

# **Estudo do efeito da Genisteína e da Daidzeína na atividade da Aromatase de células MCF-7**

**Flávia da Costa Ferreira**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Ciências Biomédicas**  
(2<sup>o</sup> ciclo de estudos)

Orientadora: Professora Doutora Luíza Augusta Tereza Gil Breitenfeld  
Granadeiro  
Co-Orientadoras: Mestre Micaela Carina Pereira Almeida, Mestre Mafalda Neto  
Soares

**Junho de 2020**



# **Dedicatória**

Dedico este trabalho aos meus queridos pais pelo exemplo de vida, amor, carinho e dedicação incondicionais que me ofereceram durante toda a vida e aos pacientes oncológicos que sempre foram minha fonte de inspiração, de carinho e de cuidado.



# Agradecimentos

Não quero fazer um agradecimento curto. Esta dissertação é resultado do reinício da minha vida académica dezesseis anos após a conclusão da graduação e da abdicação da estabilidade profissional. A um oceano de distância daqueles que amo, os passos que aqui dei serão inestimáveis para o meu futuro e, com a mais pura certeza, valeu a pena cada minuto de esforço porque tive a oportunidade de encontrar, nessa caminhada, pessoas extremamente importantes que me estimularam intelectual e emocionalmente.

Em primeiro lugar, agradeço a minha orientadora Prof. Doutora Luiza Granadeiro, a quem admiro profundamente pelo exemplo de profissionalismo, inteligência, conhecimento e sabedoria, por acreditar no meu potencial e me motivar ao longo deste trabalho.

Às minhas co-orientadoras, Micaela Almeida e Mafalda Santos pelo incentivo, paciência e prontidão na resolução de todas as atividades laboratoriais de forma eficiente e eficaz e esclarecimentos de todas as dúvidas, contribuindo cientificamente em todas as etapas deste trabalho.

À Inês Martins pela colaboração, participação e troca de conhecimentos.

Ao Prof. Doutor Ilídio Correia pelos ensinamentos e pela disposição em sempre colaborar e resolver dúvidas acerca do mestrado com maestria e prontidão.

Com muita emoção, agradeço à minha mãe e ao meu pai (*in memoriam*), luz e razão da minha existência. Exemplos de força, amor e caráter, sempre confiaram em meus sonhos e me ensinaram a acreditar que é possível realizá-los, além de me mostrarem que dedicação, perseverança e honestidade são as ferramentas ideais para atingirmos nossas metas. Saudades (e)ternas.

Agradeço a minha família que nas últimas quatro décadas estiveram presentes em todos os momentos da minha vida, não só familiar, mas também académico e profissional, por entenderem os momentos de ausência e por serem minha base e meu apoio.

Ao meu amor, Nuno Jerónimo, e toda sua família linda, agradeço por todo amor, apoio, incentivo, companheirismo e partilha. Vocês fazem os meus dias mais felizes e a minha caminhada mais leve.

Ao Dr. Renato Nogueira, que me proporcionou a primeira oportunidade de trabalho em oncologia. Nunca me esquecerei daquela entrevista. Tenho imenso orgulho de ter trabalhado consigo, um dos oncologistas mais renomados e competentes do Brasil. Agradeço por sempre me guiar e ser fonte inesgotável de competência, conhecimento, inspiração e cuidado aos pacientes. Obrigada por ter confiado no meu trabalho e pelos laços formados, tanto profissional quanto de amizade, ao longo desses dezesseis anos.

Aos meus queridos amigos do Brasil, Barbara Delano, Renata Melgaço, Selem Lauar, Danielle Lacerda, Aliete Pereira, Katrina Silva e Rosangela Santos, que mesmo distantes sempre estiveram ao meu lado dizendo sempre que posso tudo que realmente quero e sou capaz de fazer tudo aquilo que desejo.

Agradeço a todos os amigos brasileiros residentes na Covilhã por remeterem o carinho e aconchego da nossa pátria amada e, em especial, àqueles que se tornaram minha família em Portugal, Tamires Esteves, Rafael Vasconcelos, Gabriela Santos, Joselli Dantas, Waleska Szadkoski, Lucas Diz, Juliana Queiroga, Rebecca Nantes e Thalita Lopes. Fomos ombro amigo nos momentos difíceis, a palavra reconfortante nos momentos de desespero, compartilhamos alegrias, tristezas e loucuras, dividimos sonhos e vibramos juntos cada vitória. Gratidão pelos laços estabelecidos.

A Deus, sempre presente e que coloca em meu caminho pessoas mais que especiais, por toda minha trajetória.

Finalmente, a todos que acreditaram.





## Resumo

A aromatase é a enzima chave da síntese do estrogênio e constitui um alvo terapêutico para o tratamento do cancro da mama recetor estrogênio positivo na pós-menopausa. Os fitoestrogênios, principais componentes da soja, são utilizados muitas vezes como substituto hormonal feminino devido às suas propriedades estrogénicas.

Com este estudo, pretende-se determinar se os fitoestrogénios genisteína e daidzeína interferem na atividade da aromatase e na terapêutica do cancro da mama, utilizando um potente inibidor da aromatase.

Com o ensaio, procurámos estudar a influência da genisteína e da daidzeína (em diferentes concentrações) na atividade da aromatase de células de adenocarcinoma da mama recetor estrogênio positivo, MCF-7, na presença e na ausência do letrozol, um potente inibidor da aromatase, em comparação com o substrato fisiológico 17 $\beta$ -estradiol.

Para a realização do ensaio, foi necessária a otimização do volume de lisado celular. A atividade específica da aromatase foi determinada por fluorescência, com utilização do *Aromatase (CYP19A) Activity Assay kit*, e correlacionada com a quantificação de proteínas totais nas amostras, utilizando o *Pierce BCA Protein Assay*.

Os resultados mostram que a genisteína e a daidzeína, nas diferentes concentrações testadas, aumentaram a atividade da aromatase e diminuíram o efeito inibitório do letrozol. Esses resultados destacam que se deve ter precaução no consumo de isoflavonas da soja por mulheres na pós-menopausa com cancro da mama recetor estrogênio positivo em tratamento com inibidores da aromatase, uma vez que foi evidenciada uma diminuição da ação inibitória do letrozol.

## Palavras-chave

Cancro da mama;MCF-7;17 $\beta$ -estradiol;genisteína;daidzeína;atividade da aromatase; letrozol



# Abstract

Aromatase is the key enzyme of the estrogen synthesis and constitutes a therapeutic target for the treatment of estrogen receptor positive breast cancer in postmenopausal women. Phytoestrogens, the main components of soy, are often used as female hormonal substitutes, due to their estrogenic properties.

This research aims to determine if genistein and daidzein, predominant soya isoflavones, interfere with aromatase activity and with breast cancer therapy, using a potent aromatase inhibitor.

With this research we intended to study the influence of genistein and daidzein (in different concentrations), on aromatase activity in breast carcinoma estrogen receptor positive cell line MCF-7, in the presence and absence of letrozol, a potent aromatase inhibitor, comparing with physiological substrate  $17\beta$ -estradiol. For this purpose, the lysates cells volumes were optimized. The specific aromatase activity was determined by fluorometric assay assessed, using Aromatase (CYP19A) Activity Assay kit, and correlated with the total protein concentration in the samples, using Pierce BCA Protein Assay.

The research showed that genistein and daidzein, in all the tested concentrations, increased aromatase activity and decreased the inhibitory effect of letrozole. Based on our results, the present study highlights the concern about the consumption of soy isoflavones by postmenopausal women with estrogen receptor positive breast cancer in treatment with aromatase inhibitors, since there is evidence of a decrease in letrozole's inhibitory action.

## Keywords

Breast cancer;MCF-7; $17\beta$ -estradiol;genistein;daidzein;aromatase activity;letrozole



# Índice

Capítulo 1: Introdução	31
1.1 Estrogénios	32
1.1.1 Síntese e Metabolismo	33
1.1.1.1 Aromatase como Fator Limitante da Síntese de Estrogénios	37
1.1.2 Recetores e Mecanismos de Ação	39
1.2 Fitoestrogénios	40
1.2.1 Isoflavonas da Soja	42
1.2.1.1 Genisteína – Mecanismo de Ação	44
1.2.1.2 Daidzeína – Mecanismo de Ação	45
1.3 Linhas Celulares no Estudo do Cancro da Mama	46
1.4 Objetivos	47
Capítulo 2: Estudo do efeito da Genisteína e da Daidzeína na atividade da Aromatase de células MCF-7	48
Materiais e Metodologia	48
2.1 Materiais	48
2.1.1 Reagentes	48
2.1.2 Linha Celular	48
2.1.3 Compostos Testados	48
2.1.4 Materiais	49
2.2 Preparação do Meio de Cultura DMEM	49
2.3 Preparação da Solução de PBS	50
2.4 Preparação das Soluções dos Compostos	50
2.4.1 17 $\beta$ -Estradiol	50
2.4.2 Genisteína	51
2.4.3 Daidzeína	51
2.4.4 Controlo com DMSO	52
2.5 Cultura Celular	52
2.6 Técnicas Aplicadas	53
2.6.1 Tripsinização	53
2.6.2 Criopreservação	53
2.6.3 Contagem de Células	53

2.7	Justificação das concentrações utilizadas nos ensaios	54
2.8	Preparação das Amostras para realização dos ensaios de Doseamento de Proteínas Totais e Atividade da Aromatase	54
2.9	Ensaio de Doseamento de Proteínas Totais pelo Método do Ácido Bicinchonínico (BCA)	56
2.10	Ensaio da Atividade da Aromatase	56
2.10.1	Preparação das Soluções	57
2.10.2	Curva de Calibração Padrão para o Ensaio da Atividade da Aromatase	57
2.11	Desenvolvimento e Otimização do Protocolo Experimental para o Ensaio da Atividade da Aromatase	58
2.12	Protocolo Experimental da Atividade da Aromatase – Condições definidas	61
2.13	Cálculo da Atividade Específica da Aromatase	63
Capítulo 3: Análise dos Resultados e Discussão		67
3.1	Doseamento de Proteínas Totais pelo Método BCA das Células MCF-7 tratadas com 17 $\beta$ -estradiol, Genisteína e Daidzeína	67
3.2	Atividade da Aromatase de Células MCF-7 tratadas com 17 $\beta$ -estradiol, Genisteína e Daidzeína	71
Capítulo 4: Conclusões e Perspetivas Futuras		74
Referências Bibliográficas		75





# Lista de Figuras

## Capítulo 1: Introdução

- Figura 1.1 – Estrutura química do colesterol (Adaptado de Casabon et al. 2014). 34
- Figura 1.2 – Estrutura química dos estrogénios (Adaptado de Liang and Shang 2012). 34
- Figura 1.3 – Biossíntese de estrogénio (Adaptado de Samavat and Kurzer 2016). 35
- Figura 1.4 – Representação esquemática do metabolismo dos estrogénios. 2-OHE2, 2-hidroxiestradiol; 4-OHE2, 4-hidroxiestradiol; 2-MeOE2, 2-metoxiestradiol; 4-MeOE2, 4-metoxiestradiol; E2-3,4-Q, 3,4-quinonaestradiol (Adaptado de Yasuda, Sakakibara, and Shimoi 2017). 36
- Figura 1.5 – Mecanismo de conversão de androgénios em estrogénios mediado pela aromatase (Adaptado de Miller 2003). 37
- Figura 1.6 – Vias de sinalização estrogénica. Sinalização dependente do ligando: A) Sinalização genómica clássica ou genómica direta; B) Sinalização não-clássica ou genómica indireta; C) Sinalização não-genómica; e D) Sinalização independente do ligando. EGF, fator de crescimento epidermal; EGFR, recetor do fator de crescimento epidermal; GFR, recetor do fator de crescimento (Adaptado de Khan, Cowan, and Ahmed 2012). 40
- Figura 1.7 – Classificação química dos fitoestrogénios e comparação com o 17 $\beta$ -estradiol (Adaptado de Molina et al. 2018). 41
- Figura 1.8 – Composição química de isoflavonas da soja e seu metabolismo após ingestão e comparação das estruturas tridimensionais do principal metabólito S-(-)Equol com o estradiol; 6'-O-hidroxi-DMA: 6'-Hidroxi-O-desmetilangolensina (Adaptado de Setchell 2017). 43

## Capítulo 2: Estudo do efeito da Genisteína e da Daidzeína na atividade da Aromatase de células MCF-7

- Figura 2.1 – Preparação da solução mãe de 17 $\beta$ -estradiol e soluções intermédias 10<sup>-3</sup>M e 10<sup>-5</sup>M. 50
- Figura 2.2 – Preparação das soluções de 17 $\beta$ -estradiol 50, 10 e 1nM. 51
- Figura 2.3 – Preparação das soluções de Genisteína 100, 50 e 25 $\mu$ M. 51

Figura 2.4 – Preparação das soluções de Daidzeína 100, 50 e 25 $\mu$ M.	52
Figura 2.5 – Preparação da solução de controlo com DMSO 1,1%.	52
Figura 2.6 – Preparação das amostras para o Ensaio da Atividade da Aromatase.	55
Figura 2.7 – Desenho esquemático da preparação da placa de 96 pocetos.	62





## Lista de Gráficos

Capítulo 2: Estudo do efeito da Genisteína e da Daidzeína na atividade da Aromatase de células MCF-7	
Gráfico 2.1 – Curva de calibração padrão do metabolito fluorescente da aromatase. Um mole do padrão fluorescente corresponde ao metabolismo de um mole do substrato da aromatase.	58
Gráfico 2.2 – Gráfico de fluorescência correspondente aos diferentes volumes de lisado celular (12, 24 e 48 $\mu$ L), com e sem inibidor da aromatase.	59
Gráfico 2.3 – Gráfico de fluorescência correspondente aos diferentes volumes de lisado celular (2, 4 e 6 $\mu$ L), com e sem inibidor da aromatase.	60
Gráfico 2.4 – Gráfico da cinética do metabolismo do substrato fluorogénico na presença e na ausência do inibidor da aromatase. <i>Background (Negative Control); Aromatase PC (Positive Control); PC + Inhibitor (Positive Control + Letrozol)</i> .	63
Gráfico 2.5 – Gráfico da cinética do metabolismo do substrato fluorogénico da Genisteína 50 $\mu$ M na presença e ausência do inibidor da aromatase.	64
Gráfico 2.6 – Gráfico da cinética do metabolismo do substrato fluorogénico da Daidzeína 100 $\mu$ M na presença e ausência do inibidor da aromatase.	64
Gráfico 2.7 – Gráfico da cinética do metabolismo do substrato fluorogénico da 17 $\beta$ -estradiol 50nM na presença e ausência do inibidor da aromatase.	65
Capítulo 3: Análise dos Resultados e Discussão	
Gráfico 3.1 – Reta de Calibração do Ensaio de Doseamento de Proteínas Totais.	67
Gráfico 3.2 – Doseamento de proteínas totais de células MCF-7 tratadas com diferentes concentrações de genisteína comparativamente com os controlos.	68
Gráfico 3.3 – Doseamento de proteínas totais de células MCF-7 tratadas com diferentes concentrações de daidzeína comparativamente com os controlos.	69
Gráfico 3.4 – Doseamento de proteínas totais de células MCF-7 tratadas com diferentes concentrações de 17 $\beta$ -estradiol comparativamente com os controlos.	70







# Lista de Tabelas

Capítulo 2: Estudo do efeito da Genisteína e da Daidzeína na atividade da Aromatase de células MCF-7	
Tabela 2.1 – Conteúdo fornecido no <i>Aromatase (CYP19A) Activity Assay kit (Fluorometric)</i> para o ensaio da atividade da aromatase.	57
Tabela 2.2 – Valores calculados de fluorescência por poceto no minuto zero.	58
Capítulo 3: Análise dos Resultados e Discussão	
Tabela 3.1 – Concentração de proteínas totais para cada amostra.	68
Tabela 3.2 – Atividade específica da aromatase de células MCF-7 para cada amostra.	71



## Lista de Acrónimos

2-MeOE2	2-metoxiestradiol
4-MeOE2	4-metoxiestradiol
2-OHE2	2-hidroxiestradiol
4-OHE2	4-hidroxiestradiol
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
AKT	<i>Protein Kinase B (also known as PKB)</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
COMT	<i>Catecol-O-metiltransferase</i>
cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
DHDE	<i>Dihidrodaidzeína</i>
DHGE	<i>Dihidrogenisteína</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	<i>Dimetilssulfóxido</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
E1	<i>Estrona</i>
E2	<i>17<math>\beta</math>-estradiol</i>
E2-3,4-Q	<i>3,4-quinonaestradiol</i>
E3	<i>Estriol</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ER	<i>Estrogen receptor</i>
ER $\alpha$	<i>Estrogen receptor <math>\alpha</math></i>
ER $\beta$	<i>Estrogen receptor <math>\beta</math></i>
ER+	<i>Estrogen receptor positive</i>
ERE	<i>Estrogen Response Elements</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
ESR1	<i>Estrogen receptor 1 (the same as ER<math>\alpha</math>)</i>
ESR2	<i>Estrogen receptor 2 (the same as ER<math>\beta</math>)</i>
Ex/Em	<i>Excitação/Emissão</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FSH	<i>Follicle-stimulating hormone</i>
GnRH	<i>Gonadotropin-releasing hormone</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
GPER30	<i>G protein-coupled estrogen receptor</i>
HER2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
HSD3B2	<i>3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta(5)-delta(4)isomerase type II</i>
HSD17B1	<i>Hydroxysteroid 17-Beta Dehydrogenase</i>
LH	<i>Luteinizing hormone</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCF-7	<i>Linha celular de adenocarcinoma da mama (Michigan Cancer Foundation-7)</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor <math>\kappa</math>B</i>
O-DMA	<i>O-desmetilangolensina</i>

OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PI <sub>3</sub> K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PIP <sub>3</sub>	<i>Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate</i>
PKA	<i>Protein kinase A</i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
PR	<i>Progesterone receptor</i>
PTK	<i>Protein tyrosine kinase</i>
RCF	<i>Relative centrifugal force</i>
SERM	<i>Selective Estrogen Receptor Modulator</i>
THS	Terapia hormonal de substituição
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
UDP	Uridina difosfato
WHI	<i>Women's Health Initiative</i>





# Capítulo 1

## Introdução

Atualmente, dentro das patologias não-infecciosas, o cancro continua a ser um dos principais problemas de saúde pública que afeta a população a nível mundial. A Agência Internacional de Pesquisa do Cancro (IARC - *International Agency for Research on Cancer*) da Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que o cancro seja responsável por cerca de 10 milhões de mortes em 2020 a nível mundial (World Health Organization 2018).

O cancro da mama é o cancro mais frequente nas mulheres e o segundo mais comum entre as patologias oncológicas. Segundo as suas projeções, a OMS, estima, a nível mundial, para o ano de 2020, aproximadamente 650 mil mortes e 90 mil novos casos de cancro da mama. Na Europa, estima-se aproximadamente 7 mil novos casos e 140 mil mortes para 2020 (World Health Organization 2018). Contudo, é uma doença curável em 70-80% das pacientes diagnosticadas em estadio inicial, não metastático (Harbeck 2019).

Diversos fatores relacionam-se com o desenvolvimento do cancro da mama como sexo, idade, história familiar, fatores genéticos, estilo de vida (dieta, obesidade, consumo de álcool, tabagismo) e fatores ambientais (exposição à radiação e pesticidas) (Eslami-S et al. 2020; Harbeck et al. 2019; Marchand and Stewart 2018; Sun et al. 2017).

A exposição ao estrogénio é o principal fator para iniciação e crescimento tumoral (Marchand and Stewart 2018). Menarca precoce, menopausa tardia, primeira gravidez em idade avançada, nuliparidade e exposição a estrogénios exógenos como contraceptivos orais e terapia hormonal de substituição (THS) para o tratamento dos sintomas da menopausa parecem aumentar o risco de desenvolvimento do cancro da mama (Chen 2008; Marchand and Stewart 2018).

A THS era a terapia padrão para os sintomas vasomotores e prevenção de doenças crónicas até à publicação dos resultados do estudo da *Women's Health Initiative* (WHI) em 2002 (Zaw, Howe, and Wong 2018). Neste estudo, mulheres tratadas com estrogénio combinado com a progesterona tiveram maior risco de cancro da mama linfonodo-positivo e estadio avançado do que as que foram tratadas com placebo. Estes resultados não são consistentes com estudos observacionais e a sua significância clínica não é clara (Ramalhinho 2014).

