



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

O Efeito da Soja e do Tamoxifeno nas células MCF-7

Carolina de Moura Ferreira Barros Simões

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Bioquímica

(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof.^a Doutora Luiza Granadeiro

Covilhã, outubro de 2014

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço à Professora Doutora Luiza Granadeiro por toda a ajuda e apoio que me deu durante a execução e escrita desta dissertação de mestrado.

Aos colegas de laboratório, Nuno e Maria, por toda a ajuda e companhia.

À minha família, principalmente pais e avós, por todo o apoio incondicional, carinho, muita paciência e motivação. Sem eles nada disto era possível.

Ao Vasco, por estar sempre presente, sobretudo nos momentos menos bons, por todo o carinho, dedicação e disponibilidade para todos os desabafos.

Por fim, mas não menos importantes, a todos os amigos que estiveram presentes ao longo desta fase da minha vida, por tornarem tudo um bocadinho mais fácil, sempre com boa disposição e sempre presentes quando preciso.

Resumo

O cancro da mama continua a ser a doença com maior taxa de morte nas mulheres um pouco por todo o Mundo. O tratamento para o cancro da mama dependente de estrogénio passa pela administração de compostos que interfiram nos mecanismos de ação desta hormona. Assim o tamoxifeno, sendo um modulador seletivo do recetor de estrogénio, é o fármaco mais utilizado, mas compostos naturais como a soja têm vindo a ganhar destaque como adjuvante. Os fitoestrogénios ligam-se aos recetores de estrogénio e assim exercem efeitos benéficos, tanto anticancerígenos no caso do cancro da mama, como em doenças como a osteoporose e doenças cardiovasculares bem como na diminuição dos sintomas associados à menopausa.

Os estudos efetuados tiveram como objetivo determinar a citotoxicidade da soja na presença de 17 β -estradiol e tamoxifeno em células de carcinoma humanas MCF-7. Para tal efetuamos os estudos em células MCF-7 em que analisámos diferentes concentrações dos compostos referidos. Os efeitos foram analisados passadas 48 horas de incubação e após recuperação pelo ensaio MTT.

Foi observada uma variação entre os valores após 48 horas e a recuperação no caso dos compostos utilizados como tratamento, o tamoxifeno e o extrato de soja, e por isso a sua administração deve ser alvo de especial atenção. A toma do tamoxifeno também deve ser acautelada porque os efeitos desde fármaco na viabilidade celular dependem dos valores de estradiol presentes, logo cada caso deve ser avaliado individualmente.

Palavras-chave

Cancro da mama, MCF-7, extrato de soja, 17 β -estradiol, tamoxifeno

Abstract

Breast cancer remains the most deadly disease in women all over the world. The treatment for estrogen-dependent breast cancer involves the administration of compounds that interfere in mechanisms of action of this hormone. Thus tamoxifen, being a SERM, is the most widely used drug, but natural compounds like soy have gained prominence as adjuvants. Phytoestrogens bind to estrogen receptors and therefore exert beneficial effects, both in the case of breast cancer, as in diseases like osteoporosis and cardiovascular disease as well as the reduction of symptoms associated with menopause.

The studies were carried out to determine the cytotoxicity of soy in the presence of 17 β -estradiol and tamoxifen in human carcinoma cells MCF-7. To this end we have made studies on MCF-7 cells in which different concentrations of the mentioned compounds were used. The effects were evaluated after 48 hours of incubation and after recovery by MTT assays.

Variation between the values after 48 hours and the recovery in the case of compounds used as treatment, tamoxifen and soy extract were observed, and therefore its administration should be given special attention. Taking tamoxifen must be safeguarded also because the drug effects on cell proliferation depend on the values of estradiol present, and so each case must be evaluated individually.

Keywords

Breast cancer, MCF-7, soy extract, 17 β -estradiol, tamoxifen

Índice

Introdução	1
1. A utilização dos produtos naturais	1
2. Soja	3
2.1. Caracterização da soja	3
2.2. Constituintes da soja	3
2.2.1. Macronutrientes	4
2.2.2. Micronutrientes	4
3. Fitoestrogénios	5
3.1. O que são	5
3.2. Isoflavonas da soja	7
3.2.1. Genisteína - Mecanismo de ação	8
3.2.2. Daidzeína - Mecanismo de ação	9
3.3. Aplicações	10
4. Estrogénio	12
4.1. Síntese	13
4.2. Transporte e Metabolismo	16
4.3. Recetores e Mecanismos de ação	17
5. Terapia hormonal e Tamoxifeno	21
6. Cultura de células no cancro da mama	24
Objetivos	27
Material e Métodos	29
1. Material	29
1.1. Reagentes	29
1.2. Linha celular	29
1.3. Compostos testados	29
1.4. Equipamentos	29
2. Preparação de meio de cultura DMEM	30
3. Cultura celular	30

O Efeito da Soja e do Tamoxifeno nas células MCF-7

4. Tripsinização	30
5. Contagem de células	31
6. Preparação dos compostos a testar	31
6.1. Preparação das soluções de 17 β -estradiol	31
6.2. Preparação das soluções de tamoxifeno.....	31
6.3. Preparação das soluções de extrato de soja.....	32
7. Justificação das concentrações testadas	32
8. Adição dos compostos para estudar os seus efeitos na viabilidade celular	33
9. Ensaio de viabilidade celular pelo método do Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT).....	36
10. Análise estatística	37
Otimização do protocolo experimental após resultados iniciais	39
1. Aplicação do protocolo básico nas células MCF-7.....	39
2. Protocolo experimental - Condições definidas	41
Resultados e Discussão	43
1. Estudo da influência do 17 β -estradiol no efeito do tamoxifeno em células MCF-7	43
2. Estudo da influência do extrato de soja no efeito do tamoxifeno em células MCF-7 ..	46
3. Estudo da viabilidade das células MCF-7 na presença simultânea de extrato soja, 17 β -estradiol e tamoxifeno.....	49
Conclusões.....	51
Bibliografia	53

Lista de Figuras

Figura 1 - Diferentes famílias de fitoestrogénios e comparação com o estradiol.

Figura 2 - Metabolismo das isoflavonas com transformação dos glicosídeos inativos em agliconas ativa.

Figura 3 - Estrutura dos diferentes estrogénios.

Figura 4 - Variação das concentrações hormonais durante o ciclo menstrual.

Figura 5 - Síntese de estrogénios.

Figura 6 - Estrutura dos recetores de estrogénio alfa e beta.

Figura 7 - Vias de efeito genómico e não genómico do recetor de estrogénio.

Figura 8 - Mecanismo do efeito não genómico do ER- α na membrana plasmática.

Figura 9 - Esquema da disposição das soluções de diferentes concentrações de 17 β -estradiol adicionadas nos diferentes poços.

Figura 10 - Esquema da disposição das soluções de diferentes concentrações de tamoxifeno adicionadas nos diferentes poços.

Figura 11 - Esquema da disposição das soluções de diferentes concentrações de extrato de soja adicionadas nos diferentes poços.

Figura 12 - Esquema da disposição das soluções de diferentes concentrações de 17 β -estradiol + tamoxifeno (Tam) adicionadas nos diferentes poços.

Figura 13 - Esquema da disposição das soluções de diferentes concentrações de soja + tamoxifeno (Tam) adicionadas nos diferentes poços.

Figura 14 - Esquema da disposição das soluções de diferentes concentrações de 17 β -estradiol (E2) + soja + tamoxifeno (Tam) adicionadas nos diferentes poços.

Figura 15 - Efeito do 17 β -estradiol nas células MCF-7, sob a forma de viabilidade celular comparativamente com os controlos, após 48h de incubação e após recuperação (Rec).

Figura 17 - Efeito do 17 β -estradiol nas células MCF-7, sob a forma de viabilidade celular comparativamente com o controlo, após 48h de incubação e após recuperação (Rec).

Lista de Abreviaturas

3 β -HSD	3 β -hidrosteróide desidrogenase
AF-1	Função de ativação 1
AF-2	Função de ativação 2
Akt	Proteína cinase B
AP-1	Proteína ativadora 1
Asp 351	Asparagina 351
ATP	Adenosina Trifosfato
cAMP	Adenosina 3'-5'-monofosfato cíclico
cav-1	Caveolina-1
CDK-4	Cinase ciclina-dependente 4
COMT	Catecol-O-metiltransferase
c-Src	Proto-oncogene de proteína tirosina cinase Src
DBD	Domínio de ligação ao DNA
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DMEM	<i>Dulbecco's Modified eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E1	Estrona
E2	17 β -estradiol
E3	Estriol
EGF	Fator de crescimento epidérmico ligado à pró-heparina
EGF-R	Recetor do fator de crescimento epidérmico
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ER	Recetor de estrogénio (<i>estrogen receptor</i>)
ERE	Elemento de resposta ao estrogénio
ER- α	Recetor de estrogénio α
ER- β	Recetor de estrogénio β
FBS	Soro fetal bovino
FSH	Hormona folículo-estimulante
GnRH	Hormona libertadora de Gonadotropina
GPER	Recetor de estrogénio acoplado à proteína G
GPR30	Recetor acoplado à proteína G 30
GST	Glutationa-S-transferase
GTPase	Hidrolase de guanosina trifosfato
HDL	Lipoproteína de alta densidade (<i>high density lipoprotein</i>)
HER-2	Fator de crescimento epidérmico humano 2

O Efeito da Soja e do Tamoxifeno nas células MCF-7

HSP	Proteína de choque térmico
ISOM	Isomerase
LBD	Domínio de ligação ao ligando
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (<i>low density lipoprotein</i>)
LH	Hormona luteínica
MAP	Proteína ativada por mitogénio (<i>mitogen-activated protein</i>)
MAPK	Proteína cinase ativada por mitogénio
MCF-7	Linha celular de adenocarcinoma mamário (<i>Michigan Cancer Foundation-7</i>)
mER	Recetor de estrogénio associado à membrana
MMP	Matriz de metaloproteinases
MNAR	Modulador da atividade não genómica do ER
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reduzido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido
NFkB	Fator nuclear kB
NO	Óxido nítrico
O-DMA	O-desmetilangolensina
PBS	Tampão fosfato salino
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase
PTK	Proteína Tirosina Cinase
PUFAs	Ácidos gordos polinsaturados
Rec	Recuperação
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigénio
rpm	Rotações por minuto
SERD	<i>Selective estrogen receptor down-regulator</i>
SERM	Modulador seletivo do recetor de estrogénio (<i>Selective Estrogen Receptor Modulator</i>)
SHBG	Globulina de ligação às hormonas sexuais
SP-1	Proteína estimulante 1
Tam	Tamoxifeno
TF	Fator de transcrição
TGF- α	Fator α de transformação do crescimento (<i>Transforming growth factor α</i>)
TGF- β	Fator β de transformação do crescimento (<i>Transforming growth factor β</i>)
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

Introdução

1. A utilização dos produtos naturais

Tal como já tem sido referenciado há algum tempo, a utilização de produtos naturais é uma realidade desde o início da Humanidade, principalmente no Oriente, e aumenta cada vez mais em todo o Mundo, principalmente nos países ocidentais (van Duursen et al., 2011, Pugi et al., 2011, Menniti-Ippolito et al., 2008, Jacobsen et al., 2014). Estas podem incluir a utilização de preparações farmacêuticas como medicamentos à base de plantas ou fitoterapêuticos, homeopáticos, óleos essenciais e suplementos alimentares, utilizados na manutenção da saúde, para tratamento ou prevenção de doenças, desde as menos graves, passando pelas mais graves e até crónicas, geralmente disponíveis sob a forma de comprimidos ou cápsulas não sujeitos a receita médica (Barnes, 2003a, Barnes, 2003b).

Os medicamentos à base de plantas são misturas complexas, ricas quimicamente, onde se incluem muitos componentes farmacologicamente ativos. Estes constituintes são muitas vezes desconhecidos e, mesmo naqueles em que as características fitoquímicas são bem compreendidas, não se consegue estabelecer a sua relação com a atividade farmacológica, e nem sempre se sabe qual ou quais são os componentes mais importantes a nível do efeito terapêutico. Estes podem ser extraídos a partir de toda a planta ou apenas de partes (raiz, folhas, sementes ou fruto) o que leva a que o perfil de constituintes não seja uniforme para cada planta. Este também pode variar consoante as condições ambientais e de colheita e armazenamento da planta (Barnes, 2003a, Ernst, 2005).

O seu consumo é muitas vezes potenciado pela falsa ideia de serem produtos totalmente seguros, não tóxicos, só por se tratarem de produtos de origem natural. No entanto, tal não ocorre pois existem problemas inerentes à sua utilização como a toxicidade intrínseca, a possível adulteração, substituição e contaminação, os erros de identificação da planta, as possíveis interações planta-outros medicamentos e planta-planta e a falta de padronização e estudos acerca da sua eficácia e segurança (Pugi et al., 2011, Zhou et al., 2004, Ernst, 2005, Menniti-Ippolito et al., 2008).

Estas avaliações de eficácia e segurança ao nível da farmacovigilância, uma vez que a composição dos produtos varia entre fabricantes, devem ser específicas para cada extrato e para cada planta. No máximo, só se deve extrapolar os ensaios para preparações da mesma planta com uma constituição muito semelhante. No entanto, detalhes importantes como o tipo de extrato e/ou a formulação são ignorados nalgumas revisões sistemáticas e análises de ensaios clínicos sobre medicamentos fitoterapêuticos (Barnes, 2003b), podendo levar a disparidades nos resultados de diferentes estudos.

O Efeito da Soja e do Tamoxifeno nas células MCF-7

Para além dos factos acima referidos devemos ainda ter em consideração a variabilidade inter-individual da resposta a estes produtos (Barnes, 2003a, Barnes, 2003b).

Mesmo tendo em conta estes possíveis problemas, os produtos naturais à base de soja têm sido cada vez mais estudados e utilizados, verificando-se uma melhoria nos sintomas causados pela menopausa e uma diminuição da incidência de doenças, como por exemplo o cancro da mama em países asiáticos, facto atribuído ao alto consumo deste produto (Ernst, 2005, Patisaul e Jefferson, 2010, van Duursen et al., 2011, He e Chen, 2013).

2. Soja

2.1. Caracterização da soja

Considerando a sua classificação científica, a soja pertence à ordem *Rosaceae* e pode fazer parte das famílias *Leguminosae*, *Papillonaceae* ou *Fabaceae*. Pertence ainda à subfamília *Papilionoidae*, ao género *Glycine* e à espécie *Glycine max* (Mateos-Aparicio et al., 2008).

Pensa-se que esta planta teve origem na China há mais de 4000 - 5000 anos (Mateos-Aparicio et al., 2008, He e Chen, 2013, Mourouti e Panagiotakos, 2013, Nishinari et al., 2014). Muito mais tarde, em 1712, Engelbert Kaempfer introduziu a soja na Europa e só mais tarde, Carl von Linné lhe deu o nome de *Glycine max*. No entanto, devido às condições ambientais como o solo e o clima, a soja não é muito produzida neste continente (Mateos-Aparicio et al., 2008).

A soja pode ser facilmente encontrada no mercado sob a forma de produtos lácteos, tofu, substitutos da carne e também como forma de enriquecer cereais, leite, alimentos energéticos e formulações para crianças (Patisaul e Jefferson, 2010, Cederroth et al., 2012).

O consumo desta planta tem aumentado em todo o Mundo mas o consumo entre países orientais e ocidentais varia quer na quantidade quer ao nível do processamento. No continente asiático, a soja é consumida em maior quantidade em alimentos muito pouco processados ou não processados, enquanto que nos países ocidentais é consumida em menor quantidade e sob formas altamente processadas (Cederroth et al., 2012, Swann et al., 2013, Guerrero-Bosagna e Skinner, 2014). A diferença no processamento condiciona as diferenças nos benefícios para a saúde, devido à possível perda de alguns componentes bioativos com o processamento (Kim et al., 2008).

A parte desta planta habitualmente consumida é a semente (grão). O perfil nutricional da semente é determinado por alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas durante o desenvolvimento do grão (Yin et al., 2014).

2.2. Constituintes da soja

A soja é constituída por água, macronutrientes como lípidos, hidratos de carbono e proteínas e por micronutrientes como isoflavonas, fitatos, saponinas, fitosteróis, vitaminas e minerais (Cederroth e Nef, 2009, Mateos-Aparicio et al., 2008). Esta é um aditivo muito utilizado pois não tem colesterol nem lactose (Patisaul e Jefferson, 2010).

2.2.1. Macronutrientes

A soja é uma planta muito rica em proteínas com um teor de cerca de 40%, ao contrário de outros grãos que só contêm em média 25%. As proteínas presentes na soja têm um teor baixo em aminoácidos com enxofre como a metionina, a cistina e a treonina, mas um alto teor em lisina, que é rara nos cereais. Assim o perfil de aminoácidos da soja é complementar ao dos cereais (Mateos-Aparicio et al., 2008).

Nesta planta existem vários tipos de proteínas, as envolvidas no metabolismo, as estruturais ou glicoproteínas (ribossomais, cromossômicas e proteínas de membrana) e as de armazenamento, que não têm atividade biológica. A grande maioria das proteínas presentes na soja são globulinas pouco solúveis em água. No que diz respeito a enzimas, esta planta é rica em monofosfatase, fosfodiesterase, calmodulina, α -galactosidase, lactato desidrogenase, lipoxigenase e β -amilase (Cederroth et al., 2012).

A soja contém também muitos lípidos, entre os quais saturados, monoinsaturados e PUFA (ácidos gordos polinsaturados), onde destes últimos se destacam o ácido linoleico e o ácido α -linolénico (Jian, 2009, Cederroth e Nef, 2009, He e Chen, 2013).

A semente desta planta compreende cerca de 30% de hidratos de carbono que se dividem em partes iguais, solúveis como a sacarose, rafinose e estaquiose, e insolúveis como as fibras, hemicelulose e celulose (Cederroth e Nef, 2009).

2.2.2. Micronutrientes

Na sua constituição, a soja, conta ainda com a maioria dos minerais essenciais ao Homem, como o ferro, cobre, manganês, cálcio, magnésio e potássio entre outros, assim como as vitaminas tiamina (vitamina B1) e riboflavina (vitamina B2), saponinas, ácidos fenólicos e fitoestrogénios como as isoflavonas daidzeína e genisteína (Cederroth e Nef, 2009, Garcia et al., 1997).

3. Fitoestrogénios

3.1. O que são

Os fitoestrogénios são um grupo de compostos biologicamente ativos que ocorrem naturalmente em várias plantas, com estrutura química semelhante à dos estrogénios ou à dos seus metabolitos (Swann et al., 2013, Guerrero-Bosagna e Skinner, 2014). Estes compostos encontram-se em todas as plantas mas nas leguminosas, como a soja, em maior concentração exercendo funções idênticas às destas hormonas (Patisaul e Jefferson, 2010, Baber, 2010, Bedell et al., 2014, Chang, 2014).

