

CARACTERIZAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE COMPOSTOS ESTROGÊNICOS E ANTI NEOPLÁSICOS EM LINHAGENS DE CÉLULAS DO CÂNCER DE MAMA

Aluna: Débora Roncato Magnani

Colaboradoras: Isabella Marques, Sabrina Mendes Botelho

Orientador: Prof. Dr. Andrei Leitão

IQSC - USP - São Carlos

deboraroncato@estudante.ufscar.br

Objetivos

Ensaios celulares apresentam grande relevância para a identificação de substâncias com novos mecanismos de ação ou na confirmação de um mecanismo já em teste¹. Neste estudo, o bisfenol A, seus derivados e produtos de degradação² foram testados em duas linhagens de câncer de mama: responsivas ao hormônio feminino estradiol (MCF7) e independente de hormônio (MDA-MB-231), com o objetivo de caracterizar a bioatividade de poluentes aquáticos estrogênicos processados por reações de fotocatalise. As substâncias foram estudadas com a finalidade de compreender como ocorre a sua atuação nas diferentes linhagens de células de câncer de mama; como isso afeta o seu crescimento.

Métodos e Procedimentos

As células foram cultivadas em frascos de cultura com os respectivos meios a 37°C, 90% de umidade e 5% de CO₂. Após atingirem 80% de confluência, as mesmas foram contadas na câmara de Neubauer, a concentração ajustada e adicionadas em placas de 96 poços. Inicialmente, três condições diferentes foram testadas: um meio tratado, controle negativo e um controle positivo com estradiol. Para o 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. Os controles consistiram em: negativo (meio de cultura sem tratamento com 0,5% de álcool) e positivo (meio de cultura tratado com 0,5% de álcool e 10 nM de estradiol). Os ensaios utilizaram o método colorimétrico de MTT na concentração celular de 1.10^5 células.mL⁻¹. Inicialmente, foi avaliado o crescimento celular avaliando os meios com e sem seus fatores hormonais e submetidos à leitura a cada 48h. Esse procedimento foi repetido a cada 48 horas, fazendo troca do meio de cultura, ao longo de 10 dias. Outro experimento conduzido, consistiu em avaliar seis compostos estrogênicos: BPA e mais cinco resultantes de sua degradação. 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 e vermelho fenol. Os controles (positivo e negativo) utilizados foram idênticos aos ensaios anteriores. As leituras foram realizadas a cada 48 horas, com subsequente troca de meio, por um período total de 10 dias. Os dados foram analisados com o auxílio do Excel e do software GraphPad Prism v. 8.

Resultados

Primeiramente, o estudo focou na substância estradiol e sua atividade estrogênica em ambas as linhagens (Figura 1).

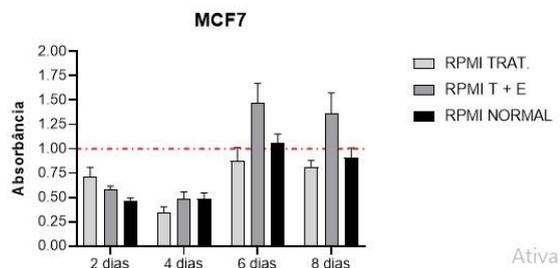


Figura 1: Ensaio das células da linhagem MCF7 utilizando estradiol. Na escala estão: RPMI tratado (cinza claro), RPMI tratado com estradiol (cinza escuro) e RPMI sem tratamento (preto).

Os ensaios com estradiol mostraram que as células MCF7, que são hormônio dependentes, apresentaram maior crescimento na presença de estradiol, enquanto as células MDA-MB-231, que são triplo-negativas, não foram afetadas. As amostras não tóxicas para as células MDA-MB-231 foram observadas nos ensaios seguintes, e a análise estatística não mostrou alterações significativas em relação ao controle negativo. O estradiol estimulou as células MCF7 a se replicarem, mas as amostras testadas não apresentaram atividade estrogênica significativa, exceto para o BPA1 na concentração de 1000 ng.L⁻¹ após 6 dias de incubação (Figura 2). As concentrações de 50 ng.L⁻¹ de BPA2 e TBBPA2 não mostraram efeito inibitório.

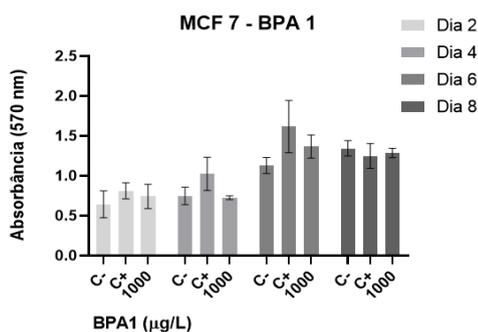


Figura 2: Ensaio de estrogenicidade do BPA1 na concentração de 1000 ng.L⁻¹ usando a linhagem MCF7 realizado durante 8 dias, com análise da replicação celular a cada 2 dias pelo método MTT. Foi realizada a análise two-way ANOVA com pós-teste de Dunnett (P < 0,05) para múltiplas

comparações usando o controle negativo como referência.

Conclusões

No experimento inicial, o estradiol apresentou atividade agonista em diferentes condições de tempo e tratamento em ambas as linhagens. MCF7 respondeu ao hormônio, aumentando a replicação celular, enquanto MDA-MB-231 não respondeu ao hormônio, mantendo sua replicação inalterada. Resultados subsequentes indicaram que as amostras não foram citotóxicas e não estimularam a linhagem estrogênio-independente (MDA-MB-231). Esses resultados sugerem que as amostras não apresentam atividade celular distinta da inicialmente identificada como agonista parcial do receptor de estrogênio. Nos ensaios com a linhagem estrogênio-dependente (MCF7), observou-se que as apenas o tratamento com BPA1 a 1000 ng.L⁻¹ após 6 dias de incubação, apresentou alteração significativa em relação às demais, fato decorrente possivelmente da baixa concentração de BPA no experimento. Além disso, as amostras não foram citotóxicas nem inibiram a replicação celular, mantendo valores de absorbância semelhantes ao controle negativo.

Agradecimentos

CNPQ (2023-2160), FAPESP (18/15904-6).

Referências

- ¹LECOMTE, S.; Habauzit, D.; Charlier, T.D.; Pakdel, F. Emerging Estrogenic Pollutants in the Aquatic Environment and Breast Cancer. *Genes*. 2017, 8, p. 229.
- ²PADOVAN, 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 TiO₂-photocatalysis: Optimization, degradation products identification, and estrogenic activity removal. *J. Environ. Chem. Eng.* 2021, 9, p. 106-442.