Após o estudo da WHI, muitas mulheres interromperam abruptamente a THS e houve uma redução das prescrições desta terapia em todo o mundo, resultando em aumento dos

sintomas vasomotores, fraturas por osteoporose e insónia (Biglia et al. 2019; Zaw, Howe, and Wong 2018).

Como consequência, houve um aumento do interesse por produtos naturais como alternativa para o tratamento dos sintomas da menopausa. Os fitoestrogénios tornaram-se o foco de investigações devido à sua similaridade estrutural com o estradiol e a sua habilidade de modular os recetores de estrogénio (Senthilkumar, Fata, and Kennelly 2018).

Dois em cada três casos de cancro da mama expressam recetor de estrogénio (ER) e a terapia antiestrogénica é o pilar do tratamento dessas doentes (Marchand and Stewart 2018; Rodriguez et al. 2017). Neste contexto, os inibidores seletivos da aromatase (letrozol, anastrozol e exemestano) são indicados para o tratamento adjuvante do cancro da mama recetor estrogénio positivo (ER+) em doentes pré-menopausa após supressão ou ablação ovárica ou em pós-menopausa (Larionov 2015; National Comprehensive Cancer Network (US) 2019).

## **1.1 Estrogénios**

Datada da década de 1920, a descoberta do estrogénio pelos pesquisadores Edgar Allen e Edward Adelbert Doisy foi um marco para o início da elucidação da fisiopatologia dessa hormona (van Iten 2017). Os estrogénios são hormonas esteroides derivadas do colesterol e sintetizadas pelos ovários, placenta, testículos e córtex adrenal, sendo responsáveis pela indução e pelo desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários e apresentam também importante papel na regulação da homeostasia óssea, metabolismo de lipídios e hidratos de carbono, balanço eletrolítico, fisiologia da pele, do sistema cardiovascular e do sistema nervoso central (Gruber et al. 2002; Saczko et al. 2017; Vrtačnik et al. 2014). Apesar de serem comumente associados às funções reprodutivas femininas, possuem também importantes funções na fisiologia reprodutiva masculina, como modulação da libido, função erétil e espermatogénese (Schulster, Bernie, and Ramasamy 2016; Vrtačnik et al. 2014).

Além da sua síntese nos ovários, muitos tecidos extragonadais também produzem estrogénios, entre eles células mesenquimais do tecido adiposo (incluindo da mama), osteoblastos e condrócitos, células musculares lisas aórticas e endotélio vascular, assim como numerosas partes do cérebro incluindo o hipotálamo anterior, hipotálamo médio basal e amígdala (Saha et al. 2019). O 17 $\beta$ -estradiol (E2) é o estrogénio biologicamente mais ativo sintetizado pelas células ováricas durante a idade reprodutiva. Outras formas de estrogénio incluem a estrona (E1) e o estriol (E3) (Liang and Shang 2012).

Na pré-menopausa, aproximadamente 95% dos estrogénios E1 e E2 são sintetizados pelos ovários durante o ciclo menstrual e em menor quantidade pelo tecido adiposo e glândula adrenal. O estriol (E3) é o estrogénio menos potente, formado a partir da estrona (E1) através de 16 $\alpha$ -hidroxilação, sendo produzido predominantemente pela placenta durante a gravidez. Na pós-menopausa, a biossíntese de estrogénio pelos ovários é mínima, sendo a fonte predominante os tecidos extragonadais. A estrona (E1) é o estrogénio predominante nesta fase, sintetizado principalmente pelo tecido adiposo (Cui, Shen, and Li 2013; Liang and Shang 2012; Vrtačnik et al. 2014).

A menopausa é considerada um período crítico, durante o qual, sem intervenções, há risco aumentado de doenças cardiovasculares e metabólicas, osteoporose, disfunção sexual, e declínio cognitivo prematuro, contribuindo para a redução da qualidade de vida (Zaw, Howe, and Wong 2018). Outros sintomas apresentados durante a menopausa incluem perturbações vasomotoras (ondas de calor, sudorese noturna), dores musculares, dores nas articulações, síndrome genito-uninária, alterações do humor e depressão (Santoro, Epperson, and Mathews 2015).

A THS ainda é considerada o tratamento mais efetivo para a redução dos sintomas da menopausa. Porém, não é indicada para todas as mulheres, especialmente para aquelas com histórico de cancro hormono-dependente ou tromboembolismo venoso (Biglia et al. 2019).

De acordo com a declaração do *The North American Menopause Society* (NAMS - The 2017 Hormone Therapy Position Statement), a THS somente é aprovada em quatro condições: sintomas vasomotores, osteopenia decorrente da menopausa, sintomas vulvovaginais e sintomas genito-urinários em mulheres com menos de 60 anos que estejam até 10 anos em menopausa e que não possuam contraindicações para a THS. Para prevenção primária de outras doenças crónicas, como doenças cardiovasculares, cancro e demência, a utilização de THS permanece controversa (The North American Menopause Society 2017; Zaw, Howe, and Wong 2018).

### **1.1.1 Síntese e Metabolismo**

Derivados do colesterol (C27), os estrogénios possuem uma parte estrutural em comum, formada por 18 carbonos (C18), consistindo em um anel benzénico e um grupo hidroxifenólico no C3 (Figura 1.1). A diferença estrutural entre os estrogénios é a presença de um grupo hidroxilo no C17 no 17 $\beta$ -estradiol e no estriol, sendo que o estriol ainda apresenta outro grupo hidroxilo no C16 e a estrona possui uma cetona no C17 (Figura 1.2) (Liang and Shang 2012; Samavat and Kurzer 2016).

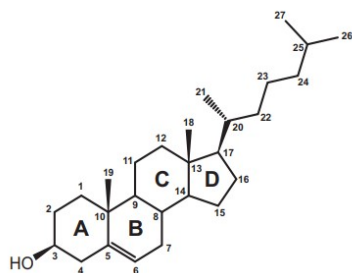


Figura 1.1 - Estrutura química do colesterol (Adaptado de Casabon et al. 2014).

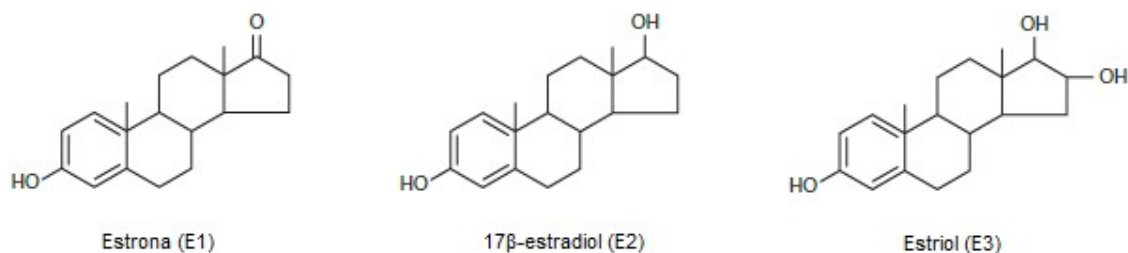


Figura 1.2 – Estrutura química dos estrogénios (Adaptado de Liang and Shang 2012).

A produção ovárica de estrogénios é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-ovário e inicia-se pela libertação da hormona luteinizante (LH) e da hormona foliculo estimulante (FSH) produzidos pela glândula hipófise anterior em resposta à hormona libertadora de gonadotropina (GnRH) pelo hipotálamo (Liang and Shang 2012; Samavat and Kurzer 2016).

O primeiro passo da esteroidogénese é a entrada do colesterol na mitocôndria que é regulada pela proteína StAR, codificada pelo gene STAR (*Steroidogenic Acute Regulatory Protein*). Uma vez dentro da mitocôndria, o colesterol é convertido em pregnenolona, processo catalisado pela enzima de clivagem de cadeia lateral mitocondrial CYP11A1. A pregnenolona, então, atua como precursor de todas as hormonas esteroides, por ação de enzimas codificadas pelo gene CYP17A1 e pela enzima HSD3B2 ( $3\beta$ -hidroxisteroide desidrogenase-delta5,delta4 isomerase tipo 2), conforme a Figura 1.3. Como resultado da ação destas enzimas, tem-se como produto a formação de androstenediona (Miller and Auchus 2011; Samavat and Kurzer 2016).

A androstenediona, produto mais importante da esteroidogénese durante a fase folicular do ciclo menstrual, não é biologicamente ativa. É convertida em testosterona pela ação da enzima HSD17B1 ( $17\beta$ -hidroxisteroide desidrogenase 1) e em estrona pela ação da enzima aromatase, codificada pelo gene CYP19A1 (item 1.1.1.1). A testosterona e a estrona são convertidas em  $17\beta$ -estradiol, pela ação das enzimas aromatase e HSD17B1, respetivamente. Esta etapa da esteroidogénese ocorre em tecidos extragonadais (Figura

1.3) e é a principal fonte de estrogénio na pós-menopausa (Friesenhengst et al. 2018; Samavat and Kurzer 2016; To et al. 2014; Zhao et al. 2016).

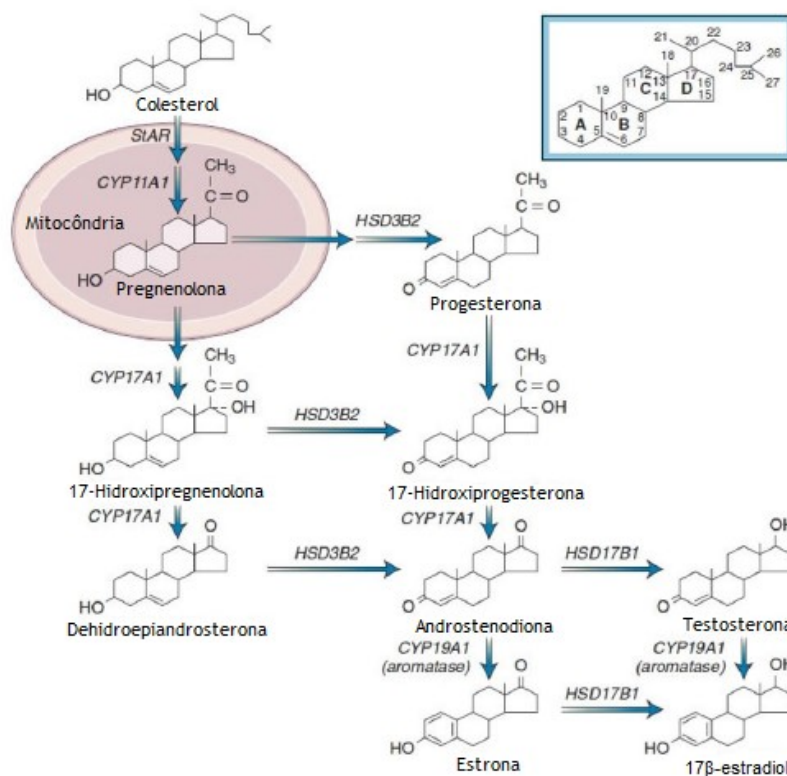


Figura 1.3 –Biossíntese de estrogénio (Adaptado de Samavat and Kurzer 2016).

Os esteroides, devido ao seu caráter lipofílico, são transportados no plasma ligados às proteínas séricas (albumina e  $\beta$ -globulina). Somente a fração livre dos esteroides, não ligados às proteínas, é biologicamente ativa (Holschbach and Handa 2017). Ao alcançar o tecido alvo, desligam-se das proteínas séricas e difundem-se passivamente através das membranas celular e nuclear, ligam-se a recetores intracelulares ativando sequencias específicas de genes que regulam o crescimento e a diferenciação celular (Epstein 2001; Holschbach and Handa 2017).

A metabolização dos estrogénios ocorre principalmente no fígado, sendo biotransformados em diferentes metabolitos por três vias distintas: hidroxilação, metilação e oxidação (Figura 1.4) (Epstein 2001; Samavat and Kurzer 2016; Yasuda, Sakakibara, and Shimoi 2017).

A hidroxilação do estradiol pelo citocromo P450 (CYP) A1 e B1, forma os catecóis estrogénios 2-hidroxiestradiol (2-OHE2) e 4-hidroxiestradiol (4-OHE2), respetivamente.

A metilação dos catecóis estrogénios é a segunda fase da metabolização, mediada pela enzima catecol-O-metiltransferase (COMT), convertendo esses compostos em metoxiestrogénios, 2-metoxiestradiol (2-MeOE<sub>2</sub>) e 4-metoxiestradiol (4-MeOE<sub>2</sub>) (Epstein 2001; Samavat and Kurzer 2016; Yasuda, Sakakibara, and Shimoi 2017). O 2-hidroxiestradiol inibe o crescimento e a proliferação celular. O mecanismo relacionado ao baixo potencial carcinogénico deste metabolito está associado à alta taxa de *clearance*, rápida metilação pela COMT e ao baixo potencial estrogénico e, ainda, a sua forma metilada, o 2-metoxiestradiol, inibe a angiogénese e suprime o crescimento tumoral (Samavat and Kurzer 2016).

A via oxidativa pode gerar espécies potencialmente mutagénicas. O metabolito 3,4-quinonaestradiol (E<sub>2</sub>-3,4-Q), formado pela oxidação do 4-OHE<sub>2</sub>, pode reagir diretamente com o DNA e ligar-se de forma covalente à guanina e/ou adenina levando à formação de aductos no DNA (Yasuda, Sakakibara, and Shimoi 2017). Além disso, o processo de oxidação pode gerar radicais livres do oxigénio por via não enzimática, causando *stress* oxidativo à célula (Avendaño and Menéndez 2015).

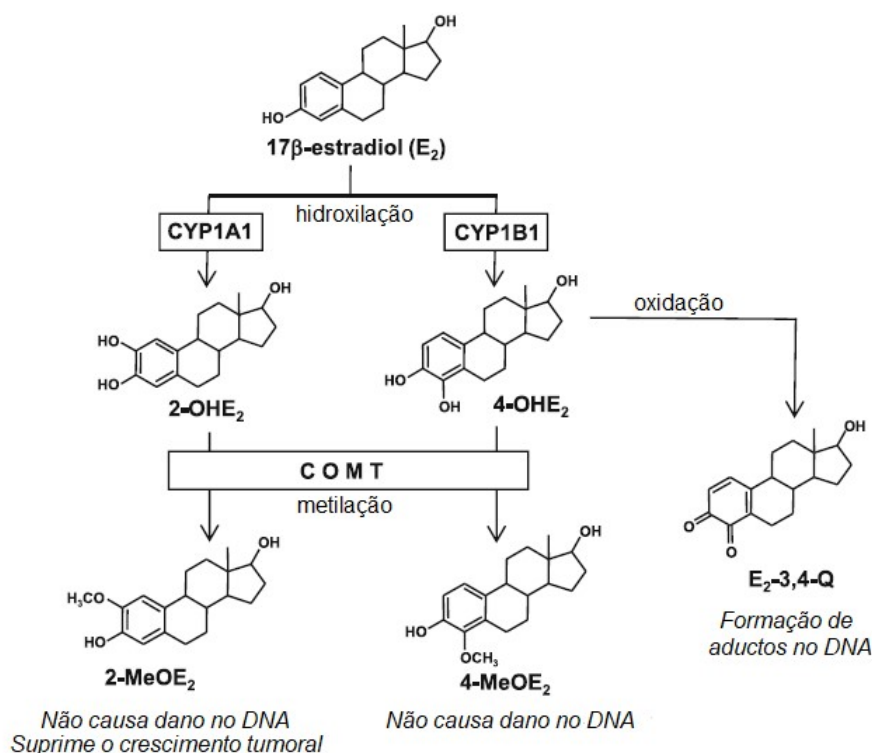


Figura 1.4 – Representação esquemática do metabolismo dos estrogénios. 2-OHE<sub>2</sub>, 2-hidroxiestradiol; 4-OHE<sub>2</sub>, 4-hidroxiestradiol; 2-MeOE<sub>2</sub>, 2-metoxiestradiol; 4-MeOE<sub>2</sub>, 4-metoxiestradiol; E<sub>2</sub>-3,4-Q, 3,4-quinonaestradiol (Adaptado de Yasuda, Sakakibara, and Shimoi 2017).

A última fase do metabolismo dos estrogénios é a reação de glicuronidação em que são formados conjugados dos vários substratos com o ácido glicurónico e sulfato por enzimas microsomias hepáticas, incluindo UDP-glicuroniltransferases e sulfotransferases, respetivamente. A conjugação dos estrogénios permite que se tornem hidrossolúveis para serem excretados na urina e fezes (Samavat and Kurzer 2016).

### 1.1.1.1 Aromatase como Fator Limitante da Síntese de Estrogénios

Codificada pelo gene CYP19A1, localizado no cromossomo 15q21.1, a aromatase é a enzima que catalisa a etapa final e limitante da biossíntese de estrogénios, desempenhando um papel crucial na conversão de androstenediona em estrona e de testosterona em estradiol (Friesenhengst et al. 2018; Rahideh et al. 2017; To et al. 2014; Zhao et al. 2016).

A aromatase catalisa três reações oxidativas em que cada reação consome uma molécula de oxigénio e uma de NADPH, sendo este o cofator que catalisa a reação por transferência de eletrões doados pela flavoproteína para o grupo heme da aromatase e depois para o substrato androgénico, através do complexo NADPH-citocromo P450 redutase (Figura 1.5) (Ji et al. 2014; Miller 2017; Nardo and Gilardi 2013; Sohl and Guengerich 2010).

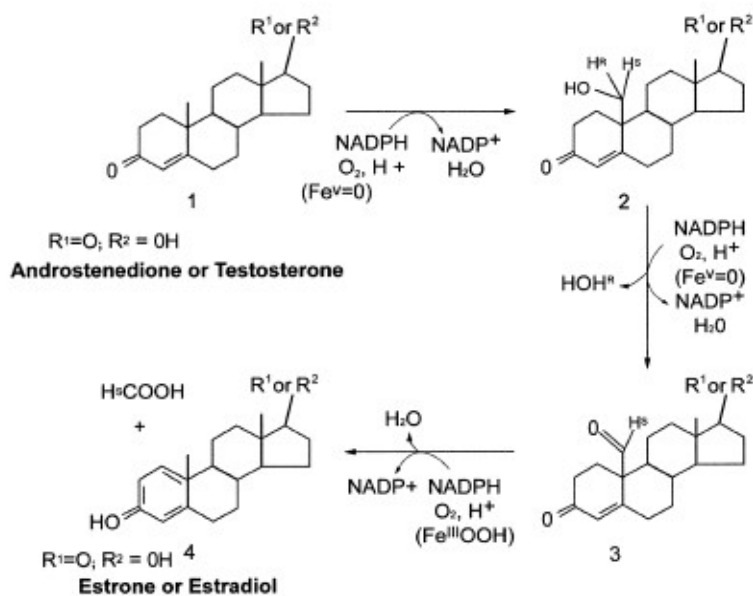


Figura 1.5 – Mecanismo de conversão de androgénios em estrogénios mediado pela aromatase (Adaptado de Miller 2003).

A aromatase localiza-se no retículo endoplasmático e é expressa em vários tecidos incluindo ovários, placenta, ossos, músculos, cérebro, pele e tecido adiposo (Chumsri et al.

2011; To et al. 2014). Os ovários são a principal fonte de biossíntese de estrogénios em mulheres em idade reprodutiva. Na pós menopausa, as células mesenquimais do tecido adiposo são a principal fonte de estrogénio (Mukhopadhyay et al. 2015).

A expressão da aromatase é regulada pela transcrição do gene CYP19A1. Uma característica deste gene é a existência de regiões promotoras para regular a transcrição de maneira tecido-específica (To et al. 2014). Estas regiões promotoras incluem I.1, I.2 e I.2a para a placenta, I.4 para o tecido adiposo e para a pele, I.5 para o tecido fetal, I.f para o cérebro, I.7 para as células endoteliais, I.6 para os ossos, I.3 para o tecido adiposo e PII para as gónadas e para o tecido adiposo (Zhao et al. 2016). Distintos fatores de transcrição regulam cada região promotora através de vias de sinalização e de maneira tecido-específica. A hormona folículo estimulante (FSH) induz a região promotora proximal II, a prostaglandina-PGE2 induz as regiões promotoras II e I.3 e os glucocorticoides e as citocinas, interleucinas 6 ou 11 e o fator de necrose tumoral (TNF) induzem a região promotora I.4 (Bulun et al. 2012).