Estes fitoestrogénios são polifenóis e podem ser classificados em várias famílias consoante a sua estrutura química em flavonóides (canferol e quercetina), onde se inserem as isoflavonas (genisteína, daidzeína e equol), linhanos (enterodiol), coumestanos (cousmestrol), micotoxinas (zeranol) e estilbenos (resveratrol), como representado na figura 1 (Zhao e Mu, 2011, Guerrero-Bosagna e Skinner, 2014, Baber, 2010). Numa só planta é possível estarem presentes mais do que uma destas famílias (Zhao e Mu, 2011).

Como já foi referido anteriormente, os fitoestrogénios trazem benefícios preventivos e terapêuticos em várias doenças, como o cancro e a osteoporose, e na sintomatologia inerente à menopausa, atuando ao nível do crescimento e proliferação celular e da síntese proteica (Patisaul e Jefferson, 2010). Esta ação deve-se à ligação destes compostos a recetores de estrogénio (ER, do inglês *estrogen receptor*) devido à semelhança estrutural com o 17 β -estradiol (E2), como demonstrado na figura 1 (Zhao e Mu, 2011, Cederroth et al., 2012, Swann et al., 2013, Bedell et al., 2014).

O Efeito da Soja e do Tamoxifeno nas células MCF-7

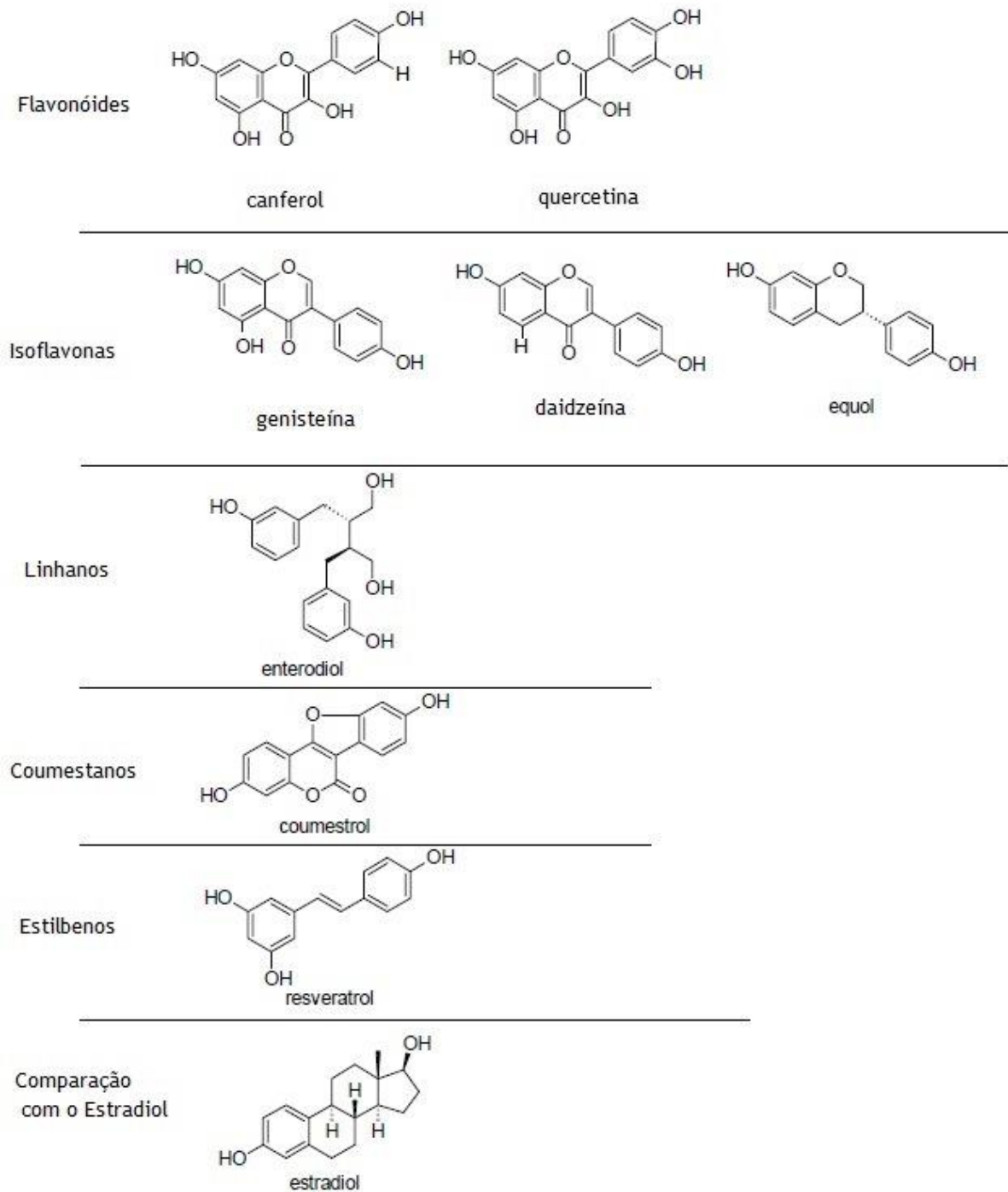


Figura 1 - Diferentes famílias de fitoestrogénios e comparação com o estradiol (Adaptado de Zhao et al., 2011).

Os efeitos do E2 são mediados através de três recetores intracelulares, ER- α , ER- β e GPR30. No caso dos fitoestrogénios a afinidade para estes recetores não é tão grande como a do estradiol. No entanto, estes compostos têm uma baixa afinidade para os ER- α , levando a atividades estrogénicas baixas, mas como se ligam preferencialmente ao ER- β , têm um efeito anti-estrogénico significativo e também protetor contra a proliferação celular mediada por Er- α (Zhao e Mu, 2011, Imhof et al., 2008).

3.2. Isoflavonas da soja

As isoflavonas são dos fitoestrogénios mais comuns e a classe mais estudada (Baber, 2010). Na soja, a quantidade e a composição de isoflavonas depende da variedade da planta, das condições a que é submetida, tais como a variação de temperatura e luz, e da maneira como a planta é processada. Na soja, as isoflavonas estão associadas a proteínas e a sua dissociação é feita por extração alcoólica (Cederroth et al., 2012). Relativamente à estrutura química, as isoflavonas consistem em dois anéis benzeno ligados por um anel pirano heterocíclico (Pavese et al., 2010). Também é constituído por um fenol, tal como o estradiol, que é o fator que possibilita a ligação ao recetor de estrogénio (Cederroth e Nef, 2009, Bedell et al., 2014, Guerrero-Bosagna e Skinner, 2014).

Desta classe de fitoestrogénios destacam-se a genisteína (4,5,7'-trihidroxiisoflavona) e a daidzeína (7,4'-dihidroxiisoflavona), que estão presentes na soja como β -D-glicosídeos biologicamente inativos, genistina e daidzina. Estes glicosídeos inativos transformam-se nas agliconas ativas, genisteína e daidzeína, após a ingestão e consequente hidrolisação por β -glucosidases presentes na parede do intestino, conforme ilustrado na figura 2. As formas biologicamente ativas são as únicas que são absorvidas pelo trato intestinal (Cederroth e Nef, 2009, Patisaul e Jefferson, 2010). As isoflavonas conjugadas passam depois para a circulação entero-hepática, e voltam ao intestino para ser desconjugadas pela microflora presente. Como resultado deste metabolismo, a genisteína é transformada em dihidrogenisteína e 6'-hidroxi-O-desmetilangolensina, e por fim degradada a ácido 4-hidroxifenil-2-propionico, e a daidzeína é reduzida a dihidrodaidzeína, que é depois metabolizada em equol ou O-desmetilangolensina (O-DMA) (Cederroth e Nef, 2009, Patisaul e Jefferson, 2010, Bedell et al., 2014). A excreção das formas não conjugadas é feita por via urinária, e a das formas conjugadas é feita pelas fezes (Klein e King, 2007).

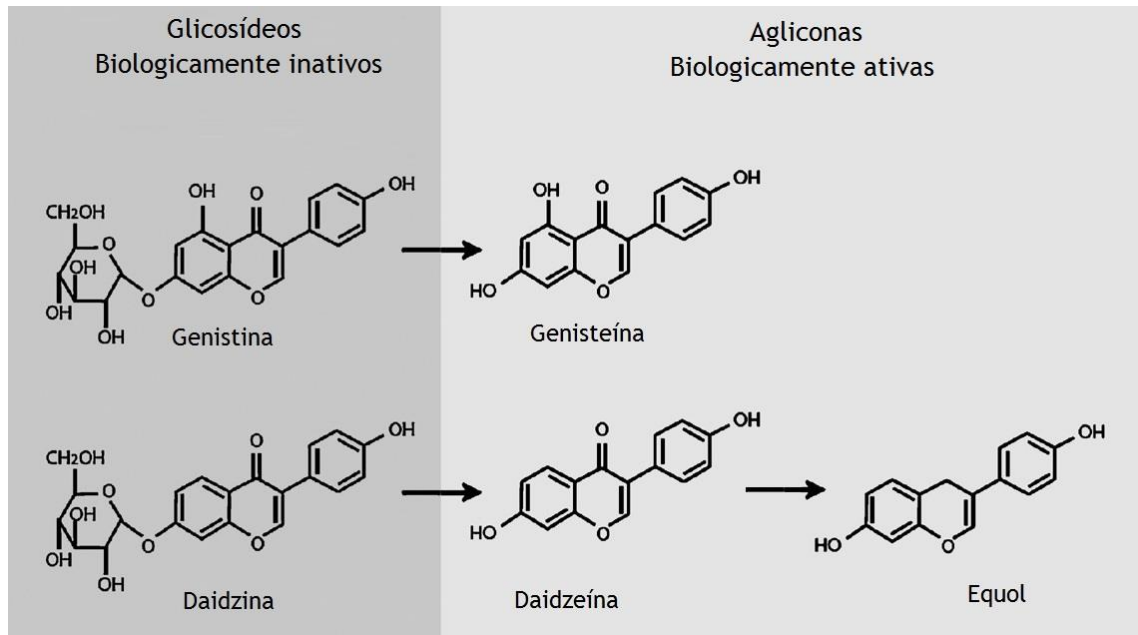


Figura 2 - Metabolismo das isoflavonas com transformação dos glicosídeos inativos em agliconas ativas (Adaptado de Cederroth, 2009)

De modo geral o mecanismo de ação destes compostos passa pela ligação ao recetor de estrogénio, mas também por respostas celulares mais rápidas através das vias da proteína cinase ativada por AMP, proteína cinase ativada por mitogénio e fosfatidilinositol-3-cinase, por uma resposta antioxidante, pela inibição da tirosina cinase e pela ligação ao recetor GPR30 (Guerrero-Bosagna e Skinner, 2014).

3.2.1. Genisteína - Mecanismo de ação

A genisteína é a isoflavona que predomina nos produtos com soja (Banerjee et al., 2008, Pavese et al., 2010, Jia et al., 2013).

Esta isoflavona tem propriedades muito próximas às do 17 β -estradiol como o peso molecular e o padrão de hidroxilação (Pavese et al., 2010). Como já foi referido, existe também uma grande similaridade a nível estrutural com o 17 β -estradiol, e é precisamente devido a ela que a genisteína compete com este produto na ligação a recetores de estrogénio (Banerjee et al., 2008, Mourouti e Panagiotakos, 2013). Contudo, a afinidade desta isoflavona difere com o tipo de recetores de estrogénio, sendo de 4% para o ER- α e de 87% para o ER- β quando comparada com o E2 (Banerjee et al., 2008). Como resultado desta ligação, pode bloquear e afetar o metabolismo dos estrogénios, prevenindo cancros dependentes de hormonas (Banerjee et al., 2008, Fitzpatrick, 2003).

A genisteína pode ainda afetar os níveis de várias hormonas como a insulina, leptina, hormonas da tiroide, hormonas adenocorticotrópicas, cortisol e corticosterona. Previne uma série de doenças para além do cancro, como doenças cardiovasculares, osteoporose, atenua sintomas

pós menopausa e reduz a massa gorda e o apetite. Esta isoflavona altera a expressão de genes implicados no metabolismo lipídico e no transporte de glucose, afetando processos como a lipólise, lipogénese e síntese de ATP (Banerjee et al., 2008).

A genisteína é um inibidor da proteína tirosina cinase (PTK) o que faz com que o crescimento das células cancerígenas seja atenuado, bloqueando os mecanismos de sinalização mediados por esta proteína como a fosforilação dos resíduos de tirosina das células tumorais e de proteínas que incluem fatores de crescimento implicados na proliferação tumoral (Banerjee et al., 2008, Jia et al., 2013, Jian, 2009). A proliferação é também diminuída pela inibição do fator nuclear kB (NFkB) (Pavese et al., 2010). Esta inibe também a topoisomerase II, a angiogénese, a metastização e induz a apoptose, aumentando a expressão de p53 (Jian, 2009, Chen et al., 2003, Hewitt e Singletary, 2003).

A genisteína altera o metabolismo do estrogénio inibindo enzimas como a aromatase e a 5 α -redutase (Chen et al., 2003, Fitzpatrick, 2003).

As propriedades das isoflavonas nas células humanas de cancro da mama, *in vivo* e *in vitro*, são influenciadas pelos níveis de estrogénio circundantes, presença ou ausência de estrogénio e pela dose. Sendo assim, sem que haja estrogénio, concentrações fisiológicas de genisteína (1 nM a 10 μ M) estimulam o crescimento de células humanas de cancro da mama com recetor de estrogénio (MCF-7) *in vitro*, enquanto que concentrações mais elevadas inibem este crescimento e a sobrevivência deste tipo de células (Chen et al., 2003).

Estudos com MCF-7 tratadas com altas concentrações de genisteína (50 e 100 μ M) demonstram que a proporção de células na fase G2/M aumenta enquanto que a de células na fase S diminui, o que quer dizer que esta isoflavona inibe a proliferação das células tumorais bloqueando a progressão do ciclo celular na fase G2/M (Chen et al., 2003, Hewitt e Singletary, 2003).

No caso do tratamento de MCF-7 com genisteína e tamoxifeno, foi demonstrado no trabalho *Mai et al.*, que a combinação destes dois produtos poderá inibir sinergicamente o crescimento tumoral (Mai et al., 2007).

3.2.2. Daidzeína - Mecanismo de ação

A daidzeína é a segunda isoflavona mais predominante nos produtos à base de soja. Esta isoflavona pode ligar-se aos dois tipos de recetor de estrogénio, ER- α e ER- β , e assim induzir uma resposta estrogénica quer *in vitro* quer *in vivo*, mas a afinidade desta ligação é menor que a da genisteína (Ju et al., 2006).

Tal como no caso da genisteína, a proliferação de células MCF-7 aumenta quando é adicionada uma concentração baixa de daidzeína (≤ 1 μ M) e diminui quando é adicionada uma concentração

maior, mas o efeito estrogénico desta isoflavona e do seu metabolito equol é mínimo (Ju et al., 2006, Guo et al., 2004).

Estudos demonstram que a daidzeína bloqueia o ciclo celular nas fases G1 e G2/M em células humanas do cancro da mama, aumenta significativamente a atividade da caspase-9 e diminui a expressão da ciclina D. Assim, esta isoflavona tem nestes processos de bloqueio da proliferação celular e na indução da apoptose a sua atividade anticancerígena (Jin et al., 2010, Choi e Kim, 2008).

No trabalho *Jin et al.* demonstraram que a daidzeína inibe o crescimento de MCF-7 de forma dependente da dose e do tempo e para concentrações $\geq 25 \mu\text{M}$ foi atingida uma inibição significativa da viabilidade celular. Quanto à indução da apoptose é relatado um aumento de células apoptóticas com o aumento da concentração de daidzeína, bem como o mecanismo pelo qual é desencadeada, tendo como alvo a via intrínseca, observando-se a ativação da caspase-9, a disrupção da permeabilidade da membrana mitocondrial, o aumento da libertação de citocromo C e aumento de espécies reativas de oxigénio (ROS) dentro e à volta da mitocôndria (Jin et al., 2010).

No trabalho *Choi et al.* são revelados resultados semelhantes, uma vez que obtiveram também uma inibição da proliferação de MCF-7 ao tratar estas células com daidzeína, e igualmente de modo dependente da dose e do tempo. O bloqueio do ciclo celular é comprovado pelo aumento da proporção de células na fase G2/M. Também relatam o aumento da apoptose através do aumento da atividade da caspase-9 e da libertação de citocromo c pela mitocôndria (Choi e Kim, 2008).

3.3 Aplicações

Os efeitos da soja têm sido estudados a nível clínico e epidemiológico, avaliando-se a relação entre a soja e os seus fitoestrogénios com algumas doenças. No entanto, estes estudos podem não ser muito conclusivos devido a diferenças nas condições em que são efetuados os ensaios como a dose, a composição da dieta, a duração da utilização, o composto utilizado e a amostra estudada (Patisaul e Jefferson, 2010).

O consumo de soja é visto como o principal fator que leva a uma diminuição da gravidade dos sintomas associados à menopausa, e da incidência de doenças como a osteoporose, doenças cardiovasculares ou o cancro da mama nos países asiáticos em relação ao número de casos registados nos países ocidentais (van Duursen et al., 2011).

No caso da menopausa, os fitoestrogénios aliviam os sintomas vasomotores, os afrontamentos e os suores noturnos. Para muitas mulheres a terapia hormonal de substituição convencional,

devido aos riscos que tem inerentes, como o de poder vir a desenvolver cancro, não é uma opção, sendo o consumo de fitostrogénios a alternativa (Patisaul e Jefferson, 2010).

Tem sido estudada a possível relação entre o consumo de soja com a densidade óssea, associada ao risco de desenvolvimento de osteoporose e, o que é facto, é que no continente asiático, onde a dieta é pobre em proteínas animais e cálcio, o número de fraturas não é muito alto. Pensa-se então, que o consumo de soja, e consequentemente das suas isoflavonas, é o responsável por este dado (Mateos-Aparicio et al., 2008). A perda de massa óssea é uma preocupação para as mulheres, principalmente em pós-menopausa, por isso a inclusão de produtos de soja na sua dieta ser uma opção para evitar este problema (Patisaul e Jefferson, 2010, Schilling et al., 2014, Bedell et al., 2014).

Como se sabe, as doenças cardiovasculares são um grande problema sobretudo nos países desenvolvidos, que se relaciona muitas vezes com um estilo de vida pouco saudável. Por isso, uma melhoria no estilo de vida e na dieta podem alterar o prognóstico destas doenças, podendo a ingestão de leguminosas, com ênfase na substituição de proteínas animais por proteínas da soja, diminuir o risco de aparecimento destas doenças. Já foi demonstrado que a soja pode baixar os níveis de colesterol total, de lipoproteínas de baixa densidade (LDLs) e de triglicéridos, mas os valores de lipoproteínas de alta densidade (HDLs) não variam (Mateos-Aparicio et al., 2008).

