

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO**



**Patrícia Severo Ramos**

**EFEITOS DA QUERCETINA E CRISINA E SUA ASSOCIAÇÃO SOBRE A  
VIABILIDADE E PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR EM LINHAGENS  
TUMORAIS DE MAMA MCF-7 E MDA-MB-231**

**Orientadora: Eliane Fialho de Oliveira**

**Rio de Janeiro**

**Abril de 2017**

**Patrícia Severo Ramos**

**Efeitos da quercetina e crisina e sua associação sobre a viabilidade e progressão do ciclo celular em linhagens tumorais de mama MCF-7 e MDA-MB-231.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição, do Instituto de Nutrição Josué de Castro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

**Orientadora:**

Eliane Fialho de Oliveira

Rio de Janeiro  
Abril de 2017

## **Patrícia Severo Ramos**

**Efeitos da quercetina e crisina e sua associação sobre a viabilidade e progressão do ciclo celular em linhagens tumorais de mama MCF-7 e MDA-MB-231.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição, do Instituto de Nutrição Josué de Castro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana

### **Banca examinadora:**

---

Dr. Christian Ferreira (membro titular interno)

Pós-Doutorando do Programa de Oncobiologia/UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Danielly Cristiny Ferraz da Costa (membro titular externo)

Professora Adjunta do Departamento de Nutrição Básica e Experimental/INU/UERJ

---

Prof. Felipe Leite de Oliveira (membro titular interno)

Professor Adjunto do Departamento de Histologia e Embriologia/ICB/UFRJ

---

Prof. Dr. Julio Beltrame Daleprane (membro suplente externo)

Professor Adjunto do Departamento de Nutrição Básica Experimental e do Programa de Pós Graduação em Alimentos, Nutrição e Saúde/PPG-ANS/UERJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiana El-Bacha Porto (membro suplente interno)

Professora Adjunta do Departamento de Nutrição e Dietética/INJC/UFRJ

## **Ficha Catalográfica**

Severo-Ramos, Patrícia

**Efeitos da quercetina e crisina e sua associação sobre a viabilidade e progressão do ciclo celular em linhagens tumorais de mama MCF-7 e MDA-MB-231/** Patrícia Severo Ramos. - Rio de Janeiro: UFRJ/Instituto de Nutrição Josué de Castro, 2017.

104 f.: il.

Orientador: Eliane Fialho de Oliveira

Dissertação (Mestrado) - UFRJ / Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2017.

Referências: f. 49 - 64.

1. Câncer de mama 2. quercetina 3. crisina 4. apoptose 5. associação

Dissertação I. Fialho de Oliveira, Eliane. II Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição III. Título

**Este trabalho foi realizado no Laboratório de Alimentos Funcionais do departamento de Nutrição Básica e Experimental, INJC/UFRJ, sob a orientação da professora Eliane Fialho de Oliveira na vigência de auxílios concedidos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).**

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer neste momento, em primeiro lugar, à Deus, por ter me dado forças para seguir adiante e sempre colocar pessoas maravilhosas no meu caminho, pessoas estas que não só iluminaram minha mente, mas também o meu coração, fazendo com que esta caminhada, apesar de cansativa, fosse extremamente prazerosa.

Gostaria de agradecer à minha orientadora Profª Eliane Fialho por se mostrar disponível não só para as questões referentes à vida acadêmica, mas sempre estando ao meu lado quando precisei de apoio emocional.

À família LABAFs, por estarem ao meu lado há 6 anos e me mostrarem que, apesar de árdua, a vida acadêmica pode ser muito divertida e que a amizade é o principal combustível para seguirmos sempre em frente.

Gostaria de agradecer especialmente às minhas queridíssimas Juliette e Luluzete e aos maravilhosos Chris e Luan, por estarem ao meu lado em todos os problemas que enfrentei e me deixaram paralisada de medo, desde protocolos extremamente cansativos até citômetros que simplesmente não gostavam da gente. Também à Iris, por todos os brigadeiros que já evitaram que eu tivesse uma crise nervosa.

Ao Cassio Larotonda Maia e Vanessa Mota, por suportarem os últimos dois anos falando apenas de experimentos e cansaço sem nunca reclamarem, pelo contrário, dividindo comigo suas lamúrias e me ajudando a suportar tudo.

À Lissa Bantim Frambach, uma grande amiga que a UFRJ me presenteou e que esteve comigo em todos os momentos desde 2009, inclusive passando no mestrado junto comigo e dividindo o desespero em tempo real.

À Thaisa Santos Marques, por, apesar das divergências em nossas agendas nos últimos anos, nunca ter deixado de estar presente na minha vida e me dar todo o amor que uma pessoa pode oferecer.

Ao João Paulo A. Fernandes, Renan Alonso, Leonardo Mogli, Rafael Ludiosa, Erick Wilson e Priscila Araújo, por entenderem minha ausência e sempre se mostrarem disponíveis, seja para uma conversa, para um sequestro relâmpago para dançar ou para um jogo de videogame num horário completamente desfavorável, simplesmente por eu estar muito estressada.

Aos amigos d'A Série, por mudar todos os compromissos nos últimos 2 anos para que a data e horário fossem condizentes com meus poucos horários livres.

Às minhas amigas Flávia Lopes e Camila Rodrigues, por terem feito com que fazer uma pós-graduação concomitante com o mestrado não se tornasse um fardo.

Ao Héttori Baptista Tosi, por suportar todas, repito, TODAS as minhas TPMs sempre de bom humor e nunca transformando meu estresse num grande problema, pelo contrário, sempre me fazendo rir, mesmo estando com raiva.

À Kat e Vanessa Pires, por estimularem minha esperança de que tudo daria certo, nem que seja através de clássicos Disney.

Ao Erick Lorenzato, Marília, Juliana Paulini, Debora, Suzanne e Gabi, amigos que fiz no grupo de caronas da UFRJ e que me divertiram nos meses que enfrentei engarrafamento tanto para ir quanto para voltar.

Aos demais amigos, por estarem presentes em maior ou menor grau e sempre se mostrarem dispostos a estender uma mão amiga.

À minha madrinha Elizabete, meus tios Márcia e Robinho e minha prima Rosane, por me darem apoio em tudo que faço na vida e sempre estarem na torcida para que tudo dê certo.

À Minerva, Vênus, Junior, Batman por tornar minha vida um lugar cheio de amor incondicional e, principalmente, ao Mentirinha por me fazer companhia sempre e ser a luz dos meus olhos.

E por último, mas sem sombra de dúvidas o mais importante, aos meus pais Edson e Jaqueline, aos meus irmãos Pedro e Fernanda e minhas sobrinhas Márcia e Maria Eduarda por todo o apoio, amor, cuidado, paciência, estímulo e carinho infinitos não só nos últimos 2 anos, mas por toda a minha vida.

Amo todos vocês.

## Resumo

O câncer de mama é o segundo tipo que mais acomete as mulheres em todo o mundo, com estimativa de 57.960 casos incidentes para o biênio 2016/2017. Os flavonoides quercetina, encontrada em maçãs e cebolas, e crisina, encontrada no mel e própolis, apresentam ação anticancerígena, entretanto, seus mecanismos de ação não estão completamente elucidados. O objetivo deste estudo foi investigar a ação desses flavonoides, isoladamente e em associação, em culturas de células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 e da linhagem não tumoral MCF-10A. A viabilidade celular foi realizada pelo método de redução do MTT. Observou-se que, de acordo com os valores de IC<sub>50</sub>, a crisina foi o flavonoide mais citotóxico para todas as linhagens (MCF-7 = 232.5 µM, MDA-MB-231 = 170.0 µM), sendo a linhagem não tumoral a mais sensível ao tratamento (110.3 µM). A combinação dos compostos reduziu significativamente a viabilidade celular na linhagem MCF-7 quando pré-incubada com 10 µM de quercetina por 1 hora (IC<sub>50</sub> = 60.6 µM). O Índice de Combinação demonstrou que a associação conferiu efeito sinérgico nas linhagens tumorais e antagônico na linhagem não tumoral (MCF-7 = 0.447, MDA-MB-231 = 0.725, MCF-10A = 1.797). O tratamento em associação promoveu maior seletividade para as linhagens tumorais do que para a linhagem não tumoral (MCF-10A/MCF-7 = 1.63, MCF-10A/MDA-MB-231 = 2.29). A associação gerou um maior número de células em apoptose nas linhagens tumorais. A análise do ciclo celular demonstrou que o tratamento associado gerou bloqueio na fase G0/G1 na linhagem tumoral MDA-MB-231. Dentre as caspases observadas por imunoblotting neste estudo, não foi possível definir a provável via de indução de morte, e mais estudos precisam ser realizados com o objetivo de verificar quais outras vias de morte celular podem estar alteradas pela combinação de compostos bioativos utilizada nessa dissertação. Concluímos que esses resultados mostram o efeito da associação entre quercetina e crisina sobre a indução de morte celular por apoptose nas células MCF-7 e MDA-MB-231, inferindo seu potencial como uma possível ferramenta para o tratamento do câncer de mama.

**Palavras-chave:** Câncer de mama, quercetina, crisina, apoptose, associação.

## **Abstract**

Breast cancer is the second type of cancer that most affects women worldwide and presents estimates of 57,960 incident cases for the biennium 2016/2017. Flavonoids quercetin, found in apples and onions, and chrysin, found in honey and propolis, play a role as an anticancer agent, however its precise mechanism of action is not completely elucidated. The aim of this study was to investigate the action of these flavonoids, isolated and in association, in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells and the non-tumor MCF-10A cells culture. Cellular viability analysis by MTT assay was performed. It was observed that, according to the IC<sub>50</sub> values, chrysin was the most cytotoxic flavonoid for all the cell lines (MCF-7 = 232.5 µM, MDA-MB-231 = 170.0 µM), with the non-tumoral being the most sensitive to the treatment (110.3 µM). The combination of the compounds significantly reduced cell viability in the MCF-7 cell line when preincubated with 10 µM quercetin for 1 hour (IC<sub>50</sub> = 60.6 µM). The Combination Index showed that the association had a synergistic effect in the tumoral cell lines and antagonistic effect in the non-tumoral one (MCF-7 = 0.447, MDA-MB-231 = 0.725, MCF-10A = 1.797). It was observed that the associated treatment presented greater selectivity for the tumor cell lines than for the non-tumoral (MCF-10A/MCF-7 = 1.63, MCF-10A/MDA-MB-231 = 2.29). The association generated a larger number of apoptotic cells in the tumor lines. Cell cycle analysis demonstrated that the associated treatment caused cell cycle arrest in the G0/G1 phase in the MDA-MB-231 cell line. Among the caspases observed by immunoblotting in this study, it was not possible to define a probable pathway for induction of cell death, and further studies need to be performed with the objective of verifying which other apoptotic pathways may be altered by the combination of the bioactive compounds used in this dissertation. Taken together, these results show the effect of the association of quercetin and chrysin on the induction of cell death by apoptosis in MCF-7 and MDA-MB-231 cells, inferring its potential as a possible tool for the treatment of breast cancer.

**Keywords:** Breast cancer, quercetin, chrysin, apoptosis, association.

## Lista de siglas e abreviaturas

ALT	Alanina aminotransferase
APAF1	do inglês, <i>apoptotic-protease-activating factor-1</i>
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
Bad	do ingles, <i>Bcl-2-associated agonist of cell death</i>
Bak	do inglês, <i>Bcl-2-homologous antagonist/killer</i>
Bax	do inglês, <i>Bcl-2 associated X</i>
Bcl-2	do inglês, <i>B-cell lymphoma-2</i>
Bcl-xL	do inglês, <i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BH3-Only	Do inglês, <i>Bcl-2 homology 3 only</i>
BCRP	Do inglês, <i>Breast cancer resistance protein</i>
Caspases	Cisteinil-aspartato proteases
CDKs	do inglês, <i>cyclin-dependent kinases</i>
IC	Índice de combinação
CRIS	Crisina
CTRL	Controle
D-MEM	<i>Dulbecco´s Modified Eagle Medium</i>
DMEM F-12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
DREAM	do ingles, <i>dimerization partner, RB-like, E2F and multi-vulval class B</i>
ECL	do inglês, <i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGCG	Do inglês, <i>Epigallocatechin gallate</i>

EMT	do inglês, <i>Epithelial-mesenchymal transition</i>
FasL	Proteína ligante de Faz
FOXO3	Proteína Forkhead box O3
G0	do inglês, <i>Gap phase 0</i>
G1	do inglês, <i>Gap phase 1</i>
G2	do inglês, <i>Gap phase 2</i>
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória média
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
LDH	Lactato desidrogenase
M	Mitose
MCF-10 <sup>a</sup>	Células epiteliais não tumorais de mama
MCF-7	Células epiteliais de câncer de mama humano positivas para receptor de estrogênio derivadas de um carcinoma <i>in situ</i>
Mda	Megadalton
MDA-MB-231	Células triplo-negativas para receptor de estrogênio, receptor de progesterona e receptor do fator de crescimento epidermal humano 2 derivadas de um carcinoma metastático
MDM-2	Do inglês, <i>Murine double minute gene 2</i>
MDR	Resistência à multiplas drogas, do inglês <i>Multidrug Resistance</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol

NF-κB	Fator nuclear kappa B
NOXA	<i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>
PARP	Poli-ADP-ribose polimerase
PBS	Tampão fosfato salino, do inglês <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PEITC	Isotiocianato de fenetilo, do inglês <i>Phenethyl Isothiocyanate</i>
P-gp	Glicoproteína-P
PI	Iodeto de propídio, do inglês <i>Propidium iodide</i>
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PVDF	Membrana de difluoreto de polivinilideno
QRC	Quercetina
Rb	Proteína retinoblastoma
SDS–PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
IS	Índice de seletividade
TNF	Fator de necrose tumoral

## **Lista de ilustrações**

	Página
Figura 1. Fases da carcinogênese.....	18
Figura 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma.....	20
Figura 3. Caspases iniciadoras e efetoras.....	27
Figura 4. Representação esquemática das duas principais vias apoptóticas: extrínseca e intrínseca.....	29
Figura 5. Fitoquímicos e seus compostos bioativos.....	32
Figura 6. Estrutura da quercetina.....	33
Figura 7. Estrutura da crisina.....	35

## Sumário

<b>1. Introdução.....</b>	<b>17</b>
1.1 – Câncer.....	17
1.2 – Ciclo celular.....	22
1.3 – Apoptose.....	25
1.4 – Compostos bioativos na prevenção do câncer .....	30
1.5 – Quercetina.....	33
1.6 – Crisina.....	35
1.7 – Associação entre compostos e com quimioterápicos.....	37
<b>2 – Objetivos.....</b>	<b>40</b>
2.1 – Objetivo geral.....	40
2.2 – Objetivos específicos.....	40
<b>3 – Material e métodos.....</b>	<b>41</b>
3.1 – Linhagens celulares e reagentes.....	41
3.2 – Cultura de células.....	41
3.3 – Ensaio de citotoxicidade - Redução de MTT (3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromide).....	42
3.4 – Ensaio de citotocixidade - Contagem celular utilizando teste de exclusão com Azul de Trypan.....	43
3.5 – Índice de seletividade (IS) .....	43
3.6 – Índice de Combinação (IC).....	44
3.7 – Conteúdo de DNA nuclear.....	44
3.8 – Ensaio de apoptose.....	44
3. 9 – Preparação do extrato protéico das células.....	45

3.10 – Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	46
3.11 – <i>Western Blotting</i> .....	46
3.12 – Análise estatística.....	48
<b>4 – Resultados e discussão.....</b>	<b>48</b>
<b>5 – Conclusão.....</b>	<b>48</b>
<b>6 – Referências Bibliográficas.....</b>	<b>49</b>
ANEXO 1.....	65

## **1. Introdução**

### **1.1 - Câncer**

O câncer é uma doença caracterizada basicamente por alterações genéticas, causando divisão anormal e proliferação exacerbada das células, além do desenvolvimento da capacidade de disseminação para outros tecidos que não o seu de origem (Stratton *et al.*, 2011). Acredita-se que a carcinogênese seja um processo biológico, descrito em três fases contínuas, sendo elas: a iniciação, a promoção e a progressão (Figura 1).

A iniciação envolve a transformação das células por meio da exposição à agentes carcinógenos, que podem ser de origem física (ex. luz ultravioleta e radiações ionizantes), química (ex. hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e nitrosaminas) ou biológica (ex. vírus) e apresentam capacidade de alterar o DNA celular. Estas alterações podem atuar convertendo células normais em células geneticamente modificadas, apresentando perda da capacidade de resposta aos sinais de proliferação, diferenciação e morte, tornando-as autônomas em relação ao seu crescimento e independentes de controles externos (Hanahan & Weinberg, 2000; Béliveau & Gingras, 2007; Freitas *et al.*, 2010; Poirier, 2012).

Durante a promoção, as células iniciadas multiplicam-se, gerando lesões pré neoplásicas sob estímulos promotores. O agente cancerígeno promotor seleciona as células iniciadas, ocorre acúmulo de mutações e aumenta a instabilidade genética. É estabelecida, então, a neoplasia – um tecido novo e anormal, sem função utilizável (Pitot, 2007; Vicenti & Gatenby, 2008; Siddiqui *et al.*, 2015).

A partir da progressão, há o desequilíbrio entre a proliferação e morte, as células tumorais se agregam e proliferam, gerando eventualmente um tumor com

capacidade de invasão tecidual, podendo disseminar para outros tecidos e órgãos distantes e desencadear as metástases (Vicenti & Gatenby, 2008).



Figura 1. Fases da carcinogênese (adaptado de Béliveau & Gingras, 2007).

No processo de carcinogênese, as células mutadas desenvolvem um mecanismo capaz de prover nutrientes e oxigênio a fim de auxiliar o desenvolvimento do tumor, mecanismo conhecido como angiogênese, ou seja, o desenvolvimento de pequenos vasos que atuam irrigando este tecido com sangue. Durante a progressão tumoral, um "interruptor angiogênico" é quase sempre ativado e permanece ligado, fazendo com que novos vasos sejam continuamente desenvolvidos a partir da vasculatura normalmente quiescente, ajudando assim a sustentar o crescimento do tumor. Evidências indicam que este "interruptor angiogênico" é governado por fatores compensatórios que induzem ou se opõem à angiogênese. Alguns destes reguladores angiogênicos são proteínas de sinalização que se ligam aos receptores de superfície celular estimuladores ou inibitórios presentes no endotélio vascular. Dentre as proteínas indutoras e inibidoras de

angiogênese encontram-se o Fator de Crescimento do Endotélio Vascular A (VEGF-A) e a Trombospondina 1 (TSP-1), respectivamente (Hanahan & Weinberg, 2011).

Há também mudanças na estrutura de tumores epiteliais, chamada de transição epitélio-mesenquimal (EMT, do inglês *Epithelial-mesenchymal transition*), onde estas células perdem sua forma estrutural característica, sofrendo diversas alterações, dentre elas perda de polaridade, o que gera o desenvolvimento de uma estrutura alongada, e a perda de proteínas epiteliais associada ao ganho de proteínas mesenquimais. Essas alterações conferem aumento na capacidade de migração, resistência a apoptose e invasão de outros tecidos (Chang, 2016).

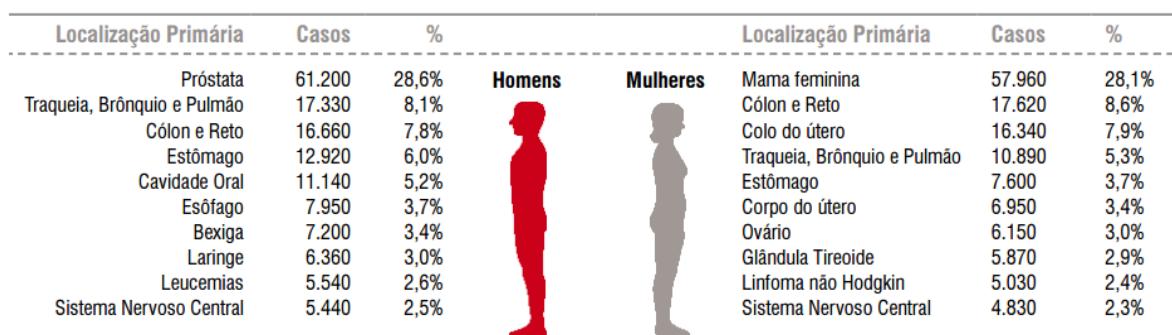
A capacidade de invasão de outros tecidos chama-se metástase e ocorre ao longo de cinco fases: invasão, intravazamento, transporte, extravazamento e colonização cancerosas (Chang, 2016).