No tecido mamário saudável, os fibroblastos do tecido adiposo expressam baixos níveis da aromatase via região promotora I.4, enquanto as regiões promotoras I.3/II, ocupadas por repressores transcricionais, permanecem quiescentes (Bulun et al. 2012).

No cancro da mama, as regiões promotoras I.3, II e I.7 são ativadas, levando a um aumento acentuado da expressão da aromatase no tecido tumoral e no tecido adiposo adjacente e, conseqüentemente, a sobreprodução de estrogénio promove o crescimento e a progressão tumoral. Além disso, citocinas podem estimular a atividade da região promotora I.4 e também induzir a reação desmoplásica nos fibroblastos do tecido adiposo tumoral (Chen et al. 2009). A região promotora I.7 é ativada pelo fator de transcrição GATA2 em células endoteliais, aumentando a expressão da aromatase, o que leva ao aumento da biossíntese de estrogénios no tecido vascular endotelial (Zhao et al. 2016).

Uma vez que o tecido tumoral tem aumento da expressão da aromatase e dos níveis de estrogénio e por esta enzima ser responsável pela etapa limitante da biossíntese de estrogénios, os inibidores da aromatase são um tratamento efetivo do cancro da mama (Liang and Shang 2012).

Os inibidores seletivos da aromatase de terceira geração, como o letrozol e o anastrozol, são fármacos utilizados como primeira linha de tratamento do cancro da mama recetor estrogénio positivo em mulheres pós-menopausa ou pré-menopausa submetidas à supressão ou ablação ovárica prévias (Mukhopadhyay et al. 2015; National Comprehensive Cancer Network (US) 2019). O letrozol contém um anel triazólico que se liga de forma competitiva não-covalente ao grupo heme do sítio ativo da aromatase,

resultando em redução da biossíntese de estrogénios em todos os tecidos (Bhatnagar 2007; Chan, Petrossian, and Chen 2016).

### **1.1.2 Recetores e Mecanismos de Ação**

Os estrogénios exercem as suas funções biológicas através da ligação aos recetores nucleares de estrogénio alfa (ER $\alpha$ ) e beta (ER $\beta$ ) e a recetores de estrogénios acoplados à proteína G, o GPER30, localizado na superfície celular e na membrana do retículo endoplasmático (Piperigkou and Karamanos 2019; Xu et al. 2019).

Os recetores nucleares ER $\alpha$  e ER $\beta$ , codificados pelos genes ERS1 e ERS2, respetivamente, são membros da superfamília de recetores hormonais, agem como fatores de transcrição ativados por ligando e modulam a transcrição de genes específicos (Ramalhinho 2014). A sua distribuição nos tecidos varia. O ER $\alpha$  é expresso principalmente em órgãos gonadais (útero, ovários, próstata, testículos e mama) e, em menor nível, em outros tecidos (ossos, fígado, rins, tecido adiposo e cérebro). O ER $\beta$  é expresso principalmente em tecidos não-gonadais (colon, medula óssea, endotélio vascular, pulmões, bexiga e cérebro) (Cui, Shen, and Li 2013). O sistema músculo-esquelético expressa os dois recetores (Patel et al. 2018).

Os GPER30 são recetores pertencentes à família de recetores acoplados à proteína G (GPCR) e são expressos nos tecidos nervoso, reprodutor, digestivo e muscular, e também na medula adrenal e pelvis renal (Cui, Shen, and Li 2013; Xu et al. 2019).

As vias de sinalização através dos ER envolvem mecanismos moleculares distintos. Estas vias podem ser classificadas como vias de sinalização dependente do ligando ou independente do ligando, conforme Figura 1.6 (Khan, Cowan, and Ahmed 2012).

A sinalização genómica clássica ou genómica direta dos ER envolve a ligação do estrogénio a recetores nucleares, que dimerizam e ligam-se a elementos de resposta ao estrogénio (ERE – *Estrogen Response Elements*) localizados nas regiões promotoras do gene. A ligação ao estrogénio também induz mudanças no domínio de ligação ao ligando nos ER e, essa alteração conformacional, permite o recrutamento de proteínas coativadoras (Björnström and Sjöberg 2005). Entretanto, os ER podem regular a expressão génica sem se ligarem diretamente ao DNA, sendo denominada sinalização genómica não-clássica ou genómica indireta (Björnström and Sjöberg 2005; Khan, Cowan, and Ahmed 2012). Esta sinalização independente de ERE ocorre através de interações proteína-proteína com outros fatores de transcrição no núcleo, como o AP-1 (Björnström and Sjöberg 2005; Vrtačnik et al. 2014).

Além disso, os ER da membrana medeiam as ações não-genômicas dos estrogénios, que podem levar a alterações na função de proteínas no citoplasma e a regulação da expressão génica (Björnström and Sjöberg 2005). A sinalização não-genômica ocorre através da ligação do estrogénio aos ER ou GPR30, tanto intracelular como na membrana plasmática, resultando na ativação de várias cascatas de proteínas cinase, que podem eventualmente levar a mudanças indiretas na expressão génica devido à fosforilação dos fatores de transcrição (Gogos et al. 2015; Vrtačnik et al. 2014). A ligação do estrogénio aos ER na superfície celular promove a cascata de sinalização através da proteína cinase ativada pelo mitogénio (MAPK), do fosfatidilinositol-3 cinase (PI<sub>3</sub>K) e da proteína cinase C (PKC) (Coleman and Smith 2001).

Na sinalização independente do ligando, fatores de crescimento e ativação das vias de sinalização das proteínas cinases (PKA e PKC), da MAPK e do PI<sub>3</sub>K, promovem a fosforilação e a ativação dos ER nucleares, modulando a expressão génica (Fuentes and Silveyra 2019; Khan, Cowan, and Ahmed 2012; Ramalinho 2014). Esta via de sinalização ocorre na ausência do estrogénio (Khan, Cowan, and Ahmed 2012).

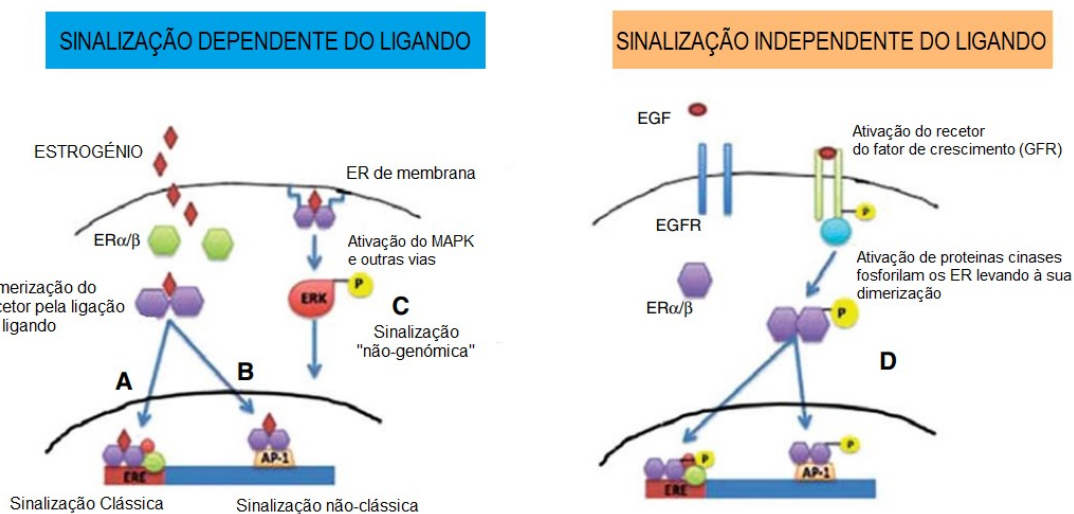


Figura 1.6 – Vias de sinalização estrogénica. Sinalização dependente do ligando: A) Sinalização genômica clássica ou genômica direta; B) Sinalização não-clássica ou genômica indireta; C) Sinalização não-genômica; e D) Sinalização independente do ligando. EGF, fator de crescimento epidermal; EGFR, recetor do fator de crescimento epidermal; GFR, recetor do fator de crescimento (Adaptado de Khan, Cowan, and Ahmed 2012).

## 1.2 Fitoestrogénios

Os fitoestrogénios são compostos polifenólicos não-esteroidais naturais derivados de plantas presentes numa grande variedade de alimentos, especialmente na soja (*Glycine max*) e em menor quantidade em leguminosas como alfafa (*Medicago Sativa*), semente de

linhaça (*Linum usitatissimum*), grão de bico (*Cicer arietinum*), feijão (*Phaseolus vulgaris*) e trevo vermelho (*Trifolium pratense*). Possuem estrutura química e atividade similares ao 17 $\beta$ -estradiol. Os grupos hidroxilo nos anéis fenólicos dos fitoestrogénios correspondem aos grupos hidroxilo nos anéis aromáticos do 17 $\beta$ -estradiol, desta forma permitem que os fitoestrogénios exerçam os seus efeitos estrogénicos ou antiestrogénicos ao ligarem-se aos recetores de estrogénio (ER) (Basu and Maier 2018; Poluzzi et al. 2014; Rietjens, Louisse, and Beekmann 2017; Senthilkumar, Fata, and Kennelly 2018).

São classificados de acordo com sua estrutura química em flavonóides que incluem as isoflavonas, cumestanos e prenilflavonóides e não-flavonóides que inclui os lignanos (Figura 1.7) (Lephart 2015; Molina et al. 2018).

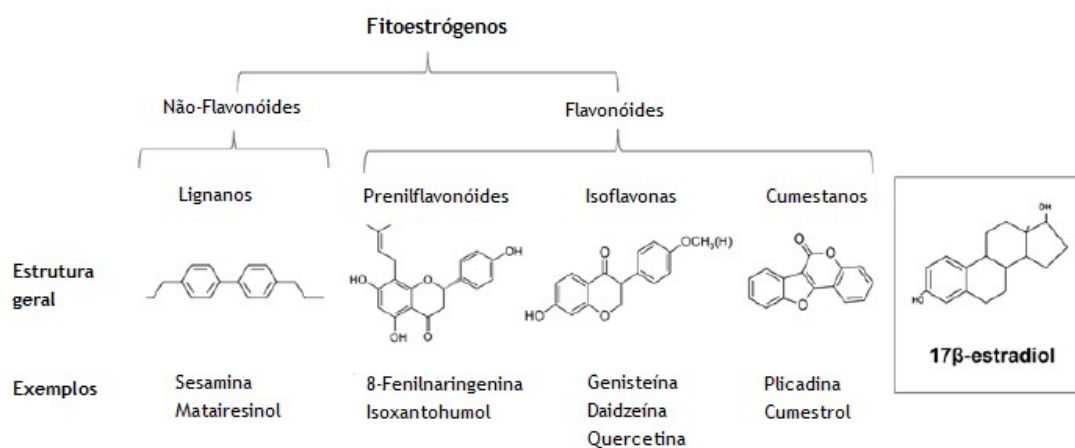


Figura 1.7 – Classificação química dos fitoestrogénios e comparação com o 17 $\beta$ -estradiol (Adaptado de Molina et al. 2018).

Os fitoestrogénios possuem vários efeitos benéficos para a saúde como redução do risco de sintomas associados à menopausa, como ondas de calor e osteoporose. Como resultado, os fitoestrogénios estão presentes num grande número de suplementos alimentares e amplamente comercializados como alternativas naturais à terapia hormonal de substituição. Além disso, a exposição aos fitoestrogénios tem sido relacionada com a redução dos riscos de doença cardiovascular, obesidade, síndrome metabólica, diabetes tipo 2, distúrbios cerebrais e cancro da mama, da próstata e do intestino (Rietjens, Louisse, and Beekmann 2017).

O interesse no consumo de dieta fitoestrogénica iniciou-se por estudos epidemiológicos que evidenciaram menor incidência de cancro da mama em mulheres asiáticas, e que levantaram a hipótese de que, por essa população ingerir uma dieta rica em fitoestrogénios (isoflavonas da soja), possuiriam menor risco de desenvolver cancro da mama. Esta hipótese foi corroborada por estudos que mostraram aumento da incidência

de cancro da mama em mulheres asiáticas que migraram para o ocidente e adquiriram hábitos alimentares não tradicionais (Basu and Maier 2018; Choi and Kim 2013; Senthilkumar, Fata, and Kennelly 2018).

Apesar da associação favorável entre o consumo de produtos da soja e a redução do risco de cancro da mama, ensaios experimentais em células do cancro da mama *in vitro* mostram que muitos fatores podem influenciar as propriedades da isoflavonas, incluindo a concentração de estrogénio circundante, presença ou ausência de recetores de estrogénio, assim como a dose (Chen et al. 2003).

Muitos estudos têm sido conduzidos para investigar a atividade farmacológica dos fitoestrogénios, sendo as isoflavonas a classe mais pesquisada devido à sua atividade estrogénica (Choi and Kim 2013; Křížová et al. 2019).

### **1.2.1 Isoflavonas da Soja**

As isoflavonas predominantes na soja são a genisteína e daidzeína (aproximadamente 47 e 44%, respetivamente) e em menor quantidade a gliciteína (aproximadamente 9%) (Poschner et al. 2017). Apresentam-se na forma conjugada com vários açúcares formando malonilglicosídeos, acetilglicosídeos e  $\beta$ -glicosídeos que não possuem atividade biológica. A quantidade desses compostos na soja varia, o que influencia a sua biodisponibilidade e, consequentemente, a sua atividade biológica. Além disso, a concentração final das isoflavonas pode variar nos indivíduos devido ao seu metabolismo específico (Amaral et al. 2017; Setchell 2017). A ativação desses glicosídeos depende da hidrólise por glicosidases intestinais, libertando agliconas bioativas que são absorvidas pelos enterócitos e assim, as agliconas exercem a sua atividade biológica (Figura 1.8) (Setchell 2017).

Após a absorção, as isoflavonas são conjugadas no fígado, principalmente pelo ácido glicurónico e em menor proporção pelo ácido sulfúrico (Molina et al. 2018). A daidzeína é convertida em dihidrodaidzeína (DHDE), equol e O-desmetilangolensina (O-DMA) e a genisteína é convertida em dihidrogenisteína (DHGE) e p-etilfenol, que é inerte e o metabolito menos predominante. Estes compostos e seus metabolitos circulam no sangue e são excretados na urina em até 48 horas após a ingestão (Kim et al. 2010; Poluzzi et al. 2014; Setchell 2017).

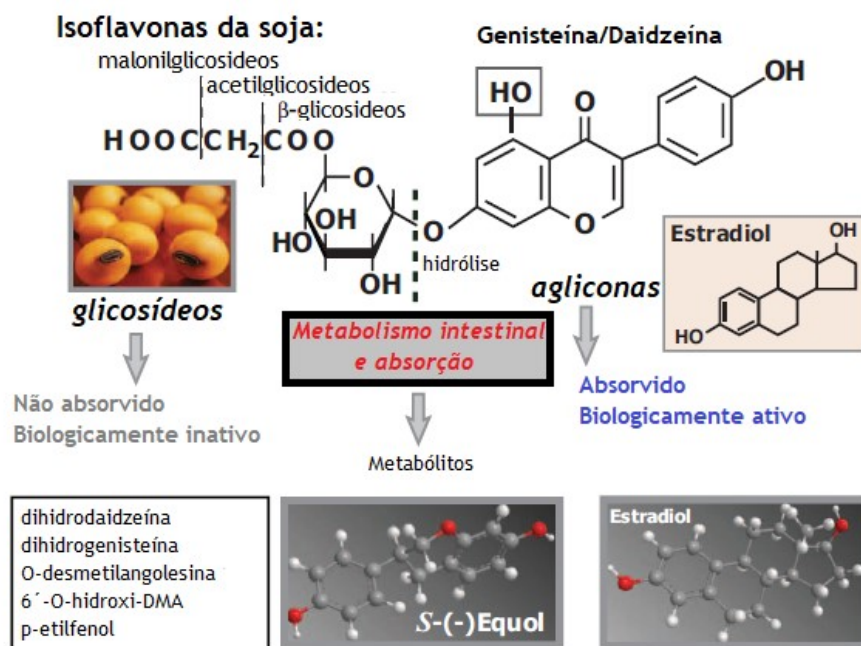


Figura 1.8 – Composição química de isoflavonas da soja e seu metabolismo após ingestão e comparação das estruturas tridimensionais do principal metabólito S-(-)Equol com o estradiol; 6'-O-hidroxi-DMA: 6'-Hidroxi-O-desmetilangolensina (Adaptado de Setchell 2017).

As isoflavonas possuem ações biológicas benéficas como a quimioproteção (modulação da carcinogênese, nomeadamente iniciação, promoção e progressão tumoral) (Křížová et al. 2019; Varinska et al. 2015). Entretanto, são também classificadas como disruptores endócrinos, indicando que possuem o potencial de causar efeitos adversos no organismo como infertilidade e aumento do risco de cancro estrogénio-dependente, como o cancro da mama (Rietjens, Lousse, and Beekmann 2017). Além disto, são considerados moduladores seletivos dos recetores de estrogénio (SERM - *Selective Estrogen Receptor Modulators*), uma vez que induzem efeito estrogénico ou antiestrogénico ao ligar-se aos ER, competindo com o estradiol endógeno pela ligação aos recetores (Basu and Maier 2018; Křížová et al. 2019).

No núcleo celular, as isoflavonas ligam-se aos ER regulando a expressão génica. A afinidade à isoforma ER $\beta$  é aproximadamente vinte vezes maior do que à isoforma ER $\alpha$ , em contraste com o estradiol, que possui a mesma afinidade para ambos os recetores. Em comparação com o estradiol, as isoflavonas possuem baixo potencial estrogénico. Entretanto, deve-se considerar que os fitoestrogénios são consumidos em grandes quantidades, o que pode levar a concentrações muito maiores do que as dos estrogénios endógenos e compensar a sua baixa afinidade aos ER (Amaral et al. 2017; Křížová et al. 2019).

Estudos *in vitro* têm mostrado que as isoflavonas genisteína e daidzeína estimulam a proliferação de células MCF-7 (cancro da mama ER+) quando em baixas concentrações, mas inibem quando em altas concentrações, o que indica que o efeito proliferativo em baixas doses é mediado pelos ER $\alpha$ , uma vez que as células MCF-7 têm baixa expressão de ER $\beta$  (Poschner et al. 2017).

Além da interação mediada pelos ER $\alpha$ , as isoflavonas genisteína e daidzeína, em baixas concentrações, podem induzir a transcrição não-genômica ao ativar os recetores de estrogénio acoplados à proteína G (GPER30) tanto em células normais como em células tumorais. A ativação do GPER30 resulta em aumento da produção de AMP cíclico (cAMP), da mobilização de cálcio intracelular e da síntese de fosfatidilinositol trifosfato (PIP<sub>3</sub>), da transativação do recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e na ativação das vias de sinalização PI<sub>3</sub>K/Akt e MAPK/ERK (Molina et al. 2018; Poschner et al. 2017).

Desta forma, as isoflavonas exercem efeitos agonista ou antagonista, dependendo da sua concentração no tecido alvo. Quando em altas concentrações, atuam como antagonista, ao ligarem-se aos ER e, como consequência, bloqueiam o efeito do estrogénio endógeno (Basu and Maier 2018; Krížová et al. 2019).

### **1.2.1.1 Genisteína – Mecanismo de Ação**

A genisteína possui estrutura difenólica que se assemelha estereoquímica e funcionalmente aos grupos hidroxilo do estradiol, tornando-a capaz de se ligar aos recetores de estrogénio subtipos  $\alpha$  e  $\beta$  (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ) e ao recetor de membrana GPER30 (Ganai and Farooqi 2015; Molina et al. 2018; Mukund et al. 2017). Possui 40 vezes mais afinidade pelo ER $\beta$ , e a ativação preferencial por este recetor reduz ao aumentar a concentração da genisteína, sendo esta capaz de ativar os dois subtipos de recetores de estrogénio (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ) (Poluzzi et al. 2014; Russo et al. 2016). Em comparação com o estradiol, a interação da genisteína com o ER $\beta$  ocorre com a mesma eficiência, no entanto, a concentração de genisteína necessária para induzir a transcrição génica é 10<sup>4</sup> vezes maior do que a do estradiol (Basu and Maier 2018).