O cancro é uma das maiores causas de morte em todo o Mundo, de modo a colmatar este facto têm sido estudadas combinações de vários agentes quimioterapêuticos em detrimento da utilização de um só agente. Tendo em conta o potencial risco de toxicidade, cada vez mais as atenções se voltam para outros agentes, podendo estes serem compostos naturais como os fitoestrogénios, que reduzem esta toxicidade aumentando o poder anticancerígeno (Virk-Baker et al., 2010).

A soja é então um possível anticancerígeno pois as suas isoflavonas, como têm atividade hormonal, podem interferir em cancros dependentes de hormonas, como é o caso do cancro da mama. Assim, as isoflavonas parecem agir como anti-estrogénio quando há uma alta concentração de estrogénio, e como estrogénio quando este está em baixa concentração. A genistéina parece contribuir também para o efeito anticancerígeno com as suas propriedades antioxidantes e, por ser um inibidor específico de proteínas como a tirosina cinase, a MAP cinase e a topoisomerase II, que fazem parte da cascata de transdução de sinal estimulada por fator de crescimento. Esta isoflavona também faz com que os valores de TGF- β aumentem e assim o crescimento das células cancerígenas é inibido (Mateos-Aparicio et al., 2008, Bedell et al., 2014).

4. Estrogénio

Os estrogénios são hormonas esteroides que regulam muitos dos processos do organismo como o crescimento, a diferenciação e a função de vários tecidos alvo (Prossnitz et al., 2008, Cui et al., 2013, Rettberg et al., 2014).

As hormonas esteroides são lípidos derivados do colesterol, produzidas pelas gónadas (ovários e testículos), pelo córtex adrenal e pela placenta durante a gravidez. A síntese destas hormonas passa pela conversão do colesterol através de várias reações bioquímicas, depois passam diretamente para a circulação sanguínea onde são transportadas ligadas a proteínas (May, 2014, Rettberg et al., 2014). Devido à sua lipossolubilidade, estas hormonas atravessam facilmente as membranas celulares e ligam-se na maioria dos casos a recetores intracelulares nas células alvo. No interior destas, após a formação do complexo hormona-recetor, este pode migrar para o núcleo e assim regular a transcrição e a síntese proteica (Cui et al., 2013, Oh e Chung, 2013).

Quanto à estrutura dos estrogénios, todos têm quatro anéis. Só varia um grupo presente na estrutura, sendo um hidroxilo no estradiol, e uma cetona no caso da estrona, como ilustrado na figura 3 (May, 2014, Kumar et al., 2010).

Os estrogénios são produzidos nos ovários e o mais predominante é o 17 β -estradiol (E2), mas também estão presentes a estrona (E1) e o estriol (E3), mas em menores concentrações (Cui et al., 2013, Rettberg et al., 2014).

Nas mulheres as fontes endógenas destas hormonas são as células teca e granulosa dos ovários e os derivados luteinizados destas células (Cui et al., 2013, Gruber et al., 2002). A sua síntese ocorre nestes locais mas também nos homens, numa escala muito menor, nas células de Leydig dos testículos e no tecido adiposo (Kumar et al., 2010, Gruber et al., 2002, Cui et al., 2013).

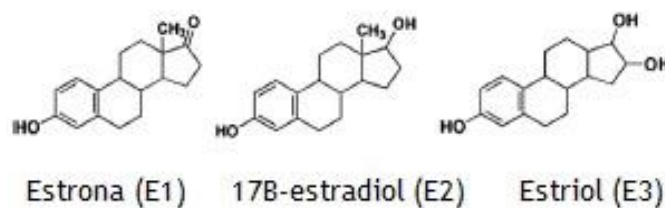


Figura 3 - Estrutura dos diferentes estrogénios (Adaptado de Kumar, 2010).

4.1. Síntese

A síntese de estrogénio varia consoante a fase, reprodutiva ou não, em que a mulher se encontra (Cui et al., 2013). Nas mulheres em idade fértil a síntese de estradiol nos ovários varia ciclicamente, havendo um pico na fase pré-ovulatória e verificando-se o valor mais baixo na fase pré-menstrual. Estas variações do ciclo dependem das gonadotropinas, a hormona luteínica (LH) e a hormona foliculo-estimulante (FSH), no início do ciclo menstrual as células da granulosa têm recetores para a FSH mas não para a LH, a FSH estimula assim a multiplicação das células da granulosa e a produção de estrogénio, algum deste difunde-se no sangue e mantém relativamente constante a concentração plasmática. Na segunda semana do ciclo, um folículo fica dominante e secreta estrogénio suficiente, aumentando assim a concentração, tendo um pico no final da fase folicular. Dá-se a ovulação e há formação do corpo lúteo que secreta grandes quantidades de estrogénios. Com a degeneração do corpo lúteo há uma diminuição do estrogénio plasmático, como se verifica na figura 4 (Cui et al., 2013, Palmieri et al., 2014).

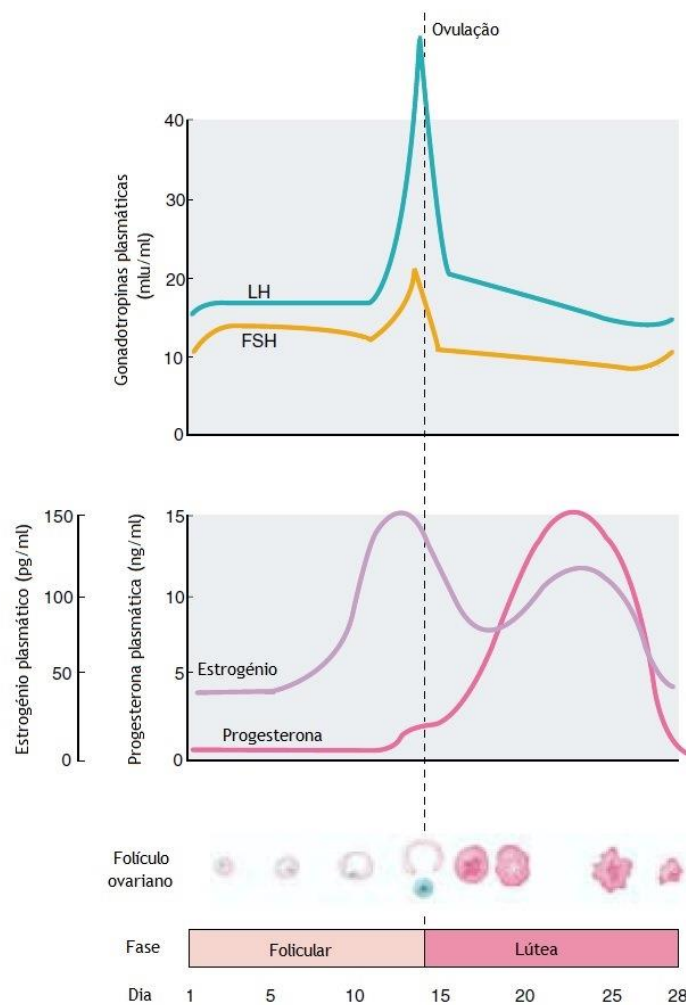


Figura 4 - Variação das concentrações hormonais durante o ciclo menstrual (Adaptado de Widmaier et al., 2013).

O Efeito da Soja e do Tamoxifeno nas células MCF-7

A produção desta hormona volta a diminuir na perimenopausa devido à inexistência de folículos ovarianos, mas ainda assim há uma variação considerável na concentração sérica. Nas mulheres em pós-menopausa, a síntese é bastante reduzida e é feita através da conversão da testosterona e aromatização da androstenediona em estrona, não nas gónadas, mas no tecido adiposo e dependente de fatores como a idade e o peso. Nesta fase o estrogénio prevalente é a estrona em vez do estradiol (Mitrunen e Hirvonen, 2003, Cui et al., 2013).

A biossíntese dos estrogénios, representada na figura 5, tem como precursor o colesterol, que pode estar livre ou esterificado em ácidos gordos. O colesterol é então convertido em pregnenolona pela enzima mitocondrial CYP11A/P450_{scc}, sendo esta reação o passo limitante desta síntese (Cui et al., 2013, Mitrunen e Hirvonen, 2003). A pregnenolona formada pode ser convertida em progesterona, com a ação da 3 β -hidrosteróide desidrogenase (3 β -HSD) e uma isomerase, ou em 17 α -hidroxipregnenolona. A progesterona é um precursor para androgénios e estrogénios uma vez que é convertida em 17 α -hidroxiprogesterona através do P450_{c17} (17 α -hidroxilase) no retículo endoplasmático. A 17 α -hidroxipregnenolona é convertida em dehidroepiandrosterona (DHEA) pela P450_{c17 α} (liase). Esta é convertida em androstenediona, sendo o androgénio mais produzido nos ovários. O estradiol é sintetizado a partir deste último androgénio por ação da P450 aromatase (Cui et al., 2013).

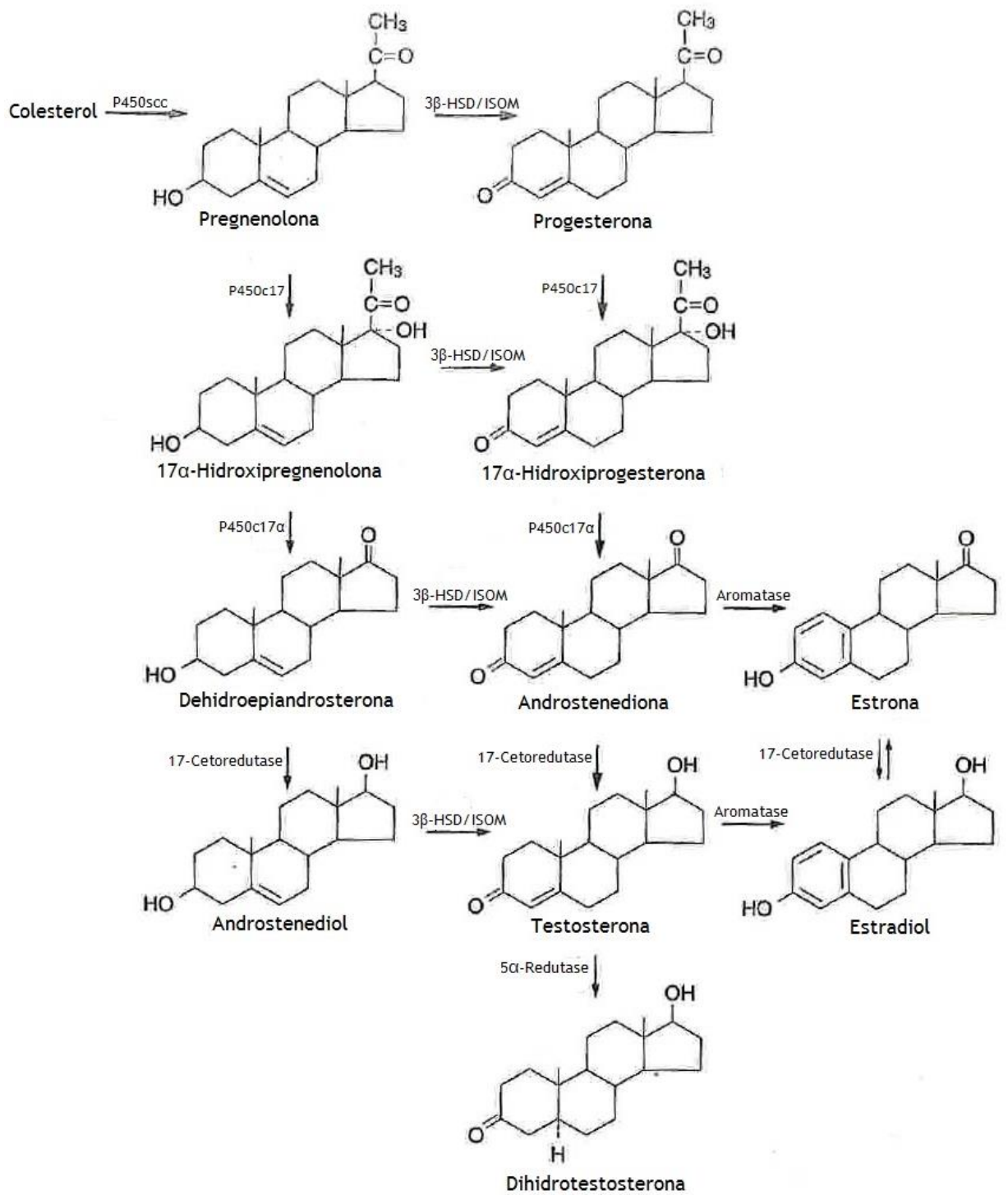


Figura 5 - Síntese de estrogênios (Adaptado de Gardner e Shoback, 2011).

4.2. Transporte e Metabolismo

As hormonas quando são libertadas para a circulação ligam-se a proteínas plasmáticas. O estradiol liga-se com avidéz à globulina de ligação às hormonas sexuais (SHBG), uma β -globulina (Gruber et al., 2002, May, 2014, Rettberg et al., 2014).

De um modo geral, os estrogénios são metabolizados por sulfatação ou glucuronidação e são conjugados e excretados na bÍlis ou na urina. Estes conjugados podem ser hidroxilados pela flora intestinal e serem reabsorvidos estrogénios, resultando na circulação enterohepática (Gruber et al., 2002).

O estradiol circulante é rapidamente convertido no fÍgado, em estrona por ação da 17-cetoreductase. Alguma desta estrona entra em recirculação, mas a maioria é metabolizada através de uma hidroxilação no anel D a 16 α -hidroxiestrona, que depois é convertida em estriol, ou através da hidroxilação do anel A a 2- ou 4-hidroxiestrona, estrogénio catecol que tem atividade biológica. Este último é convertido pela catecol-O-metiltransferase (COMT) a compostos 2- e 4-metoxi. Muita da estrona que permanece em circulação é conjugada e forma-se sulfato de estrona. Antes de ser excretado pelos rins, o estriol é convertido a estriol 3-sulfato-16-glucoronido (Mitrunen e Hirvonen, 2003).

A maior via de metabolização é a 2-hidroxilação que se dá no fÍgado. Já a enzima responsável pela 4-hidroxilação é dominante em tecidos extrahepáticos como o tecido do útero e da mama. No caso de cancro da mama humano verifica-se a presença quatro vezes maior de 4-hidroxiestradiol em relação ao 2-hidroxiestradiol. A via da 2-hidroxilação foi mesmo considerada anticarcinogénica, enquanto que a 4-hidroxilação é considerada carcinogénica devido à formação de quinonas (4-hidroxiestradiol-o-quinona e 4-hidroxiestrona-o-quinona) e semiquinonas que formam aductos com o DNA e produzem espécies reativas de oxigénio (ROS), causando dano celular. Através da metilação pela COMT, os 2- e 4-hidroxiestrogénios são inativados sendo destoxificados. As quinonas, por ação da GST, podem ser conjugadas com a glutathione ou reduzidas a estrogénios catecol pela quinona reductase. As semiquinonas podem reagir com o oxigénio molecular e assim são formados radicais superóxido, estes podem ser reduzidos, espontaneamente ou por uma reação catalisada por superóxido dismutase, pelo peróxido de hidrogénio (Mitrunen e Hirvonen, 2003, Chandrasena et al., 2008).

4.3. Recetores e Mecanismos de ação

Os recetores hormonais medeiam os efeitos biológicos dos estrogénios. O estradiol plasmático entra na célula alvo por difusão e é transportado até ao local de ligação a recetores de estrogénios (Oh e Chung, 2013). Estes recetores podem ser de três tipos diferentes, o recetor de estrogénio alfa (ER- α), o recetor de estrogénio beta (ER- β) e o recetor de estrogénio acoplado à proteína G (GPR30) (Prossnitz et al., 2008, Ramalinho et al., 2013, Cui et al., 2013).

As duas isoformas de recetores de estrogénio, alfa e beta, pertencem à mesma superfamília de recetores nucleares mas variam quanto à sua distribuição pelos tecidos (Cui et al., 2013). O ER- α está presente no endométrio, na mama e no estroma do ovário. Já o ER- β encontra-se nos rins, na mucosa intestinal, no parênquima pulmonar, na medula óssea, no osso, no cérebro, nas células endoteliais e na próstata (Cui et al., 2013, Ramalinho et al., 2013).

Em relação ao número de recetores por célula, são estimados cerca de 5000 a 20000. Estes recetores servem também como local de regulação da atividade hormonal (Prossnitz et al., 2008).

Estruturalmente estes recetores são formados por cinco regiões cuja homologia varia, denominadas de A/B a F, como representado na Figura 6 (May, 2014).

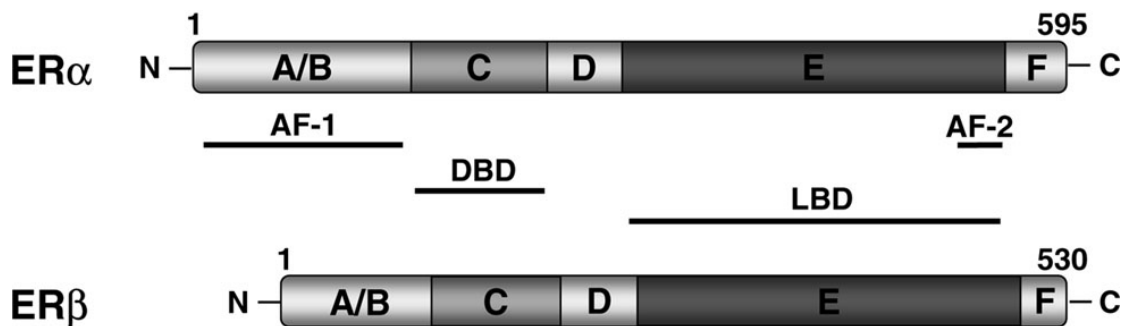


Figura 6 - Estrutura dos recetores de estrogénio alfa e beta. DBD - domínio de ligação ao DNA; LBD - domínio de ligação ao ligando; AF-1 - função de ativação independente de ligando; AF-2 - função de ativação ligando-dependente (Adaptado de Shao e Brown, 2004).

A região A/B, N-terminal, contém o local AF-1 (função de ativação 1). Este local é essencial para que ocorra interações com proteínas co-reguladoras e é responsável por ativações independentes de hormona/ligando (Cui et al., 2013, May, 2014, Patani e Martin, 2014).

A região C corresponde ao domínio de ligação ao DNA (DBD, do inglês *DNA-binding domain*) (May, 2014, Cui et al., 2013). Este domínio é o mais conservado e é constituído por dois *zinc fingers* envolvidos na ligação do recetor e na dimerização. Estes *zinc fingers* contêm

aproximadamente 60 a 70 aminoácidos e uma região terminal COOH. Cada um tem quatro cisteínas que coordenam um íon zinco de forma tetraédrica (Aranda e Pascual, 2001).

A região D encontra-se entre os domínios C e E e participa na translocação (Cui et al., 2013).

