença estatística na expressão de AKT entre nenhum grupo nos tempos estudados (**Figura 11**).

Figura 11

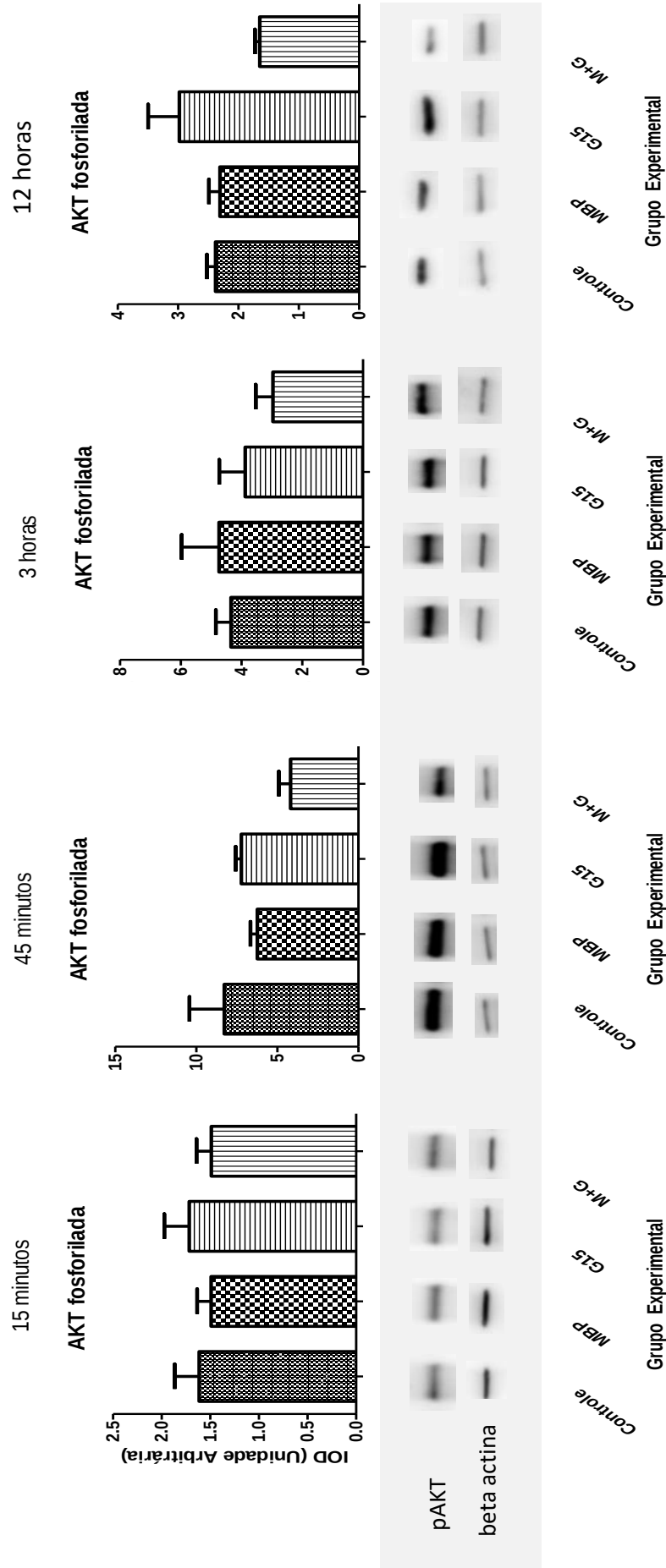


Figura 11: O gráfico representa a expressão relativa de pAKT (IOD – densidade óptica integrada) normalizada pela β -actina; e as bandas (abaixo) referem-se a análise por Western Blot das proteínas pAKT e β -Actina em células LNCaP dos grupos experimentais. Cada linha representa um pool de 3 amostras de um mesmo grupo.

5.4.2. Avaliação dos efeitos tardios sobre a transcrição gênica e ativação de proteínas da via do GPER1

Para avaliação dos efeitos tardios dos tratamentos realizou-se o estudo das expressões genica e proteica de importantes participantes da via do GPER1, como o próprio receptor GPER1, EGFR, PI3K, AKT e as MAPK 1 e 3 (ERKs -2 e -1, respectivamente), frente às exposições por um período de 12 horas.

GP_{ER}1

Foi observada diferença estatística na expressão gênica de *GP_{ER}1* para o grupo MBP em relação ao controle e ao grupo M+G (**Figura 12**). Já para expressão proteica de *GP_{ER}1*, os grupos MBP e G15 apresentaram aumento na expressão em relação ao grupo M+G (**Figura 13**).

Figura 12

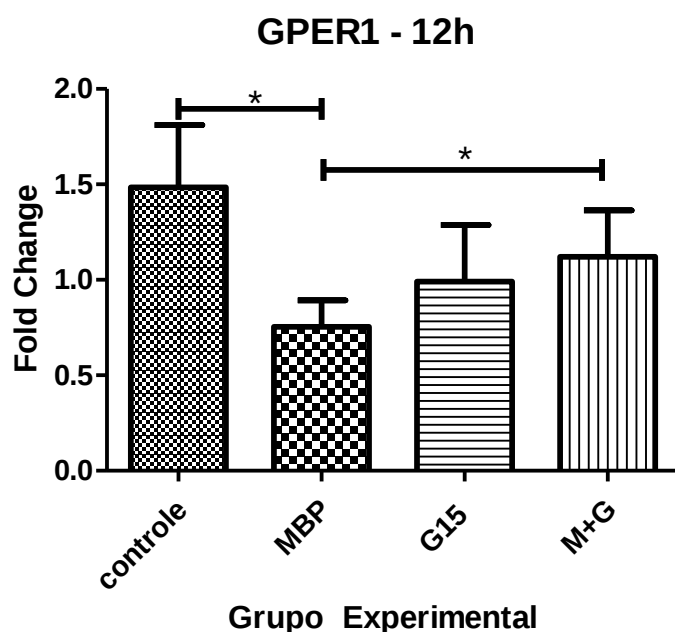


Figura 12: Níveis de expressão de *GP_{ER}1* estimados por RT-qPCR (SYBR Green). A expressão de cada mRNA foi normalizada pelo *HPRT1*. Os dados são expressos como *fold change* (média ± erro padrão). * $p \leq 0.05$.