A primeira fase é caracterizada pela invasão de tecidos circunvizinhos, perda de junções celulares e indução de proteases que facilitem a invasão local. As segunda e terceira fases são interligadas, na segunda havendo a invasão do sistema vascular por essas células tumorais e, na terceira, direcionando-as para tecidos distantes do seu de origem via circulação sistêmica. Na quarta fase ocorre a fixação destas células cancerosas nos tecidos que não o seu de origem e na quinta, e última fase, há a proliferação dos tumores e colonização dos tecidos saudáveis por parte das células cancerosas (Chang, 2016).

De acordo com dados disponibilizados pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2017), o câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, com aproximadamente 14,1 milhões de casos novos e 8,2 milhões de mortes relacionadas a essa doença, com um aumento estimado para 20 milhões de casos incidentes para o ano de 2025, tendo seu maior impacto observado sobre a

população de países em desenvolvimento, com um total correspondente a 80% dos casos, o que caracteriza o câncer como um grave problema de saúde pública.

A neoplasia de mama é o tipo de câncer que mais acomete mulheres em todo o mundo, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos. Para o biênio de 2016/2017 é esperado, apenas no Brasil, 57.960 novos casos, com um risco estimado de 56,20 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2016).



\*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma (INCA, 2016).

As maiores e menores taxas de incidência encontram-se na Europa Ocidental e Ásia Oriental, respectivamente, tendo aproximadamente 43% de casos ocorridos na Europa e na América do Norte (INCA, 2016).

De acordo com os dados disponibilizados pelo projeto GLOBOCAN 2012, vinculado à IARC (*International Agency for Research on Cancer*), 500 mil óbitos por câncer de mama em mulheres foram estimados no ano de 2012 em todo mundo, sendo este valor correspondente a 15% de todos os óbitos por câncer em mulheres. Em geral, são observadas maiores taxas de mortalidade em regiões mais desenvolvidas socioeconomicamente. Entretanto, esta neoplasia especificamente, encontra-se como a principal causa de morte (324 mil óbitos) em regiões menos

favorecidas e atualmente ocupa a segunda posição (198 mil óbitos) nas regiões mais desenvolvidas, apresentando taxas menores apenas do que o câncer de pulmão (WHO, 2012).

Os possíveis tratamentos utilizados no câncer de mama são a cirurgia, a quimioterapia, a radioterapia e a hormonioterapia. A quimioterapia pode ser a primeira modalidade na terapia de um tumor primário de mama de grande porte (acima de 3 cm), localmente avançado (Harmer, 2008). O tratamento quimioterápico utilizado no câncer de mama é realizado normalmente por meio de uma combinação de medicamentos, injetados por via endovenosa em intervalos regulares de três semanas. Os medicamentos apresentam efeito citotóxico e agem contra as células cancerosas de duas maneiras principais: eliminando as células tumorais e/ou interferindo na divisão celular e, por consequência, na reprodução destas células. Desta forma, estes medicamentos erradicam ou controlam o crescimento das células cancerosas (McCoy, 2003; van der Hage *et al.*, 2001).

Entretanto, o quimioterápico não pode distinguir entre células normais e malignas. Desta forma, o medicamento não atua apenas nas células cancerosas, mas também nas células normais, resultando assim nos efeitos colaterais desse tratamento (McCoy, 2003). A maneira atualmente utilizada ao longo do tratamento quimioterápico é a marcação genética, onde são identificados os padrões das células neoplásicas de determinado tumor e passa-se a utilizar drogas terapêuticas direcionadas às células que apresentem biomarcadores específicos, tornando assim a terapia mais eficiente e com menores efeitos colaterais, como o uso de imatinib, nilotinib e ponatinib no tratamento de leucemia mieloide crônica, por atuarem diretamente como inibidores da Bcr-Abl tirosina quinase; ou o uso do trastuzumab no tratamento adjuvante de câncer de mama positivo para superepressão da proteína

HER-2, uma vez que este atua atingindo seletivamente o domínio extracelular desta proteína (Feitelson *et al.*, 2015; Harbeck *et al.*, 2008).

Algumas das drogas quimioterápicas mais utilizadas incluem antimetabólitos (por exemplo, metotrexato), agentes que interagem com o DNA (por exemplo, cisplatina, doxorrubicina e melfalan), agentes antitubulina (taxanos), hormônios e agentes de direcionamento molecular (Hosseini & Ghorbani, 2015), sendo o taxol, ciclofosfamida, tamoxifeno, gemcitabina, melfalan, doxorrubicina, docetaxel, carboplatina e transtuzumab os mais utilizados para os tumores mamários (Rothbarth *et al.*, 2002; INCA, 2001).

## 1.2 – Ciclo Celular

A transição do ciclo celular é um processo ordenado e rigorosamente regulado que envolve múltiplos pontos de verificação que avaliam os sinais de crescimento extracelular, o tamanho da célula e a integridade do DNA. O ciclo de células somáticas é dividido em quatro fases distintas. Durante duas destas fases, as células executam os eventos básicos de divisão celular, como geração de uma cópia única e fiel de seu material genético (**Síntese de DNA ou fase S**) e separação de todos os componentes celulares entre as duas células filhas idênticas (**Mitose ou fase M**). As duas outras fases do ciclo celular representam períodos de intervalo (**fase Gap 1**, ou **G1** e **fase Gap 2**, ou **G2**), durante as quais as células se preparam para a conclusão bem-sucedida das fases S e M, respectivamente. Quando as células cessam a proliferação, seja devido a sinais antimitogênicos específicos ou à ausência de sinalização mitogênica adequada, então eles saem do ciclo e entram num estado não-divisor, quiescente, conhecido como G0. Além disso, o ciclo celular

pode ser parado nos pontos de controle G1 ou G2 que avaliam o tamanho da célula, os sinais de crescimento extracelular e a integridade do DNA (Park & Lee, 2003).

A progressão adequada do ciclo celular é monitorada por pontos de verificação que detectam possíveis erros durante a síntese do DNA e divisão cromossômica. A ativação destes pontos de verificação induz a parada do ciclo celular através da modulação da atividade de enzimas quinases dependentes de ciclina (CDK, do inglês *cyclin-dependent kinases*), proteínas estas atuantes na transição de uma fase do ciclo celular para a seguinte, as quais são ativadas quando estão ligadas a proteínas regulatórias (ciclinas), sendo esta associação entre CDKs e ciclinas as responsáveis pela regulação de vários pontos do ciclo celular. A interrupção do ciclo celular permite que as células reparem adequadamente estes defeitos, impedindo assim a sua transmissão para as células filhas resultantes. Este ponto de verificação para danos do DNA protege as células do ataque constante por agentes genotóxicos exógenos e endógenos (por exemplo, produtos químicos, radicais livres, radiação ionizante, entre outros), que induzem diversas alterações na molécula de DNA. Estas alterações são detectadas por uma via de sinalização que conduz, em última instância, à inibição da CDK e à parada do ciclo celular. Se o reparo não obtiver êxito devido a danos excessivos no DNA ou defeitos genéticos no ponto de verificação ou na maquinaria de reparo do DNA, as células podem entrar em senescência ou sofrer apoptose (Malumbres & Barbacid, 2009).

Dentre as proteínas envolvidas nas diferentes fases do ciclo celular, a proteína p53 é a de maior importância na regulação dessas fases, uma vez que suas funções vão desde a indução à parada do ciclo em diferentes etapas, como também na indução de morte celular. Além disso, o gene p53 é o mais frequentemente mutado em tumores humanos (Jacobson & McInnes, 2002).

Esta proteína é conhecida como supressora de tumor, devido a sua ação sobre a parada do ciclo celular, senescência e apoptose em resposta a uma ampla gama de danos celulares. A indução rápida de níveis elevados de proteína p53 por vários tipos de estresse (hipóxia, radiação UV, estresse oxidativo, danos ao DNA), impede a propagação inadequada de células portadoras de DNA danificado e potencialmente mutagênico (Moll & Petrenko, 2003).

A regulação da expressão dessa proteína ocorre por meio de sua interação com a proteína MDM-2 (*murine double minute gene 2*). Em situações onde não há estresse, ele se liga e inibe a atividade de transcrição da p53, contribuindo para sua degradação proteolítica e facilitando a sua ubiquitinação, proporcionando deste modo, um ciclo de *feedback* negativo. Já em situações de estresse, há modificações pós-traducionais entre p53 e MDM-2, onde proteínas se ligam à MDM-2, separando-a da p53, gerando assim, o aumento na sua concentração e estimulando a síntese de p21, um inibidor de CDKs necessárias para a progressão do ciclo celular (Jacobson & McInnes, 2002; Vogelstein *et al.*, 2000).

A p53 pode bloquear de maneira eficaz a progressão do ciclo celular por ativação da transcrição do inibidor de quinase dependente de ciclina p21, embora vários outros genes alvo de p53, tais como 14-3-3 sigma e GADD45, também contribuam para esta resposta (Vousden & Prives, 2009).

A indução da expressão de p21 conduz à estabilização do complexo DREAM (abreviação para o inglês *dimerization partner, RB-like, E2F and multi-vulval class B*), que atua de maneira central na regulação decrescente de genes relacionados com o ciclo celular. Fischer *et al.* (2016) identificaram 210 genes regulados de maneira decrescente através da via de p53-p21-DREAM-CDE/CHR, o que parece ser o mecanismo preliminar para a parada do ciclo celular em G2/M disparado por

p53. Além disso, a p21 também interage fisicamente e apresenta capacidade de inibir a atividade dos complexos ciclina-CDK2, -CDK1, e-CDK4/6, funcionando assim como um regulador da progressão do ciclo celular durante as fases G1 e S. (Fischer *et al.*, 2016; Georgakilas *et al.*, 2017).

Sendo a expressão deste gene extremamente sensível a níveis mesmo baixos de proteína p53, um bloqueio temporário em diferentes fases do ciclo, tal como induzido por dano leve ou estresse, permite que as células sobrevivam com segurança até que o dano seja resolvido ou o estresse removido. Logo, alterações na regulação normal da divisão e progressão do ciclo celular têm sido importantes fatores no desenvolvimento do câncer, tornando, assim, proteínas regulatórias deste ciclo um dos alvos na terapia contra esta doença (Vousden & Prives, 2009).

### **1.3 – Apoptose**

A morte celular programada baseia-se numa relação de equilíbrio entre morte celular e sobrevivência das células. Em condições de desequilíbrio desta relação, a morte celular programada atua desempenhando um papel fundamental no destino final das células, como ocorre em casos de câncer. Existem diversos tipos de morte celular programada, dentre elas a apoptose, autofagia e necrose, sendo cada uma delas distingível por meio de suas diferenças morfológicas (Ouyang *et al.*, 2012).

A palavra "apoptose" deriva do grego "ἀπόπτωσις" que significa árvores derramando suas folhas no outono, descrevendo a queda de pétalas de suas flores, ou folhas de suas árvores. Esse termo descreveu de maneira imaginária a morte celular desencadeada por estimulação fisiológica e patológica. Os fenômenos de apoptose foram descritos pela primeira vez pelo cientista alemão Carl Vogt em 1842,

entretanto, o termo "apoptose" só veio a ser utilizado pela primeira vez em 1973, por John Foxton Ross Kerr (Hongmei, 2012).

Este tipo de morte celular é caracterizado por alterações morfológicas e bioquímicas específicas de células em estágio de morte, dentre as quais destacam: encolhimento celular, fragmentação e condensação nuclear, perda de adesão às células circunvizinhas ou à matriz extracelular. Dentre as alterações bioquímicas incluem clivagem do DNA cromossomal, externalização da fosfatidilserina e clivagem de substratos intracelulares por proteólise específica (Ouyang *et al.*, 2012).

A morte celular por apoptose é mediada por uma família de cisteinil-aspartato proteases (caspases), constituída nos humanos por, pelo menos, 14 componentes, dentre os quais aproximadamente 7 estão envolvidos no processo apoptótico. As caspases são sintetizadas como zimogênios inativos que necessitam de ativação para exercer a sua função. A ativação completa é alcançada por meio da clivagem de um pró-domínio por outras caspases. As caspases envolvidas na apoptose são classificadas em caspases iniciadoras e caspases efetoras, conforme observado na figura 3 (Riedl & Shi, 2004).

As caspases iniciadoras (Caspases 2, 8, 9 e 10) apresentam a capacidade de auto ativação e estão envolvidas na iniciação da cascata proteolítica. À medida que a ativação de uma caspase iniciadora inevitavelmente desencadeia uma cascata de ativação de caspases, esta é fortemente regulada e frequentemente exige a combinação de um complexo multi-componente, em condições apoptóticas. Por exemplo, a ativação de procaspase-9 é facilitada pelo apoptossomo, um complexo de ~ 1,4-MDa que inclui APAF1 (*apoptotic-protease-activating factor-1*) e citocromo c (Riedl & Shi, 2004).

As caspases efetoras (Caspases 3, 6 e 7), por outro lado, necessitam da ação de uma caspase iniciadora para que possam ser ativadas e realizem seus efeitos. Uma vez ativadas, as caspases efetoras são responsáveis pela clivagem proteolítica de substratos citoplasmáticos e nucleares, produzindo muitas das características morfológicas da morte celular por apoptose (Riedl & Shi, 2004).

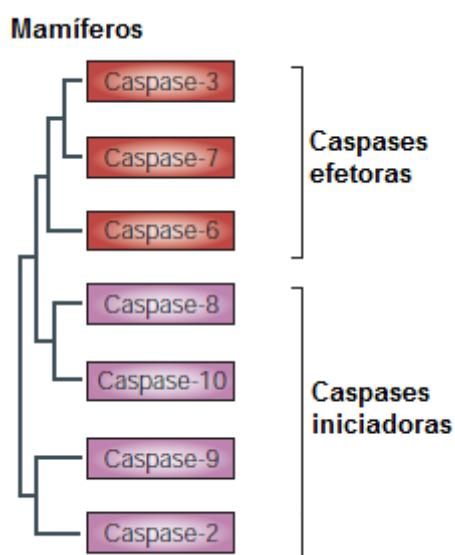


Figura 3. Caspases iniciadoras e efetoras (adaptado de Riedl & Shi, 2004).

Dentre os diversos substratos das caspases, pode-se citar a proteína MDM-2, que apresenta a capacidade de ligação com a proteína p53, mantendo-a no citoplasma. Ao ser clivada por ação das caspases, essa proteína libera a p53, a qual se transloca para o núcleo celular, gerando a ativação da transcrição de genes pró-apoptóticos, como a proteína Bax, entre outros. (Grivicich *et al.*, 2007).

Há duas vias moleculares principais que levam à ativação de caspases e, por consequência, à apoptose: Uma via intrínseca e outra extrínseca (Figura 4) (Elmore, 2007).

A via extrínseca é mediada por receptores que transmitem sinais extracelulares de morte para a maquinaria apoptótica intracelular a fim de induzir a morte de células, estes receptores são conhecidos por receptores de morte. Os receptores de morte pertencem a um subconjunto da superfamília dos receptores do fator de necrose tumoral (TNF), caracterizado por proteínas de padrões distintos, conhecidas por domínios de morte (do inglês *death domains*) e domínios efetores de morte (do inglês *death effector domains*). Estes domínios especializados são capazes de realizar interações que promovem a ativação de caspases 8 e 10. Uma vez ativadas, estas caspases podem transmitir e amplificar o sinal de morte, seja por meio de ativação direta de caspases efetoras, como as caspases 3, 6 e 7, ou através da ativação da via apoptótica intrínseca (Koff *et al.*, 2015).

Já a via intrínseca é controlada por meio da ação opositora dos membros da família Bcl-2. Estas proteínas são divididas em três grupos: Inibidores de apoptose (como Bcl-2 e Bcl-xL), promotores de apoptose (como Bax e Bak) e proteínas reguladoras BH3-Only (como Bad e Noxa), sendo este último grupo capaz de inibir proteínas antiapoptóticas e estimular as pró-apoptóticas (Rastogi, 2009; Elmore, 2007).

Com a detecção de um estímulo citotóxico interno, como dano ao DNA ou privação do fator de crescimento, as proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak migram para a mitocôndria e se oligomerizam para formar poros na membrana mitocondrial, gerando assim um aumento da permeabilização da membrana e liberação de proteínas do espaço intermembranar mitocondrial. Dentre as proteínas do espaço intermembranar mitocondrial, liberados quando há o aumento da permeabilização membranar, o citocromo c é o mais importante, uma vez que, quando no citosol e na presença de ATP (adenosina trifosfato), este se liga à APAF-1 (*apoptosis protease activating factor 1*).

*activating factor-1*), formando o complexo conhecido por apoptossoma, o qual se liga à caspase 9, ativando-a e clivando-a. A ativação da caspase 9 leva à ativação de outras caspases da cascata apoptótica, como as caspases 3 e 7 (Koff *et al.*, 2015; Elmore, 2007).

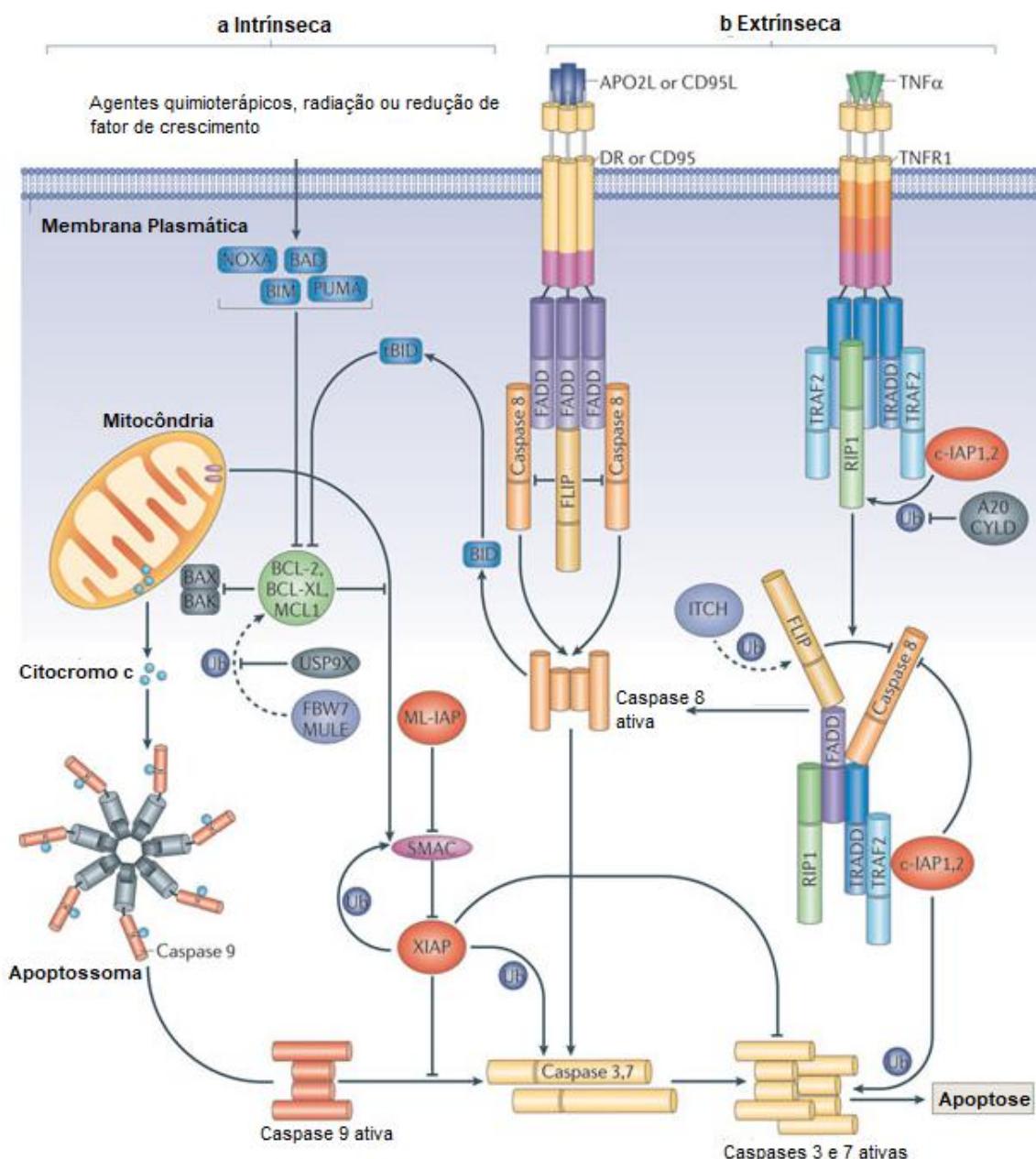


Figura 4. Representação esquemática das duas principais vias apoptóticas: extrínseca e intrínseca. Cada via ativa sua própria caspase iniciadora (8, 9), que por sua vez ativará a caspase executora (3, 7) (adaptado de Vucic *et al.*, 2011).