A região E/F, no domínio C-terminal é a maior e contém o domínio de ligação ao ligando (LBD, do inglês *ligand-binding domain*). Neste domínio encontra-se o local AF-2 (função de ativação 2) responsável pela ativação ligando-dependente, cuja conformação pode ser alterada pelos ligandos, e assim também determina a interação posterior com co-ativadores ou co-repressores, para além de conter também uma superfície de dimerização (Cui et al., 2013, May, 2014, Patani e Martin, 2014).

O GPR30 ou GPER é, como já foi referido, um recetor da família dos recetores acoplados à proteína G, com 7 segmentos transmembranares envolvido na função dos estrogénios devido à existência de sinalização pelo estrogénio mediada por proteínas G e a localização de sítios de ligação de estrogénios membranares (Prossnitz et al., 2008, Ramalhinho et al., 2013). Quanto à sua localização, o GPR30 parece poder estar no retículo endoplasmático, no complexo de *Golgi* ou então na membrana plasmática (Mizukami, 2010). Estruturalmente contém um domínio C-terminal com 47 aminoácidos, um *loop* intracelular com uma sequência envolvida na transdução de sinal e um *loop* intracelular mais curto com cerca de 10 aminoácidos (Thomas et al., 2005). O N-terminal, localizado fora da célula, tem presente resíduos de ácido aspártico que modificam através de glicosilação, se este recetor estiver na membrana plasmática. Possivelmente a ativação do recetor dá-se aquando da interação entre o ligando e o N-terminal. Ao terceiro *loop* intracelular liga-se a proteína G trimérica (Mizukami, 2010).

As ações dos estrogénios são determinadas por vários fatores como a estrutura da hormona, a isoforma do recetor, o promotor do gene alvo e a variação entre co-ativadores e co-repressores que controlam a resposta transcripcional final dos complexos ER-hormona (Cui et al., 2013, Oh e Chung, 2013).

A via que tem por base a ligação do estradiol aos recetores de estrogénio nucleares ER- α e ER- β , e assim a regulação da expressão de genes alvo é um processo bastante lento e contínuo, e é chamada via de ação genómica do estradiol e está ilustrada na figura 7 (Silva et al., 2010, Meyer et al., 2009, Cui et al., 2013). Assim, o estradiol pode ligar-se às isoformas α ou β do recetor de estrogénio, que funcionam como fatores de transcrição ativados por ligando, localizados no citoplasma inativados e ligados a proteínas de choque térmico (HSP, do inglês *heat shock protein*). Após a formação do complexo ligando-recetor, as HSP dissociam-se e os recetores são translocados para o núcleo para depois ocorrer transcrição de genes. Esta dissociação das HSP leva à dimerização do recetor, formando um homo ou heterodímero. Os passos seguintes ocorrem intracelularmente com a interveniência de co-reguladores, co-ativadores ou co-repressores, que vão influenciar a transcrição. O dímero de ER formado interage com elementos de resposta a estrogénio (ERE). Estes são sequências de DNA no

promotor de genes regulados por estrogénio, que formam o complexo ERE-ER que promove a formação do complexo de pré-iniciação da transcrição que leva à disrupção da cromatina nos ERE. Por fim, a RNA polimerase II e todos os intervenientes na transcrição levam a que o gene seja transcrito (Prossnitz et al., 2008, Meyer et al., 2009, Oh e Chung, 2013, May, 2014, Huan et al., 2014).

O ER ativado, pode ainda regular a transcrição através da sua interação com fatores de transcrição como a proteína estimulante 1 (SP-1), proteína ativação 1 (AP-1), fator nuclear kB (NF-kB) e c-jun, sem se ligar diretamente ao DNA (Cui et al., 2013, Patani e Martin, 2014).

No que diz respeito à ligação do estrogénio ao GPR30, este ativa efetores como o adenilato ciclase, que vai resultar na produção de cAMP, e c-Src. Este último ativa a matriz de metaloproteinases (MMP) que, por sua vez, vai clivar o fator de crescimento epidérmico ligado à pró-heparina (EGF), que liberta e ativa os recetores de fator de crescimento epidérmico (EGF-R). Esta ativação leva ao início de eventos como as cascatas de MAPK e PI3K/Akt que vão produzir efeitos rápidos ou influenciar a transcrição (Meyer et al., 2009, Silva et al., 2010, Rettberg et al., 2014).

O ER ativado pode também, através de interações proteína-proteína, modular outros fatores de transcrição. O processo transcripcional pode ser ampliado por fosforilação, ou então outros fatores de transcrição podem ser ativados e assim interagirem com o ER ou até ligarem-se de forma independente do ER no promotor do gene alvo (Meyer et al., 2009, Cui et al., 2013).

No entanto, existem respostas celulares a concentrações fisiológicas de estrogénio que acontecem tão rapidamente que é impossível serem mediadas por transcrição e síntese proteica. Assim, estes efeitos do estrogénio são transmitidos por via enzimática e por canais iónicos através da ativação do recetor de estrogénio associado à membrana (mER) e são denominados como não genómicos (Meyer et al., 2009).

O passo inicial desta via mediada pelo mER é a ativação do c-Src, que só é possível depois da proteína G interagir com o recetor. O modulador da atividade não genómica do ER (MNAR) faz com que se forme um complexo entre ER, c-Src e p85 (subunidade regulatória do PI3K) levando à ativação da via de sinalização PI3K/Akt. Em alternativa, a GTPase p21ras monomérica, ativada pelo c-Src, pode recrutar cinases da via da MAPK. Assim que ativas, as vias PI3K/Akt e MAPK podem levar à transcrição de genes (Meyer et al., 2009).

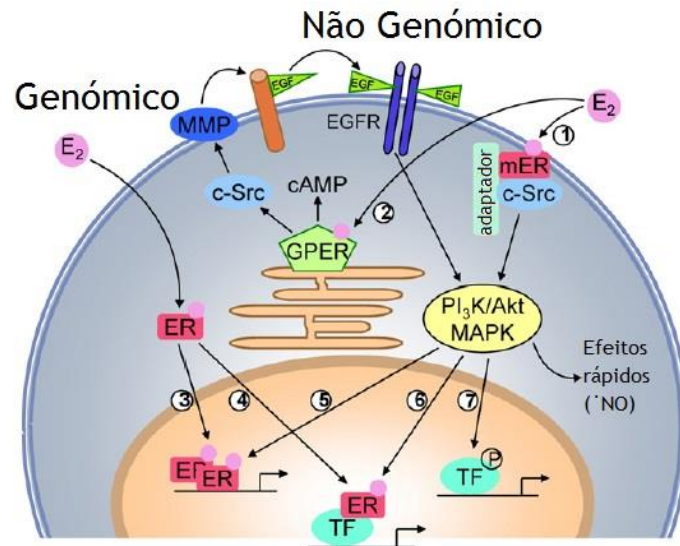


Figura 7 - Vias de efeito genómico e não genómico do recetor de estrogénio (Adaptado de Meyer et al., 2009).

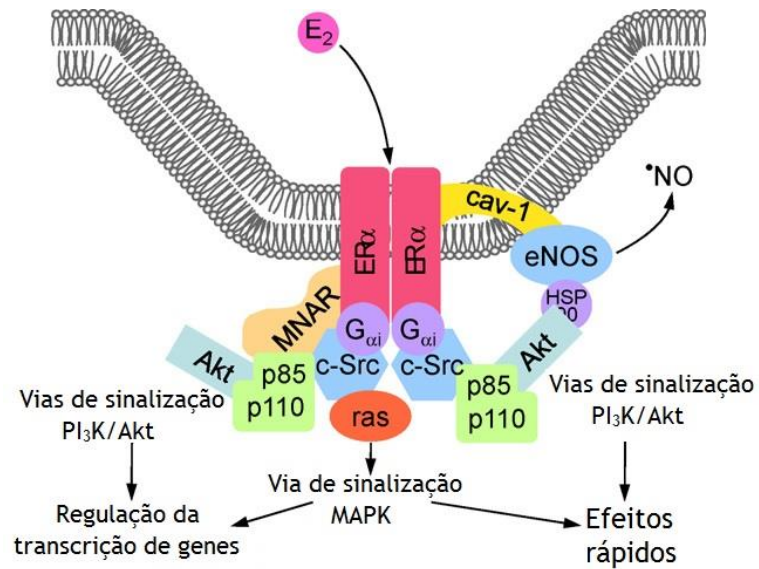


Figura 8 - Mecanismo do efeito não genómico do ER- α na membrana plasmática (Adaptado de Meyer et al. 2009).

5. Terapia hormonal e Tamoxifeno

A terapia hormonal é o tratamento adequado para todos os estados de cancro da mama dependente de estrogénio. Pode ser administrada no pré-operatório (neoadjuvante), no pós-operatório (adjuvante) ou no caso de doença metastizada e avançada (tratamento paliativo) (Palmieri et al., 2014).

O tratamento endócrino avançou muito e já há algum tempo que este dado parece dever-se ao melhor entendimento de como o ER medeia a dependência de estrogénio, à utilização dos recetores como modo de prever os efeitos benéficos de terapia e ao desenvolvimento de novos compostos (Locker, 1998).

O tratamento do cancro da mama dependente de hormonas passa pela privação ou modulação do estrogénio. Esta pode ser levada a cabo pelo bloqueio da produção de LH/FSH pela hipófise através de análogos de GnRH, pela redução da produção de estrogénio, quer pela supressão da função ovárica ou pela utilização de inibidores da aromatase, pelo bloqueio do recetor de estrogénio com a utilização de moduladores seletivos do recetor de estrogénio, ou pela diminuição da expressão de recetores de estrogénio através de um processo de *down-regulation* pelos SERDs (Bodmer e Castiglione-Gertsch, 2011, Zilli et al., 2009, Palmieri et al., 2014).

Os moduladores seletivos do recetor de estrogénio (SERM, do inglês *Selective Estrogen Receptor Modulator*) competem com o estrogénio pelo recetor, ligando-se a ele e levando a alterações conformacionais que podem resultar num efeito agonista, agonista parcial ou antagonista, conforme a localização do ER nos diferentes tecidos (Mahoney et al., 2008, Bedell et al., 2014). No osso são agonistas do estrogénio, aumentando a densidade óssea, enquanto que na mama são antagonistas, uma vez que inibem a proliferação celular no cancro da mama e agonistas parciais, aumentando a proliferação de células do endométrio (Park e Jordan, 2002, Grilli, 2006, Bodmer e Castiglione-Gertsch, 2011, Mahoney et al., 2008, Bedell et al., 2014).

Os SERMs dividem-se em cinco grupos, os trifeniletílenos, os benzotiofenos, os tetrahidronaftílenos, os indóis e os benzopiranos (Bryant, 2002). De todos estes, o fármaco mais utilizado no tratamento do cancro da mama é o tamoxifeno, que pertence aos trifeniletílenos.

Este composto é utilizado por mulheres, antes ou após a menopausa, que tenham um tumor ER positivo, uma vez que a maioria dos casos com ER negativo não há resposta ao tratamento (Jordan, 2006, Goetz et al., 2005, Lochab et al., 2012, Lymperatou et al., 2013, Palmieri et al., 2014, Yang et al., 2013).

Ao nível da administração, esta é feita por via oral e 4 a 7 horas após a ingestão são atingidos os níveis plasmáticos máximos de tamoxifeno. Este tem duas fases de eliminação com tempos de meia-vida diferentes, de 7 a 14 horas e de 4 a 11 dias. Esta meia-vida longa faz com que a equilíbrio da dose de manutenção leve semanas ou meses (Locker, 1998).

Após a circulação entero-hepática, os metabolitos do tamoxifeno conjugados com o ácido glucurónico, são excretados no intestino pelo ducto biliar e de seguida os metabolitos hidrolisados e conjugados são reabsorvidos para a recirculação enterohepática. Os que não são reabsorvidos são excretados nas fezes e uma minoria na urina (Locker, 1998).

O metabolismo do tamoxifeno é realizado pelas isoenzimas do citocromo p450, CYP2D6, CYP2C9 e CYP3A4. A última está envolvida na N-desmetilação e consequente formação de N-desmetiltamoxifeno, o principal metabolito e de meia-vida longa. Este composto sofre ainda uma hidroxilação a 4-hidroxitamoxifeno, cuja atividade antiestrogénica é muito maior (Goetz et al., 2005, Jin et al., 2005, Brauch e Jordan, 2009). Os dois metabolitos formados podem ainda ser convertidos a 4-hidroxi-N-desmetiltamoxifeno (Goetz et al., 2005, Jin et al., 2005).

O mecanismo de ação do tamoxifeno parece passar pela inibição da síntese de DNA, pela indução da apoptose e pelo bloqueio das células na fase G1/G0 do ciclo celular. O tamoxifeno parece inibir a expressão de E6AP, uma proteína que participa na regulação de processos importantes como a transcrição, a transdução de sinal, o controlo do ciclo celular e a reparação do DNA. Assim, o tamoxifeno pode provocar apoptose e efeitos citostáticos (Lochab et al., 2012, Yang et al., 2013). É a este efeito que se pode dever o reaparecimento dos tumores após a utilização do fármaco ser cessada.

O tamoxifeno também regula a transcrição de genes através do elemento de resposta ao estrogénio (ERE), tal como o estrogénio. Há formação do complexo ER-tamoxifeno, o ER fica ativado, dá-se a formação de dímeros que se vão ligar ao ERE causando alterações conformacionais no domínio N-terminal do ER, que interage com fatores de ativação transcripcionais levando ao início da transcrição. Assim, o complexo não ativa a transcrição e interfere no ciclo celular (Yang et al., 2013).

Tal como o estrogénio, o tamoxifeno também se pode ligar a recetores não nucleares na membrana plasmática, regulando a transcrição através do AP-1 (Park e Jordan, 2002).

A atividade antiestrogénica do tamoxifeno deve-se à inibição das alterações conformacionais do ER essenciais para a ligação dos ativadores. O que acontece na presença de estrogénio, ou de um agonista, é o reposicionamento da hélice 12, essencial para a ativação do AF-2, que envolve o ligando numa parte hidrofóbica do domínio de ligação ao ligando fazendo com que co-ativadores interajam e se dê a ativação do AF-2. Já na presença de tamoxifeno, o mesmo não acontece, uma vez que a cadeia lateral interage com o resíduo de asparagina (Asp 351) impedindo a rotação da hélice 12 do ER, não fechando a parte hidrofóbica e não ocorrendo a interação com co-ativadores, bloqueando a transcrição (Zilli et al., 2009, May, 2014).

Devido aos seus possíveis efeitos de agonista parcial, o tamoxifeno tem como possível efeito adverso a possibilidade de desenvolvimento de cancro endometrial, uma vez que aumenta a proliferação de células endoteliais no útero. A sua administração tem também como possíveis riscos o aumento de tromboembolias e retinopatias (Grilli, 2006).

Este composto pode interagir com outros fármacos levando a efeitos secundários não desejados. Por exemplo, no caso de haver uma administração concomitante de estrogénio, há uma redução da eficácia do tratamento com tamoxifeno uma vez que os dois compostos competem pelo mesmo recetor (Yang et al., 2013).

Outra complicação com a utilização deste fármaco é a ativação de ER não nucleares com sobre expressão de HER-2, que em algumas condições, leva à ligação do tamoxifeno ao ER ativando-o, e assim podem ligar-se co-ativadores e não co-repressores, aumentando a atividade agonista. Pode ainda ligar-se à molécula de zinco no domínio de ligação ao DNA ou induzir a saturação do ER (Osborne e Schiff, 2005).

Devido aos efeitos secundários têm sido procuradas alternativas para melhorar a qualidade de vida das doentes. Entre elas encontram-se compostos que atuam de forma indireta no ER, como os inibidores da aromatase, SERMs mais seletivos como o raloxifeno e SERDs como o fulvestrant (Zilli et al., 2009).

Os inibidores da aromatase, tal como o nome indica, inibem a estrogénio sintetase ou aromatase. Inibindo esta enzima, os estrogénios não se podem formar a partir dos androgénios, reduzindo os valores séricos de estrogénio (Jordan, 2006, van Duursen et al., 2013). Os inibidores da aromatase de 2ª geração são mais tóxicos ou o seu efeito é menor comparativamente aos do tamoxifeno, mas os de 3ª geração já apresentam menos efeitos secundários (Bodmer e Castiglione-Gertsch, 2011).

O fulvestrant é um SERD logo promove processos de *down-regulation* do ER, tendo assim uma ação antitumoral em tumores dependentes de hormonas (Zilli et al., 2009, Palmieri et al., 2014, Lymperatou et al., 2013). Este previne a ligação do estrogénio ao ER e anula assim a regulação da transcrição pelo estrogénio que leva à proliferação celular e exerce o seu efeito bloqueando a dimerização do recetor, sendo um verdadeiro antagonista do ER (Bodmer e Castiglione-Gertsch, 2011, Zilli et al., 2009).

6. Cultura de células no cancro da mama

O cancro da mama é o cancro mais diagnosticado nas mulheres (Mahoney et al., 2008, He e Chen, 2013, Mourouti e Panagiotakos, 2013, May, 2014). Esta doença é, do ponto de vista molecular, muito heterogénea e complexa (Charafe-Jauffret et al., 2006, Yang et al., 2013).

O risco de vir a desenvolver cancro da mama varia do ponto de vista clínico. Uma mulher pode ter o risco da população em geral ou um risco acrescido, dependendo se sofre ou não de outra complicação médica ou se tem ou não um historial familiar, ou se está exposta a condições que podem levar à doença ou não. Fatores como o álcool, a massa corporal e a dieta podem também influenciar o desenvolvimento da doença (Mahoney et al., 2008, Yang et al., 2013).

O que se sabe sobre esta doença é devido, principalmente, a estudos *in vivo* e *in vitro* realizados em linhas celulares. Estas são modelos representativos de tumores e apresentam vantagens por serem um material autorreplicativo, ilimitado, de fácil manipulação, o que as torna uma importante ferramenta para vários estudos (Charafe-Jauffret et al., 2006).

A linha celular MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation 7*, local onde foi isolada pela primeira vez) é obtida a partir do cancro da mama de uma paciente Americana, de 69 anos de idade. Esta foi obtida por efusão pleural, isto é, um excesso de fluido na cavidade pleural que rodeia os pulmões, de um cancro de mama metastizado da paciente. Antes de ter sido iniciada a cultura primária das células, esta paciente foi sujeita a uma mastectomia da mama direita devido a um tumor benigno e a uma mastectomia radical da mama esquerda devido a um adenocarcinoma maligno, 7 e 3 anos antes, respetivamente (Levenson e Jordan, 1997).

Esta linha celular tornou-se num modelo *standard* para vários laboratórios em todo o mundo devido às suas propriedades, como a sua aderência e o seu crescimento em camada para além da presença de recetores, que deram uma importante perspetiva para a terapia endócrina do cancro da mama (Levenson e Jordan, 1997).