As semelhanças da genisteína com o estradiol permitem que possa ser utilizada no tratamento dos sintomas da menopausa como redução da massa óssea, ondas de calor e vaginite (Mukund et al. 2017). Estudos têm demonstrado que a genisteína possui uma variedade de benefícios para a saúde e um importante papel na prevenção e no tratamento de várias doenças (Ganai and Farooqi 2015). Além de possuir propriedades estrogénicas, a genisteína pode alterar a concentração e a função de várias hormonas como insulina,

leptina, hormona da tireoide e cortisol. Possui efeito na regulação do metabolismo lipídico, modificando a lipólise, a lipogénese e a síntese de ATP. Tem propriedades antioxidantes e exerce atividade antitumoral (inibição da proliferação celular, regulação do ciclo celular e indução da apoptose) (Thangavel et al. 2019).

O efeito da genisteína em células de cancro da mama recetor estrogénio positivo (ER+) MCF-7 é dose-dependente. Em baixas concentrações (1nM a 10µM), estimula o crescimento de células cancerígenas, enquanto em concentrações acima de 10µM, inibe o crescimento celular (Chen et al. 2003; Poschner et al. 2017). Segundo Thangavel e colaboradores (2019), a genisteína induz apoptose em células MCF-7 em concentrações de 10 a 100µM (Thangavel et al. 2019).

O efeito antiproliferativo da genisteína é mediado pela inibição da PTK (proteína tirosina cinase) interrompendo a transdução do sinal, a diferenciação celular e a inibição da topoisomerase II, que levam à fragmentação do DNA e apoptose (Ko 2014; Poluzzi et al. 2014; Russo et al. 2016). Outros mecanismos moleculares inibitórios da carcinogénese pela genisteína incluem inibição da 5α-redutase, da proteína histidina cinase e de cinases dependentes de ciclina, bloqueio do ciclo celular na fase G2/M, modulação de diferentes vias de sinalização associadas com a proliferação celular como NF-κB (fator nuclear κB), Akt e MAPK (Poluzzi et al. 2014; Thangavel et al. 2019; Varinska et al. 2015).

A genisteína possui ação na aromatase. Estudo realizado por van Duursen e colaboradores (2011) em células MCF-7 utilizando fadrozol (inibidor da aromatase), mostrou que a genisteína aumenta a expressão e a atividade da aromatase, sugerindo que suplementos da soja podem afetar a eficácia do tratamento do cancro da mama com inibidores da aromatase (van Duursen et al. 2011).

### **1.2.1.2 Daidzeína -Mecanismo de Ação**

A daidzeína é a segunda isoflavona mais predominante na soja. Devido à sua estrutura semelhante ao estradiol, é capaz de se ligar aos recetores de estrogénio alfa e beta, porém possui apenas cinco vezes mais afinidade pelo ERβ, quando comparada com a genisteína (Poschner et al. 2017).

As atividades farmacológicas atribuídas à daidzeína incluem anticarcinogénese, antifibrótica, antidiabética, além de redução dos níveis de colesterol e atividade cardiovascular (Rawat et al. 2019).

Assim como a genisteína, a daidzeína estimula a proliferação de células do cancro da mama MCF-7 em concentrações menores que 10µM e inibe o crescimento em

concentrações superiores a 10 $\mu$ M (Choi and Kim 2008; Poschner et al. 2017). Um estudo realizado por Ju e colaboradores (2006) em células MCF-7 mostrou que a daidzeína possui um efeito estimulatório modesto no crescimento celular em concentrações de 0.001 $\mu$ M a 50 $\mu$ M, com estimulação máxima a 1 $\mu$ M (Ju et al. 2006).

Em altas doses, a daidzeína exerce seu efeito antiproliferativo por inibição da proteína tirosina cinase (PTK) levando à supressão ou inibição da via de transdução de sinal que induz a carcinogénese (Ko 2014). Noutro estudo, realizado por Choi e Kim (2008), a proliferação reduziu significativamente em células MCF-7 tratadas com daidzeína nas concentrações de 1–100 $\mu$ M pelo período de 24, 48 e 72 horas. A atividade antiproliferativa da daidzeína relacionou-se com a indução da apoptose mediada pelo bloqueio do ciclo celular na fase G1 em concentração de 10 $\mu$ M e em maior proporção na fase G2/M no intervalo de concentrações 50-100 $\mu$ M. E na concentração de 100 $\mu$ M induziu apoptose através da ativação da caspase-9 (Choi and Kim 2008).

### **1.3 Linhas Celulares no Estudo do Cancro da Mama**

O cancro da mama é uma doença com impacto socioeconómico considerável devido à sua severidade e alta incidência a nível global, sendo necessárias pesquisas contínuas para diagnósticos, terapêuticas e prognósticos eficientes, utilizando diferentes tipos de materiais. As linhas celulares do cancro da mama têm contribuído significativamente para o entendimento da fisiopatologia desta doença, desenvolvimento de novos fármacos e investigações toxicológicas (Dai et al. 2017; Ravi, Sneka, and Joshipura 2019).

Algumas vantagens da utilização de linhas celulares em cultura são a fácil execução, o controlo do ambiente físico-químico como pH, temperatura, pressão osmótica e concentração de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, os ensaios podem ser realizados com volumes reduzidos, o que reduz os custos dos ensaios e as culturas são expostas diretamente aos reagentes em concentrações baixas e definidas (Philippeos et al. 2012). Além disso, a utilização de culturas celulares, principalmente em estudos pré-clínicos, contribui para a redução do uso de animais em pesquisas (Comşa, Cîmpean, and Raica 2015).

As linhas celulares do cancro da mama são caracterizadas de acordo com a presença ou ausência de três importantes recetores: recetor de estrogénio (ER), recetor de progesterona (PR) e recetor do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) (Ravi, Sneka, and Joshipura 2019). São exemplos de linhas celulares: MCF-7, recetor estrogénio positivo; MDA-MB-231, recetor triplo negativo; e MDA-MB-453, HER2 positivo (Holliday and Speirs 2011).

A linha celular de adenocarcinoma da mama MCF-7, acrónimo de Michigan Cancer Foundation-7, é a mais utilizada na investigação do cancro da mama e foi isolada pela primeira vez em 1973 por Soule e colaboradores, proveniente da efusão pleural de uma paciente de 69 anos com doença metastática (Soule et al. 1973). Caracteriza-se por expressar altos níveis de recetores de estrogénio ER $\alpha$  e baixos níveis de ER $\beta$ , apresentando alta sensibilidade ao estrogénio, nomeadamente o estradiol (E $_2$ ), dependendo desta hormona para sua proliferação. Na ausência de estrogénios, estas células aumentam a expressão dos recetores de estrogénio (Comşa, Cîmpean, and Raica 2015).

As células MCF-7 apresentam a vantagem de serem bem caracterizadas e, devido ao seu fácil manuseio, continuam sendo amplamente utilizadas na investigação do cancro da mama.

## **1.4 Objetivos**

Uma vez que a aromatase é a enzima chave da síntese do estrogénio e está sobreexpressa no cancro da mama recetor estrogénio positivo, a terapia com inibidores seletivos da aromatase constitui o tratamento padrão na pós-menopausa. Os fitoestrogénios, principais componentes da soja, muitas vezes são utilizados como substituinte hormonal feminino devido às suas propriedades estrogénicas, além de comporem uma gama variada de alimentos que podem ser consumidos deliberadamente. Com este estudo, pretende-se determinar se os fitoestrogénios interferem na atividade da aromatase e na terapêutica do cancro da mama utilizando um potente inibidor da aromatase.

Este trabalho tem como objetivo principal estudar o efeito dos fitoestrogénios genisteína e daidzeína na atividade da aromatase de células MCF-7.

Para alcançar este objetivo, desenvolveram-se os seguintes estudos:

- Otimização das condições para o ensaio da atividade da aromatase;
- Comparação dos efeitos da aromatase na presença da genisteína e da daidzeína com o substrato natural, 17 $\beta$ -estradiol;
- Estudo do efeito da genisteína e da daidzeína, comparado ao 17 $\beta$ -estradiol, na presença e na ausência do inibidor da aromatase, letrozol.

## Capítulo 2

# Estudo do Efeito da Genisteína e da Daidzeína na Atividade da Aromatase de células MCF-7

## Materiais e Metodologia

### 2.1 Materiais

#### 2.1.1 Reagentes

- Acetonitrilo, Carlo Erba Reagents;
- Água MilliQ, Millipore;
- Antibiótico Ab (10,000 unidades/mL de penicilina, 10mg/mL de estreptomicina) e Antimicótico (25µg/mL de anfotericina B);
- Aromatase (CYP19A) Activity Assay Kit, BioVision;
- Azul de tripano (*Trypan blue*);
- Bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>), Fisher Scientific;
- Cloreto de potássio (KCl), AppliChem;
- Cloreto de sódio (NaCl), Fisher Scientific;
- Dimetilsulfóxido (DMSO), Honeywell Research Chemicals;
- Fosfato dissódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), Fisher Scientific;
- Fosfato monopotássico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), Honeywell;
- Meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), Sigma Aldrich;
- Pierce BCA Protein Assay kit, Thermo Scientific;
- Soro bovino fetal (FBS), Biochrom;
- Tampão fosfato salino (PBS).

#### 2.1.2 Linha celular

- MCF-7 (adenocarcinoma da mama - Michigan Cancer Foundation-7).

#### 2.1.3 Compostos testados

- 17-β-estradiol, Sigma Aldrich;
- Isoflavona de soja- Daidzeína, Sigma Aldrich;
- Isoflavona de soja- Genisteína, Sigma Aldrich.

#### **2.1.4 Materiais**

- Agitador magnético, Agimatic HS;
- Balança analítica, RadMag PS 2100.R2;
- Banho Maria, Fisher Scientific Polystat 36;
- Câmara de Fluxo Laminar Vertical, NuAire, Classe II;
- Câmara de Neubauer;
- *Cell scraper*;
- Centrífuga refrigerada, Sigma 3K18C, Bioblock Scientific;
- Deionizador de água, MilliQ;
- Incubadora, NuAire, DHD Autoflow;
- Microscópio invertido, Olympus CK40;
- Espectrofotômetro de microplacas, BioRad xMark;
- Microtubos de 1,5mL;
- Fluorímetro, Spectra Max Gemini EM;
- Frascos de cultura;
- Micropipetas e pontas;
- Placas de petri;
- Placas multipocetos;
- Pipetas graduadas;
- Potenciômetro medidor de pH, Thermo Scientific Orion Star A211;
- Tubos falcon.

#### **2.2 Preparação do Meio de Cultura DMEM**

O meio de cultura utilizado foi o DMEM liofilizado, com alta percentagem de glicose, contendo L-glutamina.

Para a preparação, solubilizou-se DMEM liofilizado (13,4g) e bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$  – 3,7g/L) em água destilada MilliQ para o volume final de 1L de meio. O pH foi ajustado para 7,2, no potenciômetro, sob agitação magnética.

O meio foi suplementado com 1% de Antibiótico Ab/Antimicótico (10,000 unidades/mL de penicilina, 10mg/mL de estreptomicina e 25µg/mL de anfotericina B) e 10% (v/v) de FBS não ativado. Procedeu-se, então, à filtragem do meio por meio de sistema a vácuo na Câmara de Fluxo Laminar vertical, sendo posteriormente armazenado a 4°C até sua utilização, sendo previamente aquecido a 37°C para as culturas celulares.

## 2.3 Preparação da Solução de PBS

A solução de PBS para os ensaios foi preparada utilizando a solução concentrada e previamente preparada pelo Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS), composta pelos seguintes reagentes: NaCl (1,37M), KCl (27mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (100mM) e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (20mM).

Diluiu-se 100mL da solução concentrada de PBS em água destilada MilliQ para o volume final de 1L. A solução obtida foi filtrada a vácuo na Câmara de Fluxo Laminar vertical e armazenada à temperatura ambiente.

## 2.4 Preparação das Soluções dos Compostos

### 2.4.1 17β-Estradiol

A preparação da solução inicial (solução mãe) do 17β-estradiol consistiu na reconstituição de 2,7mg do 17β-estradiol liofilizado em 1mL de DMSO, obtendo uma solução de concentração 10<sup>-2</sup> M.

A partir da solução mãe, foram preparadas duas soluções intermédias de 10<sup>-3</sup>M e 10<sup>-5</sup>M (Figura 2.1), diluídas em meio de cultura DMEM e armazenadas a -20°C até os ensaios.

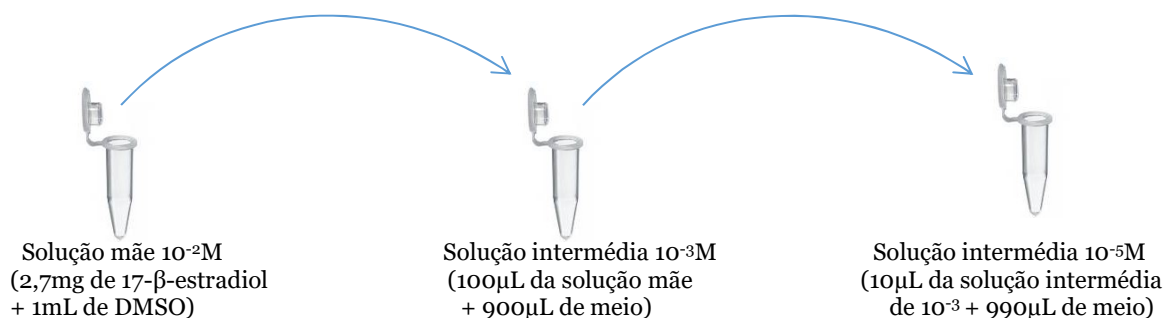


Figura 2.1 – Preparação da solução mãe de 17β-estradiol e soluções intermédias 10<sup>-3</sup>M e 10<sup>-5</sup>M.

As soluções de 17β-estradiol requeridas para os ensaios com as concentrações 50, 10 e 1nM, foram preparadas a partir da solução intermédia 10<sup>-5</sup>M, conforme Figura 2.2.

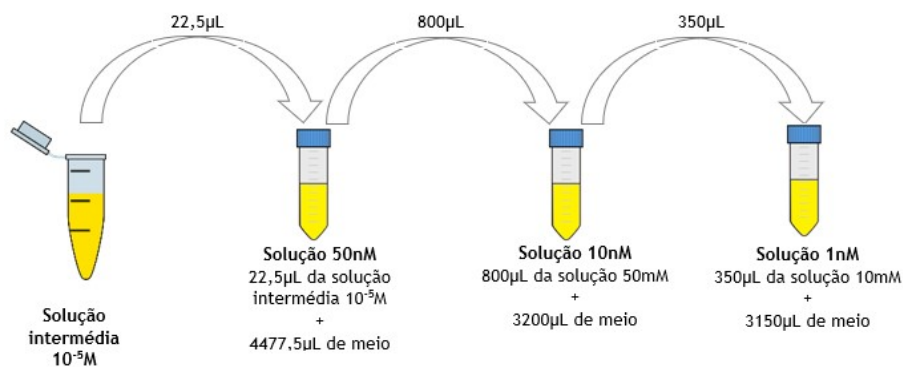


Figura 2.2 – Preparação das soluções de  $17\beta$ -estradiol 50, 10 e 1nM.

### 2.4.2 Genisteína

A solução inicial de genisteína (solução mãe) foi preparada diluindo-se 5mg de genisteína liofilizada em 2mL de DMSO, obtendo-se a concentração final de 9,25mM e armazenada a  $-20^{\circ}C$  até aos ensaios.

As soluções de genisteína 100, 50 e 25µM para os ensaios foram preparadas a partir da diluição da solução mãe em meio de cultura DMEM, conforme a Figura 2.3.

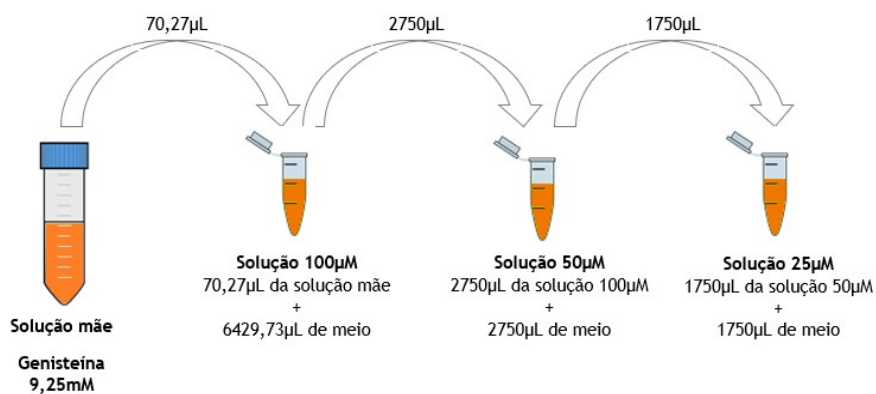


Figura 2.3 – Preparação das soluções de Genisteína 100, 50 e 25µM.

### 2.4.3 Daidzeína

A solução inicial (solução mãe) de daidzeína foi preparada diluindo-se 5mg de daidzeína liofilizada em 2mL de DMSO, obtendo-se uma solução de concentração 9,85mM e armazenada a  $-20^{\circ}C$  até os ensaios.

As soluções de daidzeína 100, 50 e 25µM foram preparadas a partir da solução mãe 9,85mM em meio DMEM, conforme a Figura 2.4.

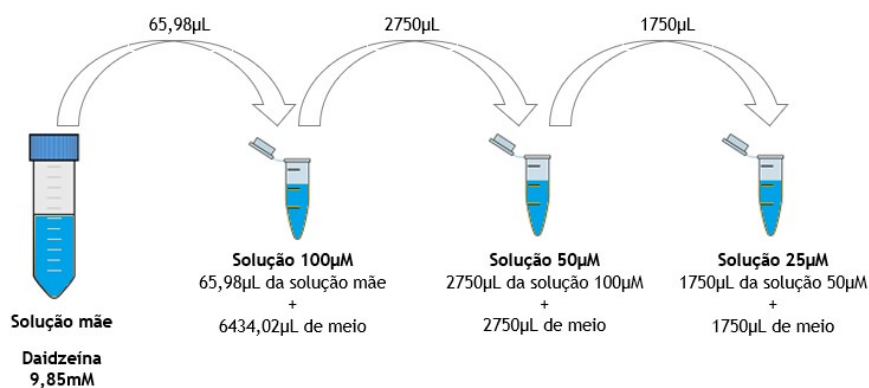


Figura 2.4 – Preparação das soluções de Daidzeína 100, 50 e 25µM.

#### 2.4.4 Controlo com DMSO

O controlo com DMSO 1,1% foi preparado diluindo-se 38,5µL de DMSO 100% em 3461,5µL de meio DMEM, conforme a Figura 2.5.

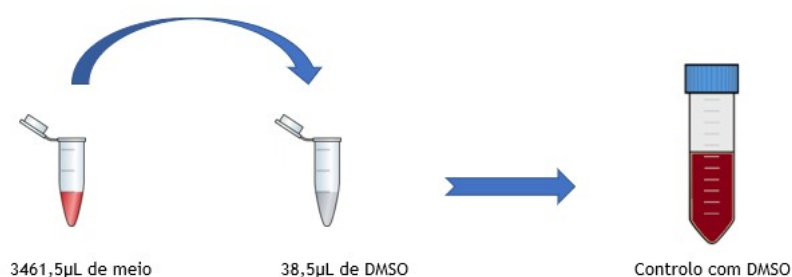


Figura 2.5 – Preparação da solução de controlo com DMSO 1,1%.

A concentração final de DMSO utilizada para a preparação dos compostos e do controlo foi sempre inferior a 1,1 % uma vez que esta concentração não interfere na viabilidade celular.

### 2.5 Cultura Celular

As células MCF-7 foram semeadas em meio DMEM e incubadas a 37°C, sob atmosfera húmida e 5% de CO<sub>2</sub>.

A alíquota mãe utilizada neste trabalho foi obtida do banco de células armazenada em azoto a -180°C em solução de criopreservação (DMSO 5% e meio de cultura). Realizou-se o descongelamento à temperatura ambiente e centrifugação. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensão em meio de cultura DMEM à temperatura de 37°C. A

suspensão foi dividida em 2 alíquotas de 500µL e transferidas para frascos de cultura de 25cm<sup>2</sup>, aos quais foi adicionado 4mL de meio de cultura DMEM à temperatura de 37°C. A troca do meio foi realizada a cada 48 horas e as células foram divididas para novos frascos de cultura de 25cm<sup>2</sup> ou 75cm<sup>2</sup> ao se atingir confluência de 80-90%.