Outra maneira de ativar a via intrínseca se dá pela proteína p53, em resposta aos danos no DNA, ou por outros fatores que geram estresse celular, podendo então ser vista também como uma via apoptótica dependente de p53 (Ouyang *et al.*, 2012).

#### **1.4 – Compostos bioativos na prevenção do câncer**

Pesquisas afirmam que mais de dois terços dos cânceres humanos poderiam ser prevenidos por meio de mudanças no estilo de vida. Entre os casos de câncer relacionados a fatores ambientais, a dieta inadequada contribui com cerca de 30%, seguida pelo tabaco (30%), fatores genéticos (15%) e outros fatores de risco (Béliveau & Gingras, 2007; Wahle, 2010). Dessa forma, muitos componentes dietéticos podem aumentar o risco de desenvolvimento da doença. No entanto, também existem inúmeras evidências provenientes de estudos populacionais, assim como laboratoriais/experimentais, que provam uma relação inversa entre o consumo regular de frutas, legumes e verduras e o risco do desenvolvimento de cânceres específicos (Riboli & Norat, 2003; Surh, 2003; Boeing *et al.*, 2012).

Donaldson (2004) verificou que uma dieta equilibrada pode ser capaz de reduzir de 60 a 70% a incidência de câncer de mama. Uma dieta rica e variada, que contenha frutas, legumes e verduras, é recomendada como prioridade global para a prevenção do câncer, sugerindo a ingestão de, pelo menos, cinco porções de vegetais por dia (Costa & Rosa, 2010). Estes componentes presentes nos alimentos e que são capazes de atuar no metabolismo e na fisiologia humana, promovendo efeitos benéficos para a saúde são chamados de compostos bioativos, ou fitoquímicos (Figura 5) (Pratheeshkuma, 2012).

Os fitoquímicos são compostos considerados não-nutrientes e que atuam nos vegetais como uma resposta às agressões sofridas por patógenos ambientais, com o objetivo de protegê-las, sendo produzidas em situações de estresse e em pequenas quantidades. Estes compostos são classificados em carotenóides, fenólicos, alcalóides, terpenóides, compostos não nitrogenados e compostos organosulfurados (Suhr, 2003; Cowan, 1999).

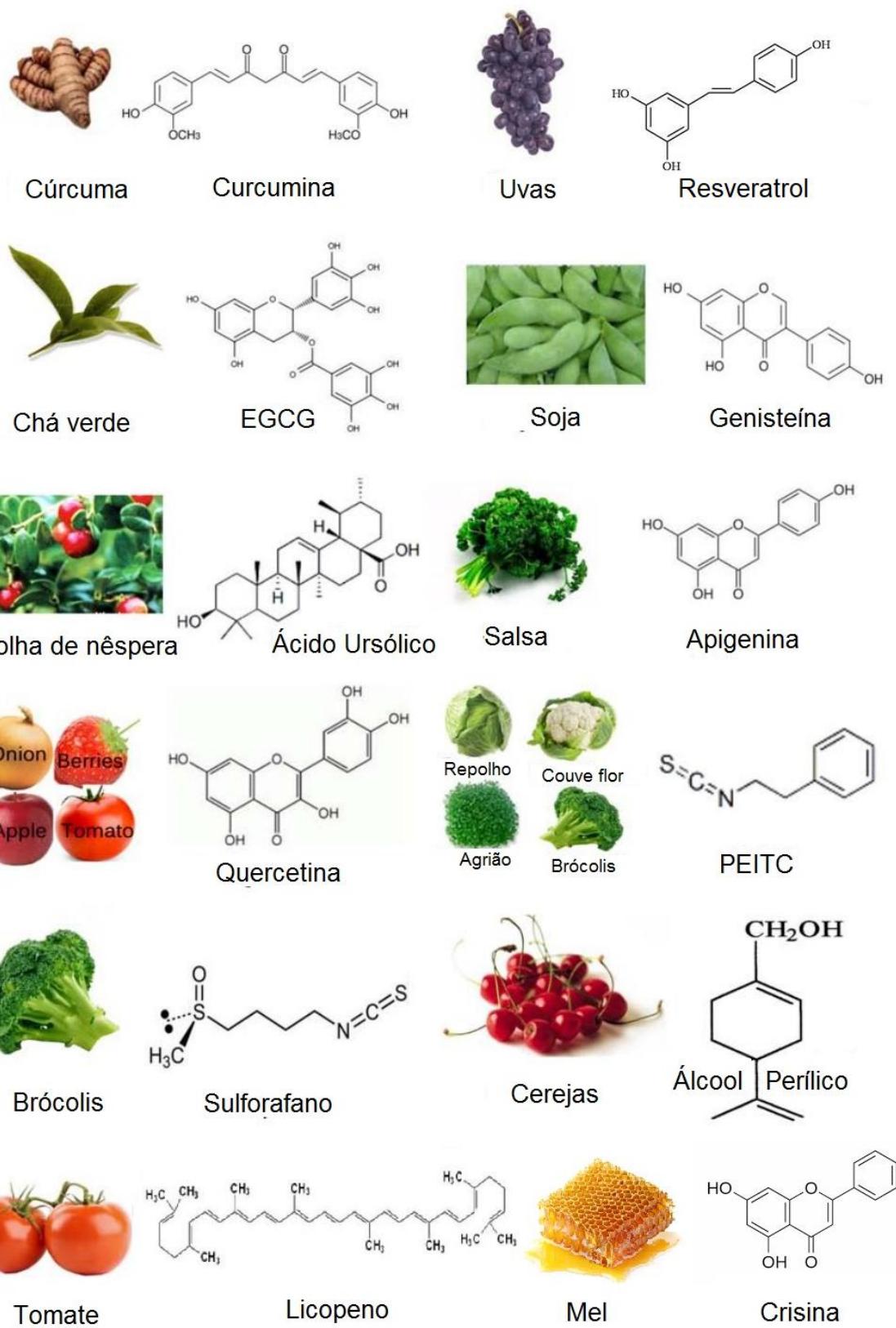


Figura 5. Alimentos e seus fitoquímicos (adaptado de Pratheeshkuma, 2012).

Dentre os efeitos benéficos à saúde observados pelos fitoquímicos, encontra-se a regulação na produção de espécies reativas de oxigênio, regulação da ativação do NF-κB, inibição da angiogênese, regulação da apoptose, entre outros. Devido aos seus efeitos já observados, estes compostos já foram descritos como capazes de reduzir a incidência de diversas doenças crônicas, dentre as quais, o câncer, conferindo-os ação quimiopreventiva (Pratheeshkumar *et al.*, 2012).

No entanto, é necessária uma avaliação precisa dos mecanismos bioquímicos e fisiológicos dos nutrientes e/ou compostos bioativos presentes nos alimentos vegetais que estejam associados à redução do câncer para que, posteriormente, estes sejam testados em ensaios de intervenção em humanos, e utilizados como suplementos alimentares.

### 1.5 - Quercetina

A quercetina (3,3',4',5,7-Pentahidroxiflavona) (Figura 6) é o flavonol mais comumente encontrado nos alimentos, em maiores concentrações na cebola e na maçã (Huber *et al.*, 2008), principalmente na forma glicosilada, ou seja, ligada à diferentes moléculas de açúcar (Hertog *et al.*, 1993; Sampson *et al.*, 2002).

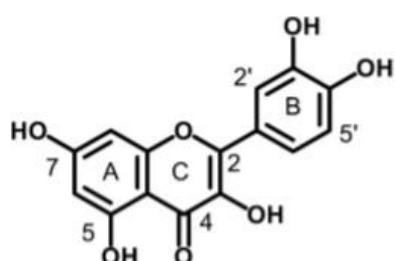


Figura 6. Estrutura da quercetina (Martins *et al.*, 2015).

Diversos estudos vêm mostrando associação entre a quercetina e a prevenção de doenças crônicas não transmissíveis, como doenças

cardiovasculares, câncer e insuficiências renal e hepática devido às suas atividades antioxidantes e antinflamatórias (Dorta *et al.*, 2008, Behling *et al.*, 2004).

Garelnabi e colaboradores (2014), identificaram que a quercetina foi capaz de modular a expressão de genes ligados a atividade cardiovascular e as vias de sinalização envolvidas no câncer em ratos submetidos à uma dieta aterogênica e exercício físico. Também foi observado que a quercetina atua como um potente inibidor da xantina oxidase e da lipoxigenase, enzimas envolvidas em processos como inflamação, atheroscleroze, câncer e envelhecimento (Cos *et al.*, 1998).

Além dos efeitos já citados, Tsimplouli *et al.* (2012) verificaram a ação de flavonóis sobre linhagens tumorais de mama (MCF-7 e MDA-MB-435), de cólon (HT29 e HCT116), de pulmão (DMS114 e NCI-H460) e de glioma (SF268) e, dentre os resultados observados, a quercetina, na concentração de 15 µM, apresentou um efeito antiproliferativo moderado sobre a linhagem MCF-7, e induziu apoptose e alteração no ciclo celular nas demais linhagens pesquisadas.

Um estudo *in vitro* com células MCF-7 e MDA-MB-231 mostrou que, após o tratamento com 80 µM de quercetina, foi observado aumento na expressão da proteína Bax, um dos principais genes reguladores da apoptose, o qual causa liberação do citocromo c e ativação de caspases; além do aumento dos níveis de caspase 3 clivada, a forma ativa da caspase 3, que caracteriza a ocorrência de apoptose. Neste mesmo estudo, essas células foram inoculadas em camundongos BALB/c e foi possível observar que, com o tratamento com 80 µM de quercetina houve a diminuição do crescimento do tumor e de sua vascularização (Tao *et al.*, 2015).

Experimentos *in vivo* têm demonstrado a capacidade da quercetina tanto de prevenir quanto de inibir tumores malignos em diversos modelos animais. Dentre os

diversos tipos de neoplasia nas quais as propriedades quimiopreventivas deste composto têm sido observadas, estão os tumores de cólon, boca, cérvix e pulmão (Loizzo *et al.*, 2009; Dajas, 2012; Ramos *et al.*, 2005; Howells *et al.*, 2010).

Em ensaio clínico de Fase I, 420mg/m<sup>2</sup> de quercetina foi administrada por infusão intravenosa em uma paciente em estado terminal de câncer de ovário. Os dados mostraram uma diminuição seis vezes maior da concentração sérica de CA125, um marcador protéico para este tipo de tumor. Neste mesmo estudo, a administração de quercetina em um paciente acometido por hepatoma em estágio avançado, resultou na diminuição significativa dos valores séricos de α-fetoproteína, um marcador correlacionado com a agressividade de tumores hepáticos (Sak, 2014).

## 1.6 – Crisina

A Crisina (5, 7-dihidroxiflavona) (Figura 7) é uma flavona encontrada em muitos extratos vegetais, incluindo a flor de maracujá (*Passiflora caerulea*), mel e própolis, que possui alto valor econômico e importância medicinal (Pichichero *et al.*, 2011; Medic-Saric *et al.*, 2011).

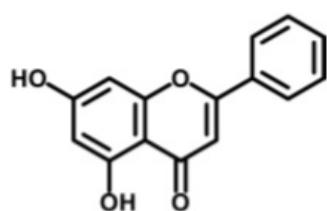


Figura 7. Estrutura da crisina (Martins *et al.*, 2015).

O metabolismo da crisina ainda é pouco conhecido, porém seus efeitos benéficos têm sido bastante estudados. A crisina apresenta ações antioxidantes (Pushpavalli *et al.*, 2010), antinflamatórias (Bae *et al.*, 2011), anticonvulsivantes

(Medina *et al.*, 1990), anti-hipertensivas (Vilar *et al.*, 2002), anticancerígena (Pichichero *et al.*, 2011), entre outras.

Zhang e colaboradores (2004) observaram que, dentre diversos flavonoides utilizados de forma isolada em linhagens tumorais de mama, com e sem resistência à multiplas drogas (MDR, do inglês *Multidrug Resistance*), a crisina, utilizada na concentração de 50 µM, foi capaz de sensibilizar as linhagens resistentes, deixando-as com o nível de sensibilidade ao quimioterápico mitoxantrona semelhante às linhagens tumorais que não apresentavam MDR.

Pichichero *et al.* (2011) verificaram que o tratamento com 50 µM de crisina foi capaz de aumentar entre 15 e 20 vezes a ativação das caspases em células de melanoma, além de causar aumento na expressão da proteína Bax. Em outro estudo, realizado por Samarghandian *et al.* (2014), o tratamento com crisina foi capaz de inibir o crescimento de uma linhagem de adenocarcinoma de pulmão humano (A549), induzindo apoptose através do aumento na relação das proteínas Bax/Bcl-2 e da ativação de caspases 3 e 9.

A crisina é capaz de inibir o crescimento celular e induzir apoptose em diversas linhagens tumorais, como também se mostrou um efetivo agente quimiopreventivo em experimentos com câncer renal induzido em ratos Wistar (Martins *et al.*, 2015; Rehman *et al.*, 2012.).

Karthikeyan e colaboradores (2013) observaram que, em hamsters sírios dourados com carcinomas bucais induzidos, o tratamento com 250 mg/kg de crisina foi capaz de inibir o desenvolvimento dos tumores por meio de diversos mecanismos, incluindo a prevenção da ativação do procarcinogênio utilizado, aumento da expressão de enzimas antioxidantes e de destoxicação, como glutationa

(GSH), glutationa peroxidase (GPx) e glutationa redutase (GR), além de inibir a proliferação celular, invasão, angiogênese e metástase.

Este composto foi capaz de modular de forma satisfatória os efeitos tóxicos de quimioterápicos como cisplatina e doxorrubicina, tanto a nível renal quanto hepático em ratos Wistar, gerando aumento na atividade de enzimas antioxidantes, como catalase e glutationa reduzida e diminuição nos níveis de marcadores de nefrotoxicidade, como creatinina e ureia sanguínea, e marcadores de hepatotoxicidade, como alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e lactato desidrogenase (LDH) (Rashid *et al.*, 2013.; Sultana *et al.*, 2012).

### **1.7 – Associação entre compostos e com quimioterápicos**

Além dos estudos sobre compostos bioativos isolados presentes em alimentos no combate ao câncer, uma estratégia que tem sido investigada é a associação entre esses fitoquímicos. Como normalmente possuem mecanismos de ação diferentes, a hipótese é de que poderiam agir em diversos processos bioquímicos e moleculares, promovendo assim maior ou menor sinergia (Raj *et al.*, 2008). Trabalhos recentes têm demonstrado a utilização de fitoquímicos em associação com quimioterápicos, com o objetivo de subsidiar estudos clínicos, a fim de promover diminuição da dose utilizada do fármaco, reduzindo, possivelmente, os efeitos colaterais provocados pelo tratamento (Heeba & Elghany, 2010; Lin *et al.*, 2015a; Lin *et al.*, 2015b). A ocorrência de resistência a agentes antineoplásicos, como o melfalan, também tem sido um problema no tratamento do câncer, por isso mais estudos são necessários a fim de aumentar a eficácia dos quimioterápicos, potencializando sua ação (Zub *et al.*, 2015).

Jakubowicz-Gil *et al.* (2014) verificaram que a quercetina, quando associada com o quimioterápico sorafenib, potencializou o efeito do fármaco administrado em células de glioma e astrocitoma anaplásico. Em outro estudo desenvolvido por Wang *et al.* (2012), verificou-se que o tratamento associado entre quercetina e doxorrubicina *in vitro* e *in vivo*, potencializou os efeitos tóxicos do quimioterápico tanto na linhagem tumoral quanto no modelo animal. Além disso, este tratamento diminuiu os danos observados em células hepáticas normais, tanto no modelo *in vitro* quanto *in vivo*. Doxorrubicina também teve seu efeito potencializado quando em tratamento associado com crisina em linhagens tumorais de pulmão A549, H157, H460 e H1975 que apresentavam MDR, onde a crisina apresentou capacidade de inibir bombas de efluxo ABCG2 presentes nas linhagens estudadas (Brechbuhl, 2012).

Todavia, é importante considerar que alguns fitoquímicos podem afetar o resultado do tratamento de maneira adversa, seja pela atenuação ou inibição do efeito terapêutico de certos fármacos, sendo por isso contraindicada a associação de determinados compostos. Um dos resultados observados por Sak (2012) foi a atenuação do efeito inibitório do tamoxifeno em células de mama MCF-7 quando em tratamento associado com genisteína.

Dessa forma, sugere-se cautela na utilização de fitoquímicos por pacientes com câncer, uma vez que os estudos ainda são inconclusivos e ressalta-se a necessidade imediata de se estabelecer mais perfis de eficácia e toxicidade em relação à associação de compostos bioativos presentes em alimentos, tendo por objetivo uma melhor avaliação dos benefícios do uso destes compostos no tratamento desta doença (Raj *et al.*, 2008; Hsieh & Wu, 2008; Fukui *et al.*, 2010).

Devido aos diversos efeitos benéficos já observados, os flavonoides têm recebido atenção, o que tem gerado relatos e evidências epidemiológicas de que dietas ricas nestes compostos bioativos, como, por exemplo, a quercetina e a crisina, podem ter efeitos sobre a prevenção e o tratamento de diferentes tipos de doenças, incluindo o câncer.

A elucidação dos mecanismos de resposta quimioterápica dos compostos encontrados em alimentos, isolados e/ou associados, ainda é uma barreira a ser explorada, pois os estudos ainda são inconclusivos para a determinação de novas terapias. Dessa forma, torna-se relevante elucidar os efeitos da associação de fitoquímicos, como a quercetina e a crisina, sobre células de câncer de mama para uma possível aplicabilidade futura em ensaios experimentais e, posteriormente, clínicos uma vez que o câncer é uma doença crônica, com alta prevalência e considerado um grave problema de saúde pública.

## **2 – Objetivos**

### **2.1 - Objetivo geral**

- Investigar os possíveis efeitos dos flavonoides quercetina e crisina, isolados ou associados, sobre células tumorais MCF-7 e MDA-MB-231 e não tumoral de mama MCF-10A.

### **2.2 - Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito da quercetina, crisina e da associação destes compostos sobre a viabilidade de células de câncer de mama das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231, comparando com a linhagem de mama não tumoral MCF-10A.
- Avaliar o efeito citotóxico da associação de quercetina e crisina nas linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10A.
- Analisar o ciclo celular das linhagens de células de câncer de mama após o tratamento com quercetina, crisina e sua associação.
- Analisar o efeito da quercetina, crisina e sua associação sobre o tipo de morte celular.
- Analisar as possíveis vias de sinalização de morte celular relacionadas.

### **3 – Material e métodos**

#### **3.1 – Linhagens celulares e reagentes**

Foram utilizadas neste estudo linhagens de células epiteliais de câncer de mama humano positivas para receptor de estrogênio derivadas de um carcinoma *in situ* (MCF-7) e células triplo-negativas para receptor de estrogênio, receptor de progesterona e receptor do fator de crescimento epidermal humano 2 derivadas de um carcinoma metastático (MDA-MB-231), o que confere a esta linhagem maior resistência ao tratamento com quimioterápicos (Wang *et al.*, 2004). Além disso, a fim de verificar a toxicidade dos compostos bioativos em células não tumorais, foram realizados experimentos com a linhagem normal de mama, MCF-10A. Estas linhagens foram obtidas do *American Type Culture Collection* (ATCC; Manassas, VA, USA).

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico. Quercetina, crisina, dimetilsufóxido (DMSO), iodeto de propídio (PI), RNase A e brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólio (MTT) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA); Penicilina/estreptomicina da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA); Meio DMEM e soro fetal bovino (SFB) da Gibco (EUA); Azul de Trypan da VETEC (Brasil); Kit de detecção de apoptose da eBioscience. O anticorpo anti-GAPDH (#0411) da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA) e os anticorpos anti-caspase 9 (#9502), anti-caspase 7 (#9492), anti-caspase 3 (#9662) da Cell Signaling Technology (CA, EUA).