A fim de compreender a presença de recetores de estrogénio nestas células foram realizados estudos *in vivo* e *in vitro* de frações de células e tecidos. É provável que a paciente tenha sido tratada com estrogénio sintético em doses elevadas e a doença ficou controlada três vezes mais que o esperado, o que demonstra que a doença responde a hormonas (Levenson e Jordan, 1997).

Foram identificados, para além dos recetores de estrogénio, também recetores para glucocorticoides, progesterona e androgénios, o que releva que as células MCF-7 são um ótimo modelo para estudos *in vitro* das relações entre estas hormonas e dos mecanismos de resposta à terapia endócrina por parte do tumor (Levenson e Jordan, 1997).

Numa situação saudável estão presentes os dois tipos de ER, ER- α e ER- β . Neste tipo de células, como são dependentes de hormonas e expressam o recetor ER- α , a sua incubação com o

estrogénio leva a um aumento da proliferação celular e pode ser utilizada para deteção de efeitos agonistas do recetor (Levenson e Jordan, 1997, Imhof et al., 2008).

Objetivos

Este trabalho tem como principal objetivo determinar a citotoxicidade da soja na presença de 17β -estradiol e tamoxifeno em cultura de células de cancro da mama MCF-7.

Para tornar este objetivo possível foram desenvolvidos vários estudos:

- Efeitos do 17β -estradiol a diferentes concentrações;
- Efeitos do tamoxifeno a diferentes concentrações;
- Efeitos de diferentes concentrações de extrato de soja;
- Efeitos de diferentes concentrações de 17β -estradiol com uma concentração constante de tamoxifeno;
- Efeitos de diferentes concentrações de extrato de soja com uma concentração constante de tamoxifeno;
- Efeitos de diferentes concentrações de extrato de soja com uma concentração constante de tamoxifeno e 17β -estradiol.

Material e Métodos

1. Material

1.1. Reagentes

- Meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified eagle Medium*), *Sigma Aldrich*;
- Água *MilliQ* - *Millipore*;
- NaHCO₃;
- Soro fetal bovino (FBS);
- Antibiótico Ab (estreptomicina e penicilina) e Antimicótico anfotericina B;
- Tripsina, *Sigma Aldrich*;
- Azul tripano;
- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), *Sigma Aldrich*;
- Tampão fosfato salino (PBS);
- Dimetilsulfóxido (DMSO).

1.2. Linha celular

- MCF-7.

1.3. Compostos testados

- 17 β -estradiol;
- Extrato de soja comercial;
- Tamoxifeno.

1.4. Equipamentos

- Câmara de fluxo laminar vertical, Classe II, *NuAire*;
- Incubadora, DH *autoflow*, *NuAire*;
- Microscópio, *Olympus*;
- Potenciômetro medidor de pH;
- Frascos *Shot*;
- Frascos de cultura;
- Tubos *falcon*;
- *Eppendorfs*;
- Micropipetas e pontas;
- Pipetas graduadas;
- Pompe;te;

- Centrifugadora, *Bioblock Scientific, Sigma*;
- Câmara de *Neubauer*;
- Filtro de 22 μM ;
- Vórtex;
- Caixas multipoços;
- Microplacas de leitura;
- Leitor espectrofotométrico de microplacas, *Anthos*.

2. Preparação de meio de cultura DMEM

O meio DMEM liofilizado que foi utilizado consistia em DMEM com alta percentagem de glucose, tendo na sua constituição também L-glutamina e piruvato de sódio.

A preparação do meio de cultura DMEM consistiu na dissolução de um frasco de DMEM liofilizado e de NaHCO_3 (2,5 g/litro) num litro de água MilliQ. Ajustou-se o pH, no potenciómetro, da mistura resultante até 7,4. Considera-se este meio como DMEM incompleto, uma vez que não é suplementado com FBS. Para a preparação do DMEM completo, adicionou-se FBS 10% (v/v) e 1% da mistura de antibióticos.

Após a preparação, os meios foram filtrados através do sistema de vácuo da câmara de fluxo laminar vertical, e identificados. O seu armazenamento foi feito a uma temperatura de 4 °C. Para a sua utilização ser possível, os meios foram aquecidos num banho de água a 37 °C.

3. Cultura celular

As células MCF-7 foram mantidas em meio DMEM completo, na incubadora a 37 °C, sob uma atmosfera húmida de 5% e CO_2 . O meio foi trocado, na câmara de fluxo laminar vertical, a cada 2 dias, e assim que foi alcançada uma confluência de 70 a 80%, foram divididas para novos frascos.

4. Tripsinização

A tripsinização foi a técnica utilizada após as células atingirem a confluência, quer para as dividir em novos frascos, quer para as dividir e aplicar em cada poço para o estudo com os compostos a testar.

Este procedimento iniciou-se com a aspiração do meio de cultura existente no frasco. Seguidamente, adicionou-se 10 mL de tripsina (para um frasco de 75 cm^3) a fim da desagregação

das células do frasco. Esta reação foi acompanhada através da visualização ao microscópio e acelerada colocando-se o frasco na incubadora por breves minutos.

Uma vez verificada a desagregação, a tripsina foi neutralizada com 20 mL de meio completo aquecido. Esta preparação foi centrifugada a 1000 rpm, a 25 °C durante 8 minutos.

O sobrenadante resultante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em meio de cultura completo.

5. Contagem de células

Para contar células, após se ter realizado a tripsinização, o *pellet* resultante foi ressuspensionado em 1 mL de meio de cultura completo. Num *ependorf* foram colocados 10 µL da suspensão celular e 10 µL de azul tripano e a solução resultante foi aplicado na câmara de *Neubauer* e contabilizaram-se as células.

6. Preparação dos compostos a testar

6.1. Preparação das soluções de 17β-estradiol

A preparação da solução Mãe de 17β-estradiol consistiu numa dissolução do mesmo em DMSO, perfazendo-se uma solução de concentração de 10 mM (10^{-2} M).

Prepararam-se duas soluções intermédias a partir da solução Mãe, uma de 10^{-3} M e outra de 10^{-5} M a partir de diluições com meio de cultura.

As soluções utilizadas neste trabalho experimental foram obtidas também por diluição em meio de cultura, a partir da solução intermédia de 10^{-5} M, tendo como concentrações 1 nM, 10 nM, 50 nM e 100 nM.

6.2. Preparação das soluções de tamoxifeno

O tamoxifeno vinha em pó, sendo um composto muito higroscópico e sensível à luz.

Para preparar a solução mãe de 2 mM dilui-se 11,3 mg do tamoxifeno em 10 mL de DMSO, tendo-se depois dividido em dez alíquotas de 1 mL.

As soluções utilizadas foram obtidas por diluição em meio de cultura da solução Mãe de 2 mM. As concentrações finais adicionadas foram de 1 µM e 2 µM.

6.3. Preparação das soluções de extrato de soja

O extrato de soja foi obtido através de uma preparação comercial em cápsulas. Cada cápsula continha 175 mg de extrato de soja, dos quais 17,5 mg são isoflavonas, destas 11 mg são agliconas e deste valor, 5,5 mg correspondem ao valor em daidzeína. O teor em genisteína não estava descrito na caracterização das cápsulas utilizadas.

O composto sólido de 175 mg de extrato de soja foi dissolvido em 1 mL de DMSO. Agitou-se no vórtex e filtrou-se a solução com um filtro de 22 µm, obtendo-se a solução inicial com uma concentração de 175 µg/µL.

A partir desta solução inicial, foram obtidas as restantes soluções através de três diluições 1:2 consecutivas em DMSO, ficando as soluções finais com concentrações de 175 µg/µL, 87,5 µg/µL, 43,75 µg/µL e 21,875 µg/µL.

7. Justificação das concentrações testadas

As concentrações utilizadas de 17β-estradiol foram 1 nM, 10 nM, 50 nM e 100 nM. A escolha destas concentrações baseou-se no facto de já terem sido utilizadas em trabalhos anteriores do mesmo grupo de investigação, e por serem também utilizadas por outros investigadores nos seus estudos (Babu et al., 2013).

As concentrações de tamoxifeno utilizadas foram 1 µM e 2 µM. Estas concentrações foram escolhidas tendo em conta o resumo das características do medicamento da Infarmed, referente ao *Nolvadex*, onde refere 300 ng/mL como concentração no estado de equilíbrio que correspondem a aproximadamente 1 µM. A concentração de 2 µM foi escolhida para comparar com a anterior. A escolha também recaiu nas concentrações adicionadas por serem referenciadas nos trabalhos de outros investigadores (Babu et al., 2013, Lymperatou et al., 2013).

As concentrações de extrato de soja adicionadas foram 175 µg/µL, 87,5 µg/µL, 43,75 µg/µL e 21,875 µg/µL. A escolha recaiu no facto de já terem sido utilizadas em trabalhos anteriores do mesmo grupo de investigação, sendo estas concentrações diluições consecutivas de 1 cápsula de extrato de soja comercial.

8. Adição dos compostos para estudar os seus efeitos na viabilidade celular

Para o protocolo básico foram preparadas 12 caixas multipoços, de 24 poços, onde foram mantidas 1×10^4 células/poço em 0,5 mL de meio de cultura/poço. Após 48h o meio de cada poço foi aspirado e foram adicionadas as soluções preparadas de cada composto a testar.

Nas figuras seguintes estão representadas as caixas multipoços a que foram acrescentados os compostos com as respetivas concentrações em triplicado:

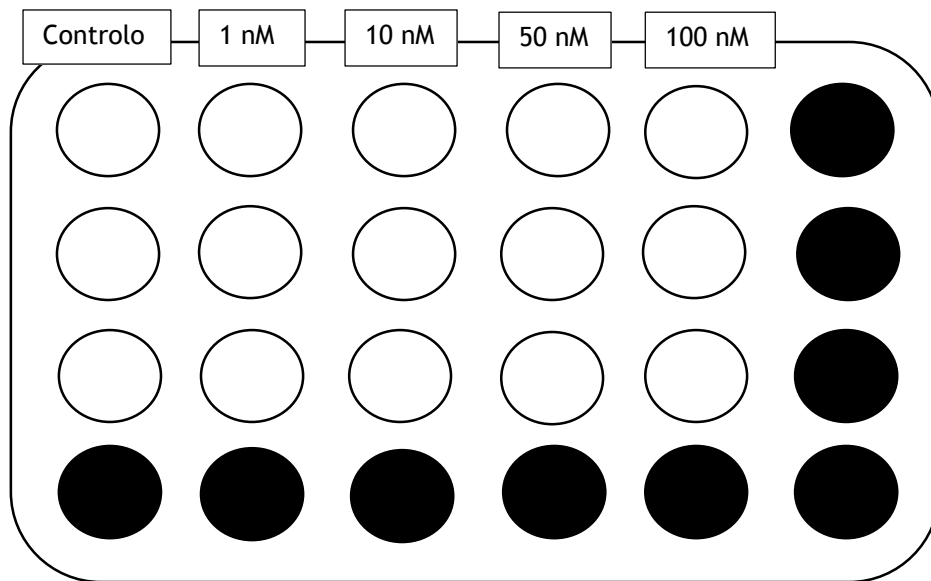


Figura 9 - Esquema da disposição das soluções de diferentes concentrações de 17β-estradiol adicionadas nos diferentes poços. Os poços preenchidos a preto não foram utilizados.

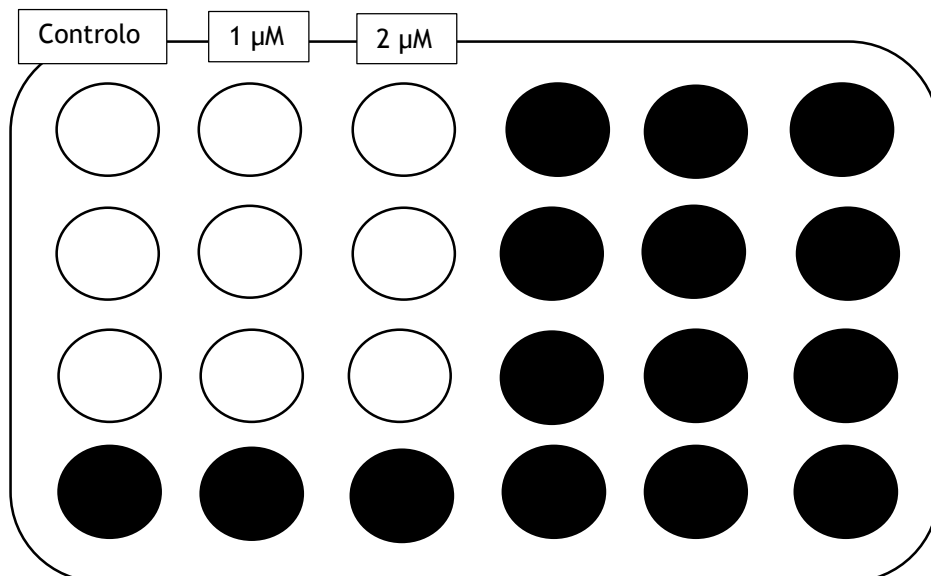


Figura 10 - Esquema da disposição das soluções de diferentes concentrações de tamoxifeno adicionadas nos diferentes poços. Os poços preenchidos a preto não foram utilizados.

O Efeito da Soja e do Tamoxifeno nas células MCF-7

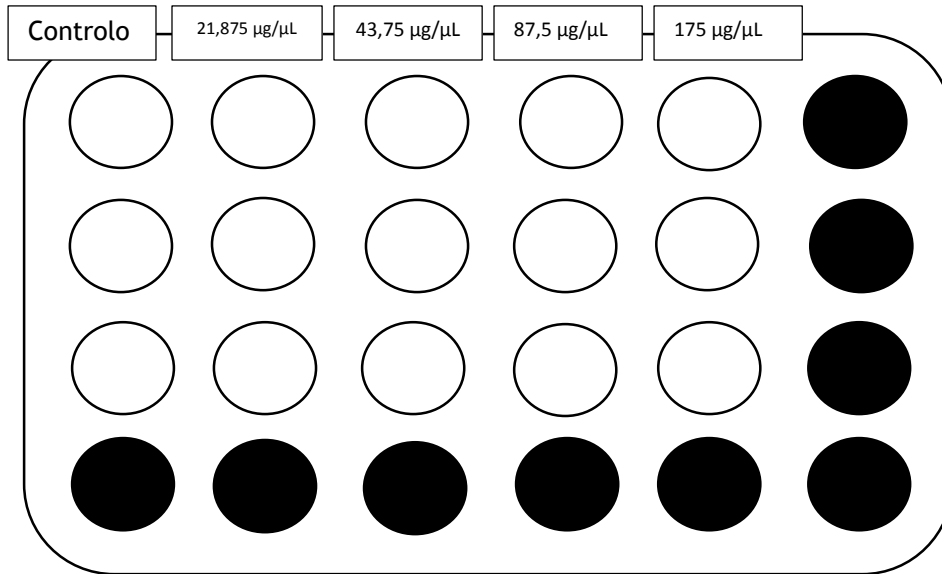


Figura 11 - Esquema da disposição das soluções de diferentes concentrações de extrato de soja adicionadas nos diferentes poços. Os poços preenchidos a preto não foram utilizados.

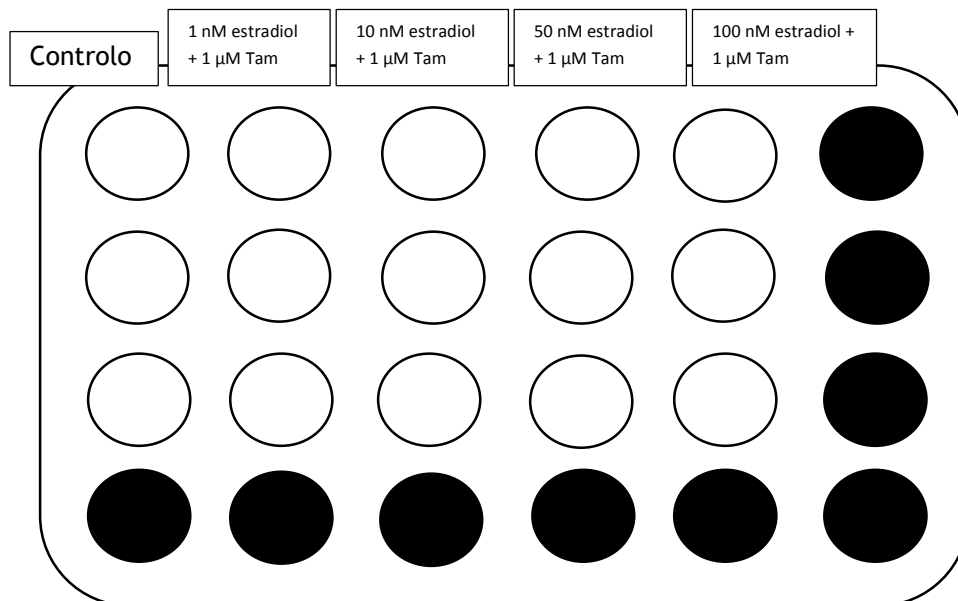


Figura 12 - Esquema da disposição das soluções de diferentes concentrações de 17 β -estradiol + tamoxifeno (Tam) adicionadas nos diferentes poços. Os poços preenchidos a preto não foram utilizados.

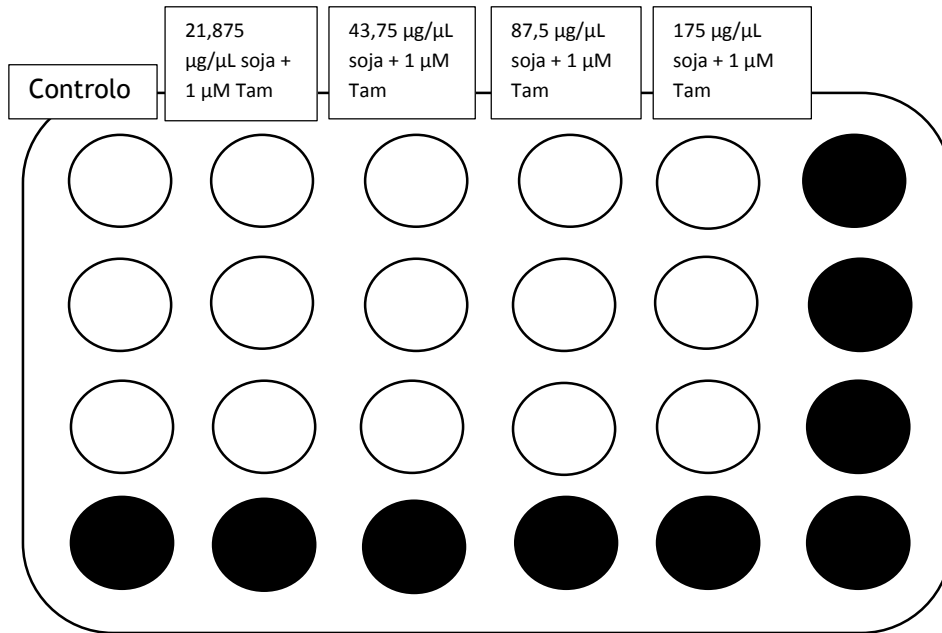


Figura 13 - Esquema da disposição das soluções de diferentes concentrações de soja + tamoxifeno (Tam) adicionadas nos diferentes poços. Os poços preenchidos a preto não foram utilizados.

