UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO

Renata Madureira Polinati da Silva

COMPOSTOS BIOATIVOS DE ESPECIARIAS E SEUS EFEITOS ISOLADOS E COMBINADOS EM CULTURAS DE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA

Rio de Janeiro

2015

Renata Madureira Polinati da Silva

COMPOSTOS BIOATIVOS DE ESPECIARIAS E SEUS EFEITOS ISOLADOS E COMBINADOS EM CULTURAS DE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Doutor em Ciências Nutricionais.

Orientador: Prof.ª Eliane Fialho de Oliveira

Rio de Janeiro

2015

Renata Madureira Polinati da Silva

COMPOSTOS BIOATIVOS DE ESPECIARIAS E SEUS EFEITOS ISOLADOS E COMBINADOS EM CULTURAS DE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA

Banca examinadora:

Prof.ª Dr.ª Eliane Fialho de Oliveira

Prof.ª Associada do Departamento de Nutrição Básica e Experimental/ INJC / UFRJ

Orientadora

Prof.º Dr.º Anderson Junger Teodoro

Prof.º Adjunto da Escola de Nutrição/UNIRIO

Revisor

Prof.ª Dr.ª Juliany Cola Fernandes Rodrigues

Prof.ª Adjunta do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/UFRJ-Xerém

Membro titular externo

Prof.ª Dr.ª Danielly Cristiny ferraz da Costa

Prof.ª Adjunta do Instituto de Nutrição/UERJ

Membro titular externo

Prof.ª Dr.ª Anna Paola Trindade Rocha Pierucci

Prof.ª Associada do Departamento de Nutrição Básica e Experimental/ INJC / UFRJ

Membro titular interno

Prof.ª Dr.ª Avany Fernandes Pereira

Prof.ª Associada do Departamento de Nutrição e Dietética/ INJC / UFRJ

Membro titular interno

Prof.ª Dr.ª Mariana Monteiro

Prof.ª Adjunta do Departamento de Nutrição Básica e Experimental/ INJC / UFRJ

Suplente Interno

Prof. Dr.º Julio Beltrame Daleprane

Prof.º Adjunto do Departamento de Nutrição Básica Experimental/UERJ

Suplente externo

FICHA CATALOGRÁFICA

da Silva, Renata Madureira Polinati

Compostos bioativos de especiarias e seus efeitos isolados e combinados em culturas de células de câncer de mama/ Renata Madureira Polinati da Silva. Rio de Janeiro: UFRJ/INJC, 2015

Nº de folhas C, 129 p.

Tese: Doutor em Ciências Nutricionais – Universidade Federal do Rio de Janeiro, INJC

1. Células de câncer de mama 2. Combinação de compostos 3. Curcumina 4. Piperina 5. Melfalan 6. Antagonismo

I. Compostos Bioativos de Especiarias e Seus Efeitos Isolados e Associados em Culturas de Células de Câncer de Mama

II. Doutor.

Aos meus pais, Raquel e Renato

À minha irmã, Natália e sobrinho Miguel

Ao meu namorado, Bruno

À minha amiga Julia e

À Deus sobre todas as coisas

Pelo amor, dedicação, compreensão, apoio e sonho compartilhado.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Eliane Fialho, por durante todos estes anos ser mais que uma orientadora, uma verdadeira mãe científica. Por despertar em mim, os meus primeiros desejesos de ser uma professora e pesquisadora. Pela confiança, compreensão e carinho compartilhado dentro do laboratório e na vida pessoal. Obrigada por me transformar na pessoa e profissional que sou hoje. Você é um exemplo de profissional!

À minha querida amiga Julia Quarti. Por toda a sua amizade, carinho, companheirismo e todos os melhores adjetivos que existem. Por compartilhar os momentos felizes e difíceis da minha vida, sempre estando ao meu lado sem julgamentos. Por se envolver nesta tese, as vezes, muito mais do que eu, e por me ajudar em todos os momentos e etapas: intelectual, prática e emocional. Obrigada por ser o "carrapatinho" mais amado deste mundo e por morar comigo nos EUA via skype. Tenho certeza que esta tese também é sua e que a nossa amizade está muito além das bancadas e pipetas. Tenho certeza que nada disso teria acontecido desta forma se não fosse por você. Amo você e sua famíla: Denise, Luis Paulo, Isabela, Milla Burns, Elis Flor de Lis e Xena Maria. Obrigada por tudo o que vocês fizeram e são por mim!!!

Às minhas queridas alunas de IC emprestadas Íris Leite e Érika Ferreira. Obrigada Íris por se envolver de maneira tão responsável e dedicada aos experimentos. Por ser uma companhia que tornou as horas dentro do laboratório, com certeza, mais divertidas. Tenho certeza que você será uma excelente profissional. Obrigada Érika, por sempre estar disposta a ajudar e a colaborar no que fosse preciso. Com certeza, sem a sua ajuda, tudo teria sido mais difícil. Admiro muito sua força de vontade e sua responsabilidade.

À minha querida amiga Christiane de Queiroz. Amiga de tantos anos e que me ensinou também a ser uma pesquisadora. Obrigada por me ajudar com a tese e a traçar um plano B, que se tornou mais complexo e difícil que o plano A. Tenho certeza que você nasceu para ser pesquisadora e que por isso, desvendaremos este mistério da curcumina e piperina. Hoje, juntas, estamos na luta pelo nosso sonho e tenho certeza que sua hora vai chegar. Espero que possamos estar juntas por muitos mais anos. Confiamos em Deus.

Ao Professor Jerson de Lima, colaborador desta tese, tão solícito no uso da sala de cultura e de seus equipamentos e materiais. E a todos do seu laboratório que compartilharam muitos momentos na sala de cultura.

Ao Professor Rui Hai Liu, que me acolheu tão carinhosamente em seu laboratório durante o meu período de estágio sanduíche no exterior. Graças à ele pude trabalhar no melhor departamento de Food Science do mundo. Com ele, aprendi o sentido e a essência de um pesquisador. Simplicidade, determinação, força de vontade, responsabilidade, carisma, atenção, são muitos dos adjetivos que posso dar à ele. Thank you, professor Liu, for giving me the opportunity to live the happiest days of my life.

Aos meus queridos amigos de laboratório da Cornell: Xue Jiang (Lowra), Jicheng Chen, Caroline Chau Le, Ran Yin, Hui Hong, Rachel HY Chen, Sumia Akram, Ningbo Liao e Miajing. Obrigada por me ensinarem uma cultura encantadora e que por isso, em muitos momentos, me fizeram sentir no Brasil novamente. Levo a amizade de vocês para sempre e com muito carinho.

À minha querida amiga Brunna Boaventura. Que tão inesperadamente a encontrei no mesmo laboratório da Cornell. Obrigada por ter sido a minha família durante 6 meses, por me mostrar e acreditar o quanto os EUA era maravilhoso, pelas nossas road trips, aventuras desastrosas, comilanças que me garantiram 7 kg a mais. Obrigada por sempre colocar a minha autoestima nas alturas, por me fazer acreditar que merecemos o melhor em nossas vidas e por querer tão bem a mim. Passamos momentos inesquecíveis juntas que vão me fazer lembrar que a amizade verdadeira existe e que não importa o tempo e a distância, sempre estaremos juntas de coração.

Aos amigos brasileiros da Cornell, Jussara, Bárbara, Larissa, Juliana, Fabiana, Paulo Roberto, José Renato, Eduardo, Jean e Guilherme que compartilharam os momentos felizes de se viver em outro país e as dificuldades de se estar “sozinho”. Ao Natal tão diferente, mas tão próximo ao que estávamos acostumados e ao Ano Novo mais louco que poderíamos ter.

Ao Professor Robson Monteiro, por sempre ser tão solícito e permitir tão gentilmente que eu usasse seu laboratório nos momentos de dificuldades com as contaminações das culturas de células.

Ao Professor Anderson Teodoro, que tão gentilmente aceitou revisar esta tese e por toda a contribuição durante o meu período de doutorado, participando também da banca de qualificação. Muito obrigada!

Aos Professores titulares da banca, Anna Paola Pierucci, Avany Fernandes, Danielly Ferraz, Juliany Rodrigues, por aceitarem o convite de participar desta banca avaliadora.

Aos Professores Julio Beltrame e Mariana Monteiro por aceitarem participar como suplentes na banca de defesa desta tese.

À minha querida amiga Luciana Gomes, que esteve comigo todos estes anos, dividindo a bancada, dividindo a vida, sendo uma amiga carinhosa e conselheira. Minha amiga, você fez e fará parte de todos os momentos da minha vida. Passamos juntas pela graduação, mestrado e doutorado e além disso, compartilhamos nossas vidas pessoais. Rimos e choramos. Por mais que a vida possa nos colocar longe uma da outra, tenho certeza que esta amizade vai permanecer para onde formos. Obrigada por tudo o que você fez e faz por mim e por ser tão especial na minha vida. Te amo, honey!

À minha amiga Fabiana Casanova. Por ser tão maravilhosa, linda, inteligente, engraçada, divertida....ai meu Deus, quantos elogios!! Eu sei que ela adora!! Mas é a pura verdade! Obrigada minha amiga, por todos os momentos que te pedi socorro e você, como sempre, nos ajudando. Você foi a primeira a me ensinar o que é uma cultura de células e me proporcionou me apaixonar por este mundo. Obrigada!

À todos os outros amigos do nosso grupo LABAF's, Betina, Marcelo, Denise, Paulinha, Leidiane e Patrícia, pela companhia no laboratório e por ser um grupo de pesquisa tão unido. Espero que continue assim, pois tenho certeza que a união faz a força neste grupo!

Aos companheiros de laboratório do grupo da Professora Mariana, Ana Luísa, Vera Valente Mesquita e Maria Lúcia, por compartilharem as horas de bancada e fazerem destes momentos mais divertidos e alegres.

Ao meu amor, Bruno Pimenta. Obrigada por ser um incentivador da minha carreira e por se orgulhar tanto do que eu sou e faço. Obrigada por ser paciente e sempre entender meus momentos de estresse e por me acalmar e transformar meus momentos de desespero menos sacrificantes. Obrigada por me ajudar nesta caminhada e por fazer parte dela, dividindo meus dias e minhas noites com você. Obrigada por transformar minha vida e por isso me permitir ser o que sempre quis. Tenho orgulho de ser o homem e pai que é, e espero que a nossa vida continue sendo compartilhada. Amo você!

Ao meu querido entiado Breno, pelos momentos de alegria e descontração de todos os dias e por se preocupar tanto com a escrita e finalização desta tese.

À minha queria tia Cléa, por todas as orações, energias e fibrações positivas. Tenho certeza que esta vitória passa por muitos momentos com a senhora, através do seu incentivo e apoio. Obrigada por ser uma segunda mãe!!!

À minha irmã, Natália, por ser tão companheira e amiga nesta vida. Tenho certeza que em outras vidas estivemos juntas e que o nosso laço será eterno, sempre melhorando a cada dia. Você me deu um presente muito especial, meu sobrinho Miguel, que faz a alegria dos meus dias e que me incentiva a ser o melhor na vida pessoal e profissional, para poder dar e mostrar a ele tudo de bom dessa vida. Amo vocês!

Aos meus queridos e amados pais, Renato e Raquel. Obrigada por me ensinarem os valores e princípios desta vida e por me tornarem a pessoa que sou hoje. Obrigada por quererem sempre o melhor para mim e por todo o amor incondicional dado por vocês. Pai, obrigada por ser um pai babão, incentivador, carinhoso e orgulhoso; por rir e chorar e por me ajudar tanto nos momentos que precisei. Você é um pai maravilhoso. Mãe, todas as palavras desse mundo não seriam suficientes para te descrever e mostrar a gratidão que tenho por você. Obrigada por sempre acordar comigo para fazer meu café da manhã, por ser tão companheira e incentivadora nesta jornada. Obrigada por agreditar e torcer por mim. Deus não poderia ter me dado uma mãe melhor. O amor que sinto por vocês transborda em mim. Amo vocês!!!

À Deus, Pai todo Poderoso, meu alicerce e minha força, que me guiou até aqui e que todos os dias me abençõa, para que todos os meus sonhos se tornem realidade.

"Vale trabalhar e fazer o melhor que pudermos,

aqui e agora, porque a vida incumbe de trazer-nos aquilo que buscamos."

Chico Xavier

Resumo

No Brasil, a estimativa de câncer para o ano de 2015 é de aproximadamente 576 mil novos casos, reforçando a magnitude desta doença. O câncer de mama é o tipo que mais acomete as mulheres em todo o mundo e estimativas indicam que surgirão 57.120 novos casos, sendo 8.380 só para o estado do Rio de Janeiro. O processo da carcinogênese apresenta três etapas, as quais compreendem a iniciação, promoção e progressão tumoral e tem sido demonstrado que compostos bioativos (CBAs) dietéticos podem atuar nas diferentes fases. As especiarias têm sido utilizadas por milhares de anos e possuem compostos bioativos responsáveis por suas propriedades quimiopreventivas e quimioterápicas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da curcumina, da piperina, do [6]-gingerol e do quimioterápico melfalan, isolados e combinados, em culturas de células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231. Para as análises da viabilidade celular foi realizado o método de redução do MTT e as células foram tratadas com concentrações que variaram de 1 a 300µM dos compostos bioativos isolados e de 0,5 a 150µM do melfalan. Observou-se que, de acordo com os valores de IC_{50}, a linhagem MDA-MB-231 foi a mais resistente para todos os tipos de tratamentos quando comparada a linhagem MCF-7. Após 24 horas de tratamento, os valores de IC_{50} para a linhagem MDA-MB-231 foram de 24µM, 280µM e 190µM, para curcumina, piperina e melfalan, respectivamente. O [6]-gingerol não demonstrou efeito nesta linhagem celular. Foi realizada uma curva de combinação dos compostos com os valores de IC_{50} em concentrações que variaram de 0,25 a 1,25 x IC_{50} com o intuito de potencializar a ação dos compostos na linhagem mais resistente. A combinação dos compostos reduziu a viabilidade celular de maneira dose-dependente e esta redução foi mais expressiva quando foram combinados os valores de 1 x $IC_{50.}$ A análise do ciclo celular demonstrou um bloqueio apenas na fase G2/M, principalmente para a curcumina isolada, mas também em sua associação com a piperina, quando comparadas ao controle. Ao tratar as células MDA-MB-231 por 24 horas, a associação de melfalan com curcumina gerou um maior número de células em apoptose e o tratamento da curcumina com a piperina levou as células à necrose. Após 48 horas de tratamento, a morte celular por necrose foi a mais expressiva em todas as associações. Não foram observadas diferenças entre os tratamentos com os CBAs isolados dos combinados, demonstrando uma semelhança na ação dos mesmos. Porém, para a determinação do efeito sinérgico, aditivo ou antagônico, a avaliação do Índice de Combinação (IC) demonstrou que todas as associações apresentaram efeito antagônico, com menor intensidade para o tratamento da piperina com melfalan (IC=1,21). Ao analisar o efeito citotóxico destas combinações em células mononucleadas de sangue periférico (PBMC), observou-se que a combinação de piperina com melfanan não apresentou efeito tóxico considerável para esta linhagem, em nenhuma das concentrações combinadas utilizadas. Considerando que não há diferenças entre a ação dos compostos isolados com os combinados e que a associação de piperina com melfalan apresentou efeitos citotóxicos em células cancerosas de mama, mas não em células normais, esta associação pode emergir uma possível proposta de ensaio clínico, principalmente a partir de associações sinérgicas. **Palavras chaves:** câncer de mama, curcumina, piperina, melfalan, MDA-MB-231, antagonismo.

Abstract

In Brazil the cancer estimative for 2015 year indicates the occurrence of 576.000 new cases, reinforcing the magnitude of this disease. Breast cancer is a cancer type that affects more women worldwide and 57.120 new cases are estimated while 8.380 only to the Rio de Janeiro state. Carcinogenesis process present three steps, this includes iniciation, promotion, and progression tumor and it has already been demonstrated that dietary bioactive compounds (BCs) may act at these different stages. Spices have been used for thousands years and have a lot of BCs responsible for chemopreventive and chemotherapeutic properties. Thus, the aim of this study was to investigate the effect of curcumin, piperine, [6]-gingerol, and melphalan, alone and/or combined, in breast cancer cell cultures MCF-7 and MDA-MB-231. For cell viability analyzes was performed MTT reduction method and the cells were treated with bioactive compounds concentrations isolated from 1 to 300µM and 0.5 to 150µM of melphalan chemotherapy. It was observed that, according to IC_{50} values, MDA-MB-231 line was more resistant to all treatment types when compared to MCF-7 line. After 24 hours of treatment, the IC_{50} values for the most resistant line were 24µM, 280µM, and 190µM to curcumin, piperine and melphalan, respectivily. The [6]-gingerol showed no effect in this cell culture. A combination curve of the compounds with IC_{50} values in concentrations ranging from 0.25 to 1.25 x IC_{50}, in order to enhance the action of the compounds, on the most resistant line was performed. The combination of the compounds reduced cell viability in a dose-dependent manner and that reduction was more significant when the 1 x IC_{50} amounts were combined. The cell cycle analysis demonstrated a blockade only at G2/M phase, especially to curcumin isolated, but in its association with piperine when compared to the control. In the MDA-MB-231 cells treated for 24 hours, the melphalan plus curcumin association generated a higher numberof apoptotic cells and curcumin plus piperine combination led cells to necrosis. After 48 hours the necrotic cell death was more significant in all treatments. No differences were observed between isolated or combination BCs treatments, showing a similarity in these action. However, to determination of synergism, additive, or antagonistic, the avaliation of Combination Index (CI) (CalcuSyn software-version 2.0, Biosoft) demonstrated that all combinations presents antagonic effect, with lower intensity to piperine plus melphalan treatment (CI = 1.21). Analyzing the cytotoxic effect of these compounds on peripheral blood mononuclear cells (PBMC), it observed that the piperine with melphalan combination showed no significant toxic effect on this line in any concentrations combined used. Considering that there no differences between the action of compounds individualy or combined and that piperine with melphalan combination had cytotoxic effects on breast cancer but not in the normal cells, this association can emerge a possible trial proposal, mainly from synergistic associations.

Key words: breast cancer, curcumin, piperin, melphalan, MDA-MB-231, antagonism.

Lista de abreviaturas

ADA - Associação Dietética Americana

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APAF-1 - *apoptosis protease activating fator-1*

ATP - adenosina trifosfato

CBA - Composto bioativo

CDKs - ciclinas dependentes de kinases

CI – Combination Index

Curc – curcumina

D-MEM - *Dulbecco´s Modified Eagle Medium*

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - *Deoxyribonucleic Acid*

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

ERO's - espécies reativas de oxigênio

G1 - *Gap phase 1*

G2 - *Gap phase 2*

IC_{50} - Concentraçâo Inibitória Média

INCA - Instituto Nacional do Câncer

M - *Mitose*

Mdm2 - *murine double minute gene 2*

Mel - melfalan

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBMC - Células Mononucleadas de Sangue Periférico

PBS - *Phosphate-Buffered Saline*

PHA - *Phytohemagglutinin*

PI - *Propidium Iodide*

Pip – piperina

PMSF - Fluoreto de Fenilmetilsulfonil

Rb - proteína retinoblastoma

RIPK3 - proteina serina/treonina kinase receptor de integração

RNA - *Ribonucleic Acid*

ROS - *Reactive Oxygen Species*

S - Fase de Síntese de DNA

SFB - Soro Fetal Bovino

TNF-α – *Tumoral necrosis factor*

Lista de Figuras e Tabelas

Tabela 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma. 22
Figura 1: Representação esquemática dos múltiplos estágios da carcinogênese. 24
Figura 2: Representação esquemática das alterações no teor de DNA durante o ciclo celular. 26
Figura 3: Tipos de morte celular e seus programadores morfológicos. PCD: morte celular programada. a) célula saudável, b) célula necrótica, c) célula apoptótica, d) célula autofágica. 28
Figura 4: As vias intrínseca e extrínseca da apoptose. 30
Figura 5: Estutura molecular do melfalan. 35
Figura 6: Alimentos funcionais e seus compostos bioativos. 38
Figura 7: Fitoquímicos dietéticos como agentes bloqueadores e supressores dos múltiplos estágios da carcinogênese. 39
Figura 8: Estrutura química da curcumina, piperina, [6]-gingerol e seus análogos. 41
Figura 9: Efeito da curcumina, piperina, [6]- gingerol e melfalan isolados na viabilidade celular de culturas de células de câncer de mama MCF-7. 66
Figura 10: Efeito da curcumina, piperina, [6]-gingerol e melfalan isolados na viabilidade celular de culturas de células de câncer de mama MDA-MB-231. 67
Tabela 2: Valores do IC_{50} dos compostos bioativos e do melfalan em culturas de células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 durante 24 e 48 horas de tratamento. 68
Figura 11: Efeito da combinação dos compostos bioativos e do melfalan na viabilidade celular de culturas de células de câncer de mama MDA-MB-231. 73
Figura 12: Efeito da curcumina, piperina, melfalan e suas associações utilizando os valores de IC_{50} na viabilidade celular de culturas de células de câncer de mama MDA-MB-231. 76
Figura 13: Efeito da curcumina, piperina, melfalan e suas associações utilizando os valores de IC_{50} na viabilidade celular de culturas de células de câncer de mama MDA-MB-231 a partir da exclusão de azul de trypan. 78
Tabela 3: Efeito da curcumina, piperina, melfalan e suas associações sobre a distribuição nas fases do ciclo celular das células MDA-MB-231 durante 24 horas de tratamento. 81
Tabela 4: Efeito da curcumina, piperina, melfalan e suas associações sobre a distribuição nas fases do ciclo celular das células MDA-MB-231 durante 48 horas de tratamento. 81
Figura 14: Efeito da curcumina, piperina, melfalan e suas associações sobre a distribuição nas fases do ciclo celular das células de câncer de mama MDA-MB-231 por 24 horas de tratamento. 80
Figura 15: Efeito da curcumina, piperina, melfalan e suas associações sobre a distribuição nas fases do ciclo celular das células de câncer de mama MDA-MB-231 por 48 horas de tratamento. 83
Tabela 5: Efeito da curcumina, piperina, melfalan e suas associações sobre o tipo de morte celular das células MDA-MB-231 após 24 horas de tratamento. 86

Tabela 6: Efeito da curcumina, piperina, melfalan e suas associações sobre o tipo de morte celular das células MDA-MB-231 após 48 horas de tratamento. 87
Figura 16: Efeito da curcumina, piperina, melfalan e suas associações sobre o tipo de morte celular das células MDA-MB-231 durante 24 horas de tratamento. 85
Figura 17: Efeito da curcumina, piperina, melfalan e suas associações sobre o tipo de morte celular das células MDA-MB-231 durante 48 horas de tratamento. 88
Figura 18: Efeitos da curcumina, piperina, melfalan e suas associações nos níveis das proteínas relacionadas à morte celular. 90
Tabela 7: Índice de combinação e efeito da combinação da curcumina com a piperina, da curcumina com o melfalan e da piperina com o melfalan segundo o programa Calcusyn (versão 2.0, Biosoft). 94
Figura 19: Efeito das associações dos compostos bioativos e do melfalan sobre a viabilidade das células PBMC. 99

Sumário

1. **INTRODUÇÃO** 20

1.1. Câncer 21

1.1.1. Ciclo celular 25

1.1.2. Morte celular 27

1.1.3. Câncer de mama 32

1.2. Nutrição e Câncer 36

1.2.1. Curcumina 41

1.2.2. Piperina 44

1.2.3. [6]-gingerol 47

1.3. Combinação de Compostos 48

2. **JUSTIFICATIVA** 51

3. **OBJETIVOS** 53

3.1. Objetivo Geral 54

3.2. Objetivos Específicos 54

4. **MATERIAL E MÉTODOS** 55

4.1. Reagentes 56

4.2. Culturas de Células e Tratamentos 56

4.3. Ensaio de viabilidade celular pelo método de redução de MTT 57

4.4. Ensaio de Citotoxicidade - Contagem celular utilizando teste de exclusão com Azul de Trypan 58

4.5. Análise do Ciclo Celular 59

4.6. Ensaio de Morte Celular 60

4.7. Preparação do extrato protéico das células 61

4.7.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes 61

4.7.2. *Western Blotting* 62

4.8. Índice de Combinação (IC) para determinação do efeito sinérgico, aditivo ou antagônico 63

4.9. Análise Estatística 64

5. **RESULTADOS E DISCUSSÃO** 65

5.1. Viabilidade celular dos compostos isolados nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 66

5.2. Curva de associação dos compostos bioativos e do melfalan na linhagem MDA-MB-231 73

5.3. Efeito da curcumina, piperina, melfalan e suas associações utilizando os valores de IC_{50} na viabilidade por MTT na linhagem MDA-MB-231 75

5.4. Efeito da curcumina, piperina, melfalan e suas associações utilizando os valores de IC_{50} na viabilidade a partir da exclusão de azul de trypan na linhagem MDA-MB-231 77

5.5. Efeito da curcumina, piperina, melfalan e suas associações no ciclo celular da linhagem MDA-MB-231 79

5.6. Efeito da curcumina, piperina, melfalan e suas associações no tipo de morte celular da linhagem MDA-MB-231 84

5.7. Efeito da curcumina, piperina, melfalan e suas associações na expressão de proteínas relacionadas a morte celular na linhagem MDA-MB-231 89

5.8. Índice de Combinação (CI) e efeito da combinação segundo Calcusyn 93

5.9. Efeito da curcumina, piperina, melfalan e suas associações na viabilidade da célula não tumoral PBMC (células mononucleadas de sangue periférico) 98

6. **CONCLUSÕES** 101

7. **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** 103

8. **ANEXO I:** Artigo 115

Introdução

1. Introdução

1.1. Câncer

O câncer é uma doença caracterizada essencialmente pelo crescimento rápido e invasivo de células com mutações em seu material genético. O processo de formação do câncer inicia-se em decorrência do acúmulo progressivo de mutações no genoma de uma célula. Essas alterações na expressão ou função de genes essenciais para a manutenção da homeostasia celular provocam a perda da capacidade da célula em responder aos sinais de proliferação, diferenciação e morte, adquirindo autonomia de crescimento e tornando-se independentes de controles externos (FREITAS e cols., 2010).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2008), o câncer é uma das principais causas de mortalidade e o número total de casos está aumentando em todo o mundo. Mundialmente, espera-se que a mortalidade por câncer aumente 45% entre os anos de 2007 e 2030, passando de 7.900.000 para 11.500.000 mortes; em parte devido ao crescimento populacional, ao aumento da expectativa de vida e a novas tecnologias que permitem diagnósticos precisos (WHO, 2008 e INCA, 2015). Além disso, estima-se que durante este mesmo período, o número de novos casos de câncer aumentará de 11,3 milhões em 2007 para 15,5 milhões em 2030. Na maioria dos países desenvolvidos, esta é a segunda principal causa de morte após as doenças cardiovasculares, porém, dados epidemiológicos indicam que esta tendência está sendo iniciada em países em desenvolvimento, principalmente os da América do Sul, onde mais da metade dos casos de câncer são registrados (WHO, 2008).

No Brasil, a estimativa do INCA para o ano de 2015 é de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a

magnitude do problema no país. O câncer de pele do tipo não melanoma (182 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil) (**Tabela 1**).

Tabela 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma (Adaptado do INCA, 2014).

Homens			***Mulheres***		
Localização primária	**Casos**	**%**	**Localização primária**	**Casos**	**%**
Próstata	68.800	22,8	**Mama Feminina**	57.120	20,8
Traquéia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4	**Cólon e Reto**	17.530	6,4
Cólon e Reto	15.070	5,0	**Colon do Útero**	15.590	5,7
Estômago	12.870	4,3	**Traquéia, Brônquio e Pulmão**	10.930	4,0
Cavidade Oral	11.280	3,7	**Glândula Tireóide**	8.050	2,9
Esôfago	8.010	2,6	**Estômago**	7.520	2,7
Laringe	6.870	2,3	**Corpo do Útero**	5.900	2,2
Bexiga	6.750	2,2	**Ovário**	5.680	2,1
Leucemias	5.050	1,7	**Linfoma de Hodgkin**	4.850	1,8
Sistema Nervoso central	4.960	1,6	**Leucemias**	4.320	1,6

As causas de câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos próprios de um ambiente social e cultural. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, estão relacionadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Esses fatores causais podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais (INCA, 2015).

Importantes avanços foram identificados nas bases do processo de transformação de uma célula normal a uma célula neoplásica. Os genes estão presentes nas moléculas de DNA (ácido desoxirribonucleico), no núcleo celular e especificam seqüências de aminoácidos que devem ser ligados uns aos outros para sintetizar determinada proteína. As mutações em um gene podem alterar a quantidade de proteína ou a atividade da célula. Duas classes de genes tem papel chave no desenvolvimento do câncer e coletivamente são responsáveis pela proliferação descontrolada encontrada nos cânceres em humanos, são eles: os protooncogenes que estimulam os processos de divisão celular, e os genes supressores que inibem este processo. Em suas configurações normais, os genes participam do ciclo celular em uma intrincada seqüência de eventos, pelos quais as células crescem e se dividem. Quando ocorrem mutações, protooncogenes tornam-se oncogenes, que são carcinogênicos e causam multiplicação celular excessiva. Estas mutações levam o protooncogene a expressar em excesso sua proteína estimuladora do crescimento ou a produzir uma forma mais ativa. Os genes supressores de tumores, em contraste, contribuem para o desenvolvimento de câncer quando são inativados por mutações. O resultado é a perda da ação de genes supressores funcionais, o que depriva a célula de controles importantes para a prevenção de crescimento inapropriado (RIVOIRE e colaboradores, 2001).

Toda essa sequência de eventos que causam à transformação de uma célula normal em uma célula neoplásica chama-se carcinogênese. A carcinogênese é um processo complexo provavelmente envolvendo uma série de mudanças genéticas e epigenéticas ocorrendo em níveis morfológicos, celulares e moleculares podendo ser dividida em três estágios principais: iniciação, promoção, progressão (**Figura 1**).