## **2.6 Técnicas Aplicadas**

### **2.6.1 Tripsinização**

A tripsinização foi realizada a cada passagem, ao obter-se 80-90% de confluência. Para a realização deste procedimento, aspirou-se o meio de cultura dos frascos e adicionou-se 3mL de tripsina, à temperatura de 37°C, para os frascos de cultura de 25cm<sup>2</sup> e 7mL para os frascos de 75cm<sup>2</sup>. Em seguida, realizou-se a incubação a 37°C, sob atmosfera húmida e 5% de CO<sub>2</sub> por 5 a 10 minutos para otimizar a reação enzimática. Observaram-se os frascos ao microscópio invertido para certificar que as células se encontravam desagregadas e adicionou-se 3mL e 7mL de meio de cultura DMEM (à temperatura de 37°C) a cada frasco de cultura 25cm<sup>2</sup> e 75cm<sup>2</sup>, respetivamente, para neutralizar a tripsina. A suspensão de células foi centrifugada a 125g durante 5 a 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* ressuspensado em 1mL de meio de cultura, sendo a suspensão dividida em novos frascos de cultura.

### **2.6.2 Criopreservação**

A cada passagem celular, procedeu-se à criopreservação. Após a tripsinização das células, centrifugação e descarte do sobrenadante, os *pellets* foram ressuspensos em meio de cultura DMEM, à temperatura de 37°C e DMSO 5%. Foram adicionados 1mL da suspensão para cada *cryovial*, sendo em seguida armazenados a -20°C durante 4 horas, transferidos para -80°C por 3 dias e mantidos no banco de células a -180°C em azoto líquido.

### **2.6.3 Contagem de Células**

A contagem de células foi realizada após cada tripsinização. Retirou-se 10µL da suspensão celular, adicionou-se 10µL do corante azul de tripano (*Trypan Blue*) e homogeneizou-se a solução obtida. Aplicou-se 10µL da solução na câmara de Neubauer e procedeu-se à contagem das células por quadrante no microscópio invertido.

O cálculo do volume de suspensão de células a retirar para o plaqueamento foi realizado com a média das células viáveis, para a densidade de células de  $2 \times 10^4$  por poceto, em placas de 24 pocetos, sendo o volume final de cada poceto de 500 $\mu$ L.

## **2.7 Justificação das concentrações utilizadas nos ensaios**

As concentrações utilizadas de 17 $\beta$ -estradiol 1, 10 e 50nM, genisteína 25, 50 e 100 $\mu$ M e daidzeína 25, 50 e 100 $\mu$ M basearam-se no facto de terem sido utilizadas previamente pelo grupo de investigação no qual se insere este projeto e por outros grupos de investigadores (Basu and Maier 2018; Chen et al. 2003; Choi and Kim 2013; Liu et al. 2016; Poschner et al. 2017).

## **2.8 Preparação das Amostras para realização dos ensaios de Doseamento de Proteínas Totais e Atividade da Aromatase**

Para cada ensaio foi preparada uma placa de 24 pocetos, utilizando-se a concentração de  $2 \times 10^4$  células em 500 $\mu$ L de meio de cultura por poceto.

Após 48 horas de incubação a 37°C, sob atmosfera húmida e 5% de CO<sub>2</sub>, retirou-se o meio de cultura dos pocetos e adicionaram-se as soluções com os compostos e os controlos.

Realizaram-se os estímulos em duplicado para cada concentração dos compostos (17 $\beta$ -estradiol, genisteína e daidzeína). As placas foram incubadas por 48 horas a 37°C, sob atmosfera húmida e 5% de CO<sub>2</sub>.

Após o período de incubação, para o ensaio da aromatase, retirou-se o meio dos pocetos e em seguida, lavou-se cada poceto com 500 $\mu$ L de solução de PBS à temperatura de 37°C. Retirou-se a solução de PBS e adicionou-se mais 500 $\mu$ L de PBS. Raspam-se os pocetos com *cell scraper*, lavando-os em solução de PBS entre as diferentes concentrações. Aspirou-se o conteúdo de cada poceto e transferiu-se para microtubos, correspondente a cada poceto (Figura 2.6). Procedeu-se à centrifugação a 125RCF por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 200 $\mu$ L de *Aromatase Assay Buffer* gelado a cada microtubo de 1.5mL. Com um pilão, macerou-se o *pellet*, lavando-se o pilão em solução de PBS entre as concentrações. Realizou-se a incubação em gelo por 5 minutos, seguida de centrifugação a 14000g por 15 minutos a 4°C. Transferiu-se o sobrenadante de cada microtubo para um novo microtubo congelado e armazenou-se a -80°C até o ensaio.

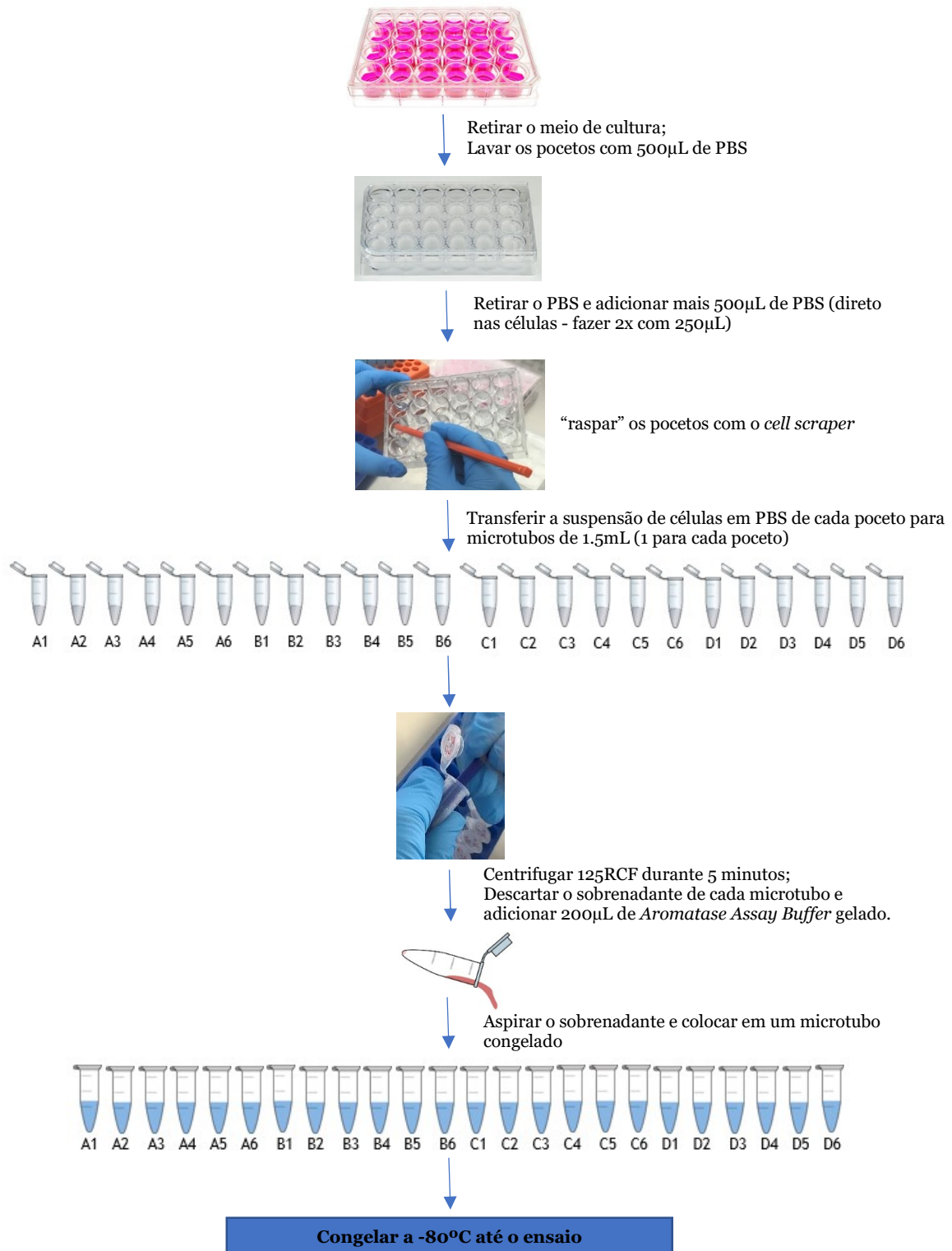


Figura 2.6 – Preparação das amostras para o Ensaio da Atividade da Aromatase.

Para o ensaio de doseamento de proteínas, retirou-se o meio dos pocetos e lavou-se com 500µL de solução de PBS à temperatura de 37°C. Retirou-se a solução de PBS, cobriu-se a placa com papel alumínio e armazenou-se a -20°C até o ensaio.

## **2.9 Ensaio de Doseamento de Proteínas Totais pelo Método do Ácido Bicinchonínico (BCA)**

O doseamento de proteínas pelo método do ácido bicinchonínico (BCA - *Bicinchoninic Acid*) é um ensaio colorimétrico, com leituras a 562nm. A reação baseia-se na redução dos cátions de cobre II ( $\text{Cu}^{2+}$ ) a cobre I ( $\text{Cu}^+$ ) pelas proteínas em meio alcalino com o ácido bicinchonínico, formando um complexo de cor púrpura resultante da quelação de um cátion de cobre (I) por parte de duas moléculas de ácido. Este método deteta proteínas na faixa de 20-2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Goldring 2015; Moraes et al. 2013; Olson 2016).

O doseamento de proteínas totais foi realizado com o *Pierce BCA Protein Assay Kit* conforme instruções do fabricante. Para a curva de calibração foram preparadas alíquotas dos padrões de albumina do soro bovino (BSA – *Bovine Serum Albumin*) nas concentrações de 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 e 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e adicionados 25 $\mu\text{L}$  em cada poceto, em triplicada, em uma placa de 96 pocetos. O *mix* de reagentes foi preparado e adicionado 200 $\mu\text{L}$  em cada poceto, sendo a placa homogeneizada levemente e incubada a 37°C por 30 minutos. A leitura da placa foi realizada em modo cinético no espectrofotômetro de microplacas a 562/690nm. Para calcular a curva de calibração, fez-se a média das absorvâncias a 562nm para cada concentração de BSA, subtraíram-se as médias ao branco e fez-se o gráfico das absorvâncias *versus* a concentração da proteína ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

À placa de 24 pocetos, com os controles e compostos em duplicada, cada poceto foi lavado com 20 $\mu\text{L}$  de solução de PBS e, em seguida, removeu-se o PBS. Adicionou-se 200 $\mu\text{L}$  do *mix* de reagentes em cada poceto. A placa foi homogeneizada levemente e incubada a 37°C por 30 minutos. A leitura foi realizada em modo cinético no espectrofotômetro de microplacas a 562/690nm. Fez-se a média dos valores de absorvância obtidos e os cálculos da quantificação de proteínas foi realizado utilizando-se a equação linear da curva de calibração.

## **2.10 Ensaio da Atividade da Aromatase**

A aromatase é a enzima responsável pela conversão de androgénios em estrogénio (17 $\beta$ -estradiol) e desempenha importante papel na proliferação do cancro da mama hormono-dependente e na resistência tumoral, sendo que a sua atividade pode estar aumentada neste tipo de cancro (Chan, Petrossian, and Chen 2016).

No ensaio da atividade da aromatase, foi utilizado um substrato fluorogénico convertido em um metabolito altamente fluorescente detetado na faixa de visível de Ex/Em =

488/527nm, garantindo uma boa relação sinal-ruído com pouca interferência por autofluorescência. Para o ensaio, utilizou-se o Letrozol, um potente inibidor da enzima aromatase, e altamente seletivo, assegurando que outras enzimas não interferissem no resultado do ensaio (BioVision Incorporated 2019).

### 2.10.1 Preparação das Soluções

Ao longo do ensaio da atividade da aromatase, foram preparadas soluções com os componentes fornecidos no *Aromatase (CYP19A) Activity Assay kit (Fluorometric)* conforme apresentado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Conteúdo fornecido no *Aromatase (CYP19A) Activity Assay kit (Fluorometric)* para o ensaio da atividade da aromatase.

Componente	Apresentação
<i>Aromatase Assay Buffer</i>	Frasco com 100mL
<i>Fluorescence Standard 1mM</i>	Frasco com 50µL
<i>Aromatase Inhibitor (Letrozol)</i>	Frasco com pó liofilizado
<i>NADPH+ Generating System (100X)</i>	Frasco com pó liofilizado
<i>β-NADP+ Stock (100X)</i>	Frasco com pó liofilizado
<i>Aromatase Substrate</i>	Frasco com pó liofilizado
<i>Recombinant Human Aromatase</i>	Frasco com pó liofilizado

A diluição das soluções está descrita em cada etapa realizada ao longo deste trabalho mantendo-se o nome original em inglês.

### 2.10.2 Curva de Calibração Padrão para o Ensaio da Atividade da Aromatase

A curva de calibração padrão foi realizada utilizando o *Aromatase (CYP19A) Activity Assay kit (Fluorometric)*. Preparou-se a solução de *Fluorescence Standard* a uma concentração de final de 0.5 pmole/µL. Para tal, diluiu-se 10µL do *Fluorescence Standard 1mM* em 990µL *Aromatase Assay Buffer*, obtendo-se uma solução de 10µM. Da solução obtida, retirou-se 50µL e diluiu-se em 950µL de *Aromatase Assay Buffer*, resultando em uma solução *Fluorescence Standard* 0.5 pmole/µL para utilização na placa de 96 pocetos.

A placa foi preparada utilizando-se somente a coluna 1, adicionando 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16 e 20 µL do *Fluorescence Standard* 0.5 pmole/µL, obtendo a concentração de 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 10 pmole/poceto. O volume de cada poceto foi ajustado para 100µL com *Aromatase Assay Buffer*.

A leitura da fluorescência procedeu-se no fluorímetro de microplacas no modo cinético em intervalos de 1 minuto a Ex/Em 485/538nm por 60 minutos a uma temperatura de 37°C.

Para o cálculo da curva de calibração, subtraiu-se a leitura de cada concentração do *Fluorescence Standard* ao padrão em branco (0 pmole/poceto) para cada minuto de leitura (Tabela 2.2) e escolheu-se a fluorescência do minuto zero para fazer o gráfico da reta de calibração, representada no Gráfico 2.1.

Tabela 2.2 – Valores calculados de fluorescência por poceto no minuto zero.

Poceto \ Tempo (min)	A	B	C	D	E	F	G	H
0	0	1204,355	2916,801	4072,747	5599,254	7513,547	9396,599	11818,92

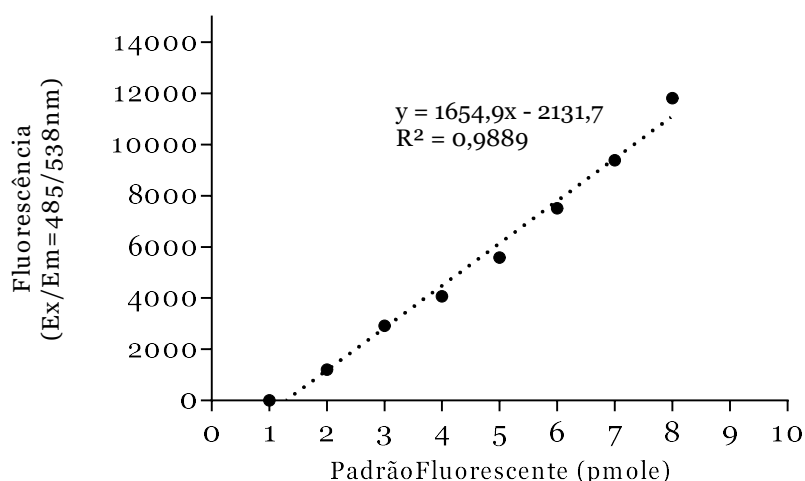


Gráfico 2.1 – Curva de calibração padrão do metabolito fluorescente da aromatase. Um mole do padrão fluorescente corresponde ao metabolismo de um mole do substrato da aromatase.

## 2.11 Desenvolvimento e Otimização do Protocolo Experimental para o Ensaio da Atividade da Aromatase

A realização do ensaio da atividade da aromatase iniciou-se pela escolha dos volumes de lisado celular para os ensaios. O protocolo do *Aromatase (CYP19A) Activity Assay kit (Fluorometric)* define que o volume de lisado celular deve ser de 2 a 48µL (BioVision Incorporated 2019). Desta forma, começaram por se testar os volumes de 12, 24 e 48 µL de lisado.

Para a reação, foram preparadas as soluções do inibidor da aromatase Letrozol 5µM e *NADPH Generating System (100X)*. A preparação da solução Letrozol consistiu na sua

reconstituição com 55µL de acetonitrilo, obtendo-se uma solução estoque de Letrozol 1mM. Desta solução, retirou-se 5µL e dilui-se em 995µL de *Aromatase Assay Buffer*, obtendo a solução para trabalho de Letrozol 5µM. O *NADPH Generating System (100X)* foi reconstituído em 220µL de *Aromatase Assay Buffer*. As soluções *stock* e de trabalho de Letrozol e de *NADPH Generating System (100X)* foram armazenadas a -20°C até o ensaio.

Na placa com 96 pocetos, foram adicionados na coluna 2 os lisados de células nos volumes de 12µL (poceto 2A), 24µL (poceto 2B) e 48µL (poceto 2C) e 2µL de *NADPH Generating System (100X)*, ajustando o volume final com *Aromatase Assay Buffer* para 70µL por poceto. Ainda na coluna 2, foi preparado o controlo positivo com inibidor, adicionando-se os lisados de células nos volumes de 12µL (poceto 2D), 24µL (poceto 2E) e 48µL (poceto 2F) e 2µL *NADPH Generating System (100X)*, e 20µL de Letrozol 5µM, ajustando o volume final para 70µL por poceto com *Aromatase Assay Buffer*.

No leitor de fluorescência de microplacas foi realizada a leitura da fluorescência no modo cinético em intervalos de 1 minuto a Ex/Em 485/538nm por 60 minutos a uma temperatura de 37°C.

No Gráfico 2.2, está representado o resultado da fluorescência com os volumes de lisado celular de 12, 24 e 48µL.

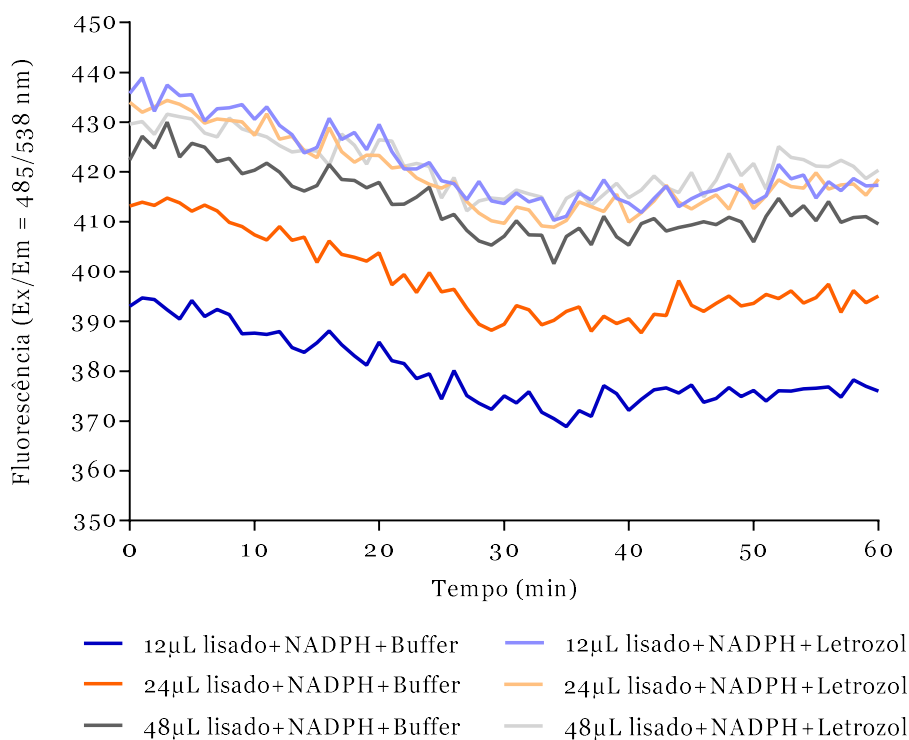


Gráfico 2.2 – Gráfico de fluorescência correspondente aos diferentes volumes de lisado celular (12, 24 e 48µL), com e sem inibidor da aromatase.