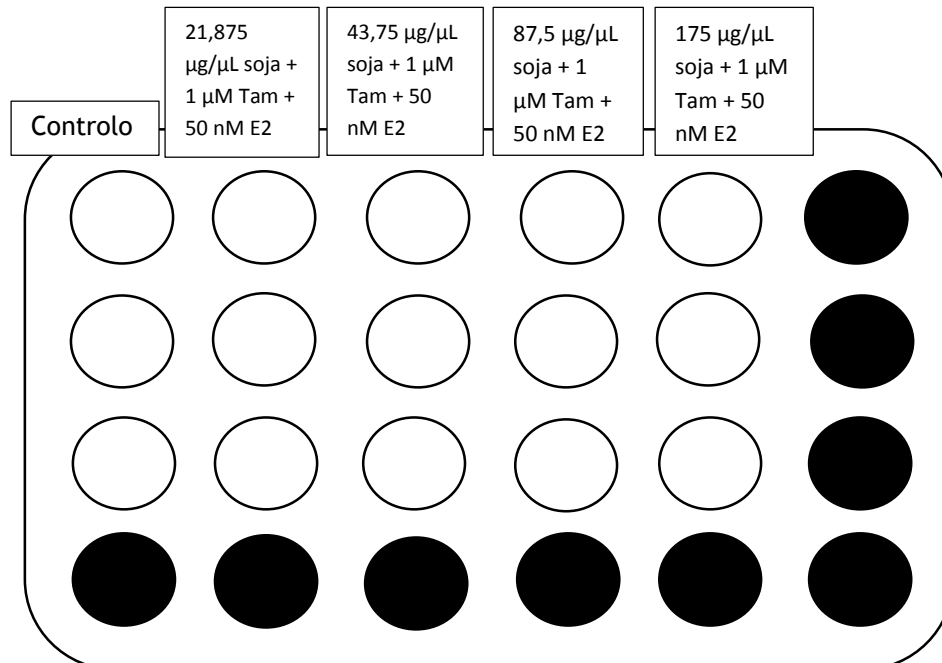


Figura 14 - Esquema da disposição das soluções de diferentes concentrações de 17β-estradiol (E2) + soja + tamoxifeno (Tam) adicionadas nos diferentes poços. Os poços preenchidos a preto não foram utilizados.

Foram feitas duas caixas de cada esquema representado.

Passado 48h uma de cada, ou seja um total de 6 caixas, foram sujeitas ao ensaio de viabilidade celular MTT, onde os valores de absorvência foram determinados a 570 nm. Após a realização do ensaio de MTT, as caixas foram descartadas.

Às restantes 6 caixas, passadas as 48h, foram retirados os compostos e foi adicionado 0,5 mL de meio de cultura em cada poço. Foram, posteriormente submetidas ao mesmo ensaio mas passado 120h da aplicação dos compostos, correspondendo aos valores com recuperação. Esta recuperação serviu então, para perceber qual o efeito dos compostos nas células aquando da sua interrupção, se o possível efeito se mantém ou se pelo contrário aumenta ou diminui. Mais uma vez, as caixas foram descartadas após ter sido realizado o ensaio de MTT.

9. Ensaio de viabilidade celular pelo método do Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT)

O ensaio pelo MTT é um método colorimétrico, utilizado para quantificar a viabilidade e proliferação celular o que nos permite deste modo deduzir a citotoxicidade de compostos *in vitro* (van Meerloo et al., 2011, Stockert et al., 2012).

O princípio deste método baseia-se no facto da maioria das células viáveis terem atividade mitocondrial constante e, assim aquando de um aumento ou uma diminuição do número de células viáveis há uma relação linear com a atividade mitocondrial. O MTT é reduzido pelas desidrogenases intracelulares (NADPH e NADH) existentes fundamentalmente na mitocôndria, a cristais de formazano (de cor azul), que após solubilização absorvem a 570 nm (van Meerloo et al., 2011, Stockert et al., 2012).

Para realizar este ensaio, preparou-se a solução MTT com 0,050 g de MTT em 20 mL de PBS. Seguidamente substituiu-se o meio existente nos poços por 200 µL da solução de MTT. Incubou-se durante 3 horas, num ambiente com 5% CO₂, a 37 °C. Após incubação terminar, o sobrenadante de cada poço foi substituído por 200 µL de DMSO. Após a solubilização dos cristais de formazano formados pelo DMSO, o sobrenadante de cada poço foi transferido para a microplaca de 96 poços que foi lida no leitor espectrofotométrico a 570 nm.

Todos os ensaios foram efetuados em duplicado ou triplicado. Posteriormente foi calculada a média e o desvio padrão das absorvências obtidas.

Os resultados obtidos para os controlos (ou seja a ausência da presença dos compostos em estudo), foi considerada como o valor de 100% de viabilidade celular.

A média das absorvências obtidas no ensaio de MTT dos triplicados dos diferentes compostos foi convertida, em percentagem de viabilidade celular relativamente aos controlos. Assim foi possível comparar a viabilidade celular na presença ou ausência dos compostos testados em relação ao controlo e assim verificar se a viabilidade celular aumentou ou diminuiu.

10. Análise estatística

Como já foi referido, para todas as absorvências obtidas foram calculados os valores da média e desvio padrão. Para a análise dos resultados obtidos foi utilizado o teste *t student*, considerando como significativo quando $p \leq 0.05$. Para tal foi utilizado o *software Microsoft Office Excel 2013*®.

Otimização do protocolo experimental após resultados iniciais

A presença dos compostos em estudo nas células MCF-7 foi analisada às 48 horas de incubação com os compostos e após 72 horas na ausência dos mesmos (fase de recuperação). Após a análise destes resultados iniciais foram escolhidas as condições ideais de trabalho.

1. Aplicação do protocolo básico nas células MCF-7

Para estudar o efeito da presença de 17β -estradiol nas células MCF-7 incubamos as mesmas com diferentes concentrações do composto em causa, 0 nM - controlo, 1 nM, 10 nM, 50 nM e utilizamos 1×10^4 células/poço.

Na figura 15 está representado o gráfico do efeito do 17β -estradiol nas células MCF-7 após incubação de 48 horas e após recuperação.

As células MCF-7 tendem a formar aglomerados quando em solução o que promove muitas vezes erros na sua distribuição pelos poços. Os resultados que obtivemos refletem esse erro pois o primeiro poço preenchido por células ficam com mais células que os restantes. Apesar do meio utilizado conter estrogénios numa concentração superior a 1 nM é sempre inferior a 50 nM. Ao analisar os nossos resultados há uma relação linear entre a viabilidade e concentrações crescentes de estrogénio, apesar de qualquer um dos valores ser inferior ao controlo.

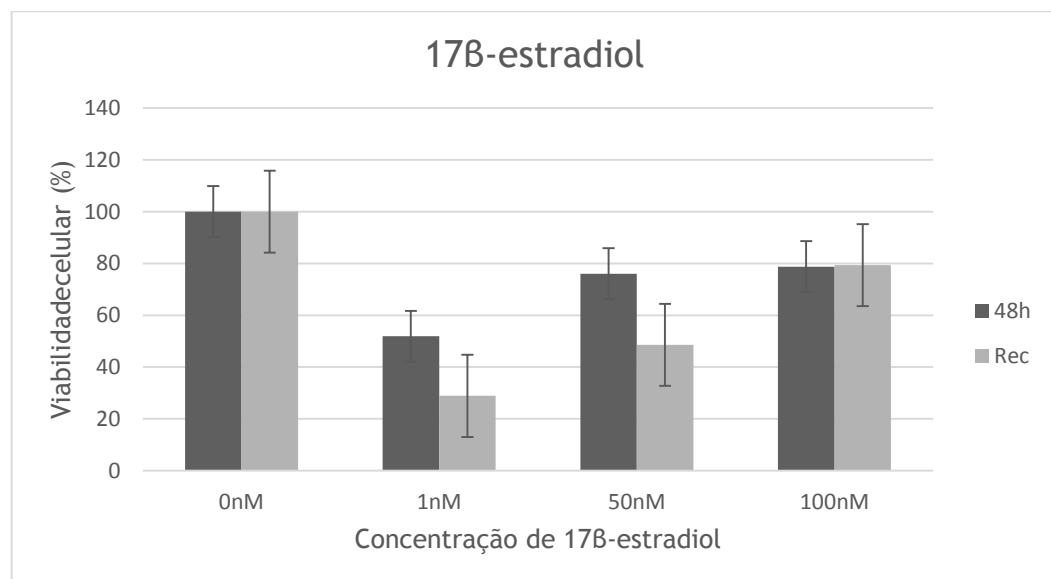


Figura 15 - Efeito do 17β -estradiol nas células MCF-7, sob a forma de viabilidade celular comparativamente com os controlos, após 48h de incubação e após recuperação (Rec).

O Efeito da Soja e do Tamoxifeno nas células MCF-7

Para os resultados obtidos para a recuperação, mantem-se a relação linear entre a viabilidade e a concentração de estrogénio mas inferior aos valores obtidos após 48 horas.

Utilizando o mesmo protocolo básico, estudamos também as diferentes concentrações de tamoxifeno, 1 μM e 2 μM e ainda as diferentes concentrações de extrato de soja.

O resultado obtido para a relação tamoxifeno/número de células no ensaio preliminar com este protocolo foi inconsistente. Os valores obtidos refletiam, mais do que no caso do 17 β -estradiol, a heterogeneidade do número de células inicial.

Para testar o efeito da presença de extrato de soja com este protocolo utilizamos as concentrações de 0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - controlo, 21,875 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 43,75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 83,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 175 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Os efeitos do extrato de soja, expressos em percentagem de viabilidade celular comparada com os controlos, após 48 horas de incubação com o composto e após recuperação estão representados graficamente na figura 17.

Através dos resultados podemos concluir que os efeitos da soja observados não são tão dependentes do número de células quanto o estradiol e o tamoxifeno.

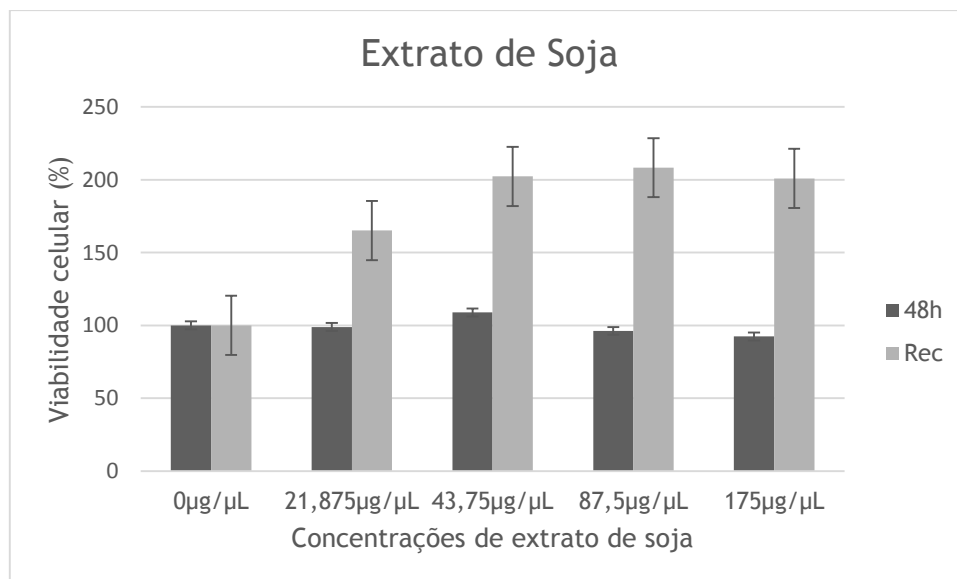


Figura 16 - Efeito do extrato de soja nas células MCF-7, sob a forma de viabilidade celular comparativamente com os controlos, após 48h de incubação e após recuperação (Rec).

Uma vez que um dos nossos objetivos neste trabalho foi estudar a influência da soja na presença de 17 β -estradiol e tamoxifeno, estas condições também foram testadas com o protocolo designado por nós como protocolo básico.

Como era de esperar os valores obtidos foram incongruentes devido à heterogeneidade e ao baixo número de células inicial.

2. Protocolo experimental - Condições definidas

Após a obtenção dos resultados acima citados, foram escolhidas algumas alterações ao protocolo experimental utilizado de forma a obter mais resultados. Desta forma foi escolhida uma nova quantidade de células colocadas em cada poço e foram selecionadas as concentrações dos compostos em estudo a aplicar.

Relativamente ao número de células colocado em cada poço, este passou de 1×10^4 células/poço a 2×10^4 células/poço, mantendo-se a quantidade de meio de cultura DMEM utilizado posteriormente de 0,5 mL/poço. Assim podemos verificar se realmente os efeitos dos compostos estudados variam consoante a quantidade de células presente, obtendo resultados mais coerentes. Tentámos também minimizar a formação de agregados pelas células MCF-7, que nos ensaios anteriores eram, por vezes, visíveis até a olho nu.

No que diz respeito às concentrações utilizadas, foram selecionadas uma concentração de 17β -estradiol e outra de tamoxifeno, mantendo-se a variação de quatro concentrações diferentes de soja, sendo o composto com mais ênfase neste estudo. Para o estradiol, das concentrações anteriormente utilizadas foi escolhida a de 10 nM, uma vez que entre elas é a mais fisiológica. Já para o tamoxifeno, selecionou-se a concentração de 2 μ M uma vez que induziu um efeito muito maior quando aplicado nas células MCF-7 e por uma questão económica.

Resultados e Discussão

1. Estudo da influência do 17 β -estradiol no efeito do tamoxifeno em células MCF-7

Para estudar o efeito do 17 β -estradiol, as células MCF-7 foram sujeitas a uma incubação com 10 nM. Relativamente ao tamoxifeno, as células foram mantidas em contacto com 2 μ M do fármaco. As células MCF-7 foram também submetidas a uma incubação com os dois compostos em simultâneo. O efeito destes compostos foi avaliado através da comparação com o controlo, onde as células foram sujeitas a incubação apenas com meio de cultura.

Nas figuras 1,2 e 3 estão representados os gráficos dos efeitos do 17 β -estradiol, tamoxifeno e 17 β -estradiol + tamoxifeno nas células MCF-7 após incubação de 48 horas e após recuperação. Os efeitos estudados refletem a viabilidade celular comparando com os controlos, ou seja, a ausência de composto, considerado como 100%.

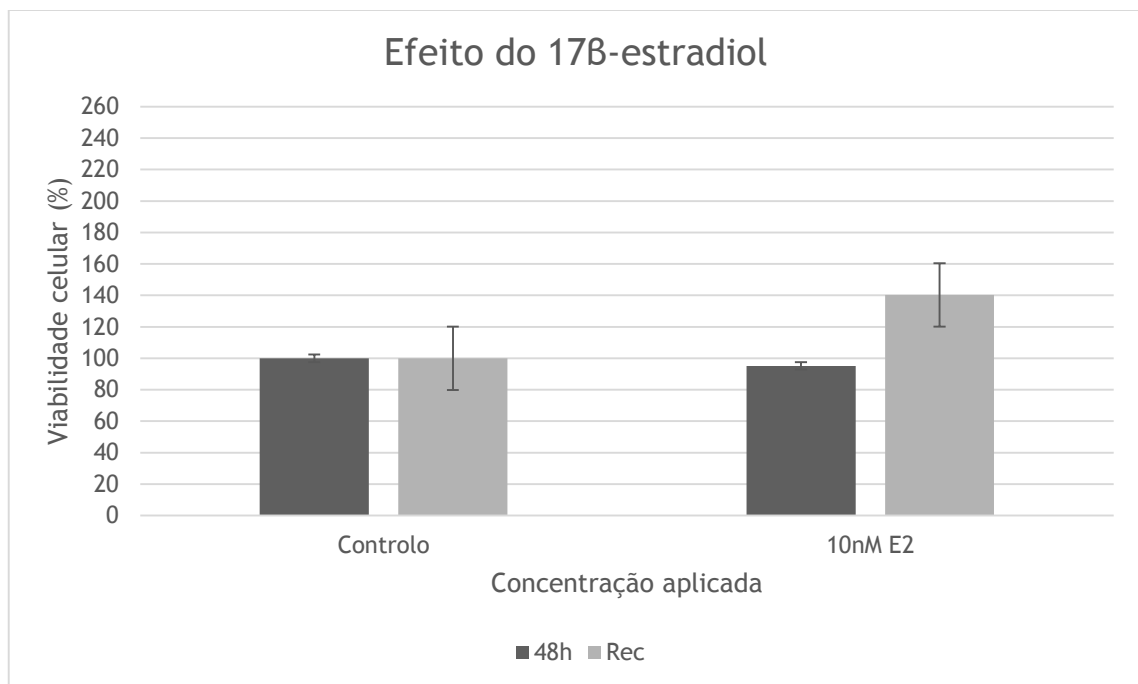


Figura 167 - Efeito do 17 β -estradiol nas células MCF-7, sob a forma de viabilidade celular comparativamente com o controlo, após 48h de incubação e após recuperação (Rec).

Verificou-se uma ligeira diminuição da viabilidade celular quando é adicionado 10 nM de 17 β -estradiol. Já quando este composto foi retirado, a proliferação aumenta bastante, comparando com o controlo. O aumento da viabilidade celular nas células MCF-7 é esperado aquando da

O Efeito da Soja e do Tamoxifeno nas células MCF-7

adição de estradiol, uma vez que respondem a esta hormona através da presença de recetores de estrogénio.

O estradiol regula a expressão da ciclina D1 e CDK4 através das proteínas c-Jun e c-Fos e regula ainda a atividade da proteína AP-1, fazendo com que ocorra um aumento da viabilidade celular (Babu et al., 2013).

Estudos anteriores de outros investigadores, com concentrações semelhantes mostram um aumento da viabilidade das células MCF-7 quando aplicado o estradiol (Babu et al., 2013, Lymperatou et al., 2013). Quando estas células são tratadas com 0,01 μM de E2 verificaram que este composto induziu a viabilidade celular (Lymperatou et al., 2013). Este aumento da viabilidade também foi verificado no trabalho *Babu et al.*, onde as MCF-7 foram tratadas com concentrações de 17 β -estradiol de 1-500 nM, tendo sido verificado um aumento significativo a 50 nM, mantendo-se quase constante a 100 e 500 nM (Babu et al., 2013).

Esta diferença entre os resultados obtidos e os resultados descritos nos trabalhos anteriores pode dever-se ao número de células, uma vez que o número de células colocado em cada poço, bem como a tipologia das caixas multipoços utilizadas foram diferentes. Neste trabalho foram colocadas 2×10^4 células por poço numa caixa de 24 poços, já no trabalho *Babu et al.* foram colocadas 3×10^3 células por poço numa caixa de 96 poços (Babu et al., 2013).