Figura 13

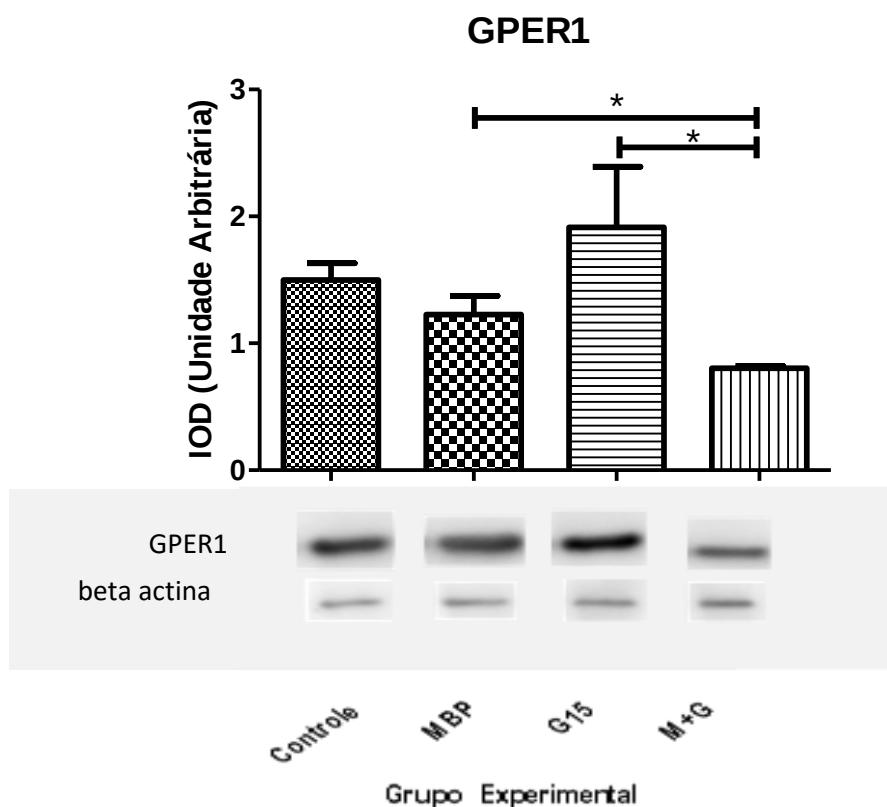


Figura 13: O gráfico representa a expressão relativa de *GP_{ER}1* (IOD – densidade óptica integrada) normalizada pela β -actina; e as bandas (abaixo) referem-se a análise por Western Blot das proteínas *GP_{ER}1* e β -Actina em células LNCaP dos grupos experimentais. Cada linha representa um pool de 3 amostras de um mesmo grupo. * $p < 0.05$.

EGFR

Para a expressão gênica de *EGFR* observou-se diferença estatística entre os grupos controle e MBP e entre MBP e M+G (**Figura 14**). As expressões proteicas de EGFR não mostraram diferença estatística entre os tratamentos após 12 horas de exposição (**Figura 15**).

Figura 14

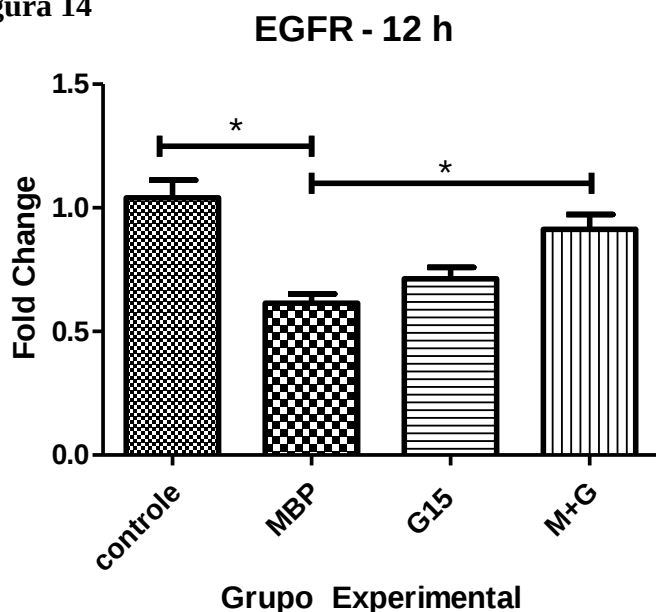


Figura 14: Níveis de expressão de *EGFR* estimados por RT-qPCR (SYBR Green). A expressão de cada mRNA foi normalizada pelo *HPRT1*. Os dados são expressos como *fold change* (média ± erro padrão). * $p \leq 0.05$.

Figura 15

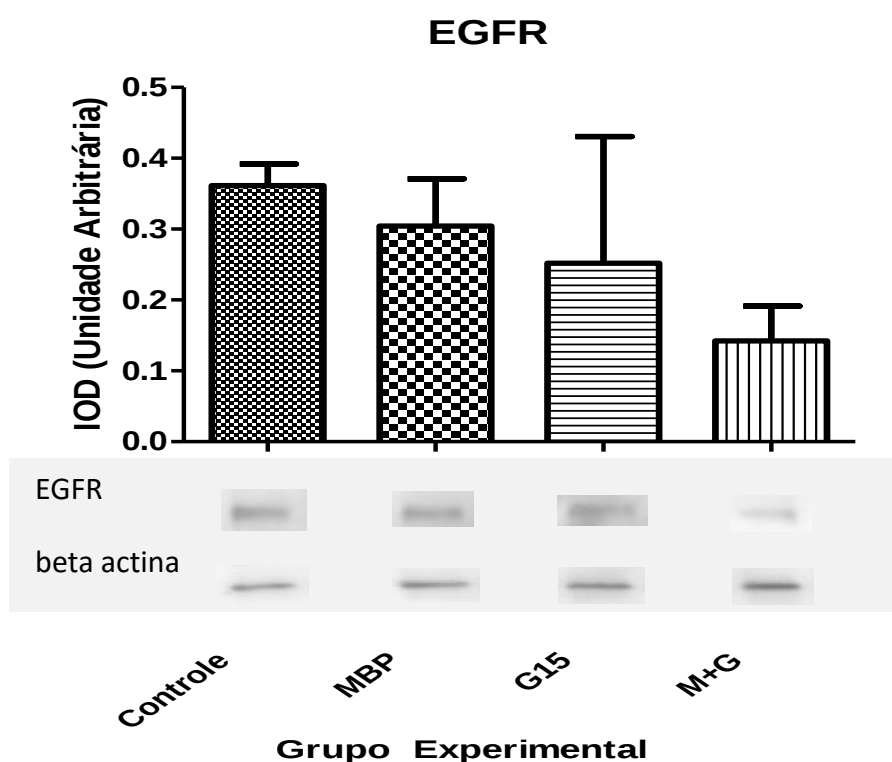


Figura 15: O gráfico representa a expressão relativa de EGFR (IOD – densidade óptica integrada) normalizada pela β -actina; e as bandas (abaixo) referem-se a análise por Western Blot das proteínas EGFR e β -Actina em células LNCaP dos grupos experimentais. Cada linha representa um pool de 3 amostras de um mesmo grupo. * $p < 0,05$.

PI3K

Para a expressão gênica de *PIK3CA* foi observada diferença diminuição entre o grupo G15 e os grupos controle e M+G e entre o grupo MBP e o M+G (**Figura 16**). A expressão proteica de PI3K se mostrou invariável para os tratamentos (**Figura 17**).