#### **3.2 – Cultura de células**

As células MCF-7 e MDA-MB-231 foram mantidas em meio DMEM alta glicose (4,5 g/L), suplementadas com 10 % de soro fetal bovino, 100 unidades/mL

de penicilina G e 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina. Já a linhagem MCF-10A foi mantida em meio DMEM F-12 com proporção 1:1, suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 10 µg/mL de insulina, 20 ng/mL de fator de crescimento epidermal humano, 0,5 µg/mL de hidrocortisona. As células foram mantidas a 37°C em uma atmosfera umidificada contendo 5 % de CO<sub>2</sub> (Jin *et al.*, 2009).

### **3.3 – Ensaio de citotoxicidade - Redução de MTT (3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromide)**

A viabilidade celular foi determinada por ensaio de redução de MTT adaptado de Mossman (1983).

Para o tratamento das linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10A foram feitas culturas em placas de 96 poços até obtenção de confluência entre 70% e 80%. Posteriormente, as células foram tratadas com diferentes concentrações de quercetina (0 – 300 µM) ou crisina (0 – 300 µM), dissolvidos em 0,5 % de dimetilsulfóxido (DMSO); associação entre os compostos bioativos ou 0,5 % de DMSO (Controle). Os experimentos com as células tratadas foram realizados após 24 horas de tratamento das células.

Após a incubação das células com os compostos bioativos, o meio foi retirado e as células foram lavadas com PBS à 37°C. Em seguida, foi adicionado 100 µL de MTT, diluído em DMEM sem vermelho de fenol + 10% de soro fetal bovino, a uma concentração de 1 mg/mL. As placas foram mantidas na estufa à 37°C por 1 hora. Após a incubação, a solução de MTT foi removida e foi acrescentado 200 µL de DMSO 100 %. A leitura foi realizada em um leitor de microplacas (*SpectraMax® Paradigm® Multi-Mode Microplate Reader*) em frequência de onda de 570 nm e os resultados obtidos em absorbância foram expressos em porcentagem de células

viáveis em relação ao controle (onde foi considerado como tendo uma viabilidade celular correspondente a 100 %).

### **3.4 – Ensaio de citotoxicidade - Contagem celular utilizando teste de exclusão com Azul de Trypan**

Para confirmar os resultados obtidos pelo método de MTT, as células MCF-7 e MDA-MB-231 foram tratadas utilizando-se a concentração de 75 µM dos compostos isolados e analisadas após 24 horas. Foram adicionados a 10 µL de células, 10 µL de solução de Azul de Trypan a 0,04 %. Após homogeneização, 10 µL do total foi utilizado para a contagem em câmara de Neubauer. Esse método de contagem de células é baseado no princípio de que as células vivas possuem membrana intacta e conseguem excluir o azul de Trypan, já as células mortas, em necrose ou apoptose tardia, por apresentarem formação de poros em sua membrana, conseguem incorporar esse corante e ficam marcadas, permitindo contagem diferenciada entre células viáveis (vivas) e não-viáveis (mortas) (Konopka *et al.*, 1996).

### **3.5 – Índice de seletividade (IS)**

O índice de seletividade corresponde à divisão entre os valores de IC<sub>50</sub> dos compostos na linhagem celular normal e o IC<sub>50</sub> dos compostos nas linhagens tumorais (IS = IC<sub>50</sub> MCF-10A / IC<sub>50</sub> célula neoplásica). Segundo Zingue *et al.* (2016), um resultado do índice de seletividade > 1.0 indica que a substância utilizada foi mais ativa nas linhagens tumorais do que na linhagem não tumoral.

### **3.6 – Índice de Combinação (IC)**

O índice de combinação (IC) foi calculado de acordo com a equação  $IC = D_1 / (D_x)_1 + D_2 / (D_x)_2$ , onde  $D_1$  e  $D_2$  são as concentrações dos compostos na associação que inibe 50% da população, e  $(Dx)_1$  e  $(Dx)_2$  são os valores do  $IC_{50}$  dos compostos sozinhos, como descrito por Chou (2006). O IC calculado foi comparado com os valores de referência relatado por Chou (2006), como um método semi-quantitativo para descrever a intensidade do sinergismo, aditividade ou antagonismo.

### **3.7 – Conteúdo de DNA nuclear**

A distribuição do conteúdo de DNA nuclear foi analisada por citometria de fluxo. As células foram plaqueadas em placas de 24 poços, com volume final de 0,5 mL/ poço. Em seguida, foi feito o tratamento com os valores de 100  $\mu M$  de crisina e 10  $\mu M$  de quer cetina isoladas e associadas com pré incubação de quer cetina ou com os respectivos volumes de DMSO 0,5 % (v/v; controle). Após incubação por 24 horas, as células foram lavadas com PBS e fixadas com solução 70 % (vol/vol) metanol/PBS por 1 hora à 4°C. Posteriormente, foram incubadas com solução de PBS suplementado com 10 mg/mL de PI e 20 mg/mL de RNase à 37°C por 45 min. Em seguida, o conteúdo de DNA foi medido usando FACScalibur equipado com o programa *CellQuest* (*Becton Dickinson, CA*) (Ferreira *et al.*, 2014; Ambit *et al.*, 2008).

### **3.8 – Ensaio de apoptose**

A caracterização da morte celular foi investigada pela dupla marcação com iodeto de propídio (PI) e Anexina-V.

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços, e, após 24 horas, foi realizado o tratamento com os compostos dissolvidos em 0,5 % de DMSO ou com os respectivos volumes de DMSO 0,5 % (v/v; controle). O etoposídeo (50 µM) foi utilizado como controle positivo de indução de apoptose (Sen *et al.*, 2004; Molavi *et al.*, 2008). Para esse ensaio foi utilizado o kit de detecção de apoptose da *eBioscience*. Após incubação por 24 horas, as células foram lavadas com PBS e incubadas com tampão de ligação contendo Anexina-V, por 20 minutos, em temperatura ambiente e protegidas da luz. No momento da leitura foi adicionado 1 µL de PI e em seguida, a análise foi realizada por citometria de fluxo (*FACScalibur*) equipado com o programa *CellQuest* (*Becton Dickinson, CA*). A leitura do PI e da Anexina-V foi realizada pelo detector FL-3 e FL-1, respectivamente.

### **3.9 – Preparação do extrato protéico das células**

Para o preparo dos extratos celulares, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com PBS e lisadas em nitrogênio líquido. Em seguida, tampão de lise contendo Tris-HCl 5 mM pH 7,4, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 10 mM, ortovanadato de sódio 1 mM, fluoreto de sódio (NaF) 5 mM, óxido de fenilarsina 1 mM, ácido ocadálico 1 µM, PMSF 1 mM e coquetel de inibidores de proteases (aprotinina A, leupeptina, bestatina, pepstatina A e E-64) em concentração final de 1 mM, foi acrescentado e, com auxílio de um raspador de células (scraper), as células foram raspadas da superfície das placas. O extrato obtido foi sonicado por 10 minutos e centrifugado por 5 minutos à 10.000 rpm. O sobrenadante obtido da centrifugação foi considerado como o extrato protéico das células. Após sua obtenção, o extrato foi armazenado à -80°C até a realização dos experimentos. A

concentração de proteínas foi determinada de acordo com Lowry *et al.* (1951), utilizando albumina bovina sérica como padrão.

### **3.10 – Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)**

Quantidades iguais das amostras de extratos protéicos celulares (100 µg) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida à 10 % na presença de SDS (Dodecil sulfato de sódio) (Laemmli, 1970). O gel de corrida em condições desnaturantes contendo Tris-HCl 375 mM, SDS 0,1 g%, acrilamida 9,7 g%, bisacrilamida 0,3 g%, persulfato de amônio 0,033 g%, TEMED (Tetrametiletilenodiamina) 0,055 % (v/v), pH 8,8. O gel de empacotamento contendo Tris-HCl 83 mM, SDS 0,07 g%, acrilamida 3,2 g%, bisacrilamida 0,09 g%, persulfato de amônio 0,073 g%, TEMED 0,123 % (v/v), pH 6,8. O tampão de corrida contendo Tris-HCl 24,7 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1 g%, pH 8,3. As proteínas foram ressuspendidas em tampão de amostra contendo Tris-HCl 62,5 mM, glicerol 10 % (v/v), azul de bromofenol 0,001 g%, SDS 2 g%, β- mercaptoetanol 10 %. Os padrões de massa molecular utilizados foram: β-galactosidase (120 kDa), albumina bovina sérica (85 kDa), ovoalbumina (50 kDa), anidrase carbônica (35 kDa), β-lactoglobulina (25 kDa) e lisozima (20 kDa) (Thermo Fisher Scientific Inc, Muskego, WI, USA, #26612). Em seguida os géis foram submetidos a uma corrente constante de 15 mA.

### **3.11 – Western Blotting**

Após eletroforese, as proteínas foram eletrotransferidas do gel para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF). A eletrotransferência foi realizada

em tampão Tris-glicina 25 mM e metanol 20 % (v/v), pH 8,3 a 210 mA por 90 minutos à 4 °C (Towbin *et al.*, 1979) utilizando-se o sistema de transferência da Bio-Rad (*Mini-PROTEAN® Electrophoresis System*). A membrana foi então bloqueada com Tris-HCl 0,01 M pH 7,6 contendo cloreto de sódio (NaCl) 0,15 M, 5 % de albumina sérica bovina fração V e 0,1 % de Tween 20 (TBS-Tween-Albumina) por 2 horas à temperatura ambiente. Após 2 horas, o tampão de bloqueio foi desprezado e a membrana incubada com anticorpo primário numa diluição de (1:1.000) por 18 horas à 4 °C. Em seguida, a membrana foi lavada 5x com TBS-Tween e incubada por 2 horas à temperatura ambiente com o anticorpo secundário (anti-IgG coelho/camundongo) conjugado à peroxidase (1:5.000). A membrana foi então lavada 5x por 5 minutos com TBS-Tween e 5x com TBS. A imunodetecção das bandas foi visualizada por quimioluminescência, utilizando o kit ECL *Western Blotting Detection System* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), de acordo com as intruções do fabricante. Os níveis de gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foram utilizados como controle interno para verificação do carregamento de proteínas no gel. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-GAPDH (#0411) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA); anti-caspase 9 (#9502), anti-caspase 7 (#9492), anti-caspase 3 (#9662) (*Cell Signaling Technology*, CA, EUA). A quantificação das bandas foi determinada por análise densitométrica, utilizando o programa *Image-J* versão 1.51j8 (NIH, EUA) e os resultados foram expressos em unidades arbitrárias conforme a sua comparação ao controle GAPDH. Para o descarregamento, as membranas foram lavadas três vezes, por 2 minutos, com TBS-Tween e três vezes, por 2 minutos, com tampão TBS pH 7,6, então incubadas com a solução de descarregamento *Re-Blot Plus Mild* (Millipore). Em seguida, foram lavadas três vezes, por 2 minutos com TBS-Tween e três vezes, por

2 minutos, com TBS pH 7,6. Para verificar a transferência das proteínas para a membrana de PVDF, esta foi corada com o corante vermelho de Ponceau. Para retirada do corante, as membranas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com água destilada e 1 vez por 5 minutos com TBS pH 7,6.

### **3.12 – Análise estatística**

O erro padrão foi calculado por meio da média de 3 experimentos independentes. O nível de significância das diferenças entre as médias foi avaliado pelo método de análise estatística “teste t de Student, não pareado” ( $P \leq 0,05$ ) ou por análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ), usando o GraphPad Prism 6.0 software

## **4 – Resultados e discussão**

Resultados obtidos nessa dissertação estão apresentados em modelo de artigo para submissão para a revista *Journal of Functional Foods* (Anexo A).

## **5 – Conclusão**

Por meio dos resultados obtidos nesta dissertação, é possível concluir que, isoladamente, ambos os compostos utilizados apresentaram efeito citotóxico sobre as linhagens tumorais estudadas, sendo a crisina o composto com maior efeito.

A associação apresentou resultado mais satisfatório, uma vez que a pré-incubação com quercetina potencializou o efeito observado pela crisina na indução de morte celular, apresentando maior toxicidade e seletividade para as linhagens tumorais testadas quando comparadas com a linhagem não tumoral.

Entretanto, esta alteração não foi observada na expressão de caspases 3, 7 e 9. Mais estudos precisam ser realizados com o objetivo de verificar que outras vias apoptóticas estarão alteradas pelo tratamento utilizado.

## 6 – Referências Bibliográficas

AMBIT, A., FASEL, N., COOMBS, G. H. & MOTTRAM, J. C. An essential role for the *Leishmania major* metacaspase in cell cycle progression. *Cell Death & Differentiation*, v. 15, n. 1, p. 113-122, 2008.

BAE, Y., LEE, S. & KIM, S. H. Chrysin suppresses mast cell-mediated allergic inflammation: involvement of calcium, caspase-1 and nuclear factor- $\kappa$ B. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 254, n. 1, p. 56-64, 2011.

BEHLING, E. B., SENDÃO, M. C., FRANCESCATO, H. D. C., ANTUNES, L. M. G. & BIANCHI, M. D. L. P. Flavonóide querçetina: aspectos gerais e ações biológicas. *Brazilian Journal of Food and Nutrition*, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BÉLIVEAU, R. & GINGRAS, D. O flagelo do câncer. Em: Os alimentos contra o câncer. Editora Vozes, Rio de Janeiro, v. 1, p. 17-29, 2007.

BOEING, H., BECHTHOLD, A., BUB, A., ELLINGER, S., HALLER, D., KROKE, A., ... & STEHLE, P. Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. *European Journal of Nutrition*, v. 51, p. 637–663, 2012.

BRECHBUHL, H. M., KACHADOURIAN, R., MIN, E., CHAN, D., & DAY, B. J. Chrysin enhances doxorubicin-induced cytotoxicity in human lung epithelial cancer cell lines: the role of glutathione. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 258, n. 1, p. 1-9, 2012.

CHANG, J.C. Cancer stem cells: Role in tumor growth, recurrence, metastasis, and treatment resistance. *Medicine*, v. 95, n. 1S, p. S20-S25, 2016.

CHOU, T.C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological reviews*, v. 58, n. 3, p. 621-681, 2006.

COS, P., YING, L., CALOMME, M., HU, J. P., CIMANGA, K., VAN POEL, B. & BERGHE, D. V. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products*, v. 61(1), p. 71-76, 1998.

COSTA, N.M.B. & ROSA, C.O.B. Alimentos funcionais: componentes bioativos e efeitos fisiológicos. Editora Rubio, Rio de Janeiro, 2010.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

DAJAS F. Life or death: neuroprotective and anticancer effects of quercetin. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 143, p. 383–396, 2012.

DONALDSON, M. S. Nutrition and cancer: a review of the evidence for an anti-cancer diet. *Nutrition Journal*, v. 3, p. 1-21, 2004.

DORTA, D. J., PIGOSO, A. A., MINGATTO, F. E., RODRIGUES, T., PESTANA, C. R., UYEMURA, S. A. & CURTI, C. Antioxidant activity of flavonoids in isolated mitochondria. *Phytotherapy Research*, v. 22, n. 9, p. 1213–1218, 2008.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

FEITELSON, M. A., ARZUMANIAN, A., KULATHINAL, R. J., BLAIN, S. W., HOLCOMBE, R. F., MAHAJNA, J. & SHARMA, D. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Seminars in Cancer Biology*, v. 35, p. S25–S54, 2015.

FERREIRA, C., SOARES, D. C., DO NASCIMENTO, M. T. C., PINTO-DA-SILVA, L. H., SARZEDAS, C. G., TINOCO, L. W. & SARAIVA, E. M. Resveratrol is active against *Leishmania amazonensis*: in vitro effect of its association with amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, n. 10, p. 6197-6208, 2014.

FISCHER, M., QUAAS, M., STEINER, L. & ENGELAND, K. The p53-p21-DREAM-CDE/CHR pathway regulates G2/M cell cycle genes. *Nucleic Acids Research*, v. 44, n. 1, p. 164-174, 2016.

FREITAS, M. S., COSTA, D. C. F. & CASANOVA, F. A.. “Principais mecanismos de oncogênese”. Em: Bases Moleculares Em Clínica Médica (Alves, P. C. C.; Da Poian, A. T.; Abrahão, A.). Editora Atheneu, São Paulo, 1a Edição, p. 555-571, 2010.

FUKUI, M., YAMABE, N. & ZHU, B. T. Resveratrol attenuates the anticancer efficacy of paclitaxel in human breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. European Journal of Cancer, v. 46, p. 1882-1891, 2010.

GARENALBI, M. & MAHINI, H. Modulation of microRNA 21, 125 b and 451 expression by quercetin intake and exercise in mice fed atherogenic diet. Biomedicine & Preventive Nutrition, v. 4, p. 359-363, 2014.

GEORGAKILAS, A.G., MARTIN, O. A. & BONNER, W.M. p21: A two-faced genome guardian. Trends in Molecular Medicine, V. 23, n. 4, p. 310–319, 2017.

GRIVICICH, I., REGNER, A. & ROCHA, A.B.D. Morte celular por apoptose. Revista Brasileira de Cancerologia, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

HANAHAN, D. & WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. cell, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HANAHAN, D. & WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. cell, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HARBECK, N., SCHMITT, M., VETTER, M., KROL, J., PAEPKE, D., UHLIG, M., ... & SWEEP, F. Prospective biomarker trials Chemo N0 and NNBC-3 Europe validate the clinical utility of invasion markers uPA and PAI-1 in node-negative breast cancer. *Breast Care*, v. 3, n. Suppl. 2, p. 11-15, 2008

HARMER, V. Breast cancer. Part 2: present and future treatment modalities. *British Journal of Nursing*, v. 17, p. 1028-1035, 2008.

HEEBA, G. H. & ABD-ELGHANY, M.I. Effect of combined administration of ginger (*Zingiber officinale Roscoe*) and at orvastatin on the liver of rats. *Phytomedicine*, v. 17, p. 1076-1081, 2010.

HERTOG, M. G., FESKENS, E. J., KROMHOUT, D., HOLLMAN, P. C. H. & KATAN, M. B. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, v. 342, p. 1007–1011, 1993.

HONGMEI, Z. Extrinsic and intrinsic apoptosis signal pathway review. INTECH Open Access Publisher, 2012.

HOSSEINI, A. & GHORBANI, A. Cancer therapy with phytochemicals: evidence from clinical studies. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, v. 5, n. 2, p. 84, 2015.

HOWELLS, L. M., BRITTON, R. G., MAZZOLETTI, M., GREAVES, P., BROGGINI, M., BROWN, K. & SALE, S. Preclinical colorectal cancer chemopreventive efficacy

and p53-modulating activity of 3',4',5'-trimethoxyflavonol, a quercetin analogue. Cancer Prevention Research, v. 3, p. 929–939, 2010.

HSIEH, T.C. & WU, M.J. Suppression of cell proliferation and gene expression by combinatorial synergy of EGCG, resveratrol and  $\gamma$ -tocotrienol in estrogen receptor-positive MCF-7 breast cancer cells. International Journal of Oncology, v. 33, p. 851-859, 2008.

HUBER, L. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. Alimentos e Nutrição, v. 19, n. 1, p. 97-108, 2008.

IARC - International Agency for Research on Cancer. Cancer incidence and mortality worldwide GLOBOCAN. World Health Organization (WHO), 2012. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>. Acessado em 09/04/2017.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil para 2016. Ministério da Saúde, 2015.

INCA, Câncer de mama. Revista Brasileira de Cancerologia, v. 47, n. 1, p. 9-19, 2001.

JAKUBOWICZ-GIL, J., LANGNER, E., BĄDZIUL, D., WERTEL, I. & RZESKI, W. Quercetin and sorafenib as a novel and effective couple in programmed cell death induction in human gliomas. Neurotoxicity Research, v. 26, n. 1, p. 64-77, 2014.

JACOBSON, S.G. & MCINNES, R.R. Blinded by the light. *Nature Genetics*, v. 32, n. 2, p. 215-217, 2002.

JIN, S., ZHANG, Q. Y., KANG, X. M., WANG, J. X. & ZHAO, W. H. Daidzein induces MCF-7 breast cancer cell apoptosis via the mitochondrial pathway. *Annals of Oncology*. v. 21, n. 2, p. 263-8, 2009.

KARTHIKEYAN, S., SRINIVASAN, R., WANI, S. A. & MANOHARAN, S. Chemopreventive potential of chrysins in 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, v. 3, n. 1, p. 46, 2013.

KOFF, J. L., RAMACHANDIRAN, S. & BERNAL-MIZRACHI, L. A time to kill: targeting apoptosis in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, n. 2, p. 2942-2955, 2015.

