

## **CARACTERIZAÇÃO DA BIOATIVIDADE ESTROGÊNICA DE PARABENOS E PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO USANDO LINHAGENS DE CÉLULAS DO CÂNCER DE MAMA**

**Estudante de Graduação Autor:** Débora Roncato Magnani

**Colaborador:** Sabrina Mendes Botelho

**Orientador:** Prof. Dr. Andrei Leitão

IQSC - USP - São Carlos

deboraroncato@estudante.ufscar.br

### **Objetivos**

O câncer de mama é o que apresenta maior incidência na população feminina, excluindo o câncer de pele não melanoma. Vários compostos com atividade endócrina são encontrados em efluentes<sup>1</sup> e não são inativados pelos métodos de tratamento de água convencionais. Assim, o metilparabeno, seus derivados e produtos de degradação<sup>2</sup> foram estudados em modelos celulares de câncer de mama responsiva ao estrógeno (MCF-7) ou independente (MDA-MB-231). Essas substâncias foram testadas com o objetivo de caracterizar a bioatividade de poluentes aquáticos estrogênicos a partir de ensaios usando diferentes linhagens de células de câncer de mama.

### **Métodos e Procedimentos**

As células foram cultivadas em frascos de cultura com os respectivos meios a 37°C, 90% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>. Após atingirem 80% de confluência, as mesmas foram contadas na câmara de Neubauer, a concentração ajustada e adicionadas em placas de 96 poços. Foram utilizadas 4 placas para cada linhagem, havendo posterior replicação dos ensaios. Nessa etapa, utilizou-se meio de cultura tratado para ambas

as células. Para este meio de cultura tratado, o soro de feto bovino (FBS) foi submetido a um processo de purificação com carvão ativado e dextran para remover hormônios endógenos. Além disso, não foi adicionado vermelho fenol. No segundo dia, foram adicionados os controles e os compostos. Os controles utilizados na placa consistiram em: negativo (meio de cultura tratado com 0,5% de álcool) e positivo (meio de cultura tratado com 0,5% de álcool e 10 nM de estradiol), além do “branco” que consistiu em somente meio de cultura tratado. No experimento, foram testadas diferentes concentrações (1000, 500, 200, 100 e 50 ng/L) de três compostos resultantes da degradação do metilparabeno, identificados como Inicial, Visível e UV. Para a linhagem MCF7 utilizou-se meio RPMI com FBS tratado sem vermelho fenol, para a linhagem MDA-MB-231 utilizou-se meio DMEM com FBS tratado sem vermelho fenol. Os ensaios foram feitos em triplicatas e cada um deles contou com 4 placas, para cada linhagem celular, sendo que as leituras das placas foram feitas em 2, 4, 6 e 8 dias (uma placa para cada dia de incubação), justamente para analisar como as células reagem de acordo com cada amostra em um intervalo de tempo progressivo. Foi avaliado o crescimento e a viabilidade celular exposto à cada concentração de cada composto, sendo que 1 placa de cada cultura foi submetida à leitura a cada 48h,

fazendo a troca do meio de cultura das restantes, e repetindo-se o processo, totalizando em 10 dias de ensaio. Os ensaios utilizaram o método colorimétrico de MTT (1,0 mg/ml), um corante amarelo que se reduz a um produto roxo cuja tonalidade varia de acordo com a quantidade de células viáveis pois reage com o NADPH mitocondrial, na concentração celular de  $1.10^5$  células.mL<sup>-1</sup>. As células foram incubadas por 3 horas com o MTT e depois se fez a solubilização dos cristais formados com Dimetilsulfóxido (DMSO) para ser possível a realização da leitura no fluorímetro a 560 nm. Os dados foram analisados com o auxílio do Excel e do software GraphPad Prism v. 8.

## Resultados

Esses ensaios foram realizados para analisar se a replicação celular nos diferentes tratamentos e condições de tempo teria alteração significativa em razão de algum dos compostos testados. Nos ensaios com a linhagem MDA-MB-231, as células não tiveram um crescimento significativo na presença de estradiol (C+), ou seja, não teve a replicação afetada, por ser triplo-negativa. As amostras não foram tóxicas para a maioria das células, uma vez que os valores percentuais da viabilidade celular foram iguais ou acima do controle negativo. A análise demonstrou que não houve uma alteração significativa para estas amostras em relação ao controle negativo. Porém, para as amostras Visível e UV, houve uma pequena alteração em algumas concentrações (Figura 1), especialmente nos dias 2 e 4, podendo representar um momento em que os compostos foram possivelmente tóxicos, causando baixa viabilidade celular (menor que o controle negativo e menor que 100% de viabilidade). No entanto, mesmo com essa variação, não houve diferença significativa entre essas amostras e tempos de análise. Assim, os estudos evoluíram para uma análise da estrogenicidade para todas as amostras usando a linhagem MCF7.