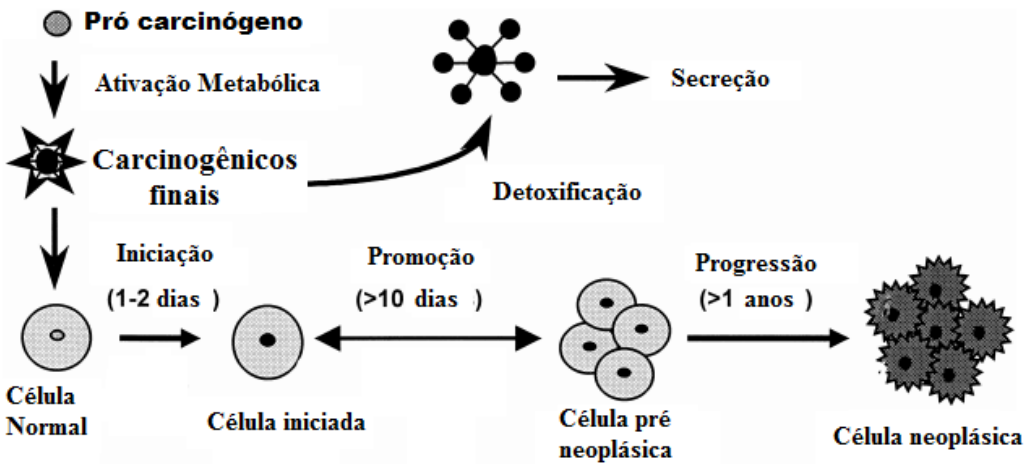

Figura 1: Representação esquemática dos múltiplos estágios da carcinogênese (Adaptado de SURH, 1999).

No estágio de iniciação, segue uma exposição a agentes mutagênicos que resulta em pouca ou nenhuma mudança observável na morfologia celular ou tecidual, mas confere aumento permanente na susceptibilidade à formação do câncer. Na etapa de promoção, as células iniciadas se multiplicam formando lesões pré-neoplásicas por estímulos promotores. O agente cancerígeno promotor age de forma a selecionar as células iniciadas e dessa forma ocorre a expansão clonal das mesmas, resultando em acúmulo de mutações e aumento da instabilidade genética. A etapa seguinte é a progressão onde se tem células com alto grau de anaplasia, desequilíbrio entre proliferação celular e apoptose e auto-suficiência, que independem de estímulos para crescimento e multiplicação (VICENTI e GATENBY, 2008). Esta fase é caracterizada por alterações moleculares adicionais, pelo aumento da massa tumoral primária, desprendimento de células do tumor, movimento na direção de tecidos e órgãos adjacentes e penetração de células neoplásicas individuais ou pequenos agrupamentos das mesmas no sistema circulatório, com seu transporte e aprisionamento em órgãos e tecidos distantes. Tais grupos de células tendem a ficar retidos e costumam fixar-se em

novos locais, continuando a crescer e levando à formação de tumores secundários, em um processo conhecido como metástase (FREITAS e colaboradores, 2010).

1.1.1. Ciclo celular

A divisão celular consiste em dois processos consecutivos, caracterizada, principalmente pela replicação do DNA e a segregação dos cromossomos replicados em duas células separadas. Tradicionalmente, o ciclo celular em células eucarióticas tem sido dividido em quatro fases: *Gap phase 1* (G1); síntese de DNA (S); *Gap phase 2* (G2), durante a qual a célula se prepara para divisão; e mitose (M) durante a qual os cromossomos se separam e a célula se divide (**Figura 2**) (MEERAN e KATIYAR, 2008). A progressão do ciclo celular de uma fase para outra é regulada pela ativação e inativação sequencial de muitas proteínas que monitoram o estado da célula. Com isso, proteínas regulatórias do ciclo celular tem se tornado alvos na terapia do câncer. A diminuição da proliferação da célula tumoral por meio do bloqueio do ciclo celular em alguma fase específica permite o reparo do DNA ou a indução de proteínas pró-apoptóticas (HASTAN e BARTEK, 2004).

As células têm desenvolvido vários mecanismos de defesa que as protegem contra os ataques constantes a seu DNA. No entanto, os processos de reparo do DNA não são perfeitos. Assim, o rompimento da regulação normal da progressão e divisão do ciclo celular é um importante evento no desenvolvimento do câncer. Consequentemente, proteínas regulatórias do ciclo celular tem se tornado alvos na terapia do câncer (VERMEULEN e colaboradores, 2003).

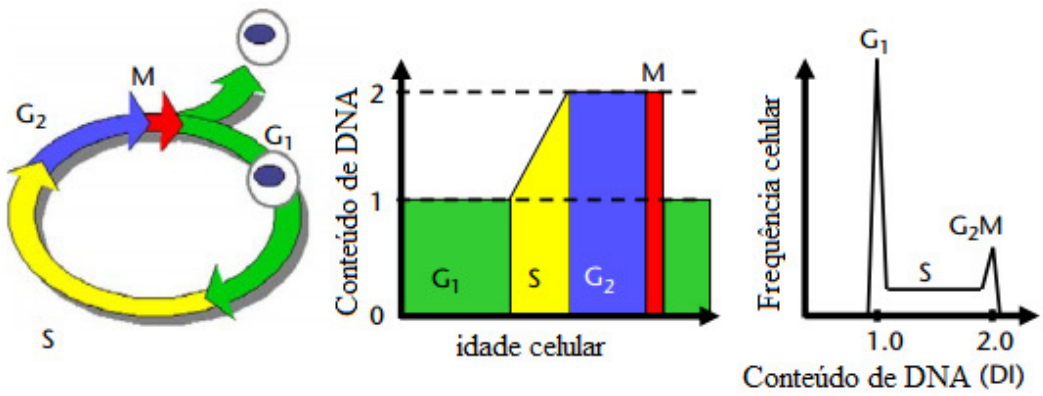

Figura 2: Representação esquemática das alterações nos teores de DNA durante o ciclo celular (Adaptado de DARZYNKIEWICZ e ZHAO, 2014).

A proteína p53 consiste em um dos mais importante regulador do ciclo celular, com funções que vão desde a parada do ciclo celular até indução da morte celular, sendo estimado que pelo menos 50% dos tumores humanos possuem o gene p53 mutado. Também é conhecida como um dos principais supressores tumorais, e que geralmente se encontra dentro da célula, ligada a uma outra proteína chamada Mdm2 (*murine double minute gene 2*), que funciona como marcador para que a p53 se degrade. Havendo uma lesão no material genético, enzimas específicas que entram em ação para separar a Mdm2 da p53. Separado de seu marcador, a p53 não se degrada e permanece na célula, aumentando assim a sua concentração, isso estimula a síntese de p21, alvo transcripcional da p53, a qual se une a CDK2 (quinases dependentes de ciclina) e Ciclina E, inibindo então a ação deste complexo. A consequência dessa cadeia de acontecimentos é a parada do ciclo celular em G1 (MICHAEL e OREN, 2002).

Durante as fases G1 e G2 o maquinário celular verifica a integridade do material genético e, uma vez detectados defeitos no DNA, um sinal é disparado a fim de manter a célula num estado estacionário no qual ela tentará corrigir os erros encontrados. Esse mecanismo depende da proteína p53, sendo ela, por esse motivo, considerada a guardiã do genoma. No início do ciclo mitótico, o gene p53, ativa o gene p21, induzindo à

síntese da proteína p21. Esta inibe a ação de CDKs (ciclinas dependentes de kinases), pois se une ao complexo CDK2-ciclina, o que bloqueia a inativação de Rb (proteína retinoblastoma) e, assim, promove a parada do ciclo celular em G1, a fim de que o DNA danificado possa ser reparado (HASTAN e BARTEK, 2004).

A alternativa de atuação da p53 a danos não reparados, caso a via com a proteína pRb não esteja intacta, é a indução da apoptose. Além disso, p53 também promove um *check point* de S para G2, que depende da integridade do domínio C-terminal do gene. Portanto, quando p53 sofre mutações, as células com danos no DNA, que por um processo de seleção natural favorável, podem desencadear a transformação maligna, escapam do reparo destes danos e de sua destruição, podendo iniciar um clone maligno (HASTAN e BARTEK, 2004 e KNAPPSKOG e colaboradores, 2015).

1.1.2. Morte celular

A morte celular consiste no equilíbrio entre a morte celular e a sobrevivência das células. Este equilíbrio pode estar desregulado e a morte celular programada desempenha um papel fundamental nas decisões finais do destino das células, como por exemplo, ocorre no câncer. Existem três tipos de morte celular: a apoptose, a autofagia e a necrose, sendo facilmente distinguíveis por suas diferenças morfológicas (OUYANG e colaboradores, 2012), como demonstrada na **Figura 3**.

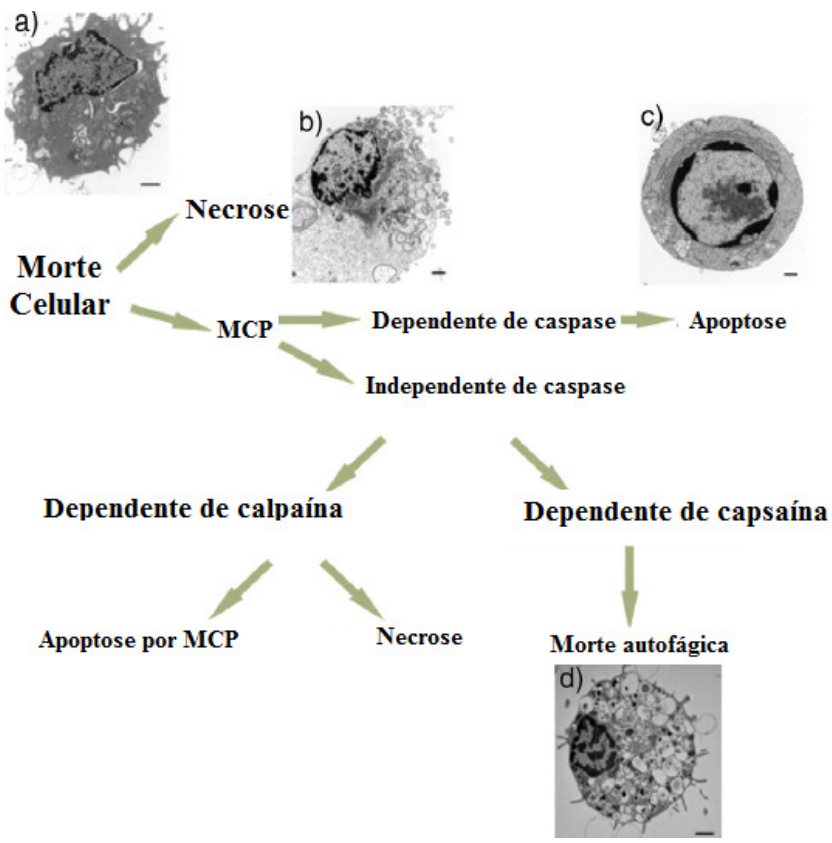

Figura 3: Tipos de morte celular e seus programadores morfológicos. MCP: morte celular programada. a) célula saudável, b) célula necrótica, c) célula apoptótica, d) célula autofágica (Adaptado de NIKOLETOPOULOU e colaboradores, 2013).

A apoptose é caracterizada por alterações morfológicas e bioquímicas específicas de células moribundas, que inclui: encolhimento celular, fragmentação e condensação nuclear, perda de adesão as células vizinhas ou a matriz extracelular. Dentre as alterações bioquímicas incluem clivagem do DNA cromossomal, externalização da fosfatidilserina e clivagem de substratos intracelulares por proteólise específica (OUYANG e colaboradores, 2012).

A morte celular por apoptose é mediada por uma família de cisteinil-aspartato proteases (caspases) constituída de pelo menos 14 membros. 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. As caspases iniciadoras (caspase-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10 e -14) estão envolvidas na iniciação da cascata proteolítica. As caspases efetoras (caspase-3, -6 e -7) são responsáveis pela clivagem de diversos substratos citoplasmáticos e nucleares, produzindo muitos das características morfológicas da morte celular por apoptose (WEN e colaboradores, 2012). Entre os diversos substratos das caspases é possível citar a proteína *murine double minute gene 2* (MDM2). Ao ser clivada pelas caspases, essa proteína libera a p53 que se transloca para o núcleo, ativando a transcrição de genes pró-apoptóticos (GUIMARÃES e LINDEN, 2004).

Duas principais vias moleculares, seja intrínseca ou extrínseca, levam a ativação de caspases, portanto, apoptose (**Figura 4**). A apoptose por via extrínseca é uma forma de morte celular induzida por sinais extracelulares que resultam na interação de ligantes específicos a receptores de trans-membrana, coletivamente conhecidos como receptores de morte, pertencente à família dos receptores do fator de necrose tumoral (rTNF). Essa interação é capaz de promover a ativação da cascata de sinalização de caspases (FAVOROLO e colaboradores, 2012).

Por outro lado, a via intrínseca é ativada em resposta a diversas situações de estresse, incluindo danos no DNA, estresse oxidativo e muitos outros. Em todos os casos, estas múltiplas formas de estresse convergem para a mitocôndria e determinam a permeabilização da membrana externa mitocondrial, que por sua vez resulta em dissipação do potencial de membrana mitocondrial e, portanto, na cessação de produção de ATP (adenosina trifosfato), bem como liberação de um número de proteínas que contribuem para a ativação das caspases. As proteínas da família *B-cell lynphoma-2* (Bcl-2) são reguladores essenciais deste tipo de apoptose. Elas podem ser classificadas em anti-apoptóticas, tais como Bcl-2 e *B-cell lymphoma-extra large* (Bcl-xL), e pró-apoptóticas, tais como Bax (*Bcl-2 associated X protein*) e Bak (*Bcl-2-homologous*

antagonist/killer). As proteínas pró-apoptóticas se oligomerizam para formar poros na membrana mitocondrial, através da qual ocorre liberação de citocromo *c*. No citosol, o citocromo *c* se liga a APAF-1 (*apoptosis protease activating fator-1*), induzindo a formação de um complexo, conhecido como apoptossoma, que requer caspase 9. No apoptossoma, caspase 9 é ativada e clivada, levando a ativação de outras caspases, como a caspase 3 (CHIPUK e GREEN, 2008).

A via apoptótica intrínseca também é muitas vezes ativada pela p53 em resposta a danos no DNA ou por outros fatores de estresse celulares e pode ser vista como uma via apoptótica dependente de p53 (OUYANG e colaboradores, 2012).

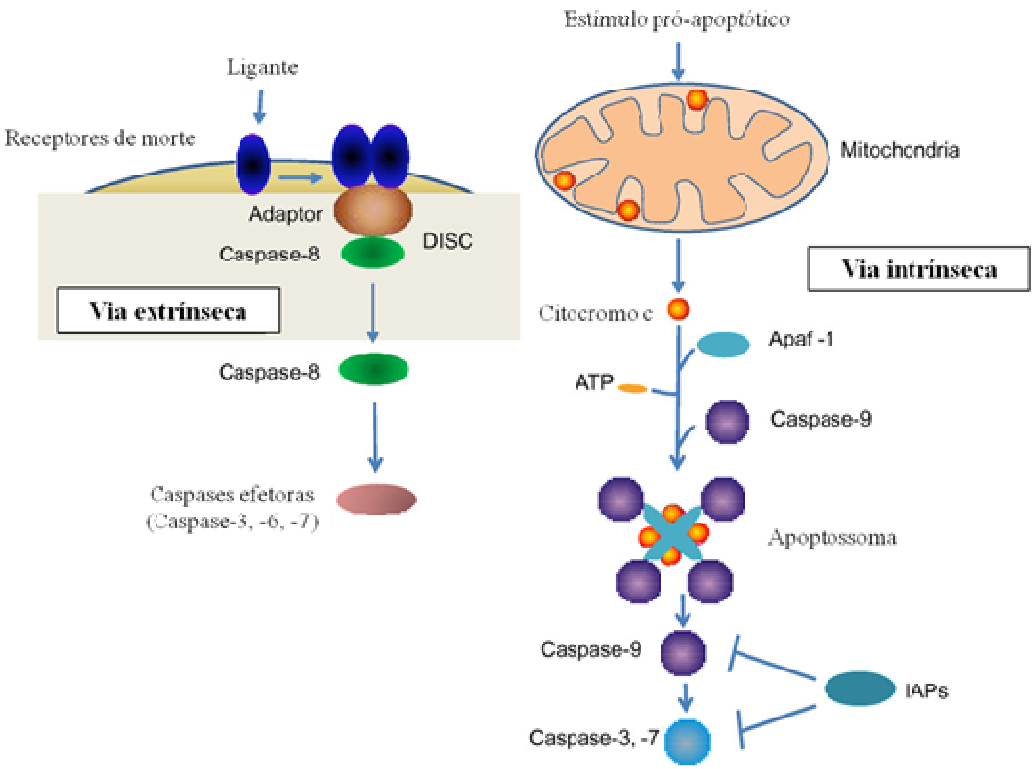

Figura 4: As vias intrínseca e extrínseca da apoptose As duas vias principais de apoptose são ilustradas. A via extrínseca é iniciada pela ligação do ligante aos receptores de morte da membrana plasmática. A via intrínseca é também chamada de via mitocondrial. Ambos os caminhos levam à ativação de caspases (Adaptado de LI e SHENG, 2012).

A autofagia é um processo catabólico evolutivamente conservador com a formação de autofagossomas, estruturas duplas ligadas a organelas macromoleculares citoplasmáticas e destinadas à reciclagem. Em geral, a autofagia desempenha um papel crucial na sobrevivência da homesotase celular e é requerida nos períodos de estresse celular ou insuficiência de nutrientes devido a privação de fatores de crescimento. No entanto, não há evidências de que as células em autofagia podem submeter-se a morte celular e a um estresse excessivo, o que a difere dos processos de apoptose e necrose. O controle da autofagia inclui uma série de processos fisiológicos, incluindo a privação de nutrientes, diferenciação celular, sobrevivência celular e morte (VISCOME e AMELIO, 2012).

A necrose é um processo que pode ser melhor definido pelas alterações na morfologia celular, caracterizando-se por inchaço, disfunção mitocondrial, ruptura da membrana celular, derramamento do conteúdo citoplasmático para o espaço extracelular e lise celular. Ao contrário da apoptose, os núcleos necróticos não exibem uma condensação, clivagem e fragmentação do DNA internucleossomal, embora alguma degradação de DNA ocorra em estágios tardios da necrose. Contrariamente a apoptose, a necrose não envolve a participação e ativação de caspases e as reações inflamatórias são frequentemente desencadeadas em resposta a necrose. A indução da necrose geralmente ocorre em situações acidentais ou em situações patológicas agudas que levam um dano à célula. Por muito tempo, a necrose foi considerada uma morte celular descontrolada e não programada, resultando em alterações dramáticas irreversíveis nos parâmetros essenciais do metabolismo e da estrutura celular (OUYANG e colaboradores, 2012).

A morte celular programada necrótica é o resultado da interação entre várias cascatas de sinalização com receptores RIPK3 (proteina serina/treonina kinase receptor

de integração), cálcio e mitocôndrias. A proteína RIPK3 interage com a proteína RIPK1 e se liga a diversas enzimas do metabolismo de carboidratos e da glutamina. O cálcio controla a ativação do ácido polilático e óxido nítrico, que induzem a uma série de eventos que levam a morte celular por necrose. A mitocôndria contribui para a necrose pela formação excessiva de espécies reativas de oxigênio e depleção de ATP (JAIN e colaboradores, 2013).

Assim, a morte celular programada pode desempenhar importante papel na preservação da homeostase tecidual, além de eliminar células danificadas, podendo ter efeito importante em tecidos malignos.

1.1.3. Câncer de mama

O câncer de mama é o tipo de câncer que mais acomete as mulheres em todo o mundo, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos. Cerca de 1,67 milhões de casos novos dessa neoplasia foram esperados para o ano de 2012, em todo o mundo, o que representa 25% de todos os tipos de câncer diagnosticados nas mulheres (INCA, 2014). No Brasil, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas, provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados. Em 2008, a estimativa de novos casos de câncer no Rio de Janeiro era de 29.040, sendo 7.680 somente para câncer de mama. Já para este ano, estimativas indicam que surgirão 57.120 novos casos de câncer de mama no Brasil, sendo 8.380 só para o estado do Rio de Janeiro (INCA, 2014).

A etiologia do câncer de mama indica uma complexidade que pode estar além do nível atual de conhecimento. Esta complexidade é enraizada em componentes multifatoriais (endógenos e exógenos) que interagem entre si e pode ser afetada pela

dieta, peso e massa corporal, paridade, menopausa, história familiar de câncer de mama/ovário, entre outros. Todos esses fatores têm sido identificados em aumentar o risco de desenvolver câncer de mama (RUSSO, 1995). McELIGOT e colaboradores, 2009, avaliando a relação entre a dieta e o risco de câncer de mama e demostraram uma significativa associação, especificamente com a ingestão calórica, o consumo de frutas e hortaliças e, em geral, a qualidade da dieta. Afirmaram ainda que mulheres com histórico familiar de câncer de mama ou ovário deveriam ser estimuladas a consumir uma dieta rica em alimentos de origem vegetal, ricos em fibras, folato, carotenóides e outras substâncias anticarcinogênicas, com o intuito de prevenir estes tipos de câncer.

Linhagens celulares de câncer de mama têm sido os modelos mais amplamente utilizados para investigar a proliferação, a apoptose e a migração desregulada durante a progressão do câncer de mama. A utilização destas linhagens resultou em uma riqueza de informações sobre os genes e as vias de sinalização que regulam esses processos. Há diversas razões pelas quais os modelos de linhagens tumorais de câncer de mama têm sido os mais investigados: são relativamente fáceis para manipular e possuem condições experimentais bem definidas, e em geral, geram resultados reproduzíveis e quantificáveis (VARGO-GOGOLA e ROSEN, 2007). Dentre as inúmeras células testadas, as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 são as mais utilizadas nos estudos. A linhagem MDA-MB-231 expressa a proteína p53 mutante e caspase-3, possuindo receptor negativo para estrogênio (ER-); enquanto a MCF-7 expressa p53 do tipo selvagem e é deficiente para caspase-3, possuindo receptor positivo para estrogênio (ER+); ambas proteínas (p53 e caspase-3) são essenciais para a regulação do ciclo celular e apoptose (YANG e colaboradores, 2007 E VANI e colaboradores, 2006).

Os principais tratamentos para o câncer são a cirurgia, a quimioterapia, a radioterapia e a hormonioterapia (HARMER, 2008). A quimioterapia pode ser a

primeira modalidade no tratamento do tumor primário de mama de grande porte (acima de 3 cm), se for localmente avançado, ou se o câncer é uma doença do tipo inflamatória (LEWIS, 2005). A quimioterapia não melhora a sobrevida do paciente, mas permite que o tumor não progrida, possivelmente resultando em cirurgia de conservação da mama, uma forma segura e eficaz para melhorar a qualidade de vida do indivíduo (STEBBING e GAYA, 2001).

A quimioterapia para o câncer de mama é feita geralmente por uma combinação de drogas. A combinação é usada porque as células de câncer são sensíveis e/ou resistentes a determinados medicamentos e em diferentes fases do ciclo celular. A quimioterapia, entretanto, não pode distinguir entre células normais e malignas. Isto significa que o medicamento quando introduzido no organismo, não ataca apenas as células cancerosas, mas também as normais que proliferam como parte dos processos fisiológicos normais, como as de reparação e substituição; por exemplo, medula óssea, cabelo, trato gastrointestinal, pele, dentre outras. Este processo proporciona os efeitos colaterais desses medicamentos (McCOY, 2003). A quimioterapia neoadjuvante é a primeira modalidade de tratamento se o tumor primário for grande (acima de 3 cm), localmente avançado, ou se o câncer for um tipo inflamatório (PARRY e colaboradores, 2005). Após a quimioterapia, ocorrendo uma redução suficiente no tamanho do tumor, faz-se em seguida a cirurgia conservadora e a radioterapia. A quimioterapia neoadjuvante não melhora a sobrevida da paciente, mas permite que o tumor diminua, possivelmente resultando em uma cirurgia de conservação da mama, o que parece seguro e eficaz podendo melhorar a qualidade de vida (STEBBING e GAYA, 2001).

Os quimioterápicos utilizados no tratamento de câncer de mama são taxol, ciclofosfamida, tamoxifeno, gemcitabina, melfalan, entre outros. O melfalan, também

conhecido como mostarda L-fenilalanina, é uma fenilalanina derivada da família de mostarda nitrogenada usada na terapia do câncer (**Figura 5**). Esta droga foi sintetizada pela primeira vez em 1953. Inicialmente, o melfalan era usado contra o mieloma múltiplo, mas depois também demonstrou ser efetivo no tratamento de pacientes com câncer de ovário e de mama, entre outros. Sistematicamente, o melfalan é usado no tratamento de pacientes com mieloma múltiplo, câncer de ovário, câncer de mama, melanoma e câncer colorretal (ROTHBARTH e colaboradores, 2002). Localmente, esta droga é empregada em perfusão isolada de membro (melanoma de membro superior ou inferior) (VERHOEF e colaboradores, 2007), ou do fígado (metástase confinada ao fígado) (VAHRMEIJER e colaboradores, 2000).

O melfalan exerce seu efeito citotóxico por meio da formação de ligações cruzadas entre ou intra- fitas de DNA, assim como entre DNA-proteína, pela alquilação via os dois grupos cloroetil da molécula. Sítios comuns de alquilação no DNA incluem a posição N-7 da guanina, posições N-1, N-3 e N-7 da adenina, posição N-3 da citosina e posição O-4 da timidina. Assim como outras drogas da família de mostarda nitrogenada, melfalan afeta as células em todas as fases do ciclo celular de modo inespecífico. Especialmente em altas doses, melfalan mostra uma variedade de efeitos colaterais. O mais comum destes efeitos é a supressão da medula óssea, incluindo leucopenia e trombocitopenia (ROTHBARTH e colaboradores 2002).

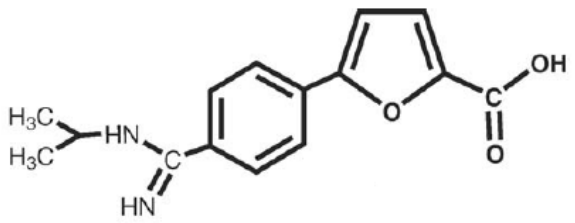

Figura 5: Estutura molecular do melfalan. (BIELAWSKI e colaboradores, 2006).

O melfalan é um dos agentes antitumorais que detém a divisão celular nas diferentes fases do ciclo e recentemente vem sendo pesquisado em células tumorais de câncer de mama, entretanto, os estudos ainda são escassos (CHRZANOWSKI e colaboradores, 2003, BIELAWSKA e colaboradores, 2007 e CASANOVA e colaboradores, 2012), contudo, o estudo de drogas já conhecidas e de novos agentes anticancerígenos é uma questão de extrema relevância (MULLER, 2004). Adicionalmente, a resistência do tratamento por agentes antineoplásicos tem sido um problema no câncer e mais estudos tornam-se necessários para aumentar a eficácia do melfalan, assim como potencializar sua toxicidade e diminuir sua resistência (CASANOVA e colaboradores, 2012).

1.2. Nutrição e Câncer

Em 2004, DONALDSON verificou que uma dieta balanceada pode ser capaz de reduzir em 60 a 70% a incidência de câncer de mama. Uma dieta rica e variada, contendo frutas e hortaliças em abundância, tem sido recomendada como prioridade global para a prevenção do câncer, sugerindo a ingestão de pelo menos cinco porções de frutas e hortaliças por dia (COSTA e ROSA, 2010).

Adicionalmente, nos últimos anos, muitas investigações com células epiteliais de câncer de mama têm demonstrado que seus mecanismos bioquímicos podem ser modulados por compostos bioativos (WANG e colaboradores, 2010; WAYA e colaboradores, 2009 e NORATTO e colaboradores, 2010). Os compostos bioativos ou fitoquímicos são metabólitos secundários presentes em plantas e são considerados ingredientes não-nutricionais, porém de vital importância para a saúde humana, pois

além de apresentarem resposta ao estresse oxidativo, reduzindo o risco de desenvolvimento de doenças crônicas (PATIL e colaboradores, 2009), possuem propriedades anticarcinogênicas e antimutagênicas (SURH, 2003). Algumas dessas substâncias têm demonstrado efeito inibidor na carcinogênese, e por isso, são referidas como agentes quimiopreventivos. Os fitoquímicos quimiopreventivos são encontrados em diversos alimentos funcionais, e são compostos pertencentes a diferentes classes estruturais (**Figura 6**) (COSTA e ROSA, 2010).

Como visto anteriormente, a carcinogênse é iniciada com a transformação de uma célula normal a uma célula cancerosa (células iniciadas). Estas células logo sofrerão a promoção do tumor em células pré-neoplásicas, evoluindo para células neoplásicas. Os fitoquímicos podem interferir em diferentes momentos deste processo. Alguns fitoquímicos quimioprotetores inibem a ativação metabólica de agentes prócarcinógenos a sua espécie eletrofílica final ou impede a sua interação subsequente com o DNA. Estes agentes bloqueiam, assim, a iniciação do tumor (agentes de bloqueio). Outra alternativa, os agentes bloqueadores dietéticos podem estimular a desintoxicação de substâncias cancerígenas, levando a sua secreção. Outros fitoquímicos podem suprimir as etapas posteriores (promoção e progressão) da carcinogênese em vários estágios (agentes supressores), sendo considerados quimioterapêuticos, como demonstrado na **Figura 7** (SUHR, 2003).