Os resultados mostram que para as três amostras testadas (12, 24 e 48 $\mu$ L) há sensibilidade, entretanto atingem os valores mais baixos de fluorescência ao fim de 30 minutos da reação. Além disso, o volume de 12 $\mu$ L de lisado celular apresentou maior amplitude de fluorescência entre a amostra sem inibidor e com o inibidor (controle positivo). Para os outros volumes de 24 e 48 $\mu$ L, há uma menor amplitude da fluorescência. É possível observar no gráfico que a fluorescência dessas amostras sem e com inibidor estão muito próximas.

Apesar dos resultados com os volumes de 12, 24 e 48 $\mu$ L mostrarem diferenças, consideramos que deveriam ser testados volumes menores de 2, 4 e 6 $\mu$ L de lisado celular para verificar se haveria aumento significativo da diferença entre os valores obtidos. Na mesma placa com 96 pocetos, foram adicionados na coluna 3 lisados de células nos volumes de 2 $\mu$ L (poceto 3A), 4 $\mu$ L (poceto 3B) e 6 $\mu$ L (poceto 3C) e 2 $\mu$ L de *NADPH Generating System (100X)*, ajustando o volume final com *Aromatase Assay Buffer* para 70 $\mu$ L por poceto. Ainda na coluna 3, foi preparado o controle positivo com inibidor, adicionando-se lisados de células nos volumes de 2 $\mu$ L (poceto 3D), 4 $\mu$ L (poceto 3E) e 6 $\mu$ L (poceto 3F) e 2 $\mu$ L *NADPH Generating System (100X)* e 20 $\mu$ L de Letrozol 5 $\mu$ M, ajustando o volume final para 70 $\mu$ L por poceto com *Aromatase Assay Buffer*.

O resultado obtido para as amostras de 2, 4 e 6 $\mu$ L está representado no Gráfico 2.3.

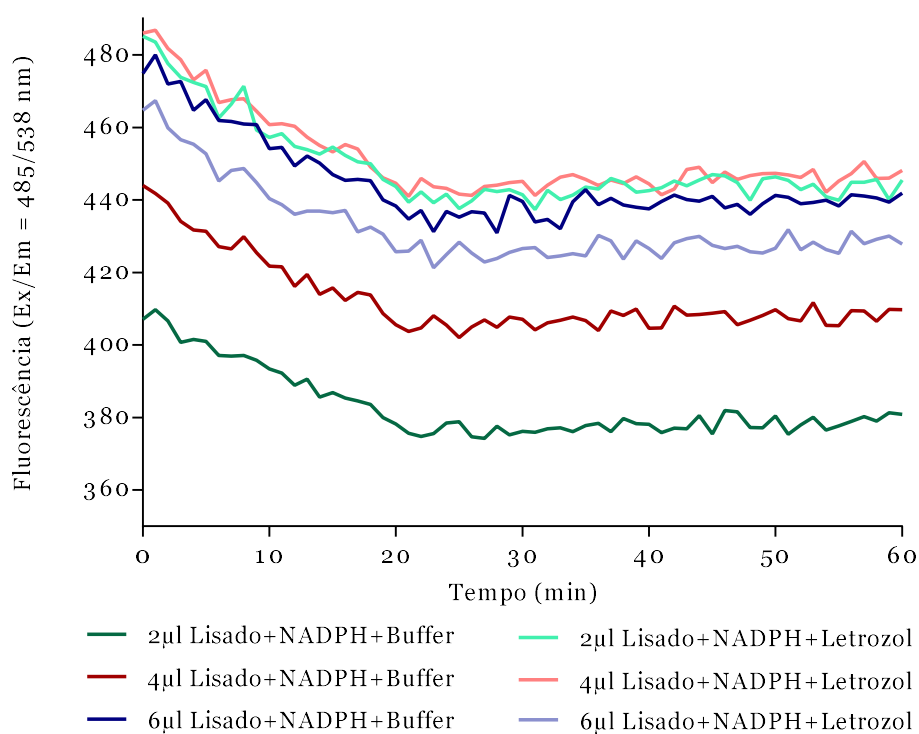


Gráfico 2.3 - Gráfico de fluorescência correspondente aos diferentes volumes de lisado celular (2, 4 e 6 $\mu$ L), com e sem inibidor da aromatase.

Da mesma forma que as amostras anteriores, os resultados mostram que o volume de 2 $\mu$ L de lisado celular apresentou maior amplitude de fluorescência entre a amostra sem inibidor e com o inibidor (controle positivo) e o tempo das três amostras para alcançar os valores mais baixos de fluorescência foi de aproximadamente 20 minutos, portanto menor do que das amostras de 12, 24 e 48 $\mu$ L.

De entre os ensaios realizados com diferentes volumes de lisado, as amostras com maior amplitude de fluorescência foram as de 2 e 12 $\mu$ L. No entanto, a amostra de 12 $\mu$ L apresentou maior tempo para alcançar os valores mais baixos de fluorescência (30 minutos), em comparação com a amostra de 2 $\mu$ L (20 minutos), e por este motivo foi selecionado pelo grupo de investigação o volume de lisado de 12 $\mu$ L para proceder ao ensaio da atividade da aromatase.

## **2.12 Protocolo Experimental da Atividade da Aromatase – Condições definidas**

O ensaio da atividade da aromatase foi realizado com o volume de lisado de 12 $\mu$ L das culturas celulares expostas aos compostos 17 $\beta$ -estradiol, genisteína e daidzeína em diferentes concentrações.

Para o ensaio, foram preparadas as seguintes soluções:  $\beta$ -NADP<sup>+</sup> (100X), *Aromatase Substrate 1mM* e *Recombinant Human Aromatase*. A preparação do  $\beta$ -NADP<sup>+</sup> (100X) consistiu na reconstituição do frasco de  $\beta$ -NADP<sup>+</sup> (100X), em 110 $\mu$ L de *Aromatase Assay Buffer*, obtendo-se a solução *stock* de  $\beta$ -NADP<sup>+</sup> (100X). A solução de *Aromatase Substrate 1mM* foi preparada ao reconstituir *Aromatase Substrate* com 55 $\mu$ L de acetonitrilo. Estas soluções foram armazenadas a -20°C até o ensaio da atividade da aromatase. A solução de *Recombinant Human Aromatase* foi preparada imediatamente antes do uso no ensaio. Reconstituiu-se o conteúdo do frasco de *Recombinant Human Aromatase* em 230 $\mu$ L de *Aromatase Assay Buffer* e 20 $\mu$ L de *NADPH Generating System (100X)*. A porção não utilizada neste ensaio, foi armazenada a -80°C para futuros ensaios.

O ensaio foi realizado em duplicado para os controlos e para as amostras com os compostos genisteína 25, 50 e 100 $\mu$ M, daidzeína 25, 50 e 100 $\mu$ M e 17 $\beta$ -estradiol 1, 10 e 50nM. Descongelaram-se as amostras e preparou-se para cada amostra o *Aromatase Reaction Mix*, para um volume final de 50 $\mu$ L, contendo 12 $\mu$ L do lisado celular, 2 $\mu$ L de *NADPH<sup>+</sup> Generating System (100X)* e 36 $\mu$ L de *Aromatase Assay Buffer*.

Para a montagem da placa, os pocetos foram preparados com os reagentes da seguinte forma:

- *Test Sample = 50µL Aromatase Reaction Mix + 20µL de Aromatase Assay Buffer*
- *Positive Inhibition Control = 50µL Aromatase Reaction Mix + 20µL Letrozol 5µM*
- *Background (Negative Control) = 70µL Aromatase Assay Buffer*
- *Aromatase PC (Positive Control) = 25µL Recombinant Human Aromatase + 45µL Aromatase Assay Buffer*
- *PC + Inhibitor = 25µL Recombinant Human Aromatase + 20µL Letrozole 5µM + 25µL Aromatase Assay Buffer*

Na Figura 2.7, está representado o desenho da placa para o ensaio da atividade da aromatase.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	CONTROLOS				Controlo	Controlo	Controlo DMSO	Controlo DMSO	Controlo	Controlo	Controlo DMSO	Controlo DMSO	
<b>B</b>	GENISTEÍNA COM BUFFER AROMATASE				Genisteína 25µM	Genisteína 25µM	Genisteína 50µM	Genisteína 50µM	Genisteína 100µM	Genisteína 100µM			
<b>C</b>	GENISTEÍNA COM LETROZOL				Genisteína 25µM	Genisteína 25µM	Genisteína 50µM	Genisteína 50µM	Genisteína 100µM	Genisteína 100µM			
<b>D</b>	DAIDZEÍNA COM BUFFER AROMATASE				Daidzeína 25µM	Daidzeína 25µM	Daidzeína 50µM	Daidzeína 50µM	Daidzeína 100µM	Daidzeína 100µM			
<b>E</b>	DAIDZEÍNA COM LETROZOL				Daidzeína 25µM	Daidzeína 25µM	Daidzeína 50µM	Daidzeína 50µM	Daidzeína 100µM	Daidzeína 100µM			
<b>F</b>	17-β-ESTRADIOL COM BUFFER AROMATASE				17-β-Estradiol 1nM	17-β-Estradiol 1nM	17-β-Estradiol 10nM	17-β-Estradiol 10nM	17-β-Estradiol 50nM	17-β-Estradiol 50nM			
<b>G</b>	17-β-ESTRADIOL COM LETROZOL				17-β-Estradiol 1nM	17-β-Estradiol 1nM	17-β-Estradiol 10nM	17-β-Estradiol 10nM	17-β-Estradiol 50nM	17-β-Estradiol 50nM			
<b>H</b>					Background	Background	Aromatase PC	Aromatase PC	PC + Inhibitor	PC + Inhibitor			

	Test Sample	+ Inhibitor Control	Background	Aromatase PC	PC + Inhibitor
Aromatase Reaction Mix (2X)	50 µl	50 µl	—	—	—
Recombinant Human Aromatase	—	—	—	25 µl	25 µl
Letrozole 5 µM Solution (5X)	—	20 µl	—	—	20 µl
Aromatase Assay Buffer	20 µl	—	70 µl	45 µl	25 µl

Figura 2.7 – Desenho esquemático da preparação da placa de 96 pocetos.

A placa foi incubada por 10 minutos a 37°C. Esta etapa permite que o Letrozol interaja com a aromatase. Durante a incubação, foi preparada a solução *Aromatase Substrate/NADP<sup>+</sup>* misturando 6µL de da solução *Aromatase Substrate*, 50µL da solução

de  $\beta$ -NADP<sup>+</sup> (100X) e 1444 $\mu$ L de *Aromatase Assay Buffer*, para um volume final de solução de 1,5mL, suficiente para a reação nos 50 pocetos utilizados na placa.

Imediatamente antes da leitura da placa, adicionou-se em cada poceto 30 $\mu$ L da solução *Aromatase Substrate/NADP<sup>+</sup>* e procedeu-se a medição da fluorescência no leitor de fluorescência de microplacas em modo cinético em intervalos de 1 minuto a Ex/Em 485/538nm por 60 minutos a uma temperatura de 37°C.

### 2.13 Cálculo da Atividade Específica da Aromatase

Os cálculos para a atividade específica da aromatase foram realizados conforme as instruções do fabricante do *Aromatase (CYP19A) Activity Assay kit (Fluorometric)*.

Para cada amostra, incluindo *background* e controlos com inibidor (Letrozol), realizou-se a média da fluorescência em dois tempos (T1 e T2) na fase linear da curva da reação, obtendo-se os valores de fluorescência nesses pontos, denominados RFU<sub>1</sub> e RFU<sub>2</sub>.

Conforme pode ser observado no Gráfico 2.4 e nos Gráficos 2.5, 2.6 e 2.7, onde foi escolhida uma concentração significativa de cada composto para representação gráfica, a fase linear inicia-se em aproximadamente 10 minutos após o início da reação sendo, portanto, os tempos escolhidos 5 minutos (T1) e 10 minutos (T2) para a realização dos cálculos.

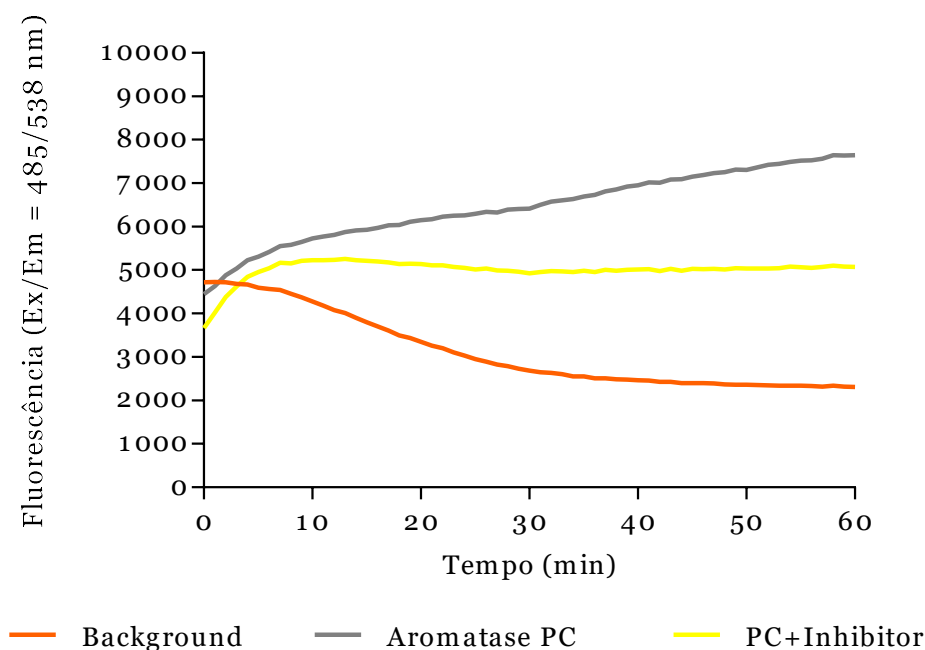


Gráfico 2.4 – Gráfico da cinética do metabolismo do substrato fluorogénico na presença e na ausência do inibidor da aromatase. *Background (Negative Control)*; *Aromatase PC (Positive Control)*; *PC + Inhibitor (Positive Control + Letrozol)*.

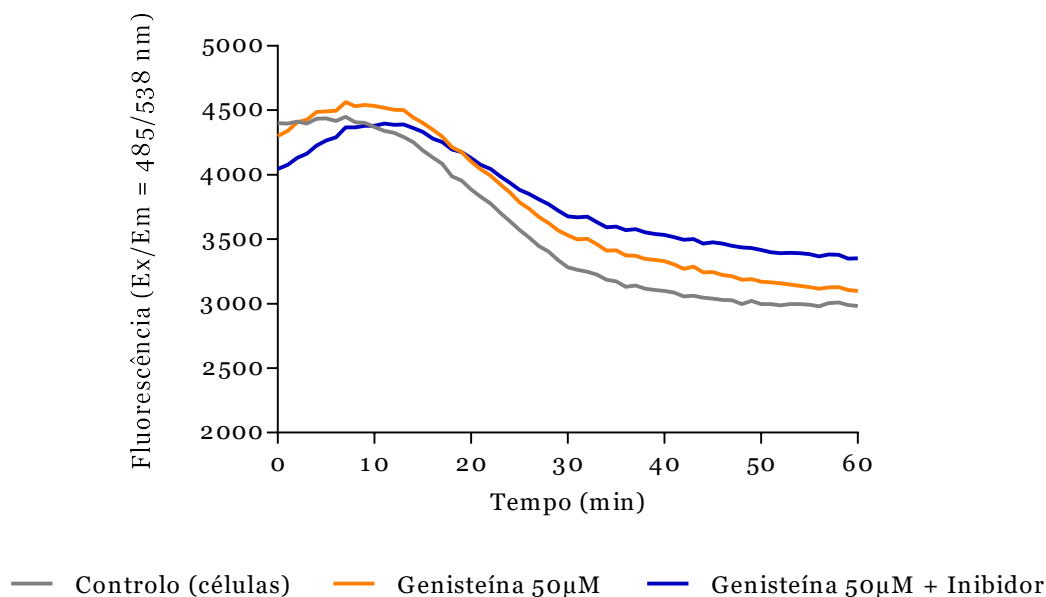


Gráfico 2.5 – Gráfico da cinética do metabolismo do substrato fluorogénico da Genisteína 50 µM na presença e ausência do inibidor da aromatase.

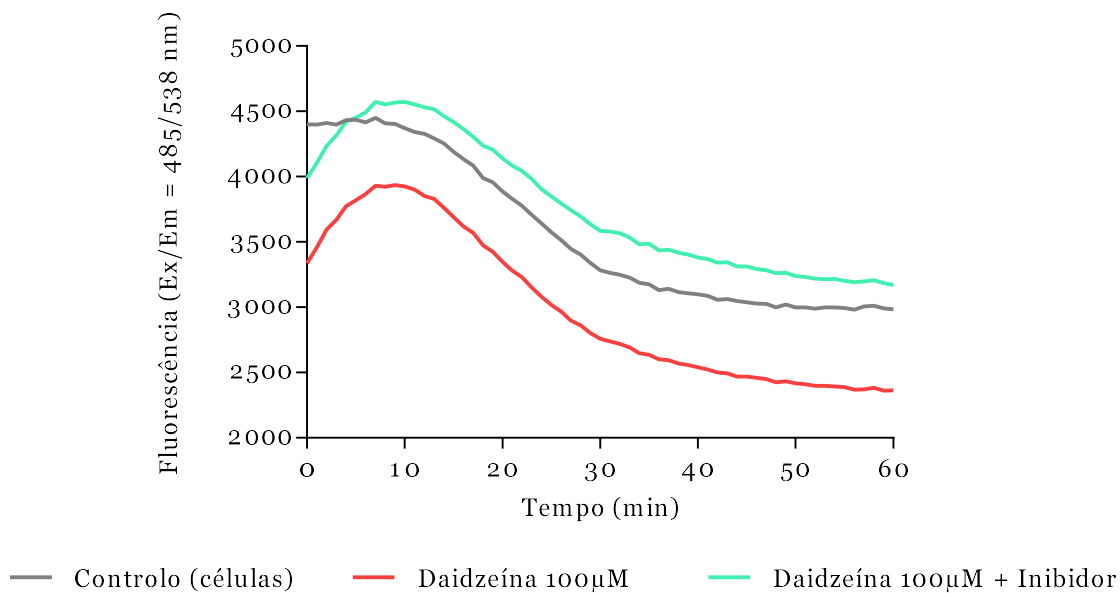


Gráfico 2.6 – Gráfico da cinética do metabolismo do substrato fluorogénico da Daidzeína 100µM na presença e ausência do inibidor da aromatase.

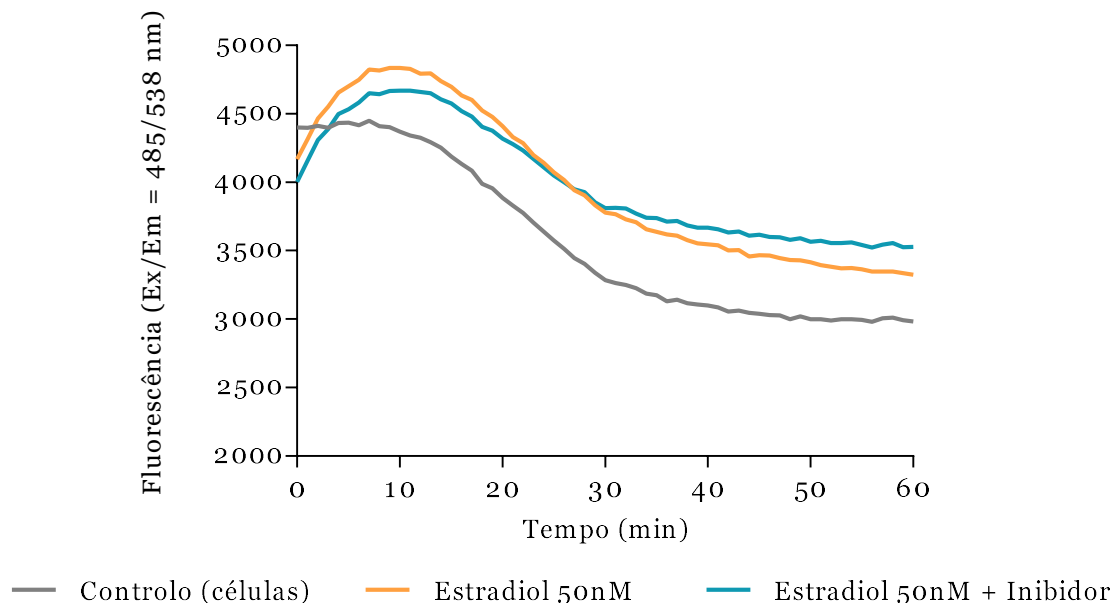


Gráfico 2.7 – Gráfico da cinética do metabolismo do substrato fluorogênico da 17β-estradiol 50nM na presença e ausência do inibidor da aromatase.