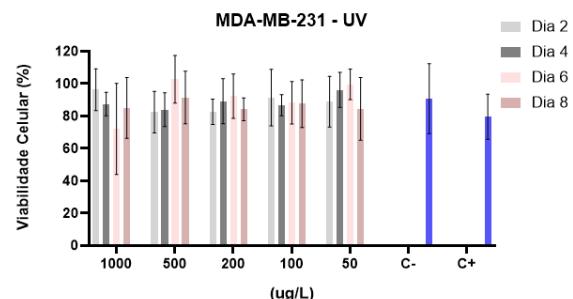


Figura 1: Ensaio de citotoxicidade com células da linhagem MDA-MB-231 utilizando concentrações da amostra “UV”, realizado durante 8 dias, com análise da replicação celular a cada 2 dias pelo método MTT. O controle negativo foi usado como referência.

Como esperado, as células da linhagem MCF7 apresentaram maior crescimento na presença do estradiol, uma vez que são hormônio dependentes (ER+). As amostras só apresentaram atividade estrogenica para o Inicial na concentração de 1000 ng/L após 8 dias de incubação (Figura 2).

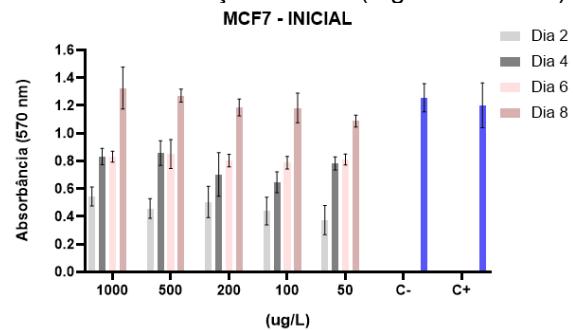


Figura 2: Ensaio de estrogenicidade com células da linhagem MDA-MB-231 utilizando concentrações da amostra “Inicial”, realizados durante 8 dias, com análise da replicação celular a cada dois dias pelo método MTT. O controle negativo foi usado como referência.

Não foi possível testar outros compostos derivados do metilparabeno devido a problemas relacionados a fatores externos que impossibilitaram a continuidade dos experimentos.

## Conclusões

Os resultados com as amostras indicaram que estas não foram citotóxicas ou estimularam a linhagem MDA-MB-231 nas concentrações testadas. Nos ensaios com a linhagem MCF7 foi observado que as amostras não apresentaram atividade estrogênica, com exceção do composto Inicial. Isso se deve, possivelmente, em decorrência da baixa concentração dos compostos no experimento. Nesse caso, a amostra não atua como agonista na atividade do receptor da célula, não desencadeando a reação de maior proliferação. Além disso, foi observado que as amostras foram citotóxicas ou inibiram a replicação celular na maioria das concentrações e dias, pois os valores de absorbância estavam abaixo da faixa do controle negativo. Este resultado foi muito relevante, pois demonstrou que os produtos de reação podem levar a alteração da resposta celular.

## Agradecimentos

CNPQ (2023-2160).

## Referências

<sup>1</sup>LECOMTE, S.; Habauzit, D.; Charlier, T.D.; Pakdel, F. Emerging Estrogenic Pollutants in the Aquatic Environment and Breast Cancer. *Genes*. 2017, 8, p. 229.

<sup>2</sup>PADOVAN, R.N.; Xavier, C.; Azevedo, E.B.; Carvalho, L.S.; Santos Neto, A.J.; Lanças, F.M.; Leitão, A.; Bergo, P.L.S. Degradation of hormones in tap water by heterogeneous solar TiO<sub>2</sub>-photocatalysis: Optimization, degradation products identification, and estrogenic activity removal. *J. Environ. Chem. Eng.* 2021, 9, p. 106-442.