Figura 16

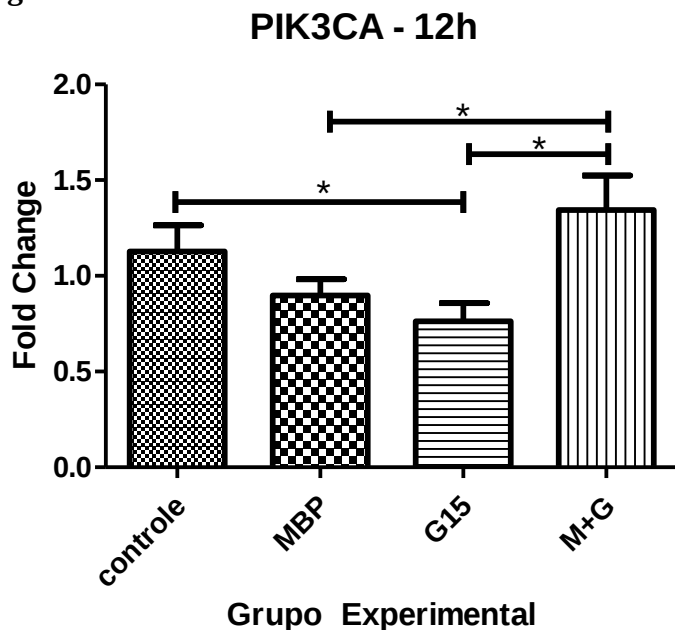


Figura 16: Níveis de expressão de *PIK3CA* estimados por RT-qPCR (SYBR Green). A expressão de cada mRNA foi normalizada pelo *HPRT1*. Os dados são expressos como *fold change* (média ± erro padrão). * $p \leq 0.05$.

Figura 17

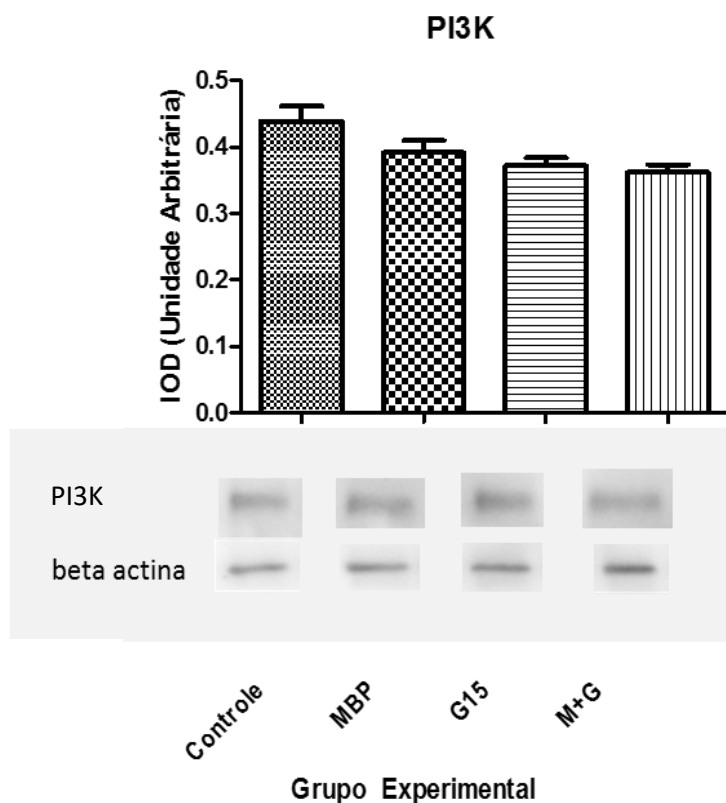


Figura 17: O gráfico representa a expressão relativa de PI3K (IOD – densidade óptica integrada) normalizada pela β -actina; e as bandas (abaixo) referem-se a análise por Western Blot das proteínas PI3K e β -Actina em células LNCaP dos grupos experimentais. Cada linha representa um pool de 3 amostras de um mesmo grupo. * $p < 0,05$.

AKT

Houve diminuição da expressão gênica de *AKT1* entre os tratamentos MBP e o controle (**Figura 18**). Na **Figura 19** se vê a expressão proteica de AKT em suas formas total e fosforilada, assim como a razão entre as duas. Não houve diferença estatística entre as expressões dos diferentes tratamentos durante a exposição 12 horas, tal qual para a razão entre a forma fosforilada e total dessa proteína.

Figura 18

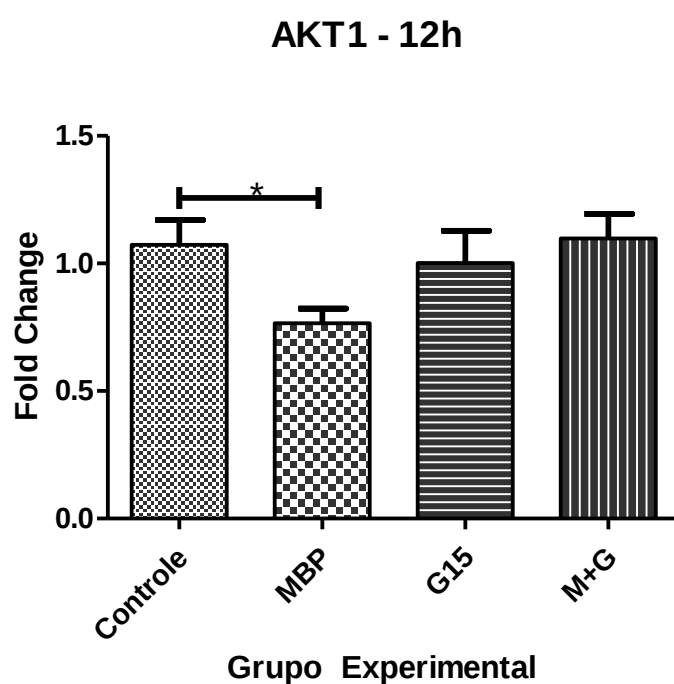


Figura 18: Níveis de expressão de *AKT1* estimados por RT-qPCR (SYBR Green). A expressão de cada mRNA foi normalizada pelo *HPRT1*. Os dados são expressos como *fold change* (média ± erro padrão). * $p \leq 0.05$.