KONOPKA, K., PRETZER, E., FELGNER, P. L. & DÜZGÜNEŞ, N. Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection increases the sensitivity of macrophages and THP-1 cells to cytotoxicity by cationic liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, v. 1312, n. 3, p. 186-196, 1996.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophages T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.

LIN, L. T., TAI, C. J., SU, C. H., CHANG, F. M., CHOONG, C. Y., WANG, C. K. & TAI, C. J. The ethanolic extract of Taiwanofungus camphoratus (*Antrodia camphorata*) induces cell cycle arrest and enhances cytotoxicity of cisplatin and doxorubicin on human hepatocellular carcinoma cells. BioMed Research International. 2015a.

LIN, M. T., LIN, C. L., LIN, T. Y., CHENG, C. W., YANG, S. F., LIN, C. L. & TSAI, J. P. Synergistic effect of fisetin combined with sorafenib in human cervical cancer HeLa cells through activation of death receptor-5 mediated caspase-8/caspase-3 and the mitochondria-dependent apoptotic pathway. Tumor Biology - Official Journal of the International Society of Oncology and BioMarkers. 2015b.

LOIZZO, M. R., SAID, A., TUNDIS, R., HAWAS, U. W., RASHED, K., MENICHINI, F. & MENICHINI, F. Antioxidant and antiproliferative activity of *Diospyros lotus L.* extract and isolated compounds. Plant Foods for Human Nutrition, v. 64, p. 264–270, 2009.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, v. 193, p. 265-275, 1951.

MALUMBRES, M. & BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. Nature Reviews Cancer, v. 9, n. 3, p. 153-166, 2009.

MARTINS, I. L., CHARNEIRA, C., GANDIN, V., FERREIRA DA SILVA, J. L., JUSTINO, G. C., TELO, J. P. & ANTUNES, A. M. Selenium-containing chrysin and

quercetin derivatives: Attractive scaffolds for cancer therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 58, p. 4250–4265, 2015.

MCCOY, J. Chemotherapy as a treatment for breast cancer. Em: *Breast Cancer Nursing Care and Management* (HARMER, V.). Whurr Publishers, 2003.

MEDIĆ-ŠARIĆ, M., RASTIJA, V. & BOJIĆ, M. Recent advances in the application of high performance liquid chromatography in the analysis of polyphenols in wine and propolis. *Journal of AOAC International*, v. 94, n. 1, p. 32-42, 2011.

MEDINA, J. H., PALADINI, A. C., WOLFMAN, C., DE STEIN, M. L., CALVO, D., DIAZ, L. E. & PEÑA, C. Chrysin (5,7-di-OH-flavone), a naturally-occurring ligand for benzodiazepine receptors, with anticonvulsant properties. *Biochemical Pharmacology*, v. 40, n. 10, p. 2227-31, 1990.

MOLAVI, O., MA, Z., HADDADI, A., LAI, R., GOSSAGE, R. A. & LAVASANIFAR, A. Resveratrol analog trans 3,4,5,4'-tetramethoxystilbene (DMU-212) mediates anti-tumor effects via mechanism different from that of resveratrol. *Cancer Chemotherapy & Pharmacology*, v. 63, n. 1, p. 27-35, 2008.

MOLL, U. M. & PETRENKO, O. The MDM2-p53 interaction. *Molecular Cancer Research*, v. 1, n. 14, p. 1001-1008, 2003.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 63-66, 1983.

OUYANG, L., SHI, Z., ZHAO, S., WANG, F. T., ZHOU, T. T., LIU, B. & BAO, J. K. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell proliferation*, v. 45, n. 6, p. 487-498, 2012.

PARK, M. T. & LEE, S. J. Cell cycle and cancer. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v. 36, n. 1, p. 60-65, 2003.

PICHICHERO, E., CICCONI, R., MATTEI, M. & CANINI, A. Chrysin-induced apoptosis is mediated through p38 and Bax activation in B16-F1 and A375 melanoma cells, *International Journal of Oncology* v. 38, p. 473-483, 2011.

PITOT, H. C. Adventures in hepatocarcinogenesis. *Annual Review of Pathology*, v. 2, p. 1-29, 2007.

POIRIER, M.C. Chemical-induced DNA damage and human cancer risk. *Discovery Medicine*, v. 14, n. 77, p. 283-288, 2012.

PRATHEESHKUMAR, P., SREEKALA, C., ZHANG, Z., BUDHRAJA, A., DING, S., SON, Y. O. & LEE, J. C. Cancer prevention with promising natural products: mechanisms of action and molecular targets. *Anti-Cancer Agents in Medicinal*

Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents), v. 12, n. 10, p. 1159-1184, 2012.

PUSHPAVALLI, G., KALAIARASI, P., VEERAMANI, C. & PUGALENDI, K. V. Effect of chrysin on hepatoprotective and antioxidant status in D-galactosamine-induced hepatitis in rats. European Journal of Pharmacology, v. 10;631, n. 1-3, p. 36-41, 2010.

RAJ, M. H., ELMAGEED, Z. Y. A., ZHOU, J., GAUR, R. L., NGUYEN, L., AZAM, G. A. & OUHTIT, A. Synergistic action of dietary phyto-antioxidants on survival and proliferation of ovarian cancer cells. Journal of Gynecologic Oncology, v. 110, p. 432-438, 2008.

RAMOS, S., ALÍA, M., BRAVO, L. & GOYA, L. Comparative effects of food derived polyphenols on the viability and apoptosis of a human hepatoma cell line (HepG2). Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 53, p. 1271–1280, 2005.

RASHID, S., ALI, N., NAFEES, S., AHMAD, S. T., ARJUMAND, W., HASAN, S. K. & SULTANA, S. Alleviation of doxorubicin-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity by chrysin in Wistar rats. Toxicology Mechanisms and Methods, v. 23, n. 5, p. 337-345, 2013.

RASTOGI, R. P. & SINHA, R. P. Apoptosis: Molecular mechanisms and pathogenicity. Experimental and Clinical Sciences, International Online Journal for Advances in Sciences, v. 2009, n. 8, p. 155-181, 2009.

REHMAN, M. U., TAHIR, M., KHAN, A. Q., KHAN, R., LATEEF, A., QAMAR, W. & SULTANA, S. Chrysin suppresses renal carcinogenesis via amelioration of hyperproliferation, oxidative stress and inflammation: plausible role of NF- $\kappa$ B. *Toxicology Letters*, v. 216, n. 2, p. 146-158, 2013.

RIBOLI, E. & NORAT, T. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 78, p. 559S-569S, 2003.

RIEDL, S.J. & SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 5, n. 11, p. 897-907, 2004.

ROTHBARTH, J., VAHRMEIJER, A. L. & MULDER, G. J. Modulation of cytostatic efficacy of melphalan by glutathione: mechanisms and efficacy. *Chemico-Biological Interactions*, v. 140, p. 93–107, 2002.

SAK, K. Site-specific anticancer effects of dietary flavonoid quercetin. *Nutrition and Cancer*, v. 66, n. 2, p. 177-193, 2014.

SAMARGHANDIAN, S., AZIMI NEZHAD, M. & MOHAMMADI, G. Role of caspases, Bax and Bcl-2 in chrysin-induced apoptosis in the A549 human lung adenocarcinoma epithelial cells. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, v. 14, n. 6, p. 901-909, 2014.

SAMPSON, L., RIMM, E., HOLLMAN, P. C., DE VRIES, J. H. & KATAN, M. B. Flavonol and flavone intakes in US health professionals. Journal of the American Dietetic Association, v. 102, p. 1414–1420, 2002.

SEN, N., DAS, B. Á., GANGULY, A., MUKHERJEE, T., TRIPATHI, G., BANDYOPADHYAY, S. & MAJUMDER, H. K. Camptothecin induced mitochondrial dysfunction leading to programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. Cell Death & Differentiation, v. 11, n. 8, p. 924-36, 2004.

SIDDQUI, I. A., SANNA, V., AHMAD, N., SECHI, M. & MUKHTAR, H. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 1348, n. 1, p. 20-31, 2015.

STRATTON, M. R. Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. Science. v. 25, n. 6024, p. 1553-8, 2011.

SULTANA, S., VERMA, K. & KHAN, R. Nephroprotective efficacy of chrysin against cisplatin-induced toxicity via attenuation of oxidative stress. Journal of Pharmacy and Pharmacology, v. 64, n. 6, p. 872-881, 2012.

SURH, Y. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. Nature, v. 3, p. 768-780, 2003.

TAO, S. F., HE, H. F. & CHEN, Q. Quercetin inhibits proliferation and invasion acts by up-regulating miR-146a in human breast cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 402, p. 93–100, 2015.

TOWBIN, H., STAEHELIN, T. & GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

TSIMPLIOULI, C., DEMETZOS, C., HADZOPOULOU-CLADARAS, M., PANTAZIS, P. & DIMAS, K. *In vitro* activity of dietary flavonol congeners against human cancer cell lines. *European Journal of Nutrition*, v. 51, p. 181–190, 2012.

VAN DER HAGE, J. A., VAN DE VELDE, C. J., JULIEN, J. P., TUBIANA-HULIN, M., VANDERVELDEN, C. & DUCHATEAU, L. Preoperative chemotherapy in primary operable breast cancer: results from the European Organization for Research and Treatment of Cancer trial 10902. *Journal of Clinical Oncology*, v. 19, n. 22, p. 4224-4237, 2001.

VILLAR, I. C., JIMÉNEZ, R., GALISTEO, M., GARCIA-SAURA, M. F., ZARZUELO, A. & DUARTE, J. Effects of chronic chrysin treatment in spontaneously hypertensive rats. *Planta Medica*, v. 68, n. 9, p. 847-50, 2002.

VINCENT, T. L. & GATENBY, R. A. An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. *International Journal of Oncology*, v. 32, p. 729-737, 2008.

VOGELSTEIN, B., LANE, D. & LEVINE, A. J. Surfing the p53 network. *Nature*, v. 408, n. 6810, p. 307-310, 2000.

VOUSDEN, K. H. & PRIVES, C. Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell*, v. 137, n. 3, p. 413-431, 2009.

VUCIC, D.; DIXIT, V.M.; WERTZ, I.E. Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. *Nature reviews Molecular cell biology*, v. 12, n. 7, p. 439-452, 2011.

WAHLE, K.W.J.; BROWN, I., ROTONDO, D.; HEYS, S.D. Plant phenolics in the prevention and treatment of cancer. In: *Bio-Farms for Nutraceuticals*. Springer US, p. 36-51, 2010.

WANG, G., ZHANG, J., LIU, L., SHARMA, S. & DONG, Q. Quercetin potentiates doxorubicin mediated antitumor effects against liver cancer through p53/Bcl-xL. *Plos one*, v. 7, n. 12, p. 1 -12, 2012.

WANG, Y., SERFASS, L., ROY, M. O., WONG, J., BONNEAU, A. M. & GEORGES, E. Annexin-I expression modulates drug resistance in tumor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 314, p. 565–570, 2004.

WHO. (2017). Cancer Fact Sheet. Lyon: France. World Health Organization.

ZHANG, S., YANG, X. & MORRIS, M. E. Flavonoids are inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport. *Molecular Pharmacology*, v. 65, n. 5, p. 1208-1216, 2004.

ZINGUE, S., CISILOTTO, J., TUECHE, A. B., BISHAYEE, A., MEFEGUE, F. A., SANDJO, L. P. & AWOUNFACK, C. F. *Crateva adansonii DC*, an African ethnomedicinal plant, exerts cytotoxicity in vitro and prevents experimental mammary tumorigenesis in vivo. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 190, p. 183-199, 2016.

ZUB, K. A., DE SOUSA, M. M. L., SARNO, A., SHARMA, A., DEMIROVIC, A., RAO, S. & JENSEN, O. N. Modulation of cell metabolic pathways and oxidative stress signaling contribute to acquired melphalan resistance in multiple myeloma cells. *PLOS One*, v. 10, n. 3, p. e0119857, 2015.

## **ANEXO A**

### **Effect of quercetin and chrysin and its association on viability and cell cycle progression in MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cells**

Patrícia Severo Ramos<sup>1</sup>, Jerson Lima e Siva<sup>2</sup>, Eliane Fialho<sup>1\*</sup>

1 Instituto de Nutrição Josué de Castro, Departamento de Nutrição Básica e Experimental, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil

2 Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil

**Keywords:** breast cancer cells/ quercetin/ chrysin/ cell cycle/ apoptosis

\*Corresponding author:

Professor Eliane Fialho de Oliveira, Ph.D.

Departamento de Nutrição Básica e Experimental, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Caixa Postal 68041, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, CEP 21941-590, Brasil

E-mail address: fialho@nutricao.ufrj.br

Telephone number:+51 21 3938 6799

## **Abstract**

Breast cancer is the second most deadly cancer among women. Pharmacological properties of flavonoids have been reported, with an anticancer role amongst them, however, its mechanisms are not elucidated. In this study, the activity of quercetin and chrysin towards MCF-7, MDA-MB-231 and MCF-10A breast cells was investigated. Cells were cultured using standards techniques. Cellular viability was determined by MTT assay, after treatment with the compounds in different concentrations for 24 h. Secondly, cells were treated with fixed concentration of chrysin and different concentrations of quercetin with/without preincubation. Both compounds inhibited cellular proliferation in dose-dependent manner. The combination showed improvement in their citotoxicity, more expressively with preincubation of quercetin. Selectivity index showed that this association was more active in cancer cell lines. Quercetin preicubation induced cell cycle arrest in G0/G1 phase, however did not modify the expression of caspases 3, 7 and 9. Taken together, our results demonstrate that both flavonoids inhibited cells growth in a dose-dependent manner and preincubation of quercetin improved chrysin's effect over the cell lines.

**Keywords:** Breast cancer cells, quercetin, chrysin, cell cycle, apoptosis

## **Introduction**

Breast cancer is the type of cancer that most affects women over the world, both in developing and developed countries. According to data provided by WHO, 571,000 deaths from breast cancer in women were estimated in the year of 2015 worldwide. In general, higher mortality rates are observed in more socioeconomically developed regions. However, this neoplasm is found to be the main cause of death in less favored regions and currently occupies the second position in more developed regions, presenting lower rates only than lung cancer (WHO, 2017).

More than two-thirds of human cancers could be prevented through lifestyle changes. Among cancer cases related to environmental factors, inadequate diet contributes for about 30 % (Wahle, 2010). Thus, many dietary components may increase the risk of developing the disease. However, there is also a great deal of evidence from population-based studies as well as laboratory/experimental studies that proves an inverse relationship between regular consumption of fruits and vegetables and the risk of developing specific cancers (Riboli and Norat, 2003; Boeing et al., 2012).

Donaldson (2004) found out that a balanced diet may be able to reduce the incidence of breast cancer from 60 to 70 %. A rich and varied diet containing fruits and vegetables is recommended as a global priority for cancer prevention, suggesting the ingestion of at least five servings of vegetables per day (Nicklett, 2013). However, an accurate assessment of the biochemical and physiological mechanisms of the nutrients and/or bioactive compounds present in plant foods that are associated with cancer reduction is necessary so that, subsequently, they could be tested in human intervention trials and used as supplements.

Quercetin is the flavonol most commonly found in foods, especially on onion and apple (Djuric et al., 2012). Several studies have shown an association between quercetin and the prevention of non-communicable diseases due to its antioxidant and anti-inflammatory activities (Dorta et al., 2008). Garelnabi et al. (2014) identified beneficial actions of quercetin in the expression of genes linked to cardiovascular activity and cancer signaling pathways in rats submitted to an atherogenic diet and physical exercise. It has also been observed that quercetin acts as a potent inhibitor of xanthine oxidase and lipoxygenase, enzymes involved in processes such as inflammation, atherosclerosis, cancer and aging (Cos et al., 1998). *In vivo* experiments have demonstrated the ability of quercetin to both prevent and inhibit malignant tumors in various animal models. Among the different types of neoplasms in which the chemopreventive properties of this compound have been observed, there are tumors of colon, mouth, cervix and lung (Loizzo et al., 2009; Dajas, 2012; Howells et al., 2010).

Chrysin is a flavone commonly found in honey and propolis (Pichichero et al., 2011; Medic-Saric, 2011). The metabolism of chrysin is not completely elucidated yet, however its beneficial effects have been well studied. This bioactive compound has anti-inflammatory (Bae et al., 2011), anticonvulsants (Medina et al., 1990), antihypertensive (Vilar et al., 2002) and anticancer effects (Pichichero et al., 2011). In addition, it was observed that chrysin induces the inhibition of cell growth and apoptosis in several types of cancer, and has also been shown to be an effective chemopreventive agent in kidney cancer experiments in rats. This compound was able to satisfactorily modulate the toxic effects of chemotherapeutic drugs such as cisplatin and doxorubicin (Martins et al., 2015).

In addition to the studies on isolated bioactive compounds present in foods in the fight against cancer, a strategy that has been investigated is the association between these phytochemicals. Since they normally have different mechanisms of action, the hypothesis is that they could act in several biochemical and molecular processes, thus promoting greater or lesser synergy (Raj et al., 2008).

Thus, the aim of this study was to investigate the possible effects of flavonoids on tumoral and non-tumoral breast cells. Identifying the best combination *in vitro* related to the association between the compounds, analyzing their effect on the type of cell death and the possible pathways of the related signaling.

## **Material and methods**

### **Cell lines and reagents**

Human breast carcinoma cell lines MCF-7, MDA-MB-231 and non-tumorigenic epithelial cell line MCF-10A were obtained from American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA). MCF-7 and MDA-MB-231 cells were cultured in DMEM containing 4.5 g/L glucose, supplemented with 2.0 g/L HEPES, 3.7 g/L sodium bicarbonate, 10 % fetal bovine serum, penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 mg/mL). MCF-10A cells were cultured in DMEM F-12 medium (1:1), supplemented with 10 % fetal bovine serum, 10 µg / mL insulin, 20 ng/mL human epidermal growth factor, 0.5 µg/mL hydrocortisone, penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 mg/ mL). Cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5 % CO<sub>2</sub> (Jin et al. 2009). Quercetin and Chrysin (>99 % pure), were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) and fetal bovine serum (FBS) used in the cell culture methods were products of Gibco (USA). The antibodies anti-caspase-3 (#9662), anti-

caspase 7 (#9492) and anti-caspase-9 (#9502) were purchased from Cell Signaling Technology (CA, USA) and antibody anti-GAPDH (#0411) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). All other chemicals were purchased in the purest form commercially available.

### **Cell viability by 3-(4,5- dimethylthiazol-2- yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay**

Cellular viability was determined by MTT assay, adapted from Mossman (1983). For the treatment of the MCF-7, MDA-MB-231 and MCF-10A cell lines, cultures were made into 96-well plates. Subsequently, the cells were treated with different concentrations of quercetin (0-300 µM) or chrysin (0-300 µM) dissolved in 0.5 % dimethylsulfoxide (DMSO), association between the bioactive compounds and 0.5 % DMSO (Control). Experiments with the treated cells were performed for 24 hours.

After incubation of the cells with the bioactive compounds, the medium was removed and the cells were washed with PBS at 37°C. Then, 100 µL of MTT, diluted in DMEM without phenol red + 10 % fetal bovine serum was added at a concentration of 1 mg/mL. Plates were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5 % CO<sub>2</sub> for 1 hour. After incubation, MTT solution was removed and 200 µL of 100 % DMSO was added. The absorbance was measured by spectrophotometry at a wavelength of 570 nm on Ultra Multifunctional Microplate Reader (SpectraMax® Paradigm® Multi-Mode Microplate Reader). The results obtained in absorbance were expressed as percentage of viable cells relative to control.

### **Trypan blue exclusion assay**

MCF-7 and MDA-MB-231 cells were treated using one concentration of the isolated compounds and analyzed after 24 hours of incubation at 37°C. 10 µL of Trypan Blue solution at 0.04 % was added to 10 µL of cells. After homogenization, 10 µL of the total were used for counting in the Neubauer chamber. This method of cells counting is based on the principle that living cells have an intact membrane and can exclude trypan blue dye while cells in necrosis, late apoptosis or dead, due to the pore formation in its membrane, can incorporate this dye and are marked, allowing a differentiated counting between living and dead cells (Konopka, 1996).