A variação da fluorescência no intervalo de tempo, denominado  $\Delta F$ , para cada amostra, foi calculada conforme as equações 1, 2 e 3:

$$\text{Variação da fluorescência das amostras (samples): } \Delta F_S = RFU_2 - RFU_1 \quad (1)$$

$$\text{Variação da fluorescência das amostras com inibidor: } \Delta F_I = RFU_2 - RFU_1 \quad (2)$$

$$\text{Variação da fluorescência do background control: } \Delta F_{BC} = RFU_2 - RFU_1 \quad (3)$$

Para determinar a intensidade de fluorescência de cada poceto, subtraiu-se o  $\Delta F$  do *background control* ( $\Delta F_{BC}$ ) das amostras ( $\Delta F_S$ ) e das amostras com inibidor ( $\Delta F_I$ ).

O cálculo da fluorescência específica gerada pela atividade da aromatase (denominada  $C_S$ ) foi calculada conforme a equação 4 representada abaixo, subtraindo-se o *positive inhibition control* de cada amostra. Uma vez que o  $\Delta F_{BC}$  apresentou resultado negativo, o mesmo foi omitido do cálculo de  $C_S$  (equação 5), segundo instrução do protocolo.

$$C_S = (\Delta F_S - \Delta F_{BC}) - (\Delta F_I - \Delta F_{BC}) \quad (4)$$

$$\downarrow$$

$$C_S = \Delta F_S - \Delta F_I \quad (5)$$

Onde:  $C_s$  = fluorescência específica gerada pela atividade da aromatase  
 $\Delta F_s$  = fluorescência das amostras (*samples*)  
 $\Delta F_{BC}$  = fluorescência do *background control*  
 $\Delta F_I$  = fluorescência do *positive inhibition control*

A atividade metabólica da aromatase foi obtida aplicando o valor de  $C_s$  à equação da curva de calibração para obter a quantidade de metabolito produzido (denominado B em pmole), conforme equação 6:

$$\text{Aromatase (CYP19A) Specific Activity} = \frac{\mathbf{B}}{\Delta T \times \mathbf{P}} = \text{pmole/min/mg} = \mu\text{U/mg} \quad (6)$$

Onde:  $\mathbf{B}$  é a quantidade de metabolito produzido, calculado a partir da equação da curva de calibração (em pmole)  
 $\Delta T$  é o tempo da reação da fase linear  $T_2 - T_1$  (em minutos)  
 $\mathbf{P}$  é a quantidade de proteína no poceto (em mg)

Uma unidade (U) da atividade da aromatase corresponde a quantidade de enzima que gera 1 $\mu$ mole de metabolito fluorescente por minuto por hidrólise de 1 $\mu$ mole de substrato da aromatase a 37°C e pH 8.

## Capítulo 3

### Análise dos Resultados e Discussão

#### 3.1 Doseamento de Proteínas Totais pelo método BCA das Células MCF-7 tratadas com 17 $\beta$ -estradiol, Genisteína e Daidzeína

O estudo do doseamento de proteínas totais foi realizado após incubação das células MCF-7 com diferentes concentrações dos compostos genisteína 25, 50 e 100 $\mu$ M, daidzeína 25, 50 e 100 $\mu$ M e 17 $\beta$ -estradiol 1, 10 e 50nM pelo período de 48 horas. Simultaneamente, as células foram incubadas com o meio de cultura DMEM na ausência e na presença de DMSO 1,1% (v/v), denominados controlo (células) e controlo (DMSO), respetivamente. O doseamento de proteínas totais dos compostos foi avaliado em comparação com os controlos.

A concentração de proteínas totais das amostras de células MCF-7 foi calculada a partir da equação da reta da curva de calibração (Gráfico 3.1), que foi preparada utilizando-se a solução de albumina de soro bovino (BSA) em diferentes concentrações como descrito no item 2.9, do Capítulo 2.

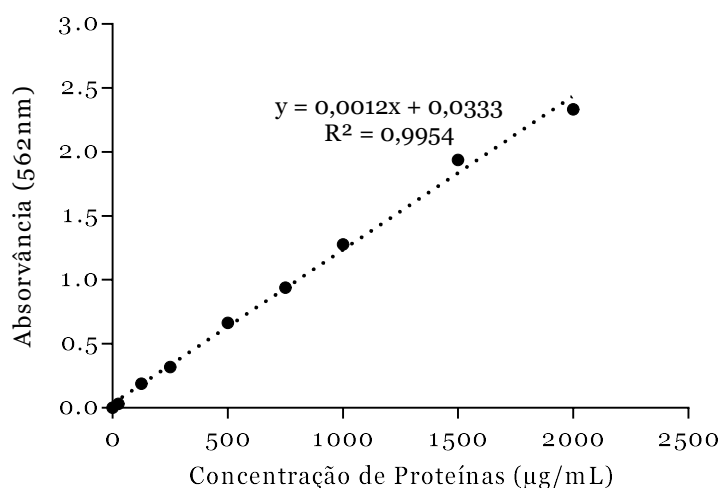


Gráfico 3.1 – Reta de Calibração do Ensaio de Doseamento de Proteínas Totais.

A aplicação do método BCA serviu para avaliar a correlação da concentração de proteínas totais e os efeitos dos compostos na proliferação celular. Os resultados obtidos estão representados na Tabela 3.1 e nos Gráficos 3.1, 3.2 e 3.3.

Tabela 3.1 – Concentração de proteínas totais para cada amostra.

Amostras	Concentração	Concentração de proteínas totais (ug/mL)
Controlo (Células)	-	305,58
Controlo (DMSO)	-	368,08
Genisteína	25µM	252,25
	50µM	148,08
	100µM	184,75
Daidzeína	25µM	317,67
	50µM	331,00
	100µM	306,83
17β-estradiol	1nM	888,50
	10nM	831,00
	50nM	815,17

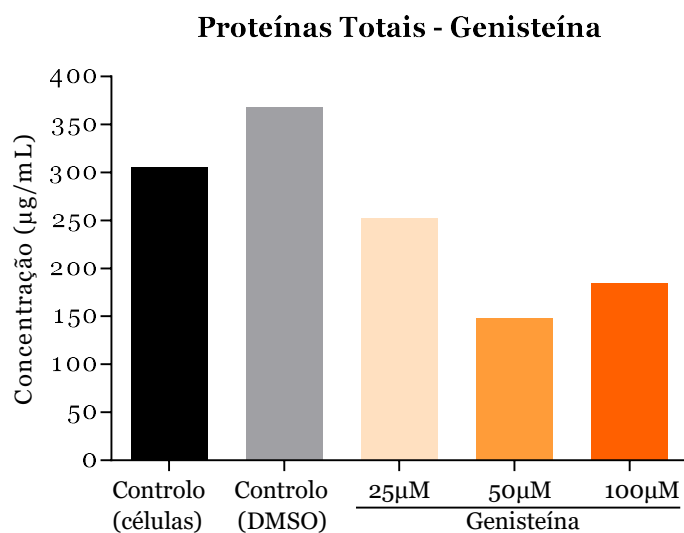


Gráfico 3.2 – Doseamento de proteínas totais de células MCF-7 tratadas com diferentes concentrações de genisteína comparativamente com os controlos.

Em comparação com os controlos, verificou-se uma redução da quantidade de proteínas totais nas células MCF-7 tratadas com genisteína (Gráfico 3.2), verificando-se uma menor concentração de proteínas nas células tratadas com genisteína 50µM.

O resultado obtido do total de proteínas para a genisteína nas três concentrações parece estar de acordo com os trabalhos publicados por outros investigadores, nomeadamente Chen e colaboradores (2003), Choi e Kim (2013) e Poschner e colaboradores (2017), que verificaram o efeito antiproliferativo da genisteína quando aplicado em concentrações superiores a 10 $\mu$ M (Chen et al. 2003; Choi and Kim 2013; Poschner et al. 2017). Segundo Thangavel e colaboradores (2019), estudos *in vitro* em células de cancro da mama MCF-7 têm demonstrado que a genisteína, em concentrações entre 10-100 $\mu$ M, atuam como antagonistas do estrogénio, impedindo sua ligação aos recetores de estrogénio (ER), afetando o metabolismo desta hormona, induzindo apoptose e reduzindo a proliferação celular (Thangavel et al. 2019).

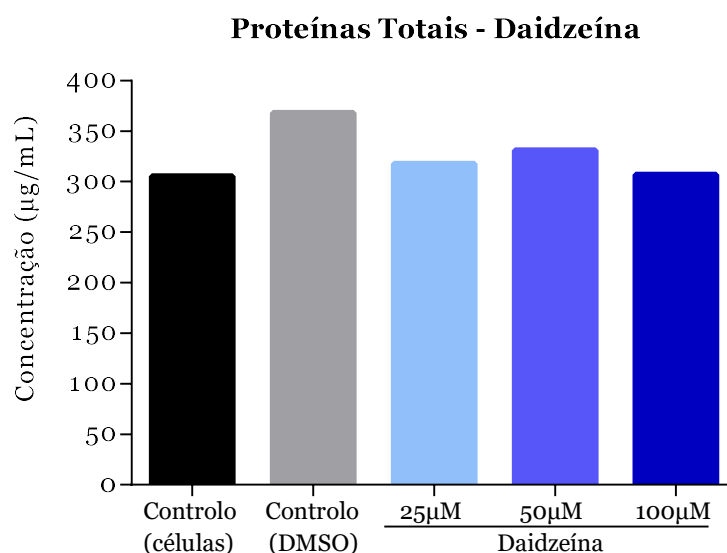


Gráfico 3.3 – Doseamento de proteínas totais de células MCF-7 tratadas com diferentes concentrações de daidzeína comparativamente com os controlos.

A daidzeína, em todas as concentrações quando comparada com os controlos, apresentou um aumento não significativo da quantidade total de proteínas, sendo mais pronunciado na concentração de 50 $\mu$ M (Gráfico 3.3). Os resultados obtidos não parecem estar de acordo com os estudos de outros grupos de investigação que evidenciaram que a daidzeína reduz a proliferação celular em concentrações superiores a 10 $\mu$ M em células MCF-7 (Choi and Kim 2013; Poschner et al. 2017). Noutro estudo realizado por Theil e colaboradores (2011), foi demonstrado que somente em altas concentrações (25 $\mu$ M-50 $\mu$ M), a daidzeína possui ação antiproliferativa em células MCF-7 *in vitro* (Theil et al. 2011). Contudo, Amaral e colaboradores (2017) e Theil e colaboradores (2011) demonstraram que a daidzeína possui fraco efeito antiproliferativo no cancro da mama em comparação com a

genisteína, podendo ser esta a explicação para a diferença de resposta entre esses dois grupos (Amaral et al. 2017; Theil et al. 2011).

As diferenças de concentração de proteínas totais entre as três amostras tratadas com daidzeína não são significativas.

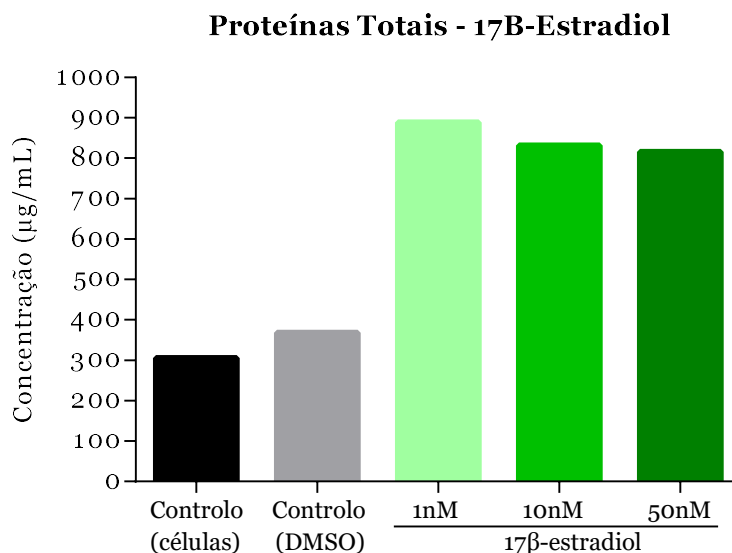


Gráfico 3.4 – Doseamento de proteínas totais de células MCF-7 tratadas com diferentes concentrações de 17 $\beta$ -estradiol comparativamente com os controlos.

Em resposta ao 17 $\beta$ -estradiol 1, 10 e 50nM a concentração de proteínas totais foi superior em comparação com os controlos (Gráfico 3.4). Os resultados obtidos estão de acordo com diversos estudos que comprovaram que o estrogénio estimula a proliferação celular, uma vez que se liga aos ER promovendo a sinalização estrogénica genómica e não-genómica (Hamilton et al. 2018; Huang, Warner, and Gustafsson 2014; Morselli et al. 2017; Patel et al. 2018).

Estudo realizado por Tian e colaboradores (2018) em células MCF-7 com estrogénio ou progesterona mostrou que o 17 $\beta$ -estradiol promove a proliferação celular de forma dose-dependente e a progressão do ciclo celular por acumulação de células na fase G2/M do ciclo celular (Tian et al. 2018).

Pode ainda verificar-se que a concentração total de proteínas se reduz à medida que se aumenta a concentração do 17 $\beta$ -estradiol. Estas diferenças não são significativas. Possivelmente, este efeito deve-se ao *feedback* negativo gerado pelas altas concentrações de estrogénio no meio.

### 3.2 Atividade da Aromatase de Células MCF-7 tratadas com 17β-estradiol, Genisteína e Daidzeína

O estudo da atividade da aromatase foi realizado em células MCF-7 tratadas com os compostos genisteína (25, 50 e 100μM), daidzeína (25, 50 e 100μM) e 17β-estradiol (1, 10 e 50nM). A atividade da aromatase foi determinada utilizando o *Fluorogenic Aromatase Substrate* que é convertido em um metabolito altamente fluorescente detetado na faixa de Ex/Em=488/527nm por comparação com os controlos. Foram realizadas reações simultâneas na presença e ausência do letrozol, um potente inibidor da atividade da aromatase utilizado para assegurar inibição seletiva desta enzima. Os resultados obtidos no doseamento de proteínas foram utilizados para calcular a atividade específica da aromatase.

Os resultados obtidos estão representados na Tabela 3.2 e no Gráfico 3.5.

Tabela 3.2 – Atividade específica da aromatase de células MCF-7 para cada amostra.

Amostras	Concentração	Atividade Específica da Aromatase (μU/mg)
Controlo meio	-	0,776
Controlo DMSO	-	0,709
Genisteína	25μM	0,987
	50μM	1,682
	100μM	1,362
Daidzeína	25μM	0,764
	50μM	0,746
	100μM	0,834
17β-estradiol	1nM	0,280
	10nM	0,291
	50nM	0,316

## Atividade Específica da Aromatase

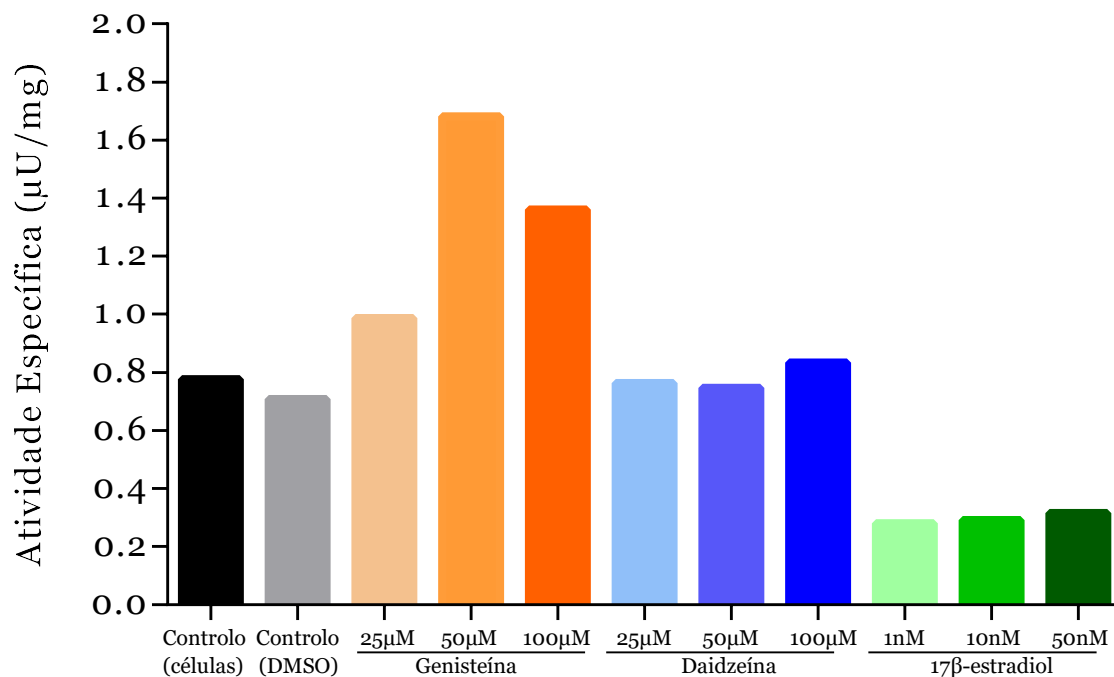


Gráfico 3.5 – Atividade específica da aromatase de células MCF-7.

De acordo com os resultados obtidos, na presença de genisteína em todas as concentrações testadas e em comparação com os controlos, verifica-se uma maior atividade da aromatase, sendo mais evidente na concentração de 50µM. Estes resultados corroboram o estudo realizado por Young H. Ju (2008) e colaboradores, que demonstrou que uma dieta à base de genisteína (250-1000p.p.m) diminuiu o efeito inibitório do letrozol em ratos ovariectomizados implantados com células MCF-7Ca na presença e na ausência de androstenediona e, como resultado, a genisteína aumentou o crescimento tumoral e impediu a ação inibitória do letrozol, levando à conclusão de que a genisteína pode reverter o efeito inibitório do letrozol, estimulando o crescimento de tumores da mama dependentes de estrogénio e que expressam aromatase, por efeito agonista nos ER (Ju et al. 2008).

van Duursen e colaboradores (2011) também demonstraram que a genisteína em concentrações fisiológicas reduz a atividade inibitória do fadrozol (inibidor da aromatase) em modelo experimental de co-cultura de células MCF-7 e *human primary BAF (breast adipose fibroblastos) in vitro* (van Duursen et al. 2011).

Ressalta-se que apesar dos estudos realizados por outros investigadores para avaliar a influência da genisteína na atividade da aromatase utilizando células MCF-7 e inibidores

da aromatase referirem que a genisteína pode alterar a atividade inibitória de compostos inibidores da aromatase, as condições dos ensaios são diferentes das utilizadas neste trabalho.

A presente investigação teve como foco avaliar a influência das isoflavonas da soja, genisteína e daidzeína em comparação com o substrato fisiológico,  $17\beta$ -estradiol, na atividade da aromatase em células MCF-7 *in vitro*, na presença e na ausência do letrozol, um potente inibidor da aromatase.

Os resultados obtidos mostram que a genisteína e a daidzeína alteram a atividade da aromatase em células do cancro da mama. Para todas as concentrações testadas destes compostos, houve aumento da atividade da aromatase, sendo maior na presença da genisteína, quando comparadas com o  $17\beta$ -estradiol.

O inibidor da aromatase, letrozol, foi eficaz na presença do  $17\beta$ -estradiol, uma vez que houve redução da atividade da enzima. No entanto, a eficácia diminuiu na presença da daidzeína e é inexistente na presença da genisteína.

## Capítulo 4

### Conclusões e Perspetivas Futuras

Com o presente trabalho, a utilização do *Kit* para o ensaio da aromatase foi um processo de desconstrução do mesmo, uma vez que fomos o primeiro grupo de investigação a utilizá-lo e não há trabalhos publicados tanto com o *Kit* em si, como com a finalidade a que nos propomos. Os ensaios e as metodologias apresentados são originais e servem de referência para a reprodução dos mesmos e para ensaios complementares futuros. Além disso, verificamos que o *Kit* pode ser utilizado não só para testar a atividade da aromatase com diversos tipos de compostos, mas também para testar a resistência aos fármacos.