Figura 19

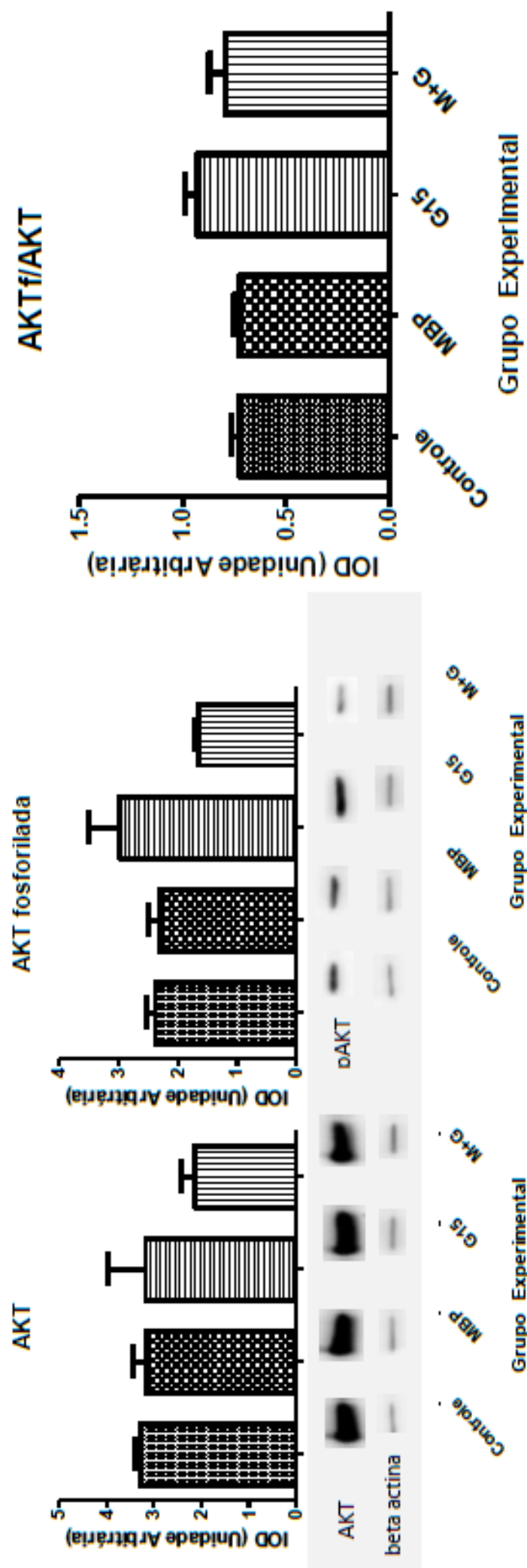


Figura 19: O gráfico representa a expressão relativa de AKT total e fosforilada (IOD – densidade óptica integrada) normalizada pela β -actina; e as bandas (abaixo) referem-se a análise por Western Blot das proteínas AKT, pAKT e β -Actina em células LNCaP dos grupos experimentais. Cada linha representa um pool de 3 amostras de um mesmo grupo.

MAPK (ERK-1/-2)

Para a *MAPK1* (ERK-2) houve diminuição na expressão desse gene nos grupos MBP e G15 quando comparados ao grupo controle e para o grupo G15, quando comparado ao M+G (**Figura 20**). A expressão de *MAPK3* (ERK-1) apresentou diferença estatística para os grupos MBP e G15 quando comparados ao controle, para o grupo G15 observou-se diferença também entre o grupo M+G (**Figura 21**).

Figura 20

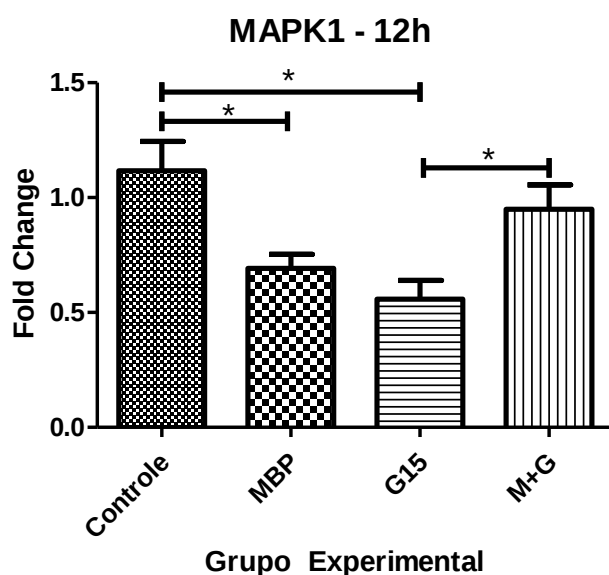


Figura 20: Níveis de expressão de *MAPK1* estimados por RT-qPCR (SYBR Green). A expressão de cada mRNA foi normalizada pelo *HPRT1*. Os dados são expressos como *fold change* (média ± erro padrão). * $p \leq 0.05$.

Figura 21

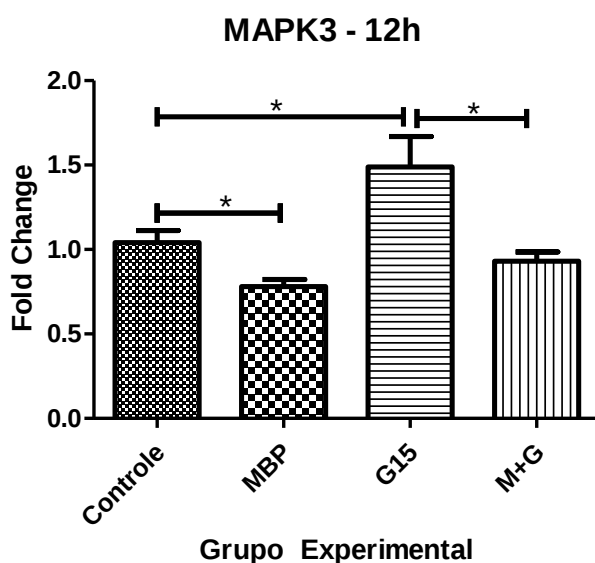


Figura 21: Níveis de expressão de *MAPK3* estimados por RT-qPCR (SYBR Green). A expressão de cada mRNA foi normalizada pelo *HPRT1*. Os dados são expressos como *fold change* (média ± erro padrão). * $p \leq 0.05$.

A expressão proteica de MAPK (Erk-1/-2) total e em sua forma ativa (fosforilada) é apresentada na Figura 22. O primeiro gráfico, da esquerda para a direita, corresponde à expressão de MAPK total, o gráfico do meio à expressão de MAPK fosforilada e o gráfico da direita representa a razão entre a expressão de MAPK total e fosforilado. Não foi observada diferença estatística entre os grupos tratados por 12 horas para MAPK total ou para AR fosforilado. Também não houve diferença estatística entre os grupos na razão entre AR fosforilado e total.

Figura 22

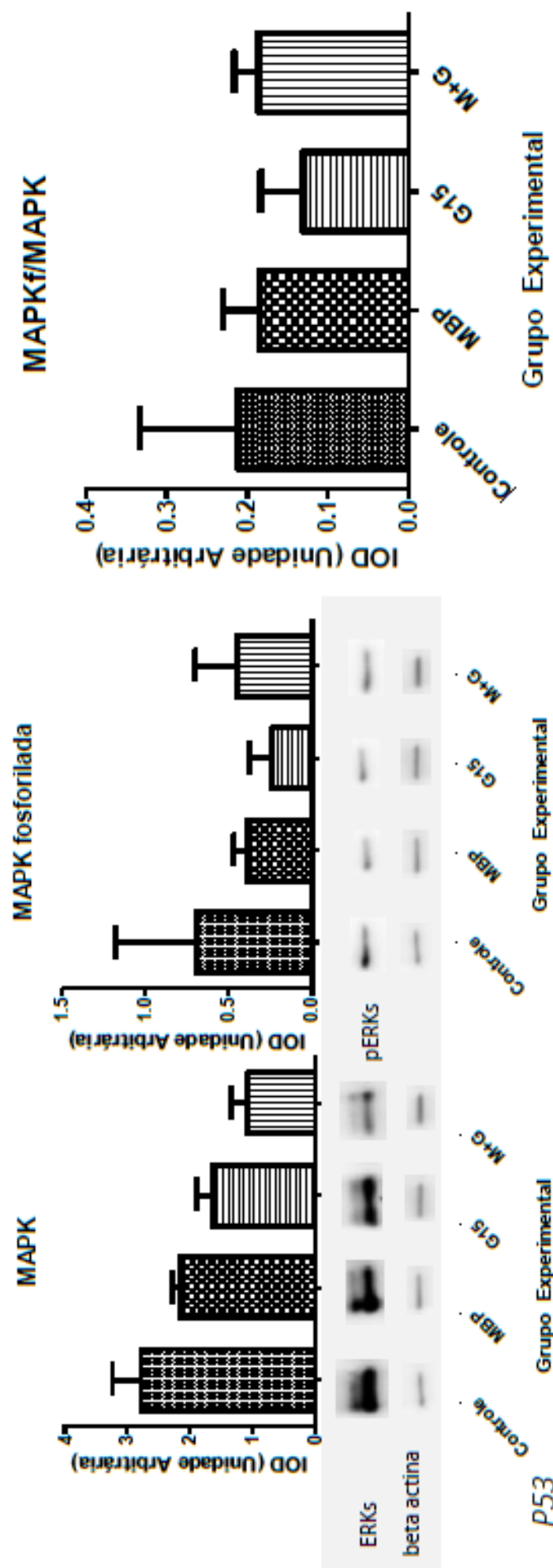


Figura 22: O gráfico representa a expressão relativa de MAPK (ERKs-1/-2) total e fosforilada (IOD – densidade óptica integrada) normalizada pela β -actina; e as bandas (abaixo) referem-se a análise por Western Blot das proteínas ERK-1/-2, pERK-1/-2 e β -Actina em células LNCaP dos grupos experimentais. Cada linha representa um pool de 3 amostras de um mesmo grupo.