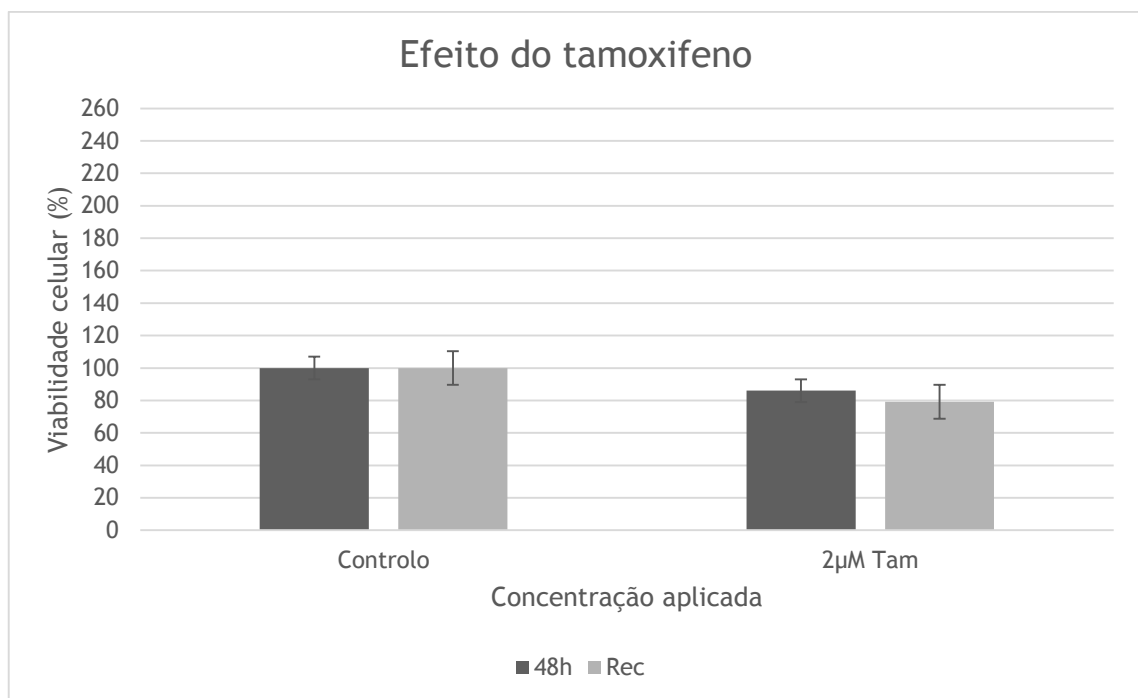


Figura 18 - Efeito do tamoxifeno (Tam) nas células MCF-7, sob a forma de viabilidade celular comparativamente com o controlo, após 48h de incubação e após recuperação (Rec).

Por sua vez, o tamoxifeno provocou uma diminuição da viabilidade das células MCF-7, quer após 48 horas da sua aplicação, quer depois de este ter sido retirado. Tais resultados são coerentes

pois este composto é um fármaco anticancerígeno utilizado para tumores que respondam a hormonas, como é o caso do cancro da mama. Este fármaco é um antagonista do recetor de estrogénio que leva ao efeito antiproliferativo neste tipo de células (Babu et al., 2013). O tamoxifeno pode exercer efeitos genómicos e não genómicos (Lochab et al., 2012). Este facto pode estar na origem de resultados obtidos quer após a sua administração, quer quando é retirado.

A diminuição da viabilidade das células MCF-7 quando é administrado tamoxifeno pode também dever-se ao bloqueio das células na fase G1 do ciclo celular (Lochab et al., 2012, Babu et al., 2013).

Os efeitos mesmo quando o composto é retirado podem ser devidos a uma ação ao nível da expressão, estando referido que o tamoxifeno parece diminuir a expressão de mRNA ao nível das proteínas jun-D e Fra-2 e induzir a da ciclina E1 (Babu et al., 2013). O tamoxifeno parece também inibir a expressão de TGF α e aumentar a de TGF β 1 e TGF β 2 e promover o c-erbB-2, um oncogene ligado a tumores mamários agressivos (Yang et al., 2013). Induz também a apoptose atuando na via de sinalização ERK, induzindo a caspase 3 e inibindo o bcl2 (Lochab et al., 2012).

Os efeitos de antiestrogénio do tamoxifeno foram verificados por outros investigadores através da aplicação de várias concentrações semelhantes às usadas neste trabalho (Babu et al., 2013). Ao aplicar concentrações 0,2-1 μ M de tamoxifeno, *Babu* verificou que a viabilidade celular das MCF-7 diminuía de forma dependente da dose e os valores mais significativos foram obtidos com 0,8 e 1 μ M (Babu et al., 2013). Os nossos resultados estão de acordo com os resultados descritos pelos outros autores, exceto a relação com a dose que não foi por nós efetuada por razões já descritas.

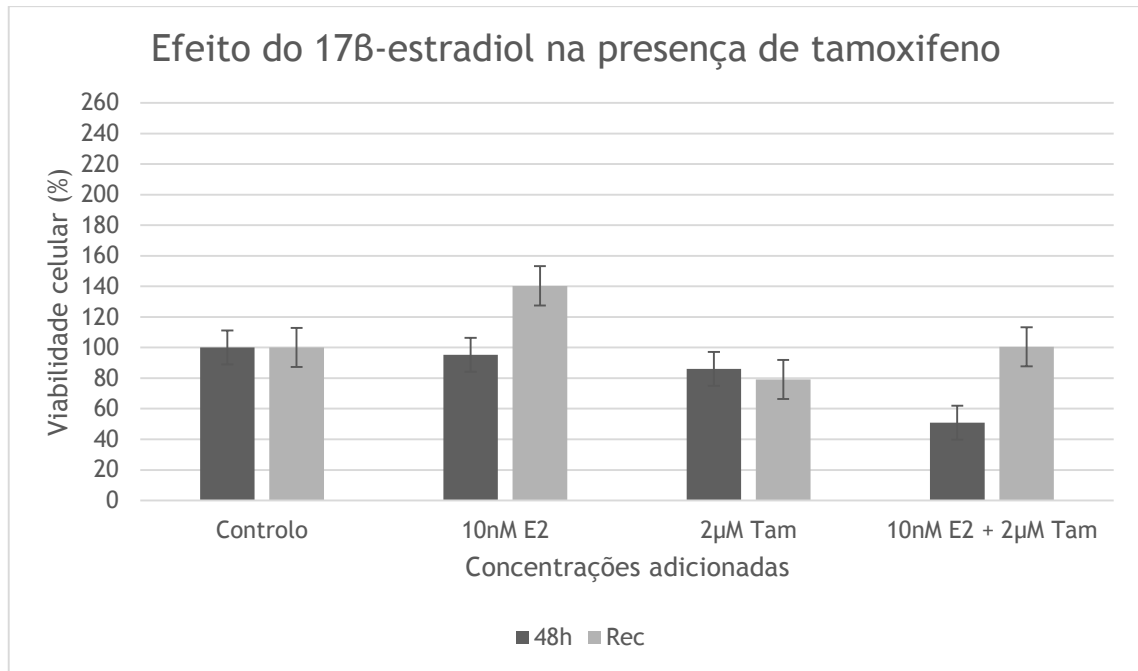


Figura 19 - Efeito do 17 β -estradiol (E2), tamoxifeno (Tam) e 17 β -estradiol+tamoxifeno nas células MCF-7, sob a forma de viabilidade celular comparativamente com o controlo, após 48h de incubação e após recuperação (Rec).

Os resultados obtidos com a adição de 17 β -estradiol e tamoxifeno simultaneamente mostraram uma diminuição da viabilidade após 48 horas de incubação com os compostos. No entanto, quando estes são retirados a viabilidade aumenta. Assim comparando com os valores obtidos com os mesmos compostos mas em separado, podemos afirmar que o 17 β -estradiol influencia o efeito pós tamoxifeno. Estes resultados podem ser devidos também a um aumento da viabilidade exercido pelo estradiol ao nível da expressão, que ainda se faz sentir mesmo quando este é retirado e à interrupção do bloqueio exercido pelo tamoxifeno.

Os resultados obtidos para as 48 horas de incubação estão de acordo com os de estudos anteriores realizados por outros investigadores que demonstram que aplicando estradiol e tamoxifeno ao mesmo tempo, a viabilidade das MCF-7 é inibida comparando com o efeito proliferativo do estradiol (Lympertou et al., 2013). Não podemos comparar os resultados obtidos para a fase que designamos por recuperação porque os outros autores não a realizaram.

2. Estudo da influência do extrato de soja no efeito do tamoxifeno em células MCF-7

O estudo dos efeitos do extrato de soja foi realizado incubando as células MCF-7 com concentrações diferentes, 0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - controlo, 21,875 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 43,75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 83,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 175 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. A incubação com soja e tamoxifeno simultaneamente foi levado a cabo com as mesmas concentrações de soja às quais se adicionou 2 μM de tamoxifeno.

Os resultados obtidos no estudo da citotoxicidade do extrato de soja estão representados na figura 4.

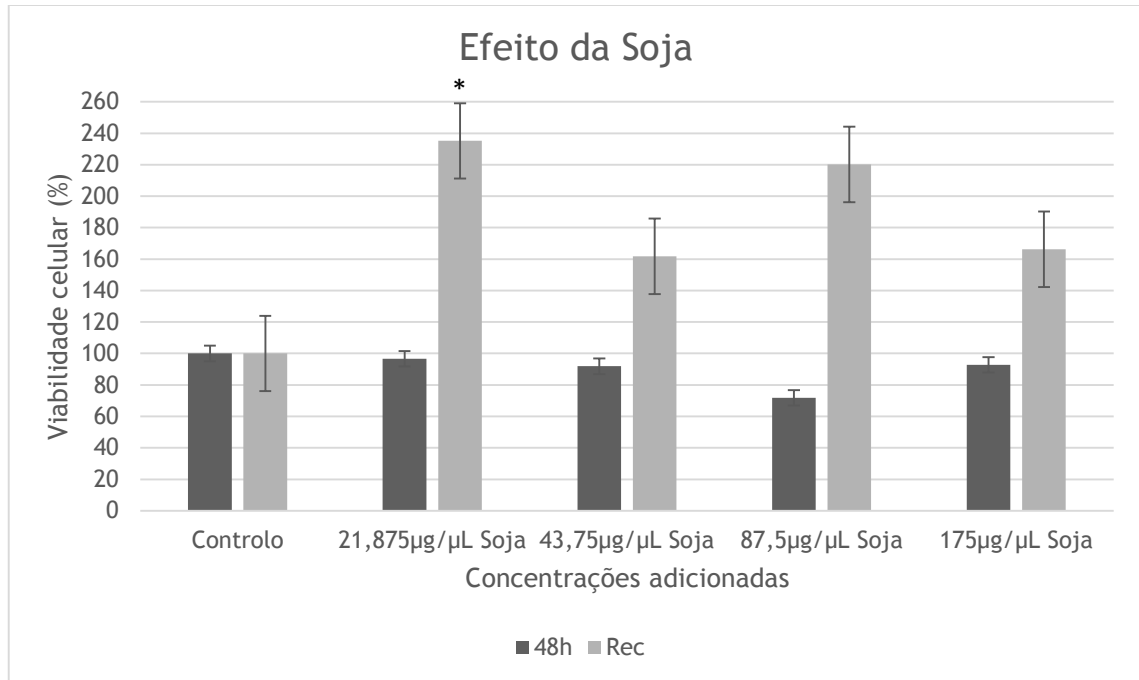


Figura 20 - Efeito das diferentes concentrações de soja nas células MCF-7, sob a forma de viabilidade celular comparativamente com o controlo, após 48h de incubação e após recuperação (Rec) (* = significativo).

Os resultados obtidos após incubação de 48 horas com as diferentes concentrações de soja mostraram uma ligeira diminuição da viabilidade celular para todas as concentrações.

A capacidade de recuperação da viabilidade celular na fase pós soja é muito elevada, apresentando valores estatisticamente significativos na concentração mais baixa de soja, o que poderá pressupor um eventual efeito genómico.

Existem muitos estudos sobre o papel da soja e das isoflavonas no cancro da mama, mas ainda existe muita discrepância entre trabalhos.

Outros investigadores referem um decréscimo da proliferação de MCF-7 quando estas são tratadas com diferentes concentrações de daidzeína, do modo dependente da dose e do tempo (Jin et al., 2010, Choi e Kim, 2008).

Diferentes estudos referem que as isoflavonas de soja exercem o seu efeito devido à sua estrutura semelhante ao 17β-estradiol, logo podem ligar-se ao recetor ER, também efeitos que são independentes deste, como os pré-apoptóticos, a inibição da tirosina cinase, da topoisomerase II e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Banerjee et al., 2008, Park et al., 2009).

As isoflavonas de soja têm uma estrutura semelhante ao 17β-estradiol, logo podem ligar-se ao recetor ER. Para além da atividade mediada pelo recetor, a soja também parece ter efeitos

O Efeito da Soja e do Tamoxifeno nas células MCF-7

que são independentes deste, como os pré-apoptóticos. A genisteína parece inibir a tirosina cinase e o fator nuclear kB (Jia et al., 2013, Pavese et al., 2010).

Apesar de no trabalho *Fritz et al.*, não terem sido demonstrados efeitos estrogénicos por parte da soja, a possibilidade não pode ser descartada (Fritz et al., 2013).

Apesar de haver uma concordância dos diferentes autores em relação ao efeito da presença da soja na viabilidade celular, praticamente não está estudado o efeito da soja pós incubação (fase de recuperação).

Os resultados obtidos para o estudo da influência da soja no efeito do tamoxifeno estão representados na figura 5.

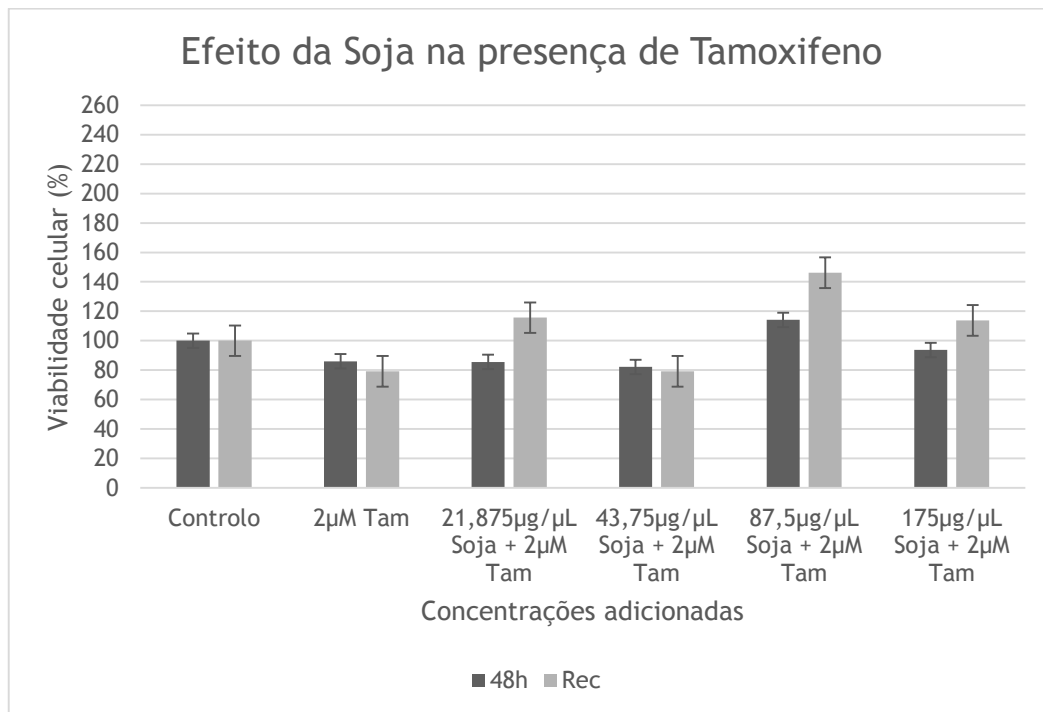


Figura 21 - Efeito das diferentes concentrações de soja+tamoxifeno (Tam) nas células MCF-7, sob a forma de viabilidade celular comparativamente com o controlo, após 48h de incubação e após recuperação (Rec) e efeito de 2 µM de tamoxifeno para comparação.

Pela análise dos resultados podemos concluir que na fase pós incubação, o efeito da soja é menor do que o que se verificou com o 17B-estradiol.

No entanto, num contexto geral a resposta do tamoxifeno não é tão evidente o que nos leva a pensar que a resposta da soja prevalece, tanto na fase de incubação como na de recuperação, independentemente da concentração de soja utilizada.

3. Estudo da viabilidade das células MCF-7 na presença simultânea de extrato soja, 17 β -estradiol e tamoxifeno

Uma vez que fisiologicamente existem estrogénios, procedemos ao estudo dos efeitos obtidos na presença dos três elementos em estudo, soja, 17 β -estradiol e tamoxifeno. Variamos as concentrações de soja e mantivemos fixas as concentrações de 17 β -estradiol (10 nM) e de tamoxifeno (2 μ M).

Os resultados obtidos para este estudo estão representados na figura 6.

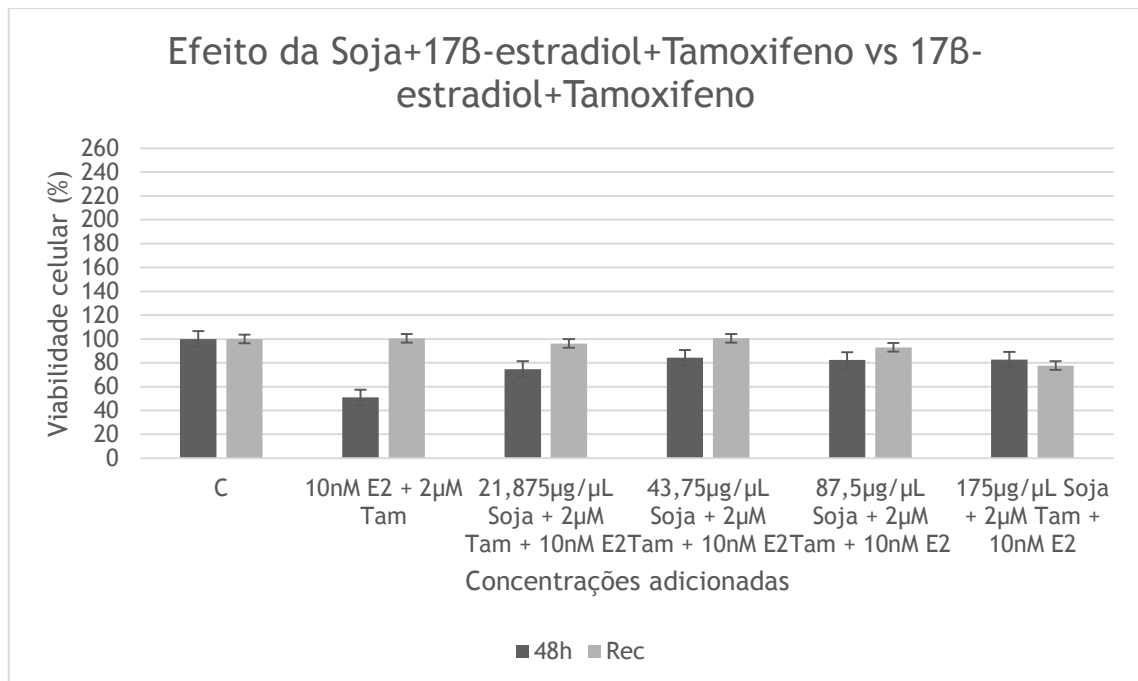


Figura 22 - Efeito das diferentes concentrações de soja+17 β -estradiol (E2)+tamoxifeno (Tam) nas células MCF-7, sob a forma de viabilidade celular comparativamente com o controlo, após 48h de incubação e após recuperação (Rec) e efeito de 10 nM E2+2 μ M Tam para comparação.