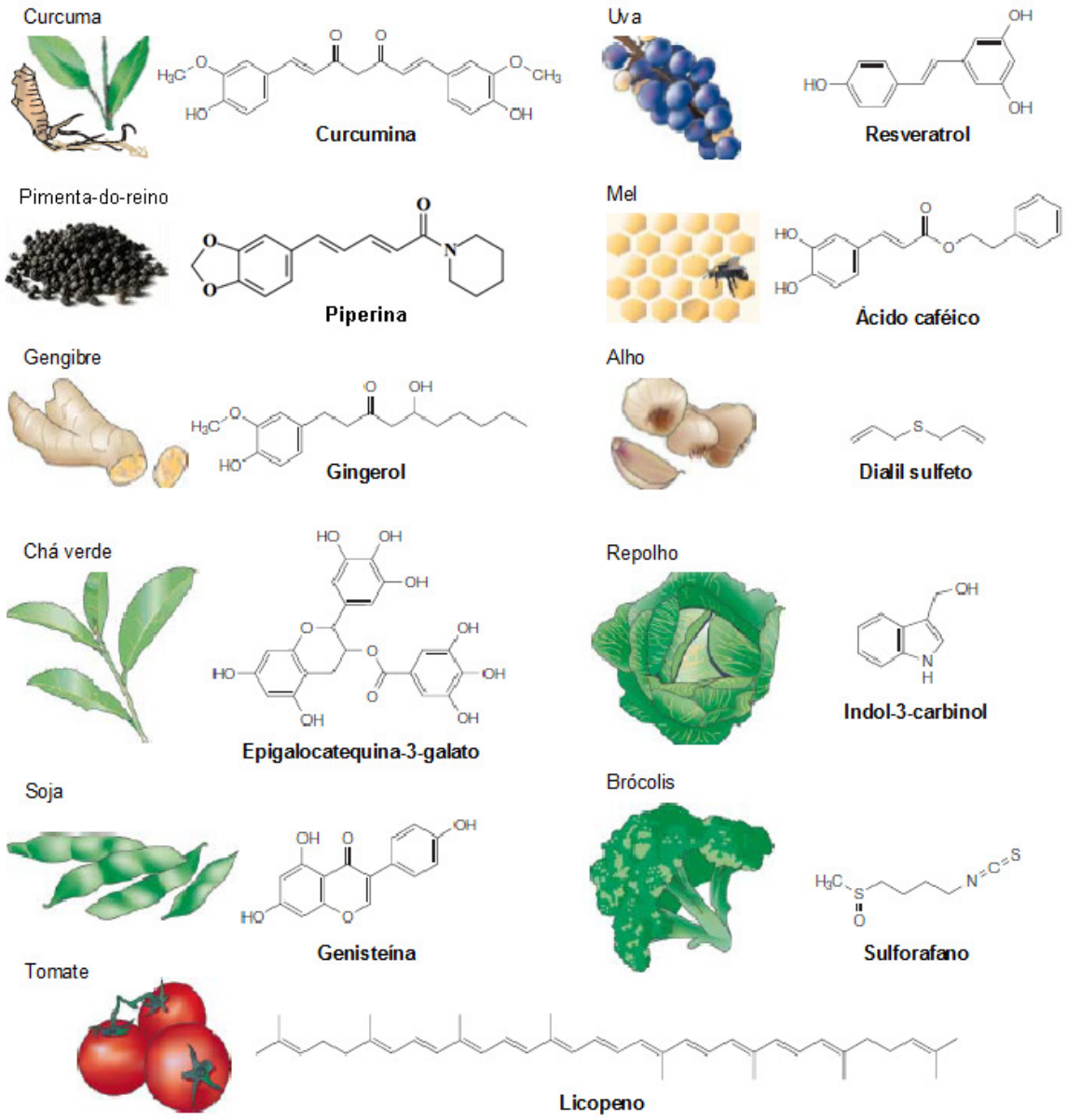

Figura 6: Alimentos funcionais e seus compostos bioativos (SUHR, 2003).

Os fitoquímicos podem ser classificados em carotenóides, fenólicos, alcalóides, compostos não nitrogenados e compostos organosulfurados. Os fitoquímicos mais estudados são os fenólicos e os carotenóides (LIU, 2004).

Para a Associação Dietética Americana (ADA), os alimentos funcionais incluem alimentos integrais, fortificados, enriquecidos ou restauradores, que apresentam,

potencialmente, efeitos benéficos para a saúde, quando consumidos como parte de uma dieta variada. Para produzir o efeito desejado, as substâncias fisiologicamente ativas devem estar presentes nos alimentos funcionais, em quantidades suficientes e adequadas. No entanto, os níveis ótimos de ingestão destes compostos não foram ainda determinados (ADA, 2004).

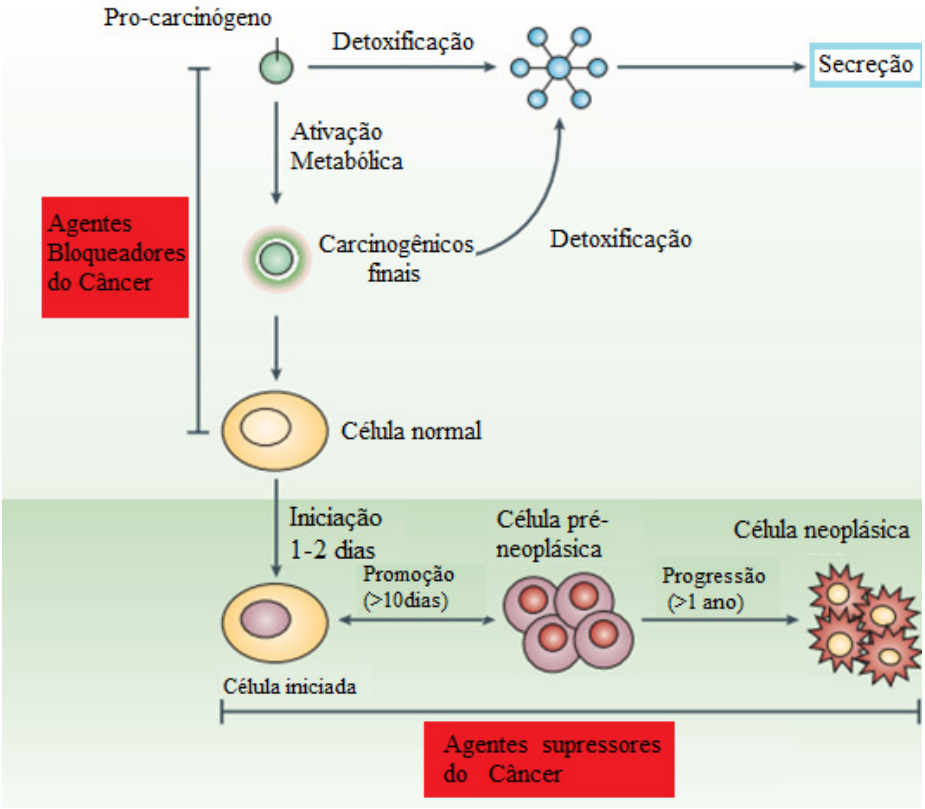

Figura 7: Fitoquímicos dietéticos como agentes bloqueadores e supressores dos múltiplos estágios da carcinogênese (Adaptado de SUHR, 2003).

A definição de Alimentos Funcionais pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) engloba duas alegações: *alegação de propriedade funcional* é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano; e *alegação de propriedade de saúde*: é aquela que afirma, sugere ou implica a existência da relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição

relacionada à saúde. Deste modo, o alimento ou ingrediente que alegar propriedades funcionais ou de saúde pode além de funções nutricionais básicas, quando se tratar de nutriente, produzir efeitos metabólicos e fisiológicos e ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica.

Recentes estudos têm demonstrado a ação quimipreventiva e quimiterapêutica dos compostos bioativos dietéticos. KASALA e colaboradores, 2015, em uma revisão sitemática, demonstraram que diversos compostos bioativos poderiam ser efetivos na quimioprevenção do câncer de pulmão provocados pelo benzopireno, como a piperina, o resveratrol, a quercetina, curcumina, sulforafano, dentre outros. BOAVENTURA e colaboradores, 2015, analisando os efeitos da erva mate (*Ilex paraguariensis*) em culturas de células de câncer de fígado (HepG2), verificaram o efeito antiproliferativo da erva, após uma digestão simulada in vitro, e seu efeito na atividade antioxidante celular. Estes compostos bioativos, isolados e/ou combinados apresentam resultados promissores contra vários tipos de câncer particulamente na prevenção e na terapia do câncer (SHUKLA e colaboradores, 2014).

As especiarias são um grupo de alimentos que têm sido utilizadas por milhares de anos a fim de melhorar a qualidade sensorial dos alimentos; e a quantidade e variedade consumida nos países tropicais é particularmente extensa. A pimenta do reino é o principal tempero exportado da Índia, seguido da pimenta vermelha, açafrão, gengibre, cardamomo, curry em pó, dentre outros. Esses temperos possuem compostos bioativos responsáveis pelas suas propriedades antioxidantes e antinflamatórias, contribuindo para a sua atividade quimiopreventiva e quimioterápica (SRINIVASAN, 2005).

1.2.1. Curcumina

A curcumina, o [6]-gingerol, a capsaicina e a piperina, compostos bioativos presentes no açafrão, gengibre, pimenta vermelha e pimenta preta, respectivamente, possuem a estrutura molecular um pouco semelhante, apresentando um esqueleto básico comum, porém as cadeias laterais são diferentes (**Figura 8**) (COSTA e ROSA, 2010; SURESH e SRINIVASAN, 2007 E SURESH e colaboradores, 2007).

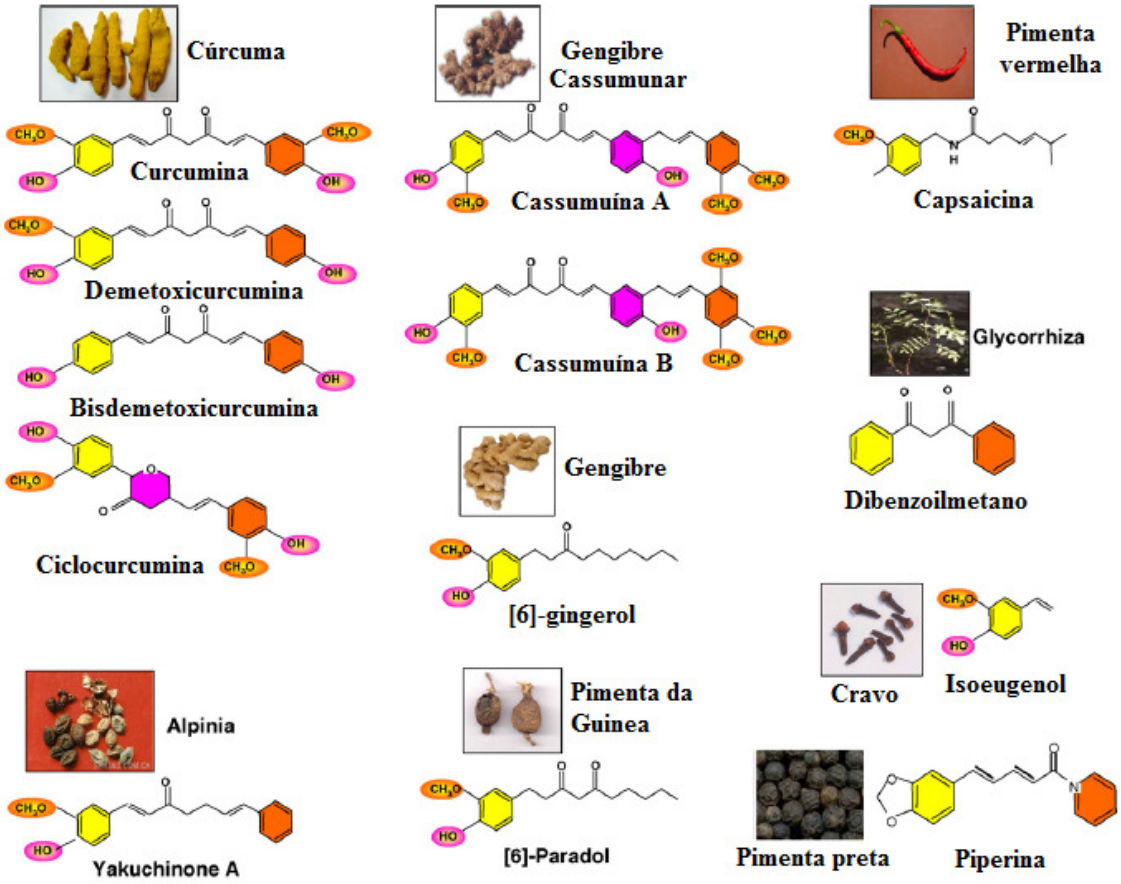

Figura 8: Estrutura química da curcumina, piperina, [6]-gingerol e seus análogos. (KUNNUMAKKARA e colaboradores, 2008).

A curcumina é um polifenol de coloração amarela e é o CBA (Composto bioativo) encontrado na cúrcuma ou açafrão da terra. É uma especiaria de origem

indiana extraída dos rizomas da curcuma longa. A fração amarelo-pigmentada da cúrcuma apresenta diversos curcuminoides, que são quimicamente relatados a um ingrediente principal, a curcumina. Este princípio ativo foi primeiramente isolado em 1815 e os principais curcuminoides presentes no açafrão são: a curcumina, a demetoxicurcumina e a bisdemetoxicurcumina, sendo que ao padrão de curcumina comercial apresenta 77% de curcumina, 17% de demetoxicurcumina e 3% de bisdemetoxicurcumina (KUNNUMAKKARA e colaboradores, 2008).

Esse tempero tem sido utilizado há longo tempo na culinária e no tratamento de uma grande variedade de condições inflamatórias. Diversas pesquisas têm demonstrado sua propriedade de interferir em mecanismos de sinalização celulares envolvidos no ciclo celular, na apoptose, na proliferação, na angiogênese, na metástase e inflamação, exibindo assim um potencial terapêutico contra diversos tipos de câncer (MULLER e colaboradores, 2004 e WANG e colaboradores, 2010).

A curcumina é conhecida por apresentar uma baixa biodisponibilidade sitêmica, por apresentar baixa absorção e rápidas alterações metabólicas. Em um estudo de SURESH e SRINIVASAN, 2007, observaram que uma ingestão de 1000 µg resultava em uma absorção máxima de 100 µg e a quantidade de curcumina analisada no sangue foi insignificante. A aborção intestinal de curcumina aumentou de 48% para 56% apenas quando este composto foi incorporado a micelas, mostrando por isso sua baixa biodisponibilidade. Adicionalmente, o tratamento térmico parece também ter efeito negativo sobre o conteúdo de curcumina. SURESH e colaboradores, 2007, observaram uma redução entre 27-53% do princípio ativo da cúrcuma após processamento térmico, sendo a perda máxima observada no processo de cozimento à pressão.

No açafrão, não são conhecidos outros agentes com atividade antinflamatória e antiproliferativa. Porém, na maioria dos estudos, a curcumina é o mais potente

componente quando comparado a demetoxicurcumina e a bisdemetoxicurcumina; em contrapartida, uma mistura dos três componentes pode ser ainda mais eficaz do que quando utilizados isoladamente (KUNNUMAKKARA e colaboradores, 2008).

Mais de 3.000 estudos sugerem que a curcumina pode interferir em diversas vias de sinalização envolvidas na tumorigênese e apresenta um potencial tanto na prevenção quanto no tratamento do câncer. Embora farmacologicamente a curcumina seja bastante segura em humanos, sua baixa disponibilidade pode ser um problema. Mais estudos devem ser feitos, tanto utilizando a curcumina isolada quanto combinada com outros componentes para comprovação de seu potencial. A segurança de seu uso, juntamente com o seu baixo custo, torna a curcumina um agente ideal a ser explorado para a prevenção e tratamento de diversos tipos de câncer.

Entre as diferentes vias de sinalização, já foi demonstrado que a curcumina pode regular a expressão da Cox-2 por meio da regulação da ativação do NF-kB, fator necessário para ativação da Cox-2. Ela também atua na regulação de atividades de moléculas que controlam a adesão, a apoptose e a invasão celular, como, por exemplo, inibindo a expressão intracelular de células de adesão induzida pelo TNF-α. Outro exemplo de mecanismo anti-carcinogênico da curcumina é a participação na ativação da proteína p53, induzindo a apoptose (MULLER e colaboradores, 2004; WANG e colaboradores, 2010; WAYA e colaboradores, 2009; NORATTO e colaboradores, E PATIL e colaboradores, 2009). AGGARWAL e colaboradores, em 2003, estudaram a atividade da curcumina na regulação da expressão da ciclina E, um protooncogene expresso em vários cânceres humanos e que faz a mediação da transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular. Neste estudo, a curcumina melhorou a expressão dos inibidores da quinase dependente da ciclina (CDK), das proteínas p21 e p27 e do gene supressor de tumor p53. Verificaram que, em uma concentração entre 50 e 100 μM por um período

de 3 horas, a curcumina desencadeou a supressão máxima da ciclina E em células de câncer de mama, próstata, pulmão, células de leucemia e linfoma e carcinoma de cabeça e pescoço.

SUN e colaboradores (2012) identificaram que altas doses (50 μM) de curcumina poderia produzir uma morte apoptótica dose-dependente de células de câncer de mama que superexpressavam um receptor de tirosina quinase (Her2), sendo capaz de clivar PARP e caspase 3, afirmando que a curcumina é um potente agente na quimioprevenção do câncer de mama. Mais recentemente, CHOI e PARK, 2015, afirmaram que um co-tratamento de curcumina em culturas de células, poderia ser utilizada em combinação com a quimioterapia, aumentando a sensibilidade da mesma, no tumor agressivo de câncer de mama.

1.2.2. Piperina

A piperina é um alcalóide isolado das espécies *Piper nigrum* e *Piper longum* e possui efeitos anti-mutagênicos e anti-tumorais. Porém, os efeitos preventivos da piperina como agente único em relação ao câncer de mama, ainda não foram bem explorados (KAKARALA e colaboradores, 2010).

A piperina pode ser capaz de aumentar a biodisponibilidade de certas drogas terapêuticas como a ampicilina, amoxicilina e o ibuprofeno, assim como de outros fitoquímicos como a curcumina, o resveratrol e a 3-galato de epigalocatequina (DUDHATRA e colaboradores, 2012). Tem sido descrito que a administração via oral de piperina na concentração entre 0,0004 e 0,15 mg/Kg de peso por dia seria suficiente para aumentar a absorção intestinal de: vitaminas lipossolúveis como A, D, E e K, *β*-caroteno (pró-vitamina A); vitaminas hidrossolúveis como as do complexo B e vitamina

C; minerais como cálcio, ferro, zinco, selênio; aminoácidos como a isoleucina, leucina e valina e, ainda, compostos bioativos como a curcumina, galato de epigalocatequina, teofilina e resveratrol (DUDHATRA e colaboradores, 2012). Considerando que o percentual de piperina na pimenta-do-reino é de 9% (BHARDWAJ e colaboradores, 2002), um indivíduo de 60 kg deve ingerir entre 0,270-100 mg de pimenta por dia, para atingir essa recomendação. Um estudo realizado nos Estados Unidos da América estimou o consumo médio de pimenta-do-reino, baseando-se em populações que utilizam regularmente esse condimento em sua dieta. O consumo diário desses indivíduos variou entre 17 mg e 31 mg de pimenta-do-reino, quantidade satisfatória para aumentar a biodisponibilidade de nutrientes (KINDELL, 1984). Com relação ao consumo diário de pimenta preta pela população indiana é estimado em torno de 330 mg, quase dez vezes maior do que o observado para os norte-americanos, o que significa que essa ingestão também seria suficiente para melhorar a biodisponibilidade de outros compostos (PRADEEP e colaboradores, 1993).

Os mecanismos pelos quais a piperina é capaz de melhorar a biodisponibilidade de alguns compostos ainda não foi completamente elucidado. Entretanto, sugere-se que a piperina tenha a capacidade de induzir alterações nas características de permeabilidade e fluidez das membranas de borda em escova do intestino delgado, resultando em aumento da sua superfície absortiva e maior eficiência na absorção através da barreira epitelial (KHAJURIA e colaboradores, 2002).

Em 1998, SHOBA e colaboradores sugeriram que a piperina poderia aumentar a biodisponibilidade da curcumina, se esses compostos bioativos fossem utilizados em associação. A biodisponibilidade da curcumina em humanos aumentou em 2.000% após administração em cápsulas de 2g de curcumina associada a 20mg de piperina. O estudo sugere que a piperina pode estar atuando no metabolismo da curcumina melhorando

assim a sua biodisponibilidade. A piperina possui uma influência inibitória sobre as reações de biotransformação enzimática de drogas no fígado, aumentando assim a biodisponibilidade das mesmas (SURESH e SRINIVASAN, 2007). PRAKASH e SRINIVASAN, 2010 atribuíram esse efeito, também ao aumento da superfície absortiva do intestino delgado, devido às alterações na fluidez das membranas de borda em escova e na propriedade da permeabilidade passiva, associada com a indução de um aumento no comprimento e perímetro das microvilosidades.

A absorção intestinal da piperina é relativamente alta, em torno de 96% (SURESH e SRINIVASAN, 2010). Após a administração de piperina via oral em ratos (20 mg/Kg de peso), observou-se que esse composto era absorvido rapidamente pelo trato gastrointestinal, podendo ser detectado no plasma após 15 minutos de sua administração. Além disso, a piperina permaneceu no sangue desses animais por até 8 horas, no entanto, sua concentração máxima detectável foi obtida após 30 minutos da sua ingestão (BAJAD e colaboradores, 2002).

SELVENDIRAN e colaboradores (2005) demonstraram que a suplementação oral de piperina (50 mg/kg) poderia aumentar a expressão das enzimas de fase II de detoxificação hepática e reduzir o dano ao DNA em um modelo experimental *in vivo* de câncer de pulmão induzido pelo benzopireno. Os mesmos autores, em 2004, verificaram que a piperina poderia aumentar a expressão de enzimas de fase I, aumentar a atividade de enzimas mitocondriais, sugerindo seu importante papel na produção de energia mitocondrial, além de aumentar a atividade da glutationa peroxidase.

Mais recentemente, a piperina foi identificada como um potente composto capaz de reverter a resistência de células a múltiplas drogas por modulação de PGP, MRP, bem como outros mecanismos, como também foi demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa em modelo celular de leucemia mielóide crônica parental e resistente

(CARDOSO, 2015 e LI e colaboradores, 2011). ZHANG e colaboradores, em 2015 avaliaram o efeito da piperina na proliferação de células de osteosarcoma humano e mostraram que este composto seria capaz de bloquear o ciclo celular em fase G2/M e suprimir o potencial metastático desta célula.

1.2.3. [6]-gingerol

O [6]-gingerol, composto fenólico responsável pelo sabor picante do gengibre (*Zingiber officinale Roscoe*, Zingiberaceae), possui diversos efeitos farmacológicos incluindo ação antioxidante, antinflamatória e atividade anticâncer. O tratamento com o [6]-gingerol *in vitro* já demonstrou aumentar a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO's) diminuindo o potencial de menbrama mitocondrial e subsequentemente a indução da apoptose. Além disso, ele pode interferir nos vários alvos moleculares da sinalização celular tanto *in vitro* como *in vivo*. Por isso, é necessária a melhor caracterização das vias que regulam a progressão do ciclo celular e da apoptose, assim a descoberta de novas drogas é de fundamental importância para a prevenção e tratamento do câncer (NIGAM e colaboradores, 2009). Um estudo realizado por Lee e colaboradores, 2008, sugeriu ainda que o [6]-gingerol seria capaz de inibir o processo de metástase, e que a ingestão de gengibre poderia ser estimulada, pois ele pode ser consumido em quantidades consideráveis na dieta humana (250mg a 1g/dia), o que proporcionaria uma quantidade satisfatória de [6]-gingerol (1% a 3%) e a que foi utilizada no estudo, para a prevenção do câncer, um dos escassos estudos publicados até então relacionado ao câncer de mama (LEE e colaboradores, 2008).

. KIM e colaboradores, 2005, demonstraram que o [6]-gingerol é um potente inibidor do processo de angiogênese e pode ser útil no tratamento de tumores e outras

doenças que depender do processo de angiogênese. Outros estudos mais recentes sugerem que o [6]-gingerol pode estar envolvido na parada do crescimento celular e apoptose em modelos de culturas de células de câncer coloretal e induzir a apoptose aumentando a expressão de caspase 3 e a autofagia em culturas de células de câncer mais agressivas como a HeLa (carcinoma humano cervical) (LEE e colaboradores, 2008 e CHAKRABORTY e colaboradores, 2012).

1.3. Combinação de compostos

A carcinogênese é geralmente reconhecida como um processo de várias etapas, nas quais ocorrem diferentes alterações celulares e moleculares (COSTA e ROSA, 2010). Durante as três últimas décadas, ocorreram progressos na identificação de eventos que estão associados com os múltiplos estágios da carcinogênese, e sabe-se, de certa forma, como os fitoquímicos dietéticos podem atuar nestes processos (SURH, 2003). Os eventos celulares e moleculares afetados ou regulados pelos agentes quimiopreventivos incluem: a ativação/detoxificação pelas enzimas xenobióticas, reparo do DNA, progressão do ciclo celular, proliferação celular, diferenciação e apoptose, expressão e ativação funcional de oncogenes ou inibição de genes supressores de tumor, angiogênese e metástase, ativação hormonal e de fator de crescimento (SURH, 2003).

Porém, apesar destes progressos, a identificação molecular e os alvos celulares dos fitoquímicos quimiopreventivos ainda são incompletos. Muitas das alterações moleculares provocadas pelos fitoquímicos quimiopreventivos, associadas com a carcinogênese, podem ocorrer nas vias de sinalização, proliferação e diferenciação celulares (SURH, 2003). Todos os mecanismos envolvidos nestes processos podem estar atuando em conjunto na quimioprevenção e quimioterapia, pois, sugere-se que

quando utilizados em conjunto, poderia haver um aumento da atividade de um determinado composto, potencializando sua ação ou haveria uma ação sinérgica, agindo nos diversos processos moleculares por possuírem perfis de atividade diferentes. Porém, os estudos ainda são inconclusivos e ressalta-se a necessidade imediata de se estabelecer mais perfis de eficácia e toxicidade em relação à combinação de compostos bioativos e assim utilizá-los como base em combinações sinérgicas (RAJ e colaboradores, 2008 e HSIEH e WU, 2008).

Recentemente, PATIAL e colaboradores, 2015, avaliaram o efeito combinado e isolado da curcumina e da piperina no carcinoma hepatocelular induzido por dietilnitrosamina em um modelo *in vivo* e concluíram que a combinação de curcumina com piperina poderia aumentar a supressão do tumor quando comparada aos seus efeitos isolados.

Além disso, estudos mais recentes vêm investigando a ação de fitoquímicos em associação com drogas quimioterapêuticas, pois, acredita-se que confirmada à ação quimiopreventiva e quimioterápica destes compostos dietéticos, poderia ocorrer uma diminuição das concentrações destas drogas quimioterapêuticas quando associadas, diminuindo assim seus efeitos colaterais e com isso melhorando a qualidade de vida do paciente (HEEBA e ABD, 2010).

HARTOJO e colaboradores, 2010 e SÁNCHEZ e colaboradores, 2010 verificaram que a curcumina, em células de adenocarcinoma esofágico e leucemia mieloide, respectivamente, quando associada a drogas antitumorais como a cisplatina e o trióxido de arsênio, seria capaz de aumentar a citotoxicidade destes fármacos e potencializar a ação quimioterápica dos mesmos reforçando seu uso como um potente composto para a terapia do câncer.

Esta linha de pesquisa deve ser bem investigada, pois alguns estudos vêm demonstrando que certos compostos bioativos podem atenuar a eficácia anticancerígena do fármaco, sendo por isso contra-indicada a associação de determinados compostos antioxidantes. Por exemplo, FUKUI e colaboradores, 2010, usando concentrações farmacologicamente alcançáveis de resveratrol, verificaram um estímulo do crescimento de células de câncer de mama MDA-MB-435s, porém não observaram o mesmo efeito para outras linhagens como a MDA-MB-231 e a MCF-7. Esses resultados sugerem uma cautela na utilização de compostos bioativos por pacientes com câncer, os quais vem utilizando na esperança de melhorar o tratamento. Mais estudos são necessários a fim de melhor avaliar os benefícios do uso destes compostos.

Justificativa

2. Justificativa

Os compostos quimioprotetores dietéticos oferecem um grande potencial na luta contra o câncer através de seus diversos mecanismos biológicos. Para converter, com êxito, um composto quimiopreventivo dietético a um potente quimioterápico clinicamente viável, são exigidas análises aprofundadas de suas ações famacocinéticas e de seus biomarcadores intermediários, em indivíduos saudáveis e na população alvo. Adicionalmente, são necessários diversos estudos para uma potencial combinação dos compostos com diferentes mecanismos quimiopreventivos, no sentido de aumentar a sua eficácia e reduzir sua toxicidade.

A elucidação dos mecanismos moleculares de resposta quimiopreventiva e quimioterápica dos compostos bioativos, focados nas cascatas de sinalização celulares e vias moleculares comuns ainda é uma barreira a ser explorada, pois os estudos ainda são inconclusivos quanto aos efeitos da associação de compostos sobre linhagens celulares de câncer de mama. Uma vez que são escassos e/ou inéditos os trabalhos com estes fitoquímicos relacionados aos seus efeitos sinérgicos e associados ao melfalan em células de câncer de mama, uma investigação deste tipo será de grande relevância para gerar melhores perspectivas, para uma doença que acomete mulheres de todo o mundo.

Objetivos

3. Objetivos

3.2. Objetivo geral

Investigar o efeito da curcumina, piperina, [6]-gingerol (fitoquímicos) e melfalan (agente quimioterápico), isolados e combinados, em diferentes linhagens de células de câncer de mama

3.3. Objetivos específicos

- Avaliar a viabilidade celular dos compostos idolados curcumina, piperina, [6]-gingerol e melfalan nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231;
- Comparar a viabilidade celular, o ciclo celular, a morte celular e as vias de sinalização relacionadas aos compostos isolados e associados;
- Analisar o efeito da combinação dos compostos assciados e sua citotoxicidade em células normais.

Material e Métodos

4. Material e Métodos

4.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico. Meio DMEM, curcumina, piperina, [6]-gingerol, 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); Soro Fetal Bovino (SFB) da *Cultilab* (Campinas, SP, BR); Azul de Trypan da VETEC (Brasil); Kit de detecção de apoptose da e *Bioscience*.

4.2. Culturas de células e tratamentos

As linhagens de células epiteliais de câncer de mama humano, MCF-7 e MDA-MB-231 foram cultivadas em meio D-MEM (*Dulbecco´s Modified Eagle Medium*) suplementadas com 2,0 g/L de HEPES, 3,7 g/L de bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino, 5µg/L de insulina bovina, 100 unidades/mL de penicilina G e 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina. As células foram mantidas a 37 °C em uma atmosfera umidificada de 5% de CO_2.