### **Combination Index (CI)**

The combination index (CI) was calculated according to the equation  $CI = D_1/(Dx)_1 + D_2/(Dx)_2$ , where  $D_1$  and  $D_2$  are the concentrations of the compounds in the association which inhibits 50 % of the population, and  $(Dx)_1$  and  $(Dx)_2$  are the  $IC_{50}$  values of the compounds alone as described by Chou (2006). The calculated CI was compared with the reference values reported by Chou (2006) as a semi-quantitative method to describe the intensity of synergism, additivity or antagonism.

### **Selectivity index (SI)**

SI corresponds to the division between the  $IC_{50}$  of the tested compound in the normal cell line and the  $IC_{50}$  of the compound in the tumor lines. ( $SI = IC_{50} \text{ MCF-10A} / IC_{50} \text{ breast cancer cells}$ ). According to Zingue et al. (2016), a selectivity index  $> 1.0$  indicates that the substance used was more active in the tumor cell lines than in the non-tumoral one.

## **DNA content analysis**

Cells were incubated in DMEM medium with 10 µM of quercetin and 100 µM of chrysin with and without preincubation for 24 h. The cells were washed with PBS and fixed in 70 % (vol/vol) ice-cold methanol-PBS for 1 h at 4°C. The fixed cells were washed once with PBS and incubated in DNA content solution (PBS supplemented with 10 g/ml propidium iodide and 20 g/ml RNase) at 37°C for 45 min (Ferreira et al, 2014; Ambit et al., 2008). For each sample, 10,000 events were collected on a BD FACSCalibur (Becton, Dickinson) and analyzed using the CellQuest software.

## **Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay**

The characterization of cell death was investigated by double labelling with propidium iodide (PI) and Annexin-V.

Cells were plated in 24-well plates, and, after 24 hours, treatment was performed with the compounds dissolved in 0.5 % DMSO or with respective volumes of 0.5 % (v/v control) DMSO. The etoposide was used as a positive control for induction of apoptosis (Sen et al., 2004; Molavi et al., 2008). For this assay the eBioscience apoptosis detection kit was used. After incubation for 24 hours, the cells were centrifuged at 2000 rpm for 7 minutes at 4°C and resuspended with PBS twice. They were then incubated with Annexin V-binding buffer for 20 minutes at room temperature and protected from light. After the stated time period, 200 µL of the binding buffer were added and, at the time of reading, 1 µL of PI was added. The analysis were performed by flow cytometry (FACSCalibur) equipped with the CellQuest program (Becton Dickinson, CA). The PI and Annexin-V reading were performed by detector FL-3 and FL-1, respectively.

## **Preparation of cell lysates**

After treatment for 24 h, the cells were washed with PBS and lysed in liquid nitrogen. The cells were then scraped in ice-cold lysis buffer [5 mM Tris–HCl, 10 mM ethylenediamine tetraacetic acid, 5 mM sodium fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylarsine oxide, 1 mM okadaic acid, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (pH 7.4)] with freshly added protease inhibitor cocktail (1.04 mM 4-2-aminoethylbenzenesulfonyl fluoride, 15 mM pepstatin A, 14 mM E-64, 40 mM bestatin, 20 mM leupeptin, and 0.8 mM aprotinin). The lysate was collected, sonicated and cleared by centrifugation at 8,000 rpm for 5 min at 4°C; the supernatant (total cell lysate) was then collected, aliquoted, and stored at -80°C. The protein concentration was determined according to Lowry's method (1951) and bovine serum albumin was used as standard.

## **Western blotting analysis**

Equal amounts of total cellular proteins (100 µg) were resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Immobilon P, Millipore, Bedford, MA). The membranes were blocked for 2 h at 4°C in Tris-buffered saline containing 1 % Tween 20 (TBS-T), and 5 % nonfat milk and incubated overnight with the primary antibody (1:1,000). The membranes were then washed with TBS-T and TBS and incubated with a peroxidase-conjugated secondary antibody (1:5,000) for 2 h. The antibodies used were as follows: anti-Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; 0411), from Santa Cruz Biotechnology, and anti-caspase 9 (#9502), anti-caspase 7 (#9492), anti-caspase 3 (#9662), from Cell Signaling Technology. The immuno-complexes were visualized with the enhanced chemiluminescence (ECL) kit

(Amersham, UK). For every immunoblot assay, equal loading of protein was confirmed by stripping the blot and reprobing with the GAPDH antibody. The quantification of proteins was performed by densitometric analysis of protein bands using ImageJ 1.51j8 Software.

### **Statistical analysis**

Quantitative data represent the mean values with the respective standard error (SE) of the mean corresponding to three or more replicates. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) using the post-hoc multiple comparisons Tukey's test. Data were considered to be statistically significant at  $P \leq 0.05$  using Graph-Pad Prism 6.0 software

## **Results**

### **Effect of quercetin or chrysin treatments on cellular viability of MCF-7 and MDA-MB-231 and MCF-10A**

In the present study, the effects of quercetin or chrysin on MCF-7 (**Figure 1A**), MDA-MB-231 cell lines (**Figure 1B**) and MCF-10A (**Figure 1C**) were analyzed by the MTT assay. This method consisted in a colorimetric assay in which the compound MTT is reduced by the mitochondrial enzymes and, therefore, formazan crystals are formed, which are purplish in color and can be detected by spectrophotometry. The greater intensity of the purplish coloration represents viable mitochondria (Fotakis and Timbrell, 2006).

In the MTT assay it was possible to demonstrate that both quercetin and chrysin reduced cell viability in a dose dependent manner. In the 24-hour treatment, in MCF-7, however, despite the decrease in cell viability, our experiment showed an

$IC_{50}$  of 3mM for quercetin, with a significant decrease in the concentration of 100.0  $\mu$ M, whereas for chrysin, there was a significant decrease in the concentration of 100.0  $\mu$ M, presenting an  $IC_{50}$  of 232.5  $\mu$ M. In MDA-MB-231, when treated with quercetin, a significant reduction was observed only from the concentration of 150.0  $\mu$ M, presenting an  $IC_{50}$  of 415.5  $\mu$ M. In the assay performed using chrysin, this reduction was observable from the concentration of 100.0  $\mu$ M, presenting  $IC_{50}$  of 170.0  $\mu$ M. In the MCF-10A cell line, the treatment with quercetin showed an  $IC_{50}$  of 111.0  $\mu$ M while in the assay performed using chrysin, it was observed an  $IC_{50}$  value of 110.5  $\mu$ M, with the isolated compounds being more cytotoxic in the MCF-10A cell line.

In order to verify if the result observed with the MTT assay caused modification on the cell membrane integrity of MCF-7 and MDA-MB-231, the number of viable cells was estimated with the use of Trypan blue dye (**Figure 2**). This method is based on the fact that intact cells are impermeable to the dye, whereas non-viable cells have permeability since there is pore formation in the cell membrane, which allows the dye to penetrate and color them (Konopka et al., 1996).

It was possible to observe that the treatment with 100.0  $\mu$ M of quercetin or chrysin showed a viability reduction by the trypan blue dyeing method however it did not reflect the result observed with the MTT assay, suggesting that the treatment caused higher damage over the mitochondrial enzymes than over the cell membrane integrity.

## **Effect of compounds association on cellular viability of MCF-7, MDA-MB-231 and MCF-10A**

After observing the effect of the isolated flavonoids and calculating their IC<sub>50</sub> values, a fixed concentration of chrysin was defined, since this compound had the most pronounced effect, which presented a significant decrease in viability but remained below the IC<sub>50</sub>. The concentration defined for chrysin was 100 µM . In order to observe if the association between the compounds would present a more satisfactory result, it was necessary to perform the concentration curve with quercetin plus the fixed concentration of chrysin. In addition, the preincubation of both compounds was performed within one hour in order to observe if there would be alteration of the result obtained, once, according to a study by Dudhatra et al. (2012), quercetin presented a bioenhancer capability when preincubated with other flavonoids or chemotherapeutic drugs (**Table 1**).

The association between the compounds reduced the cell viability in a dose-dependent manner, with quercetin having IC<sub>50</sub> values of 69.4 µM in MCF-7, 45 µM in MDA-MB-231 and 96,5 µM in MCF-10A. When the cells' pre-incubation with the compounds was carried out, it was possible to observe that there was a potentiation of the effect observed in both cancer cell lines, with quercetin showing an IC<sub>50</sub> in MCF-7 of 60.6 µM when it was preincubated and 49.2 µM when chrysin was the preincubated flavonoid. In MDA-MB-231, IC<sub>50</sub> was 43.1 µM when preincubated with quercetin and 82.8 µM when preincubated with chrysin. In MCF-10A, when quercetin was preincubated, the IC<sub>50</sub> value was 99.0 µM and, when chrysin was the preincubated flavonoid, the IC<sub>50</sub> value was 62.7 µM Thus, pre-incubation with quercetin had a better effect on the cell lines. It was also observed that in the MCF-7

cell line, the treatment with 10 µM of quercetin was the one with the most significant decrease when compared to the other concentrations tested in this work.

### Selectivity index (SI)

In order to verify if the association between the flavonoids was more active in the tumor cell lines than in the non-tumoral one and if the pre-incubations potentiated the selectivity of the substances, the compounds SI was calculated. As observed in the **Table 2**, all three treatments showed higher selectivity for the tumor cell lines than the non-tumor one, except with MDA-MB-231 cell line in the treatment with pre-incubation of chrysin, where the treatment was more active in the non-tumoral cell line.

### Combination index

To determine if the effect of the combination of flavonoids would be additive, synergistic or antagonistic, the combination index was calculated. The CI values for each performed treatment were, in MCF-7, 0.450 for the combination without preincubation, 0.447 for the treatment with preincubation of quercetin and 0.444 for the treatment with the preincubation of chrysin, with all the three conditions acting in synergism. In MDA-MB-231, the combination acted in moderate synergism, with the CI for each condition being 0.772, 0.725 and 0.797 for no preincubation, preincubation with quercetin and preincubation with chrysin, respectively. In MCF-10A, however, the combinations acted in antagonism, with the CI for each condition being 1.775, 1.797 and 1.468 for no preincubation, preincubation with quercetin and preincubation with chrysin, respectively (**Table 3**).

## **Effect of treatment with quercetin, chrysin and their association on the DNA content of MCF-7 and MDA-MB-231**

After that preincubation with quercetin was defined as the best treatment to be applied in tumor cell lines and in order to verify the mechanisms underlying the synergy between chrysin plus quercetin in growth inhibition of breast cancer cells, DNA content analysis were performed on both MCF-7 and MDA-MB-231 cells after 24 h of exposure to the treatment, using flow cytometric analysis of cellular DNA content (**Figure 3**).

Co-treatment of MDA-MB-231 cells with 10 µM quercetin plus 100 µM chrysin resulted in a -1.63 fold decrease of cells in the G0/G1 phase at 24 h when compared to control and treatment using either of the two agents alone. The co-treatment of MDA-MB-231 also showed a 4.43 fold increase of cells in the Sub-G0/G1 phase, compared to control and treatments using quercetin, the only exception being the treatment with chrysin alone at Sub-G0/G1, however it did not show significative difference (**Figures 3A, 3B, 3C, 3D**).

When the co-treatment was performed on the MCF-7 cell line, it was observed a 1.35 fold increase in the cells in G0/G1 phase, a 1.3 fold increase in cells in Sub-G0/G1 phase, and a 2.07 fold increase of cells in S phase (**Figure 3E, 3F, 3G, 3H**).

## **Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay**

A double-labeled apoptosis assay was performed with propidium iodide and annexin V, where annexin V binds to phosphatidylserine translocated to the extracellular medium in the cells at the beginning of apoptosis and propidium iodide can intercalate in any DNA, as long as the cell membrane is permeable, thus marking cells in late apoptosis or necrosis.

It was observed that the treatment associating compounds had a satisfactory effect in all tumor cell lines, with the pre-incubation of quercetin and subsequent addition of chrysin showing a 1 fold increase in the amount of cells in late apoptosis in MCF-7 (**Figure 4A**) and increasing in 0.3 fold, the amount of cells in apoptosis in MDA-MB-231 (**Figure 4B**).

**Effect of treatment with quercetin, chrysin and their association on the levels of proteins related to cell death of MCF-7, MDA-MB-231 and MCF-10A**

Protein extracts from the cells treated with 10  $\mu$ M quercetin, 100 $\mu$ M chrysin and their association for 24 hours were submitted to SDS-PAGE. Then Western blotting was performed using antibodies anti-caspase 3, anti-caspase 7, anti-caspase 9 and anti-GAPDH (loading control). Immunoblottings are representative of one experiment. The densitometric analysis of each band was performed using Image J software and the data were expressed as relative arbitrary unit.

In MDA-MB-231 cell line, there was a decrease in the levels of caspase 3 (**Figure 5A**) and 9 (**Figure 5C**), in the latter case for treatments with the associated compounds when compared to control, and being increased when the cells were treated with the isolated compounds, furthermore, there was an increase at the levels of caspase 7 (**Figure 5B**) in both isolated and associated compound treatments.

In the MCF-7 cell line, a decrease in the levels of caspase 7 (**Figure 5D**) was observed when compared to control in all treatments, however when compared to each other, the treatment with the compounds associated showed an increase, which was not considered statistically significant. Regarding to the levels of caspase 9 (**Figure 5E**), the treatments with the isolated compounds showed no difference when compared to control and with each other. The associated treatment caused a

decrease in the expression of this protein. The expression of caspase 3 in MCF-7 cells was not measured because, according to Jänicke (2009), MCF-7 cells do not express detectable levels of caspase 3. These results suggested that the citotoxicity caused by the associated compounds did not lead to cell death by this pathway.

## Discussion

In the present study, it was investigated the effect of the co-treatment of the flavonoids quercetin and chrysin over an estrogen positive receptor human breast cancer cell line derived from an carcinoma in situ (MCF-7) and a triple negative breast cancer cell line, negative for estrogen, progesterone and human epidermal growth factor 2 receptors derived from a metastatic carcinoma (MDA-MB-231).

Thus, these characteristics of the MDA-MB-231 cell line confer greater resistance to different approaches used in chemotherapeutic treatments (Wang et al., 2004). In addition, in order to verify the toxicity of the bioactive compounds in non-tumoral cells, experiments were performed on the normal breast cell line, MCF-10A.

The inhibitory effect of quercetin or chrysin treatments has been described on several types of tumor cells, such as leukemia, colon, ovary carcinoma, breast cancer and lymphoma. Different antiproliferative mechanisms have been suggested to explain these observed effects, among them the reduction of inflammatory metabolites formation, inhibition of the glycolytic pathway, increase in the expression of tumor suppressor genes, decrease in cell cycle gene expression and induction of apoptosis (Jung et al., 2010; Van der Woude et al., 2003; Sak, 2014).

In the present study, the treatment with the associated compounds increased the number of cells in apoptosis, late apoptosis and necrosis in the MCF-7 cell line, being late apoptosis the most statistically significant type of cell death and presenting

a higher cell counting even when compared with the cells incubated with isolated compounds. The same effect was observed in MDA-MB-231, with apoptosis having the highest counting when compared even with the compounds isolated.

One of quercetin and chrysin actions on inhibiting the growth and viability of different tumor lines has been through blocking the cell cycle at different stages, with the exact location of this blocking differing according to the cell type and tumor origin (Rusak et al, 2005; Gibellini et al., 2011, Pichichero et al., 2010). However, the different effects on the cell cycle, observed by these compounds, are related to the condition of the p53 protein of these cells, a tumor suppressor protein that acts as one of the regulators of the cell cycle but, when mutated, it has its function impaired (Lee et al., 2006; Haddad et al., 2006; Mertens-Talcott & Percival, 2005).

Stopping cell cycle progression leads to apoptosis death in malignant cells where it can occur as a result of cytochrome c release, poly-ADP-ribose polymerase cleavage (PARP), and activation of caspases (Braganhol et al., 2006; Aalinkeel et al., 2008; Kuo et al., 2004). In addition, other action by which these flavonoids can act in this pathway is by decreasing the expression of anti-apoptotic proteins, i.e. Bcl-2 and Bcl-xL, and increasing the expression of pro-apoptotic proteins, i.e. Bax (Niu et al., 2011; Granado-Serrano et al., 2006).

In order to assess whether chrysin and quercetin cell growth inhibition is mediated via alterations in cell cycle progression, DNA content analysis in response to the isolated and associated treatments was performed. In this study, we observed that the association of these flavonoids induced a G0/G1 phase arrest in MCF-7 cells and a Sub-G0/G1 phase arrest in MDA-MB-231 cells. A higher counting of cell population in G0/G1 phase was also observed in other cancer cell lines after chrysin or quercetin isolated treatments. Cao et al. (2014) assessed that the treatment with

chrysins induced a decrease in the levels of cyclin D1 and CDK4 in breast cancer cell line MDA-MB-453. Cyclin D1 acts as the regulatory subunit of Cdk4 and contributes to its stability and the progression of cell cycle from G1 to S phase. Chrysins also induced cell cycle arrest in G1 phase in C6 glioma cells, which was caused by the increase of p21<sup>Waf/Cip1</sup> protein levels and suppression of CDK4 and CDK2 kinase activities, which mediate the phosphorylation of retinoblastoma protein (Rb) (Weng et al., 2005). In a study performed by Jeong et al. (2009), it was observed that the treatment of breast cancer cell line Sk-Br3 with 10 µM of quercetin for two and four days also induced cell cycle arrest in G1 phase through dephosphorylation of Rb, they also observed a dramatically increasing of p21, suggesting that quercetin inhibited cyclin-CDK activity through the induction of p21, resulting in a decrease of phosphorylation of Rb.

Nguyen et al. (2017) investigated the possible molecular mechanisms involved in the cytotoxicity of quercetin in MDA-MB-231 cells and observed a significant increase in the levels of p21 and p53 markers, as did the Fas ligand (FasL) protein, a pro apoptotic factor which has the ability to activate the Fas receptor, directing the cell to death by apoptosis. In this same study it was observed that the treatment with 20 µM quercetin for 24 hours showed an increase of approximately 3 folds in the activity of the protein Forkhead box O3 (FOXO3), protein known for its ability to modulate the expression of genes involved in the processes of apoptosis and cell cycle, which also has the FasL protein as a target gene. These results suggest possible signaling pathways for death by apoptosis that are not exclusively related to the increase of caspase expression. This shows an alternative to be investigated, considering that in the present study the expression of caspases 3, 7 and 9 did not

present significative results that lead to the death pathway observed by the treatments performed.

Some studies have recently shown that the combination of chemotherapeutics with phytochemicals may be more effective in the therapy against cancer when compared to its isolated effects. In a study by Casanova et al. (2012), the effects of resveratrol and melphalan isolated and in association showed that the phytochemical improved the effect of the chemotherapeutic drug by upregulation of p53, downregulation of procaspase 8 and activation of procaspase 7 and 9. Li et al. (2007) observed that, when associated with paclitaxel, the phytochemical genistein potentiated its effect significantly, both when administered orally and intravenously. In relation to quercetin used in the present study, it was observed that this compound administration potentiated the bioavailability of chemotherapeutic drugs verapamil, tamoxifen, and paclitaxel by inhibiting P-gp and BCRP efflux pump function and CYP 3A metabolizing enzyme in the intestine on animal models (Choi et al., 2004; Choi & Han, 2004; Shin et al., 2006). A study by Wang et al. (2015) found that the administration of low doses of quercetin (10  $\mu$ M - 50  $\mu$ M) showed the ability to reverse tamoxifen resistance in the MCF-7Ca/TAM-R cell line. A study by Zhang et al. (2004) observed that, among several flavonoids used in breast cancer cell lines with and without multidrugs resistance (MDR), chrysin used in the concentration of 50  $\mu$ M was able to sensitize the resistant cell lines, leaving them with the level of sensitivity to the chemotherapeutic drug mitoxantrone similar to tumor lines that did not present MDR. In addition, this compound was also able to satisfactorily modulate the toxic effects of chemotherapeutic drugs such as cisplatin and doxorubicin, both in renal and hepatic levels in Wistar rats, generating an increase in the activity of antioxidant enzymes, such as catalase and reduced glutathione and a decrease in

the levels of nephrotoxicity markers such as creatinine and blood urea, and markers of hepatotoxicity, such as alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and lactate dehydrogenase (LDH) (Rashid et al., 2013; Sultana et al., 2012).

Also in the study conducted by Casanova et al. (2012), the IC<sub>50</sub> values obtained in breast cancer cells treated with the chemotherapeutic drug melphalan was 110.0 µM and 305.0 µM for MCF-7 and MDA-MB-231, respectively. Considering that in the present study the IC<sub>50</sub> value for quercetin in the treatment associated with 100.0 µM of chrysin was 60.6 µM for MCF-7 cells, 43.1 µM for MDA-MB-231 cells and 99.0 µM for MCF-10A cells, in both tumor cell lines, the treatment with the associated flavonoids obtained an IC<sub>50</sub> below the values observed with the chemotherapeutic drug in the aforementioned study.