O doseamento de proteínas, além de ter sido necessário para os cálculos da atividade da aromatase, revelou aspetos importantes. Para os compostos genisteína e daidzeína para todas as concentrações testadas, a concentração de proteínas foi inversamente proporcional à atividade da aromatase. Parece existir, assim, uma relação entre o menor número de células e a necessidade de aumentar a síntese de estrogénio.

O ensaio da atividade da aromatase evidenciou uma diminuição da ação inibitória do letrozol pelos compostos genisteína e daidzeína para todas as concentrações testadas. Desta forma, os nossos resultados destacam que se deve ter precaução no consumo de isoflavonas da soja por mulheres com cancro da mama ER+ em tratamento com inibidores da aromatase pois pode inferir-se a existência de uma possível resistência ao tratamento com inibidores da aromatase na presença dos fitoestrogénios em especial da genisteína.

A literatura referente à interação dos compostos da soja com inibidores da aromatase é ainda limitada e, tendo em conta a importância desses fármacos no tratamento oncológico, pensamos ser fundamental aprofundar estes estudos no sentido de promover a saúde da mulher.

## Referências Bibliográficas

- Amaral, Cristina et al. 2017. “The Role of Soybean Extracts and Isoflavones in Hormone-Dependent Breast Cancer: Aromatase Activity and Biological Effects.” *Food Funct* 8(9): 3064–74.
- Avendaño, Carmen, and José Carlos Menéndez. 2015. “Anticancer Drugs That Modulate Hormone Action.” In *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*, eds. Carmen Avendaño and José Carlos Menéndez. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science, 81–131.
- Basu, Paramita, and Camelia Maier. 2018. “Phytoestrogens and Breast Cancer: In Vitro Anticancer Activities of Isoflavones, Lignans, Coumestans, Stilbenes and Their Analogs and Derivatives.” *Biomed Pharmacother* 107: 1648–66.
- Bhatnagar, Ajay S. 2007. “The Discovery and Mechanism of Action of Letrozole.” *Breast Cancer Res Treat* 105: 7–17.
- Biglia, Nicoletta et al. 2019. “Non-Hormonal Strategies for Managing Menopausal Symptoms in Cancer Survivors: An Update.” *Ecancermedicalscience* 13: 909.
- BioVision Incorporated. 2019. “Aromatase (CYP19A) Activity Assay Kit (Fluorometric).” (Jun): 1–4.
- Björnström, Linda, and Maria Sjöberg. 2005. “Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions.” *Mol Endocrinol* 19(4): 833–42.
- Bulun, Serdar E et al. 2012. “Aromatase, Breast Cancer and Obesity: A Complex Interaction.” *Trends Endocrinol Metab* 23(2): 83–89.
- Casabon, Israël et al. 2014. “Actinobacterial Acyl Coenzyme A Synthetases Involved in Steroid Side-Chain Catabolism.” *J Bacteriol* 196(3): 579–87.
- Chan, Hei Jason, Karineh Petrossian, and Shiuan Chen. 2016. “Structural and Functional Characterization of Aromatase, Estrogen Receptor, and Their Genes in Endocrine-Responsive and – Resistant Breast Cancer Cells.” *J Steroid Biochem Mol Biol* 161: 73–83.
- Chen, Dong et al. 2009. “Regulation of Breast Cancer-Associated Aromatase Promoters.” *Cancer Lett* 273(1): 15–27.
- Chen, Wen-Fang et al. 2003. “Inhibitory Actions of Genistein in Human Breast Cancer (MCF-7) Cells.” *Biochim Biophys Acta* 1638(2): 187–96.
- Chen, Wendy Y. 2008. “Exogenous and Endogenous Hormones and Breast Cancer.” *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 22(4): 573–85.

- Choi, Eun Jeong, and Gun-hee Kim. 2013. "Antiproliferative Activity of Daidzein and Genistein May Be Related to ER $\alpha$  /c-ErbB-2 Expression in Human Breast Cancer Cells." *Mol Med Rep* 7: 781–84.
- Choi, Eun Jeong, and Gun-Hee Kim. 2008. "Daidzein Causes Cell Cycle Arrest at the G1 and G2/M Phases in Human Breast Cancer MCF-7 and MDA-MB-453 Cells." *Phytomedicine* 15(9): 683–90.
- Chumsri, Saranya et al. 2011. "Aromatase, Aromatase Inhibitors, and Breast Cancer." *J Steroid Biochem Mol Biol* 125(1–2): 13–22.
- Coleman, Kevin M, and Carolyn L Smith. 2001. "Intracellular Signaling Pathways: Nongenomic Actions of Estrogens and Ligand-Independent Activation of Estrogen Receptors." *Front Biosci*: 1379–91.
- Comşa, Şerban, Anca Maria Cîmpean, and Marius Raica. 2015. "The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 Years of Experience in Research." *Anticancer Res* 35(6): 3147–54.
- Cui, Jie, Yong Shen, and Rena Li. 2013. "Estrogen Synthesis and Signaling Pathways during Ageing: From Periphery to Brain." *Trends Mol Med* 19(3): 197–209.
- Dai, Xiaofeng, Hongye Cheng, Zhonghu Bai, and Jia Li. 2017. "Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping." *J Cancer* 8(16): 3131–41.
- van Duursen, M B M et al. 2011. "Genistein Induces Breast Cancer-Associated Aromatase and Stimulates Estrogen-Dependent Tumor Cell Growth in in Vitro Breast Cancer Model." *Toxicology* 289(2–3): 67–73.
- Epstein, Franklin H. 2001. "Estrogen and the Risk of Breast Cancer." *N Engl J Med* 344(4): 276–85.
- Eslami-S, Zahra et al. 2020. "Microbiome and Breast Cancer: New Role for an Ancient Population." *Front Oncol* 10: 120.
- Friesenhengst, Andrea et al. 2018. "Elevated Aromatase (CYP19A1) Expression Is Associated with a Poor Survival of Patients with Estrogen Receptor Positive Breast Cancer." *Horm Cancer* 9(2): 128–38.
- Fuentes, Nathalie, and Patricia Silveyra. 2019. "Estrogen Receptor Signaling Mechanisms." *Adv Protein Chem Struct Biol* 116: 135–70.
- Ganai, Ajaz Ahmad, and Humaira Farooqi. 2015. "Bioactivity of Genistein: A Review of in Vitro and in Vivo Studies." *Biomed Pharmacother* 76: 30–38.
- Gogos, Andrea et al. 2015. "A Role for Estrogen in Schizophrenia: Clinical and Preclinical Findings." *Int J Endocrinol* 2015: 615356.

- Goldring, J P Dean. 2015. "Spectrophotometric Methods to Determine Protein Concentration." In *Western Blotting. Methods in Molecular Biology, Vol 1312*, eds. Biji T. Kurien and R. Hal Scofield. New York, United States: Humana Press, 41–47.
- Gruber, Christian J, Walter Tschuggel, Christian Schneeberger, and Johannes C Huber. 2002. "Production and Actions of Estrogens." *N Engl J Med* 346(5): 340–52.
- Hamilton, Katherine J, Sylvia C Hewitt, Yukitomo Arao, and Kenneth S Korach. 2018. "Estrogen Hormone Biology." *Curr Top Dev Biol* 125: 109–46.
- Harbeck, Nadia et al. 2019. "Breast Cancer." *Nat Rev Dis Primers* 5(1): 66.
- Holliday, Deborah L, and Valerie Speirs. 2011. "Choosing the Right Cell Line for Breast Cancer Research." *Breast Cancer Res* 13(4): 215.
- Holschbach, M A, and R J Handa. 2017. "Androgen Action and Stress." In *Stress: Neuroendocrinology and Neurobiology: Handbook of Stress Series, Vol 2*, ed. George Fink. San Diego, United States: Academic Press, 227–35.
- Huang, Bo, Margaret Warner, and Jan-Ake Gustafsson. 2014. "Estrogen Receptors in Breast Carcinogenesis and Endocrine Therapy." *Mol Cell Endocrinol* 418(3): 240–44.
- van Iten, Brendan. 2017. "Edgar Allen and Edward A. Doisy's Extraction of Estrogen from Ovarian Follicles, (1923)." *The Embryo Project Encyclopedia* (March, 2017): 5–8.
- Ji, Jin-zi et al. 2014. "Discovery of Novel Aromatase Inhibitors Using a Homogeneous Time-Resolved Fluorescence Assay." *Acta Pharmacol Sin* 35(8): 1082–92.
- Ju, Young H et al. 2006. "Effects of Dietary Daidzein and Its Metabolite, Equol, at Physiological Concentrations on the Growth of Estrogen-Dependent Human Breast Cancer (MCF-7) Tumors Implanted in Ovariectomized Athymic Mice." *Carcinogenesis* 27(4): 856–63.
- Ju, Young H et al. 2008. "Dietary Genistein Negates the Inhibitory Effect of Letrozole on the Growth of Aromatase-Expressing Estrogen-Dependent Human Breast Cancer Cells (MCF-7Ca) in Vivo." *Carcinogenesis* 29(11): 2162–68.
- Khan, Deena, Catharine Cowan, and Ansar Ahmed. 2012. "Estrogen and Signaling in the Cells of Immune System." *Adv Neuroimmune Biol* 3: 73–93.
- Kim, Jihye et al. 2010. "Overnight Urinary Excretion of Isoflavones as an Indicator for Dietary Isoflavone Intake in Korean Girls of Pubertal Age." *Br J Nutr* 104(5): 709–15.
- Ko, Kwang-Pil. 2014. "Isoflavones: Chemistry, Analysis, Function and Effects on Health and Cancer." *Asian Pac J Cancer Prev* 15(17): 7001–10.
- Křížová, Ludmila, Kateřina Dadáková, Jitka Kašparovská, and Tomáš Kašparovský. 2019. "Isoflavones." *Molecules* 24(6): E1076.
- Larionov, Alexey. 2015. *Resistance to Aromatase Inhibitors in Breast Cancer*. 1st ed. ed. Benjamin Bonavida. Cham, Switzerland: Springer International Publishing.

- Lephart, Edwin D. 2015. "Modulation of Aromatase by Phytoestrogens." *Enzyme Res* 12: 1–11.
- Liang, Jing, and Yongfeng Shang. 2012. "Estrogen and Cancer." *Annu Rev Physiol* 75: 225–40.
- Liu, Yan Chen et al. 2016. "Genistein-Induced Differentiation of Breast Cancer Stem/Progenitor Cells through a Paracrine Mechanism." *Int J Oncol* 48(3): 1063–72.
- Marchand, Lucille R, and James A Stewart. 2018. "Breast Cancer." In *Integrative Medicine*, ed. David Rakel. Philadelphia, United States: Elsevier Inc, 771-784.e7.
- Miller, Walter L. 2017. "Steroidogenesis: Unanswered Questions." *Trends Endocrinol Metab* 28(11): 771–93.
- Miller, Walter L, and Richard J Auchus. 2011. "The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders." *Endocrine Reviews* 32(1): 81–151.
- Miller, William R. 2003. "Aromatase Inhibitors: Mechanism of Action and Role in the Treatment of Breast Cancer." *Semin Oncol* 30(4): 3–11.
- Molina, Luis et al. 2018. "Possible Role of Phytoestrogens in Breast Cancer via GPER-1/GPR30 Signaling." *Clin Sci (Lond)* 132(24): 2583–98.
- Moraes, Caroline S et al. 2013. *Fundação Oswaldo Cruz Série Em Biologia Molecular: Métodos Experimentais No Estudo de Proteínas*. eds. Helene Santos Barbosa, Milton Ozorio Moraes, and Rubem Figueiredo Sadok Menna Barreto. Rio de Janeiro, Brasil: Instituto Oswaldo Cruz.
- Morselli, Eugenia et al. 2017. "The Effects of Oestrogens and Their Receptors on Cardiometabolic Health." *Nat Rev Endocrinol* 13(6): 352–64.
- Mukhopadhyay, Keya De et al. 2015. "Aromatase Expression Increases the Survival and Malignancy of Estrogen Receptor Positive Breast Cancer Cells." *PLoS ONE* 10(4): e0121136.
- Mukund, Vidya et al. 2017. "Genistein: Its Role in Metabolic Diseases and Cancer." *Crit Rev Oncol Hematol* 119: 13–22.
- Nardo, Giovanna Di, and Gianfranco Gilardi. 2013. "Human Aromatase: Perspectives in Biochemistry and Biotechnology." *Biotechnol Appl Biochem* 60(1): 92–101.
- National Comprehensive Cancer Network (US). 2019. "NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Breast Cancer." 3.2019(Sep 6): 216.
- Olson, Bradley J S C. 2016. "Assays for Determination of Protein Concentration." *Curr Protoc Pharmacol*: A.3A.1-A.3A.32.
- Patel, Seema, Ahmad Homaei, Akondi Butchi Raju, and Biswa Ranjan Meher. 2018. "Estrogen: The Necessary Evil for Human Health , and Ways to Tame It." *Biomed Pharmacother* 102: 403–11.

- Philippeos, Christina, Robin D Hughes, Anil Dhawan, and Ragai R Mitry. 2012. "Introduction to Cell Culture." In *Human Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, eds. Ragai R. Mitry and Robin D. Hughes. London, United Kingdom: Humana Press, 1–13.
- Piperigkou, Zoi, and Nikos K Karamanos. 2019. "Estrogen Receptor-Mediated Targeting of the Extracellular Matrix Network in Cancer." *Semin Cancer Biol* 62: 116–24.
- Poluzzi, Elisabetta et al. 2014. "Phytoestrogens in Postmenopause: The State of the Art from a Chemical, Pharmacological and Regulatory Perspective." *Curr Med Chem* 21(4): 417–36.
- Poschner, Stefan et al. 2017. "The Impacts of Genistein and Daidzein on Estrogen Conjugations in Human Breast Cancer Cells : A Targeted Metabolomics Approach." *Front Pharmacol* 8: 699.
- Rahideh, Seyede Tayebbeh et al. 2017. "Comparison of the Effects of Nobiletin and Letrozole on the Activity and Expression of Aromatase in MCF-7 Breast Cancer Cell Line." *Biochem Cell Biol* 95(4): 468–73.
- Ramalhinho, Ana Cristina Monteiro. 2014. "Influence of Low Penetrance Genes in Susceptibility for Breast Cancer in the Portuguese Population of Beira Interior." Universidade da Beira Interior.
- Ravi, Maddaly, M Kaviya Sneka, and Aastha Joshipura. 2019. "The Culture Conditions and Outputs from Breast Cancer Cell Line in Vitro." *Exp Cell Res* 383(2): 111548.
- Rawat, Sarita et al. 2019. "Recent Updates on Daidzein Against Oxidative Stress and Cancer." *EXCLI J* 18: 950–54.
- Rietjens, Ivonne M C M, Jochem Louisse, and Karsten Beekmann. 2017. "The Potential Health Effects of Dietary Phytoestrogens." *Br J Pharmacol* 174(11): 1263–80.
- Rodriguez, Gabriela Vazquez, Annelie Abrahamsson, Lasse Dahl Ejby Jensen, and Charlotta Dabrosin. 2017. "Estradiol Promotes Breast Cancer Cell Migration via Recruitment and Activation of Neutrophils." *Cancer Immunol Res* 5(3): 234–47.
- Russo, Maria et al. 2016. "Understanding Genistein in Cancer: The "good" and the "bad" Effects: A Review." *Food Chem* 196: 589–600.
- Saczko, Jolanta et al. 2017. "Estrogen Receptors in Cell Membranes: Regulation and Signaling." In *Transport Across Natural and Modified Biological Membranes and Its Implications in Physiology and Therapy. Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology, Vol 227*, eds. Julita Kulbacka and S Satkauskas. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 93–105.
- Saha, Tanmay et al. 2019. "Estrogen Signaling: An Emanating Therapeutic Target for Breast Cancer Treatment." *Eur J Med Chem* 177: 116–43.

- Samavat, Hamed, and Mindy S Kurzer. 2016. "Estrogen Metabolism and Breast Cancer." *Cancer Lett* 356(2 Pt A): 231–43.
- Santoro, Nanette, C Neil Epperson, and Sarah B Mathews. 2015. "Menopausal Symptoms and Their Management." *Endocrinol Metab Clin North Am* 44(3): 497–515.
- Schulster, Michael, Aaron M Bernie, and Ranjith Ramasamy. 2016. "The Role of Estradiol in Male Reproductive Function." *Asian J Androl* 18(3): 435–40.
- Senthilkumar, Harini Anandhi, Jimmie E Fata, and Edward J Kennelly. 2018. "Phytoestrogens: The Current State of Research Emphasizing Breast Pathophysiology." *Phytother Res* 32: 1707–19.
- Setchell, Kenneth D R. 2017. "The History and Basic Science Development of Soy Isoflavones." *Menopause* 24(12): 1338–50.
- Sohl, Christal D, and F Peter Guengerich. 2010. "Kinetic Analysis of the Three-Step Steroid Aromatase Reaction of Human Cytochrome P450 19A1." *J Biol Chem* 285(23): 17734–43.
- Soule, H D et al. 1973. "A Human Cell Line From a Pleural Effusion Derived From a Breast Carcinoma." *J Natl Cancer Inst* 51(5): 1409–16.
- Sun, Yi-sheng et al. 2017. "Risk Factors and Preventions of Breast Cancer." *Int J Biol Sci* 13(11): 1387–1397.
- Thangavel, Prakash, Abraham Puga-Olguín, Juan F Rodríguez-Landa, and Rossana C Zepeda. 2019. "Genistein as Potential Therapeutic Candidate for Menopausal Symptoms and Other Related Diseases." *Molecules* 24(21): E3892.
- The North American Menopause Society. 2017. "The 2017 Hormone Therapy Position Statement of The North American Menopause Society." *Menopause* 24(7): 728–53.
- Theil, Conrad, Volker Briese, Bernd Gerber, and Dagmar-Ulrike Richter. 2011. "The Effects of Different Lignans and Isoflavones, Tested as Aglycones and Glycosides, on Hormone Receptor-Positive and -Negative Breast Carcinoma Cells in Vitro." *Arch Gynecol Obstet* 284(2): 459–65.
- Tian, J-M et al. 2018. "Estrogen and Progesterone Promote Breast Cancer Cell Proliferation by Inducing Cyclin G1 Expression." *Braz J Med Biol Res* 51(3): 1–7.
- To, Sarah Q et al. 2014. "Transcriptional Control of Local Estrogen Formation by Aromatase in the Breast." *J Steroid Biochem Mol Biol* 145: 179–86.
- Varinska, Lenka et al. 2015. "Soy and Breast Cancer: Focus on Angiogenesis." *Int J Mol Sci* 16(5): 11728–49.
- Vrtačnik, Peter, Barbara Ostanek, Simona Mencej-Bedrač, and Janja Marc. 2014. "The Many Faces of Estrogen Signaling." *Biochem Med (Zagreb)* 24(3): 329–42.

- World Health Organization. 2018. International Agency for Research on Cancer (IARC) *Global Cancer Statistics: Cancer Tomorrow*. Lyon, France. <https://gco.iarc.fr/tomorrow> (November 17, 2019).
- Xu, Shen, Shan Yu, Daming Dong, and Leo Tsz On Lee. 2019. “G Protein-Coupled Estrogen Receptor: A Potential Therapeutic Target in Cancer.” *Front Endocrinol (Lausanne)* 10: 725.
- Yasuda, Michiko T, Hiroyuki Sakakibara, and Kayoko Shimoi. 2017. “Estrogen- and Stress-Induced DNA Damage in Breast Cancer and Chemoprevention with Dietary Flavonoid.” *Genes Environ* 39: 10.
- Zaw, Jay Jay Thaug, Peter Ranald Charles Howe, and Rachel Heloise Xiwen Wong. 2018. “Postmenopausal Health Interventions: Time to Move on from the Women’s Health Initiative?” *Ageing Res Rev* 48: 79–86.
- Zhao, Hong, Ling Zhou, Anna Junjie Shangguan, and Serdar E Bulun. 2016. “Aromatase Expression and Regulation in Breast and Endometrial Cancer.” *J Mol Endocrinol* 57(1): R19–R33.