Para o tratamento das células, estas foram contadas em uma densidade inicial de $4x10^5$ e plaqueadas na mesma densidade inicial. Após alcançarem 70 – 80 % de confluência, as células foram tratadas com:

- concentrações de 0; 1; 5; 10; 25; 50; 75; 100; 150; 200 e 300 μM de curcumina, [6]-gingerol e piperina, separadamente e associados (1:1), dissolvidos em DMSO ou somente com 0,5% de DMSO (controle);

- concentrações de 0; 0,5; 2,5; 5; 12,5; 25; 37,5; 50; 75; 100 e 150 μM de melfalan dissolvido em etanol-HCl e PBS (1:1) ou somente com 0,5% de etanol-HCl e PBS (controle);

- para a combinação dos compostos foram utilizadas as seguintes concentrações de dois compostos: 0,25 x IC_{50}, 0,5 x IC_{50}, 0,75 x IC_{50}, 1 x IC_{50}, 1,25 x IC_{50}, para curcumina e piperina, curcumina e melfalan e piperina e melfalan ou somente com 0,5% de DMSO + 0,5% de etanol-HCl e PBS (controle). O cálculo dos valores do IC_{50} está descrito no **item 4.3**.

Os testes foram realizados com as seguintes amostras: curcumina, [6]-gingerol e piperina, separadamente. E em associação, curcumina X [6]-gingerol, curcumina X piperina, [6]-gingerol X piperina, melfalan X curcumina, melfalan X [6]-gingerol e melfalan X piperina.

Os experimentos com as células tratadas foram realizados em diferentes tempos, 24 e 48 horas.

4.3. Ensaio de viabilidade celular pelo método de redução de MTT

A viabilidade celular das células MCF-7, MDA-MB-231 (câncer de mama) e PBMC (células mononucleadas de sangue periférico) foi determinada pelo ensaio de redução de MTT como descrito por MOSSMAN (1983). O tratamento foi realizado utilizando os compostos isolados. Além disso, foi realizada uma curva de concentração para a combinação dos compostos como descrito no **item 4.2** e posteriormente as

células foram tratadas com as combinações utilizando 50% do valor do IC_{50}. Este ensaio é baseado na habilidade das células viáveis de converterem o MTT em cristais de formazano, precipitado insolúvel e de coloração roxa. Para isto, após o tratamento, as células foram lavadas com PBS morno (37°C) e incubadas com 0,5 mg/mL de MTT, diluído em PBS, por 3 horas a 37 °C. Após a incubação, a solução de MTT foi retirada, e os cristais de formazano formados serão dissolvidos em isopropanol. Em seguida, as amostras foram transferidas para *eppendorfs* e submetidas à centrifugação por 5 min a 5000 rpm. O sobrenadante foi submetido à análise espectrofotométrica. A quantidade de MTT reduzido foi calculada baseada na diferença entre a absorbância de 570 e 650 nm (branco). Os valores do IC_{50} foram determinados utilizando o programa Graph Pad Prism 5.0 para Windows.

4.4. Ensaio de citotocixidade - Contagem celular utilizando teste de exclusão com Azul de Trypan

Para confirmar o ensaio de citotoxicidade utilizando o método de redução do MTT, as células MDA-MB-231 foram tratadas com os valores de IC_{50} para os compostos isolados e os compostos associados utilizando 50% dos valores do IC_{50} foram analisadas após 24 e 48 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 foram utilizados para a contagem em câmara de Neubauer. As células vivas possuem membrana intacta e conseguem excluir o Azul de Trypan. 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,

incorporam esse corante e ficam marcadas, permitindo contagem diferenciada entre células vivas e mortas (BARILE, 1994).

Após estas análises todos os outros ensaios foram realizados utilizando os valores do IC_{50} para os compostos isolados e 50% dos valores de IC_{50} associados.

4.5. Análise do Ciclo Celular

A distribuição do ciclo celular foi analisada por citometria de fluxo, como descrito previamente por POZO-GUISADO e colaboradores (2002). As células da linhagem MDA-MB-231 foram plaqueadas em placas de 6 poços, com volume final de 3 mL/ poço na concentração final de 2×10^4 céls/mL. Em seguida, foi feito o tratamento com os valores do IC_{50} para os compostos isolados e 50% dos valores do IC_{50} para as associações dissolvidas em 0,5% de DMSO ou com os respectivos volumes de DMSO 0,5% (v/v; controle). Após incubação por 24 e 48 horas, 1×10^5 células foram coletadas, centrifugadas a $220 \times g$ por 7 minutos à 4°C e lavadas 2 duas vezes com PBS, e então ressuspendidas em PBS contendo Triton X-100 0,1% (v/v), 50 µg/mL de iodeto de propídio (PI) e 1 mg/mL de RNase A. Em seguida, o conteúdo de DNA foi medido usando *FACScalibur* equipado com o programa *CellQuest* (Becton Dickinson, CA). A leitura do PI foi realizada pelo detector FL-2 área. A porcentagem de células nas fases Sub G1, G1, S e G2/M do ciclo celular foi quantificada usando o programa *Summit* v4.3® (DAKO).

4.6. Ensaio de Morte Celular

A caracterização da morte celular foi investigada pela dupla marcação com PI e Anexina-V. A marcação por PI reflete um rompimento da membrana plasmática, caracterizando necrose. Já a Anexina-V se liga ao fosfolipídio de membrana, fosfatildiserina, que sofre externalização durante a apoptose, ocasionando a marcação por Anexina-V. De forma similar, quando ocorre a marcação dupla, considera-se apoptose tardia. O termo técnico é necrose secundária, pois a marcação por PI ocorre após a permanência da célula apoptótica no meio de cultura, de tal forma, que é secundária à marcação por Anexina-V. As células viáveis são representadas pela ausência de qualquer marcação (BACELAR, 2014).

As células MDA-MB-231 foram plaqueadas em placas de 6 poços, com volume final de 3 mL/ poço na concentração final de 2×10^4 céls/mL. Em seguida, foi feito o tratamento com os valores do IC_{50} para os compostos isolados e 50% dos valores do IC_{50} para as associações dissolvidas em 0,5% de DMSO ou com os respectivos volumes de DMSO 0,5% (v/v; controle). Para esse ensaio foi utilizado o *kit* de detecção de apoptose da e*Bioscience*. Após incubação por 24 e 48 horas, as células foram centrifugadas a 220 × *g* por 7 minutos à 4°C e ressuspendidas no tampão de ligação do fabricante. Posteriormente, foram transferidas para uma placa de 96 poços com fundo em U (200 µL/ poço) e foram novamente centrifugadas a 220 × *g* por 7 minutos à 4°C. Em seguida, foram incubadas com tampão de ligação (96 µL) contendo Anexina-V conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) (3 µL) por 20 minutos em temperatura ambiente e protegidas da luz. Após o período de tempo referido, foram acrescentados 200 µL do tampão de ligação e, no momento da leitura foram adicionados 4 µL de PI. A análise foi realizada, em seguida, 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. A porcentagem de células marcadas com PI e/ou Anexina-V foi quantificada usando o programa *Summit* v4.3® (DAKO)

4.7. Preparação do extrato protéico das células

Após o tratamento com os valores do IC_{50} para os compostos isolados e 50% dos valores do IC_{50} para as associações, dissolvidas em 0,5% de DMSO ou com os respectivos volumes de DMSO 0,5% (v/v; controle), as células foram centrifugadas a 200g por 15 min a 4°C, o sobrenadante foi removido, as células foram lavadas com PBS e lisadas com nitrogênio líquido. Antes que as células descongelassem, o tampão de lise, contendo Tris-HCl 5 mM, pH 7,4, EDTA 10 mM, coquetel de inibidores de proteases (aprotinina A, leupeptina, bestatina, pepstatina A e E-64) em concentração final de 1mM, diluído 100 vezes, PMSF, 1 mM, ortovanadato de sódio 1 mM, fluoreto de sódio 5 mM, óxido de fenilarsina 1 mM, ácido ocadáico 1 mM, foi acrescentado. Em seguida, este extrato obtido foi congelado e descongelado, sonicado por 10 minutos e centrifugado por 5 min à 10000 rpm. O sobrenadante obtido da centrifugação foi considerado como o extrato protéico das células (SHE e colaboradores, 2001). A dosagem de proteína foi realizada seguindo o protocolo descrito por Lowry**,** utilizando albumina bovina como padrão (LOWRY e colaboradores, 1951).

4.8.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes

Quantidades iguais das amostras de extratos protéicos celulares (100 µg) foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) (LAEMMLI, 1970). O gel de corrida em condições desnaturantes continha Tris-HCl 375 mM, SDS 0,1 g%, acrilamida 9,7 g%, bisacrilamida 0,3 g%, persulfato de amônio 0,033 g%, N, N, N', N', -tetrametiletilenodiamina (TEMED) 0,055 % (v/v), pH 8,8. O gel de empacotamento continha 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 continha Tris-HCl 24,7 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1 g%, pH 8,3. As amostras foram dissolvidas 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 (118 kDa), albumina de soro bovino (90 kDa), ovoalbumina (50 kDa), anidrase carbônica (34 kDa), β -lactoglobulina (26 kDa) e lisozima (19 kDa). Após as corridas, utilizando corrente constante de 15 mA, os géis foram submetidos a eletrotransferência.

4.8.2. Western Blotting

Após a 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 a 4 ºC (TOWBIN e colaboradores, 1979) utilizando-se o sistema de transferência da Bio-Rad. 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 18 horas a 4 ºC. Após 18 horas, o tampão de bloqueio foi

desprezado e a membrana incubada com anticorpo primário numa diluição de 1:1.000 por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada 5x com TBS-Tween e incubada por 1 hora à temperatura ambiente com o anticorpo secundário (anti-IgG coelho/camundongo) conjugado a peroxidase (1:5000). A membrana foi então lavada 5x por 5 minutos com TBS-Tween e 2x 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-p53 (#DO-1) e anti-GAPDH (#0411) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA); anti-caspase 9 (#9502), anti-caspase 7 (#9492), anti-caspase 3, PARP, anti-p21 (#2947) (Cell Signaling Technology, CA, EUA). A quantificação das bandas foi determinada por análise densitométrica, utilizando o programa ImageJ versão 1.43p (NIH, EUA) e os resultados foram expressos em unidades arbitrárias conforme a sua comparação ao controle GAPDH.

4.9. Índice de Combinação (IC) para determinação do efeito sinérgico, aditivo ou antagônico

Após a análise de viabilidade celular, a determinação dos valores de IC_{50} e do índice de combinação (IC) para 50% de inibição celular foi determinado pelo método descrito por CHOU, T., 1991 utilizando o programa CalcuSyn (versão 2.0, Biosoft). Para a análise dos compostos usados em combinação foi utilizada a equação do isobolograma clássico, onde: (D)1 e (D)2 são as doses de dois compostos utilizados em

combinação e (Dx)1 e (Dx)2 são as doses de dois compostos utilizados isoladamente. Para a análise da combinação, IC < 1, IC = 1 e IC > 1 indicam, respectivamente, efeito sinérgico, aditivo e antagônico. IC = ((D)1/(Dx)1) + ((D)2/(Dx)2).

4.10. Análise estatística

Os resultados dos experimentos acima descritos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste de Tukey, usando o programa GraphPad Prism 5 para Windows. A média e o erro padrão são representativos de três experimentos independentes. Resultados com valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados e Discussão

5. Resultados e Discussão

5.1. Viabilidade celular dos compostos isolados nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231.

Primeiramente, realizamos o ensaio de viabilidade celular pelo método de redução do MTT para avaliar o efeito isolado dos compostos bioativos curcumina, piperina, [6]-gingerol e do quimioterápico melfalan nas linhagens de câncer de mama MCF-7 (**Figura 9**) e MDA-MB-231 (**Figura 10**).

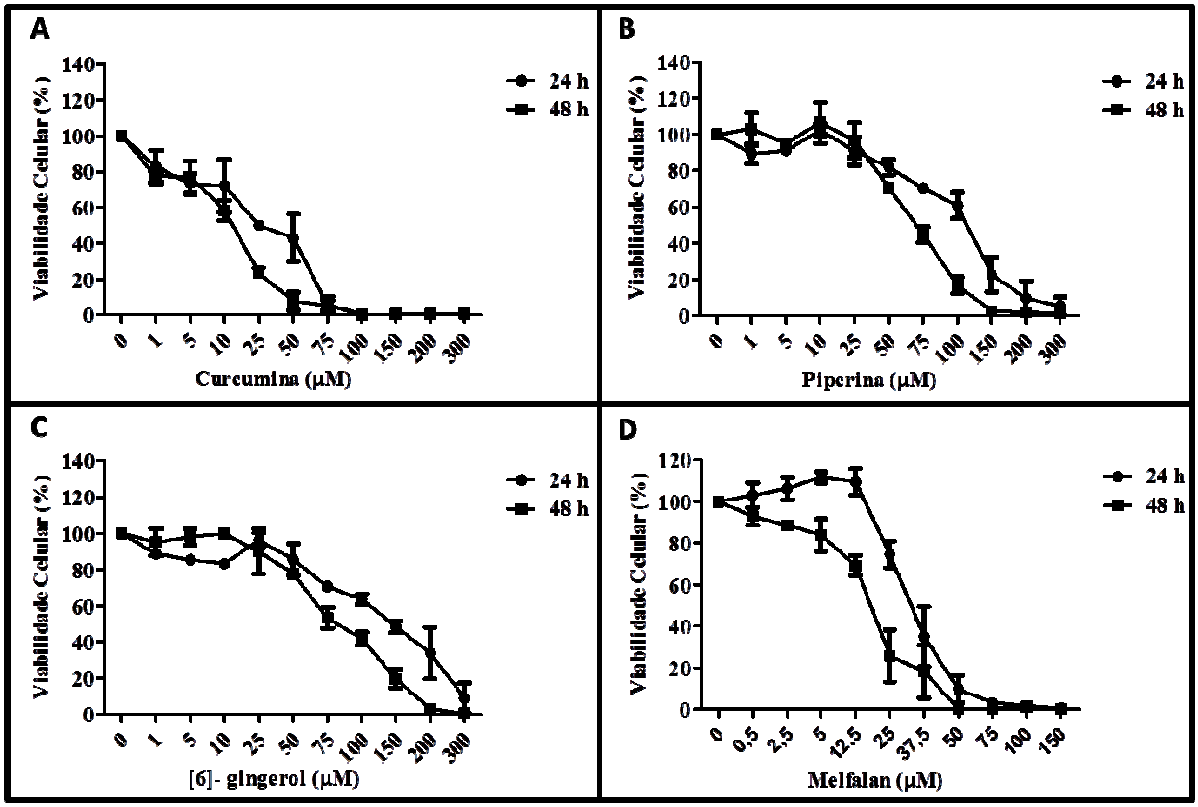

Figura 9: Efeito da curcumina, piperina, [6]- gingerol e melfalan isolados na viabilidade celular de culturas de células de câncer de mama MCF-7. As células foram tratadas com 0; 1; 5; 10; 25; 50; 75; 100; 150; 200 ou 300 µM de Curcumina (A), Piperina (B), [6]-gingerol (C) e Melfalan (D) por 24 (-•-) ou 48(-■-) horas. Os resultados representam a média e DP (desvio padrão) de três experimentos independentes.

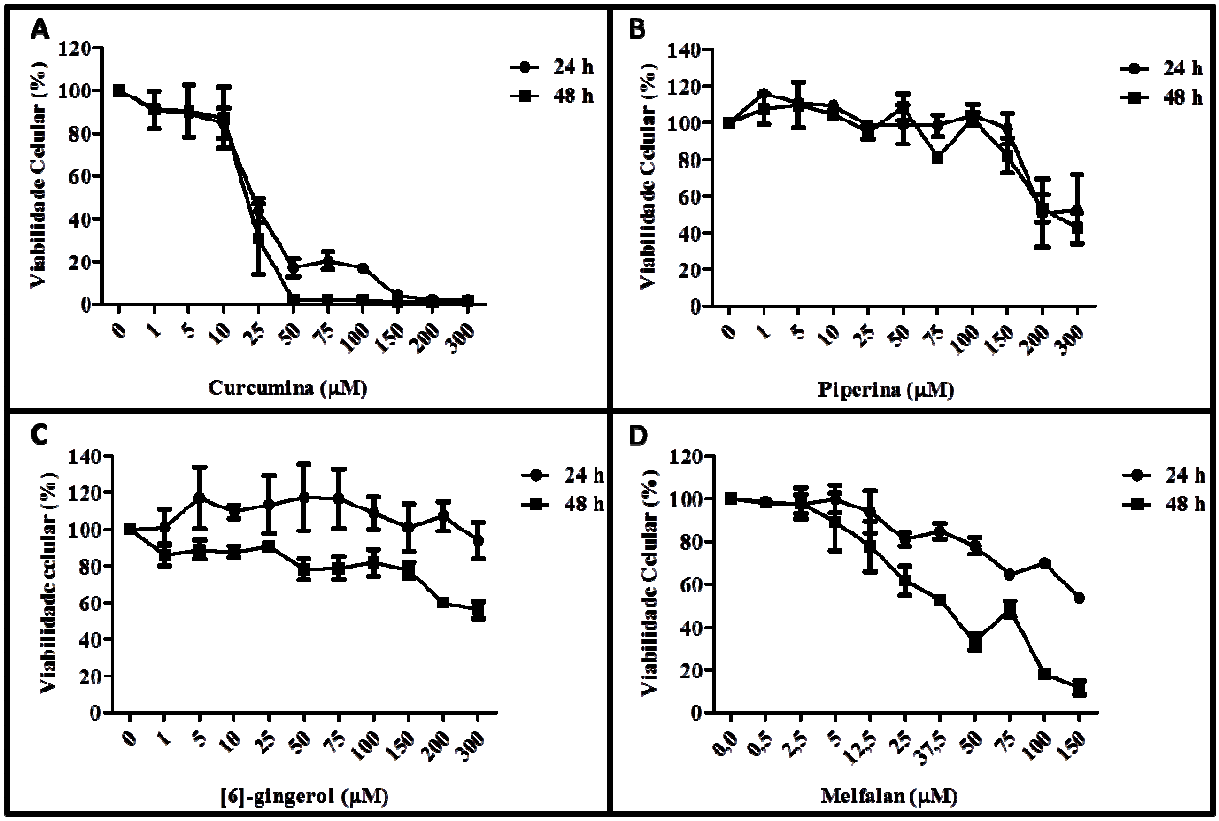

Figura 10: Efeito da curcumina, piperina, [6]-gingerol e melfalan isolados na viabilidade celular de culturas de células de câncer de mama MDA-MB-231. As células foram tratadas com 0; 1; 5; 10; 25; 50; 75; 100; 150; 200 ou 300 µM de Curcumina (A), Piperina (B), [6]-gingerol (C) e Melfalan (D) por 24 (-•-) ou 48(-■-) horas. Os resultados representam a média e DP (desvio padrão) de três experimentos independentes.

De acordo com os resultados encontrados, podemos observar que a linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 (**Figura 10**) foi mais resistente ao tratamento com o uso dos compostos bioativos e do melfalan isolados, quando comparada com a linhagem MCF-7 (**Figura 09**), de acordo com os valores de IC_{50} (**Tabela 2**). Em ambas as linhagens, o tratamento com os compostos bioativos e o melfalan, reduziram a viabilidade celular de maneira dose e tempo dependente, apenas com exceção do [6]-gingerol na linhagem MDA-MB-231 no tempo de 24 horas, que não apresentou efeito citotóxico.

Após as análises das curvas de viabilidade dos compostos, realizamos o cálculo do $IC_{50,}$ os quais estão apresentados na **Tabela 2**, para identificarmos a concentração de inibição de 50% das células, através do programa Graph Pad Prim 5.0 para Windows.

Tabela 2: Valores do IC50 dos Compostos Bioativos e do Melfalan em culturas de células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 durante 24 e 48 horas de tratamento.

Compostos Bioativos (MCF-7)	**IC_{50} (µM) 24h**	**IC_{50} (µM) 48h**	**Compostos Bioativos (MDA-MB-231)**	**IC_{50} (µM) 24h**	**IC_{50} (µM) 48h**
Curcumina	19,85	11,21	**Curcumina**	23,29	18,62
Piperina	103,40	66,91	**Piperina**	276,00	246,60
[6]- gingerol	131,00	81,47	**[6]- gingerol**	x	803,40
Melfalan	33,77	15,88	**Melfalan**	187,90	37,78

Para a linhagem MCF-7, o melfalan apresentou IC_{50} de 33,77 µM e 15,88 µM nos tempos de 24 e 48 horas, respectivamente. Já para a linhagem MDA-MB-231, o melfalan apresentou IC_{50} de 187,9 µM para as primeiras 24 horas de tratamento e uma redução de 85% após 48 horas, apresentando IC_{50} de 37,78 µM.

Em relação ao tratamento após 24 horas dos compostos bioativos isoladamente na linhagem MCF-7 (**Figura 9**), a curcumina apresentou menor valor de IC_{50} quando comparada à piperina, apresentando valores 19,85 e 103,4 µM, respectivamente. Para 48 horas de tratamento, observou-se uma redução dos valores de IC_{50} para curcumina e piperina com os valores de 11,21 e 66,91 µM, respectivamente (**Tabela 2**). O [6] – gingerol foi o composto bioativo que apresentou menor efeito nesta linhagem, com IC_{50} de 131 µM para 24 horas e 81,47 µM para 48 horas.

O tratamento com compostos isolados na linhagem MCF-7 já é bastante efetivo, já que esta linhagem é mais sensível a diversos tratamentos (WANG e colaboradores, 2004 e YANG e colaboradores, 2007). Para a linhagem MDA-MB-231, o tratamento com os compostos bioativos isolados demonstrou um menor IC_{50} para a curcumina, com valores de 23,29 µM e 18,62 µM. A piperina apresentou valores de 276 µM e 246,6 µM para 24 e 48 horas, respectivamente, valores semelhantes em relação a 24 e 48 horas. Ao realizarmos a curva de citotocixidade com o composto [6]-gingerol, não observamos efeitos citotóxicos deste após 24 horas de tratamento e após 48 horas, obtivemos um IC_{50} de 803,4 µM.

De todas as linhagens celulares de câncer de mama estudadas, as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 são as mais utilizadas em estudos com compostos bioativos. Dependendo do composto bioativo testado, as linhagens apresentam uma sensibilidade diferenciada (CASANOVA e colaboradores, 2012 e YANG e colaboradores, 2007) e isto pode ser explicado, primariamente, pela presença ou não de receptores de estrogênio. As duas linhagens também se diferenciam pela presença ou não de p53 e caspase 3, ambos responsáveis pela parada do ciclo celular e/ou regulação da apoptose. A linhagem MDA-MB-231 apresenta p53 mutante e caspase 3 funcionante, enquanto que a linhagem MCF-7 apresenta p53 selvagem e é deficiente em caspase 3.

Em 2012, nosso grupo de pesquisa realizou um estudo de citotoxicidade uitlizando resveratrol e melfalan em ambas as linhagens de câncer de mama, e assim como no presente estudo, nas células MDA-MB-231, o resveratrol e o melfalan apresentaram um efeito citotóxico menor do que nas células MCF-7 (CASANOVA e colaboradores, 2012).

Poucos estudos *in vitro* analisaram os efeitos do melfalan nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231. BIELAWSKI e colaboradores, em 2006, analisaram o efeito do

melfalan e de seu análogo (AB4) na citotoxicidade destas culturas de células de câncer de mama e observaram que o composto análogo foi mais efetivo em inibir a síntese de DNA e foi mais citotóxico do que o melfalan. A citotoxicidade foi dose-dependente em ambas as linhagens, mas foi menos pronunciada na linhagem MDA-MB-231 em alguns momentos. Os valores de IC_{50} encontrados para ambas as linhagens durante 24 horas de tratamento foi de 130 µM para MDA-MB-231 e de 125 µM para a MCF-7. Já CASANOVA e colaboradores, em 2012 encontraram valores de IC_{50} para a melfalan de 305 e 110 µM, respectivamente, demonstrando a diferença entre os valores IC_{50} de estudos já publicados e o recente estudo.

Muitos estudos vêm demonstrando o efeito da curcumina na tumorigênese. Em 1998, SIMON e colaboradores, demonstraram o efeito não só da curcumina, mas de dois curcuminoides (demetoxicurcumina e bisdemetoxicurcumina) em culturas de células de câncer de mama MCF-7, observando que a curcumina apresentou um efeito tempo e dose dependente com IC_{50} de 15 µM após 5 dias de tratamento. Além disso, afirmaram que o melhor inibidor do crescimento celular foi a demetoxicurcumina, seguida da curcumina e em último a bisdemetoxicurcumina, com IC_{50} de 10, 15 e 20 µM, respectivamente.

Em culturas de células de câncer de pulmão, A549 e H1299, a curcumina apresentou um efeito inibitório no crescimento celular de maneira dose dependente. Na linhagem H1299 apresentou efeito tempo dependente e mostrou-se mais sensível a curcumina do que a linhagem A549, demonstrando também que em outras linhagens podem ocorrer diferenças na sensibilidade de determinados compostos. Após 24 horas de exposição à curcumina, foram encontrados os valores de IC_{50} de 50 e 40µM, para as linhagens A549 e H1299, respectivamente. Concentrações mais altas de curcumina, como 160 µM foi capaz de reduzir a viabilidade celular em mais de 95% (PILLAI e

colaboradores, 2004). O mesmo ocorreu neste estudo, cujas concentrações de 75 µM para a MCF-7 e 150 µM para a MDA-MB-231 reduziram a viabilidade em mais de 95%.

CHEN e colaboradores, em 2014 verificaram que a curcumina seria capaz de induzir a expressão de Nrf2, um regulador de defesas antioxidantes, na linhagem MCF-7, diminuindo assim a proliferação destas células. Mais recentemente, JIA e colaboradores, em 2014 avaliaram a citotoxicidade da curcumina, em concentrações que variaram de 2 a 40 µM, por 12 e 24 horas e verificaram que na concentração de 40 µM resultou na morte de 80% das células MDA-MB-231, após 24 horas de tratamento, e esta mesma concentração resultou a morte de apenas 35% das células MCF-7. Estes resultados foram contraditórios ao presente estudo que demonstrou uma maior citotoxicidade da curcumina para a linhagem MCF-7, onde baixas concentrações de curcumina são mais efetivas quando comparadas à linhagem MDA-MB-231.

Poucos estudos utilizando a piperina em culturas de células de câncer de mama foram encontrados na literatura científica. Em 2013, Do e colaboradores trataram com piperina (10 -200 µM) diferentes linhagens de câncer de mama e verificaram que a piperina foi capaz de diminuir a proliferação das células de maneira dose-dependente, mas na linhagen MCF-7 apresentou um baixo efeito, exibindo um IC_{50} de 200 µM após 48 horas de tratamento. Neste estudo, o tratamento com piperina foi mais sensível na linhagem MCF-7 do que na linhagem MDA-MB-231, (**Tabela 2**) ao analisarem os efeitos de uma curva de concentração de [6]-gingerol (0 a 10 µM) por 24 horas em culturas de células de câncer de mama MDA-MB-231, LEE e colaboradores, 2008, não encontraram nenhum efeito significativo sobre a viabilidade celular após o tratamento com o composto, porém observaram efeitos na diminuição da adesão, invasão e motilidade celular de maneira dose dependente, demonstrando o potencial do [6]-

gingerol na inibição da metástase nesta linhagem. Analisando os efeitos do [6]-gingerol em outras linhagens de câncer, como a HepG2 (hepatoma humano), YANG e colaboradores em 2010, observaram uma inibição do crescimento destas células após 24 horas de tratamento de maneira dose dependente e obtiveram um IC_{50} de 304,27 μM, valor este considerado alto para compostos bioativos, como também foi observado no presente estudo, principalmente para a linhagem MDA-MB-231.

Após estes resultados e de acordo com os dados encontrados na literatura científica, optamos por testar se uma associação de fitoquímicos e/ou de fitoquímicos com quimioterápicos poderia ser mais eficiente na linhagem mais resistente, MDA-MB-231. WANG e colaboradores em 2004, afirmaram que a linhagem MDA-MB-231 apresenta de 3 a 20 vezes mais resistência ao tratamento com determinados quimioterápicos, incluindo o melfalan, na ausência de níveis detectáveis da glicoproteína P-gp 1 (MRP 1 –proteína resistência a multiplas drogas), quando comparada a MCF-7. Assim, prosseguimos as análises com a linhagem MDA-MB-231 e com os compostos bioativos mais eficazes (curcumina e piperina), juntamente com o melfalan, de acordo com os resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade, além da abordagem de combinação destes.

5.2. Curva de associação dos compostos bioativos e do melfalan na linhagem MDA-MB-231.

Sabendo-se que o uso de múltiplas drogas com diferentes mecanismos ou modelos de ação pode direcionar o efeito a um único alvo ou proporcionar um tratamento mais eficaz, testamos se uma combinação de compostos poderia reduzir ainda mais a viabilidade de células de câncer de mama, em especial a linhagem menos

sensível MDA-MB-231 (**Figura 11**). Para isso utilizamos os valores arredondados do IC_{50}, sendo eles: 24 µM para curcumina, 280 µM para piperina e 190 µM para o melfalan.