5.4.3. Avaliação de proteínas relacionadas à progressão tumoral

Além das análises de genes e proteínas relacionados com a via do GPER1 foram avaliadas as expressões de proteínas relacionadas à progressão tumoral da próstata: receptores ER-beta, receptores AR em suas formas total e fosforilada e da proteína supressora tumoral P53.

ER-beta – 12 horas

A expressão para receptores estrogênicos ER-beta não sofreu diferença estatística mediante aos tratamentos por 12 horas (**Figura 23**).

Figura 23

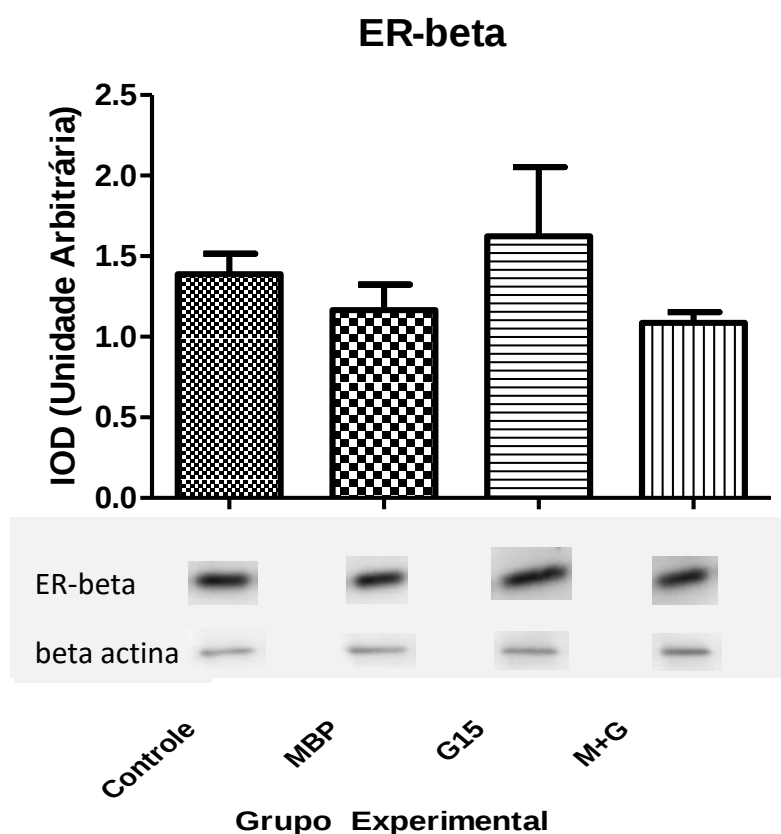


Figura 23: O gráfico representa a expressão relativa de ER β (IOD – densidade óptica integrada) normalizada pela β -actina; e as bandas (abaixo) referem-se a análise por Western Blot das proteínas ER β e β -Actina em células LNCaP dos grupos experimentais. Cada linha representa um pool de 3 amostras de um mesmo grupo.

AR

Avaliou-se a expressão proteica dos receptores de andrógenos (AR) totais e em sua forma ativa (fosforilada). Os resultados são apresentados separadamente a seguir (Figura 24). O primeiro gráfico, da esquerda para a direita, corresponde à expressão de AR total, o gráfico do meio à expressão de AR fosforilado e o gráfico da direita representa a razão entre a expressão de AR total e fosforilado. Não foi observada diferença estatística entre os grupos tratados por 12 horas para AR total ou para AR fosforilado. Também não houve diferença estatística entre os grupos na razão entre AR fosforilado e total.

Figura 24

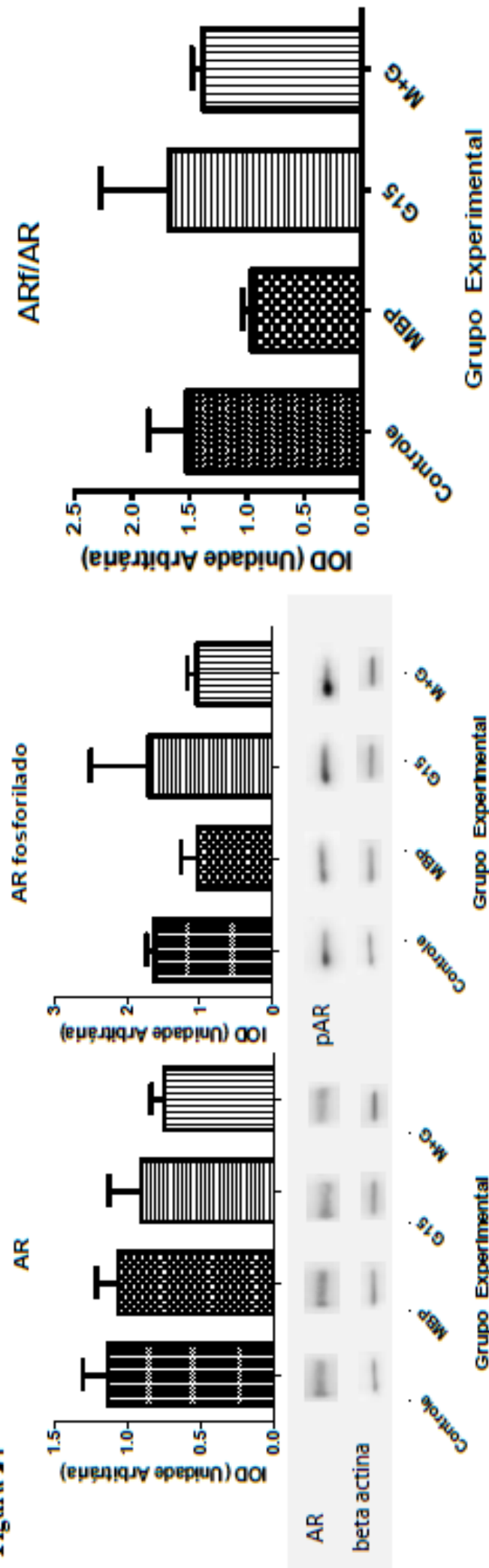


Figura 24: O gráfico representa a expressão relativa de AR e pAR (IOD – densidade óptica integrada) normalizada pela β -actina; e as bandas (abaixo) referem-se a análise por Western Blot das proteínas AR, pAR e β -Actina em células LNCaP dos grupos experimentais. Cada linha representa um pool de 3 amostras de um mesmo grupo.