Considering that phytochemicals have been extensively investigated for their anticancer activities because of their safety, low toxicity and wide availability (Pratheeshkumar et al., 2012) an IC<sub>50</sub> value below those observed even in chemotherapy treatments known to be applied in clinical practice only reinforces the benefits of the use of these naturally occurring compounds widely found in nature.

The performed treatments showed that the association between the compounds, especially when preincubated with quercetin, potentiated the effect of chrysin on the tumor cell lines, this effect not being observed in the non-tumoral cell line. This result is in accordance with the data presented in the study by Dudhatra et al. (2012), where the bioenhancing effect of quercetin was demonstrated in experimental treatments, with this flavonoid not only potentiating the effect of chemotherapeutic agents, including tamoxifen and doxorubicin, used in the therapy for breast cancer, as well as other phytochemicals, such as epigallocatechin gallate.

However to date there have been no other study observing the association between quercetin and chrysin on breast cancer cell lines.

## **Conclusion**

Taken together, it is possible to conclude that both quercetin and chrysin presented a cytotoxic effect over the studied cancer cell lines, with chrysin being the compound with greater isolated effect. However the association between them showed a more satisfactory result, since the preincubation with quercetin potentiated the effect observed by chrysin in the induction of cell death, presenting greater toxicity in the tumor cell lines observed when compared with the non-tumoral cell line. However this alteration was not observed in the expression of caspases 3, 7 and 9. Further studies need to be performed with the aim of verifying what other cell death pathways will be altered by the treatment performed.

## **References:**

- Aalinkeel, R., Bindukumar, B., Reynolds, J. L., Sykes, D. E., Mahajan, S. D., Chadha, K. C., & Schwartz, S. A. (2008). The dietary bioflavonoid, quercetin, selectively induces apoptosis of prostate cancer cells by down-regulating the expression of heat shock protein 90. *The Prostate*, 68(16), 1773-1789.
- Ambit, A., Fasel, N., Coombs, G. H., & Mottram, J. C. (2008). An essential role for the *Leishmania major* metacaspase in cell cycle progression. *Cell Death & Differentiation*, 15(1), 113-122.

Bae, Y., Lee, S., & Kim, S. H. (2011). Chrysin suppresses mast cell-mediated allergic inflammation: involvement of calcium, caspase-1 and nuclear factor- $\kappa$ B. Toxicology and Applied Pharmacology, 254(1), 56-64

Boeing, H., Bechthold, A., Bub, A., Ellinger, S., Haller, D., Kroke, A., & Stehle, P. (2012). Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. European Journal of Nutrition, 51(6), 637-663.

Braganhel, E., Zamin, L. L., Canedo, A. D., Horn, F., Tamajusku, A. S., Wink, M. R., & Battastini, A. M. (2006). Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line. Anti-cancer Drugs, 17(6), 663-671.

Cao, X. Z., Xiang, H. L., Quan, M. F., & He, L. H. (2014). Inhibition of cell growth by BrMC through inactivation of Akt in HER2/neu overexpressing breast cancer cells. Oncology Letters, 7(5), 1632-1638.

Casanova, F., Quarti, J., da Costa, D. C. F., Ramos, C. A., da Silva, J. L., & Fialho, E. (2012). Resveratrol chemosensitizes breast cancer cells to melphalan by cell cycle arrest. Journal of Cellular Biochemistry, 113(8), 2586-2596.

Choi, J. S., & Han, H. K. (2004). The effect of quercetin on the pharmacokinetics of verapamil and its major metabolite, norverapamil, in rabbits. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 56(12), 1537-1542.

Choi, J. S., Jo, B. W., & Kim, Y. C. (2004). Enhanced paclitaxel bioavailability after oral administration of paclitaxel or prodrug to rats pretreated with quercetin. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 57(2), 313-318.

CHOU, T. C. (2006) Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. Pharmacol Rev. 58, 621–681.

Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J. P., Cimanga, K., Van Poel, B., & Berghe, D. V. (1998). Structure– activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. Journal of Natural Products, 61(1), 71-76.

Dajas, F. (2012). Life or death: neuroprotective and anticancer effects of quercetin. Journal of Ethnopharmacology, 143(2), 383-396.

Djuric, Z., Severson, R. K., & Kato, I. (2012). Association of dietary quercetin with reduced risk of proximal colon cancer. Nutrition and cancer, 64(3), 351-360.

Donaldson, M. S. (2004). Nutrition and cancer: a review of the evidence for an anti-cancer diet. Nutrition Journal, 3(1), 19.

Dorta, D. J., Pigoso, A. A., Mingatto, F. E., Rodrigues, T., Pestana, C. R., Uyemura, S. A., & Curti, C. (2008). Antioxidant activity of flavonoids in isolated mitochondria. Phytotherapy Research, 22(9), 1213-1218.

Dudhatra, G. B., Mody, S. K., Awale, M. M., Patel, H. B., Modi, C. M., Kumar, A., & Chauhan, B. N. (2012). A comprehensive review on pharmacotherapeutics of herbal bioenhancers. *The Scientific World Journal*, 2012, 1-33

Ferreira, C., Soares, D. C., do Nascimento, M. T. C., Pinto-da-Silva, L. H., Sarzedas, C. G., Tinoco, L. W. & Saraiva, E. M. (2014). Resveratrol is active against *Leishmania amazonensis*: *in vitro* effect of its association with amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(10), 6197-6208.

Fotakis, G., & Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology letters*, 160(2), 171-177.

Garelnabi, M., & Mahini, H. (2014). Modulation of microRNA 21, 125 b and 451 expression by quercetin intake and exercise in mice fed atherogenic diet. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 4(3), 359-363.

Gibellini, L., Pinti, M., Nasi, M., Montagna, J. P., De Biasi, S., Roat, E., & Cossarizza, A. (2011). Quercetin and cancer chemoprevention. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.

Granado-Serrano, A. B., Martín, M. A., Bravo, L., Goya, L., & Ramos, S. (2006). Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition

of PI-3-kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). The Journal of Nutrition, 136(11), 2715-2721.

Haddad, A. Q., Venkateswaran, V., Viswanathan, L., Teahan, S. J., Fleshner, N. E., & Klotz, L. H. (2006). Novel antiproliferative flavonoids induce cell cycle arrest in human prostate cancer cell lines. Prostate Cancer and Prostatic Diseases, 9(1), 68-76.

Howells, L. M., Britton, R. G., Mazzoletti, M., Greaves, P., Broggini, M., Brown, K., & Sale, S. (2010). Preclinical colorectal cancer chemopreventive efficacy and p53-modulating activity of 3', 4', 5'-trimethoxyflavonol, a quercetin analogue. Cancer Prevention Research, 3(8), 929-939.

WHO. (2017). Cancer Fact Sheet. Lyon: France. World Health Organization.

Jänicke, R. U. (2009). MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3. Breast cancer research and treatment, 117(1), 219-221.

Jeong, J. H., An, J. Y., Kwon, Y. T., Rhee, J. G., & Lee, Y. J. (2009). Effects of low dose quercetin: Cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. Journal of Cellular Biochemistry, 106(1), 73-82.

Jin, S., Zhang, Q. Y., Kang, X. M., Wang, J. X., & Zhao, W. H. (2009). Daidzein induces MCF-7 breast cancer cell apoptosis via the mitochondrial pathway. Annals of Oncology, 21(2), 263–268

Jung, J. H., Lee, J. O., Kim, J. H., Lee, S. K., You, G. Y., Park, S. H., & Kim, H. S. (2010). Quercetin suppresses HeLa cell viability via AMPK-induced HSP70 and EGFR down-regulation. *Journal of Cellular Physiology*, 223(2), 408-414.

Konopka, K., Pretzer, E., Felgner, P. L., & Düzgüneş, N. (1996). Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection increases the sensitivity of macrophages and THP-1 cells to cytotoxicity by cationic liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1312(3), 186-196.

Kuo, P. C., Liu, H. F., & Chao, J. I. (2004). Survivin and p53 modulate quercetin-induced cell growth inhibition and apoptosis in human lung carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(53), 55875-55885.

Lee, T. J., Kim, O. H., Kim, Y. H., Lim, J. H., Kim, S., Park, J. W., & Kwon, T. K. (2006). Quercetin arrests G2/M phase and induces caspase-dependent cell death in U937 cells. *Cancer Letters*, 240(2), 234-242.

Li, X., & Choi, J. S. (2007). Effect of genistein on the pharmacokinetics of paclitaxel administered orally or intravenously in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, 337(1), 188-193.

Loizzo, M. R., Said, A., Tundis, R., Hawas, U. W., Rashed, K., Menichini, F., & Menichini, F. (2009). Antioxidant and antiproliferative activity of *Diospyros lotus L.* extract and isolated compounds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64(4), 264.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.

Ma, Z., Molavi, O., Haddadi, A., Lai, R., Gossage, R. A., & Lavasanifar, A. (2008). Resveratrol analog trans 3, 4, 5, 4'-tetramethoxystilbene (DMU-212) mediates anti-tumor effects via mechanism different from that of resveratrol. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 63(1), 27-35.

Martins, I. L., Charneira, C., Gandin, V., Ferreira da Silva, J. L., Justino, G. C., Telo, J. P., & Antunes, A. M. (2015). Selenium-containing chrysins and quercetin derivatives: attractive scaffolds for cancer therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(10), 4250-4265.

Medić-Šarić, M., Rastija, V., & Bojić, M. (2011). Recent advances in the application of high performance liquid chromatography in the analysis of polyphenols in wine and propolis. *Journal of AOAC International*, 94(1), 32-42.

Medina, J. H., Paladini, A. C., Wolfman, C., de Stein, M. L., Calvo, D., Diaz, L. E., & Peña, C. (1990). Chrysins (5, 7-di-OH-flavone), a naturally-occurring ligand for benzodiazepine receptors, with anticonvulsant properties. *Biochemical Pharmacology*, 40(10), 2227-2231.

Mertens-Talcott, S. U., & Percival, S. S. (2005). Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells. *Cancer Letters*, 218(2), 141-151.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.

Nguyen, L. T., Lee, Y. H., Sharma, A. R., Park, J. B., Jagga, S., Sharma, G., & Nam, J. S. (2017). Quercetin induces apoptosis and cell cycle arrest in triple-negative breast cancer cells through modulation of Foxo3a activity. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 21(2), 205-213.

Nicklett, E. J., & Kadell, A. R. (2013). Fruit and vegetable intake among older adults: a scoping review. *Maturitas*, 75(4), 305-312.

Niu, G., Yin, S., Xie, S., Li, Y., Nie, D., Ma, L., & Wu, Y. (2011). Quercetin induces apoptosis by activating caspase-3 and regulating Bcl-2 and cyclooxygenase-2 pathways in human HL-60 cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 43(1), 30-37.

Pichichero, E., Cicconi, R., Mattei, M., & Canini, A. (2011). Chrysin-induced apoptosis is mediated through p38 and Bax activation in B16-F1 and A375 melanoma cells. *International Journal of Oncology*, 38(2), 473.

Pichichero, E., Cicconi, R., Mattel, M., Muzi, M. G., & Canini, A. (2010). Acacia honey and chrysin reduce proliferation of melanoma cells through alterations in cell cycle progression. *International Journal of Oncology*, 37(4), 973.

Pratheeshkumar, P., Sreekala, C., Zhang, Z., Budhraja, A., Ding, S., Son, Y. O., ... & Lee, J. C. (2012). Cancer prevention with promising natural products: mechanisms of action and molecular targets. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 12(10), 1159-1184.

Raj, M. H., Elmageed, Z. Y. A., Zhou, J., Gaur, R. L., Nguyen, L., Azam, G. A., ... & Ouhtit, A. (2008). Synergistic action of dietary phyto-antioxidants on survival and proliferation of ovarian cancer cells. *Gynecologic Oncology*, 110(3), 432-438.

Rashid, S., Ali, N., Nafees, S., Ahmad, S. T., Arjumand, W., Hasan, S. K., & Sultana, S. (2013). Alleviation of doxorubicin-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity by chrysin in Wistar rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 23(5), 337-345.

Riboli, E., & Norat, T. (2003). Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(3), 559S-569S.

Rusak, G., Gutzeit, H. O., & Müller, J. L. (2005). Structurally related flavonoids with antioxidative properties differentially affect cell cycle progression and apoptosis of human acute leukemia cells. *Nutrition Research*, 25(2), 143-155.

Sak, K. (2014). Site-specific anticancer effects of dietary flavonoid quercetin. *Nutrition and Cancer*, 66(2), 177-193.

Sen, N., Das, B. Á., Ganguly, A., Mukherjee, T., Tripathi, G., Bandyopadhyay, S., ... & Majumder, H. K. (2004). Camptothecin induced mitochondrial dysfunction leading to programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. *Cell Death & Differentiation*, 11(8), 924-936.

Shin, S. C., Choi, J. S., & Li, X. (2006). Enhanced bioavailability of tamoxifen after oral administration of tamoxifen with quercetin in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, 313(1), 144-149.

Sultana, S., Verma, K., & Khan, R. (2012). Nephroprotective efficacy of chrysin against cisplatin-induced toxicity via attenuation of oxidative stress. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64(6), 872-881.

van der Woude, H., Gliszczyńska-Świgło, A., Struijs, K., Smeets, A., Alink, G. M., & Rietjens, I. M. (2003). Biphasic modulation of cell proliferation by quercetin at concentrations physiologically relevant in humans. *Cancer Letters*, 200(1), 41-47.

Villar, I. C., Jiménez, R., Galisteo, M., Garcia-Saura, M. F., Zarzuelo, A., & Duarte, J. (2002). Effects of chronic chrysin treatment in spontaneously hypertensive rats. *Planta Medica*, 68(09), 847-850.

Wahle, K.W.J.; Brown, I., Rotondo, D.; Heys, S. D. (2010). Plant phenolics in the prevention and treatment of cancer. In: Bio-Farms for Nutraceuticals. Springer US, p. 36-51.

Wang, Y., Serfass, L., Roy, M. O., Wong, J., Bonneau, A. M., & Georges, E. (2004). Annexin-I expression modulates drug resistance in tumor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 314(2), 565-570.

Weng, M. S., Ho, Y. S., & Lin, J. K. (2005). Chrysin induces G1 phase cell cycle arrest in C6 glioma cells through inducing p21 Waf1/Cip1 expression: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochemical Pharmacology*, 69(12), 1815-1827.

Zhang, S., Yang, X., & Morris, M. E. (2004). Flavonoids are inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport. *Molecular Pharmacology*, 65(5), 1208-1216.

Zingue, S., Cisilotto, J., Tueche, A. B., Bishayee, A., Mefegue, F. A., Sandjo, L. P., & Awounfack, C. F. (2016). *Crateva adansonii DC*, an African ethnomedicinal plant, exerts cytotoxicity in vitro and prevents experimental mammary tumorigenesis *in vivo*. *Journal of Ethnopharmacology*, 190, 183-199.

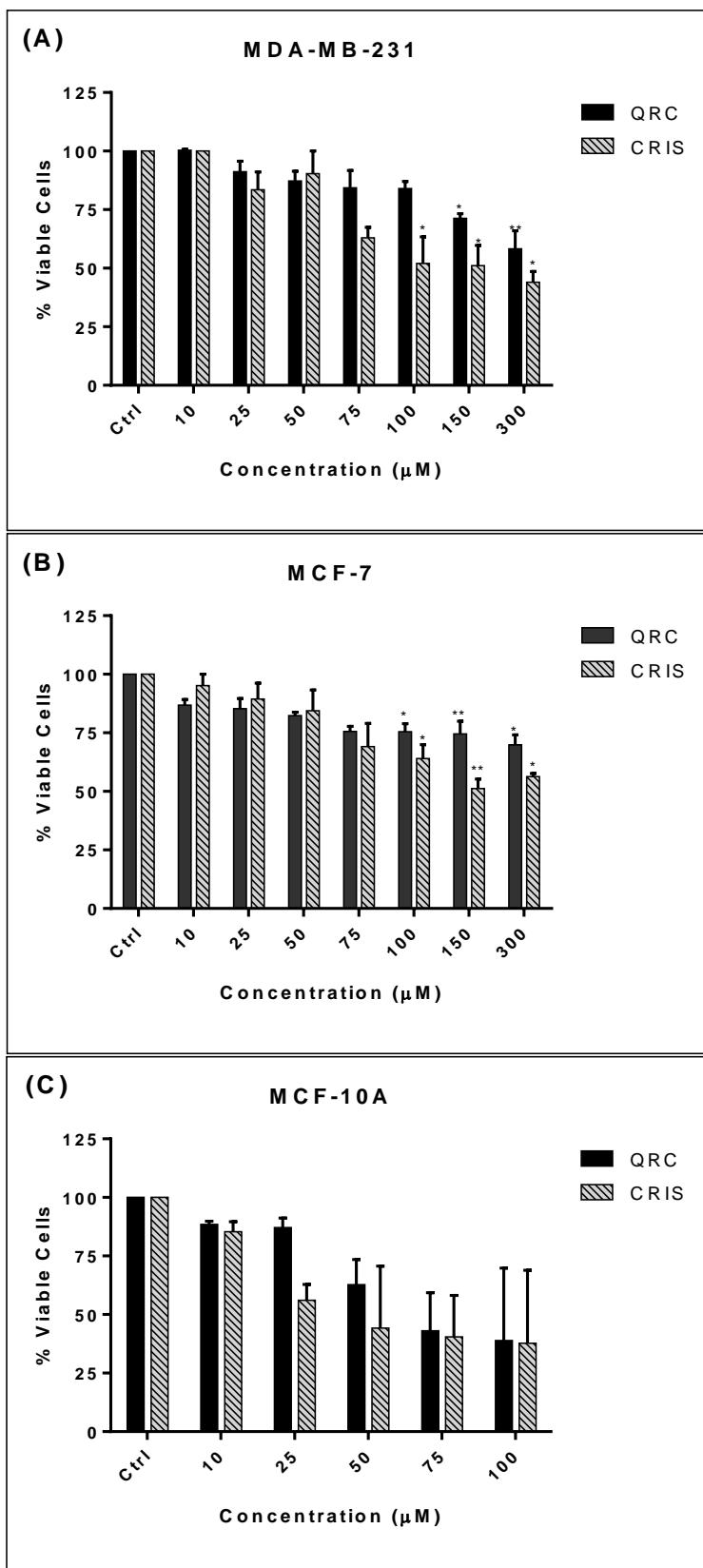


Figure 1

Severo et al., 2017.