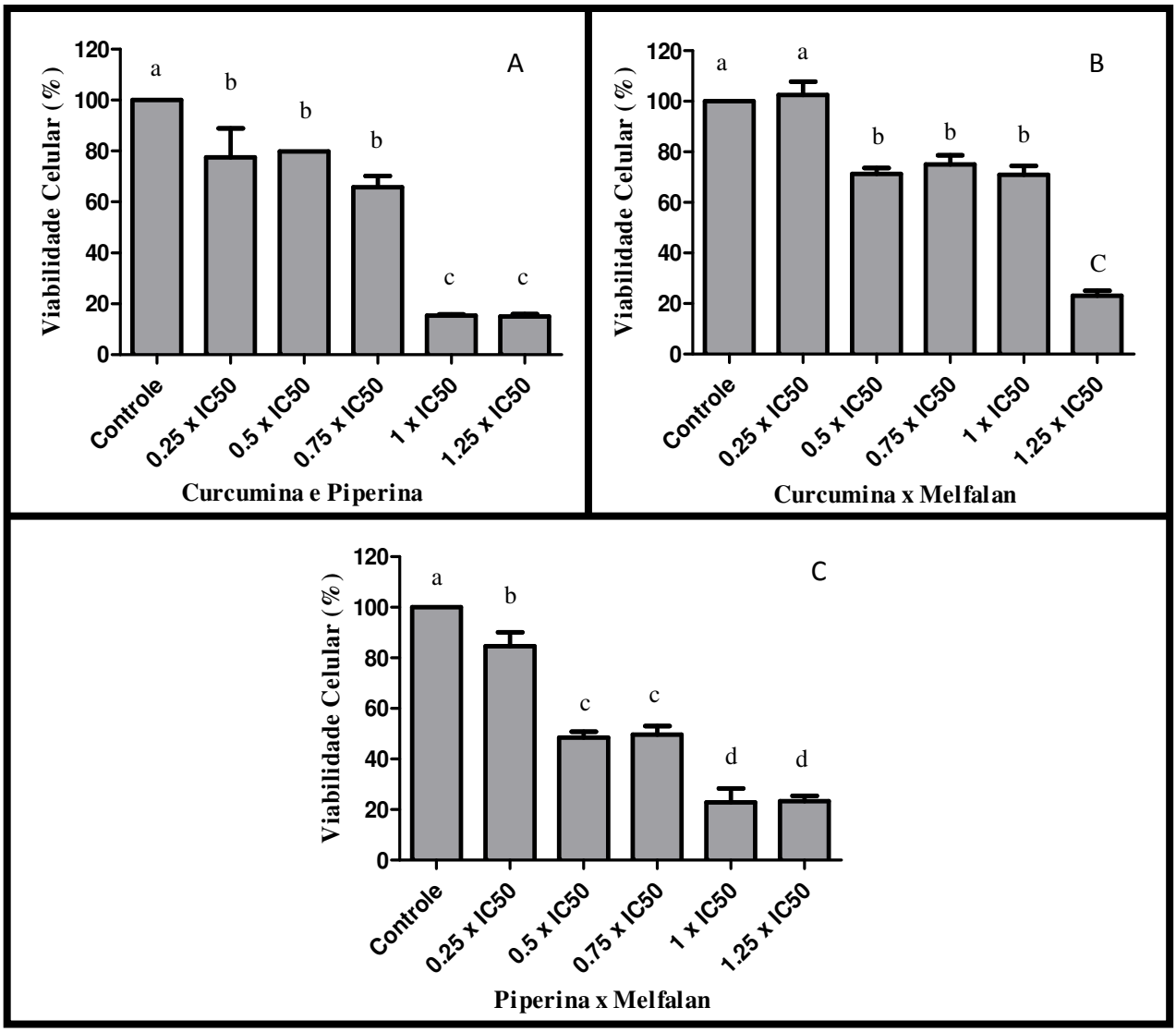

Figura 11: Efeito da combinação dos compostos bioativos e do melfalan na viabilidade celular de culturas de células de câncer de mama MDA-MB-231. Para a combinação dos compostos foram utilizadas as seguintes concentrações de dois compostos: 0,25 x IC_{50}, 0,5 x IC_{50}, 0,75 x IC_{50}, 1 x IC_{50}, 1,25 x IC_{50}, para curcumina mais piperina (A), curcumina mais melfalan (B) e piperina mais melfalan (C). Os resultados são expressos como média e erro padrão (n=3). a,b,c letras diferentes representam diferença estatística $p < 0,05$ (One-way ANOVA seguido do teste de Tukey), comparado às células controle e aos tratamentos.

Como observamos na **Figura 11**, a combinação de curcumina e piperinadiminuiu significativamente a viabilidade celular em todas as concentrações testadas com ênfase para as concentrações que utilizaram a combinação dos valores de IC_{50} dos compostos e a que utilizou 25% a mais do valor do IC_{50}, reduzindo a viabilidade em 85% e 86%, respectivamente. Para a combinação de curcumina e melfalan, , observamos que a combinação utilizando 75% a menos dos valores de IC_{50} não apresentou diferença significativa em relação ao controle, porém todas as outras concentrações reduziram a viablidade significativamente. As concentrações que utilizaram 50%, 75% e 100% do IC_{50}, reduziram em 30% a viabilidade celular. Já a concentração que utilizou 25% a mais do valor do IC_{50} reduziu em 77% a viabilidade celular. Para a piperina e o melfalan, todas as concentrações reduziram significativamente a viabilidade celular. Interessante observar que as concentrações que utilizaram a metade dos valores de IC_{50}, assim como 75% dos valores de IC_{50}, reduziram a viabilidade celular em 52 e 51%, respectivamente. Porém, quando foram utilizadas as concentrações de 100% e a de 25% a mais, esta viabilidade foi ainda mais reduzida, chegando a 77% de redução, como foi observado também para a combinação de curcumina e melfalan.

YANG e LIU, 2009, afirmaram que os fitoquímicos presentes em vegetais poderiam atuar de maneira independente ou em combinação como agentes anticâncer. Os efeitos aditivos ou sinérgicos dos fitoquímicos poderiam ser responsáveis pelo potencial antioxidante e pela atividade anticâncer, e os benefícios de uma dieta rica em vegetais é atribuída a uma complexa mistura de fitoquímicos. Este hipótese explica parcialmente, porque um antioxidante isolado não pode representar uma combinação de fitoquímicos naturais. Por isso, estes pesquisadores avaliaram, na linhagem MCF-7, se a combinação de dois componentes: extrato de maçã e quercetina 3-β-D-glicosídica

poderiam ser mais eficientes quando comparadas a seus efeitos isolados. Também utilizando combinações que variaram de 0,125 a 1,25 x IC_{50}, observaram que a associação aumentou a ação antiproliferativa das células quando comparadas a seus efeitos isolados. Poucos estudos avaliam os efeitos das interações entre fitoquímicos nas linhagens de câncer de mama, especialmente na MDA-MB-231.

Após realizarmos as curvas de combinações dos compostos, escolhemos a combinação que utiliza 50% do valor do IC_{50} de cada composto para identificarmos os mecanismos envolvidos na linhagem MDA-MB-231 que pudessem diferenciar seus efeitos isolados e dos associados. Esta combinação foi escolhida por não ter uma redução tão significativa na viabilidade celular (entre 50 e 80% de viabilidade), por ser uma concentração que utiliza metade da concentração da droga inicial isolada e por observarmos que em outros estudos de combinação, eram utilizados 50% do valor do IC_{50} da droga isolada para a associação (CAPONE e colaboradores, 2014 e NAIR e colaboradores, 2007).

5.3. Efeito da curcumina, piperina, melfalan e suas associações utilizando os valores de IC_{50} na viabilidade por MTT na linhagem MDA-MB-231

Considerando que a combinação utilizando metade dos valores de IC_{50} de cada composto poderia apresentar efeito semelhante, melhor ou pior, realizamos a viabilidade celular por redução do MTT utilizando os valores de IC_{50} de cada composto isoladamente com a combinação dos compostos utilizando 50% dos valores de IC_{50}.

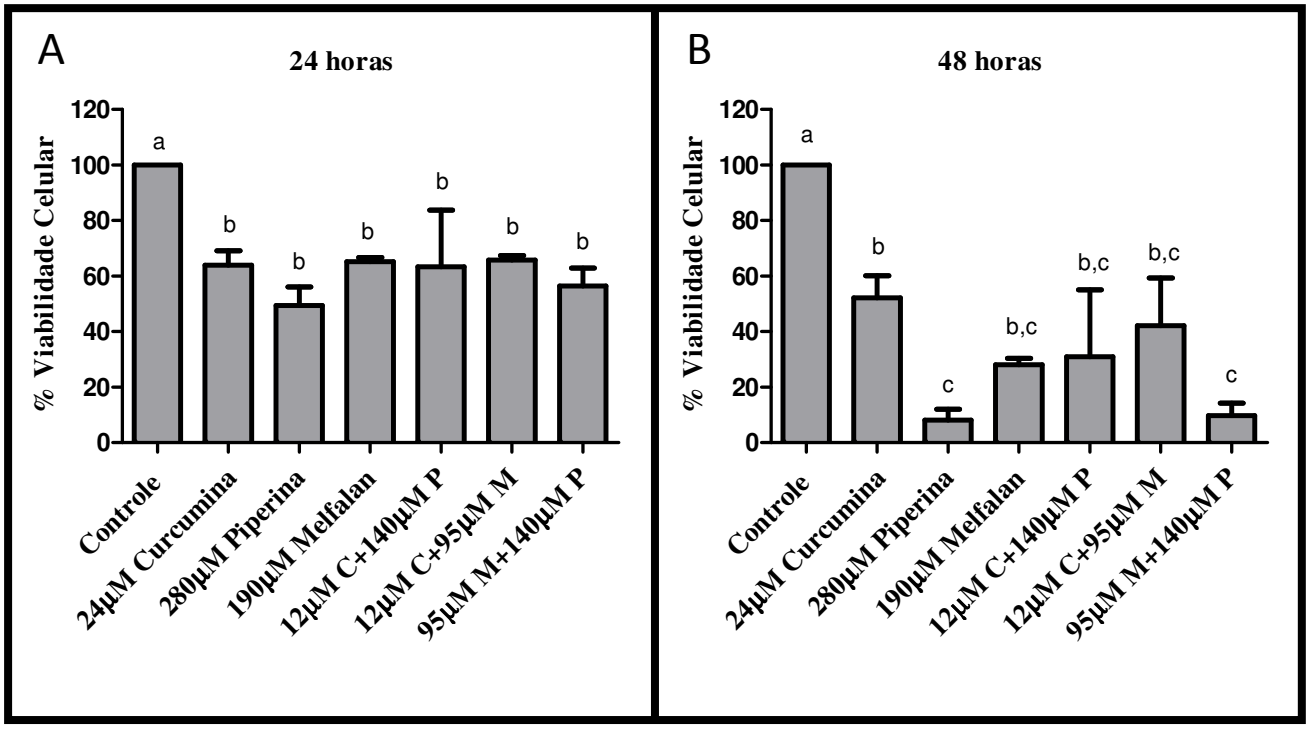

Figura 12. Efeito da curcumina, piperina, melfalan e suas associações utilizando os valores de IC_{50} na viabilidade celular de culturas de células de câncer de mama MDA-MB-231. As células foram tratadas com os valores de IC_{50} dos compostos: 24µM de curcumina, 280µM de piperina e 190 µM de melfalan e com a metade dos valores de IC_{50} para as combinações por 24 (A) ou 48 horas (B). Os resultados são expressos como média e erro padrão (n=3). ^{a,b,c,d,e} letras diferentes representam diferença estatística $p < 0,05$ (One-way ANOVA seguido do teste de Tukey), comparado às células controle e aos tratamentos. C: curcumina, P: piperina, M: melfalan.

Como podemos observar na figura acima, os tratamentos com os compostos isolados foram estatisticamente menores quando comparados ao controle, tanto em 24 quanto em 48 horas de tratamento. Em relação ao tratamento após 24 horascom os compostos isolados, a piperina apresentou maior efeito na citotocixidade celular, seguido da curcumina e do melfalan, porém sem diferenças estatísticas. Os valores variaram entre 49 e 65% de viabilidade celular, confirmando as concentrações referentes aos valores de IC_{50} e levando em consideração o intervalo de confiança obtido para atingir o IC_{50}. Após 48 horas de tratamento houve uma redução considerável na viabilidade celular utilizando os valores de IC_{50}, principalmente para piperina e

melfalan. Contraditoriamente, a curcumina não apresentou uma redução na viabilidade tão expressiva quanto os outros compostos após 48 horas, reduzindo apenas 11% a viabilidade em relação ao valor de 24 horas, demonstrando o seu potente efeito durante as primeiras horas de tratamento.

A combinação dos compostos após 24 horas de tratamento não apresentou diferença significativa em relação aos compostos utilizados isoladamente. Porém, cabe ressaltar que na combinação, a concentração dos compostos foi reduzida a metade, apresentando assim o mesmo efeito dos compostos utilizados isoladamente. Após 48 horas, o tratamento com a piperina mostrou reduzir 92% da viabilidade celular. Quando a piperina foi combinada aos outros compostos, essa redução não foi tão expressiva, porém não houve diferenças significativas em relação ao seu uso isolado. O mesmo aconteceu com os outros compostos, em seus efeitos isolados e associados. Comparando a combinação dos compostos, podemos observar que a associação de piperina e melfalan foi a que a presentou maior efeito na redução da viabilidade celular, tanto em 24 quanto em 48 horas de tratamento, apresentando 56,4% e 9,7% de células viáveis, respectivamente.

5.4. Efeito da curcumina, piperina, melfalan e suas associações utilizando os valores de IC_{50} na viabilidade a partir da exclusão de azul de trypan na linhagem MDA-MB-231

A fim de confirmar estes resultados, foram realizados testes de citotoxicidade por um outro método, o ensaio de exclusão do azul de trypan, que baseia-se na incorporação do corante azul de trypan pelas células em apoptose tardia ou necrose, possibilitando a diferenciação entre células vivas e mortas. Para isso, a linhagem MDA-

MB-231 foi tratada com as mesmas concentrações utilizadas no ensaio de viabilidade por MTT (Valores de IC_{50} para os compostos isolados e $IC_{50}/2$ para a combinação dos compostos) por 24 e 48 horas (**Figura 13**). Após esse período foi feita a contagem celular utilizando o azul de trypan.

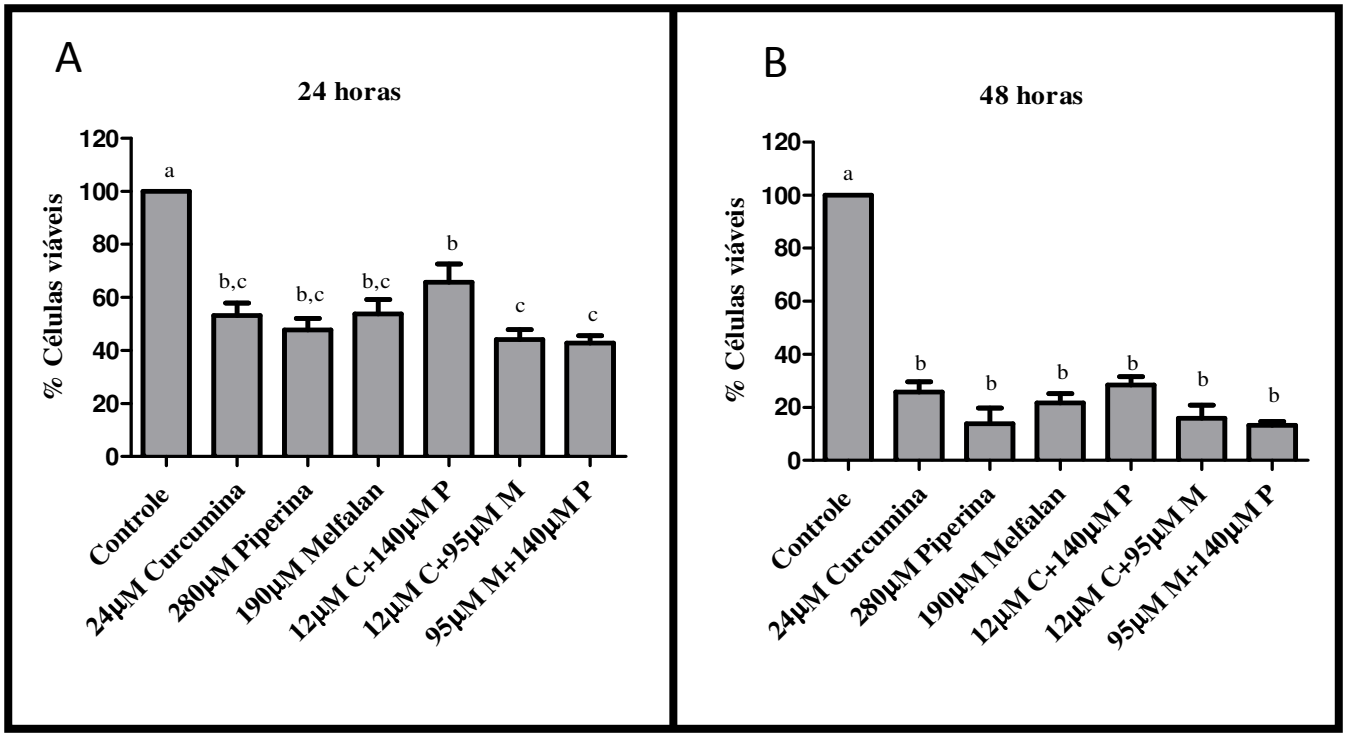

Figura 13. Efeito da curcumina, piperina, melfalan e suas associações utilizando os valores de IC_{50} na viabilidade celular de culturas de células de câncer de mama MDA-MB-231 a partir da exclusão de azul de trypan. As células foram incubadas com azul de trypan (0,04%) (v/v) após 24 (A) ou 48 horas (B). As células foram tratadas com os valores de IC_{50} dos compostos: 24µM de curcumina, 280µM de piperina e 190 µM de melfalan e com a metade dos valores de IC_{50} para as combinações. Os resultados são expressos como média e erro padrão (n=3). ^{a,b,c} letras diferentes representam diferença estatística $p < 0,05$ (One-way ANOVA seguido do teste de Tukey), comparado às células controle e aos tratamentos. C: curcumina, P: piperina, M: melfalan.

Após 24 horas de tratamento, o efeito citotóxico dos compostos isolados não apresentou diferença estatística entre si, confirmando a morte celular de aproximadamente 50% das células com o tratamento utilizando os valores de IC_{50}. Quando os compostos foram combinados, confirmou-se que esta associação não difere

significativamente dos tratamentos com os compostos isolados, sendo, novamente, o tratamento com piperina e melfalan o que mais reduziu o número de células viáveis (42,8% $\pm$ 2,7). Observamos que durante este tempo de tratamento, a associação de curcumina com a piperina, apresentou diferença estatística em relação aos outros tratamentos associados, ao reduzir menos a viabilidade das células MDA-MB-231 (65,7% $\pm$ 6,9). O mesmo foi observado para o tratamento após 48 horas, porém nenhum tratamento, seja isolado ou associado, apresentou diferenças estatísticas entre si, apenas em relação ao controle. Durante 48 horas de tratamento, observou-se uma redução mais acentuada em relação a 24 horas na viabilidade celular em todos os tratamentos empregados. Após as análises destes resultados, podemos afirmar até então, que o uso destes compostos isolados ou combinados não se diferencia estatisticamente na viabilidade de células MDA-MB-231. Porém, é interessante ressaltar que durante a associação, a concentração dos compostos foi reduzida a metade e assim obtivemos o mesmo efeito nestas células.

Alguns estudos na literatura científica também utilizam o método de exclusão do azul de trypan (SHEBABY e colaboradores, 2013) como segundo método para a análise da viabilidade celular (KOUTSILIERIS e colaboradores, 1999).

5.5. Efeito da curcumina, piperina, melfalan e suas associações no ciclo celular da linhagem MDA-MB-231

Após observarmos a citotoxicidade da curcumina, piperina e do melfalan, isolados e associados, analisamos o efeito destas drogas sobre a distribuição do ciclo celular e se os diferentes tipos de tratamentos poderiam diferir sua ação neste ciclo. Adicionalmente, a fim de verificar o efeito dos compostos bioativos, do melfalan e de

suas associações também sobre a apoptose, as células MDA-MB-231 foram contadas, incubadas com RNase e triton X-100, coradas com iodeto de propídio e analisadas por citometria de fluxo, especialmente na fase Sub G1 (**Figura 14, 15 e Tabela 3 e 4**).

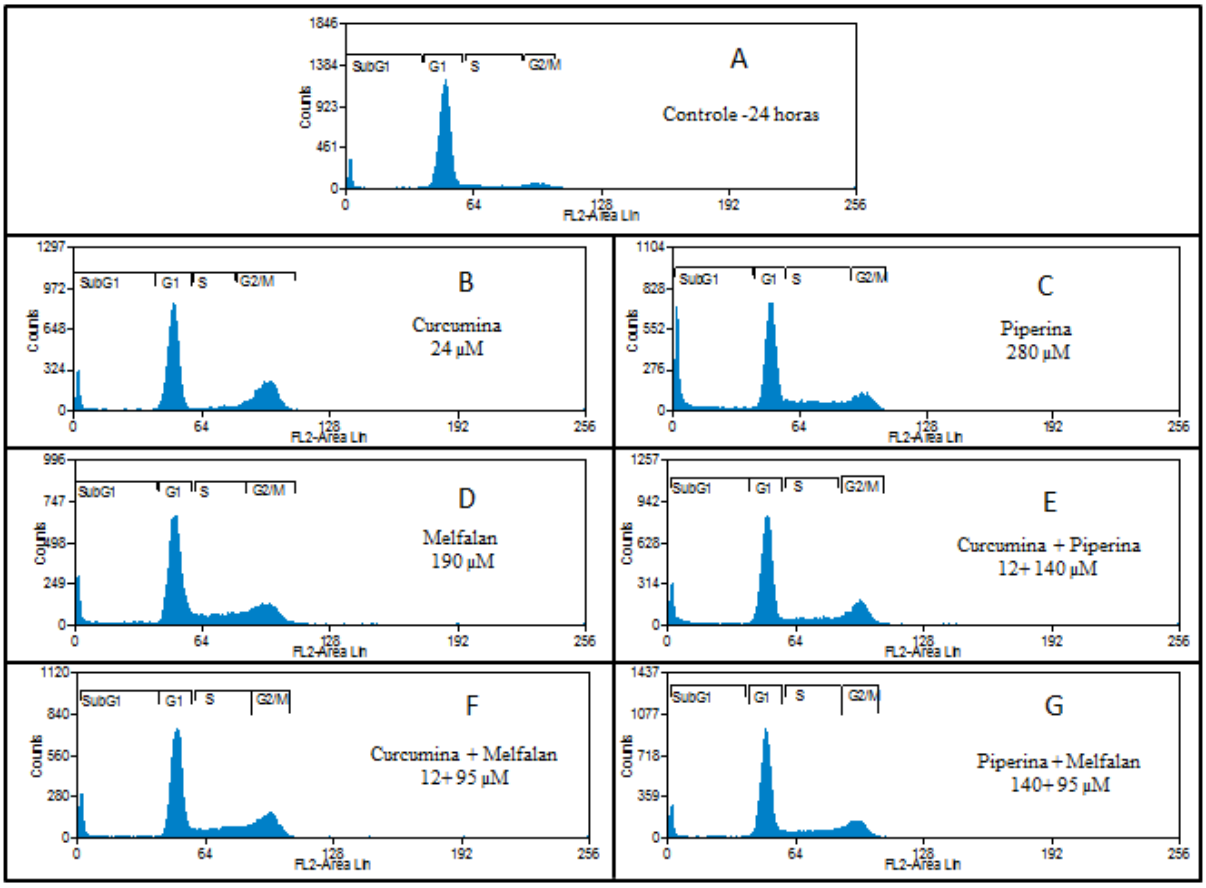

Figura 14: Efeito da curcumina, piperina, melfalan e suas associações sobre a distribuição nas fases do ciclo celular das células de câncer de mama MDA-MB-231 por 24h de tratamento. Após o tratamento por 24h, 1×10^5 células foram ressuspendidas em PBS contendo Triton X-100 0,1% (v/v), 50 µg/mL de iodeto de propídio e 1 mg/mL de RNase A. O conteúdo de DNA foi medido usando citômetro de fluxo. Linhagem MDA-MB-231 (A) controle (B) 24 µM curcumina (C) 280 µM piperina (D) 180 µM melfalan (E) 12 µM curcumina+140 µM piperina (F) 12 µM curcumina+95 µM melfalan e (G) 140 µM piperina+95 µM melfalan. Os resultados são expressos como média e erro padrão (n=3). * $p < 0,05$ (ANOVA com pós-teste de Tukey), comparado às células controle com DMSO+Veic do melfalan.

Tabela 3: Efeito da curcumina, piperina, melfalan e suas associações sobre a distribuição nas fases do ciclo celular das células MDA-MB-231 durante 24 horas de tratamento.

	24 horas						
	Controle	Curcumina	Piperina	Melfalan	Curc+Pip	Curc+Mel	Pip+Mel
Sub G1	7,06±0,9[a]	10,77±1,5[a]	19,71±5,2[a]	12,07±4,1[a]	12,70±1,4[a]	11,86±2,4[a]	9,20±0,6[a]
G1	70,50±3,1[a]	50,07±1,6[b]	50,80±4,7[b]	53,50±2,1[b]	51,50±1,0[b]	53,05±2,2[b]	60,13±2,1[a,b]
S	11,45±0,8[a]	9,25±1,0[a]	13,70±2,9[a]	16,40±0,2[a]	13,20±0,6[a]	16,07±2,1[a]	14,17±1,8[a]
G2/M	11,03±2,2[a]	29,87±1,8[b]	15,77±1,4[a,c]	18,00±2,1[a,c]	23,60±2,5[c]	19,00±1,3[a,c]	16,50±1,8[a,c]

Após 24 e 48 horas de tratamento não foi observada diferença estatística em relação aos tratamentos. Porém, foi observado um maior número de células em apoptose nos tratamentos com a piperina isoladamente nos dois tempos incubação. Após 48 horas, a combinação de piperina com o melfalan apresentou, dentre as associações, o maior número de células em apoptose. Com o objetivo de confirmarmos estes resultados, realizamos o ensaios com os marcadores fluorescentes Anexina-V FITC e PI, como observaremos no item **5.6.**

Tabela 4: Efeito da curcumina, piperina, melfalan e suas associações sobre a distribuição nas fases do ciclo celular das células MDA-MB-231 durante 48 horas de tratamento.

	48 horas						
	Controle	Curcumina	Piperina	Melfalan	Curc+Pip	Curc+Mel	Pip+Mel
Sub G1	6,50±0,4[a]	13,85±1,7[a]	31,95±9,3[a]	21,15±0,7[a]	13,35±0,4[a]	24,90±7,9[a]	29,55±10,3[a]
G1	77,40±0,4[a]	49,85±4,5[b]	47,25±8,9[b]	47,50±2,8[b]	61,35±0,2[a,b]	49,50±4,5[b]	46,70±2,0[b]
S	8,30±1,8[a]	9,85±0,1[a]	12,45±0,2[a]	12,80±1,6[a]	9,70±0,3[a]	11,50±0,9[a]	9,65±4,3[a]
G2/M	7,80±1,8[a]	26,45±6,4[b]	8,40±0,6[a,c]	18,55±0,4[a,b]	15,60±0,3[a,b]	14,05±2,4[a,b]	14,15±3,9[a,b]

Ao analisarmos as células na fase G1, observamos uma diminuição significativa do número de células nos tratamentos isolados e combinados, quando comparados com

o controle, com exceção da associação de piperina com curcumina cuja diminuição não foi significativa. O mesmo ocorreu para 48 horas de tratamento, porém a combinação de curcumina e piperina foi a que não apresentou diferença significativa em relação ao controle.

Durante a fase S observamos um acúmulo de células após os tratamentos com piperina, melfalan e as combinações, porém sem nenhuma diferença estatística durante 24 e 48 horas de tratamento. O maior acúmulo de células foi observado durante a fase G2/M para todos os tratamentos, especialmente com a incubação de curcumina isolada e a combinação de curcumina com piperina ($p<0,05$). Os tratamentos associados não apresentaram diferença estatística em relação aos tratamentos isolados, o que demonstra mais uma vez que o tipo de tratamento, isolado ou combinado, não tem diferença em relação ao seu efeito.

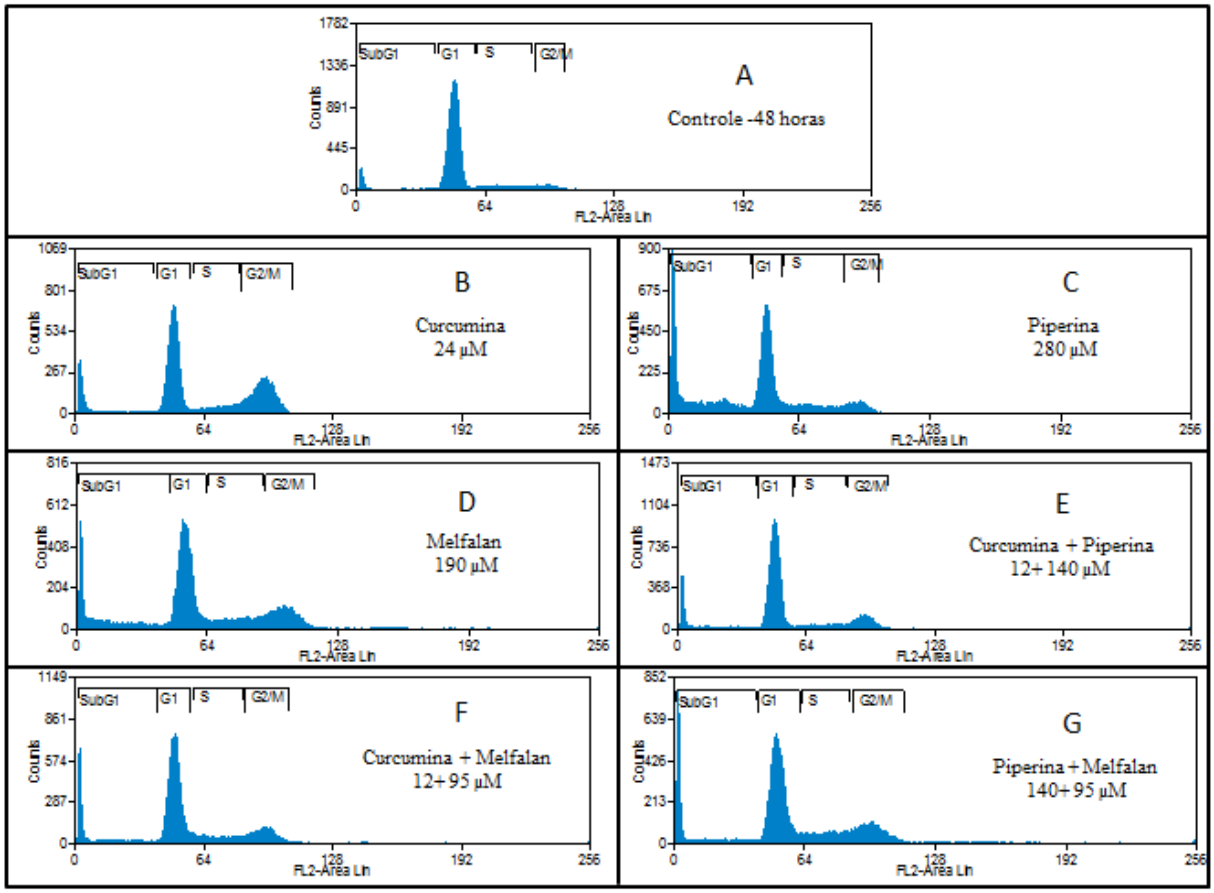

Figura 15: Efeito da curcumina, piperina, melfalan e suas associações sobre a distribuição nas fases do ciclo celular das células de câncer de mama MDA-MB-231 por 48 horas de tratamento. As células foram incubadas com os compostos nas concentrações indicadas por 48 horas. Após o tratamento, 1×10^5 células foram ressuspendidas em PBS contendo Triton X-100 0,1% (v/v), 50 µg/mL de iodeto de propídio e 1 mg/mL de RNase A. O conteúdo de DNA foi medido usando citômetro de fluxo. Linhagem MDA-MB-231 (A) controle (B) 24 µM curcumina (C) 280 µM piperina (D) 180 µM melfalan (E) 12 µM curcumina+140 µM piperina (F) 12 µM curcumina+95 µM melfalan e (G) 140 µM piperina+95 µM melfalan. Os resultados são expressos como média e erro padrão (n=3). * $p < 0,05$ (ANOVA com pós-teste de Tukey), comparado às células controle com DMSO+Veic do melfalan.