Figura 25

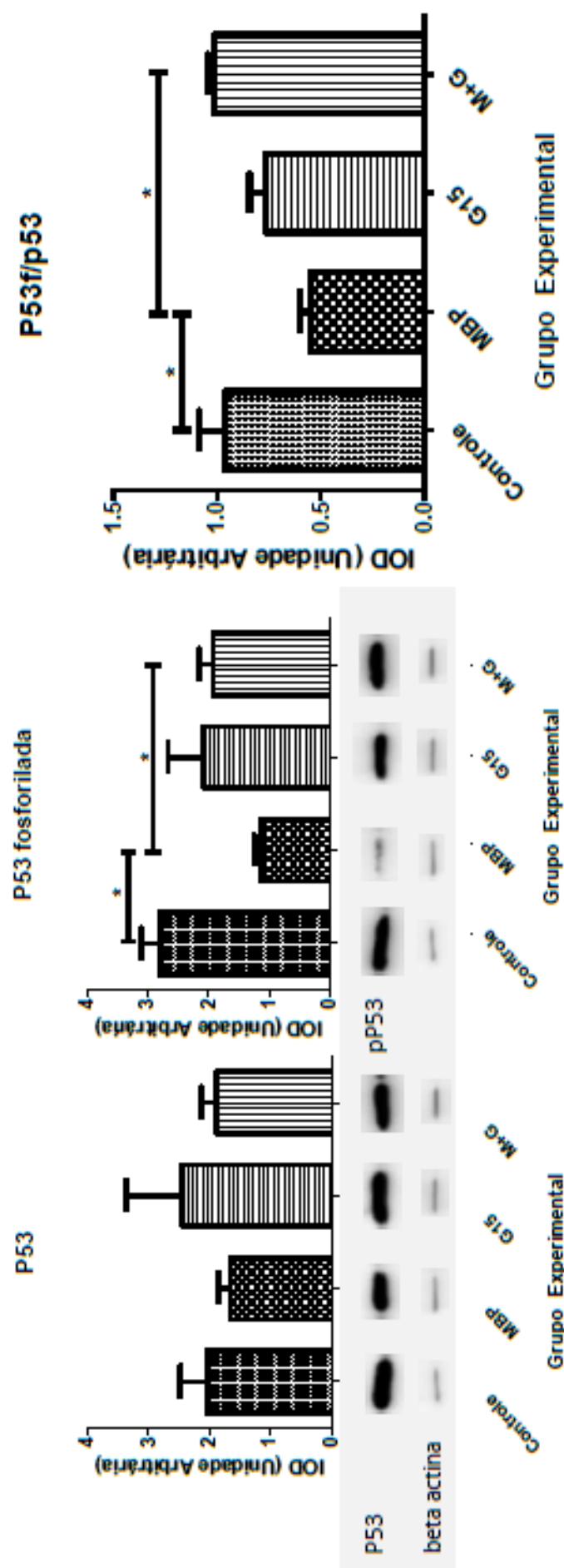


Figura 25: O gráfico representa a expressão relativa de P53 total e fosforilada (IOD – densidade óptica integrada) normalizada pela β -actina; e as bandas (abaixo) referem-se a análise por Western Blot das proteínas P53, pP53 e β -Actina em células LNCaP dos grupos experimentais. Cada linha representa um pool de 3 amostras de um mesmo grupo. * $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

Os ftalatos constituem um grupo de moléculas utilizadas na fabricação de vários insumos plásticos e cosméticos de uso cotidiano, e seu estudo têm mostrado atividade desreguladora anti-androgênica (FOSTER, 2006) e estrogênica (HU et al., 2013), interferindo em processos dependentes de hormônios. Por muitos anos, os estudos para o entendimento da base da carcinogênese prostática basearam-se no papel dos andrógenos como o principal fator etiológico e de progressão do adenocarcinoma prostático (COOPER; PAGE, 2014).

Apesar de a dependência androgênica ter um papel de destaque na carcinogênese prostática, estrógenos também influenciam significativamente o desenvolvimento e progressão de cânceres hormônio-relacionados (KAWASHIMA; NAKATANI, 2012; PRINS; KORACH, 2008).

Inicialmente acreditava-se que os efeitos estrogênicos seriam mediados por um único receptor de estrógenos, descoberto em 1958, que mais tarde passaria a ser denominado ER α (JENSEN; JACOBSEN, 1960). Como, no microambiente prostático, o ER α é localizado, quase exclusivamente, no compartimento estromal (SUGIYAMA et al., 2010), havia dúvidas em relação aos efeitos de estrógenos no epitélio. A resposta a essa lacuna veio quarenta anos mais tarde, através da descoberta do ER β na próstata de roedores (KUIPER et al., 1996).

Em contrapartida, estudos mais recentes têm mostrado o papel do receptor de estrógenos acoplado à proteína G (GPER1) na ativação de proteínas importantes para a proliferação, sobrevivência e morte celular, através da ligação de moléculas com características estruturais estrogênicas (MAGGIOLINI; PICARD, 2010; PROSSNITZ et al., 2008). Considerando que evidências cada vez mais robustas relacionam os estrógenos com o desenvolvimento e progressão do câncer de próstata (NELSON et al., 2014); que o GPER1 tem sido apontado como um mediador importante na ação estrogênica por uma via não genômica (BOLOGA et al., 2006; COMEGLIO et al., 2014), e ainda, que o GPER1 mostrou-se responsivo a outros xenoestrógenos como o bisfenol A e a genisteína (THOMAS; DONG, 2006), nossos resultados devem contribuir para a elucidação do mecanismo envolvido na atividade do MBP em células tumorais prostáticas.

Na tentativa de se estabelecer uma dose de baixo impacto toxicológico e que exercesse efeitos biológicos, optamos pela dose de 10 μ M de MBP para as células tumorais prostáticas. Pelo teste de citotoxicidade encontramos um valor para o IC₅₀ compreendido entre 1 e 10 mM. Para células de Sertoli, Hu e colaboradores (2013) encontraram um IC₅₀ de 16mM de MBP, mostrando que a relação dose-resposta é diferente para diferentes tipos celulares e que as comparações entre modelos *in vitro* devem levar em conta essas diferenças.

No teste de migração *transwell* foi verificado que as células LNCaP de todos os tratamentos foram capazes de migrar pelos poros dos insertos de 8 μ m, o que foi potencializado à partir da atividade quimioatrativa do soro fetal bovino. Uma vez que a linhagem LNCaP é derivada da metástase do linfonodo supra clavicular de um homem, infere-se que suas células tenham capacidade de realizar a migração epitélio-mesenquimal, tão importante para o sucesso da metástase. Dessa maneira, todos os grupos experimentais apresentaram potencial migratório, inclusive o grupo controle. No entanto, as células expostas ao MBP tiveram um aumento na taxa de migração celular em relação aos demais grupos.