Apesar de haver uma ligeira diminuição da viabilidade celular para todas as concentrações de soja às 48 horas, a diminuição mais significativa observou-se na ausência da soja. Os resultados pós incubação são idênticos ao valor do controlo.

Estes resultados podem estar associados a uma competição pelo recetor por parte dos compostos uma vez que todos são compostos estrogénicos e se podem ligar a este tipo de recetor ER (Fritz et al., 2013, Lymperatou et al., 2013).

Assim, mais uma vez é de ressaltar o consumo de produtos à base de soja e a sua administração em casos de cancro da mama sem ter em conta os níveis de estradiol presentes no organismo e a concentração de tamoxifeno administrada.

Conclusões

Com este estudo pode-se concluir que nos casos da administração do tamoxifeno como anticancerígeno deverá ser tida em conta a concentração de estradiol presente, e assim cada caso deverá ser visto de forma independente, uma vez que para concentrações diferentes de estrogénio os efeitos na sua administração concomitante com o tamoxifeno são diferentes.

Os efeitos posteriores do extrato de soja observados devem ser considerados relevantes quando se institui uma terapêutica com tamoxifeno.

O estudo dos efeitos pós incubação dos compostos estrogénicos na viabilidade celular devem ser considerados obrigatórios para se poder tirar ilações sobre o prognóstico da terapêutica.

Bibliografia

- Aranda, A. & Pascual, A. 2001. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev*, 81, 1269-1304.
- Baber, R. 2010. Phytoestrogens and post reproductive health. *Maturitas*, 66, 344-349.
- Babu, R. L., Naveen Kumar, M., Patil, R. H., Devaraju, K. S., Ramesh, G. T. & Sharma, S. C. 2013. Effect of estrogen and tamoxifen on the expression pattern of AP-1 factors in MCF-7 cells: role of c-Jun, c-Fos, and Fra-1 in cell cycle regulation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 380, 143-151.
- Banerjee, S., Li, Y., Wang, Z. & Sarkar, F. H. 2008. Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer Lett*, 269, 226-242.
- Barnes, J. 2003a. Pharmacovigilance of herbal medicines : a UK perspective. *Drug Saf*, 26, 829-851.
- Barnes, J. 2003b. Quality, efficacy and safety of complementary medicines: fashions, facts and the future. Part II: Efficacy and safety. *Br J Clin Pharmacol*, 55, 331-340.
- Bedell, S., Nachtigall, M. & Naftolin, F. 2014. The pros and cons of plant estrogens for menopause. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 139, 225-236.
- Bodmer, A. & Castiglione-Gertsch, M. 2011. Role of hormonal manipulations in patients with hormone-sensitive metastatic breast cancer. *European Journal of Cancer*, 47 Suppl 3, S28-37.
- Brauch, H. & Jordan, V. C. 2009. Targeting of tamoxifen to enhance antitumour action for the treatment and prevention of breast cancer: the 'personalised' approach? *European Journal of Cancer*, 45, 2274-2283.
- Bryant, H. U. 2002. Selective estrogen receptor modulators. *Rev Endocr Metab Disord*, 3, 231-241.
- Cederroth, C. R. & Nef, S. 2009. Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. *Mol Cell Endocrinol*, 304, 30-42.
- Cederroth, C. R., Zimmermann, C. & Nef, S. 2012. Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive health. *Mol Cell Endocrinol*, 355, 192-200.
- Chandrasena, R. E., Edirisinghe, P. D., Bolton, J. L. & Thatcher, G. R. 2008. Problematic detoxification of estrogen quinones by NAD(P)H-dependent quinone oxidoreductase and glutathione-S-transferase. *Chem Res Toxicol*, 21, 1324-1329.
- Chang, T. S. 2014. Isolation, bioactivity, and production of ortho-hydroxydaidzein and ortho-hydroxygenistein. *Int J Mol Sci*, 15, 5699-5716.
- Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Monville, F., Finetti, P., Adelaide, J., Cervera, N., Fekairi, S., et al. 2006. Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers. *Oncogene*, 25, 2273-2284.

- Chen, W. F., Huang, M. H., Tzang, C. H., Yang, M. & Wong, M. S. 2003. Inhibitory actions of genistein in human breast cancer (MCF-7) cells. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1638, 187-196.
- Choi, E. J. & Kim, G. H. 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, 683-690.
- Cui, J., Shen, Y. & Li, R. 2013. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends Mol Med*, 19, 197-209.
- Ernst, E. 2005. The efficacy of herbal medicine--an overview. *Fundam Clin Pharmacol*, 19, 405-409.
- Fitzpatrick, L. A. 2003. Soy isoflavones: hope or hype? *Maturitas*, 44 Suppl 1, S21-29.
- Fritz, H., Seely, D., Flower, G., Skidmore, B., Fernandes, R., Vadeboncoeur, S., Kennedy, D., et al. 2013. Soy, red clover, and isoflavones and breast cancer: a systematic review. *Plos One*, 8, e81968.
- Garcia, M. C., Torre, M., Marina, M. L. & Laborda, F. 1997. Composition and characterization of soyabean and related products. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 37, 361-391.
- Gardner, D. G. & Shoback, D. 2011. *Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology*, The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Goetz, M. P., Rae, J. M., Suman, V. J., Safgren, S. L., Ames, M. M., Visscher, D. W., Reynolds, C., et al. 2005. Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes. *J Clin Oncol*, 23, 9312-9318.
- Grilli, S. 2006. Tamoxifen (TAM): the dispute goes on. *Ann Ist Super Sanita*, 42, 170-173.
- Gruber, C. J., Tschugguel, W., Schneeberger, C. & Huber, J. C. 2002. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med*, 346, 340-352.
- Guerrero-Bosagna, C. M. & Skinner, M. K. 2014. Environmental epigenetics and phytoestrogen/phytochemical exposures. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 139, 270-276.
- Guo, J. M., Xiao, B. X., Dai, D. J., Liu, Q. & Ma, H. H. 2004. Effects of daidzein on estrogen-receptor-positive and negative pancreatic cancer cells in vitro. *World J Gastroenterol*, 10, 860-863.
- He, F.-J. & Chen, J.-Q. 2013. Consumption of soybean, soy foods, soy isoflavones and breast cancer incidence: Differences between Chinese women and women in Western countries and possible mechanisms. *Food Science and Human Wellness*, 2, 146-161.
- Hewitt, A. L. & Singletary, K. W. 2003. Soy extract inhibits mammary adenocarcinoma growth in a syngeneic mouse model. *Cancer Lett*, 192, 133-143.
- Huan, J., Wang, L., Xing, L., Qin, X., Feng, L., Pan, X. & Zhu, L. 2014. Insights into significant pathways and gene interaction networks underlying breast cancer cell line MCF-7 treated with 17beta-estradiol (E2). *Gene*, 533, 346-355.
- Imhof, M., Molzer, S. & Imhof, M. 2008. Effects of soy isoflavones on 17beta-estradiol-induced proliferation of MCF-7 breast cancer cells. *Toxicol In Vitro*, 22, 1452-1460.

- Jacobsen, B. K., Jaceldo-Siegl, K., Knutsen, S. F., Fan, J., Oda, K. & Fraser, G. E. 2014. Soy isoflavone intake and the likelihood of ever becoming a mother: the Adventist Health Study-2. *Int J Womens Health*, 6, 377-384.
- Jia, Z., Babu, P. V., Si, H., Nallasamy, P., Zhu, H., Zhen, W., Misra, H. P., et al. 2013. Genistein inhibits TNF-alpha-induced endothelial inflammation through the protein kinase pathway A and improves vascular inflammation in C57BL/6 mice. *International Journal of Cardiology*, 168, 2637-2645.
- Jian, L. 2009. Soy, isoflavones, and prostate cancer. *Mol Nutr Food Res*, 53, 217-226.
- Jin, S., Zhang, Q. Y., Kang, X. M., Wang, J. X. & Zhao, W. H. 2010. Daidzein induces MCF-7 breast cancer cell apoptosis via the mitochondrial pathway. *Ann Oncol*, 21, 263-268.
- Jin, Y., Desta, Z., Stearns, V., Ward, B., Ho, H., Lee, K. H., Skaar, T., et al. 2005. CYP2D6 genotype, antidepressant use, and tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment. *J Natl Cancer Inst*, 97, 30-39.
- Jordan, V. C. 2006. Tamoxifen (ICI46,474) as a targeted therapy to treat and prevent breast cancer. *Br J Pharmacol*, 147 Suppl 1, S269-276.
- Ju, Y. H., Fultz, J., Allred, K. F., Doerge, D. R. & Helferich, W. G. 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, 856-863.
- Kim, H. A., Jeong, K. S. & Kim, Y. K. 2008. Soy extract is more potent than genistein on tumor growth inhibition. *Anticancer Res*, 28, 2837-2841.
- Klein, C. B. & King, A. A. 2007. Genistein genotoxicity: critical considerations of in vitro exposure dose. *Toxicol Appl Pharmacol*, 224, 1-11.
- Kumar, S., Lata, K., Mukhopadhyay, S. & Mukherjee, T. K. 2010. Role of estrogen receptors in pro-oxidative and anti-oxidative actions of estrogens: a perspective. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1800, 1127-1135.
- Levenson, A. S. & Jordan, V. C. 1997. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Res*, 57, 3071-3078.
- Lochab, S., Pal, P., Kanaujiya, J. K., Tripathi, S. B., Kapoor, I., Bhatt, M. L., Sanyal, S., et al. 2012. Proteomic identification of E6AP as a molecular target of tamoxifen in MCF7 cells. *Proteomics*, 12, 1363-1377.
- Locker, G. Y. 1998. Hormonal therapy of breast cancer. *Cancer Treat Rev*, 24, 221-240.
- Lymperatou, D., Giannopoulou, E., Koutras, A. K. & Kalofonos, H. P. 2013. The exposure of breast cancer cells to fulvestrant and tamoxifen modulates cell migration differently. *Biomed Res Int*, 2013, 147514.
- Mahoney, M. C., Bevers, T., Linos, E. & Willett, W. C. 2008. Opportunities and strategies for breast cancer prevention through risk reduction. *CA Cancer J Clin*, 58, 347-371.
- Mai, Z., Blackburn, G. L. & Zhou, J. R. 2007. Soy phytochemicals synergistically enhance the preventive effect of tamoxifen on the growth of estrogen-dependent human breast carcinoma in mice. *Carcinogenesis*, 28, 1217-1223.

- Mateos-Aparicio, I., Redondo Cuenca, A., Villanueva-Suarez, M. J. & Zapata-Revilla, M. A. 2008. Soybean, a promising health source. *Nutr Hosp*, 23, 305-312.
- May, F. E. 2014. Novel drugs that target the estrogen-related receptor alpha: their therapeutic potential in breast cancer. *Cancer Manag Res*, 6, 225-252.
- Menniti-Ippolito, F., Mazzanti, G., Santuccio, C., Moro, P. A., Calapai, G., Firenzuoli, F., Valeri, A., et al. 2008. Surveillance of suspected adverse reactions to natural health products in Italy. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 17, 626-635.
- Meyer, M. R., Haas, E., Prossnitz, E. R. & Barton, M. 2009. Non-genomic regulation of vascular cell function and growth by estrogen. *Mol Cell Endocrinol*, 308, 9-16.
- Mitrunen, K. & Hirvonen, A. 2003. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. *Mutat Res*, 544, 9-41.
- Mizukami, Y. 2010. In vivo functions of GPR30/GPER-1, a membrane receptor for estrogen: from discovery to functions in vivo. *Endocr J*, 57, 101-107.
- Mourouti, N. & Panagiotakos, D. B. 2013. Soy food consumption and breast cancer. *Maturitas*, 76, 118-122.
- Nishinari, K., Fang, Y., Guo, S. & Phillips, G. O. 2014. Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. *Food Hydrocolloids*, 39, 301-318.
- Oh, Y. & Chung, K. C. 2013. Zinc finger protein 131 inhibits estrogen signaling by suppressing estrogen receptor alpha homo-dimerization. *Biochem Biophys Res Commun*, 430, 400-405.
- Osborne, C. K. & Schiff, R. 2005. Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *J Clin Oncol*, 23, 1616-1622.
- Palmieri, C., Patten, D. K., Januszewski, A., Zucchini, G. & Howell, S. J. 2014. Breast cancer: current and future endocrine therapies. *Mol Cell Endocrinol*, 382, 695-723.
- Park, K., Choi, K., Kim, H., Kim, K., Lee, M. H., Lee, J. H. & Kim Rim, J. C. 2009. Isoflavone-deprived soy peptide suppresses mammary tumorigenesis by inducing apoptosis. *Exp Mol Med*, 41, 371-381.
- Park, W. C. & Jordan, V. C. 2002. Selective estrogen receptor modulators (SERMS) and their roles in breast cancer prevention. *Trends Mol Med*, 8, 82-88.
- Patani, N. & Martin, L. A. 2014. Understanding response and resistance to oestrogen deprivation in ER-positive breast cancer. *Mol Cell Endocrinol*, 382, 683-694.
- Patisaul, H. B. & Jefferson, W. 2010. The pros and cons of phytoestrogens. *Front Neuroendocrinol*, 31, 400-419.
- Pavese, J. M., Farmer, R. L. & Bergan, R. C. 2010. Inhibition of cancer cell invasion and metastasis by genistein. *Cancer Metastasis Rev*, 29, 465-482.
- Prossnitz, E. R., Oprea, T. I., Sklar, L. A. & Arterburn, J. B. 2008. The ins and outs of GPR30: a transmembrane estrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 109, 350-353.

- Pugi, A., Gallo, E., Vannacci, A., Lapi, F. & Firenzuoli, F. 2011. Herbal remedies in hospital setting: an Italian explorative survey among physicians and patients on knowledge and use. *Intern Emerg Med*, 6, 575-576.
- Ramalhinho, A. C., Marques, J., Fonseca-Moutinho, J. A. & Breitenfeld, L. 2013. Genetic polymorphisms of estrogen receptor alpha -397 PvuII (T>C) and -351 XbaI (A>G) in a portuguese population: prevalence and relation with breast cancer susceptibility. *Mol Biol Rep*, 40, 5093-5103.
- Rettberg, J. R., Yao, J. & Brinton, R. D. 2014. Estrogen: a master regulator of bioenergetic systems in the brain and body. *Front Neuroendocrinol*, 35, 8-30.
- Schilling, T., Ebert, R., Raaijmakers, N., Schutze, N. & Jakob, F. 2014. Effects of phytoestrogens and other plant-derived compounds on mesenchymal stem cells, bone maintenance and regeneration. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 139, 252-261.
- Shao, W. & Brown, M. 2004. Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy. *Breast Cancer Res*, 6, 39-52.
- Silva, E., Kabil, A. & Kortenkamp, A. 2010. Cross-talk between non-genomic and genomic signalling pathways--distinct effect profiles of environmental estrogens. *Toxicol Appl Pharmacol*, 245, 160-170.
- Stockert, J. C., Blazquez-Castro, A., Canete, M., Horobin, R. W. & Villanueva, A. 2012. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem*, 114, 785-796.
- Swann, R., Perkins, K. A., Velentzis, L. S., Ciria, C., Dutton, S. J., Mulligan, A. A., Woodside, J. V., et al. 2013. The DietCompLyf study: a prospective cohort study of breast cancer survival and phytoestrogen consumption. *Maturitas*, 75, 232-240.
- Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E. J. & Dong, J. 2005. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*, 146, 624-632.
- Van Duursen, M. B., Nijmeijer, S. M., De Morree, E. S., De Jong, P. C. & Van Den Berg, M. 2011. Genistein induces breast cancer-associated aromatase and stimulates estrogen-dependent tumor cell growth in in vitro breast cancer model. *Toxicology*, 289, 67-73.
- Van Duursen, M. B., Smeets, E. E., Rijk, J. C., Nijmeijer, S. M. & Van Den Berg, M. 2013. Phytoestrogens in menopausal supplements induce ER-dependent cell proliferation and overcome breast cancer treatment in an in vitro breast cancer model. *Toxicol Appl Pharmacol*, 269, 132-140.
- Van Meerloo, J., Kaspers, G. J. & Cloos, J. 2011. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol*, 731, 237-245.
- Virk-Baker, M. K., Nagy, T. R. & Barnes, S. 2010. Role of phytoestrogens in cancer therapy. *Planta Med*, 76, 1132-1142.
- Widmaier, E., Raff, H. & Strang, K. 2013. *Vander's Human Physiology: The Mechanisms of Body Function*, McGraw-Hill Science/Engineering/Math.

- Yang, G., Nowsheen, S., Aziz, K. & Georgakilas, A. G. 2013. Toxicity and adverse effects of Tamoxifen and other anti-estrogen drugs. *Pharmacol Ther*, 139, 392-404.
- Yin, G., Xu, H., Liu, J., Gao, C., Sun, J., Yan, Y. & Hu, Y. 2014. Screening and identification of soybean seed-specific genes by using integrated bioinformatics of digital differential display, microarray, and RNA-seq data. *Gene*, 546, 177-186.
- Zhao, E. & Mu, Q. 2011. Phytoestrogen biological actions on Mammalian reproductive system and cancer growth. *Sci Pharm*, 79, 1-20.
- Zhou, S., Koh, H. L., Gao, Y., Gong, Z. Y. & Lee, E. J. 2004. Herbal bioactivation: the good, the bad and the ugly. *Life Sci*, 74, 935-968.
- Zilli, M., Grassadonia, A., Tinari, N., Di Giacobbe, A., Gildetti, S., Giampietro, J., Natoli, C., et al. 2009. Molecular mechanisms of endocrine resistance and their implication in the therapy of breast cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1795, 62-81.