SIMON e colaboradores, em 1998, verificaram a citotoxicidade da curcumina em células MCF-7 e observaram que após três dias de tratamento também ocorreu um acúmulo de células na fase G2/M de maneira progressiva à dosagem com o composto (5 a 20 µM).

Como podemos observer na **Figura 14**, ocorreu um acúmulo de células na fase G2/M, especialmente para o tratamento com curcumina, melfalan e as associações.

Observamos também um acúmulo de células na fase SubG1 para o tratamento com piperina, porém não significativo, indicando um número maior de células em apoptose para este tratamento. Estes resultados estão de acordo aos resultados encontrados para o ensaio de Anexin V e PI, onde o tratamento com piperina induziu a apoptose de maneira significativa em relação ao controle, assim como a combinação de curcumina e piperina (**item 5.6., Tabela 5 e 6**). Após 48 horas estes efeitos foram mais pronunciados, como podemos observar na **Figura 15**.

5.6. Efeito da curcumina, piperina, melfalan e suas associações na morte celular da linhagem MDA-MB-231

A fim de caracterizar o tipo de morte celular induzida pelos compostos e suas combinações nas linhagens celulares de câncer de mama, foram realizados ensaios com os marcadores fluorescentes Anexina-V FITC e PI (**Tabela 5 e 6 e Figura 16 e 17**). A Anexina-V é uma lectina que se liga ao fosfolipídio de membrana fosfatidilserina (externalizado por células apoptóticas) e o PI tem a capacidade de se ligar ao DNA, desde que a célula apresente sua membrana permeável (característica necrótica).

Como pode ser observado na **Figura 16**, cada gráfico foi dividido em quatro quadrantes. As células marcadas com Anexina-V, representadas na região R4, estão sofrendo apoptose, células marcadas com PI estão em necrose (região R1) e células com dupla marcação indicam apoptose tardia, ou necrose secundária (região R2). Células que entram em apoptose, geralmente, são fagocitadas, porém sem a presença de fagócitos (como em experimentos *in vitro*), prosseguem na via apoptótica até o rompimento da membrana plasmática, permitindo a entrada do PI e, com isso, a dupla marcação (BELLOC e colaboradores, 1996).

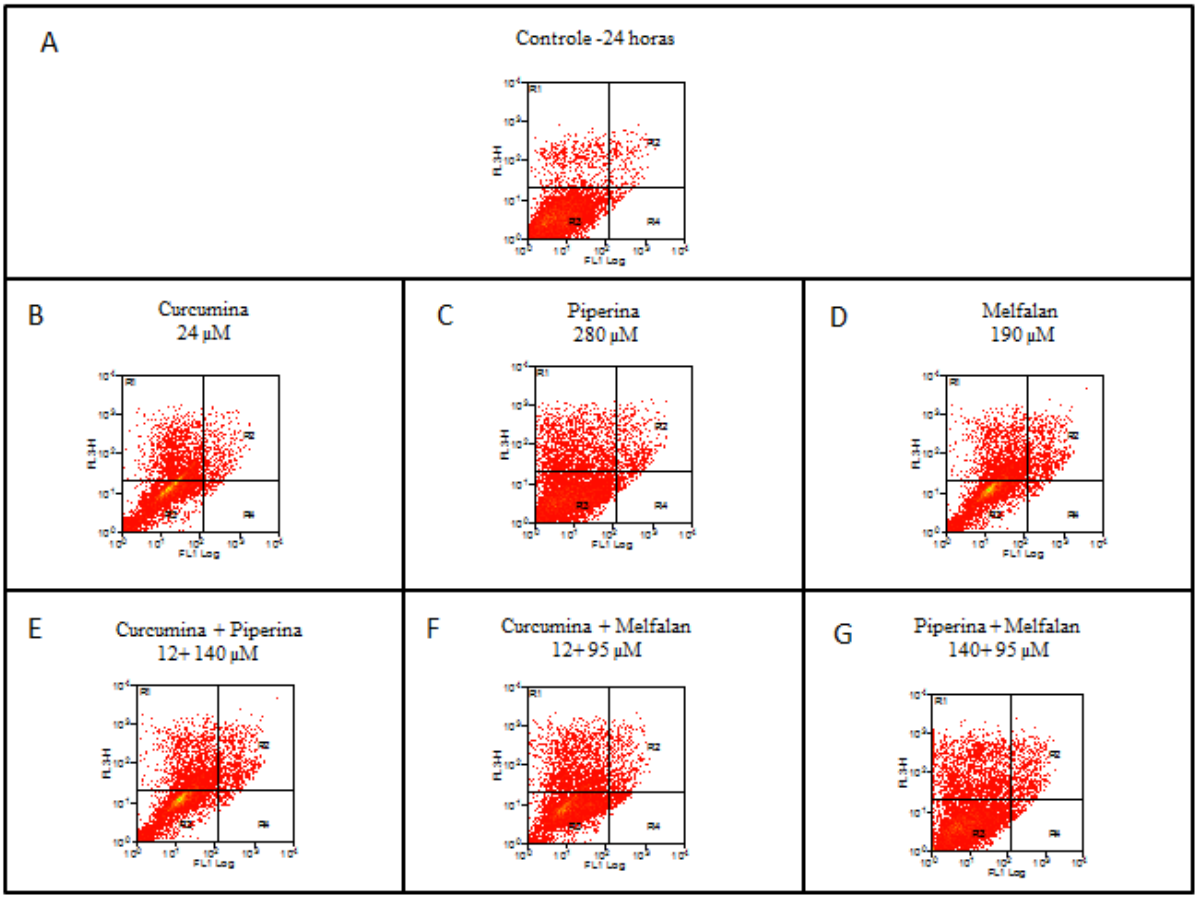

Figura 16: Efeito da curcumina, piperina, melfalan e suas associações sobre o tipo de morte celular das células MDA-MB-231 durante 24 horas de tratamento. As células foram tratadas com os valores de IC_{50} dos compostos: 24 µM de curcumina, 280 µM de piperina e 190 µM de melfalan e com a metade dos valores de IC50 para as combinações por 24 e 48 horas. Em seguida foram marcadas com Anexina V-FITC e iodeto de propídio e o resultado foi analisado em citômetro de fluxo. Os resultados são expressos como média e erro padrão (n=3). a,b,c letras diferentes representam diferença estatística $p < 0,05$ (One-way ANOVA seguido do teste de Tukey), comparado às células controle e aos tratamentos.

Tabela 5: Efeito da curcumina, piperina, melfalan e suas associações sobre o tipo de morte celular das células MDA-MB-231 após 24 horas de tratamento.

	24 horas						
	Controle	Curcumina	Piperina	Melfalan	Curc+Pip	Curc+Mel	Pip+Mel
Necrose	$4,34 \pm 0,05^{a}$	$29,42 \pm 5,6^{b}$	$20,23 \pm 4,3^{a,b}$	$15,30 \pm 2,4^{a,b}$	$22,28 \pm 3,4^{b}$	$17,12 \pm 1,0^{a,b}$	$17,72 \pm 1,4^{a,b}$
Apoptose tardia	$1,92 \pm 0,3^{a}$	$3,55 \pm 0,2^{a,b}$	$4,64 \pm 0,6^{b,c}$	$3,64 \pm 0,2^{a,b}$	$6,10 \pm 0,5^{c}$	$3,68 \pm 0,04^{a,b}$	$4,68 \pm 0,03^{b,c}$
Viáveis	$92,95 \pm 0,3^{a}$	$66,53 \pm 5,7^{b}$	$74,15 \pm 4,8^{b}$	$78,19 \pm 1,7^{a,b}$	$71,24 \pm 3,7^{b}$	$76,77 \pm 0,9^{a,b}$	$76,57 \pm 1,5^{a,b}$
Apoptose	$0,79 \pm 0,01^{a}$	$0,50 \pm 0,1^{a}$	$0,98 \pm 0,1^{a}$	$2,87 \pm 0,5^{b}$	$0,38 \pm 0,2^{a,c}$	$2,43 \pm 0,1^{b}$	$1,03 \pm 0,01^{a,c}$

Observamos que durante 24 horas de tratamento a incubação com curcumina isolada e curcumina e melfalan associados apresentaram um número significativo maior de células em necrose quando comparados ao controle. Os outros tratamentos apresentaram um aumento do número de células em necrose, porém não significativo. Após 48 horas de tratamento (**Tabela 6**), a combinação dos compostos apresentou um número significativamente maior de células em necrose em relação ao controle e a curcumina isoladamente, mas não houve diferenças significativas entre as combinações dos compostos.

Durante a apoptose tardia ou necrose secundária em 24 horas, observamos um aumento significativo para o tratamento com piperina, curcumina e piperina e piperina e melfalan. Os demais tratamentos não foram diferentes significativamente em relação ao controle. Após 48 horas, apenas o tratamento com piperina e curcumina e piperina apresentaram um número maior de células nestas condições.

Os tratamentos por 24 horas com melfalan e curcumina e melfalan apresentaram um número significativamente maior em relação ao controle de células em apoptose. Os tratamentos com curcumina e curcumina e melfalan apresentaram menos células em apoptose em relação ao controle, porém não significativo. O mesmo ocorreu durante 48

horas de tratamento, sendo a combinação de piperina com melfalan a que apresentou maior númeo de células em apoptose, porém sem diferenças estatísticas.

Como podemos observar na **Figura 16**, todos os compostos apresentaram a característica de morte celular por necrose ou apoptose tardia (necrose secundária) pela dupla marcação com Anexina-V e PI, sugerindo que, nestas condições, possivelmente ocorreu morte celular via apoptose, seguida de necrose. Após 48 horas, como podemos observar na figura abaixo (**Figura 17**), o número de células em apoptose é maior do que o encontrado para 24 horas, porém o número de células em necrose e apoptose tardia aumenta em relção ao controle e a 24 horas de tratamento.

Tabela 6: Efeito da curcumina, piperina, melfalan e suas associações sobre o tipo de morte celular das células MDA-MB-231 após 48 horas de tratamento.

	48 horas						
	Controle	Curcumina	Piperina	Melfalan	Curc+Pip	Curc+Mel	Pip+Mel
Necrose	5,31±0,1[a]	18,70±5,3[a]	31,80±3,9[b]	35,40±0,2[b,c]	53,15±2,6[c]	42,40±2,3[b,c]	42,60±6,3[b,c]
Apoptose tardia	2,44±0,1[a]	2,90±0,5[a,b]	9,40±1,1[c]	5,75±0,9[a,b,c]	7,30±1,5[b,c]	5,60±0,4[a,b,c]	6,40±0,1[a,b,c]
Viáveis	90,85±0,3[a]	77,90±4,5[a]	55,40±1,5[b,c]	55,80±1,8[b]	38,95±1,2[c]	50,40±2,1[b,c]	49,15±5,2[b,c]
Apoptose	1,40±0,3[a]	0,50±0,3[a]	3,40±1,3[a]	3,05±0,6[a]	0,60±0,1[a]	1,60±0,6[a]	1,85±0,8[a]

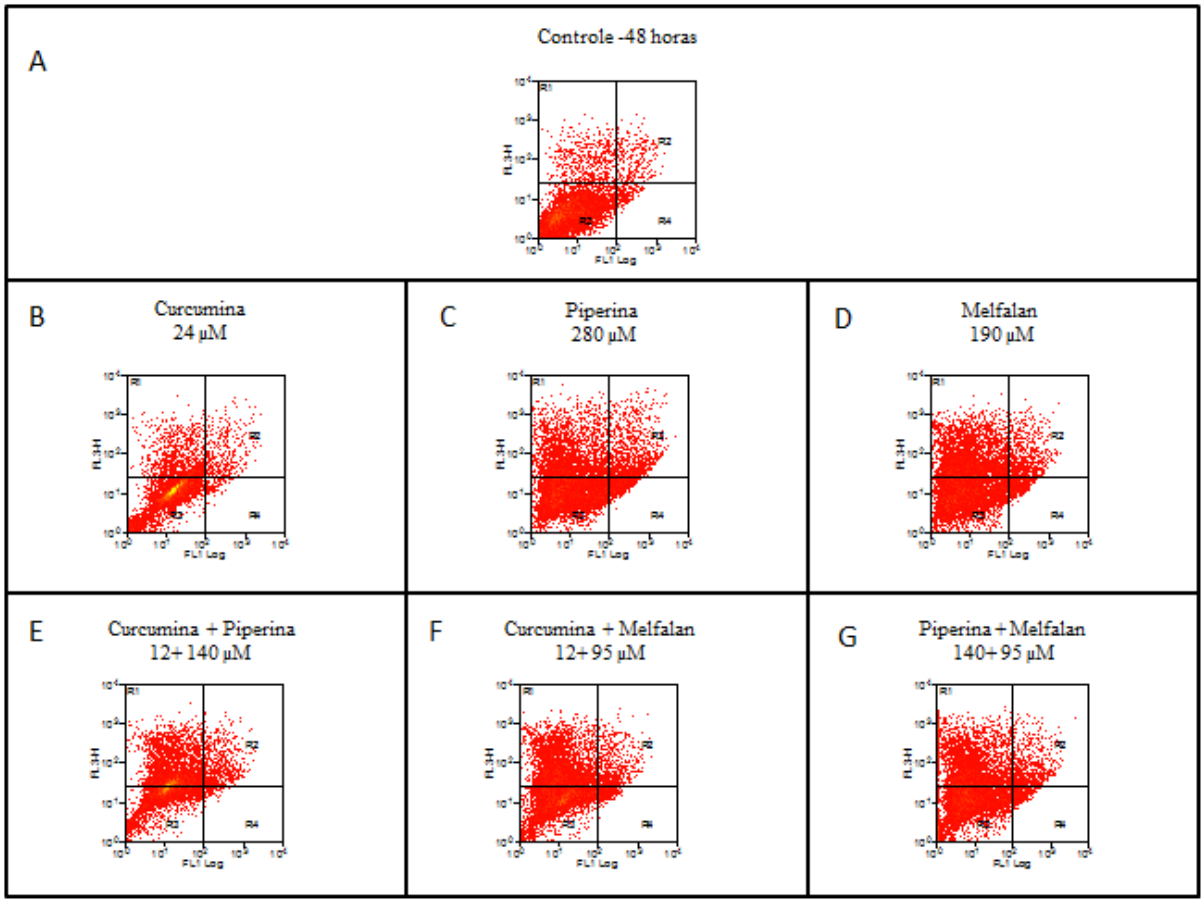

Figura 17: Efeito da curcumina, piperina, melfalan e suas associações sobre o tipo de morte celular das células MDA-MB-231 durante 48 horas de tratamento. As células foram tratadas com os valores de IC_{50} dos compostos: 24 µM de curcumina, 280 µM de piperina e 190 µM de melfalan e com a metade dos valores de IC_{50} para as combinações por 24 e 48 horas. Em seguida foram marcadas com Anexina V-FITC e iodeto de propídio e o resultado foi analisado em citômetro de fluxo. Os resultados são expressos como média e erro padrão (n=3). a,b,c letras diferentes representam diferença estatística $p < 0,05$ (One-way ANOVA seguido do teste de Tukey), comparado às células controle e aos tratamentos.

Por muitos anos, os compostos bioativos presentes nos vegetais têm sido estudados como um importante fator anticarcinogênico, desempenhando um papel vital na prevenção e no tratamento do câncer, por causa de sua baixa disponibilidade e toxicidade quando comparada a drogas quimioterápicas. Os mecanismos de ação dos fitoquímicos são numerosos e a maioria deles parece induzir a morte celular por apoptose, intrínsica e/ou extrínsica, via caspases e por mecanismos dependentes ou independentes de p53 (GALI-MUHTASIB e colaboradores, 2015). No presente estudo,

apenas o tratamento do melfalan e do melfalan associado a curcumina foram capazes de induzir a apoptose, de maneira significativa em relação ao controle.

Alguns modos alternativos de morte celular por compostos bioativos de plantas estão surgindo e incluem a autofagia e a necrose. Os mecanismos de morte celular não-apoptóticos são menos estudados e a compreensão dos mesmos pode fornecer maiores esclarecimentos sobre novas vias moleculares e novas metas de terapêutica do câncer no futuro (GALI-MUHTASIB e colaboradores, 2015).

5.7. Efeito da curcumina, piperina, melfalan e suas associações na expressão de proteínas relacionadas a morte celular na linhagem MDA-MB-231

Observando os efeitos significativos dos tratamentos na morte celular, uma investigação mais precisa da via de sinalização relacionada a este efeito foi realizada. Para isto, as células foram tratadas com os compostos bioativos isolados e associados e os níveis de proteínas regulatórias envolvidas em vias apoptóticas foram analisados. Os níveis das proteínas caspase 3, caspase 7, caspase 9, p53 e p21 dos extratos celulares de MDA-MB231 tratadas por 24 horas foram avaliados por *Western blotting* e a densitometria pelo programa Image J.

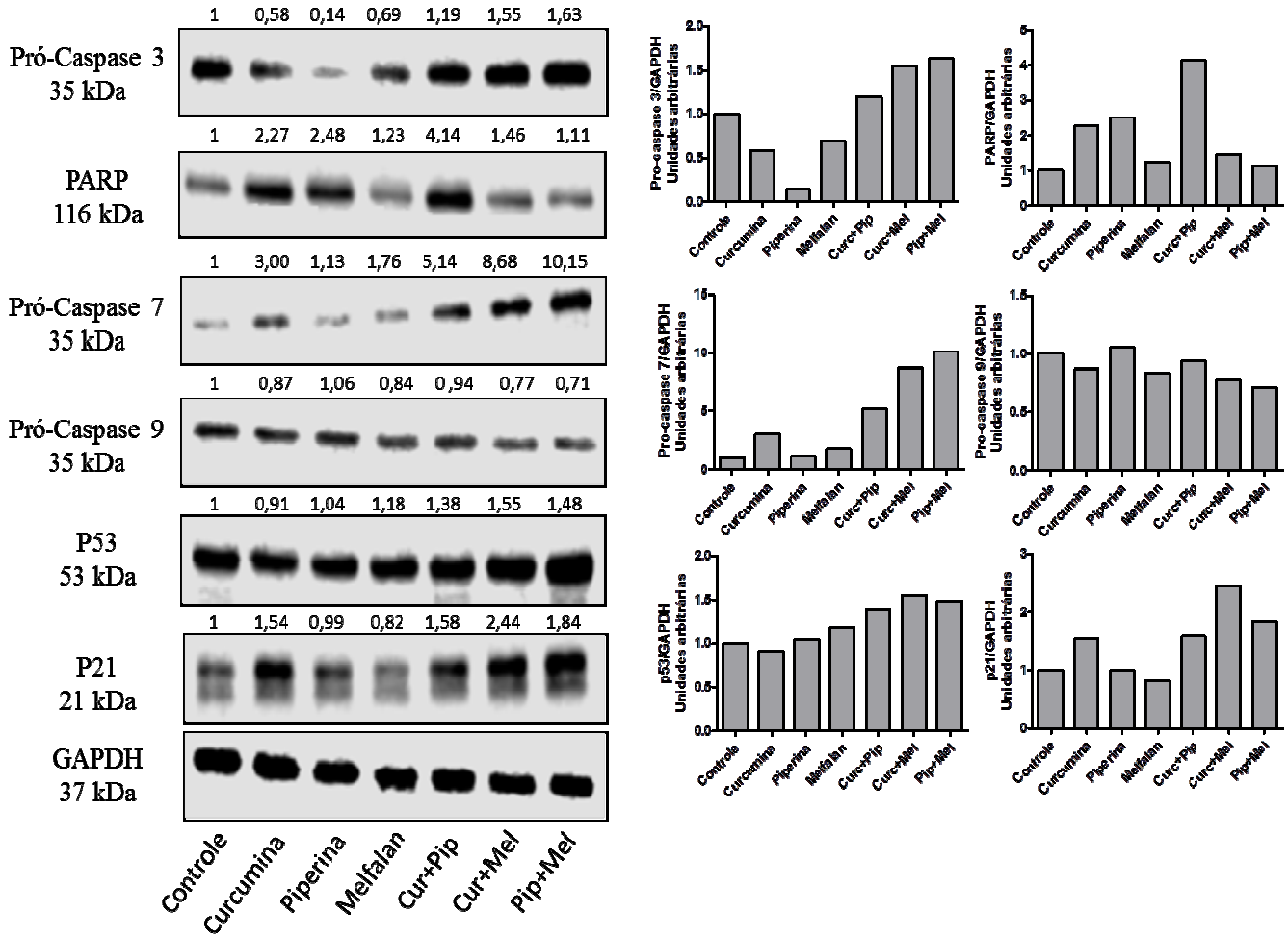

Figura 18: Efeitos da curcumina (C), piperina (P), melfalan (M) e suas associações nos níveis das proteínas relacionadas à morte celular.

Os extratos protéicos das células tratadas com os valores de IC_{50} dos compostos: 24µM de curcumina, 280µM de piperina e 190 µM de melfalan e com a metade dos valores de IC_{50} para as combinações por 24 horas foram submetidos à SDS-PAGE. Em seguida, *Western blottings* foram realizados utilizando anticorpos contra caspase 3, PARP, 7, 9, p53, p21 e GAPDH (controle de carregamento). Os *imunoblottings* são representativos de um experimento. A análise densitométrica de cada banda foi realizada utilizando o software Image J, sendo os dados expressos como unidade arbitrária.

Os resultados mostram que houve uma diminuição dos níveis de caspase 3 para os tratamentos com os compostos isolados quando comparados ao controle e que estes níveis foram semelhantes ao controle quando as células foram tratadas com os compostos associados. Os níveis de caspase 7 aumentaram nos tratamentos com os compostos combinados e um leve aumento também foi observado para o tratamento com a curcumina. Os níveis de caspase 9 parecem diminuir durante os tratamentos isoalados e associados quando comparados ao contole e esta diminuição parece ainda maior na associação. Analisando os níveis de PARP, podemos observar que os tratamentos com curcumina e piperina ou com ambos combinados, apresentaram níveis aumentados desta proteína. Já o tratamento com melfalan ou com este composto combinado não é capaz de aumentar seus níveis, sugerindo que a citotoxicidade do melfalan não envolve a ação ou a via de PARP.

O alvo transcripcional da p53 é a p21, um inibidor de CDKs, este fato permite o reparo do DNA ou a indução de vários fatores pro-apoptóticos (MICHAEL e OREN, 2002). Para determinar se a sensibilização das células MDA-MB-231 pelos compostos bioativos e melfalan isolados e associados envolve a ação da p53 e p21, os níveis destas proteínas também foram analisados. Os dados mostram que os níveis de p53 foram maiores para os tratamentos com os compostos combinados, em especial para a associação da piperina com o melfalan. Estes resultados corroboram com os níveis de p21 que foram maiores para os compostos combinados, sendo que a combinação de piperina com melfalan também teve o maior nível desta proteína. Os resultados sugerem que, sob estas condições experimentais, a p21 pode ser regulada de maneira dependente da p53.

A caspase 3 é um membro chave da família das caspases responsável por mediar a apoptose. Ela pode ser ativada por sinais apoptóticos provenientes tanto de receptores

de morte celular ou por vias de sinalização intracelular e mitocondrial. A caspase 3 funciona como uma das maiores capases efetoras de clivagem de numerosos substratos de morte celular para a disfunção e a destruição celular e a sua deficiência ou baixa atividade pode estar associada ao processo de carcinogênese na mama, podendo ser um biomarcador para a prevenção ou tratamento do câncer (YANG e colaboradores, 2007).

JIA e colaboradores em 2014, investigaram os possíveis mecanismos moleculares envolvidos na citotoxicidade da curcumina em células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 e observaram que os marcadores p27 e p21 aumentaram de maneira dose dependente nas células MDA-MB-231 e em contraste esses efeitos foram menores para a MCF-7, uma vez que observaram que esta linhagem foi resistente ao tratamento com a curcumina, resultado este divergente com o presente estudo onde a MDA-MB-231 foi a linhagem mais resistente ao tratamento. Outro resultado inesperado relatado por estes autores foi a não variação dos níveis de p53 em ambas as linhagens com o tratamento com curcumina, sugerindo que a citotoxicidade deste composto não envolve a p53. Tal resultado corrobora com os encontrados no presente estudo, onde os níveis de p53 não foram alterados com os tratamentos com os compostos bioativos isolados, mas sim para a combinação dos compostos.

Outras linhagens celulares parecem apresentar os mesmos efeitos encontrados após o tratamento com compostos bioativos. PILLAI e colaboradores, 2004, verificaram que a curcumina seria capaz de induzir a apoptose após muitas horas de tratamento em células de câncer de pulmão e sugeriram que o efeito inibitório da curcumina seria independente da expressão de p53 e que a via de apoptose também seria independente de p53. No presente estudo os tratamentos com curcumina não mostraram induzir a apoptose e não observamos um aumento dos níveis de p53 após este tratamento.

5.8. Índice de Combinação (CI) e efeito da combinação segundo Calcusyn.

Os possíveis mecanismos favoráveis do sinergismo incluem: aumento da eficácia do efeito terapêutico; diminuição da dosagem, mas aumento ou manutenção da mesma eficácia evitando assim a toxicidade; diminuição ou retardamento do desenvolvimento da resistência às drogas e sinergismo seletivo contra um alvo. Para isso, muitas combinações de drogas têm sido amplamente estudadas e utilizadas e se tornou a principal escolha para o tratamento de doenças mais graves, como o câncer (CHOU, 2006).

Com o intuito de observarmos o efeito destas combinações na linhagem de câncer de mama MDA-MB-231, utilizamos o programa Calcusyn para identificar se as combinações teriam efeito aditivo, sinérgico ou antagônico, utilizando as curvas de associação do **item 5.2.**

O efeito da combinação dos compostos bioativos e do melfalan foi realizado utilizando o Índice de Combinação (IC), sugerido por Chou, 1991 para 50% de inibição do crescimento da linhagem MDA-MB-231 (**Tabela 7**).

Após a verificação dos efeitos das combinações pelo Calcusyn, observamos que todas as combinações apresentaram efeito antagônico em menor ou maior grau (IC > 1). A combinação que apresentou o pior efeito foi a de curcumina com melfalan, apresentando um índice de combinação de 2,11, indicando antagonismo. Em seguida a combinação de curcumina com piperina, apresentando índice de combinação de 1,30 indicando antagonismo moderado e por último, a associação de piperina com melfalan, com índice de combinação de 1,21. Observamos também, que para a maioria das associações (exceto curcumina com melfalan), o IC_{50} da combinação foi menor do que

dos compostos isolados, porém não de maneira suficiente para gerar um efeito sinérgico ou aditivo.

Tabela 7: Índice de combinação e efeito da combinação da curcumina com a piperina, da curcumina com o melfalan e da piperina com o melfalan segundo o programa Calcusyn (versão 2.0, Biosoft).

	Curcumina X Piperina		**Curcumina X Melfalan**		**Piperina X Melfalan**	
	Curcumina	Piperina	Curcumina	Melfalan	Piperina	Melfalan
IC_{50} Isolado	23,29	276,00	23,29	187,90	276	187,90
IC_{50} Associado	15,36	179,25	24,82	196,49	167,40	113,59
CI	1,30		2,11		1,21	
Efeito da Combinação	Antagonismo Moderado		Antagonismo		Antagonismo Moderado	

Interessante observar que o efeito da curcumina isolado já é considerável e que quando associamos este composto aos outros, não observamos uma diminuição maior na citotoxicidade, porém cabe ressaltar que analisamos o efeito destas combinações no ciclo celular e na apoptose, utlizamos a combinação com metade dos valores do IC_{50}. Outros autores analisaram estes efeitos utilizando a combinação com 100% dos valores do IC_{50} e observaram resultados melhores para a combinação, fato que seria experado (ADITYA e colaboradores, 2014, KAKARALA e colaboradores, 2010 e TORRICELLI e colaboradores, 2011). A curva de citotoxicidade utilizada para analisar o efeito da associação apresenta a proporção de 1:12 para curcumina e piperina, 1:8 para curcumina e melfalan e 1:1,5 para piperina e melfalan. Já foi demonstrado que dependendo da

proporção escolhida, estes efeitos podem ser distintos, mostrando a complexidade de se encontrar combinações efetivamente sinérgicas (YIN e colaboradores, 2014).

Alguns estudos recentemente vêm demonstrando que a combinação de drogas pode ser mais efetiva no tratamento de linhagens resistentes quando comparados a seus efeitos isolados. LING e colaboradores, 2007, demonstraram que a combinação da elisidepsina (peptídeo) e do erlotinib (quimioterápico) foi sinérgica em todas as linhagens de câncer de pulmão testadas, incluindo as resistentes ao erlotinib, sendo mais eficaz do que qualquer fármaco quando utilizado isoladamente. DONG e colaboradores, 2013, observaram que o tratamento em células de câncer de próstata (C4-2B) com as isoflavonas de soja daidzeína e genisteína, utilizadas isoladamente, não surtiu nenhum efeito. Porém, a combinação das mesmas aumentou significativamente a apoptose e a diminuição da proliferação celular.

Para o câncer de mama, alguns estudos *in vitro* vêm demonstrando os efeitos do uso de combinações de drogas e de compostos bioativos. Estes efeitos estão mais direcionados para o aumento da eficácia dos tratamentos combinados quando comparados aos isolados e a possibilidade da diminuição da dosagem dos compostos. Por exemplo, o efeito da doxorubicina e do tamoxifeno em combinação com uma dose baixa de ácido trans-retinóico foi maior quando comparados aos compostos testados isoladamente em linhagens de câncer de mama MCF-7 (TOMA e colaboradores, 1997 e WANG e colaboradores, 2007).