Relatos anteriores apontaram para um aumento do potencial migratório promovido por diferentes ftalatos em diferentes células tumorais (*in vitro*). Tsai e colaboradores (2014) mostraram que o BBP (benzo-butil ftalato) foi capaz de elevar o potencial migratório de células de carcinoma hepatocelular Huh7 (TSAI et al., 2014). Células provenientes de carcinoma testicular embrionário (NT2/D1) expostas ao MEHP (mono-2-[etil-exil]-ftalato) tiveram seu potencial migratório aumentado após 36 horas de exposição (YAO; LIN; RICHBURG, 2012). Além disso, os resultados obtidos nos permitem inferir, para as células tumorais prostáticas, que o G15 foi capaz de bloquear o efeito do MBP sobre a migração celular, uma vez que quando administrados em conjunto não foram capazes de aumentar a migração celular das LNCaP. Sabendo-se que o G15 é um antagonista específico apenas para os receptores GPER1 pode-se presumir que esse resultado aponta para a ativação desses receptores na mediação do efeito do MBP na migração das células LNCaP. Ainda, esse resultado corrobora com os achados de Tsai e colegas que verificaram que a ativação de GPER1 é necessária para a migração celular no câncer de endométrio (TSAI et al., 2013).

Analisando-se a expressão de GPER1 ao longo do tempo, observou-se que no primeiro momento (15 minutos) não houve diferença entre os grupos. Após 45 minutos de exposição, o MBP demonstrou-se capaz de aumentar a expressão desse receptor quando comparado ao grupo controle. Após 3 horas de exposição, o grupo G15 teve a expressão de GPER1 aumentada em relação aos grupos controle e M+G, e no tempo de 12 horas não houve diferenças quanto à expressão de GPER1 entre os grupos. Para a discussão desses resultados há de se levar em consideração alguns pontos referentes ao tipo celular e as vias ativadas por GPER1.

A ativação de GPER1 por ligante específico desencadeia uma série de respostas celulares de tempo curto, já que se trata de uma via não genômica que ativa quinases específicas capazes de interferir com o ciclo celular, aumentando a sobrevivência ou induzindo apoptose (WANG et al., 2010), por exemplo. Além disso, as principais quinases ativadas por GPER1 são as ERKs e a AKT, proteínas que não são exclusivas dessa via e que podem aumentar ou diminuir sua fosforilação por diferentes estímulos. Por exemplo, sabe-se que as células tumorais prostáticas podem adquirir insensibilidade a andrógenos durante a progressão tumoral e que as ERKs e a AKT são ativadas por receptores de andrógenos (*outlaw*) e por fatores de crescimento, o que permite que essas células aumentem sua capacidade de sobrevivência e seu potencial migratório (FELDMAN; FELDMAN, 2001).

A análise das MAPKs (ERK-1/-2) fosforiladas parecem ajudar a elucidar as vias de ação do MBP nas células LNCaP, corroborando a hipótese de que seus efeitos ocorrem via GPER1. A via das Raf-MEK-ERK é extensamente relacionada com a ativação de receptores acoplados à proteína G (CAUNT et al., 2006), inclusive foi demonstrado que, em células de adenocarcinoma de mama, a ativação das ERKs-1/-2 induzida por estrógenos se dá exclusivamente através de GPER1 (FILARDO et al., 2000). Os resultados da expressão das MAPKs (ERK-1/-2) fosforiladas mostraram que em 45 minutos o MBP foi capaz de aumentar a expressão dessas proteínas, seguindo o mesmo padrão de expressão do GPER1 para esse mesmo tempo, ou seja, o aumento de expressão das pERK-1/-2 se mostrou associado ao aumento de expressão também dos receptores GPER1, ambos induzidos pelo MBP e bloqueados pelo antagonista G15.

Após 3 horas observamos um perfil de expressão totalmente diferente do observado em 15 e 45 minutos, onde o tratamento com G15 apareceu aumentando a expressão de GPER1 e pERK-1/-2. Considerando que após 12 horas de exposição os níveis de ERK-1/-2 não são diferentes entre os tratamentos, podemos inferir que o antagonismo provocado por G15 em curto prazo, possa desencadear uma resposta celular na tentativa de aumentar os níveis de GPER1 para que as vias ativadas pelo mesmo sejam restabelecidas, e dessa forma após 12 horas observamos somente o GPER1 aumentado, porém a diferença entre os grupos é menor, o que aparentemente, sinaliza para o reequilíbrio do sistema ativado por GPER1.

Achados semelhantes foram encontrados em células de Sertoli tratadas com MBP, em que se verificou que a expressão gênica de *GPER1* alcança seu máximo aos 10 minutos e com o passar do tempo essa expressão vai diminuindo até retornar a valores normais (HU et al., 2013). Visto que há um atraso entre a modulação da expressão gênica e seu resultado proteico o que vemos nos resultados de 45 minutos pode ser equivalente à resposta encontrada por Hu e colegas expondo o MBP às células de Sertoli por 10 minutos.

No grupo M+G não foi observado o mesmo comportamento tempo-resposta do grupo G15, o que era esperado tendo em vista que o antagonista foi disponibilizado para as células antes do MBP. Interessantemente, o grupo M+G comportou-se em curto prazo como o grupo G15 e nos tempos de exposição mais longos como o grupo MBP. Talvez, a afinidade e a biodisponibilidade do antagonista pelo receptor possa diminuir com o passar do tempo o que permitiria a ligação do MBP em parte dos receptores, conferindo um comportamento não muito claro em relação à ativação da via, porém essa hipótese deve ser mais bem investigada futuramente.

Após 12 horas de exposição observamos diminuição na expressão dos genes *GPER1*, *EGFR*, *AKT*, *MAPK1*, *MAPK3* no grupo MBP em relação ao controle, do gene *PI3K* no grupo G15 em relação ao controle e M+G e aumento na expressão do gene *MAPK3* no grupo G15 em relação ao controle e M+G. Esses resultados mostraram que houve uma diminuição (ainda que não estatística para alguns genes) entre o grupo MBP e o grupo controle. Tal padrão de resposta se repete para a expressão da maioria dos outros genes relacionados à via de GPER1 investigados. Uma possível explicação para a redução na expressão de *GPER1* e de outros genes da via após tratamento com MBP seria

resultado de uma resposta compensatória tendo em vista o aumento prévio de sua expressão nos curtos períodos de exposição. Essa hipótese pode ser corroborada por um estudo conduzido com células de Sertoli em cultura, onde o tempo de exposição das células ao MBP e a expressão gênica de *GPER1* foram inversamente proporcionais, ou seja, com o passar do tempo a expressão de *GPER1* diminuiu (HU et al., 2013). No entanto, há de se considerar que a maioria desses genes sofre regulação por fatores transcricionais regulados por outras vias, que não apenas a do GPER1.

Ainda nesse sentido, os níveis proteicos após 12 horas de exposição para as proteínas EGFR, ERK1/2, pERK1/2, AKT, pAKT, PI3K pertencentes à via do GPER1 não mostraram-se diferentes entre os grupos, o que sustenta a tese de que a ativação de GPER1 pelo MBP e outros desreguladores endócrinos, como o bisfenol A, ocorre a curto prazo (THOMAS; DONG, 2006; HU et al., 2013).

Com a finalidade de avaliar a expressão de proteínas importantes para a progressão tumoral prostática e que desencadeiam resposta mais lenta por ativar vias com regulação genômica, as proteínas AR, pAR, ER β , P53 e pP53 foram estudadas após 12 horas de exposição. Nesse sentido, não houve diferença entre a expressão das proteínas AR, pAR, ER β e P53 entre os grupos. No entanto, houve uma redução na expressão da proteína P53 fosforilada no grupo MBP em relação ao controle e M+G.