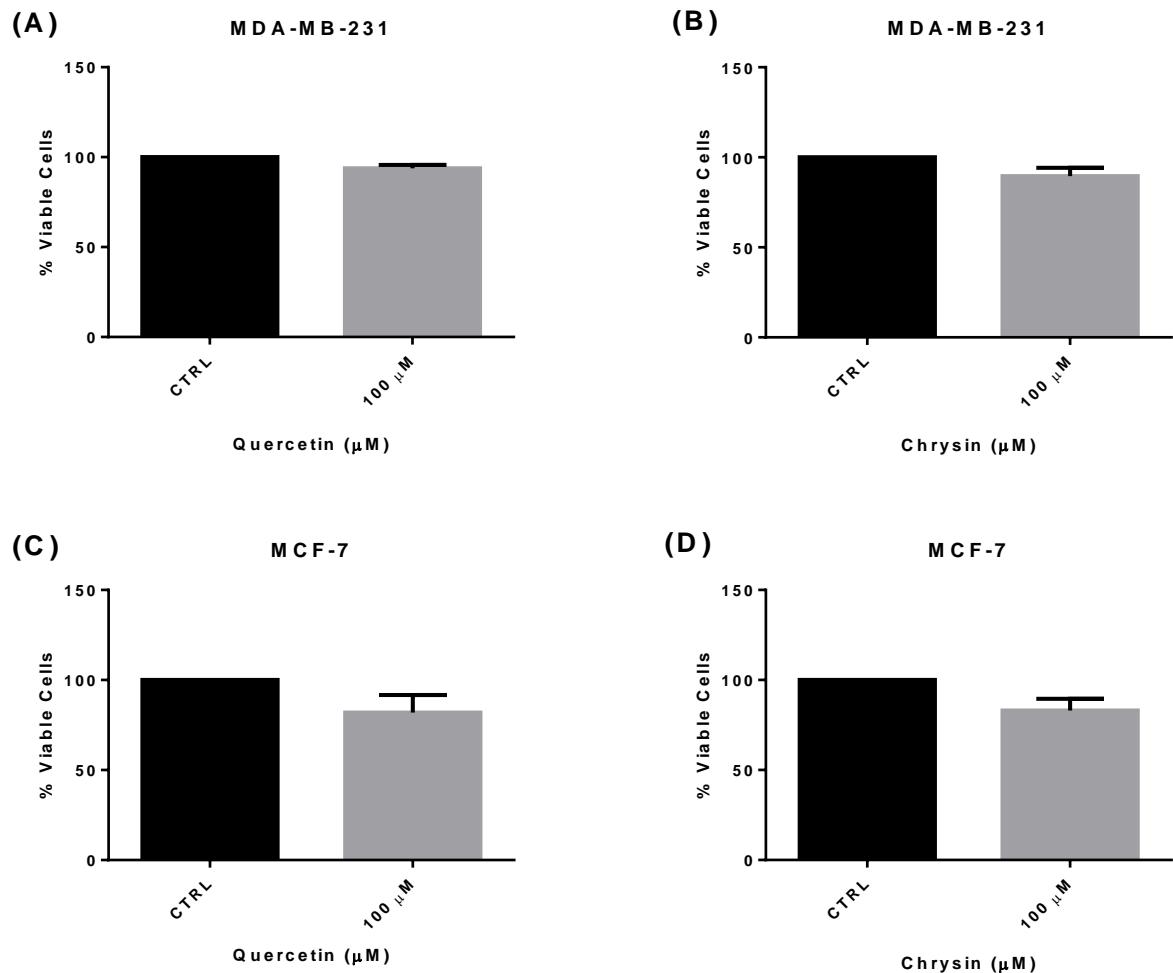
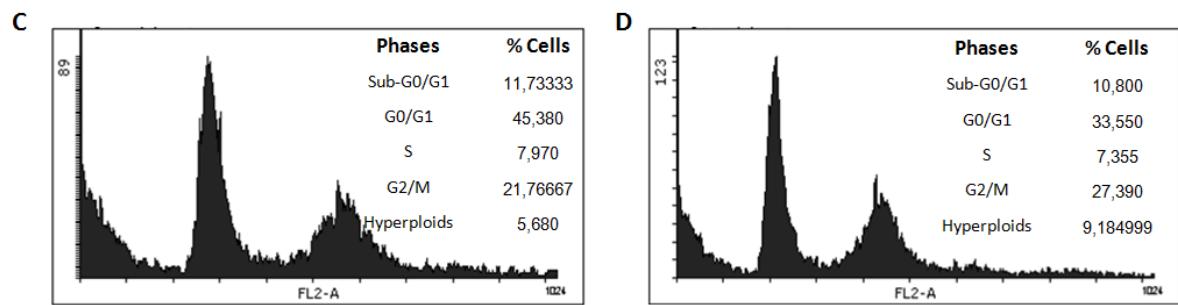
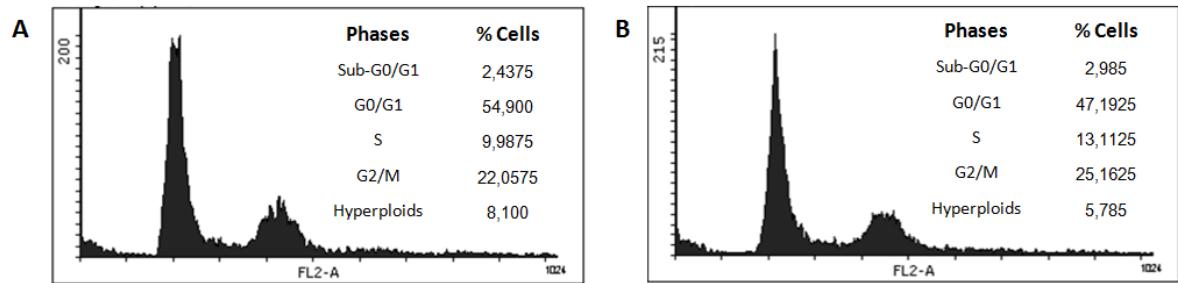


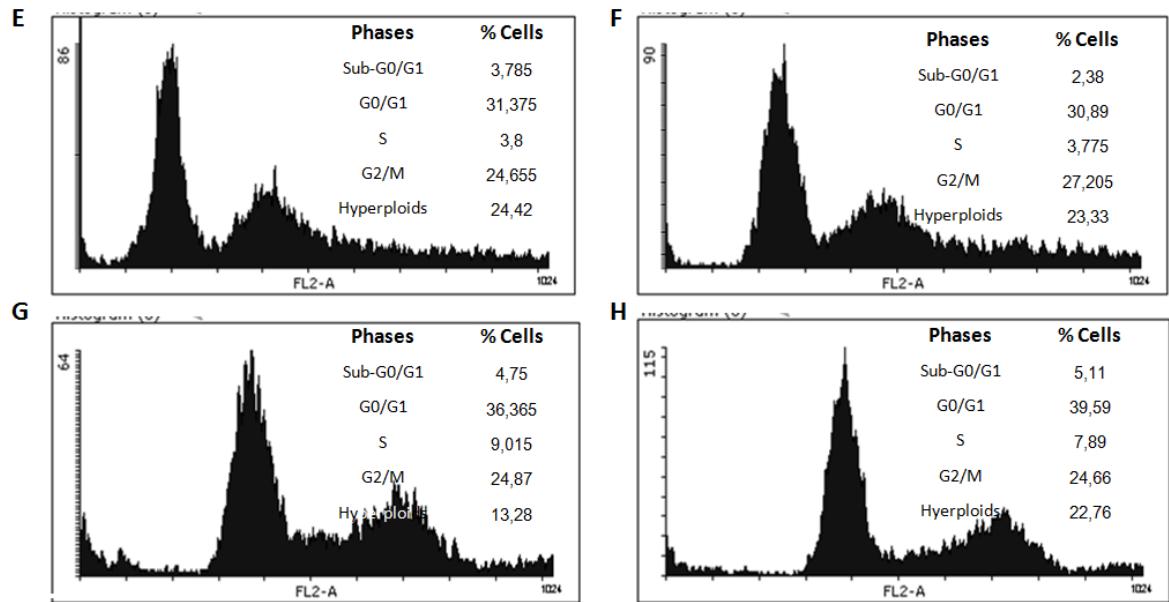
Figure 2

Severo et al., 2017.

### MDA-MB-231



### MCF-7



**Figure 3**

Severo et al., 2017.

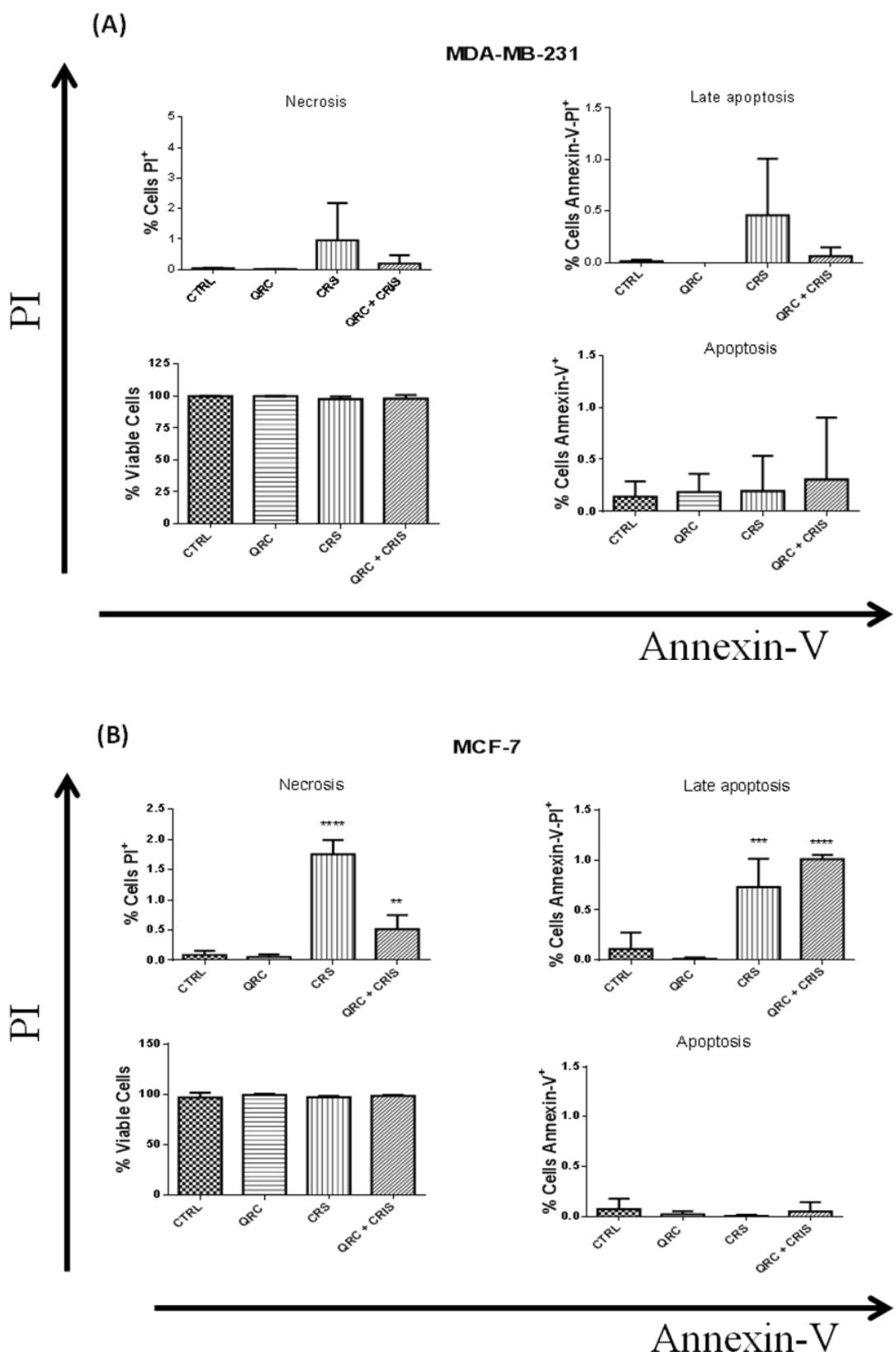


Figure 4

Severo et al., 2017.

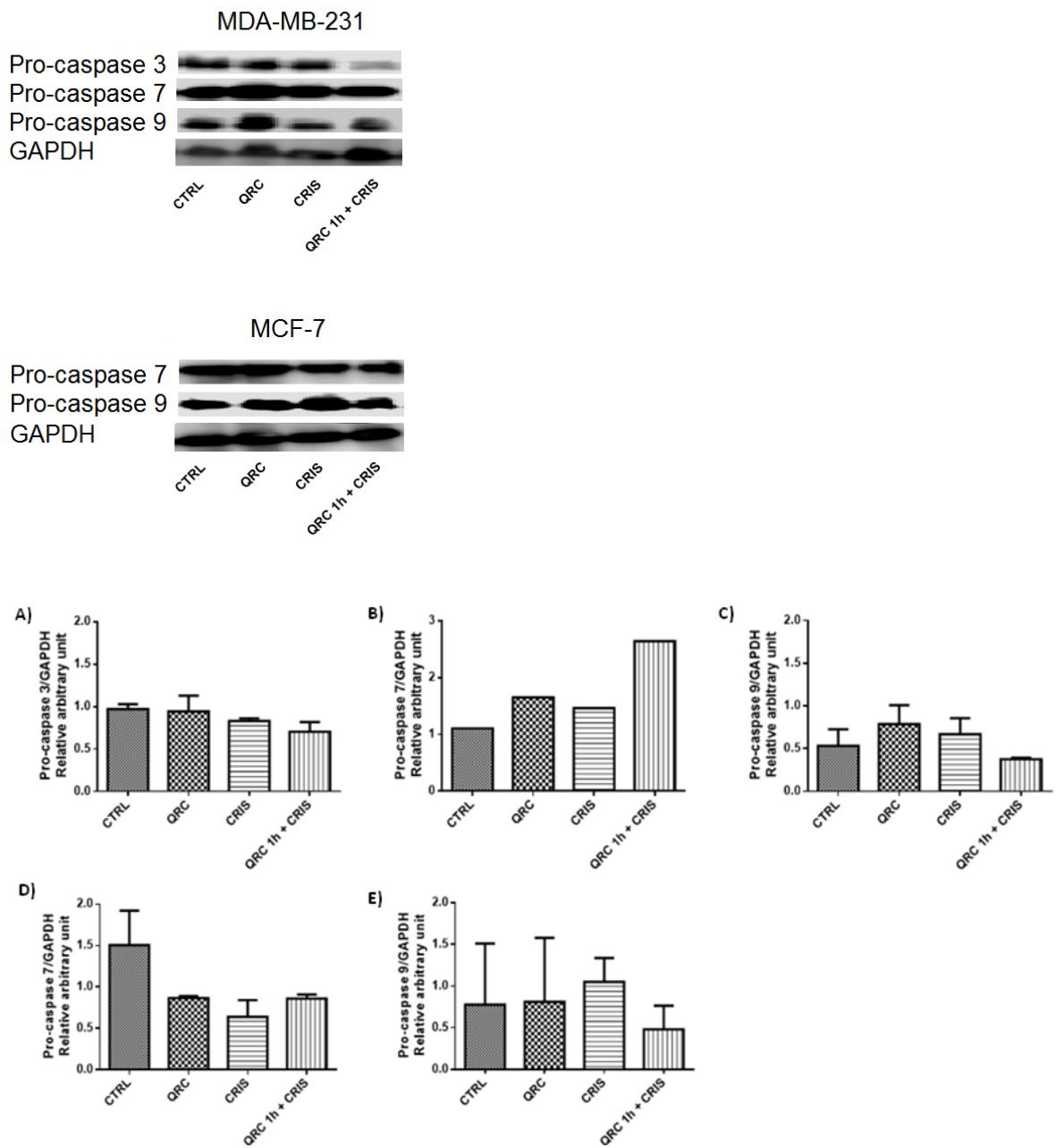


Figure 5

Severo et al., 2017.

**TABLE 1** IC<sub>50</sub> values of quercetin, chrysin and their associations in the culture of breast cancer cells MCF-7 and MDA-MB-231 and non-tumor breast cell MCF-10A for 24 hours of treatment.

	IC <sub>50</sub>		
	MCF-7	MDA-MB-231	MCF-10A
QRC	3000.0 μM	415.5 μM	111.0 μM
CRIS	232.5 μM	170.0 μM	110.3 μM
QRC + CRIS <sup>#</sup>	69.4 μM	45.0 μM	96.5 μM
QRC (1h before) + CRIS <sup>#</sup>	60.6 μM	43.1 μM	99.0 μM
QRC + CRIS <sup>#</sup> (1h before)	49.2 μM	82.8 μM	62.7 μM

# 100.0 μM

**TABLE 2** Selectivity Index of the combination of quercetin and chrysin.

	Selectivity Index	
	MCF-10A/MCF-7	MCF-10A/MDA-MB-231
QRC + CRIS <sup>#</sup>	1.39	2.14
QRC (1h before) + CRIS <sup>#</sup>	1.63	2.29
QRC + CRIS <sup>#</sup> (1h before)	1.27	0.75

# 100.0 μM

**TABLE 3** Combination Index and effect of the combination of quercetin, chrysin.

	Combination Index		
	MCF-7	MDA-MB-231	MCF-10A
QRC + CRIS <sup>#</sup>	0.450 (Sinergism)	0.772 (Moderate Sinergism)	1.775 (Antagonism)
QRC (1h before) + CRIS <sup>#</sup>	0.447 (Sinergism)	0.725 (Moderate Sinergism)	1.797 (Antagonism)
QRC + CRIS <sup>#</sup> (1h before)	0.444 (Sinergism)	0.797 (Moderate Sinergism)	1.468 (Antagonism)

# 100.0 μM

**TABLE 4** Effect of quercetin, chrysin and their association on the distribution of the cell cycle phases of MDA-MB-231 and MCF-7 cells after treatment for 24 hours.

MDA-MB-231				
Phases	CTRL	QRC	CRIS	QRC + CRIS
Sub-G0/G1	2.437	11.733	2.985	10.800
G0/G1	54.900	45.380	47.192	33.550
S	9.987	7.970	13.112	7.355
G2/M	22.057	21.767	25.162	27.390
Hyperploids	8.100	5.680	5.785	9.185

MCF-7				
Phases	CTRL	QRC	CRIS	QRC + CRIS
Sub-G0/G1	3.785	4.750	2.380	5.110
G0/G1	31.375	36.365	30.890	39.590
S	3.800	9.015	3.775	7.890
G2/M	24.655	24.870	27.205	24.660
Hyperploids	24.420	13.280	23.330	22.760

## **FIGURE CAPTIONS**

**FIGURE 1** Effect of quercetin and chrysin on cellular viability of MDA-MB-231 (A), MCF-7 (B) and MCF-10A (C) cells during 24 hours of treatment by MTT assay. Cells were seeded in 96-well plates in D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) with 10 % Fetal Bovine Serum, 2.0 g/L HEPES, penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 mg/ mL) at 37°C in humidified air containing 5 % CO<sub>2</sub>. Quercetin (A) and chrysin (B) was added at different concentrations as shown on x-axis, for 24 h and viability by MTT assay was performed immediately after. The results are expressed as % of the control. Values represent means ± SE (n=3). \*P≤ 0.05, \*\*P≤ 0.002, compared to the control.

**FIGURE 2** Effect of quercetin and chrysin on cellular viability of MDA-MB-231 and MCF-7 cells during 24 hours of treatment by Trypan blue exclusion assay. Cells were seeded in 96-well plates in D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) with 10% Fetal Bovine Serum, 2.0 g/L HEPES, penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 mg/ mL) at 37°C in humidified air containing 5% CO<sub>2</sub>. Flavonoids were added at the concentration of 100.0 µM as shown on x-axis (**A** - MDA-MB-231 with quercetin, **B** - MDA-MB-231 with chrysin, **C** - MCF-7 with quercetin, **D** - MCF-7 with chrysin), for 24 h and viability by trypan blue exclusion was performed immediately after. The results are expressed as % of the control.

**FIGURE 3** DNA content analysis of MCF-7 and MDA-MB-231 cells at the conditions (**A**) MDA-MB-231 cells with DMSO 0.5 %, (**B**) MDA-MB-231 cells with quercetin 10.0 µM, (**C**) MDA-MB-231 cells with chrysin 100.0 µM, (**D**) MDA-MB-231 cells with quercetin 10.0 µM and chrysin 100.0 µM, (**E**) MCF-7 cells with DMSO 0.5%, (**F**)

MCF-7 cells with quercetin 10.0  $\mu$ M, (G) MCF-7 cells with chrysin 100.0  $\mu$ M and (H) MCF-7 cells with quercetin 10.0  $\mu$ M and chrysin 100.0  $\mu$ M. Cells were washed with PBS and fixed in 70 % (vol/vol) ice-cold methanol-PBS for 1 h at 4°C, after that, the fixed cells were incubated in cell cycle solution at 37°C for 45 min and analyzed by Flow Cytometer. Representative plots of at least 2 independent experiments.

**FIGURE 4** Effect of quercetin, chrysin and their association on cell death type of MDA-MB-231 (A) and MCF-7 (B) cells during 24 hours of treatment. Cells were treated with 100  $\mu$ M of chrysin and 10  $\mu$ M of quercetin. Then they were labeled with Annexin V-FITC and propidium iodide and the result was analyzed by flow cytometer. The results are expressed as mean and standard error ( $n = 3$ ). \* $P \leq 0.05$  (One-way ANOVA followed by Tukey's test), compared to control cells and treatments.

**FIGURE 5** Effects of quercetin (QRC), chrysin (CRIS) and their association on the levels of proteins related to cell death. The cells were exposed to the conditions: DMSO 0.5%, quercetin 10.0  $\mu$ M, chrysin 100.0  $\mu$ M and quercetin 10.0  $\mu$ M plus chrysin 100.0  $\mu$ M. Being (A) Pro-caspase 3 levels in MDA-MB-231, (B) Pro-caspase 7 levels in MDA-MB-231, (C) Pro-caspase 9 levels in MDA-MB-231, (D) Pro-caspase 7 levels in MCF-7, (E) Pro-caspase 9 levels in MCF-7.