Em nosso grupo de pesquisa, em 2012, após a avaliação dos efeitos isolados e combinados do resveratrol e do melfalan nas linhagens MCF-7, verificou-se que o resveratrol poderia ser utilizado em combinação com este quimioterápico, atuando como um quimiossensibilizador e que esta sensibilização pelo resveratrol estaria envolvida na melhoria dos níveis de p53, diminuição de procaspase 8 e a ativação de

caspases 7 e 9. Além disso, verificamos que o melfalan foi mais citotóxico na linhagem MCF-7 quando comparada com a linhagem MDA-MB-231, apresentando IC_{50} de 110 e 305 µM, respectivamente (CASANOVA e colaboradores, 2012).

Um outro estudo utilizando linhagens de câncer colorretal e células tronco cancerosas tratadas com a combinação da curcumina e a droga dasatinibe, demonstrou interações sinérgicas destes compostos após a análise pelo Calcusyn e concluíram que a terapia de combinação destas drogas foi altamente eficaz em inibir a proliferação de células tronco cancerosas em tumores primários de cólon resistentes a quimioterapia. Além disso, concluíram que a associação da curcumina é uma estratégia para reduzir a citotoxicidade de drogas (NAUTIYAL e colaboradores, 2011).

Muitos estudos têm sido publicados recentemente avaliando o efeito da associação de compostos e de compostos com quimioterápicos, demonstrando a importância deste tema atualmente. CHEN e colaboradores, 2015, testaram a síntese de novos compostos similares a curcumina e genisteína e observaram que estes compostos eram mais eficazes do que a combinação dos compostos de origem. MOTIWALA & RANGARI, 2015, sabendo que a piperina poderia reduzir a probabilidade de câncer de pulmão e também aumentar a biodisponibilidade do quimioterápico paclitaxel em voluntários sadios, avaliaram se este composto bioativo poderia potencializar também o efeito antitumoral do paclitaxel em células de câncer de mama MCF-7. Analisaram os valores do IC_{50} encontrados para os compostos isolados e obtiveram uma proporção de 1:5 e realizaram a curva de combinação. O método de isobolograma pelo programa COMPUSYN, para a obtenção do efeito da combinação, indicou após 24 horas de tratamento, um índice de combinação com efeito sinérgico para a combinação da piperina com o paclitaxel e concluiram que novos estudos *in vitro* e *in vivo* devem ser realizados para melhor avaliar este efeito.

MOHAPATRA e colaboradores, 2015, avaliaram os efeitos do resveratrol e da curcumina isolados e combinados em culturas de células de câncer de mama transformadas por fumaça de cigarro (MCF-10A-Tr). Observaram que nas células tratadas com 3 µM de resveratrol nas primeiras 12 horas e mais 3 µM de curcumina até 24 horas o efeito era sinérgico, diminuindo ainda mais a viabilidade celular quando comparados aos efeitos isolados e induzindo a apoptose. Adicionalmente, os autores encontraram um aumento da expressão de p21 no tratamento combinado comparado ao isolado, além do aumento da clivagem de PARP e expressão de caspase 3. Foi identificado ainda uma parada do ciclo celular na fase S, tanto para os tratamentos isolados quanto para os combinados, porém, neste último, com maior intensidade e acúmulo também de células na fase G1.

Ainda na literatura científica não foram encontrados estudos que demonstrassem o efeito antagônico da combinação de compostos bioativos e quimioterápicos em culturas de células de câncer de mama. O efeito sinérgico de compostos está sendo amplamente estudado como é demonstrado por YAACOB e colaboradores, 2014, demonstrando o efeito sinérgico da combinação da *Strobilanthes crispus* (planta medicinal) com tamoxifeno em culturas de células de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) e YU e colaboradores, 2012, confirmando o efeito sinérgico de uma lignana (isochaihulactona) com o paclitaxel em culturas de células de câncer de pulmão (A549 ou H1299).

5.9. Efeito da curcumina, piperina, melfalan e suas associações na viabilidade da célula não tumoral PBMC (células mononucleadas de sangue periférico)

Após observarmos o efeito citotóxico dos compostos bioativos e do melfalan isolados e associados em células mais resistentes de câncer de mama MDA-MB-231, investigamos a citotoxicidade das associações em células mononucleadas de sangue periférico (PBMC) humano. Para isso, as células PBMC (80% linfócitos) foram ajustadas para uma concentração de 1×10^6/mL, correspondente à concentração dessas células circulantes no sangue, e, posteriormente foi realizado o tratamento com concentrações que variaram de 5 a 150 µM e com os valores de $0{,}5xIC_{50}$ dos compostos associados na presença da fitohemaglutinina (PHA), na concentração de 5 µg/mL. No organismo humano, essas células se proliferam, no entanto, quando são mantidas em cultura para realização de experimentos *in vitro*, perdem essa capacidade proliferativa.

Os quimioterápicos atuam especialmente em células que proliferam, por isso, foi utilizado o PHA que é capaz de ativar linfócitos, fazendo-os proliferar, a fim de identificar se os compostos associados seriam tóxicos em células normais com capacidade proliferativa como observadas *in vivo* (BACELAR, 2014). Após incubação com os compostos por 24 horas, foi realizado o ensaio de redução de MTT (**Figura 19**).

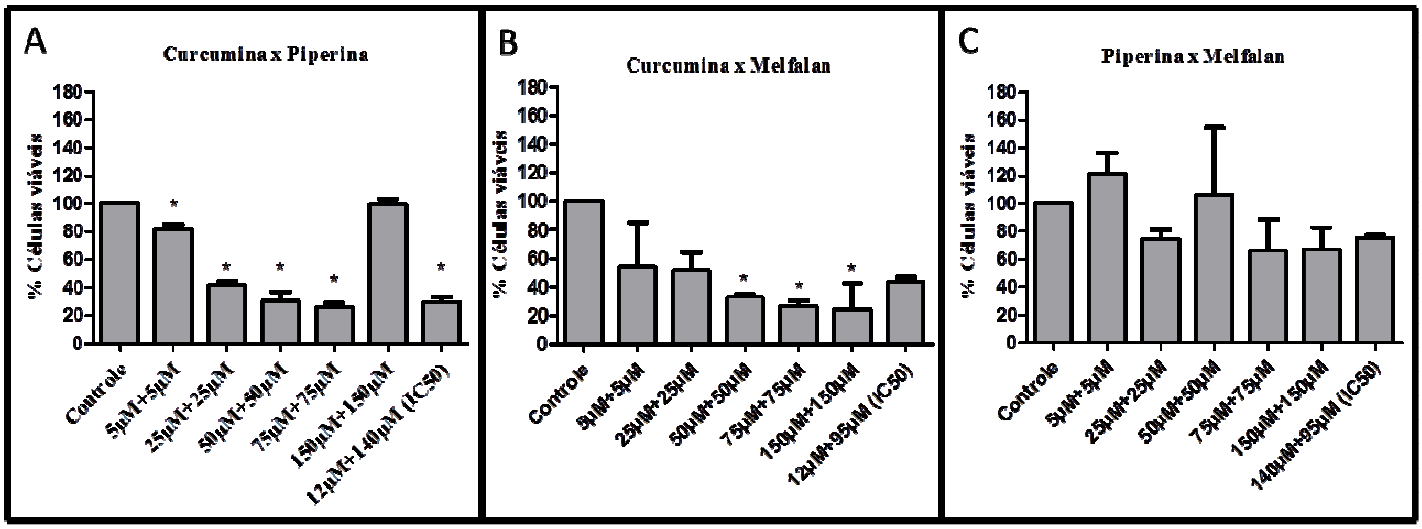

Figura 19. Efeito das associações dos compostos bioativos e do melfalan sobre a viabilidade das células PBMC. As células foram incubadas com 0,5 mg/mL de MTT por 3 horas a 37°C e com CO_2. Após a incubação, os cristais de formazan foram dissolvidos em DMSO. Viabilidade das células PBMC tratadas por 24 horas com diferentes concentrações das associações de 5+5 µM, 25+25 µM, 50+50 µM, 75+75 µM, 150+150 µM e 12+140 µM de curcumina mais piperina (A), 5+5 µM, 25+25 µM, 50+50 µM, 75+75 µM, 150+150 µM e 12+95 µM de curcumina mais melfalan (B) e 5+5 µM, 25+25 µM, 50+50 µM, 75+75 µM, 150+150 µM e 140+95 µM de piperina mais melfalan (C) ativadas por PHA (5 µg/mL). Os resultados são expressos como média e erro padrão (n=3). * $p < 0,05$ (One –way ANOVA seguido do teste de Tukey), comparado às células controle, ativadas por PHA. PBMC, células mononucleadas de sangue periférico. PHA, fitohemaglutinina.

Ao observarmos a associação dos compostos na citotoxicidade de células mononucleadas de sangue periférico, demonstramos que conforme aumentávamos a concentração da combinação, diminuíamos a viabilidade das células normais, principalmente para as associações de curcumina com piperina e curcumina com o melfalan. A associação de curcumina com piperina demosntrou diminuir a viabilidade das células normais, de maneira significativa em todas as concentrações, com excessão da combinação de 150+150 µM. Já a combinação de curcumina com melfalan, diminuiu a viabilidade das células normais de maneira significativa a partir das concentrações que associavam 50 µM dos compostos, porém a combinação utilizando os valores do IC_{50} não apresentou citotoxicidade.

A combinação de piperina com o melfalan apresentou em todas as suas concentrações uma redução, porém não significativa, de no máximo 34% de células viáveis (tratamentos com 75+75 µM e 150+150 µM) enquanto que a concentração referente ao valor do IC_{50} da linhagem cancerosa MDA-MB-231, apresentou um efeito citotóxico nas células normais de apenas 25%. O efeito combinado da piperina com o melfalan parece ser mais efetivo em células de câncer de mama e menos citotóxico em células normais de sangue periférico até então, não apresentando diferenças estáticas em nenhum tratamento realizado. Em um estudo prévio, nosso grupo de pesquisa verificou que o tratamento isolado de piperina, apresentava efeito tóxico nas células PBMC, sugerindo, com isso, que a combinação de piperina com o melfalan pode ser uma boa estratégia terapêutica *in vitro*.

YAACOB e colaboradores, 2015, demonstraram um efeito não tóxico (MCF-10A) da *Strobilanthes crispus* (planta medicinal) e de sua combinação com o tamoxifeno em um estudo com câncer de mama. Em outros modelos experimentais com células humanas como osteoblastos, fibroblastos e também células mamárias, a piperina apresentou efeito tóxico reduzido quando comparado com células de câncer, sugerindo que esse composto poderia ser um promissor agente terapêutico contra o câncer (ZHANG e colaboradores, 2015; YAFFE e colaboradores, 2014; GREENSHIELDS e colaboradores, 2015).

NORATTO e colaboradores, 2010, afirmaram que um extrato de polifenóis de diferentes cultivares de manga, apresentaou efeito supressor de tumor, em diferentes linhagens de câncer de pulmão, leucemia, câncer de mama, próstata e cólon, porém não afetou células normais, apresentando por isso um potencial na quimioprevenção.

Conclusões

6. Conclusões

- A curcumina isoladamente apresentou maior citotocixidade nas linhagens de câncer de mama, bloqueou o ciclo celular na fase G2/M com aumento na expressão da proteína p21 na linhagem MDA-MB-231;
- O melfalan isoladamente e sua associação com a curcumina foi capaz de induzir a apoptose na linhagem MDA-MB-231, provavelmente por aumento da expressão de PARP clivada;
- A associação de curcumina com piperina demonstrou bloquear o ciclo celular e induzir a apoptose nas células MDA-MB-231;
- A combinação de piperina com o melfalan reduziu de maneira mais expressiva a viabilidade celular nas menores concentrações, quando comparadas as outras associações, aumentou a expressão de p53 e p21, apresentou menor efeito antagônico dentre as associações e não apresentou citotoxicidade em células normais;
- A associação dos compostos manteve a eficácia da ação dos mesmos quando isolados, diminuindo sua citotoxicidade pela utilização da metade da concentração dos valores de IC_{50} destes isolados.

Referências

7. Referências bibliográficas

1. Aditya et al. (2014). Antiangiogenic effect of combined treatment with curcumin and genistein on human prostate cancer cell line. Journal of Funcional Foods, v8, p204-213.
2. Armstrong et al. (2002). Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line. Cell Death & Differentiation, v9, p252-63.
3. Athar et al. (2009). Multiple molecular targets of resveratrol: Anti-carcinogenic mechanisms. Archives of Biochemistry Biophysics, v486, n2: 95-102.
4. BACELAR (2014). Diferentes Formas de Matar. Tese (Doutorado em Química Biológica) – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
5. Bacelar, S. T. LQB 118: Diferentes Formas de Matar. Tese (Doutorado em Química Biológica) – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.
6. Bajad et al. (2003). Characterization of a new rat urinary metabolite of piperine by LC/NMR/MS studies. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v19, p413-421.
7. Belloc et al. (1996). Etude comparative de différentes techniques d'identification des cellules en apoptose par cytom trie en flux. Revue frangaise des laboratoires, v 287, p101-106.
8. Bhardwaj et al. (2002). Piperine, a major constituent of black pepper, inhibits human Pglycoprotein and CYP3A4. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v302, p645-650.
9. Bielawskal e Anchim. (2007). Amidine analogues of melphalan: synthesis, cytotoxic activity, and DNA binding properties. Archiv der Pharmazie - Chemistry Life Science, v340, p 251 – 257.
10. Bielawski et al. (2006). Novel amidine analogue of melphalan as a specific multifunctional inhibitor of growth and metabolism of human breast cancer cells. Biochemical Pharmacology, v72, p320-331.

11. Boaventura et al. (2015). Effect of in vitro digestion of yerba mate (Ilex paraguariensis A. St. Hil.) extract on the cellular antioxidant activity, antiproliferative activity and cytotoxicity toward HepG2 cells. Food Research International, Article in press, http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.004.

12. Capone et al. (2014). Synergistic Antitumor Effect of Doxorubicin and Tacrolimus (FK506) on Hepatocellular Carcinoma Cell Lines. The Scientific World Journal, Volume 2014, Article ID 450390, 9 pages.

13. Celis JE. (1998). Cell Biology: A laboratory Handbook. Capítulo 38, Segunda Edição, Academic Press, London.

14. Chakraborty et al. (2012). [6]-gingerol induces caspase 3 dependent apoptosis and autophagy in cancer cells: Drug-DNA interaction and expression of certain signal genes in HeLa cells. Molecular and cellular pharmacology, v694, p20-29

15. Chen et al. (2014). Curcumin inhibits proliferation of breast cancer cells through Nrf2-mediated down-regulation on Fen1 expression. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, v143, p11-18.

16. Chen et al. (2015). A new class of hybrid anticancer agents inspired by the synergistic effects of curcumin and genistein: Design, synthesis, and anti proliferative evaluation. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, In press. doi:10.1016/j.bmcl.2015.08.064.

17. Chipuk e Green. (2008). How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? Trends Cell Biol., v18, p157-164.

18. Choi e Park (2015). Curcumin enhances poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor sensitivity to chemotherapy in breast cancer cells. Journal of Nutritional Biochemistry. doi:10.1016/j.jnutbio.2015.07.015.

19. Chou et al. (2009). Capsaicin-induced apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through caspase-independent pathway. Oncology reports, v21, p 665-671.

20. Chou TC. (1991). The median-effect principle and the combination index for quantitation of synergism and antagonism. In Synergism and Antagonism in Chemotherapy, v86, p61-102.

21. Chou TC. (2006). Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. Pharmacological Reviews, v58, p621-681.

22. Chrzanowski, et al. (2003). Proline analogue of melphalan as a prodrug susceptible. IL Farmaco, v58, p 1113-1119.
23. Costa e Rosa. (2010). Alimentos funcionais – componentes bioativos e efeitos fisiológicos. Capítulo: Alimentos Funcionais e Câncer, p.445-457. Rio de Janeiro: Editora Rubio.
24. Costa, et al. (2009). Atividade antioxidante de pimentas do gênero Capsicum. Ciência Tecnologia de Alimentos, v30, p51-59.
25. Do et al. (2013). Antitumor efficacy of piperine in the treatment of human HER2-overexpressing breast cancer cells. Food Chemistry, v141, p2591-2599.
26. Donaldson MS. (2004). Nutrition and cancer: a review of the evidence for an anti-cancer diet. Nutrition Journal, v3, p1-21
27. Dong, et al. (2013). Combination of low dose of genistein and daidzein has synergistic preventive effects on isogenic human prostate cancer cells when compared with individual soy isoflavone. Food Chemistry, v14, p 923–1933.
28. Favaloro et al. (2012). Role of Apoptosis in disease. Aging, v4, p330-349.
29. Freitas et al. (2010). Principais mecanismos de oncogênese. Em: Bases moleculares em clínica médica. Editora Atheneu, São Paulo, v. 1, p. 555-571, 2010.
30. Fukui, et al. (2010). Resveratrol attenuates the anticancer efficacy of paclitaxel in human breast cancer cells in vitro and in vivo. European Journal of Cancer, doi:10.1016/j.ejca.2010.02.004.
31. Gali-Muhtasib et al. (2015). Cell death mechanisms of plant-derived anticancer drugs: beyond apoptosis. Apoptosis. 2015 Sep 11. [Epub ahead of print].
32. Greenshields et al. (2014). Piperine inhibits the growth and motility of triple-negative breast cancer cells. Cancer Letters, v357, p129-140.
33. Guimarães e Linden (2004). Programmed Cell Death. European Journal of Biochemistry, v271, p1638-1650.
34. Harmer V. (2008). Breast cancer. Part 2: present and future treatment modalities. British Journal of Nursing, v17, p 1028-1035.
35. Hartojo et al. (2010). Curcumin promotes apoptosis, increases chemosensitivity, and inhibits nuclear factor κb inesophageal adenocarcinoma. Translational Oncology, v3, p 99–108.

36. Heeba e Elghany (2010). Effect of combined administration of ginger (Zingiber officinale Roscoe) and at orvastatin on the liver of rats. Phytomedicine, doi:10.1016/j.phymed.2010.04.007.
37. Hsieh e Wu (2008). Suppression of cell proliferation and gene expression by combinatorial synergy of EGCG, resveratrol and γ-tocotrienol in estrogen receptor-positive MCF-7 breast cancer cells. International Journal of Oncology, v33, p 851-859.
38. Instituto Nacional do Câncer. (2010). Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama. Acessado em 22 de setembro de 2010.
39. Instituto Nacional do Câncer. (2015). Disponível em: http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322. Acessado em 19 de setembro de 2015.
40. Jain (2013). Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. Cell. Mol. Med., v17, p12-29.
41. Jia et al. (2014). The differential susceptibilities of MCF-7 and MDA-MB-231 cells to the cytotoxic effects of curcumin are associated with the PI3K/Akt-SKP2- Cip/Kips pathway. Cancer Cell International, v14, p1-14.
42. Kakarala et al. (2010). Targeting breast stem cells with the cancer preventive compounds curcumin and piperine. Breast Cancer Research and Treatment, v122, p777-785.
43. Kasala et al. (2015). Benzo(a)pyrene induced lung cancer: Role of dietary phytochemicals in chemoprevention. Pharmacological Reports, Article in press, http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2015.03.004.
44. Kastan e Bartek (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. Nature, v432, p316-323.
45. Khajuria et al. (2002). Piperine modulates permeability characteristics of intestine by inducing alterations in membrane dynamics: influence on brush border membrane fluidity, ultrastructure and enzyme kinetics. Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology, v9, p224–31.

46. Kim (2005). [6]-Gingerol, a pungent ingredient of ginger, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. Biochemical and Biophysical Research Communications, v335, p300–308.

47. Kindell (1984). Studies on selected genotoxic and toxic properties of piperine. Tese - Drexel University, Philadelphia.

48. Knappskog et al. (2015). Concomitant inactivation of the p53 and pRB-functional pathways predicts resistance to DNA damaging drugs in breast cancer in vivo. Molecular Oncology, v9, p1553-1564.

49. Koutsilieris et al. (1999). Chemotherapy cytotoxicity of human MCF-7 and MDA-MB 231 breast cancer cells is altered by osteoblast-derived growth factors. Molecular Medicine, v5, p86-97.

50. Kunnumakkara et al. (2008). Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. Cancer Letters, v269, p199–225.

51. Laemmli, UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, v227, p 680-685.

52. Lee et al. (2008). [6]-Gingerol inhibits metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells. Journal of Nutritional Biochemistry, v19, p313–319.

53. Lewis J. (2005). Your Guide to Breast Cancer. Hodder Arnold, Royal Society of Medicine, Great Britain – London.

54. Li e Sheng. Caspases in synaptic plasticity. Molecular Brain, v. 5, p. 1-6, 2012.

55. Li et al. (2011). Piperine, a piperidine alkaloid from Piper nigrum re-sensitizes P-gp, MRP1 and BCRP dependent multidrug resistant cancer cells. Phytomedicine, v19, p83-87.

56. Ling, et al. (2009). Molecular pharmacodynamics of PM02734 (elisidepsin) as single agent and in combination with erlotinib; synergistic activity in human non-small cell lung cancer cell lines and xenograft models. European Journal of Cancer, v45, p1855-1864.

57. Lowry et al. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, v193, p 265-275.

58. Madhwa et al. (2008). Synergistic action of dietary phyto-antioxidants on survival and proliferation of ovarian cancer cells. Gynecologic Oncology, v110, p432–438.

59. McCoy J. (2003). Chemotherapy as a treatment for breast cancer. In: Harmer V (ed). Breast Cancer Nursing Care and Management. Whurr Publishers, London.
60. McEligot et al. (2009). Diet and predictors of dietary intakes in women with family history of breast and/or ovarian cancer. Cancer Epidemiology, v33, p 419-423.
61. Meeran e Katiyar (2008). Cell cycle control as a basis for cancer chemoprevention through dietary agents. Bioscience, v13, p2191-2202.
62. Menna-Barreto, et al. (2007). Mitochondrial disruption and DNA fragmentation in Trypanosoma cruzi induced by naphthoimidazoles synthesized from beta-lapachone. Parasitology Research, v101, p 895-905.
63. Michael & Oren. (2002). The p53 and mdm2 families in cancer. Curr. Opin. Genet. Dev., v. 12, p. 53-59.
64. Michael e Oren (2002). The p53 and mdm2 families in cancer. Curr. Opin. Genet. Dev., v12, p53-59.
65. Milner et al. (2001) Molecular targets for nutrients involved with cancer prevention. Nutrition Cancer, v41, p1–16.
66. Mohanty e Sahoo (2010). The in vitro stability and in vivo pharmacokinetics of curcumin prepared as an aqueous nanoparticulate formulation. Biomaterials, v31, p6597-6611.
67. Mohapatra et al. (2015). Resveratrol and curcumin synergistically induces apoptosis in cigarette smoke condensate transformed breast epithelial cells through a p21 mediated inhibition of Hh-Gli signaling. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v66, p75-84.
68. Molavi et al. (2008). Resveratrol analog trans 3,4,5,4'-tetramethoxystilbene (DMU-212) mediates anti-tumor effects via mechanism different from that of resveratrol. Cancer Chemotherapy & Pharmacology, v63, p27-35.
69. Mossman T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods, v65, p 55–63.
70. Motiwala & Rangari (2015). Combined effect of paclitaxel and piperine on a MCF-7 breast cancer cell line in vitro: Evidence of a Synergistic interaction. Synergy, v2, p1-6.

71. Nair et al. (2007). Synergistic apoptosis of MCF-7 breast cancer cells by 2-methoxyestradiol and bis(ethyl)norspermine. Cancer Letters, v250, p311–322.
72. Nautiyal et al. (2011). Combination of dasatinib and curcumin eliminates chemo-resistant colon cancer cells. Journal of Molecular Signaling, v, n: 6-7.
73. Nigam et al. (2009). [6]-Gingerol induces reactive oxygen species regulated mitochondrial cell death pathway in human epidermoid carcinoma A431 cells. Chemico-Biological Interactions, v181, p77–84.
74. Noratto et al. (2010). Anticarcinogenic effects of polyphenolics from mango (Mangifera indica) varieties. Journal Agricultural and Food Chemistry, v58, p 4104-4112.
75. Organização Mundial da Saúde. (2008). Disponível em: http://www.who.int/features/qa/15/es/index.html. Acessado em 22 de setembro de 2010.
76. Ouyang et al. (2012). Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. Cell Prolif., v45, p487–498.
77. Patial et al. (2015). Synergistic effect of curcumin and piperine in suppression of DENA-induced hepatocellular carcinoma in rats. Environmental toxicology and Pharmacology, v40, p445-452.
78. Patil et al. (2009). Bioactive compounds: historical perspectives, opportunities, and challenges. J Agric Food Chem, v 57, p 8142-8160.
79. Pozo-Guisado, et al. (2002). The antiproliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB-231 human breast cancer cells: cell-specific alteration of the cell cycle. Biochemical Pharmacology, v64, p1375-86.
80. Pradeep et al. (1993). Common Indian spices: Nutrient composition, consumption and contribution to dietary value. Plant Foods for Human Nutrition, v44, p137-148.
81. Rivoire et al. (2001). Bases moleculares da oncogênese cervical. Revista Brasileira de Cancerologia, v47, p179-84.
82. Rothbarth et al. (2002). Modulation of cytostatic efficacy of melphalan by glutathione: mechanisms and efficacy. Chemico-Biological Interactions, v140, p93–107.
83. Russo et al. (1995). The etiopathogenesis of breast cancer prevention. Cancer Letters, v90, p81-89.

84. Samy e Gopalakrishnakone (2008). Therapeutic potential of plants as anti-microbials for drug discovery. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v7, p 283-294.
85. Sánchez et al. (2010). Curcumin stimulates reactive oxygen species production and potentiates apoptosis induction by the antitumour drugs arsenictrioxide and lonidamine in human myeloid leukaemia cell lines. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, Doi:10.1124/jpet.110.168344.
86. Selvendiran et al. (2005). Oral supplementation of piperine leads to altered phase II enzymes and reduced DNA damage and DNA-protein cross links in Benzo(a)pyrene induced experimental lung carcinogenesis. Molecular and Cellular Biochemistry, v268, p141–147.
87. Sen et al. (2004). Camptothecin induced mitochondrial dysfunction leading to programmed cell death in unicellular hemoflagellate Leishmania donovani. Cell Death & Differentiation, v11, p 924-36.
88. Shebaby et al. (2013). The antioxidant and anticancer effects of wild carrot oil extract. Phytotherapy Reserche, v27, p737-744.
89. Shoba, et al. (1998). Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. Plant Medicine, v64, p353–356.
90. Shukla et al. (2014). Epigenetic regulation by selected dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. Cancer letters, v 355, p9-17.
91. Simon et al. (1998). Inhibitory effect of curcuminoids on MCF-7 cell proliferation and structure–activity relationships. Cancer Letters, v129, p111–116.
92. Singh et al. (2009). Caspase Mediated Enhanced Apoptotic Action of Cyclophosphamide and Resveratrol-Treated MCF-7 Cells. Journal of Pharmacological Sciences, v109, p 473-485.
93. Srinivasan K. (2005). Role of spices beyond food flavoring: Nutraceuticals with multiple health effects. Food Reviews International, v21, n2:167–188.
94. Srinivasan K. (2007). Studies on the in vitro absorption of spice principles curcumin, capsaicin and piperine in rat intestines. Food and Chemical Toxicology, v 45, p1437–1442.
95. Suhr YJ. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. Nature Reviews Cancer, v3, p 768 – 780.

96. Suresh et al. (2007). Effect of heat processing of spices on the concentrations of their bioactive principles: Turmeric (curcuma longa), red pepper (Capsicum annuum) and black pepper (Piper nigrum). Journal of food composition and analysis, v20, p346-351.

97. Surh (1999). Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. Mutation Research, v428, p305–327.

98. Sutherland et al. (1983). Tamoxifen induces accumulation of MCF-7 human mammary carcinoma cells in the G0/G1 phase of the cell cycle. European Journal of Cancer and Clinical Oncology, v19, p 615-621.

99. Toma, et al. (1997). Synergistic effect between doxorubicin and a low dose of all-transretinoic acid in MCF-7 breast cancer cell line. Cancer Letters, v116, p103-110.

100. Torricelli et al. (2011). Synergic effect of a-tocopherol and naringenin in transglutaminase-induced differentiation of human prostate cancer cells. Amino Acids, v41, p1207-1214.

101. Towbin et al. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proceedings of the National Acaddemy of Sciences, v76, p4350-4354.

102. Tuoya et al. (2006). Apoptosis induction by dohevanil, a DHA substitutive analog of capsaicin, in MCF-7 cells. Life Sciences, v78, p1515 – 1519.

103. Vahrmeijer et al. (2000). Increased local cytostatic drug exposure by isolated hepatic perfusion: a phase I clinical and pharmacologic evaluation of treatment with high dose melphalan in patients with colorectal cancer confined to the liver. Br. J. Cancer, v82, p1539–1546.

104. Vargo-Gogola e Rosen. (2007). Modelling breast cancer: one size does not fit all. Nature Publishing Group, v7, p659-672.

105. Vatansever, et al. (2009). Propolis from Turkey induces apoptosis through activating caspases in human breast carcinoma cell lines. Acta Histochemica, doi:10.1016/j.acthis.2009.06.001.

106. Verhoef et al. (2007). Isolated Limb Perfusion with Melphalan and TNF-a in the Treatment of Extremity Sarcoma. Current Treatment Options in Oncology, v8, p417–427.

107. VERMEULEN et al (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. Cell Prolif., v36, p131–149.

108. Vincent e Gatenby. (2008). An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. Int J of Oncol, v32, p729-737.

109. Viscomi e D'Amelio. (2012). The "Janus-Faced Role" of Autophagy in Neuronal Sickness: Focus on Neurodegeneration. Mol Neurobiol v 46, p513–521.

110. Wang et al. (2004). Annexin-I expression modulates drug resistance in tumor cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, v314, n:565–570

111. Wang et al. (2007). Synergistic effects of retinoic acid and tamoxifen on human breast cancer cells: Proteomic characterization. Experimenta Cell Research, v313, p 357-368.