A proteína P53 é conhecida por ser uma proteína supressora de tumores, uma vez que quando fosforilada deflagra a apoptose (ASHCROFT; KUBBUTAT; VOUSDEN, 1999; SINGH; MATANHELIA; MARTIN, 2008), algo evitado pela célula tumoral. Os resultados mostram uma diminuição na expressão de P53 fosforilada no grupo tratado apenas com o MBP, sinalizando que esse ftalato pode favorecer o potencial carcinogênico das LNCaP por afetar a apoptose induzida por P53 diminuindo sua expressão na forma fosforilada. A fosforilação da P53 é realizada predominantemente por ATM, uma quinase que está relacionada ao dano do DNA (SHILOH; ZIV, 2013). Um dos fatores que ativam a ATM é o aumento de EROs (espécies reativas de oxigênio), o qual já foi observado em células LNCaP expostas a MEHP (mono-etil-exil-ftalato) e DEHP (di-etil-exil-ftalato) (ERKEKOĞLU et al., 2011).

Assim, os resultados obtidos confirmam que o MBP é capaz de ativar os receptores GPER1 e promover a ativação de ERK1/2, aumentar a capacidade migratória

das células LNCaP, além de induzir redução na fosforilação da P53. Esses resultados em conjunto mostraram que o MBP favorece a progressão tumoral em células LNCaP.

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.

8. ANEXOS

8.1. Anexo 1

Assim que as amostras foram extraídas correu-se um gel de agarose para se avaliar a qualidade do RNA obtido (**Figura 26**). Na ausência de degradação visível realizou-se um teste no Bioanalyzer System para que o número da integridade do RNA (RIN) de cada amostra fosse calculado. A média do RIN para as amostras foi de 9,13.

Figura 26

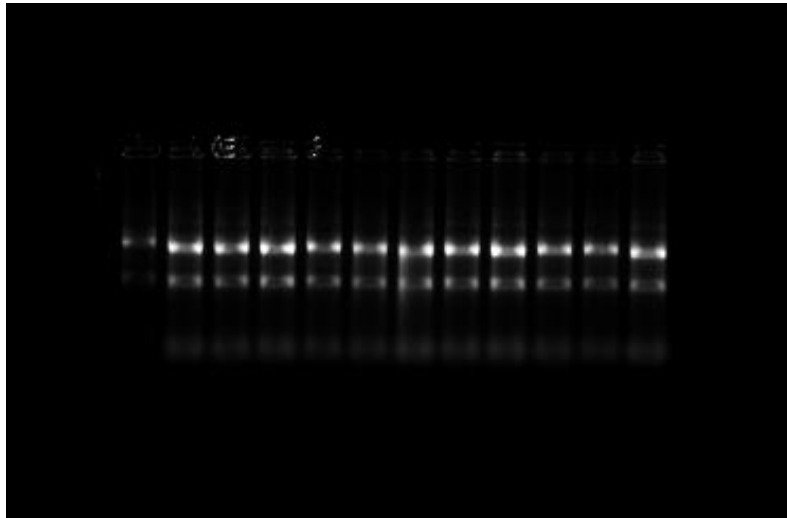


Figura 26: Gel de agarose para avaliar a qualidade dos RNAs obtidos. Deve-se observar apenas duas bandas bem definidas (no centro da imagem), qualquer arraste pode sinalizar degradação dos RNAs em análise.

8.2. Anexo 2

Para a escolha do gene a ser usado como controle endógeno comparou-se o padrão de expressão de cada um dos candidatos, *B2M* e *HPRT1*, assim como o score gerado pelo DataAssist (**Figura 27**). Para o gene *B2M* o score foi de 0.929, enquanto o do *HPRT1* foi de 0,659, isso indica que para essas amostras o gene endógeno que mostrou menor variação foi o *HPRT1*, justificando seu uso nas análises genômicas seguintes.

Figura 27:

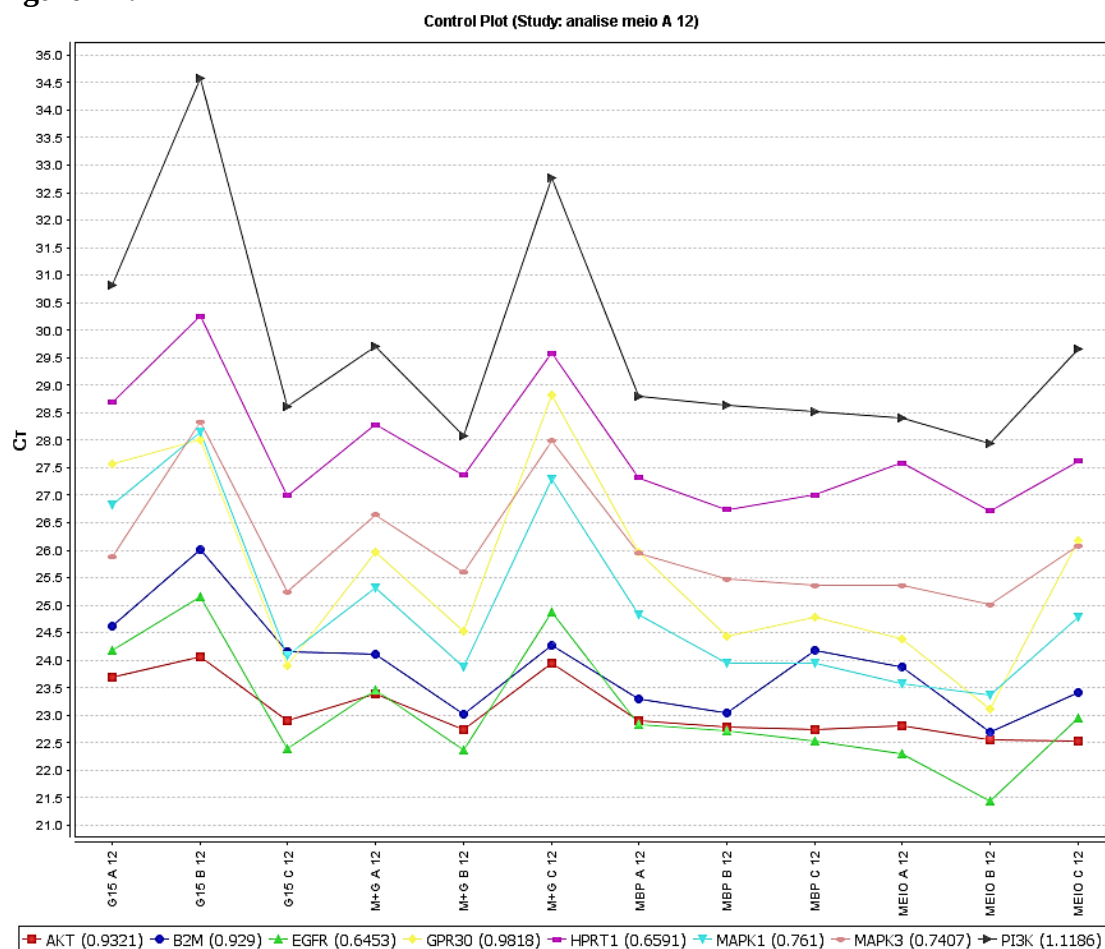


Figura 27: Gráfico da comparação do score dos dois genes candidatos a controle endógeno, *B2M* (em azul escuro) e *HPRT1* (em violeta).

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.