112. Wang et al. (2010). The carotenoid lycopene differentially regulates phase I and II enzymes in dimethylbenz[a]anthracene-induced MCF-7 cells. Nutrition, doi:10.1016/j.nut.2009.11.013.

113. Way et al. (2009). Beneficial effects of different tea flowers against human breast cancer MCF-7 cells. Food Chemistry, v114, p1231–1236.

114. Wen et al. (2012). Caspase-mediated programmed cell death pathways as potential therapeutic targets in cancer. Cell Prolif., v45, p217–224.

115. Whitaker JF. (1969). A general colorimetric procedure for the estimation of enzymes which are linked to the NADH/NAD+ system. Clinica Chimica Acta, v24, p 23-27.

116. Yaffe et al. (2014). Piperine, an alkaloid from black pepper, inhibits growth of human colon cancer cells via G1 arrest and apoptosis triggered by endoplasmic reticulum stress. Molecular Carcinogenesis, v54, p 1070-85.

117. Yang & Liu. (2009). Synergistic effect of apple extracts and quercetin 3-β-d-glucoside combination on antiproliferative activity in MCF-7 human breast cancer cells *in vitro*. J. Agric. Food Chem., v57, p8581–8586.

118. Yang, et al. (2007). Caspase-3 status is a determinant of the differential responses to genistein between MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells. Biochimica et Biophysica Acta, v1773, p903–911.

119. Yang, et al. (2010). Genotoxic effect of 6-gingerol on human hepatoma G2 cells. Chemico-Biological Interactions, v185, p12-17.

120. YIN et al. (2014). Synergistic and Antagonistic Drug Combinations Depend on Network Topology. Plos One, v9, p e93960.

121. Yu et al. (2012). Synergistic Anti-Tumor Activity of Isochaihulactone and Paclitaxel on Human Lung. Journal of Cellular Physiology, v227, p213-222.

122. Zaman et al. (2014). Targeting the Apoptosis Pathway in Hematologic Malignancies. Lymphoma,v55, p1980–1992.

123. Zhang et al. (2015). Piperine inhibits proliferation of human osteosarcoma cells via G2/M phase arrest and metastasis by suppressing MMP-2/-9 expression. International Immunopharmacology, v.24, p.50-58.

124. Zhang et al. (2015). Piperine inhibits proliferation of human osteosarcoma cells via G2/M phase arrest and metastasis by suppressing MMP-2/9 expression. International Immunopharmacology, v24, p50-58.

Anexo I

Synergistic Effect of Curcumin and Quercetin 3-β-D-Glucoside on Antiproliferative Activity in MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells

Polinati, R.M.[a]; Fialho, E.[a]; Liu, R.H[b*]

[a] Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Departamento de Nutrição Básica e Experimental, Avenida Carlos Chagas Filho, 393 RJ 21941-902, Brazil

[b] Department of Food Science, Cornell University, Stocking Hall, Cornell University, Ithaca, NY 14853-7201, United States

*Address correspondence to this author at the Department of Food Science, Stocking Hall, Cornell University, Ithaca, NY 14853-7201 [telephone (607) 255-6235; fax (607) 254-4868; e-mail: RL23@cornell.edu].

ABSTRACT

Breast cancer is the most frequently diagnosed cancer in women. An alternative strategy to reduce the risk of cancer is through dietary modification. Although phytochemicals naturally occur as complex mixtures, little information is available regarding possible additive, synergistic, or antagonistic interactions among these compounds. The antiproliferative activity of curcumin and quercetin 3-β-D-glucoside (Q3G) was assessed by measurement of the inhibition of MDA-MB-231 human breast cancer cell proliferation. Cell cytotoxicity was determined by the methylene blue assay. The two-way combination of curcumin plus Q3G was conducted. In this two-way combination, the EC_{50} values of curcumin and Q3G were 2- and 5-fold lower, respectively, than those of curcumin and Q3G alone. The combination index (CI) values at 50% inhibition rates were 0.55. The dose-reduction index (DRI) values of the curcumin and Q3G to achieve a 50% inhibition effect were reduced by 2.7 and 5.4-fold, respectively. The results suggest that curcumin plus Q3G combination possesses a synergistic effect in MDA-MB-231 cell proliferation.

1. Introduction

Breast cancer is the cancer type that affects a lot of women in worldwide. Approximately 1.67 million of new cancer cases were expected, representing 25% of all cancer types diagnosed in women. The complexity of breast cancer etiology is rooted in multifactorial components (endogenous and exogenous) that interact with each other and can be affected by diet, weight and body mass, parity, menopause, family history of breast/ovarian cancer, among others (1).

McEligot et al. (2009) affirm that women with a family history of breast or ovarian cancer should be encouraged to consume a diet based on plant foods, high in fiber, folate, carotenoids and others anticarcinogenic substances to prevent these cancers (2). Additionally, in recent years, many investigations with epithelial breast cancer cells have demonstrated that their biochemical pathways can be modulated by bioactive compounds (3).

Among functional foods as preventive of non-communicable diseases, spices were good candidates. Turmeric is a spice from Indian and possesses polyphenol curcumin as an active ingredient. This spice has been used for long time in cooking and in treating a variety of inflammatory conditions. Several studies have shown your property to interfere in cellular signaling mechanisms involved in the cell cycle, apoptosis, proliferation, angiogenesis, metastasis and inflammation, thus exhibiting a therapeutic potential against various cancers (4). Piperine is an alkaloid isolated from *Piper nigrum* and *Piper longum*. It has been shown that piperine has anti-mutagenic and anti-tumor effects. However, the preventive effects of piperine as a single agent in relation to breast cancer have not yet been explored. In addition, piperine may be able to increase the bioavailability of certain drug therapies as well as other phytochemicals (5).

Quercetin 3-glycosides (Q3G), chlorogenic acid, catechin, epicatechin and their dimers, phloridzin, and cyanidin 3-glycosides are the main individual phenolics found in apples. Apple consumption has been linked to a lowered risk of cancer, coronary heart disease, type II diabetes, asthma, and pulmonary function problems (6). Recently, a study focused on the investigation of apple intake and the risk of different cancers in Italy (7); it was found that there is a consistent inverse relationship between apple consumption and risk of various cancers such as those of the breast and prostate.

Liu et al., 2005, reported that, corresponding to doses in human consumption of one, three, and six apples a day, the whole apple extracts prevent mammary cancer in rats in a dose-dependent manner (8). In 2009, Yang and Liu, shows that quercetin 3-

glycosides had an important anticancer effects and inhibit the proliferation of breast cancer cells when was used isolated or in a combination with apple extracts (9).

Carcinogenesis is generally recognized as a multi-step process, in which occur cellular and molecular changes. During the past three decades, there has been a progress in identifying events that are associated with multiple stages of carcinogenesis. The dietary phytochemicals may act in these processes operating in both chemoprevention and chemotherapy and it is suggested that when used in combination, there could be an increase in the activity, enhancing their action or a synergistic action, acting in various molecular processes with different activity profiles. However, studies are still inconclusive and emphasize the immediate need to establish more profiles of efficacy and toxicity in relation to the bioactive compounds combination and so use them as the basis of synergistic combinations (10).

To test the hypothesis that the combination of phytochemicals is responsible for enhance the health benefit, a two-way combination of curcumin plus Q3G was designed. The objective ~~for~~ of this study was to determine whether the curcumin in combination with Q3G have antagonist, additive and/or synergistic effects on MDA-MB-231 human breast cancer cell proliferation.

2. Material and Methods

2.1. Chemicals

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl) - 2-(4-sulfenyl)-2H tetrazolium (MTS), quercetin 3-β-D-glucoside (Q3G) curcumin and piperine, and other chemicals were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis,MO). Dimethyl sulfoxide (DMSO) was purchased from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ). All chemicals used in this study were of analytical grade. All data collected were reported as means ± SD for at least three replications.

2.2. Cytotoxicity Measurement

Cell cytotoxicity was assessed by using the methylene blue assay (11, 12). The rationale here is that the maximum combined concentration of curcumin plus Q3G could be delivered, but without any cytotoxicity. Briefly, MDA-MB-231 human breast cancer cells (American Type Culture Collection, ATCC, Rockville,MD) were seeded at 4×10^4 cells/well into a 96-well plate and incubated for 24 h. The cells were then treated with different concentrations of curcumin (1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100 μM),

piperine (0.5, 1, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300 μM), Q3G (1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100 μM), curcumin plus Q3G (6.25+8.87μM, 12.5+17.7 μM, 18.75+26.6 μM, 25+35.5 μM, 31.25+44.4 μM) or control for 24 h, respectively. For experimental analysis, the growth medium was removed, and the wells were rinsed with PBS. Fifty microliters of Hanks Balanced Salt Solution (HBSS: 1.25% glutaraldehyde and 0.6% methylene blue) was added into each well to fix and stain the cells for 1 h. The 96-well plate was rinsed several times by immersion in Milli-Q water after removal of HBSS. At the end of treatment, 100 μL of elution solution (PBS plus 50% of ethanol and 1% of acetic acid) was added, and cells were incubated for 0.5 h with gentle rotation at room temperature. Absorbance was read at 570 nm using a MRX Microplate Reader (Dynex Technologies, Chantilly, VA).

2.3. Inhibition of MDA-MB-231 Cell Proliferation

The antiproliferative activity of curcumin, piperine, and Q3G toward MDA-MB-231 breast cancer cells was assessed by the colorimetric MTS assay (MTS-based cell titer 96 non radioactivity cell proliferation assay) (Promega, Madison, WI) reported previously (13, 14). Briefly, MDA-MB-231 cells were maintained in Alpha Minimum Essential Medium (MEM-R), containing 10 mM HEPES, 0.01 mg/mL insulin, 50 units/mL penicillin, 50 μg/mL streptomycin, 100 μg/mL gentamicin, and 10% fetal bovine serum (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY). MDA-MB-231 cells were maintained in a 5% CO_2/37°C incubator. MDA-MB-231 cells were seeded in 96-well flat-bottom plates at 2.5 x10^4 cells. Proliferation was measured by the ability of viable cells to reduce MTS to formazan. After 4 h of incubation, the growth medium was removed and media containing various concentrations of curcumin (1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100 μM), piperine (0.5, 1, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300 μM), Q3G (1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100 μM), curcumin plus Q3G (6.25+8.87μM, 12.5+17.7 μM, 18.75+26.6 μM, 25+35.5 μM, 31.25+44.4 μM), or control were added to the cells. After 96 h, cell proliferation was determined using the MTS assay measuring absorbance at 490 nm. Antiproliferation was measured as percent compared to control, and all measurements were conducted in triplicate. The effective median dose (EC_{50}) was determined and expressed as micromolarity of curcumin, micromolarity of piperine or micromolarity of Q3G.

2.4. Experimental Design of Combination Study

A two-way combination of curcumin plus Q3G toward MDA-MB-231 cell proliferation was designed. The EC_{50} values of curcumin and Q3G were determined on the basis of the dose-response curve. According to each EC_{50} value, a series of concentrations at different ratios of EC_{50} were tested. For curcumin or Q3G, the combined concentrations used were 0.25 x EC_{50}, 0.5 x EC_{50}, 0.75 x EC_{50}, 1.0 x EC_{50}, and 1.25 x EC_{50}. Finally, a series of concentrations of curcumin and Q3G were mixed to generate the dose-response curve in the MDA-MB-231 cell proliferation model. The combination effects were analyzed by the combination index (CI) as described below.

2.5. Combination Index for Determining Addition, Synergism, and Antagonism

The CI based on the classic isobologram equation (15) has been used for data analysis of two-way combination as $CI = ((D)_1/(Dx)_1)+ ((D)_2/(Dx)_2)$, where $(D)_1$ and $(D)_2$ are the doses of curcumin and Q3G, respectively, in the combination system; $(Dx)_1$ and $(Dx)_2$ are the doses of curcumin and Q3G alone, respectively. For data analysis of combinations, CI<1, CI=1, and CI>1 indicate synergistic, additive, or antagonistic effects, respectively (15, 16).

2.6. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using Minitab Student Release 12 (Minitab Inc., State College, PA) and Sigma Stat Version 8.0 (Jandel Corp., San Raphael, CA). Results were subjected to ANOVA, and differences between means were located using Tukey's multiple-comparison test. Significance was determined at $p< 0.05$. All data were reported as the mean $\pm$ SD of three replications.

3. Results and discussion

3.1. Cytotoxicity

The cytotoxicity of curcumin, piperine, and Q3G toward the growth of MDA-MB-231 human breast cancer cells in vitro are shown in **Figure 1**, **Figure 2**, and **Figure 3**, respectively. There was no cytotoxicity in Q3G toward MDA-MB-231 cells at the maximum level of 100 μM. Cytotoxicity was detected in the curcumin and piperine treatments, showing cytotoxicity EC_{50} of 50 μM to curcumin and 257 μM to piperine.

Piperine presents the high cytotoxicity effect when compared with others compounds, thus not considered a good compound for combination.

3.2. Inhibition of MDA-MB-231 Cell Proliferation

The antiproliferative activities of curcumin, piperine, and Q3G, toward the growth of MDA-MB-231human breast cancer cells in vitro are presented in **Figure 1A, B,** and **C**. The antiproliferative activities of two-way combination of curcumin plus Q3G toward the growth of MDA-MB-231 human breast cancer cells in vitro are presented in **Figure 2**. Curcumin inhibited the MDA-MB-231 cell proliferation at doses of 20-100 μM ($p<0.05$), but no differences was shown from doses of 30-100 μM. The EC_{50} value of curcumin in inhibiting MDA-MB-231 cell proliferation was 24 μM (**Table 1**), exhibiting a significant antiproliferative activity against MDA-MB-231 cells when compared with piperine and Q3G. Piperine no exhibited significant antiproliferative activity against MDA-MB-231 cells at any doses tested (0.5-300 μM) (**Figure 1B**). Q3G exhibited antiproliferative activity against MDA-MB-231 cells at doses of 50-100 μM ($p < 0.05$) in a dose-dependent manner (**Figure 1C**). The EC50 value of Q3G in inhibiting MDA-MB-231 cell growth was 71μM.

Two-way combination of curcumin plus Q3G significantly increased antiproliferative activity toward the growth of MDA-MB-231 human breast cancer cells in vitro when compared to the curcumin and Q3G alone (**Figure 2**). The EC50 values of curcumin and Q3G in the two-way combination were reduced to 8.85 and 13.22 μM, respectively (**Table 1**), which were 2- and 5-fold lower than those of curcumin and Q3G alone. A maximum of 30% cytotoxicity was observed in the two-way combination of curcumin and Q3G at 18.75 μM plus 26.6 μM concentrations tested in MDA-MB-231 cells.

3.3. Combination Index (CI) for Curcumin and Q3G

The combination effect of curcumin plus Q3G was expressed through CI and dose-reduction index (DRI). The CI and DRI values of this two-way combination effect were calculated on the basis of the method reported previously (15). The DRI is a measure of how much the dose of each component, in a synergistic combination, may be reduced at a given effect level compared with the doses for each component alone. The DRI is important in clinical situations, where dose-reduction leads to lowered toxicity toward the host while retaining the therapeutic efficacy. The DRI values at

different inhibition rates in MDA-MB-231 cell growth are presented in **Table 1**. The DRI values of curcumin and Q3G at the 50% of inhibition of MDA-MB-231 cell growth were 2.7 and 5.4-fold when compared to the values of curcumin and Q3G alone. The CI value at 50% of inhibition in MDA-MB-231 cell growth was calculated on the basis of the median-effect plot and is presented in **Table 1**. The CI values of the two-way combination of curcumin and Q3G at 50% inhibition of MDA-MB-231 cell growth was 0.55, indicating that there was a synergistic effect at all concentrations tested.

Yang and Liu, 2009, on the basis of the study of cytotoxicity and cell proliferation of apple extracts and Q3G alone, the two-way combination of apple extracts plus Q3G was tested in MCF-7 cells showed that apple extracts in combination with Q3G had a strong synergistic effect toward MCF-7 cell proliferation *in vitro* (17). Patial et al. (2015) using a combination of curcumin plus piperine shows better suppression of hepatocellular carcinoma DENA-induced in rats in contrast to curcumin used alone (18).

Other studies are showing the effect of drug combinations in cancer cells, for exemple, Capone et al. (2014) confirmed that doxorubicin and tacrolimus cotreatment induced a synergistic antiproliferative effect compared to treatment with drugs, administered individually as demonstrated by median drug effect analysis calculating the combination index (CI) and the dose reduction index (DRI) with CalcuSyn software on hepatocellular carcinoma cell lines (19). Yun et al. (2013), showed the synergistic effect between Sorafenib (a RAF inhibitor) and HS-173 (a novel PI3K inhibitor) to gain insight into novel therapeutic strategies for treating pancreatic cancer and shows that combined treatment of the two drugs synergistically inhibited the viability of Panc-1 cells (combination index < 1). Concomitantly, the co-treatment induced G2/M arrest and increased apoptosis with the loss of mitochondrial membrane potential. Apoptosis results from the co-treatment was accompanied by increased levels of cleaved caspase-3 and PARP as well as greater numbers of TUNEL-positive apoptotic cells compared to treatment with either drug alone. Furthermore, combined treatment with these drugs decreased the expression of HIF-1α and VEGF which play an important role in angiogenesis and concluded that the combined administration of these two drugs may be considered to be a new therapeutic regimen for treating pancreatic cancer (20).

A study on colorectal cancer cell lines and cancer stem cells using a combination of curcumin with dasatinib showed synergistic interactions of these compounds after analysis by CalcuSyn and concluded that this drug combination therapy is highly

effective in proliferation inhibition of stem cells in colon cancer primary tumors resistant to chemotherapy. In addition, they concluded that the combination of curcumin is a strategy to reduce drug cytotoxicity (21).

Mohapatra et al, 2015 evaluated the effects of resveratrol and curcumin isolated and combined in breast cancer cell cultures transformed by cigarette smoke (MCF-10A-Tr). Cells were treated with 30 μM of curcumin and with 30 μM of resveratrol for 24 hours. For the combination, cells were treated with 3 μM of resveratrol in the first 12 hours and with 3 μM of curcumin to another 24 hours and observed that the combined treatment showed synergistic effect, further decreasing cell viability and inducing apoptosis (22).

The health benefits of fruits and vegetables are likely due to the additive and synergistic effects of an array of phytochemicals, rather than to a single compound alone. The reasons may be due partially to the loss of purified compounds, the loss of their bioactivity, or the possibility that they may not behave the same as in whole food (21). In addition, these compounds differ in molecular size, polarity, and solubility, which may affect their bioavailability and distribution in different subcellular organelles, cells, tissues, and organs. Other explanations of the contradictory results between observational studies and randomized trials could be the fact that the doses used in clinical trials have been much higher than normally consumed in foods. Consumers may gain more significant health benefits from whole foods in their balanced diet than from dietary supplements, which do not contain the same array of complex compounds (23).

CONCLUSIONS

This study demonstrates a synergistic effect of curcumin and Q3G in MDA-MB-231 cell proliferation model. Our findings with curcumin and Q3G combination have an important implication in the chemoterapy of cancer, as one experimental study to trigger future clinical trials. While further investigation on other unknown phenolics and the interaction effect of different phytochemicals are worthy to be conducted in the future work to elucidate the underlying mechanisms of combination effects of bioactive components in breast cancer.

REFERENCES

1. Russo, et al. (1995). The etiopathogenesis of breast cancer prevention. Cancer Letters, v90, p81-89.
2. McEligot, et al. (2009). Diet and predictors of dietary intakes in women with family history of breast and/or ovarian cancer. Cancer Epidemiology, v33, p 419-423.
3. Wang, et al. (2010). The carotenoid lycopene differentially regulates phase I and II enzymes in dimethylbenz[a]anthracene-induced MCF-7 cells. Nutrition, v26, p11-12.
4. Mohanty e Sahoo (2010). The in vitro stability and in vivo pharmacokinetics of curcumin prepared as an aqueous nanoparticulate formulation. Biomaterials, v31, p6597-6611.
5. Kakarala, et al. (2010). Targeting breast stem cells with the cancer preventive compounds curcumin and piperine. Breast Cancer Research and Treatment, v122, p777-785.
6. Boyer e Liu (2004). Apple phytochemicals and their health benefits. Nutrition Journal, v3, p5.
7. Gallus et al. (2005). Does an apple a day keep the oncologist away? Ann. Oncol., v16, p1821–1844.
8. Liu, et al. (2005). Apples prevent mammary tumors in rats. J. Agric. Food Chem., v53, p2341–2343.
9. Yang e Liu. (2009). Synergistic effect of apple extracts and quercetin 3-β-d-glucoside combination on antiproliferative activity in MCF-7 human breast cancer cells *in vitro*. J. Agric. Food Chem., v57, p8581–8586.
10. Hsieh e Wu (2008). Suppression of cell proliferation and gene expression by combinatorial synergy of EGCG, resveratrol and γ-tocotrienol in estrogen receptor-positive MCF-7 breast cancer cells. International Journal of Oncology, v33, p 851-859.
11. Wolfe et al. (2007). Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. J. Agric. Food. Chem., v 55, p8896–8907.
12. Felice et al. (2009). A modified methylene blue assay for accurate cell counting. Journal of Funcional Foods, v1, p109–118.

13. Sun et al. (2012). Cycle arrest and apoptosis in MDA-MB-231/Her2 cells induced by curcumin. European Journal of Pharmacology, v690, p22-30.
14. Liu e Sun (2003). Antiproliferative activity of apples is not due to phenolic-induced hydrogen peroxide formation. J. Agric. Food Chem., v51, p1718–1723.
15. Yang et al. (2004). Varietal differences in phenolic content, and antioxidant and antiproliferative activities of onions. J. Agric. Food Chem., v52, p6787–6793.
16. Chou, T.-C. (1991). The median-effect principle and the combination index for quantitation of synergism and antagonism. In Synergism and Antagonism in Chemotherapy; Chouand, T.-C., Rideout, D. C., Eds.; Academic Press: Orlando, FL; pp 61-102.
17. Chou et al. (1994). Computerize quantitation of synergism and antagonism of taxol, topotecan, and cisplatin against human teratocarcinoma cell growth: a rational approach to clinical protocol design. J. Natl. Cancer Inst., v 86, p1517–1524.
18. Patial et al. (2015). Synergistic effect of curcumin and piperine in suppression of DENA-induced hepatocellular carcinoma in rats. Environmental toxicology and Pharmacology, v40, p445-452.
19. Capone et al. (2014). Synergistic antitumor effect of doxorubicin and tacrolimus (FK506) on hepatocellular carcinoma cell lines. The Scientific World Journal, Volume 2014, Article ID 450390, 9 pages.
20. Yun et al. (2013). Synergistic anticancer activity of HS-173, a novel PI3K inhibitor in combination with sorafenib against pancreatic cancer cells. Cancer Letters, v331, p250–261.
21. Nautiyal et al. (2011). Combination of dasatinib and curcumin eliminates chemo-resistant colon cancer cells. Journal of Molecular Signaling, v6, p1-11.
22. Mohapatra et al. (2015). Resveratrol and curcumin synergistically induces apoptosis in cigarette smoke condensate transformed breast epithelial cells through a p21 mediated inhibition of Hh-Gli signaling. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v66, p75-84.
23. Liu, R. H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. J. Nutr., v134, p3479S–3485S.

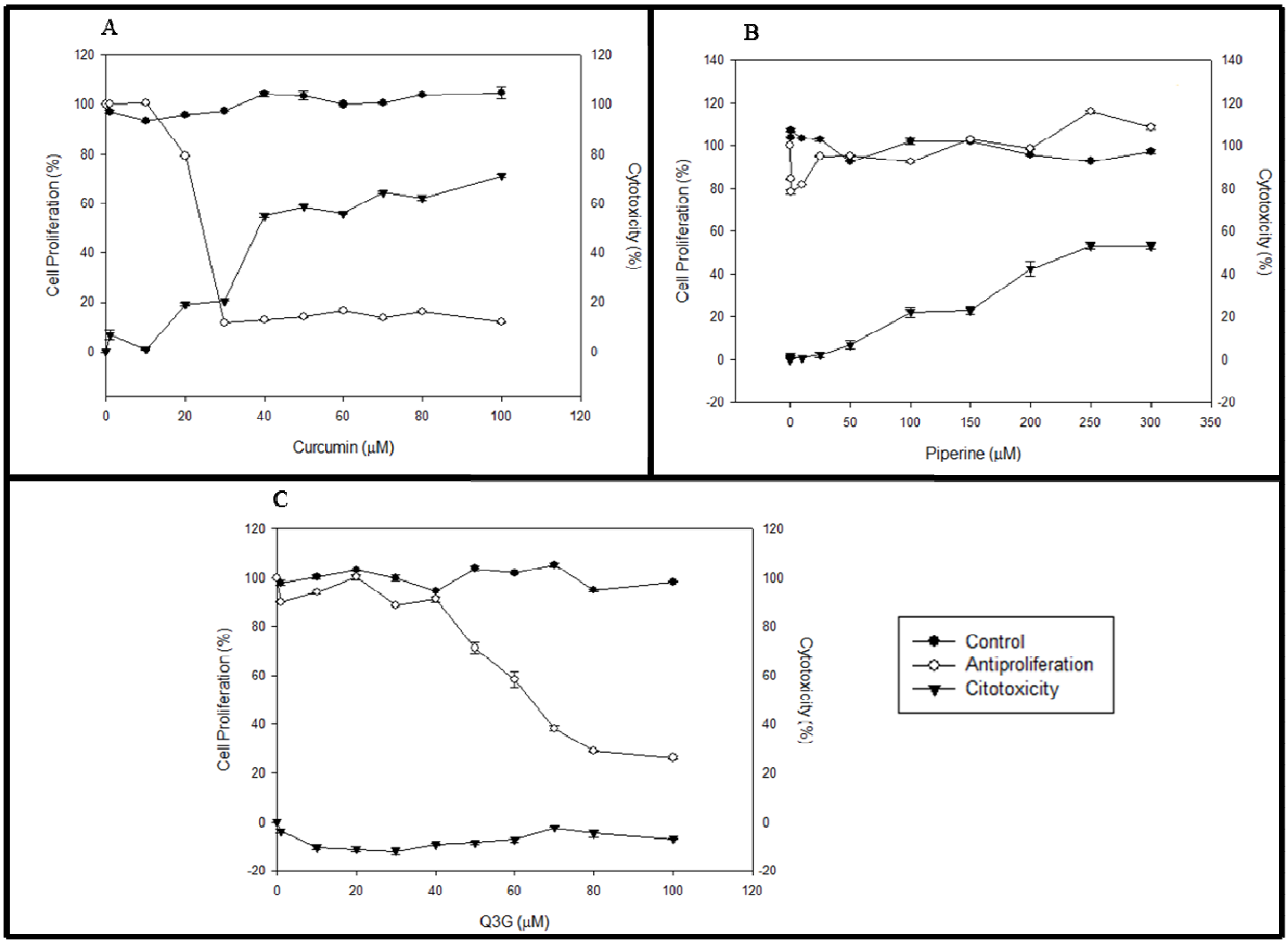

Figure 1: Effect of curcumin, piperin, and Q3G on cytotoxicity and proliferation of MDA-MB-231. (A) Curcumin cytotoxicity and proliferation; (B) Piperine cytotoxicity and proliferation; and (C) Q3G cytotoxicity and proliferation.

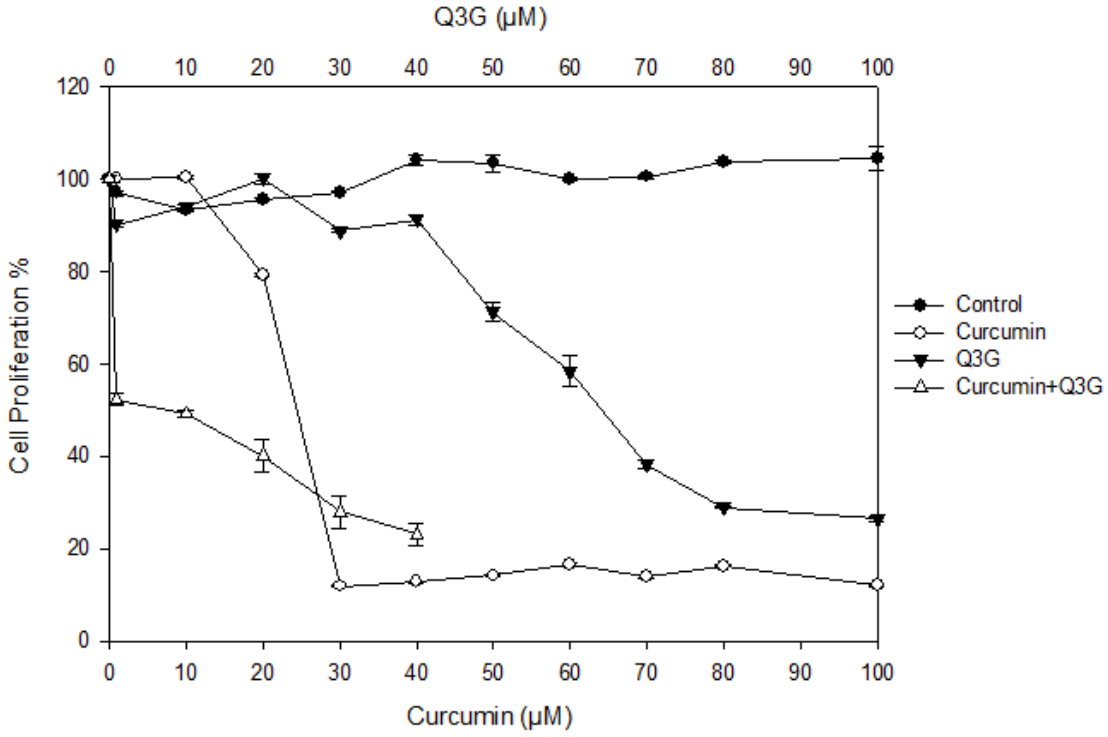

Figure 2: Synergistic interactions between curcumin and Q3G in inhibition of MDA-MB-231 breast cancer cell proliferation (mean± SD, n = 3).

Table 1: EC_{50} values and DRI of curcumin, Q3G, and curcumin in combination with Q3G in inhibiting MDA-MB-231 cell growth. Combination index (CI) and the dose reduction index (DRI)

	EC_{50} Value (µM)		
	Single	**Combined**	**DRI**
Curcumin	24	8.85	2.7
Q3G	71	13.22	5.4
CI	0.55		
Effect	Synergistic		